



**Rúben Carlos Ferreira Raposo**

Licenciado em Engenharia de Materiais

## **Nanoestruturas Orgânicas Anfífilas: Síntese e Caracterização**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia de Materiais

Orientador: Professora Doutora Maria Teresa Barros, Professora  
Associada com Agregação, Faculdade de Ciências e  
Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Professor Doutor João Paulo Borges, Professor  
Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade  
Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor João Pedro Botelho Veiga  
Arguente: Prof. Doutora Paula Manuela Lopes Correia da Silva  
Vogais: Prof. Doutora Maria Teresa Barros da Silva  
Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2013



## **Nanoestruturas Orgânicas Anfífilas: Síntese e Caracterização**

Copyright © Rúben Carlos Ferreira Raposo, 2013.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

Agradeço à professora Maria Teresa Barros todo o apoio durante a realização desta dissertação. Sem o seu apoio, incentivo e sugestões não teria sido possível concluir este trabalho.

Ao Professor João Paulo Borges, meu co-orientador e coordenador de curso, agradeço a sua disponibilidade e capacidade de solucionar a maioria dos problemas, sempre com o intuito de melhor funcionamento do curso. Quero agradecer também a todos os professores do DCM sem exceção. E com um particular agradecimento ao professor Rodrigo Martins e à professora Elvira Fortunato pelo desenvolvimento tecnológico conseguido, de forma a elevar o nível da ciência no nosso país, da nossa Faculdade e em particular do curso de Engenharia de Materiais.

Ao professor Christopher D. Maycock, pela sua disponibilidade e por todas as sugestões apresentadas no âmbito da construção da autoclave feita no decorrer deste trabalho.

Ao professor Jorge Caldeira, pela sua generosidade e disponibilidade, em relação à utilização do seu AFM.

A todos os meus colegas de laboratório, pela companhia e pelo ambiente familiar criado. Um agradecimento especial à mestre Carina Crucho, por todo o apoio e conselhos científicos, que ajudaram na realização da parte experimental e também na elaboração da dissertação. Ao João Avó, agradeço a sua disponibilidade e todas as explicações científicas.

Aos meus amigos de curso Tiago Brehm, Marisa Ferreira, Joana Duarte, João Oliveira, Filipe Silvestre, Anselmo Gomes, João Rodrigues, Salomé Moço e João Fonseca, por todo o companheirismo e amizade, enfim por todo tempo passado junto. Em especial quero agradecer ao Sérgio Silva, por toda a ajuda desde o início da licenciatura.

Ao Tomé Vicente, Celina Vicente e Ana Vicente, agradeço todo o carinho e amizade.

À Daniela Vicente, devo um agradecimento muito especial, por tudo o que já passamos, pelo seu apoio incondicional, pela sua amizade e amor, sem ela tudo seria mais difícil.

Ao meu irmão, agradeço a paciência e amizade única.

Não é por ser o último agradecimento que é menos importante, muito pelo contrário, o melhor vem sempre no fim. Por isso quero agradecer profundamente aos meus pais, por tudo o que sou hoje e por sempre acreditarem em mim.



## Resumo

O desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos coloca um grande desafio à descoberta de novos nanomateriais. No entanto, na natureza a nanotecnologia é frequentemente utilizada, onde nanoarquiteturas poliméricas desempenham um papel central em sistemas biológicos.

Os principais objetivos ao longo do trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado concentraram-se na síntese de nanopartículas orgânicas com potencial aplicação em sistemas de veiculação de fármacos. Para esse efeito, produziram-se nanoestruturas a partir de polímeros anfífilos sintetizados com base na incorporação de 3 unidades diferentes, nomeadamente de poli(etileno glicol) (PEG), uma unidade de sacarose e um derivado de colesterol.

Os polímeros sintetizados foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de massa (MALDI – TOF) e polarimetria. O comportamento dos polímeros em solução aquosa foi estudado por espectroscopia de fluorescência, utilizando pireno como sonda fluorescente.

Os métodos de síntese das nanopartículas utilizados foram: o método de emulsificação com evaporação do solvente, nanoprecipitação e fluido supercrítico. Para a realização do último método foi construída uma autoclave artesanal, de forma a ter o CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico.

As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por dispersão dinâmica de luz (DLS), microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

As nanopartículas poliméricas obtidas pelo método de nanoprecipitação apresentaram diâmetros médios de 90 nm e morfologia esférica. No entanto, a tecnologia de fluidos supercríticos, apesar de ter conduzido a diâmetros médios ligeiramente superiores (150 nm) às do método anteriormente referido, deverá ser uma técnica com elevado potencial, uma vez que não é necessária a utilização de solventes orgânicos, constituindo por isso um processo alternativo mais verde.

**Palavras-Chave:** Nanopartículas Poliméricas, Fluidos Supercríticos, Nanoprecipitação, Emulsificação, Sacarose, PEG, Ácido Cólico.



## Abstract

The development of new therapeutic systems constitutes a major challenge in the discovery of new nanomaterials. On the other hand, nanotechnology is often used in nature, where polymeric nanoarchitectures play a central role in biological systems.

The main objective of this master thesis was the synthesis of organic nanoparticles with potential application in drug delivery systems. In this study, nanostructures were prepared from amphiphilic polymeric conjugates composed of poly (ethylene glycol) (PEG), containing a sugar moiety (sucrose) and a cholesterol derivative.

The synthesized polymers were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectroscopy (MALDI – TOF) and polarimetry. Fluorescence spectroscopy (FS), using pyrene as a fluorescent probe, was applied in order to study the self-aggregation behaviour of the conjugates in aqueous solution.

The nanoparticles were prepared by different methods: emulsification with solvent evaporation, nanoprecipitation and supercritical fluid. To perform the last method a handmade autoclave was built, to use CO<sub>2</sub> in its supercritical fluid.

The obtained nanoparticles were characterized by dynamic light scattering (DLS), atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM).

Polymeric nanoparticles with an average diameter of 90 nm and spherical morphology were obtained by the nanoprecipitation method. Through supercritical fluid technology, polymeric nanoparticles with an average diameter slightly greater were obtained (150 nm). However, this is a high potential technology because it avoids the use of organic solvents, providing a greener method.

**Keywords:** Polymeric Nanoparticles, Supercritical Fluids, Nanoprecipitation, Emulsification, sucrose, PEG, cholic acid.



## Abreviaturas

$^{13}\text{C}$ RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
$^1\text{H}$ RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
$\zeta$	Potencial zeta
(n)	Massa molecular média
(o/a)	Óleo em água
(% p/p)	Porcentagem em peso/peso
$[\alpha]_D^{20^\circ}$	Rotação óptica, risca D do Sódio (589 nm) e à temperatura de 20°
$\lambda_{\text{max}}$	Comprimento de onda máximo
$\delta$	Desvio químico
Ac	Grupo acetilo
Ar	Grupo aromático
AFM	Microscopia de força atômica
AcOEt	Acetato de etilo
BHE	Barreira hematoencefálica
Bn	Grupo Benzilo
CAC	Concentração associação crítica
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
CP	Ponto Crítico
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DLS	Dispersão dinâmica de luz
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMF	Dimetilformamida
FS	Fluido supercrítico
ESD	Emulsificação difusão solvente
eq.	Equivalente
HMQC	Espectroscopia de correlação heteronuclear a uma ligação
HMBC	Espectroscopia de correlação heteronuclear a múltiplas ligações
M	Molar
m	Multiplete
MALDI – TOF	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matrix tempo-de-voo
MWCO	Taxa de admissão de peso molecular
N	Normalidade
NPPs	Nanopartículas poliméricas
$P_c$	Pressão crítica
ppm	Partes por milhão
PAA	Poli(ácido acrílico)
PBCA	Poli(butil cianoacrilato)
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)

PE	Polietileno
PEI	Poli(etilenoimina)
PEG	Poli(etileno glicol)
p.f.	Ponto de fusão
PGA	Poli(ácido glicólico)
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(láctido-co-glicólido)
pH	Potencial de hidrogénio
PMMA	Poli(metilmetacrilato)
PS	Poli(estireno)
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
s	Singuleto
Sac.	Sacarose
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
T <sub>c</sub>	Temperatura crítica
t.a.	Temperatura ambiente
TBDPSCI	Terc-butildifenilclorossilano
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina
TBAF	Fluoreto de tetrabutílamónio
TEA	Trietilamina
TEM	Microscopia eletrónica de transmissão
TMS	Tetrametilsilano
TP	Ponto triplo

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>v</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>xi</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xxi</b>
<b>Índice de Compostos sintetizados</b> .....	<b>xxiii</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>3</b>
<b>Capítulo I – Introdução</b> .....	<b>4</b>
I.1 Nanotecnologia.....	5
I.1.1 Nanomateriais .....	5
I.1.2 Nanopartículas .....	5
I.1.3 Exemplos de polímeros utilizados em sistemas de veiculação de fármacos .....	6
I.2 Métodos de preparação das nanopartículas .....	9
I.2.1 Nanoprecipitação.....	10
I.2.2 Emulsificação com métodos de remoção do solvente .....	10
I.2.3 Emulsificação com evaporação do solvente .....	11
I.2.4 Emulsificação com difusão do solvente (EDS).....	11
I.2.5 Emulsificação de <i>Salting out</i> Reverso .....	12
I.2.6 Diálise.....	13
I.2.7 Tecnologia de Fluidos Supercríticos .....	13
I.3 Áreas de Aplicação.....	15
I.3.1 Terapias Oncológicas .....	16
I.3.2 Administração Pulmonar .....	17
I.3.3 Vacinas e Genética .....	17
I.3.4 Oftalmológicas.....	18
I.4 Técnicas de Caracterização .....	19
I.4.1 Dispersão Dinâmica de Luz.....	19
I.4.2 Microscopia de Força Atômica .....	19
I.4.3 Microscopia Eletrônica de Varrimento.....	19
I.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	20
I.4.5 Espectroscopia de Fluorescência .....	20
<b>Capítulo II – Discussão de Resultados</b> .....	<b>21</b>
II.1 Preâmbulo .....	22
II.2 Síntese e Caracterização dos Polímeros Conjugados .....	23
II.3 Análise por Dispersão Dinâmica de Luz.....	29

II.4	Análise por Microscopia de Força Atômica .....	32
II.4.1	Diferentes métodos para a Sac. – PEG 400 – Cólico .....	32
II.4.1.1	Emulsificação com Evaporação do Solvente .....	32
II.4.1.2	Nanoprecipitação .....	32
II.4.1.3	CO <sub>2</sub> Líquido .....	33
II.4.1.4	Tecnologia de Fluidos Supercríticos .....	34
II.4.2	Diferentes métodos para a Sac. – PEG 6000 – Cólico .....	36
II.4.2.1	Emulsificação com evaporação do Solvente .....	36
II.4.2.2	Nanoprecipitação .....	36
II.4.2.3	CO <sub>2</sub> Líquido .....	37
II.4.2.3	CO <sub>2</sub> Líquido .....	37
II.5	Análise por Microscopia Eletrônica de Varrimento .....	38
II.6	Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	39
II.7	Espectroscopia de Fluorescência .....	40
II.8	Conclusões e Perspectivas Futuras .....	42
<b>Capítulo III</b>	<b>– Parte Experimental .....</b>	<b>44</b>
III.1	Procedimentos Gerais .....	45
III.2	Síntese do composto Ácido Cólico Benzilado .....	46
III.2.1	Síntese do composto Metil 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ – tri-hidroxi – 5 $\beta$ – colanato (1) .....	46
III.2.2	Síntese do composto Metil 3 $\alpha$ – O – benzil – 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ – di-hidroxi – 5 $\beta$ – colanato (2) .....	46
III.2.3	Síntese do composto 3 $\alpha$ – O – benzil – 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ – di-hidroxi – 5 $\beta$ – colanato (3) .....	47
III.3	Síntese do composto 6' – O – (3-carboxipropanoil) – 1',2,3,3',4,4',6 – hepta – O – benzil sacarose .....	48
III.3.1	Síntese do composto 6' – O – terc-butildifenilsilil sacarose (4) .....	48
III.3.2	Síntese do composto 1',2,3,3',4,4',6 – hepta – O – benzil – 6' – O – terc-butildifenilsilil sacarose (6) .....	48
III.3.3	Síntese do composto 1',2,3,3',4,4',6 – hepta – O – benzil sacarose (7) .....	49
III.3.4	Síntese do composto 6' – O – (3-carboxipropanoil) – 1',2,3,3',4,4',6 – hepta – O – benzil sacarose (8) .....	50
III.4	Método Geral para a Síntese do composto Sac. – PEG – Cólico .....	50
III.4.1	Síntese do composto 6' – O – (3-carboxipropanoil) – 1',2,3,3',4,4',6 – hepta – O – benzil sacarose com o PEG (9) ou (10) .....	50
III.4.2	Síntese do composto Sac. – PEG – Cólico Benzilado (11) ou (12) .....	52
III.4.3	Síntese do composto Sac. – PEG – Cólico (13) ou (14) .....	53
III.5	Método de Preparação das Nanopartículas .....	54
III.5.1	Emulsificação com Evaporação do Solvente .....	54
III.5.2	Nanoprecipitação .....	54
III.5.3	Tecnologia de Fluido Supercrítico .....	55
III.5.3.1	Descrição da Autoclave .....	55

III.6	Caraterização morfológica das NPPs por AFM, SEM e TEM .....	58
III.7	Métodos de preparação das amostras para a Espetroscopia de Fluorescência....	58
<b>Capítulo IV – Bibliografia.....</b>		<b>59</b>
<b>Anexos .....</b>		<b>64</b>
Anexo 1 – Esquema geral da síntese processada .....		65
Anexo 2 – Espetros do composto (1) .....		66
Anexo 3 – Espetros do composto (2) .....		67
Anexo 4 – Espetros do composto (3) .....		68
Anexo 5 – Espetros do composto (4) .....		69
Anexo 6 – Espetros do composto (6) .....		70
Anexo 7 – Espetros do composto (7) .....		71
Anexo 8 – Espetros do composto (8) .....		72
Anexo 9 – Espetros do composto (9) .....		73
Anexo 10 – Espetros do composto (10) .....		74
Anexo 11 – Espetros do composto (11) .....		75
Anexo 12 – Espetros do composto (12) .....		76
Anexo 13 – Espetros do composto (13) .....		77
Anexo 14 – Espetros do composto (14) .....		79



## Índice de Figuras

<b>Figura I-1</b> – Representação esquemática de nanopartículas poliméricas utilizadas em estratégias de distribuição de fármacos. Os fármacos ou são aprisionados no interior ou adsorvidos sobre a superfície (adaptado [7]).....	6
<b>Figura I-2</b> – Estruturas das cadeias repetitivas dos seguintes polímeros: <b>(a)</b> PLA; <b>(b)</b> PGA; <b>(c)</b> PCL; <b>(d)</b> PAA .....	6
<b>Figura I-3</b> – Estruturas das cadeias respetivas aos seguintes polímeros: <b>(a)</b> Dextrano; <b>(b)</b> Quitosano; <b>(c)</b> Ácido Hialurónico.....	7
<b>Figura I-4</b> – Estrutura da Sacarose, com indicação dos dois monossacarídeos e a respetiva ligação glicosídica .....	7
<b>Figura I-5</b> – Geometria molecular em diferentes meios: <b>(a)</b> solvente orgânico e <b>(b)</b> água .....	8
<b>Figura I-6</b> – Estrutura geral de esteroides .....	9
<b>Figura I-7</b> – Estrutura do <b>(a)</b> colesterol e do <b>(b)</b> ácido cólico .....	9
<b>Figura I-8</b> – Representação esquemática do método de nanoprecipitação, o surfatante* é opcional (adaptado [31]) .....	10
<b>Figura I-9</b> – Representação esquemática da técnica de emulsificação com evaporação do solvente (adaptado [8]) .....	11
<b>Figura I-10</b> – Representação esquemática do método de difusão do solvente de emulsão. Em 1 o solvente hidrossolúvel está saturado com água. Em 2 a água saturada com o solvente orgânico. No 3 a fase orgânica composta por polímero (2% p/p) e óleo (5% p/p) em (10 mL) da fase 1. No 4 a fase aquosa constituída por água (40 mL) e surfatante (2,5% p/p). O 5 mostra a emulsificação e por fim no 6 tem-se a diluição com 200 ml de água (adaptado [9]) .....	12
<b>Figura I-11</b> – Representação esquemática da técnica de <i>salting out</i> (adaptado [8]) .....	12
<b>Figura I-12</b> – Representação esquemática do método de osmose que é a base para a preparação das NPPs, 1 – Suspensão polimérica; 2 – Solvente; 3 – Agitador; 4 – Membrana de Diálise (adaptado [10]) .....	13
<b>Figura I-13</b> – Diagrama de fases, Temperatura – Pressão, para o CO <sub>2</sub> . CP – Ponto crítico; TP – Ponto triplo; P <sub>C</sub> – Pressão crítica; T <sub>C</sub> – Temperatura crítica [59] .....	14
<b>Figura I-14</b> – Estruturas de alguns fármacos encapsulados com alguma frequência: <b>(a)</b> muramil dipéptido; <b>(b)</b> hexapéptido da arginina; <b>(c)</b> tamoxifeno; <b>(d)</b> paclitaxel; <b>(e)</b> 9-nitrocaptopotecina; <b>(f)</b> dexametasona.....	16
<b>Figura I-15</b> – Estruturas das cadeias respetivas aos seguintes polímeros: <b>(a)</b> PEG; <b>(b)</b> PLGA; <b>(c)</b> PMMA; <b>(d)</b> PS; <b>(e)</b> PBCA; <b>(f)</b> PEI .....	18
<b>Figura II-1</b> – Reação de esterificação do ácido cólico, em meio ácido .....	23
<b>Figura II-2</b> – Mecanismo proposto para a reação de benzilação do grupo hidroxilo na posição 3 do composto <b>(1)</b> .....	24
<b>Figura II-3</b> – Reação de hidrólise do grupo éster no composto <b>(2)</b> .....	24
<b>Figura II-5</b> – Mecanismo proposto para a reação de silição régio-seletiva do hidroxilo 6' da sacarose.....	25
<b>Figura II-6</b> – Reação de benzilação dos grupos hidroxilos não protegidos do composto <b>(4)</b> .....	26

<b>Figura II-7</b> – Mecanismo proposto para a reação de remoção do grupo protetor (OTBDPS) do composto <b>(6)</b> .....	26
<b>Figura II-8</b> – Mecanismo proposto para a reação de esterificação do composto <b>(7)</b> , com anidrido succínico .....	27
<b>Figura II-9</b> – Mecanismo proposto para a reação de acoplamento do PEG com o composto <b>(8)</b> , para n=9 e n=136, que correspondem ao composto <b>(9)</b> e <b>(10)</b> , respetivamente.....	28
<b>Figura II-10</b> – Reação de acoplamento entre o composto <b>(9)</b> e <b>(3)</b> , e ainda entre o composto <b>(10)</b> e <b>(3)</b> .....	28
<b>Figura II-11</b> – Reação de hidrogenação do composto <b>(11)</b> ou <b>(12)</b> .....	29
<b>Figura II-12</b> – Caracterização da distribuição de tamanhos das partículas, para o método de Fluido Supercrítico, e filtrado uma vez.....	31
<b>Figura II-13</b> – Caracterização da distribuição de tamanhos das partículas, para o CO <sub>2</sub> líquido, e filtrado uma vez.....	31
<b>Figura II-14</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 30 x 30 µm .....	32
<b>Figura II-15</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 12 x 12 µm .....	32
<b>Figura II-16</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 30 x 30 µm .....	33
<b>Figura II- 17</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 15 x 15 µm .....	33
<b>Figura II-18</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 40 x 40 µm .....	34
<b>Figura II-19</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 20 x 20 µm .....	34
<b>Figura II-20</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 10 x 10 µm .....	35
<b>Figura II-21</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 3 x 3 µm .....	35
<b>Figura II-22</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 40 x 40 µm .....	36
<b>Figura II-23</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 20 x 20 µm .....	36
<b>Figura II-24</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 5 x 5 µm .....	36
<b>Figura II-25</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 15 x 15 µm .....	37
<b>Figura II-26</b> – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 10 x 10 µm .....	37
<b>Figura II-27</b> – Imagem SEM de nanopartículas compostas pelo polímero Sac – PEG 6000 – Cólico, através do método de nanoprecipitação .....	38

<b>Figura II-28</b> – Imagem SEM de nanopartículas compostas pelo polímero Sac – PEG 400 – Cólico, através do método de FSC .....	38
<b>Figura II-29</b> – Imagem TEM de nanopartículas compostas pelo polímero Sac – PEG 400 – Cólico, através do método FSC .....	39
<b>Figura II-30</b> – Espectro de Fluorescência no estado excitado do pireno/Sac. – PEG 6000 – Cólico, em função da concentração de polímero conjugado (Sac. – PEG 6000 – Cólico). Para um comprimento de onda de excitação constante, 339 nm.....	40
<b>Figura II-31</b> – Gráfico da variação da concentração em função da área (integração dos espectros da Fig. II-41), para determinação do CAC .....	41
<b>Figura III-1</b> – Corpo da Autoclave, em perfil e planta, respetivamente	55
<b>Figura III-2</b> – Cabeça da Autoclave, em perfil e planta, respetivamente.....	56
<b>Figura III-3</b> – Suporte de anilha para a Autoclave, em perfil e planta, respetivamente.....	56
<b>Figura III-4</b> – Manómetro para a Autoclave, em representação frontal e lateral, respetivamente .....	56
<b>Figura III-5</b> – Representação 3D da montagem da Autoclave .....	57
<b>Figura III-6</b> – Autoclave .....	57

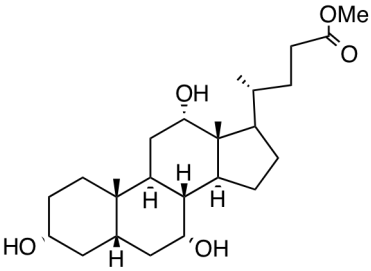
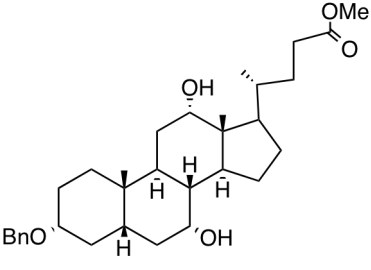
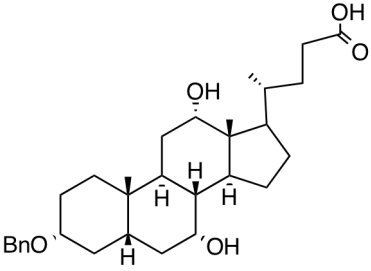
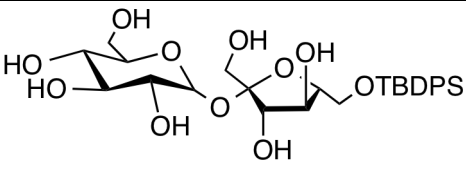
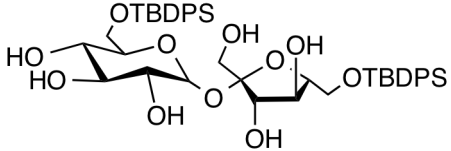
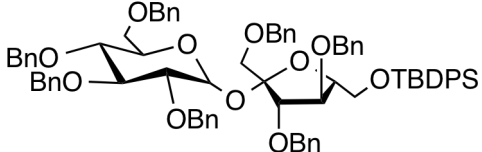
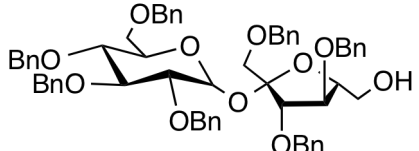


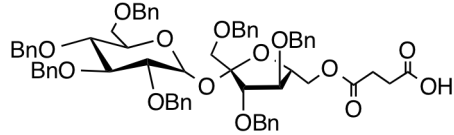
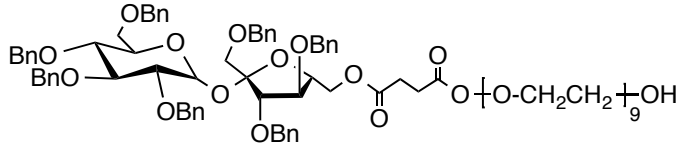
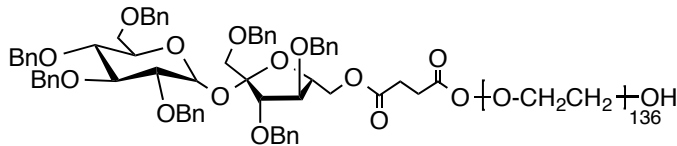
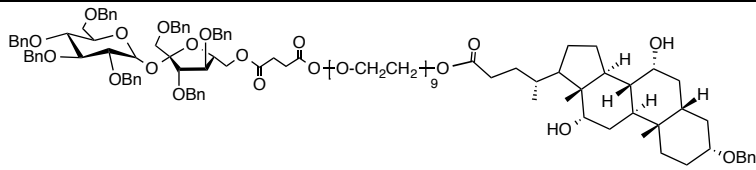
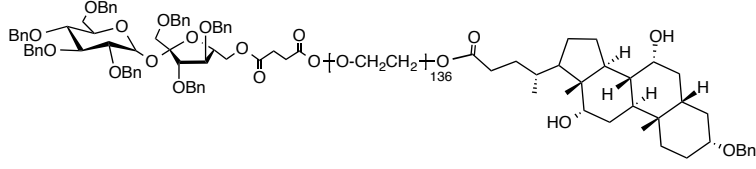
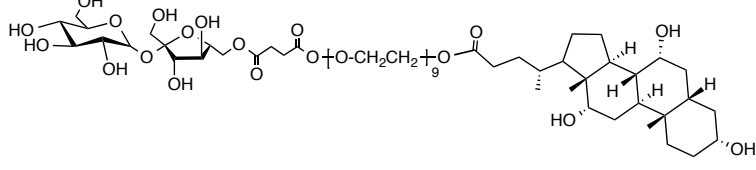
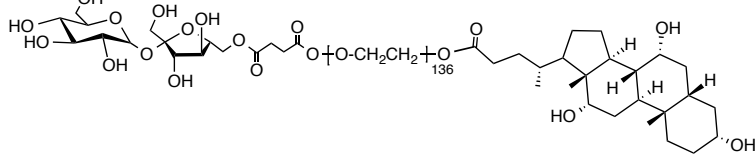
## Índice de Tabelas

<b>Tabela I-1</b> – Alguns solventes e as suas propriedades críticas (adaptado [60]) .....	15
<b>Tabela I-2</b> – Mostra as diferenças entre gases, fluidos supercríticos e líquidos, em termos de densidade, difusividade e viscosidade (adaptado [61]) .....	15
<b>Tabela I-3</b> – Sistema de entrega de fármaco com nanopartículas poliméricas (adaptado [2]) ..	18
<b>Tabela II-1</b> – Características físico – químicas determinadas por DLS para as suspensões coloidais, para a concentração de 5 mg/mL .....	29
<b>Tabela II-2</b> – Características físico – químicas determinadas por DLS para as suspensões coloidais, para o método de nanoprecipitação, fazendo variar as concentrações.....	30



## Índice de Compostos sintetizados

Número do Composto	Estrutura do Composto	Pag.
(1)		22,44
(2)		23,45
(3)		23,46
(4)		24,46
(5)		24
(6)		25,47
(7)		25,48

(8)		26,48
(9)		27,49
(10)		27,49
(11)		27,50
(12)		27,50
(13)		28,52
(14)		28,52





## Objetivos

Os principais objetivos ao longo do trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado concentraram-se na síntese de nanopartículas orgânicas com potencial aplicação em sistemas de veiculação de fármacos. Para esse efeito, produziram-se nanoestruturas a partir de polímeros anfífilos sintetizados com base na incorporação de 3 unidades diferentes, nomeadamente de poli(etileno glicol) (PEG), uma unidade de sacarose e um derivado de colesterol.

Os polímeros sintetizados foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de massa (MALDI – TOF) e polarimetria. O comportamento dos polímeros em solução aquosa foi estudado por espectroscopia de fluorescência, utilizando pireno como sonda fluorescente.

Os métodos de síntese das nanopartículas utilizados foram: o método de emulsificação com evaporação do solvente, nanoprecipitação e fluido supercrítico. Para a realização do último método foi construída uma autoclave artesanal, de forma a ter o CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico.

As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por dispersão dinâmica de luz (DLS), microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e microscopia eletrónica de transmissão (TEM).

## Capítulo I – Introdução

## I.1 Nanotecnologia

Com o avanço da interdisciplinaridade nas áreas de Química e Ciência dos Materiais existe um crescente interesse no desenvolvimento e aplicação de estruturas à escala nanométrica. O estudo de moléculas e agregados com esta dimensão só é possível devido aos recentes avanços no domínio da instrumentação analítica, que permitem uma análise estrutural mais detalhada e compreensão das propriedades a nível molecular. O interesse fundamental das nanoestruturas reside no facto da sua dimensão atribuir-lhes um grau significativo de funcionalidade com novas propriedades à nanoescala [1].

### I.1.1 Nanomateriais

Existe um grande desafio para a descoberta de nanomateriais com o intuito de desenvolver novos sistemas terapêuticos. No entanto, na natureza a nanotecnologia é frequentemente utilizada, onde nanoarquitecturas poliméricas desempenham um papel central nos sistemas biológicos. A eficiência da natureza na construção e montagem dos seus blocos básicos constituintes, de forma versátil na escala submicrométrica, têm impulsionado químicos sintéticos a desenvolver nanoestruturas procurando mimetizar a natureza [2].

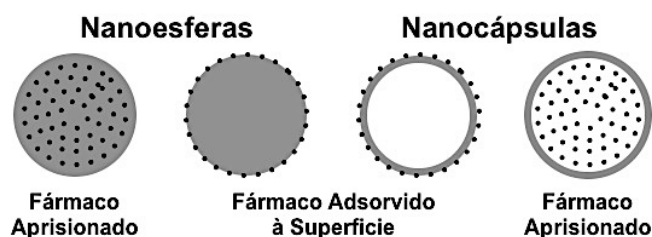
Nos últimos anos, um esforço significativo tem sido dedicado ao desenvolvimento da nanotecnologia para aplicações biológicas e médicas [2-4]. Por exemplo, constata-se um crescente potencial no diagnóstico e terapêutica de doenças, o qual passa pela aplicação de polímeros biodegradáveis, nanopartículas, ciclodextrinas, dendrímeros, lipossomas e lípidos baseados em *nanocarriers* (sistemas de partículas coloidais), nanofibras, nanofios e nanotubos de carbono [5].

### I.1.2 Nanopartículas

As nanopartículas quando utilizadas em sistemas de veiculação de fármacos têm vantagens notáveis, tais como: a capacidade de passar através dos vasos capilares de menor dimensão devido ao seu pequeno volume, evitando a deteção pelo sistema mononuclear fagocitário, permitindo uma duração prolongada no fluxo sanguíneo e por conseguinte reduzir a quantidade de fármaco necessária para se observar o efeito terapêutico; penetrar nas células e nos tecidos para chegar aos órgãos alvo, tais como fígado, baço, pulmão, medula espinal e linfa; eventuais propriedades de libertação controlada; melhorar a utilidade dos fármacos através de uma distribuição mais seletiva dos mesmos, com consequente aumento do índice terapêutico e redução dos efeitos secundários tóxicos [6].

As nanopartículas poliméricas (NPPs) têm sido utilizadas para a veiculação de fármacos e/ou biomoléculas. De acordo com a literatura, de uma forma geral as NPPs utilizadas têm dimensões entre 10 a 1000 nm e possuem várias morfologias, tais como nanoesferas, nanocápsulas, nanomicelas, nanolipossomas e nanofármacos, etc [6].

Como sistema de veiculação de fármacos as nanopartículas podem aprisionar fármacos ou biomoléculas nas suas estruturas e/ou adsorve-las sobre a superfície exterior (Fig. I-1). As nanopartículas têm sido amplamente utilizadas na veiculação de fármacos, polipeptídeos, proteínas, vacinas, ácidos nucleicos, genes, etc [6].



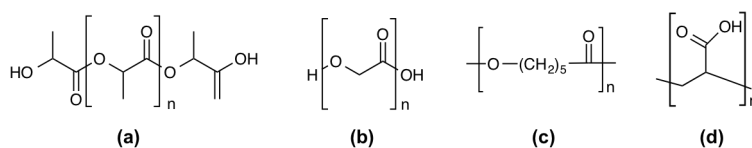
**Figura I-1** – Representação esquemática de nanopartículas poliméricas utilizadas em estratégias de distribuição de fármacos. Os fármacos ou são aprisionados no interior ou adsorvidos sobre a superfície (adaptado [7])

As pesquisas feitas nesta área têm-se concentrado essencialmente em quatro aspetos: (1) seleção e combinação de materiais de suporte para obter a velocidade apropriada de libertação de fármaco; (2) modificação da superfície das nanopartículas para melhorar a sua capacidade de direcionamento, consoante o alvo pretendido; (3) otimização dos métodos de preparação das nanopartículas para que haja a possibilidade de produção à escala industrial; (4) investigação de um processo dinâmico *in vivo* para revelar a interação das nanopartículas com o organismo e direcioná-las para os tecidos e órgãos [6].

Alguns aspetos diferentes sobre as NPPs foram analisados por vários grupos de investigação. Pinto Reis *et al.* fez uma excelente revisão em 2006, concentrando-se nos vários métodos de síntese e encapsulamento de diferentes moléculas bioativas em NPPs [8]. Kumari *et al.* resumiu os efeitos do encapsulamento de diferentes fármacos em várias NPPs biodegradáveis [7]. Procedimentos para produção em massa de formulações farmacêuticas, tratamento pós síntese e estudo de métodos para a obtenção de nanopartículas marcadas *in vitro* e *in vivo*, foram revistos por Vauthier e Bouchemal [9]. Rao e Geckeler, em 2011, publicaram um artigo de revisão sobre diferentes técnicas de preparação de diferentes NPPs, dando particular destaque ao controlo do tamanho das partículas em função de vários parâmetros [10].

### I.1.3 Exemplos de polímeros utilizados em sistemas de veiculação de fármacos

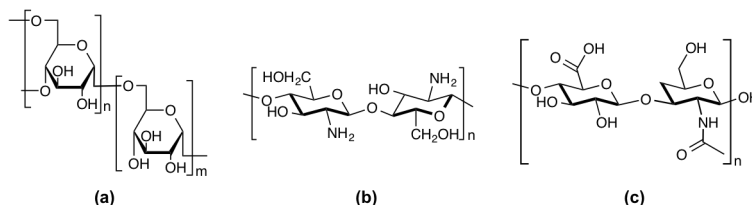
Os materiais poliméricos utilizados na preparação de nanopartículas para a veiculação de fármacos deverão ser biocompatíveis e biodegradáveis. Encontram-se descritos na literatura vários materiais poliméricos usados com este objectivo, nomeadamente: poli(ácido láctico) (PLA) (Fig. I-2 (a)), poli(ácido glicólico) (PGA) (Fig. I-2 (b)), policaprolactona (PCL) (Fig. I-2 (c)), poli(ácido acrílico) (PAA) (Fig. I-2 (d)), proteínas, polipeptídeos (tais como gelatina) e polissacarídeos [6], sendo estes usados com especial relevância.



**Figura I-2** – Estruturas das cadeias repetitivas dos seguintes polímeros: (a) PLA; (b) PGA; (c) PCL; (d) PAA

As cadeias de polissacarídeos têm diferentes propriedades físico-químicas e biológicas em função da natureza estrutural das suas unidades constituintes [11]. Assim, enquanto que alguns polissacarídeos, tais como o dextrano e as ciclodextrinas, têm uma carga neutra, outros,

tais como o quitosano são carregados positivamente e finalmente, polissacarídeos tais como os alginatos, o ácido hialurônico (Fig. I-3 (c)) e a heparina são carregados negativamente. Por outro lado, os polissacarídeos podem ser de cadeia linear, como por exemplo, o dextrano (Fig. I-3 (a)), o quitosano (Fig. I-3 (b)) e o ácido hialurônico, ou em contrapartida cíclicos, tais como as ciclodextrinas [11].



**Figura I-3** – Estruturas das cadeias respectivas aos seguintes polímeros: **(a)** Dextrano; **(b)** Quitosano; **(c)** Ácido Hialurónico

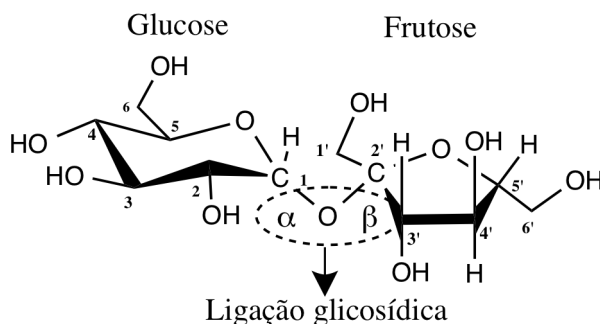
Consultando a literatura, constata-se que os polímeros de etileno glicol (PEG) apresentam algumas características típicas, nomeadamente: não iónicos, solúveis em água e possuem propriedades físico-químicas dependentes do efeito da sua cadeia (longa). Estes polímeros possuem uma vasta aplicação industrial [12].

Por outro lado, polímeros à base de açúcar, geralmente conhecidos como poli(vinil sacarídeos), têm evidenciado uma variedade de possíveis aplicações [13,14]. O método mais amplamente utilizado para a síntese de poli(vinil sacarídeos) é baseado em polimerizações de radicais livres de açúcares vinílicos [15]. Neste sentido, o grupo de investigação onde estou integrado, desenvolveu vários métodos de síntese de novos copolímeros de derivados da sacarose e estireno [16-18].

### I.1.3.1 Sacarose

A sacarose ou 1-O-( $\beta$ -D-frutofuranosil)- $\alpha$ -D-glicopiranosose, é um dissacarídeo, que consiste na união de dois monossacarídeos, a  $\alpha$ -glucose e a frutose, por uma ligação glicosídica (Fig. I-4) [19].

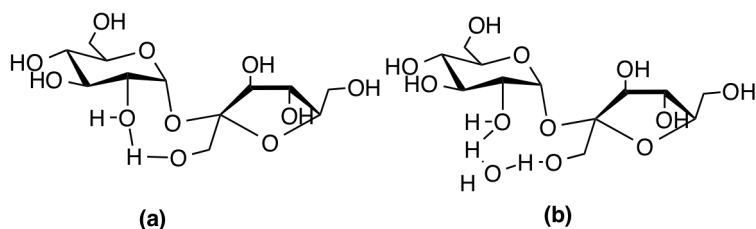
O que é notável na estrutura da sacarose e que contraria a maioria dos polissacarídeos, reside no facto da ligação glicosídica ser formada pelos dois carbonos anoméricos. Assim, a sacarose é um açúcar não redutor [20].



**Figura I-4** – Estrutura da Sacarose, com indicação dos dois monossacarídeos e a respetiva ligação glicosídica

A conformação da sacarose depende, entre outras condições, do solvente em que se encontra [19]. Assim, constata-se que em solvente orgânico aprótico a geometria molecular é

caracterizada por uma forte ligação hidrogénio envolvendo o O-2 e o OH-1' (Fig. I-5 (a)), enquanto que em meio aquoso, ocorre a incorporação de uma molécula de água (Fig. I-5 (b)) [19].



**Figura I-5** – Geometria molecular em diferentes meios: **(a)** solvente orgânico e **(b)** água

Em primeiro plano surge logo de forma evidente as diferenças de reatividade existentes entre hidroxilos primários e secundários. Todavia, estas diferenças não são meramente causadas por efeitos de impedimento estereoquímico, não se observando sempre o mesmo tipo de reatividade dos hidroxilos [21].

A ordem de reatividade é extremamente influenciada pela natureza do eletrófilo, pelo catalisador utilizado e pelo solvente usado (modo como os reagentes são solvatados) [21].

Verifica-se que em reações de acilação, alquilação, oxidação e halogenação, a reatividade dos hidroxilos obedece frequentemente à seguinte ordem: OH-6 >> OH-6' >> OH-1', essencialmente quando se trata de reagentes muito impedidos [19].

De acordo com a literatura constata-se que na química dos açúcares se usa frequentemente como grupo protetor o *tert*-butildifenilsilano (TBDPS) (grupo volumoso). A ordem de reatividade observada é a seguinte: OH-6' >> OH-6 >> OH-1' [22]. Por exemplo, em reações que ocorram em meio básico, com formação do ião alcóxido, a reatividade dos hidroxilos obedece a outra ordem: O-2 >> O-1' >> O-3' >> O-6 >> O-6' [22].

Neste contexto, um dos desafios da química dos glúcidos debate-se com a utilização de grupos protetores, que permitam a diferenciação dos vários grupos hidroxilo (régio diferenciação).

Por modificação de qualquer um dos oito grupos hidroxilo, tirando partido do jogo de proteção/desproteção, pode explorar-se a reatividade de locais seletivamente modificados. Existem vários procedimentos descritos e largamente utilizados que permitem manipular as diferentes posições [23].

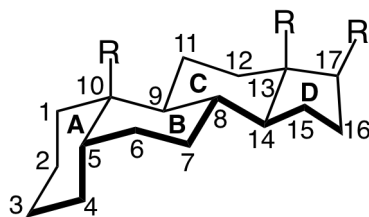
Consultando a literatura verifica-se que os compostos de silício são usados como grupos protetores. Com efeito verifica-se que são incorporados com bons rendimentos, sendo estáveis num largo espetro de condições reacionais e que podem ser posteriormente removidos na presença de outros grupos funcionais existentes na molécula [24].

A proteção seletiva é possível utilizando apenas 1 eq. de *tert*-butildifenilclorossilano (TBDPSCI) e controlando o tempo de reação, evitando assim a formação de misturas complexas.

### I.1.3.2 Alguns exemplos de esteroides

Uma importante classe de lípidos são os esteroides muito conhecidos pelo seu esqueleto tetracíclico (três anéis de seis e um anel de cinco membros, Fig. I-6). Os quatro anéis são designados por A, B, C e D, conforme indicado, e a numeração dos átomos de carbono é muito peculiar. Os substituintes designados por R são muitas vezes grupos alquilo, mas podem ser

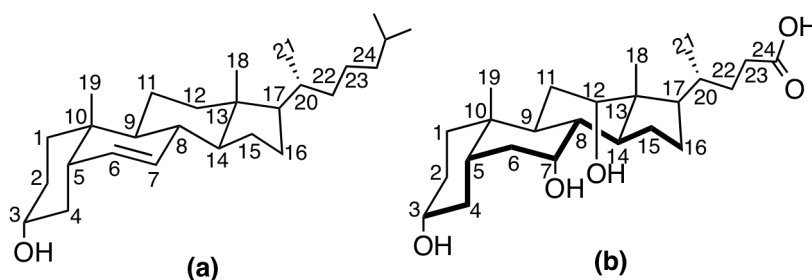
grupos funcionais. O substituinte em C-17 pode variar consideravelmente. Os grupos funcionais substituintes encontram-se normalmente nas posições C-3, C-4, C-7, C-11, C-12 e C-17.



**Figura I-6** – Estrutura geral de esteroides

A estrutura geral de um esteroide (Fig. I-6) tem sete centros quirais (carbonos 5, 8, 9, 10, 13, 14 e 17), o que significa que podem ter até 128 estereoisômeros.

Os esteroides são amplamente encontrados em animais e estão associados a um certo número de processos fisiológicos. Na Fig. I-7 estão indicados dois exemplos de esteroides importantes. Em química farmacêutica frequentemente perante uma determinada molécula alvo, parte-se de um composto natural que possua as propriedades biológicas desejadas, tentando eliminar-se os efeitos secundários indesejáveis através da modificação da respetiva estrutura [25].



**Figura I-7** – Estrutura do (a) colesterol e do (b) ácido cólico

O colesterol (Fig. I-7 (a)) é essencial para toda a vida animal uma vez que a sua presença é necessária nas membranas celulares para estabelecer uma correta permeabilidade da membrana e como tal existe em grande quantidade. Um dos seus derivados, o ácido cólico (Fig. I-7 (b)), é facilmente sintetizado. Com efeito, é uma molécula anfifílica, apresentando uma parte hidrofóbica (grupos metilo orientados para fora da molécula), e outra parte hidrofílica (grupos hidroxilos orientados para o interior da molécula). Os grupos hidroxilos têm muita facilidade em formar pontes de hidrogénio e ligações de Van der Waals, o que deverá permitir o acoplamento de fármacos ou biomoléculas [26].

## I.2 Métodos de preparação das nanopartículas

As NPPs podem ser sintetizadas por diversos métodos, dependendo da aplicação pretendida e das características físico-químicas do fármaco alvo [7]. Neste sentido, o método escolhido para a preparação das nanopartículas vai contribuir acentuadamente para obter as NPPs com as propriedades necessárias para uma aplicação em particular e conseqüentemente para o alcance dos objetivos pretendidos.

### I.2.1 Nanoprecipitação

Este método de produção de NPPs foi desenvolvido pela primeira vez por Fessi et al. [27]. O princípio básico desta técnica baseia-se na emulsificação espontânea da fase orgânica contendo o polímero dissolvido na fase aquosa (Fig. I-8). O polímero é dissolvido num solvente miscível em água, geralmente acetona, sendo esta solução adicionada a uma solução aquosa (na presença ou na ausência de um surfatante), sob agitação [28,29]. A natureza e concentração do surfatante podem influenciar o tamanho das partículas obtidas [30].



**Figura I-8** – Representação esquemática do método de nanoprecipitação, o surfatante\* é opcional (adaptado [31])

Devido à difusão espontânea da solução polimérica, são formadas NPPs instantaneamente na tentativa de evitar as moléculas de água [32]. A adição progressiva da solução orgânica de polímero à solução aquosa, conduz à formação de uma suspensão coloidal com NPPs com tamanho bem definido, aproximadamente 200 nm de diâmetro, que é caracterizada por uma distribuição monodispersa de tamanhos [33]. Para que seja possível obter as NPPs com as propriedades físico-químicas desejadas é necessário ajustar cuidadosamente as concentrações das substâncias, a proporção entre a fase orgânica e fase aquosa, a taxa de injeção da fase orgânica, bem como a velocidade de adição (todos estes parâmetros devem ser controlados). No entanto, é ainda difícil controlar todo este processo na obtenção de NPPs, tendo em vista a sua utilização em sistemas de libertação controlada de fármacos. Por isso, uma plataforma de microfluidos pode ser uma ferramenta promissora para a formação controlada de NPPs, onde o fluxo hidrodinâmico assegura uma mistura rápida do solvente com o não solvente nos canais microfluidicos, sendo o fluxo ajustado consoante a necessidade [33]. Outro desenvolvimento recente é o aparecimento da automatização para nanoprecipitação com uma elevada taxa de transferência de experimentação, com base em pipetagem através de um robô e impressão a jato [34,35].

A aplicação deste método tem sido feita em alguns materiais poliméricos, tais como PLA [36], PLGA [37] e PCL [38], incluindo os peptídeos [39] e os fármacos [40].

### I.2.2 Emulsificação com métodos de remoção do solvente

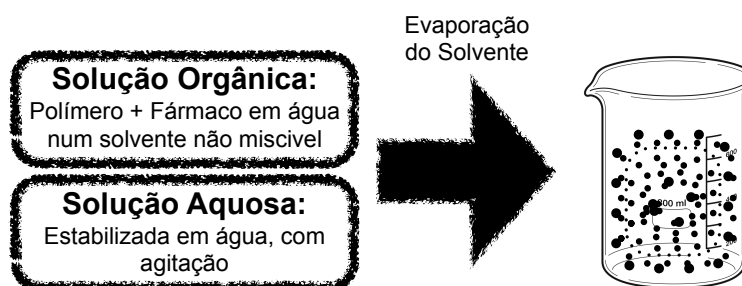
Estes métodos envolvem dois passos principais: a emulsificação da solução do polímero numa fase aquosa e subsequente evaporação do solvente orgânico, o que induz à precipitação das nanopartículas. O sistema emulsionado requer frequentemente duas fases imiscíveis e um surfatante, mas os métodos utilizados para obter a dispersão de uma fase na outra podem ser diversificados [9]. A precipitação do polímero pré-formado em nanogotas é conseguida através

da remoção do solvente polimérico por diferentes métodos, tais como a evaporação do solvente, a difusão rápida do solvente das nanogotas para a fase aquosa após a diluição ou por *salting out*. De um modo geral, emulsões simples de óleo em água (o/a) levam à produção de nanoesferas [10,41]. Nanocápsulas com um núcleo de óleo podem ser preparadas por adição de uma pequena quantidade de óleo à fase orgânica [42]. A múltipla emulsão água em óleo em água (a/o/a) é um método que pode ser utilizado para preparar nanocápsulas com um núcleo aquoso [43,44].

### 1.2.3 Emulsificação com evaporação do solvente

Este foi o primeiro método desenvolvido para preparar NPPs a partir de um polímero pré-formado (Fig. 1-9). Gurny et al. estiveram envolvidos num trabalho pioneiro aplicado a polímeros biodegradáveis para sintetizar sistemas transportadores de fármacos [45].

Nesta metodologia, o polímero é primeiramente dissolvido num solvente orgânico. Inicialmente, solventes como o diclorometano e o clorofórmio foram muito utilizados, mas no entanto, devido à sua toxicidade têm sido substituídos por acetato de etilo. A solução orgânica resultante é dispersa em nanogotas numa solução aquosa (fase contínua), utilizando um agente de dispersão e alta velocidade de homogeneização. Após a formação de uma emulsão estável, a suspensão de nanopartículas é resultante da evaporação do solvente, ao difundir-se pela fase contínua da emulsão [46]. O solvente é evaporado, quer por agitação magnética contínua à temperatura ambiente ou recorrendo a pressão reduzida [47].



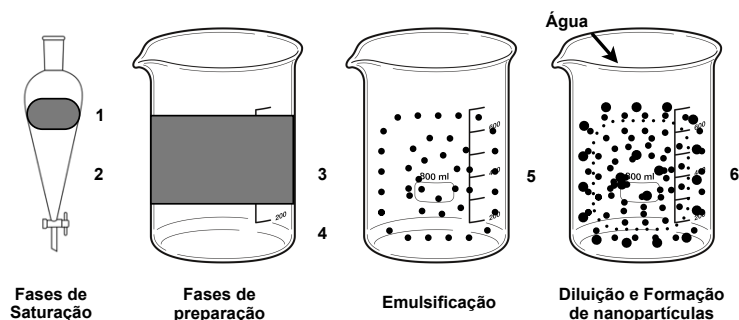
**Figura 1-9** – Representação esquemática da técnica de emulsificação com evaporação do solvente (adaptado [8])

Este método tem sido aplicado na preparação de NPPs de poli(ácido láctico) (PLA), poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), utilizando Pluronic F68 como surfatante [46]. Este também pode ser aplicado a copolímeros anfífilos, como por exemplo PEG-PLA, PEG-PLGA, PEG-PCL e PCL-polissacarídeo [48]. No entanto, este método só pode ser aplicado aquando se pretende usar fármacos lipossolúveis. Quando se pretende aumentar a escala de produção normalmente recorre-se a métodos alternativos de baixa energia de homogeneização [8].

### 1.2.4 Emulsificação com difusão do solvente (EDS)

Neste método (Fig. 1-10) o polímero é dissolvido num solvente hidrossolúvel e saturado em água. [49]. A saturação do solvente é conseguida através da mistura de volumes iguais de água e solvente orgânico e aguardar pela separação de fases. De seguida a solução saturada é emulsionada numa solução aquosa contendo o surfatante. Assim que é obtida a emulsão de

óleo em água (o/a), a diluição com excesso de água promove a difusão do solvente orgânico contido nas gotículas dispersas para a fase externa, que conduz à formação de nanocápsulas ou nanoesferas [50].

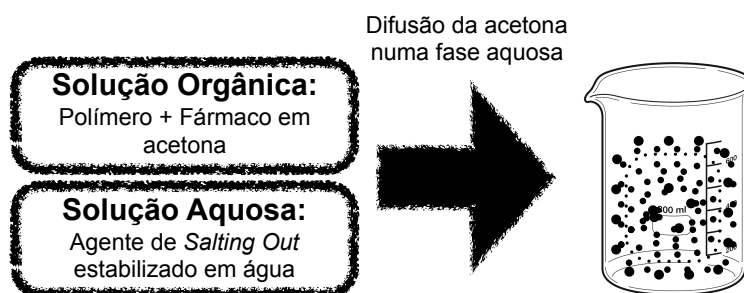


**Figura I-10** – Representação esquemática do método de difusão do solvente de emulsão. Em 1 o solvente hidrossolúvel está saturado com água. Em 2 a água saturada com o solvente orgânico. No 3 a fase orgânica composta por polímero (2% p/p) e óleo (5% p/p) em (10 mL) da fase 1. No 4 a fase aquosa constituída por água (40 mL) e surfatante (2,5% p/p). O 5 mostra a emulsificação e por fim no 6 tem-se a diluição com 200 ml de água (adaptado [9])

Esta técnica apresenta várias vantagens, tais como alta eficiência de encapsulamento, facilidade na transição para a escala industrial, alta reprodutibilidade, simplicidade e baixa distribuição de tamanhos para as nanopartículas obtidas [8]. Deste modo, o método EDS foi usado com sucesso na preparação de nanopartículas biodegradáveis, de uma forma eficiente e reprodutível [51].

### I.2.5 Emulsificação de *Salting out Reverso*

Este método (Fig. I-11) é uma modificação do método EDS discutido acima e a principal diferença resulta da composição da emulsão. O polímero é inicialmente dissolvido num solvente totalmente miscível em água, como por exemplo acetona, e a emulsificação desta solução numa fase aquosa é conseguida pela dissolução de uma elevada concentração de sal ou de sacarose na fase aquosa [52]. Uma vez que estes compostos se dissolvem em água, as propriedades de miscibilidade da água em solventes tais como acetona são modificadas. Um efeito de *salting out* reverso é então obtido por diluição com um volume suficiente de água que permita a difusão da acetona dentro das nanogotas para a fase aquosa, devido à redução da concentração de sacarose ou de sal, induzindo assim a formação de nanoesferas. O solvente e o agente de *salting out* são eliminados por filtração, com o auxílio de membranas de fluxo cruzado [52].

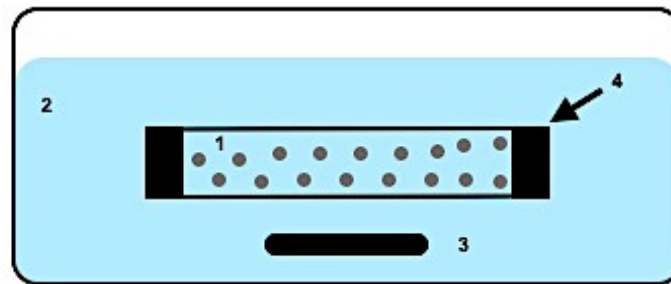


**Figura I-11** – Representação esquemática da técnica de *salting out* (adaptado [8])

Este método é utilizado para o encapsulamento de fármacos lipofílicos [54].

### I.2.6 Diálise

O método de diálise foi usado com sucesso para preparar as NPPs com uma baixa distribuição de tamanhos. Em geral o polímero é dissolvido num solvente orgânico, colocado dentro de um tubo de diálise com um peso molecular de corte apropriado, e processadas na ausência de solvente. Os pré-requisitos básicos são a miscibilidade dos solventes e a existência de soluções diluídas de polímero. A deslocação do solvente no interior da membrana resulta da agregação do polímero devido a uma perda de solubilidade que conduz à formação de uma suspensão coloidal de nanopartículas. O mecanismo de formação das NPPs não é completamente compreendido no momento, mas acredita-se que seja muito mais próxima da nanoprecipitação [55].



**Figura I-12** – Representação esquemática do método de osmose que é a base para a preparação das NPPs, 1 – Suspensão polimérica; 2 – Solvente; 3 – Agitador; 4 – Membrana de Diálise (adaptado [10])

Dependendo da escolha dos pares solvente – soluto, o MWCO de diálise, a temperatura e a concentração de polímero vão ser diferentes e portanto podem ser obtidas diferentes morfologias. Akagi et al. estudou a influência de vários solventes orgânicos na morfologia e distribuição do tamanho de partícula em NPPs de PGA [56]. Um novo método de osmose constituiu a base para a preparação das NPPs (Fig. I-12), esta experiência foi relatada por Chronopoulou e seus colaboradores [57]. Este método baseia-se na utilização de uma barreira física, especificamente em membranas de diálise ou membranas comuns semipermeáveis que permitem o transporte passivo de solventes para retardar a mistura da solução do polímero com o soluto.

### I.2.7 Tecnologia de Fluidos Supercríticos

Os métodos discutidos nas secções anteriores requerem o uso de solventes orgânicos, os quais podem ser nocivos para o ambiente, bem como para os sistemas fisiológicos. Por outro lado, se quantidades residuais de solvente e impurezas permanecerem nas NPPs que veiculam o fármaco, estas podem tornar-se tóxicas, para além de poderem induzir mais facilmente a degradação do fármaco dentro da matriz polimérica. Para superar este obstáculo, têm sido feitos esforços no desenvolvimento de métodos e técnicas de produção mais limpas. Os fluidos supercríticos (FSC) são cada vez mais uma tecnologia alternativa com elevado potencial, uma vez que são solventes amigos do ambiente [58].

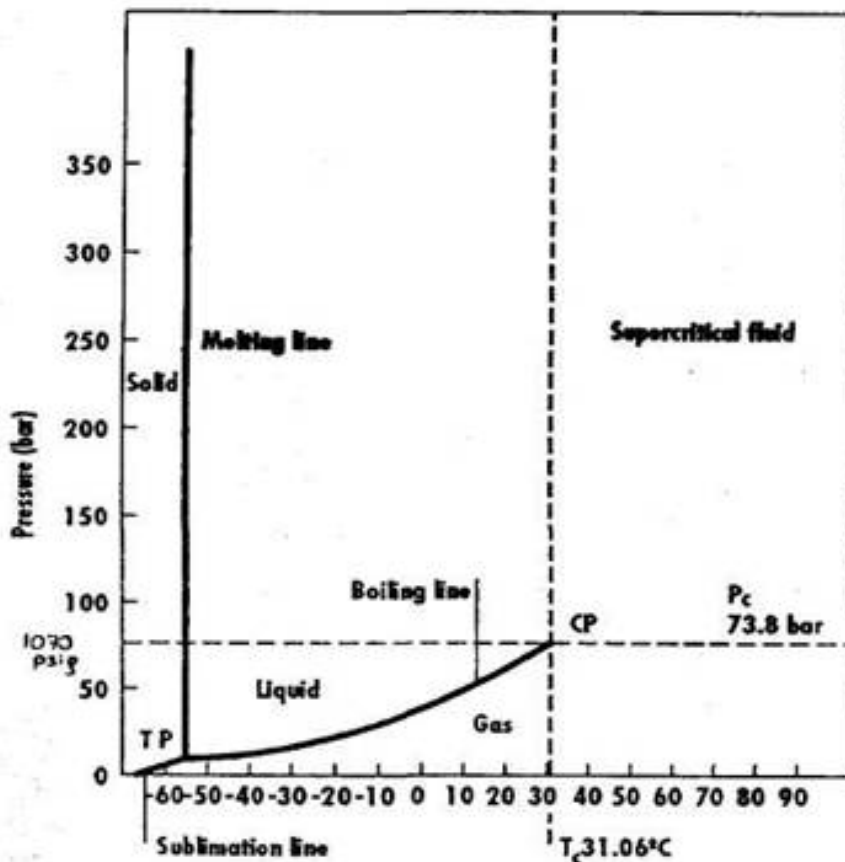
Nesta técnica, o fármaco e o polímero são dissolvidos num FSC e a solução formada é então expandida através de um fino pulverizador. Devido à redução na pressão, ocorre a perda de poder como solvente por parte do fluido supercrítico e as partículas de soluto eventualmente precipitam. Fármacos proteicos tais como a insulina, foram encapsulados por esta técnica em

nanopartículas de PEG (Fig. I-15 (a)) e PLA [8]. Essencialmente existem dois métodos para a produção de nanopartículas que usam fluidos supercríticos, dependente da utilização ou não de um solvente líquido.

Para a aplicação desta tecnologia é necessário um elevado investimento no equipamento, tendo em conta que é necessário usar pressões elevadas.

Para melhor compreender o âmbito desta técnica é necessário ter presente algumas noções e propriedades.

Por exemplo, o estado físico de uma substância com composição fixa pode ser descrito por um diagrama de fases (Fig. I-13). Neste diagrama de Temperatura – Pressão de CO<sub>2</sub>, há três linhas que descrevem os processos de sublimação, fusão e ebulição. Estas linhas também definem as regiões correspondentes aos estados sólidos, líquidos e gasosos. Os pontos ao longo das linhas, entre as fases, definem o equilíbrio entre duas fases. A ebulição inicia-se no ponto triplo (TP) e termina no ponto crítico (CP). A região crítica tem origem no CP e a partir deste ponto, podemos definir um FSC como qualquer substância que está acima da sua temperatura crítica ( $T_C$ ) e pressão crítica ( $P_C$ ). Portanto, a  $T_C$  é a temperatura mais alta no qual um gás pode ser convertido num líquido por um aumento de pressão. Enquanto a  $P_C$  é a pressão mais alta para que um líquido possa ser convertido num gás tradicional por um aumento de temperatura do líquido.



**Figura I-13** – Diagrama de fases, Temperatura – Pressão, para o CO<sub>2</sub>. CP – Ponto crítico; TP – Ponto triplo;  $P_C$  – Pressão crítica;  $T_C$  – Temperatura crítica [59]

Portanto, as propriedades dos FSC estão entre as de um gás e um líquido. Alguns dos solventes usados como FSC estão apresentados na Tabela I-1, assim como as suas propriedades críticas.

**Tabela I-1** – Alguns solventes e as suas propriedades críticas (adaptado [60])

Solventes	Massa Molecular (g/mol)	Temperatura Crítica (K)	Pressão Crítica (Bar)
Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )	44,01	304,10	73,76
Água (H <sub>2</sub> O)	18,02	647,10	220,65
Metano (CH <sub>4</sub> )	16,04	190,40	46,00
Etano (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> )	30,07	305,30	48,74
Propano (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> )	44,09	369,80	42,46
Etileno (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	28,05	282,40	50,36
Propileno (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> )	42,08	364,90	46,00
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	32,04	512,60	80,86
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	46,07	513,90	61,40
Acetona (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	58,08	508,10	47,01

Uma vez atingido o estado supercrítico deixa de haver tensão superficial, uma vez que deixa de existir o limite entre as fases líquido – gás. Uma das propriedades mais importantes é a solubilidade do material no fluido. Muitos polímeros exibem baixa solubilidade ou não são solúveis no FSC.

A solubilidade num FSC tende a aumentar comparativamente à do líquido, para uma temperatura constante, uma vez que têm aproximadamente a mesma densidade e uma difusividade muito superior (Tabela I-2). Uma vez que a densidade aumenta com a pressão, também a solubilidade aumenta. A relação com a temperatura não é assim tão linear. Com uma densidade constante a solubilidade aumenta com a temperatura. No entanto, perto do ponto crítico, a densidade pode cair acentuadamente com um ligeiro aumento na temperatura. Assim, perto da temperatura crítica a solubilidade diminui frequentemente com aumento gradual da temperatura, e uma vez ultrapassado o ponto crítico a solubilidade volta a subir novamente.

**Tabela I-2** – Mostra as diferenças entre gases, fluidos supercríticos e líquidos, em termos de densidade, difusividade e viscosidade (adaptado [61])

	Densidade (Kg/m <sup>3</sup> )	Difusividade (mm <sup>2</sup> /s)	Viscosidade (μPa.s)
Gases	1	1 – 10	10
Fluidos Supercríticos	100-1000	0,01 – 0,1	50 – 100
Líquidos	1000	0,001	500 – 1000

### I.3 Áreas de Aplicação

As aplicações propostas para as NPPs variam desde a veiculação de fármacos e proteínas, até à terapia genética. Os atuais fármacos ou moléculas bioativas nanoencapsuladas têm de

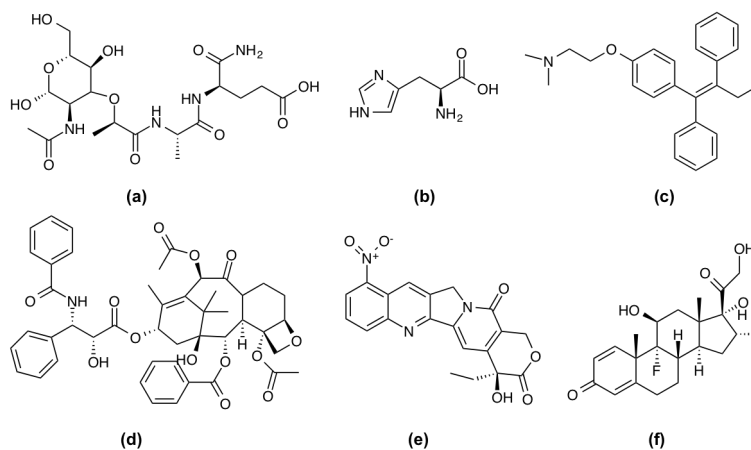
cumprir vários requisitos: maior biodisponibilidade, bioatividade, biocompatibilidade, estabilidade e liberação controlada [62].

A utilização de nanopartículas com fármacos encapsulados em várias doenças (como sejam cancro, SIDA, diabetes, malária, doença de *prion* e tuberculose) [63-68] estão em diferentes fases de ensaios clínicos e algumas nanopartículas com fármacos encapsulados já se encontram disponíveis no mercado (Tabela I-3).

### I.3.1 Terapias Oncológicas

O uso de NPPs é uma das áreas mais promissoras para a veiculação de fármacos anticancerígenos, ambicionando uma distribuição do fármaco mais seletiva, com um aumento do índice terapêutico, reduzindo assim os efeitos secundários. Existem alguns avanços significativos, mas no entanto, tem havido poucos progressos no tratamento de tumores sólidos mais comuns, uma vez que a concentração dos fármacos anticancerígenos administrados é baixa na vizinhança das células tumorais. Ao utilizar nanopartículas na veiculação de fármacos pretende-se que ocorra a acumulação do fármaco no tecido alvo, tendo em conta que estas mostram uma certa tendência para a acumulação em certos tumores [69]. Além disso alguns estudos demonstraram que as nanopartículas conseguem penetrar a barreira hematoencefálica (BHE) [70].

A imunoterapia tem sido sugerida como uma alternativa à terapia convencional para o tratamento de tumores metastáticos. O muramil dipéptido (Fig. I-14 (a)) apresenta propriedades promissoras *in vitro*. No entanto, devido à sua hidrofilia é eliminado muito rapidamente para produzir um efeito biológico *in vivo* [71]. Este problema pode ser superado pelo encapsulamento dentro das nanopartículas [72]. Também um hexapéptido da arginina (Fig. I-14 (b)) foi encapsulado em nanopartículas derivadas de quitosano-dextrano [73] para conseguir uma liberação controlada com o intuito de prolongar a atividade biológica do péptido. Vários fármacos anticancerígenos foram encapsulados com êxito em NPPs. As nanopartículas de PLGA são frequentemente utilizadas para o encapsulamento de fármacos relacionados com vários tipos de cancro, tal como o paclitaxel, a 9-nitrocamptotecina (Fig. I-14 (e)), a cisplatina, entre outros [74-76].



**Figura I-14** – Estruturas de alguns fármacos encapsulados com alguma frequência: **(a)** muramil dipéptido; **(b)** hexapéptido da arginina; **(c)** tamoxifeno; **(d)** paclitaxel; **(e)** 9-nitrocamptotecina; **(f)** dexametasona

Os fármacos anticancerígenos tamoxifeno (Fig. I-14 (c)) e o paclitaxel (Fig. I-14 (d)), também foram incorporados com sucesso em nanopartículas de PCL e demonstraram atividade anticancerígena promissora [77].

As dimensões das partículas têm um papel importante na sua capacidade de atravessar as membranas biológicas. Com base na literatura apenas as nanopartículas com diâmetro inferior a 150 nm, podem atravessar a barreira endotelial [78]. Na verdade, a vasculatura e as fenestrações podem sofrer modificações em diferentes condições patológicas. Por exemplo, o crescimento do tumor induz o desenvolvimento da neovasculatura que é caracterizada pelo endotélio vascular descontínuo com grandes fenestrações na gama dos 200 – 780 nm, permitindo a passagem de nanopartículas. Dependendo dos relatos na literatura, os requisitos de tamanho ideal para as nanopartículas desenvolvidas para o tratamento do cancro encontram-se entre 70 e 200 nm [78].

### **I.3.2 Administração Pulmonar**

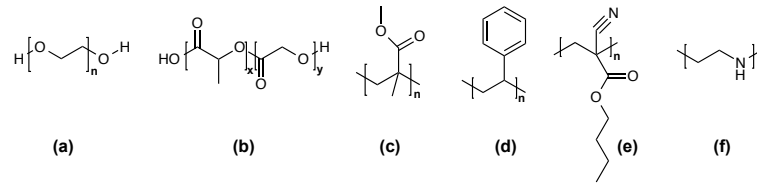
As NPPs como sistema de veiculação de fármacos para a administração pulmonar oferecem muitas vantagens, como o potencial de atingir uma distribuição relativamente uniforme da dose de fármaco nos alvéolos pulmonares, libertação controlada do fármaco que conseqüentemente permite reduzir a frequência da dosagem, melhora a aquiescência do paciente e diminui a incidência de efeitos secundários [79]. No entanto a aplicação pulmonar através da inalação é acompanhada por vários desafios, tais como a atomização na produção do fármaco numa forma adequada para inalação [80].

A aplicação das NPPs através das vias pulmonares é amplamente reconhecida, e uma vantagem adicional de produção das NPPs é que as partículas com um diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$  são facilmente incorporadas na "*percentagem respirável*" de gotículas do aerossol [81].

### **I.3.3 Vacinas e Genética**

A terapia genética funciona segundo o conceito básico de que a distribuição de polinucleótidos para as células irá alterar a expressão de uma dada proteína, resultando em benefícios terapêuticos. O transporte de polinucleótidos funcionais para dentro das células é o primeiro passo e o mais crítico para uma terapia eficiente [82].

Ao encapsular os genes em sistemas de nanopartículas, é possível protegê-los contra a degradação (por exemplo: pH, enzimas proteolíticas) e maximizar a eficiência da entrega, minimizando os efeitos tóxicos [82]. A terapia genética é um método com potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas tal como a doença de Parkinson. Hasadsri et al. [83] relataram a utilização de nanopartículas de poli(butil cianoacrilato) (PBCA) (Fig. I-15 (e)) na veiculação de proteínas funcionais para neurónios e em linhas de células neuronais. A poli(etilenoimina) (PEI) (Fig. I-15 (f)) é um polímero catiónico que é apropriado para a entrega de genes ao cérebro, devido à sua capacidade para formar complexos estáveis com o material genético [32]. Esta protege o ADN e o seu caráter iónico favorece a penetração na membrana através da ligação ao sulfato de heparina, carregado negativamente, que existe na superfície das células.



**Figura I-15** – Estruturas das cadeias respectivas aos seguintes polímeros: (a) PEG; (b) PLGA; (c) PMMA; (d) PS; (e) PBCA; (f) PEI

As primeiras aplicações descritas de nanopartículas foram como adjuvantes em vacinas [33]. Vírus, toxóides bacterianos, péptidos e outros antígenos foram encapsulados ou adsorvidos em nanopartículas [34]. Muitos polímeros foram aplicados tais como PMMA (Fig. I-15 (c)), PLGA (Fig. I-15 (b)) e nanopartículas de PS (Fig. I-15 (d)), o que representa veiculações eficientes e seguros para as vacinas [33-36].

### I.3.4 Oftalmológicas

Existe um grande interesse no desenvolvimento de NPPs para administração oftálmica, uma vez que proporcionam a proteção do fármaco da degradação química e enzimática, permitindo assim um aumento do tempo de permanência do fármaco na córnea. Estes fatores são uma grande valia para o paciente, ao traduzirem-se na redução da frequência de injeção ocular [37]. Os corticosteróides são anti-inflamatórios eficazes no tratamento de doenças agudas e crônicas do segmento posterior do olho, tais como a uveíte. Gomez et al. descreveram o encapsulamento de dexametasona (corticosteróide) (Fig. I-14 (f)), em nanopartículas de PLGA com vista à sua injeção intravítrea, superando assim a baixa solubilidade do fármaco [38].

**Tabela I-3** – Sistema de entrega de fármaco com nanopartículas poliméricas (adaptado [2])

Tipo de Nanoestrutura	Nome Comercial	Substância Ativa	Índicio	Firma
NPPs	Adagen	Adenosina deaminase	Deficiência em Adenosina deaminase (ADA)	Enzon Pharmaceuticals Inc., Bridgewater, NJ, USA
	Onscaspar	L-asparaginase	Leucemia Linfoblástica Aguda	Enzon Pharmaceuticals Inc., NJ, USA
	Copaxone	Acetato de Glatirâmer	Esclerose Múltipla recorrente-remitente	Teva Pharmaceuticals, Tikva, Isreal
	Macugen	Pegaptanib Sódio	Degeneração neovascular relacionada com a idade	OSI Pharmaceuticals
	Pegasys	$\alpha$ -2a Pegylated Interferon	Hepatite C	Nektar Therapeutics, CA, USA
	Neulasta	Pegfilgrastim	Neutopenia	Amgen Inc, Thousand Oaks, CA, USA
	Somavert	Pegvisomant	Acromegalia	Nektar Therapeutics, CA, USA

## I.4 Técnicas de Caracterização

### I.4.1 Dispersão Dinâmica de Luz

A dispersão dinâmica de luz é uma técnica de caracterização que é utilizada para determinar o perfil da distribuição de tamanhos de partículas em suspensão e o potencial zeta da suspensão [84].

A aquisição de resultados baseia-se na quantidade de luz que é dispersa por parte das partículas, com dimensões inferiores a 250 nm, a luz é dispersa em todas as direções (dispersão de Raleigh). A fonte de luz é um laser, assim sendo a luz é coerente e monocromática, e observa-se a variação do tempo com a dispersão de intensidade. Esta variação deve-se ao facto das partículas de pequenas dimensões, quando em solução estarem sujeitas a movimento Browniano, e consequentemente a distância entre as partículas em suspensão está constantemente a mudar ao longo tempo [85].

### I.4.2 Microscopia de Força Atómica

A microscopia de força atómica é uma técnica relativamente nova de caracterização, que proporciona uma alta resolução em três perfis tridimensionais da superfície, onde as características de escala atómica podem ser detetados. Além disso, esta técnica não necessita de uma preparação elaborada da amostra e as medições podem ser realizadas ao ar, contrariamente ao SEM ou TEM.

Nesta técnica existem dois modos de funcionamento, o modo de contato e modo vibracional.

O modo de contato é um dos modos de varrimento mais amplamente utilizados, em que a ponta opera por varrimento em toda a amostra, sob a ação de um piezoelétrico. Uma força extremamente baixa (cerca de  $10^{-9}$  N, similar à faixa da força interatómica) é mantida durante a oscilação, empurrando assim a ponta contra a amostra. Ou a força de repulsão entre a ponta e a amostra ou a deflexão da ponta real é gravada relativamente à variação espacial, e em seguida, convertida numa imagem analógica da superfície da amostra. Outros modos de imagem estão disponíveis, tais como o modo vibracional, o que é especialmente útil para analisar amostras moles (até mesmo líquidos), que podem ser danificados quando se utiliza o modo de contato [86].

### I.4.3 Microscopia Eletrónica de Varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento é utilizada para obter imagens de alta resolução da superfície de uma amostra. As imagens obtidas são tridimensionais, o que é bastante útil na análise morfológica [87].

O modo mais usual de aquisição de imagem passa por analisar os eletrões secundários emitidos pela amostra, após a incidência do feixe eletrónico primário. A imagem é conseguida por varrimento de uma zona limitada da amostra pelo feixe primário. Se este penetrar na amostra perpendicularmente, a região é ativada, e consequentemente dá-se a emissão secundária, é simétrica em torno desse eixo. Assim, obtêm-se uma imagem que traduz a morfologia da amostra.

#### **I.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A microscopia eletrônica de transmissão é uma técnica muito poderosa na análise de filmes finos. Um microscópio convencional de TEM é capaz de obter imagens de elevada ampliação de uma amostra, que pode ser complementado com um padrão de difração da área selecionada.

Em TEM, o modo de funcionamento recai nos elétrons que são transmitidos após a interação de um feixe eletrônico de elevada energia com a amostra a analisar. Os elétrons que não são dispersos permitem determinar regiões mais finas ou espessas da amostra, permitindo obter informações sobre a morfologia [88].

#### **I.4.5 Espectroscopia de Fluorescência**

A fluorescência é uma técnica que utiliza a excitação das moléculas quando irradiadas a um determinado comprimento de onda. Após ficar no estado excitado, as moléculas tendem a voltar ao estado fundamental, podendo esse processo fazer-se acompanhar por emissão de luz (fluorescência ou fosforescência) ou apenas por libertação de calor ou ainda por uma reação fotoquímica (degradação).

O decaimento origina a emissão de radiação em todas as direções. No entanto, apenas a radiação emitida para os ângulos retos (90°) é que é convertida num sinal elétrico para ser medido. A análise da radiação emitida em ângulos retos tem a vantagem de haver uma menor dispersão da intensidade da luz emitida pela fonte.

Sem dúvida, a aplicação mais importante desta técnica está na análise de produtos farmacêuticos, alimentares, amostras clínicas e produtos naturais. A sensibilidade e seletividade tornam a técnica numa ferramenta particularmente valiosa nestes campos.

Um dos compostos muito utilizados como sonda fluorescente é o pireno (hidrocarboneto poliaromático), com baixa solubilidade em água. Este como cromóforo isolado apresenta espectros de emissão e absorção intensos e bem definidos. O pireno associa-se preferencialmente em zonas menos polares do meio em que está inserido. Enquanto que se estiver num ambiente polar mostra fraca intensidade de fluorescência [89].

Um dos parâmetro determinantes neste tipo de técnica é a concentração de associação crítica (CAC). Este parâmetro determina a concentração a partir da qual ocorre a associação (de forma significativa) entre o polímero e a sonda, através de ligações intermoleculares.

## **Capítulo II – Discussão de Resultados**

## II.1 Preâmbulo

Este trabalho de investigação teve como principal objetivo a obtenção de nanoestruturas a partir de polímeros constituídos por PEG, uma unidade de sacarose e um derivado do colesterol. Foram usadas três técnicas na produção de NPPs: a emulsificação com evaporação do solvente, a nanoprecipitação e a tecnologia de fluidos supercríticos. Como tal, neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste projeto, nomeadamente, através das técnicas de caracterização de nanopartículas: dispersão dinâmica da luz (DLS), microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrónica de varrimento (SEM), microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e espectroscopia de fluorescência.

Relativamente ao processo de síntese desenvolvido teve como objetivo final, a obtenção de um polímero anfífilo, facilitando a sua auto-organização em solução aquosa. Tendo este objetivo em mente, foi abordada a seguinte estratégia: utilizar as unidades da sacarose e ácido cólico acopladas à molécula de PEG, estas unidades orgânicas iriam permitir que os produtos finais (NPPs) fossem biocompatíveis e biodegradáveis.

A técnica de DLS permitiu determinar o tamanho médio das partículas, a dispersão das mesmas e a ainda a frequência com que ocorrem para cada tamanho. No entanto, não se consegue garantir a forma das partículas, e por isso foi necessário recorrer-se a outro tipo de técnicas para permitir uma melhor caracterização das nanoestruturas. Através da técnica AFM é possível ter uma ideia das estrutura, mas não com muita precisão, uma vez que é uma técnica que apenas avalia a superfície. Assim, com esta técnica foi possível confirmar o tamanho das partículas, e foi possível obter uma imagem topológica da superfície.

Com o auxílio do SEM e TEM foi possível confirmar as dimensões das partículas, assim como a sua morfologia e ainda obter uma imagem das mesmas.

Foi possível determinar a concentração de associação crítica (CAC) através da espectroscopia de fluorescência, utilizando o pireno como sonda fluorescente.

## II.2 Síntese e Caracterização dos Polímeros Conjugados

Iniciou-se pela preparação do composto Metil 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$  – tri-hidroxi – 5 $\beta$  – colanato (**1**), reagindo o ácido cólico com CH<sub>3</sub>OH na presença de ácido clorídrico (HCl), a refluxo (Fig. II-1).

O composto (**1**) foi obtido sob a forma de agulhas brancas, com um rendimento de 91 %.

O ácido clorídrico (HCl) funciona como catalisador, uma vez que este acelerou a reação para os seus limites de conversão, aumentando assim o rendimento. Outro fator que aumenta o rendimento foi a utilização em excesso de um dos reagentes (CH<sub>3</sub>OH), de forma a deslocar os equilíbrios.

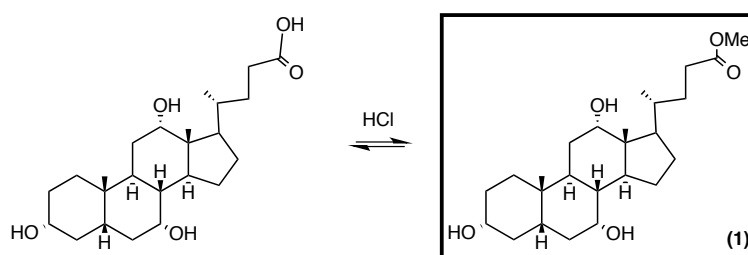


Figura II-1 – Reação de esterificação do ácido cólico, em meio ácido

A benzilação do hidroxilo na posição 3 do composto (**1**), realizou-se utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco como solvente, na presença de NaH (como base). para garantir a desprotonação do grupo hidroxilo e posteriormente o ataque nucleófilico ao BnBr.

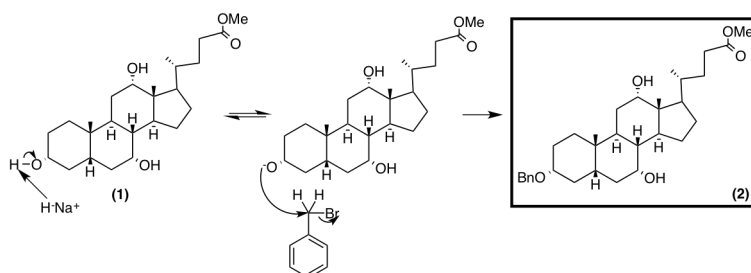
A reação entre o composto (**1**) e a base forte NaH produziu um sal do ião alcóxido. Uma vez que a reação é exotérmica, foi necessário utilizar um banho de gelo para controlar a temperatura.

O mecanismo proposto para a reação (Fig. II-2) explana a forma simples de síntese de éteres Williamson. A reação foi uma S<sub>N</sub>2, promovida pela presença de um haleto primário, que favoreceu o estado de transição (ataque do nucleófilo).

No controlo da evolução da reação recorreu-se ao uso TLC (hexano/AcOEt 4:8) e a reação foi parada, ao fim de 12 horas para evitar a formação de produtos secundários. Uma vez terminada a reação, a mistura reacional tinha como base o solvente da reação, o produto orgânico e compostos inorgânicos. Com o intuito de obter o composto (**2**), adicionou-se gelo para hidrolisar o NaH que não reagiu. O composto (**2**) foi separado da mistura aquosa por extração com um solvente orgânico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A fase orgânica continha produto da reação pretendido e algum BnBr que não reagiu (usado em excesso). A fase aquosa possuía NaOH (resultante da hidrólise de NaH não consumido). Utilizou-se uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) para ajudar na separação de fases. Posteriormente, foram feitas duas lavagens com uma solução de NaCl e a fase orgânica foi seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro (extrair vestígios de água). O agente excicante sólido foi filtrado e o solvente evaporado.

Purificou-se o composto obtido por cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se um composto branco, tipo espuma. Esta reação teve um rendimento muito baixo (19%), o que resultou da não utilização de um solvente adequado para uma reação S<sub>N</sub>2, para evitar que a reação de substituição ocorresse noutros grupos hidroxilos, conduzindo assim a uma mistura complexa difícil de purificar.

Por comparação entre os espectros de  $^1\text{H}$  RMN do composto **(1)** e os do composto **(2)**, verificou-se que os desvios químicos dos prótons ( $\text{H-}3\beta$ ,  $\text{H-}7\beta$ ,  $\text{H-}12\beta$ ) relativos ao composto **(1)** são 3,39, 3,82 e 3,96 ppm, respetivamente. Enquanto que para o composto **(2)** os prótons ( $\text{H-}7\beta$ ,  $\text{H-}12\beta$ ) permaneceram com o mesmo desvio químico, já o próton ( $\text{H-}3\beta$ ) sofreu uma mudança para campos mais altos (3,19 ppm). Isto quer dizer que o único grupo hidroxilo modificado foi o que se encontrava na posição 3, com a respetiva substituição de um átomo de hidrogénio pelo grupo benzilo, tal como foi pretendido.



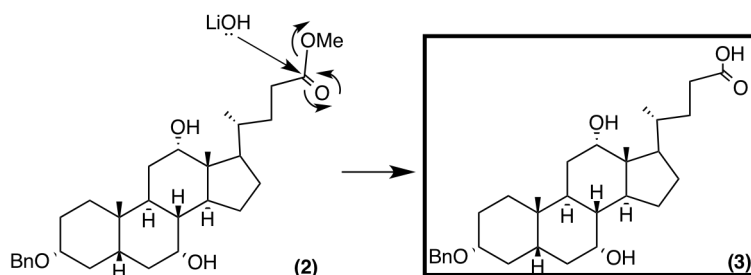
**Figura II-2** – Mecanismo proposto para a reação de benzilação do grupo hidroxilo na posição 3 do composto **(1)**

Em seguida, foi necessário libertar o grupo carboxilo para posteriormente poder acoplar esta unidade ao composto **(9)** ou **(10)**. Neste sentido, procedeu-se à reação de hidrólise do grupo éster do composto **(2)** (Fig. II-3). Usou-se uma solução aquosa de LiOH (0,5 N) e THF como solvente. A reação foi seguida por TLC (hexano/AcOEt 1:2). Após o consumo total do composto **(2)**, acidificou-se com uma solução de HCl 10 %, até o pH da solução estar entre 2 e 3. Uma vez que a reação ficou balanceada, ou seja, o ácido forte reagiu com a base forte, não há mais o risco do composto ser atacado noutra posição.

Seguidamente, extraiu-se o composto da fase aquosa com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Utilizou-se uma solução saturada de NaCl para lavar a fase orgânica e remover o LiOH (base) que ainda estivesse presente. Finalmente, foi feita uma extração com um pequeno volume de água e a fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. A solução foi filtrada e o solvente evaporado.

Posteriormente, purificou-se o produto de reação por cromatografia em coluna de sílica gel obtendo um sólido branco, tipo espuma (94 %).

Através dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN do composto **(1)**, **(2)** e **(3)** foi facilmente visível o desaparecimento do pico correspondente aos prótons do grupo metóxido ( $\text{OCH}_3$ ) a 3,67 ppm, apoiando assim a formação do composto **(3)**.

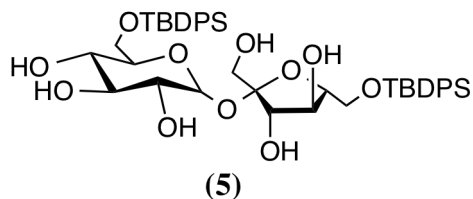


**Figura II-3** – Reação de hidrólise do grupo éster no composto **(2)**

Um dos passos do processo de síntese envolveu a proteção seletiva do grupo hidroxilo 6' da sacarose com o grupo TBDPS. Ou seja, o composto monossustituído que se preparou foi o 6'

– O – terc – butildifenilclorossilano sacarose (**4**). Fez-se reagir a sacarose com TBDPSCI, em piridina seca, e utilizando o DMAP como catalisador, à temperatura ambiente. A reação foi monitorizada por TLC (AcOEt/Acetona/H<sub>2</sub>O 10:10:1), até começar a ser visível o produto secundário (não desejado), menos polar, 6,6'-di-O-terc-butildifenilsilil sacarose (composto dissustituído) (**5**) (Fig. II-4).

O produto obtido tinha a aparência de um óleo esbranquiçado, impuro, com restos de piridina, reagente de partida e o produto secundário. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel, obtiveram-se ambos os compostos (mono e dissustituído) sob a forma de um sólido branco.

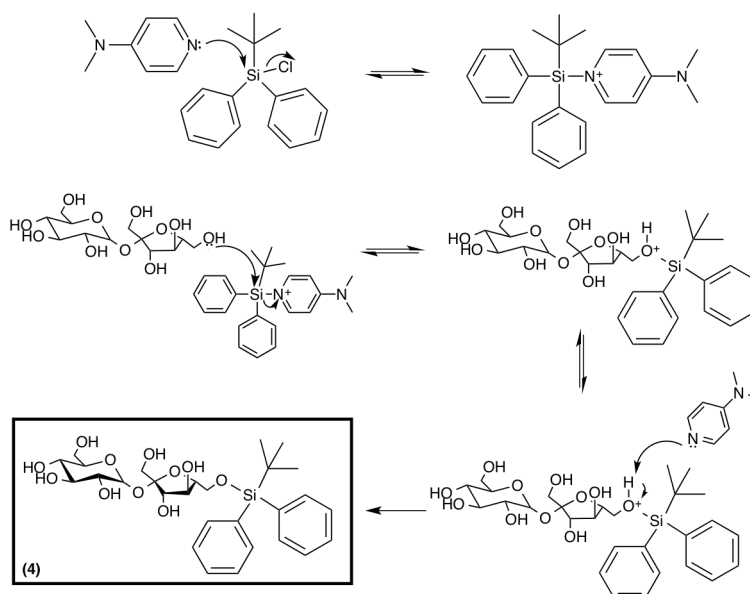


**Figura II-4** – Estrutura do composto dissustituído (**5**)

Para o composto monossustituído obteve-se um rendimento de 55 %, enquanto que o composto dissustituído (**5**) foi de 11 %. O moderado valor de rendimento deve-se à baixa solubilidade da sacarose na maioria dos solventes orgânicos. Admitiu-se que a

piridina possivelmente não dissolveu toda a sacarose. Um dos outros problemas que baixa o rendimento da reação foi a formação do produto secundário, o que é inevitável. Sendo este problema difícil de resolver, uma hipótese seria a diminuição do tempo de reação, mas assim também haveria uma diminuição da percentagem de composto pretendido. E outra hipótese seria o aumento de equivalentes TBDPSCI, mas assim aumentaria a velocidade de reação e consequentemente o aparecimento do composto dissustituído, ou até mesmo a formação do composto trissustituído.

O mecanismo proposto para esta reação (Fig. II-5) mostra a importância do catalisador (DMAP). Com efeito, o DMAP foi melhor nucleófilo do que a piridina e as reações de silição precisam de bases azotadas para agregar com o cloreto de hidrogénio libertado pela reação [90]. A piridina (solvente) sendo polar e aprótico, evitou a formação de pontes de hidrogénio, pelo que foram solvatar fracamente o nucleófilo, não contribuindo assim para a sua diminuição de reatividade.

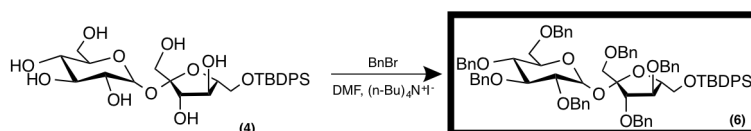


**Figura II-5** – Mecanismo proposto para a reação de silição régio-seletiva do hidroxilo 6' da sacarose

A reação de benzilação do composto **(4)** (Fig. II-6) tem como base de mecanismo o mesmo que foi representado para o composto **(1)** (Fig. II-2). Mas esta reação tem duas variantes que são a utilização do DMF como solvente e a adição de  $(n\text{-Bu})_4\text{N}^+\text{I}^-$  como catalisador. Sendo este catalisador de transferência de fase, permitiu acelerar a reação, uma vez que a mistura reacional era heterogênea.

Uma alteração feita em relação à reação de benzilação do composto **(1)**, foi em termos do número eq. de BnBr. Tendo em conta que no composto **(4)** o objetivo era proteger as sete posições disponíveis, enquanto que no composto **(1)** só era necessário proteger uma posição, foram adicionados 14 eq., para promover a proteção de todas as posições (Fig. II-6).

A reação foi seguida por TLC (AcOEt/Acetona/ $\text{H}_2\text{O}$  10:10:1) e considerou-se terminada quando deixou de se visualizar o composto **(4)**. Obteve-se um óleo laranja (acastanhado) que foi purificado por cromatografia em coluna (hexano/AcOEt 5:1), tendo-se obtido o composto pretendido **(6)** com um rendimento de 87 % sob a forma de um óleo amarelo.

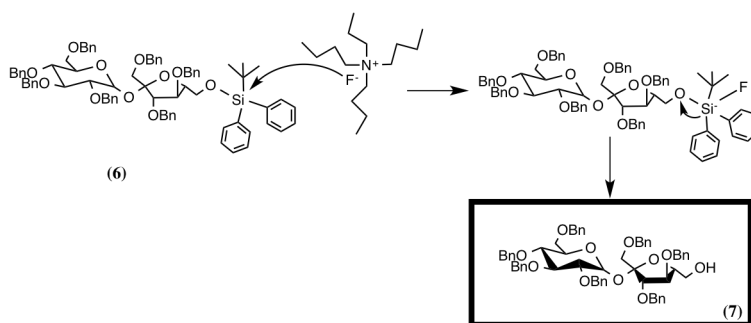


**Figura II-6** – Reação de benzilação dos grupos hidroxilos não protegidos do composto **(4)**

O passo seguinte consistiu na remoção seletiva do grupo TBDPS (Fig. II-7), libertando assim seletivamente a posição 6' do composto **(6)**. Realizou-se utilizando TBAF, em THF seco, à t. a.. O TBAF funcionou como nucleófilo, compreendendo o ataque do seu pequeno anião fluoreto ao átomo eletrofílico de silício. A força motriz da reação é a formação da forte ligação Si-F, permitindo assim obtenção do respetivo álcool no último passo.

A reação foi controlada por TLC (Hexano/AcOEt 3:1) até o consumo de todo o composto inicial. Procedeu-se à evaporação do solvente e o resíduo obtido extraído com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A fase orgânica foi lavada com pequenas porções de água, de modo a eliminar compostos inorgânicos.

Obteve-se um óleo amarelo, impuro, contendo o produto de remoção do grupo protetor, tendo em conta que este permanece na fase orgânica. Por purificação em cromatografia em coluna de sílica gel, obteve-se o composto desejado sob a forma de um óleo incolor (81 %).



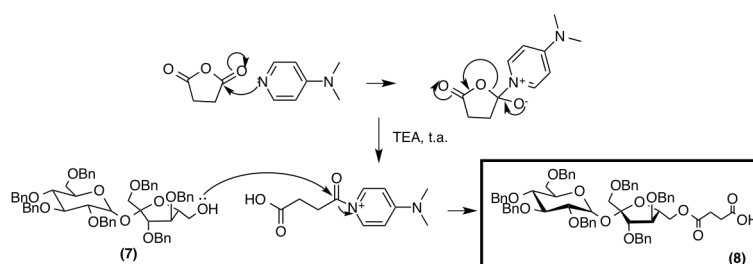
**Figura II-7** – Mecanismo proposto para a reação de remoção do grupo protetor (OTBDPS) do composto **(6)**

Na etapa seguinte (Fig. II-8) impôs-se a necessidade de introduzir um bom grupo de saída na sacarose (na posição 6'), a fim de proceder ao seu acoplamento com a unidade polimérica

PEG. Para esse efeito e de acordo com a estratégia global apresentada no anexo 1, em seguida foi possível fazer reagir o derivado da sacarose com apenas um grupo hidroxilo livre (OH-6') com o anidrido succínico na presença de DMAP. Optou-se pela esterificação com o anidrido em vez do ácido succínico uma vez que a reação é semelhante, mas o anidrido tem a vantagem de ser mais reativo. A reação foi rápida e permitiu que o composto inicial reagisse na sua totalidade. No entanto, esta reação era impossível sem a adição da TEA, que teve como função interagir com o próton do grupo hidroxilo da posição 6'.

A reação foi controlada por TLC (Hexano/AcOEt 3:2) até ao consumo total do composto inicial. Seguidamente extraiu-se o composto da fase aquosa com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Utilizou-se HCl e NaCl para lavar a fase orgânica. Finalmente, foi feita uma lavagem com um pequeno volume de água para remover os resíduos de solvente, e a fase orgânica foi seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, que extraiu os vestígios de água. A solução foi filtrada e o solvente evaporado. Obteve-se um óleo incolor, impuro, pelo que foi necessário purificá-lo por cromatografia em coluna de sílica gel.

Quando analisados os espetros de  $^1\text{H}$  RMN constatou-se um pico a 2,48 ppm, que não aparecia no espetro do composto (7), a devida atribuição mostra que esse pico é referente aos seguintes prótons ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ), que correspondem à adição do anidrido succínico. Assim sendo obteve-se o composto (8) com um rendimento de 89 %.



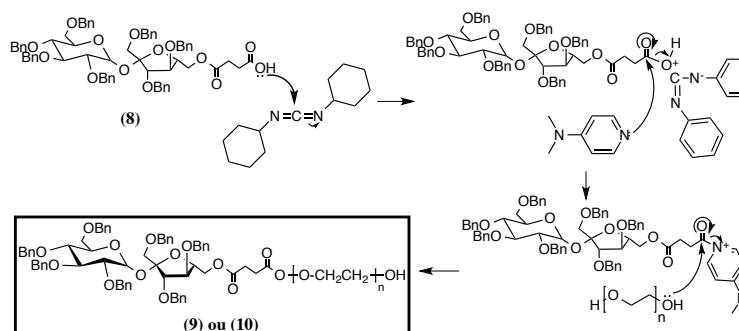
**Figura II-8** – Mecanismo proposto para a reação de esterificação do composto (7), com anidrido succínico

Para ocorrer a reação de acoplamento entre o composto (8) e o PEG, dissolveu-se o composto juntamente com o DMAP e o DCC, em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , em atmosfera de argon e com um banho de gelo, sob agitação. Deixou-se a mistura atingir a t. a.. Ao fim de 48 horas arrefeceu-se a mistura reacional. Filtrou-se a ureia sobre celite e evaporou-se o solvente. O bruto reacional foi purificado por cromatografia em coluna (gradiente  $\text{CH}_3\text{OH}$  1-10 %, em  $\text{CH}_3\text{Cl}$ ). Obteve-se o composto (9) sob a forma de um óleo incolor (56 %), enquanto que o composto (10) obteve-se sob a forma de um sólido branco ceroso (73 %).

O mecanismo proposto para a reação apresentado na Fig. II-9 mostra o reagente de acoplamento DCC, que transformou o grupo ácido carboxílico do composto (9) ou (10) numa espécie possuindo um bom grupo de saída. Primeiramente o DCC retirou o próton do ácido carboxílico, tornando o carbono da diimida mais eletrodeficiente. O oxigénio do ácido atacou esse carbono e o éster resultante possuiu um bom grupo de saída. O DMAP atacou o carbono do éster e libertou-se a diciclohexilureia. O grupo álcool do PEG atacou o carbonilo do éster libertando o DMAP.

Uma vez realizada a análise aos espetros de  $^1\text{H}$  RMN verificou-se um intervalo de picos a 4,26 – 4,17 ppm, que não aparecia no espetro do composto (8). A atribuição de sinais aponta para

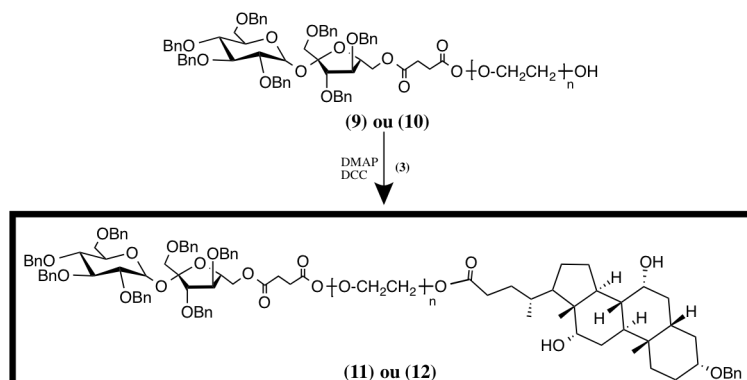
que este intervalo de picos sejam referentes aos prótons  $(-C(=O)OCH_2CH_2O-)$ , que correspondem ao PEG.



**Figura II-9** – Mecanismo proposto para a reação de acoplamento do PEG com o composto (8), para  $n=9$  e  $n=136$ , que correspondem ao composto (9) e (10), respectivamente

A reação de acoplamento (Fig. II-10) entre o composto (9) ou (10) com o composto (3), tem o mesmo tipo de mecanismo que a reação anterior, e por isso não foi aqui descrito. A reação foi controlada por TLC ( $CHCl_3/CH_3OH$  9:1) e ao fim de 48 horas arrefeceu-se a mistura reacional. Filtrou-se a ureia sobre celite e evaporou-se o solvente. O bruto reacional foi purificado por cromatografia em coluna (gradiente  $CH_3OH$  1-10 %, em  $CH_3Cl$ ). Obteve-se o composto (11) sob a forma de um óleo incolor (71 %), enquanto que o composto (12) obteve-se sob a forma de um sólido branco (37 %).

Através da análise dos espectros de  $^1H$  RMN confirmou-se a ocorrência da reação com composto (3), uma vez que há uma série de picos característicos para campos mais altos, entre 0,98 e 0,69 referentes aos prótons dos  $(CH_3)$  nas posições 21, 19 e 18, que não apareciam nos espectros dos composto (9) e (10).



**Figura II-10** – Reação de acoplamento entre o composto (9) e (3), e ainda entre o composto (10) e (3)

A hidrogenação catalítica (Fig. II-11) do composto (11) ou (12) usando paládio sob carvão e uma mistura de Etanol:AcOEt: $H_2O$ , como solvente, originou o composto (13) sob a forma de um sólido branco ceroso (83 %) e o composto (14) sob a forma de um sólido branco (85 %).

Nos espectros de  $^1H$  RMN verificou-se a remoção do grupo protetor benzilo pela ausência de prótons aromáticos e dos metilenos que se encontravam entre 7,37 – 7,17 e 4,92 – 4,26 ppm, respetivamente, para ambos os compostos. Confirmou-se ainda que a ligação éster resistiu à hidrogenação catalítica, tendo em conta que os prótons  $(CH_2CH_2COOH)$  que correspondem à

adição do anidrido succínico continuam presentes entre 2,60 – 2,52 ppm. O próton anomérico é o mais desblindado de todos, encontrando-se por isso a campo mais baixo 5,1 ppm.

Para confirmar que os compostos finais estavam puros, estes foram analisados através de espectroscopia de massa (MALDI-TOF) e obtiveram-se valores médios para a massa molecular de 1251,8 (g/mol) e 6993,2 (g/mol), referentes ao composto **(13)** e **(14)**, (anexo 13 e 14. respetivamente).

O espectro referente ao composto **(13)** apresentou ainda outra distribuição média (1642,1 (g/mol)). Uma vez que o composto apresentava-se puro por RMN, admite-se que possa ter ocorrido um acoplamento entre o polímero e a matrix do MALDI-TOF.

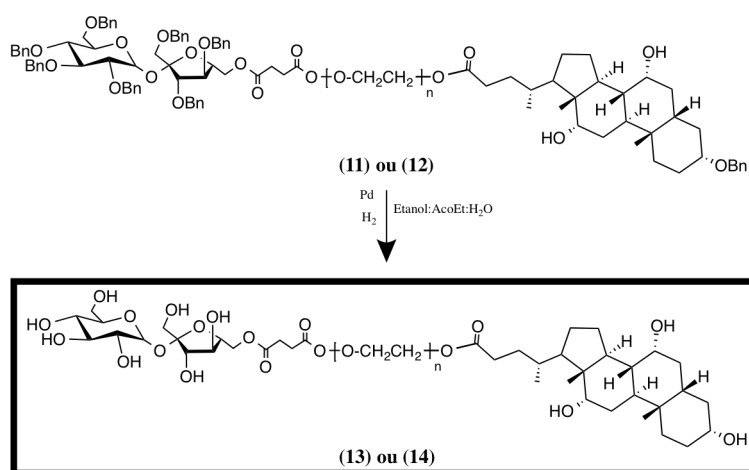


Figura II-11 – Reação de hidrogenação do composto **(11)** ou **(12)**

### II.3 Análise por *Dispersão Dinâmica de Luz*

A caracterização físico-química das suspensões coloidais obtidas foi determinada por DLS. As medidas foram realizadas a 25°C e cada análise foi obtida com um ângulo de deteção de 90°. Foi considerado o valor médio de três medidas consecutivas. Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na Tabela II-1.

Tabela II-1 – Características físico – químicas determinadas por DLS para as suspensões coloidais, para a concentração de 5 mg/mL

Métodos	Polímeros	Diâmetro (nm)	Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
Emulsificação com Evap. do Solvente	Sac. – PEG 400 – Cólico	200,1	0,580	- 0,23
	Sac. – PEG 6000 – Cólico	342,8	0,865	-
Nanoprecipitação	Sac. – PEG 400 – Cólico	97,6	0,125	- 17,93
	Sac. – PEG 6000 – Cólico	111,3	0,108	-11,40

A Tabela II-1 mostra os parâmetros determinados por esta técnica, comparando assim os valores obtidos para os diferentes métodos e para a mesma concentração de composto. Como pode ser observado, o diâmetro médio das partículas variou em função do tipo de polímero, sendo inferior para as nanopartículas sintetizadas a partir do polímero com uma unidade de

PEG 400. O método de síntese também afetou o diâmetro médio das partículas, onde o método de nanoprecipitação permitiu obter nanopartículas de dimensões inferiores. Este resultado não é surpreendente uma vez que no método de emulsificação com evaporação do solvente as nanopartículas encontram-se com uma camada de surfatante o que conduz a um tamanho aparente superior.

Para além disso a emulsão obtida foi uma microemulsão, o que conduz a partículas maiores. Quanto ao índice de polidispersão, este permite obter informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das NPPs. Verificou-se que o método de nanoprecipitação permite a formação de sistemas monodispersos ( $< 0,3$ ). Por outro lado, o método de emulsificação com evaporação do solvente conduz a misturas polidispersas, mais uma vez resultante do pouco controlo existente na formação da emulsão. As análises do potencial zeta indicaram a obtenção de partículas de carga negativa, decorrentes da presença de grupos hidroxilos na molécula do polímero. Foi ainda observada uma redução nos valores obtidos com o aumento do tamanho da cadeia de PEG no polímero, resultante do efeito de blindagem das cadeias hidrofílicas do polímero.

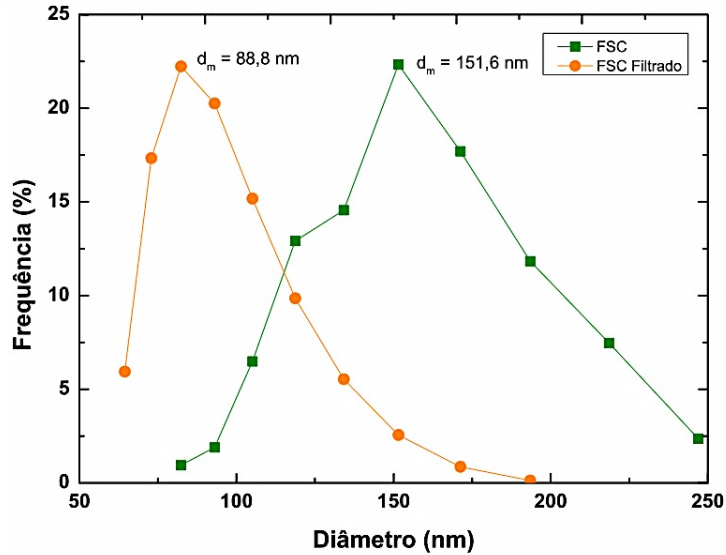
Neste trabalho foi ainda estudado para o método da nanoprecipitação o efeito da concentração de polímero no tamanho das nanopartículas. De acordo com os resultados descritos na Tabela II-2, verificou-se que para o polímero de PEG 400 o aumento da concentração conduz a um aumento do tamanho médio das nanopartículas. Este facto pode estar relacionado com a pouca solubilidade deste polímero no solvente orgânico, conduzindo a agregados maiores devido à precipitação antecipada do polímero antes da difusão do solvente orgânico para a fase aquosa. Por outro lado, para a formulação com PEG 6000 verificou-se que o aumento da concentração conduz a uma ligeira diminuição do tamanho médio das nanopartículas. No entanto, como os valores se encontram na mesma ordem de grandeza, podemos concluir que a concentração do polímero na fase orgânica tem pouca influência no tamanho médio obtido.

**Tabela II-2** – Características físico – químicas determinadas por DLS para as suspensões coloidais, para o método de nanoprecipitação, fazendo variar as concentrações

Polímeros	Concentrações	Diâmetro (nm)	Diâmetro Filtrado* (nm)	Polidispersão
Sac. – PEG 400 – Cólico	2,5 mg/mL	124,9	109,2	0,286
	5 mg/mL	97,6	89,9	0,125
	7,5 mg/mL	439,7	250,7	0,391
Sac. – PEG 6000 – Cólico	2,5 mg/mL	141,4	112,3	0,170
	5 mg/mL	111,3	97,3	0,108
	10 mg/mL	96,9	92,6	0,059

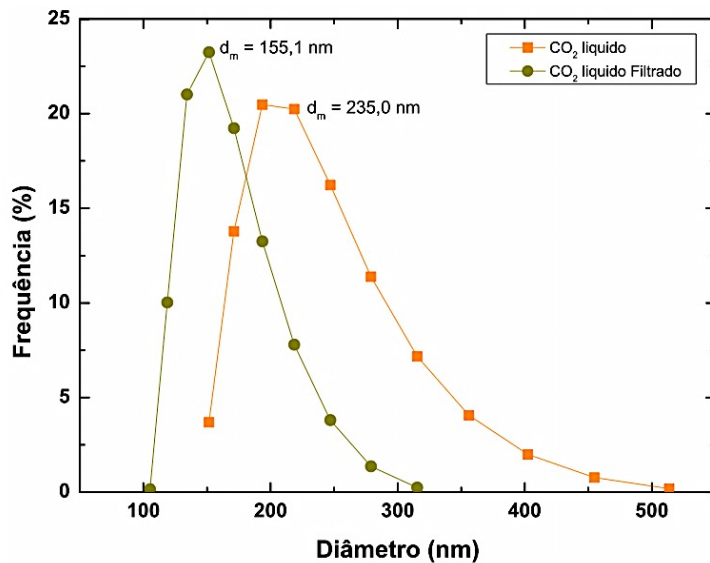
Numa outra abordagem, foram efetuados alguns estudos preliminares sobre a viabilidade do uso de solventes supercríticos. O método de FSC é extremamente interessante uma vez que não são utilizados solventes orgânicos, ou seja, não há risco de obter as nanopartículas contaminadas, com resíduos de solventes orgânicos. Por outro lado, não foi necessário

recorrer à liofilização para obter as nanopartículas no estado sólido, o que diminui o risco de agregação das mesmas. É um método com grande potencial para aplicação a nível industrial, uma vez que o processo foi rápido e depende apenas das dimensões da autoclave. Contudo é um método que requer alguns cuidados de segurança uma vez que utiliza pressões elevadas. O diâmetro médio das partículas obtido com recurso ao fluido supercrítico foi de 151,6 nm, para a formulação preparada com PEG 400. Este resultado é concordante com o obtido para o método de nanoprecipitação, no entanto a amostra apresentou-se polidispersa (0,417).



**Figura II-12** – Caracterização da distribuição de tamanhos das partículas, para o método de Fluido Supercrítico, e filtrado uma vez

Como alternativa ao FSC utilizou-se  $\text{CO}_2$  líquido como solvente, uma vez que não é necessária a utilização de uma pressão tão elevada para obter o  $\text{CO}_2$  no seu estado líquido. Os valores obtidos para o tamanho médio das nanopartículas foi de 235,5 nm e 155,1 nm após uma filtração num filtro de  $0,45 \mu\text{m}$  (Fig. II-13), revelaram-se promissores.



**Figura II-13** – Caracterização da distribuição de tamanhos das partículas, para o  $\text{CO}_2$  líquido, e filtrado uma vez

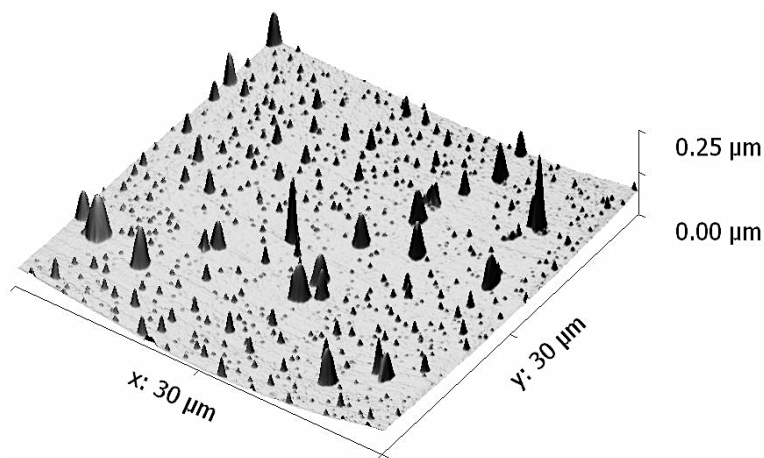
## II.4 Análise por *Microscopia de Força Atômica*

Todas as amostras que foram caracterizadas por DLS, também foram analisadas por AFM, após serem liofilizadas.

### II.4.1 Diferentes métodos para a Sac. – PEG 400 – Cólico

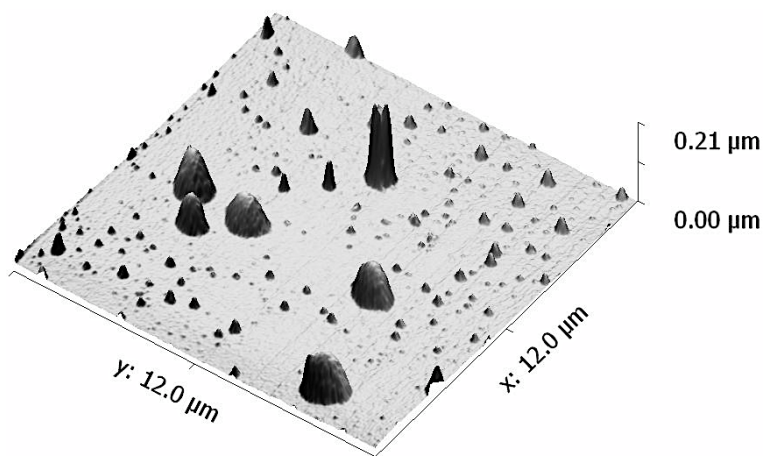
#### II.4.1.1 Emulsificação com Evaporação do Solvente

A Fig. II-14 apresenta uma larga dispersão de tamanhos referentes às nanopartículas, mas se tivermos em conta que a amostra foi liofilizada, então percebe-se que houve aglomeração de algumas partículas e daí surgirem na imagem uns relevos mais acentuados, na ordem dos micrómetros.



**Figura II-14** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 30 x 30  $\mu\text{m}$

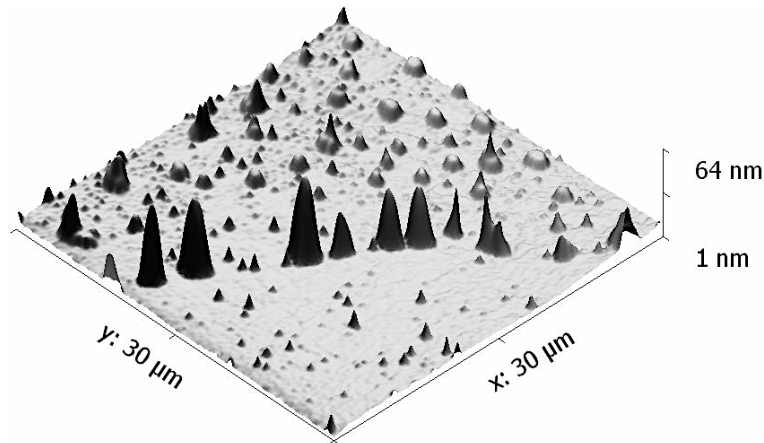
Para ser mais perceptível fez-se uma ampliação da imagem acima indicada (Fig. II-15). Verificou-se que o tamanho médio das nanopartículas foi  $130 \pm 52$  nm, excluindo os aglomerados.



**Figura II-15** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 12 x 12  $\mu\text{m}$

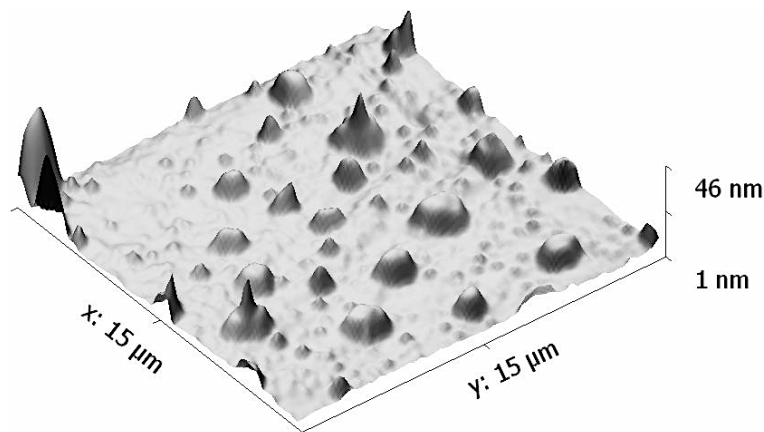
#### II.4.1.2 Nanoprecipitação

Com este método de síntese de NPPs conseguiu-se obter tamanhos médios de  $100 \pm 10$  nm.



**Figura II-16** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de  $30 \times 30 \mu\text{m}$

Uma vez feita a ampliação da imagem anterior, verificou-se a existência de uma baixa dispersão de tamanhos, ainda que muitas partículas estejam aglomeradas. Esses aglomerados são de dimensões inferiores aos observados pelo método de emulsificação com evaporação de solvente.



**Figura II-17** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de  $15 \times 15 \mu\text{m}$

Como se constatou na caracterização por DLS as dimensões das partículas foram inferiores na nanoprecipitação em relação à emulsificação com evaporação de solvente. Com a análise da Fig. II-15 e Fig. II-17 foi possível confirmar a diferença de tamanhos médios, ainda que a diferença seja aproximadamente de 30 nm.

#### II.4.1.3 CO<sub>2</sub> Líquido

Este método de síntese de NPPs não é muito usual e como foi referido na parte experimental, não existe controlo dos parâmetros, ainda assim obtiveram-se resultados extremamente interessantes, como sejam: as partículas terem tamanhos médios de  $205 \pm 70 \text{ nm}$ ; não foi necessário liofilizar a amostra; apenas foi necessário remover os resíduos de água; não ocorre a aglomeração das partículas, pelo menos de uma forma tão acentuada. O aspeto mais interessante foi o facto da utilização de CO<sub>2</sub> como solvente, uma vez que diminui a probabilidade de ocorrência de contaminação das NPPs.

Os aglomerados que se observaram, tanto na Fig. II-18 como na Fig. II-19, não têm a ver com a evaporação dos resíduos de água, mas sim com a total dissolução do composto. Uma vez

que a síntese foi feita usando gelo seco. À medida que se aumenta a temperatura e consequentemente a pressão o CO<sub>2</sub> vai sublimando até atingir o ponto crítico, a uma temperatura de -56,4°C e uma pressão de 5,18 Bar, sendo a partir daí que se observou a transformação de fase sólido – líquido. Tendo em conta que não conseguimos impedir a libertação do CO<sub>2</sub> sob a forma de gás, e uma vez que o CO<sub>2</sub> esteja no estado líquido e haja uma transferência de calor do exterior para o interior, então o CO<sub>2</sub> evapora na sua totalidade e apenas ficaram resíduos de água da reação com as nanopartículas. Com isto toda a reação é muito rápida e o CO<sub>2</sub> no estado líquido pode não ter tido a capacidade de dissolver a totalidade do polímero.

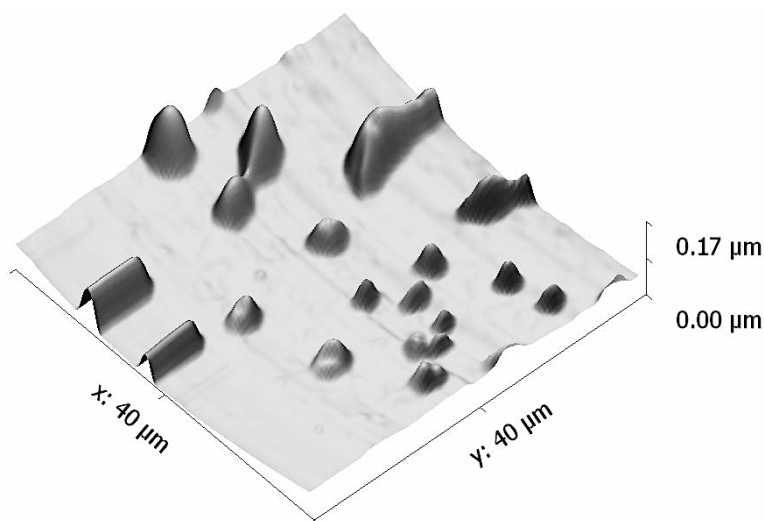


Figura II-18 – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 40 x 40  $\mu\text{m}$

Na Fig. II-19 observou-se um tamanho médio das nanopartículas de  $200 \pm 60$  nm.

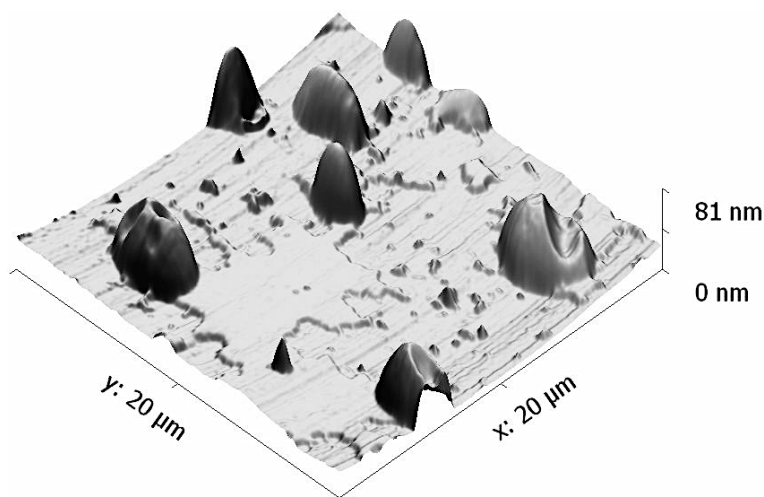
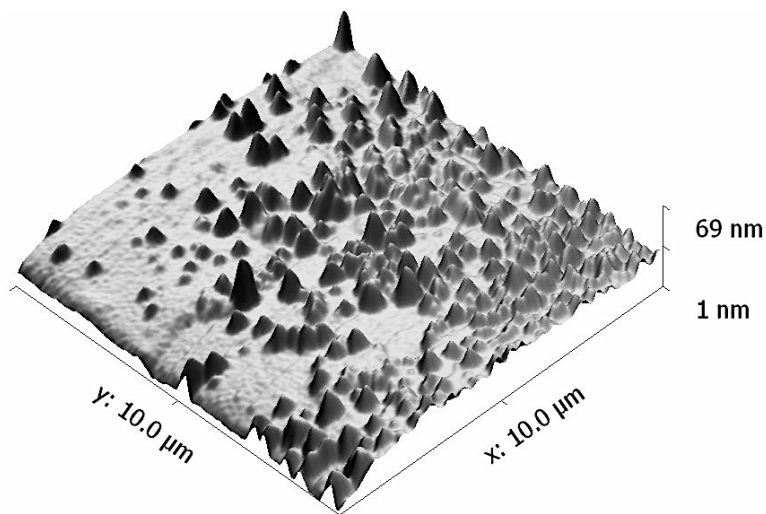


Figura II-19 – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 20 x 20  $\mu\text{m}$

#### II.4.1.4 Tecnologia de Fluidos Supercríticos

Este método de síntese de NPPs é realmente muito inovador e com particularidades extremamente interessantes, merecendo ser explorado nesta área. Na medida em que não foi necessário utilizar solventes orgânicos, a velocidade com que se obtiveram nanopartículas foi muito superior em relação a outros métodos utilizados (mencionados anteriormente). Esta

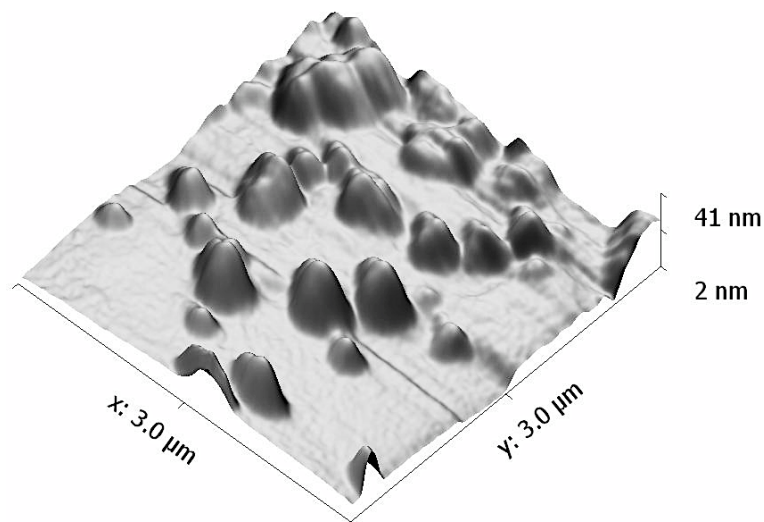
técnica foi abordada com recurso à Autoclave descrita na parte experimental, com a qual foi possível controlar vários parâmetros.



**Figura II-20** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 10 x 10 μm

Como se pode ver nas Fig. II-20 e Fig. II-21, há uma baixa dispersão de tamanhos. Praticamente não existem partículas aglomeradas e as partículas têm tamanhos médios de  $150 \pm 30$  nm. Este método tem a vantagem de não requerer a liofilização das partículas.

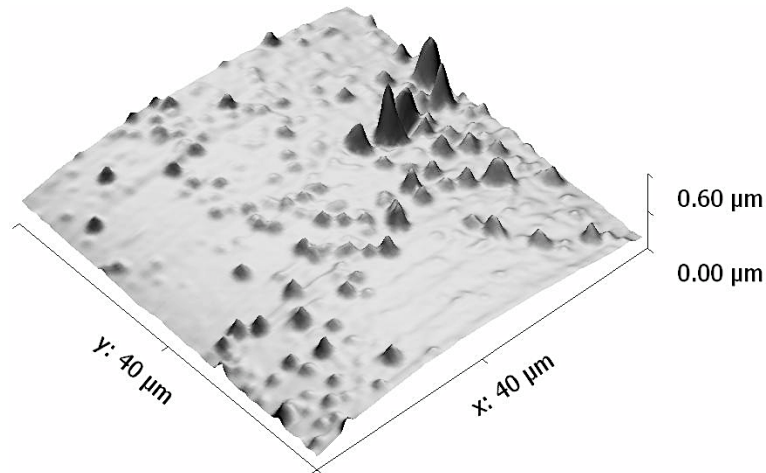
O FSC tem praticamente a mesma densidade que um líquido e uma difusividade duas ordens de grandeza superior à do líquido, o que permite uma melhor dissolução do polímero em comparação com a obtida aquando da utilização do CO<sub>2</sub> líquido.



**Figura II-21** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 3 x 3 μm

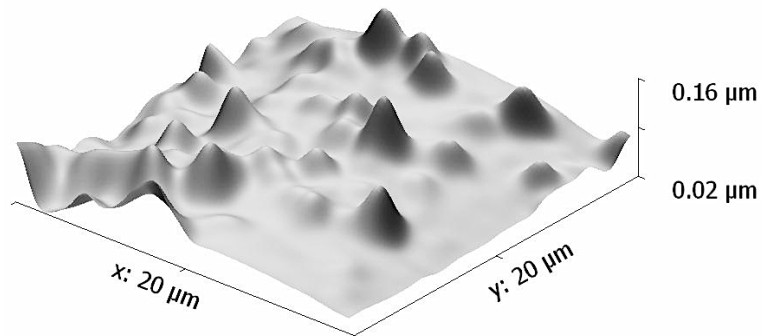
## II.4.2 Diferentes métodos para a Sac. – PEG 6000 – Cólico

### II.4.2.1 Emulsificação com evaporação do Solvente



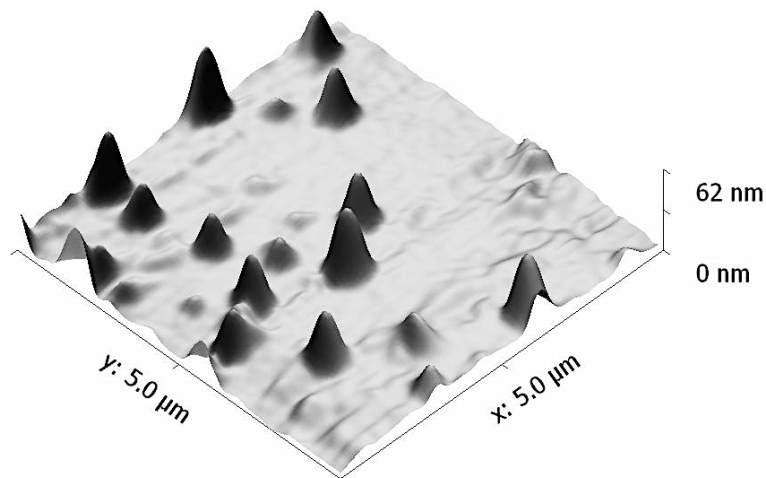
**Figura II-22** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 40 x 40  $\mu\text{m}$

Como já se verificou por DLS este foi o método em que se obteve partículas de maiores dimensões. Neste caso as partículas têm um tamanho médio de  $349 \pm 78$  nm.



**Figura II-23** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 20 x 20  $\mu\text{m}$

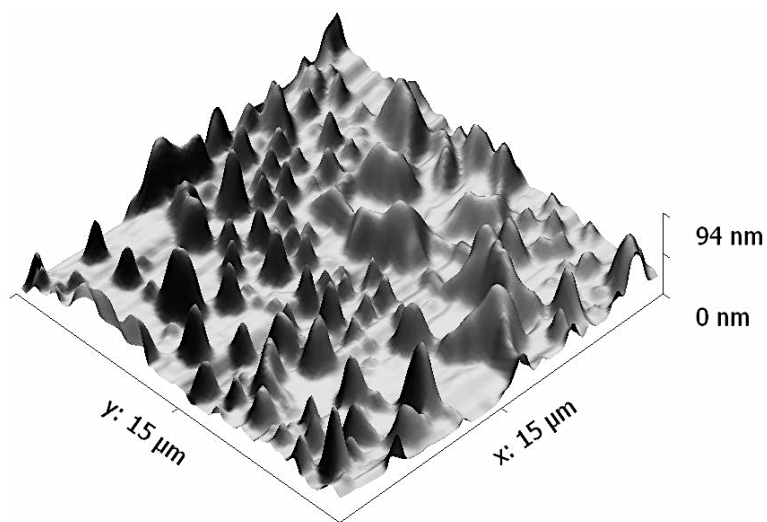
### II.4.2.2 Nanoprecipitação



**Figura II-24** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 5 x 5  $\mu\text{m}$

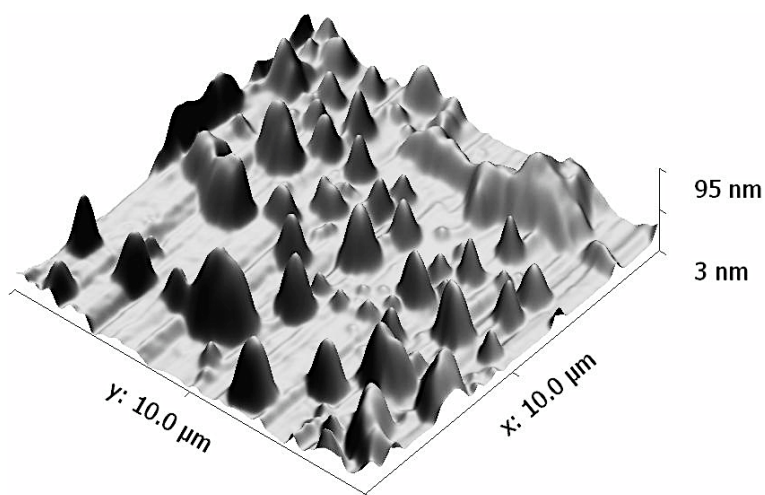
Este método permitiu obter partículas com uma baixa dispersão de tamanhos e mesmo após liofilizadas o tamanho médio das partículas foi de  $143 \pm 43$  nm.

### II.4.2.3 CO<sub>2</sub> Líquido



**Figura II-25** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 15 x 15  $\mu\text{m}$

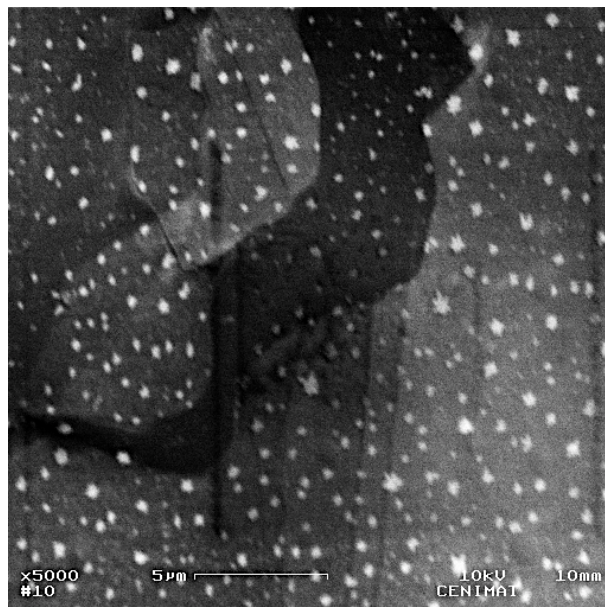
O tamanho médio das partículas para este método foi de  $263 \pm 69$  nm.



**Figura II-26** – Imagem topográfica, obtida por AFM em modo vibracional, com uma escala de 10 x 10  $\mu\text{m}$

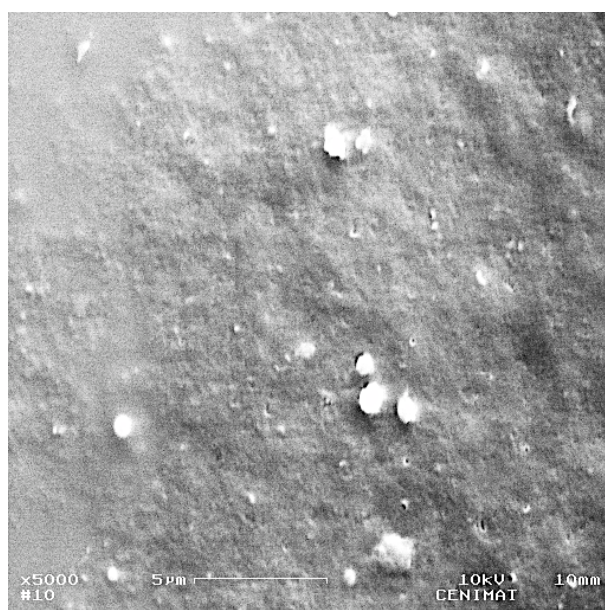
## II.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Varrimento

Pela técnica de SEM foi permitido observar a morfologia das nanoestruturas produzidas, assim como as suas dimensões médias.



**Figura II-27** – Imagem SEM de nanopartículas compostas pelo polímero Sac – PEG 6000 – Cólico, através do método de nanoprecipitação

Relativamente ao tipo de nanoestrutura produzida, com recurso a esta técnica de caracterização foi possível verificar que foram produzidas nanopartículas (Fig. II-27) com uma baixa dispersão de tamanhos, e com um valor para o diâmetro médio inferior aos outros métodos produzidos ( $83 \pm 37$  nm).



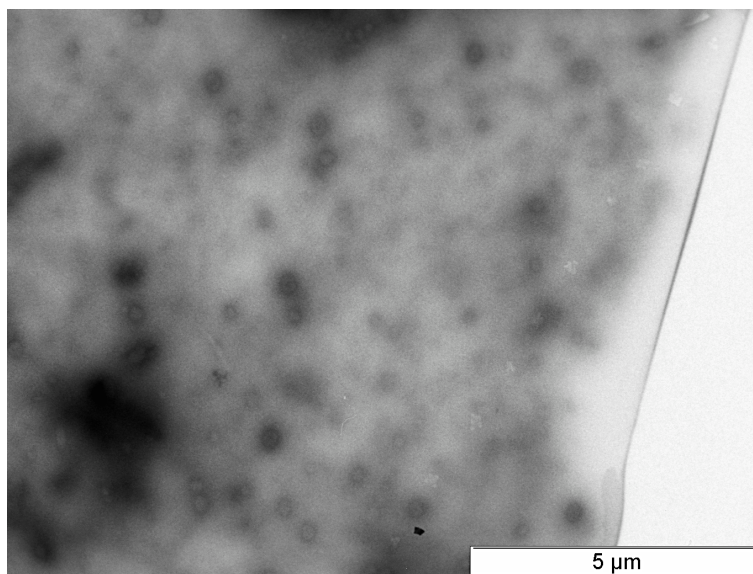
**Figura II-28** – Imagem SEM de nanopartículas compostas pelo polímero Sac – PEG 400 – Cólico, através do método de FSC

Quanto às nanopartículas obtidas pelo método de FSC o diâmetro médio obtido foi  $143 \pm 33$  nm, este valor está de acordo com os valores obtidos por outras técnicas de caracterização.

Não foi possível obter imagens com maior resolução uma vez que as amostras analisadas têm um ponto de fusão relativamente baixo, isto quer dizer que se houver um aumento na intensidade do feixe ocorreria a fusão das nanopartículas.

## II.6 Análise por Microscopia Eletrónica de Transmissão

Pela técnica de TEM foi igualmente possível observar a morfologia das nanoestruturas produzidas, assim como as suas dimensões médias.



**Figura II-29** – Imagem TEM de nanopartículas compostas pelo polímero Sac – PEG 400 – Cólico, através do método FSC

Através desta técnica foi possível verificar que o diâmetro médio das nanopartículas ( $146 \pm 49$  nm) está em conformidade com as técnicas de caracterização, anteriormente referidas.

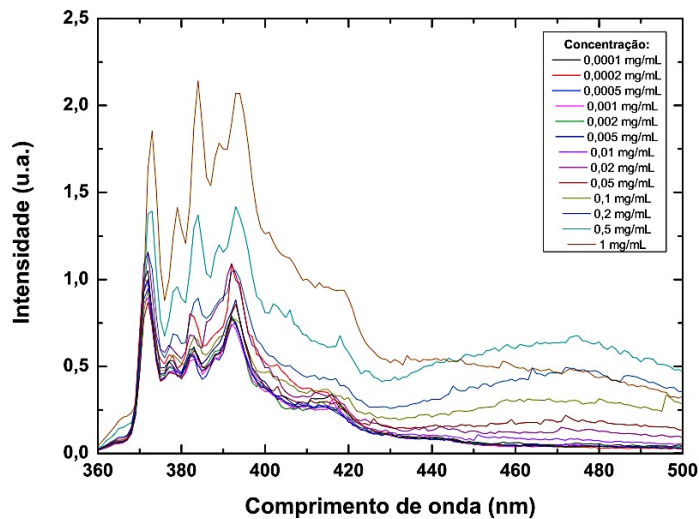
No entanto, verificou-se que houve a formação de um filme (Fig. II-29) e as nanopartículas estão no interior deste. Por isso não foi possível obter imagens com melhores resoluções, ainda que seja possível verificar a presença das nanopartículas.

Para as outras amostras não foi possível verificar a presença das nanopartículas, a justificação encontrada foi a tal formação do filme mencionada anteriormente, mas para as outras amostras a espessura do filme devia ser superior e como tal não foi possível ver nada no seu interior, ou através da amostra.

## II.7 Análise por Espectroscopia de Fluorescência

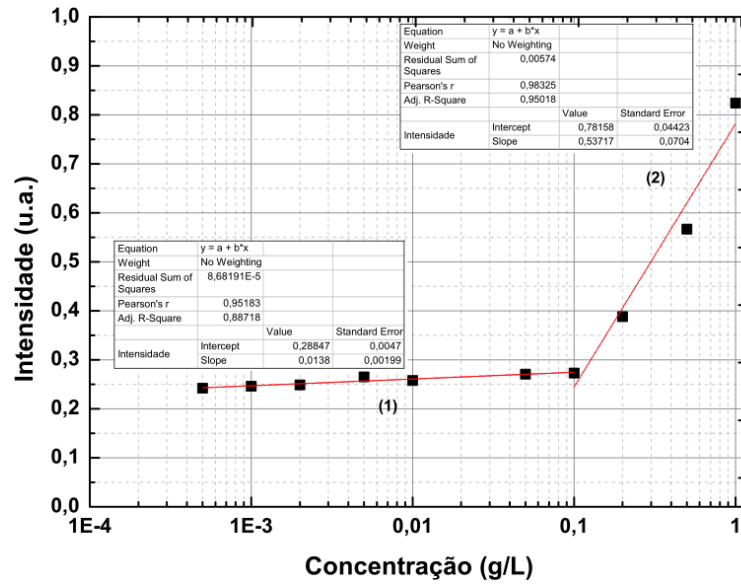
Pela técnica de espectroscopia de fluorescência utilizando pireno como sonda hidrofóbica, foi determinada a concentração de associação crítica (CAC) com base nos espectros de emissão de fluorescência, em que as interações do pireno ocorreram entre as nanopartículas e a solução aquosa.

Esta técnica apenas foi aplicada para o polímero de Sac. – PEG 6000 – Cólico, porque o outro polímero (Sac. – PEG 400 – Cólico) não é solúvel em água, assim sendo, não foi possível determinar a CAC.



**Figura II-30** – Espectro de Fluorescência no estado excitado do pireno/Sac. – PEG 6000 – Cólico, em função da concentração de polímero conjugado (Sac. – PEG 6000 – Cólico). Para um comprimento de onda de excitação constante, 339 nm

Foi obtido espectro de emissão para várias concentrações de polímero conjugado (Sac. – PEG 6000 – Cólico) e utilizando pireno como sonda. Os dados mostraram a formação de nanopartículas do polímero conjugado com o aumento das concentrações do polímero. Ocorreu ainda um aumento da intensidade de fluorescência (Fig. II-30), devido ao aumento do rendimento quântico, originando uma variação da intensidade de cada banda. O pireno associa-se preferencialmente em zonas menos polares do polímeros, o interior das nanopartículas, zona hidrofóbica. Enquanto que o pireno se estiver num ambiente polar mostra fraca intensidade de fluorescência [89].



**Figura II-31** – Gráfico da variação da concentração em função da área (integração dos espectros da Fig. II-41), para determinação do CAC

Para baixas concentrações a área foi praticamente constante, mas rapidamente sofre um aumento com o aumento da concentração. O valor de CAC é 0,114 (g/L), ou seja, foi o valor a partir do qual se formou a associação de modo significativo, através de ligações intermoleculares com o polímero. Este valor foi obtido a partir da interseção das tangentes traçadas para valores mais baixos de concentração e para valores mais elevados.

## II.8 Conclusões e Perspetivas Futuras

Ao longo deste trabalho pretendia-se obter nanopartículas que funcionassem como agentes de veiculação de fármacos. Nesse sentido foram sintetizados dois polímeros (Sac. – PEG 400 – Cólico e Sac. – PEG 6000 – Cólico) que posteriormente foram convertidos em nanopartículas. Neste contexto, a parte experimental dividiu-se essencialmente em duas partes: a) Síntese dos polímeros e sua caracterização; b) Síntese de nanopartículas e sua caracterização.

Na 1ª parte do trabalho experimental (síntese dos polímeros), os problemas inerentes a processos de síntese orgânica foram sendo ultrapassados e os rendimentos químicos obtidos para os produtos pretendidos foram bons ou aceitáveis, ver o anexo 1.

A reação que representou um maior desafio foi a monobenzilação do ácido cólico. Com efeito, ocorreu com um baixo rendimento (cerca de 20 %), o que se deve essencialmente à dificuldade em evitar a formação de produtos secundários (não pretendidos) resultantes da reação de di- e tri-substituição. A única possibilidade de contornar esta dificuldade, é monitorizar o progresso da reação (TLC) e interrompê-la logo que seja detetada a sua presença.

Na segunda parte deste trabalho, foram abordadas algumas técnicas de preparação de nanopartículas (NPPs). Pretendeu-se encontrar um método que fosse reprodutível e adaptável à escala industrial. Todos os métodos foram testados várias vezes, de modo a garantir a sua reprodutibilidade.

Neste sentido, dois dos métodos de síntese estudados, foram o da emulsificação com evaporação do solvente e o da nanoprecipitação. Constata-se que estes métodos não são facilmente adaptáveis à escala industrial, uma vez que estes métodos são relativamente lentos. Por outro lado, constata-se que o método da nanoprecipitação permite a obtenção de NPPs com dimensões inferiores aos 100 nm e com uma baixa polidispersão de tamanhos. Este método comparativamente ao método de emulsificação com evaporação do solvente, tem a vantagem de não necessitar da utilização de surfatante.

Estes dois métodos tem ainda a desvantagem em relação ao terceiro método utilizado (FSC), resultante da possibilidade da presença de resíduos da fase orgânica nas NPPs, o que é altamente indesejável em sistemas de veiculação de fármacos. Uma vez que se pretende desenvolver o uso destas partículas em seres vivos e sendo a maioria dos compostos orgânicos tóxicos, torna-se imperativo evitar a sua utilização.

Neste sentido, o método de FSC é extremamente interessante, na medida em que se utiliza CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente, evitando assim as possíveis contaminações nas NPPs. Este método tem um grande potencial para aplicações a nível industrial, uma vez que a quantidade de nanopartículas produzidas depende apenas das dimensões da câmara onde se realiza a síntese das mesmas. Esta técnica requer apenas alguns cuidados, tendo em conta que para formar o fluido supercrítico é necessária uma elevada pressão e alguma temperatura.

As amostras que foram caracterizadas por SEM e TEM apontam no sentido da morfologia das nanoestruturas produzidas serem esféricas.

Com recurso às várias técnicas de caracterização usadas (DLS, AFM, SEM e TEM) constatou-se que as dimensões dos tamanhos médios da NPPs estavam dentro de um determinado intervalo de valores, permitindo que todas as técnicas estivessem em conformidade.

Procedeu-se à análise por fluorescência (CAC) do polímero Sac. – PEG 6000 – Cólico, usando uma sonda fluorescente (o pireno). Não foi possível aplicar esta técnica de análise ao polímero de Sac. – PEG 400 – Cólico por este não ser solúvel em água. O valor de CAC obtido para a Sac. – PEG 6000 – Cólico foi 0,114 (g/L), ou seja, é o valor a partir do qual se formou a associação molecular de modo significativo, através de ligações intermoleculares.

Como perspectivas futuras sugere-se um estudo mais aprofundado sobre a aplicação do método de FSC. Para esse efeito será necessário proceder ao melhoramento da autoclave a usar (maior resistência), de modo a efetuar vários ciclos de experiências, mas em segurança. É de realçar que, este método se for melhorado, poderá tornar possível atingir o objetivo pretendido numa só etapa e sem a utilização de solventes orgânicos.

Um outro método a ser explorado é o da diálise. Neste método há vários parâmetros a considerar, mas as membranas e a sua permeabilidade deverão ser determinantes nas dimensões das NPPs pretendidas.

Finalmente, o estudo in vitro das nanopartículas já produzidas é um grande desafio, permitindo analisar a sua utilidade e por outro lado abrir outros caminhos para chegar ao objetivo pretendido (produção de NPPs para aplicação em sistemas de veiculação de fármacos).

## **Capítulo III – Parte Experimental**

### III.1 Procedimentos Gerais

A água desionizada foi filtrada por um sistema Millipore.

Os solventes e os reagentes foram fornecidos pela Aldrich e pela Pronalab.

Na cromatografia em coluna, utilizaram-se colunas de vidro com dimensões 45x2,5cm e 40x3,5cm, com enchimento de gel de sílica (Macherey-Nagel, Kieselgel 60 M) e areia do mar (PANREAC). As frações foram recolhidas manualmente.

As análises por TLC para estudar o decurso das reações, bem como para analisar o grau de pureza dos compostos, foram efetuadas em placas de gel de sílica 60 F254 Merck,

Os processos de revelação utilizados para as placas de TLC foram, a revelação no ultravioleta ( $\lambda_{\text{max}} = 254\text{nm}$ ) numa câmara (CAMAG) e por pulverização com uma solução de ácido sulfúrico em etanol ou com uma solução de ácido fosfomolibdico em etanol, seguido de aquecimento.

Os solventes de reação foram eliminados por evaporação sob pressão reduzida no evaporador rotativo (BUCHI, V-500), com um banho de água (BUCHI, B-480). Os vestígios de solvente foram eliminados com recurso a uma bomba de vácuo (Edwards, Two Stage).

A medição do pH efetuou-se com papel indicador universal (Filter-Lab).

O azoto líquido e o argón utilizados são fornecidos pela Air Liquide.

Os espetros de ressonância magnética nuclear foram registados num aparelho (Bruker AMX) ( $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz), utilizando como solventes  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-}d_6$  e como referência interna o TMS para o primeiro solvente. Os desvios químicos ( $\delta_H$ ) foram apresentados em ppm. Os espetros de correlação  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY e HMQC foram determinados no mesmo aparelho.

Os espetros de massa foram registados por MALDI – TOF (Bruker Autoflex).

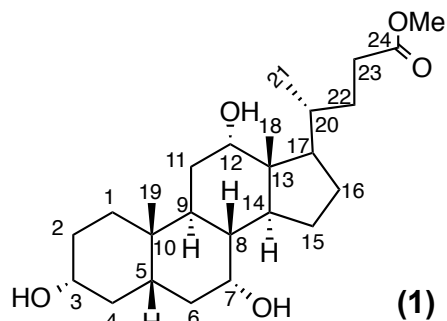
Os espetros de fluorescência foram registados num espectrofluorímetro (SPEX Fluorolog Spectrofluorimeter).

O tamanho das nanopartículas foram medidos com o auxílio do DLS (SZ-100 nanopartica, Horiba) com um ângulo de dispersão de  $90^\circ$ , AFM (AFM Workshop), TEM realizados nos laboratórios de análises do IST e SEM realizado no CENIMAT.

## III.2 Síntese do composto Ácido Cólico Benzilado

### III.2.1 Síntese do composto Metil 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ – tri-hidroxi – 5 $\beta$ – colanato (1)

A uma solução de ácido cólico (7,323 g; 17,9 mmol) em CH<sub>3</sub>OH (30 mL), adicionou-se 0,5 mL de HCl 33 %, aqueceu-se a refluxo, durante 20 minutos. Arrefeceu-se a mistura reacional à t. a. e posteriormente arrefeceu-se a 5°C. Os cristais resultantes foram filtrados e lavados com CH<sub>3</sub>OH frio. Obtendo-se assim o composto (1) (6,834 g; 16,2 mmol; 91 %), sob a forma de agulhas brancas.



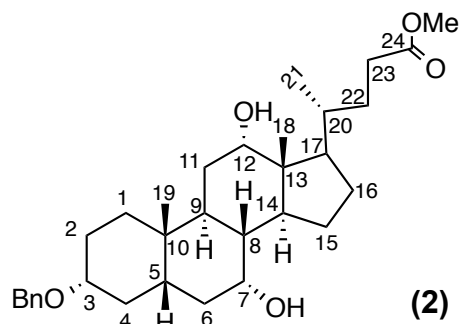
$R_f$  0,32 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1); p.f. 152 – 154°C;  $[\alpha]_D^{20} = +26,0^\circ$  (C=1, CHCl<sub>3</sub>).

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$ (ppm): 4,02 – 3,93 (m, 1H, H-12 $\beta$ ); 3,90 – 3,80 (m, 1H, H-7 $\beta$ ); 3,67 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,47 – 3,09 (m, 1H, H-3 $\beta$ ); 2,41 – 2,18 (m, 4H, H-4 $\alpha$ , H-9 $\alpha$ , H-23 $\alpha$  e 23 $\beta$ ); 1,93 – 1,85 (m, 3H, H-16 $\alpha$ , H-6 $\beta$ , H-14 $\alpha$ ); 1,81 – 1,75 (m, 4H, H-1 $\alpha$ , H-4 $\beta$ , H-17 $\alpha$ , H-22 $\alpha$ ); 1,68 – 1,66 (m, 2H, H-2 $\beta$ , H-15 $\beta$ ); 1,57 – 1,49 (m, 4H, H-6 $\alpha$ , H-8 $\beta$ , H-11); 1,44 – 1,33 (m, 4H, H-2 $\alpha$ , H-5 $\beta$ , H-20, H-22 $\beta$ ); 1,30 – 1,25 (m, 1H, H-16 $\beta$ ); 1,13 – 1,04 (m, 1H, H-15 $\alpha$ ); 0,98 (d,  $J = 5,6$  Hz, 3H, H-21); 1,02 – 0,93 (m, 1H, H-1 $\beta$ ); 0,88 (s, 3H, H-19); 0,68 (s, 3H, H-18).

$^{13}\text{C RMN}$  (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 174,84 (C(=O)O); 73,09 (C12); 71,96 (C3); 68,47 (C7); 51,51 (C25); 47,01 (C17); 46,43 (C13); 41,66 (C14); 41,47 (C5); 39,49 (C8); 39,46 (C4); 35,31 (C1); 35,29 (C20); 34,76 (C10); 34,63 (C6); 31,11 (C23); 30,92 (C22); 30,33 (C2); 28,16 (C11); 27,51 (C16); 26,38 (C9); 23,22 (C15); 22,46 (C19); 17,31 (C21); 12,48 (C18).

### III.2.2 Síntese do composto Metil 3 $\alpha$ – O – benzil – 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ – di-hidroxi – 5 $\beta$ – colanato (2)

Dissolveu-se o composto (1) (2 g; 4,74 mmol; 1eq.) em 15 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. Arrefeceu-se a 0°C e adicionou-se NaH (0,375 g; 9,48 mmol; 2eq.) e ao fim de 20 minutos BnBr (1,13 mL; 9,48 mmol; 2eq.). Controlou-se a reação por TLC (hexano/AcOEt 4:8). Ao fim de 12 horas parou-se a reação pela adição de gelo à mistura reacional. Extraíu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x 50 mL) e lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de NaCl (2x 15 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrou-se e concentrou-se.



Posteriormente purificou-se o bruto reacional, por cromatografia em coluna (hexano/AcOEt 4:8), obtendo-se o composto (2) (0,450 g; 0,878 mmol; 19 %), sob a forma de um sólido branco, tipo espuma.

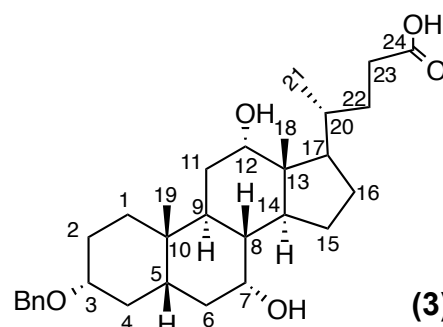
$R_f$  0,68 (hexano/AcOEt 1:2); p.f. 49,2°C;  $[\alpha]_D^{20} = +34,0^\circ$  (C=1, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$ (ppm): 7,38 – 7,22 (m, 5H, H-Ar); 4,62 – 4,52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,01 – 3,97 (m, 1H, H-12 $\beta$ ); 3,85 – 3,83 (m, 1H, H-7 $\beta$ ), 3,66 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3,20 – 3,17 (m, 1H, H-3 $\beta$ ); 2,38 – 2,14 (m, 4H, H-4 $\alpha$ , H-9 $\alpha$ , H-23 $\alpha$  e 23 $\beta$ ); 1,97 – 1,73 (m, 8H, H-1 $\alpha$ , H-2 $\beta$ , H-4 $\beta$ , H-6 $\beta$ , H-14 $\alpha$ , H-16 $\alpha$ , H-17 $\alpha$ , H-22 $\alpha$ ); 1,72 – 1,47 (m, 5H, H-8 $\beta$ , H-6 $\alpha$ , H-11, H-15 $\beta$ ); 1,45 – 1,26 (m, 5H, H-2 $\alpha$ , H-5 $\beta$ , H-16 $\beta$ , H-20, H-22 $\beta$ ); 1,19 – 1,08 (m, 1H, H-15 $\alpha$ ); 0,98 (d,  $J = 5,6$  Hz, 3H, H-21); 1,01 – 0,93 (m, 1H, H-1 $\beta$ ); 0,88 (s, 3H, H-19); 0,69 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 174,72 (C(=O)O); 127,57 (C-Ar); 78,65 (C12); 72,86 (C3); 69,71 (CH<sub>2</sub>-Ar); 68,27 (C7); 51,51 (C25); 47,10 (C17); 46,52 (C13); 42,02 (C14); 41,44 (C5); 39,65 (C8); 36,26 (C4); 35,32 (C1); 34,92 (C20); 34,61 (C10); 34,59 (C6); 31,04 (C23); 30,96 (C22); 30,88 (C11); 28,42 (C16); 27,42 (C2); 26,75 (C9); 23,19 (C15); 22,64 (C19); 17,32 (C21); 12,59 (C18).

### III.2.3 Síntese do composto 3 $\alpha$ – O – benzil – 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ – di-hidroxi – 5 $\beta$ – colanato (3)

A uma solução do composto (2) (0,66 g; 1,28 mmol) em THF (25 mL) adicionou-se uma solução de LiOH (0,5 N, 13 mL). Após 24 horas verificou-se um consumo total do composto (2). Acidificou-se com uma solução de HCl 10%, até que o pH da solução estivesse aproximadamente entre 2 e 3. Extraíu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x 50 mL). Lavou-se a fase orgânica com uma solução aquosa de NaCl (2x 15 mL) e com H<sub>2</sub>O



(15 mL). Posteriormente purificou-se o produto de reação, por cromatografia em coluna com o eluente hexano/AcOEt 4:8, obtendo-se assim o composto (3) (0,62 g; 1,20 mmol; 94 %), sob a forma de um sólido branco.

$R_f$  0,40 (hexano/AcOEt 1:2); **p.f.** 64,2°C;  $[\alpha]_D^{20} = +37,6^\circ$  (C=1, CHCl<sub>3</sub>).

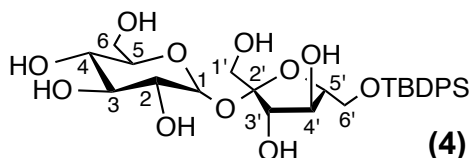
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$ (ppm): 7,39 – 7,27 (m, 5H, H-Ar); 4,58 – 4,52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,01 – 3,98 (m, 1H, H-12 $\beta$ ); 3,79 – 3,76 (m, 1H, H-7 $\beta$ ), 3,30 – 3,25 (m, 1H, H-3 $\beta$ ); 2,49 – 2,37 (m, 2H, H-23 $\alpha$ ); 2,35 – 2,17 (m, 3H, H-4 $\alpha$ , H-9 $\alpha$ , H-23 $\beta$ ); 1,98 – 1,79 (m, 8H, H-1 $\alpha$ , H-2 $\beta$ , H-4 $\beta$ , H-6 $\beta$ , H-14 $\beta$ , H-16 $\alpha$ , H-17 $\alpha$ , H-22 $\alpha$ ); 1,74 – 1,63 (m, 1H, H-15 $\beta$ ); 1,60 – 1,45 (m, 6H, H-2 $\alpha$ , H-6 $\alpha$ , H-8 $\beta$ , H-11, H-22 $\beta$ ); 1,44 – 1,21 (m, 4H, H-2 $\alpha$ , H-5 $\beta$ , H-16 $\beta$ , H-20); 1,19 – 1,08 (m, 1H, H-15 $\alpha$ ); 1,02 (d,  $J = 6,1$  Hz, 3H, H-21); 1,03 – 0,93 (m, 1H, H-1 $\beta$ ); 0,88 (s, 3H, H-19); 0,69 (s, 3H, H-18).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 178,35 (C(=O)O); 127,57 (C-Ar); 78,65 (C12); 72,86 (C3); 78,98 (C12); 73,09 (C3); 69,79 (CH<sub>2</sub>-Ar); 68,35 (C7); 47,04 (C17); 46,50 (C13); 42,00 (C14); 41,41 (C5); 39,39 (C8); 35,95 (C4); 35,52 (C20); 35,20 (C1); 34,94 (C10); 34,50 (C6); 30,84 (C23); 28,08 (C22); 27,63 (C11); 26,80 (C16); 26,47 (C2); 25,61 (C9); 23,22 (C15); 22,37 (C19); 17,14 (C21); 12,48 (C18).

### III.3 Síntese do composto 6' – O – (3-carboxipropanoil) – 1',2,3,3',4,4',6 – hepta – O – benzil sacarose

#### III.3.1 Síntese do composto 6' – O – *tert*-butildifenilsilil sacarose (4)

A uma solução de sacarose (5 g; 15 mmol) em piridina seca (100 mL), adicionou-se DMAP (0,19 g; 1,56 mmol) sob agitação magnética e em atmosfera de árgon. Após a sacarose estar praticamente



dissolvida (3 horas), adicionou-se TBDPSCI (4 mL; 14,76 mmol; 1eq.) gota a gota. A reação foi controlada por TLC (AcOEt/Acetona/H<sub>2</sub>O 10:10:1). Assim que ocorreu o produto secundário menos polar, parou-se a reação e evaporou-se o solvente, adicionando três porções de tolueno.

Posteriormente purificou-se o produto de reação, por cromatografia em coluna com o eluente AcOEt/Acetona/H<sub>2</sub>O 100:100:1, obtendo-se assim o composto **(4)** (4,738 g; 8,159 mmol; 55 %), na forma de um sólido branco.

*R<sub>f</sub>* 0,35 (AcOEt/Acetona/H<sub>2</sub>O 10:10:1); *p.f.* 192 – 195°C;  $[\alpha]_D^{20} = +44,4^\circ$  (C=1, CH<sub>3</sub>OH).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$ (ppm): 7,71 – 7,59 (m, 4H, H-Ar); 7,47 – 7,36 (m, 6H, H-Ar); 5,26 – 5,20 (m, 2H, H-1, -OH); 4,95 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H, -OH); 4,85 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H, -OH); 4,76 – 4,68 (m, 2H, -OH); 4,52 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, -OH); 4,20 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H, -OH); 3,91 – 3,86 (m, 2H); 3,81 – 3,76 (m, 2H); 3,70 – 3,66 (m, 1H); 3,65 – 3,56 (m, 1H); 3,51 – 3,32 (m + DMSO-*d*<sub>6</sub>, H-6, H-1'); 3,16 – 3,01 (m, 2H); 0,97 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 135,59 (C-H(Ar)); 135,55 (C-H(Ar)); 133,67 (C(Ar)); 133,65 (C(Ar)); 130,19 (C-H(Ar)); 130,17 (C-H(Ar)); 128,31 (C-H(Ar)); 128,28 (C-H(Ar)); 104,89 (C2'); 92,02 (C1); 82,64; 77,24; 74,98; 73,53; 73,09; 72,15; 70,49; 66,07 (C6'); 62,55 (C1'); 61,23 (C6); 27,18 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 19,32 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

Como produto secundário obteve-se o composto **(5)** (1,745 g; 1,64 mmol; 11 %), este apresenta-se também sob a forma de um sólido branco.

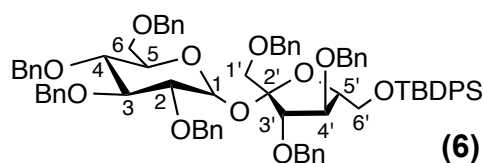
*R<sub>f</sub>* 0,59 (AcOEt/Acetona/H<sub>2</sub>O 10:10:1); *p.f.* 174 – 177°C;  $[\alpha]_D^{20} = +26,9^\circ$  (C=1, CH<sub>3</sub>OH)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$ (ppm): 7,75 – 7,64 (m, 4H); 7,57 – 7,47 (m, 4H); 7,41 – 7,14 (m, 13H); 5,31 (s, 1H); 4,23 – 3,19 (m, 16H); 1,05 – 0,91 (m, 18H).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 135,2; 133,3; 129,7; 127,9 (C(Ar)); 105,0 (C-2'); 92,2 (C-1); 82,4; 76,8; 75,0; 73,2; 72,7; 71,9; 69,6 (C-2, C-3, C-3', C-4, C-4', C-5, C-5'); 65,8 (C-1'); 63,3; 62,1 (C-6,6'); 26,8 (CH<sub>3</sub>); 19,0 (CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

#### III.3.2 Síntese do composto 1',2,3,3',4,4',6 – hepta – O – benzil – 6' – O – *tert*-butildifenilsilil sacarose (6)

Arrefeceu-se a 0°C uma solução do composto (4) (2 g; 0,29 mmol; 1eq.) e (n-Bu)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>I<sup>-</sup> (0,02 g; 0,029 mmol; 0,2eq.) em DMF (40 mL). Adicionou-se com muito cuidado NaH (1,29 g; 0,0325 mmol; 11,2



eq.; 1,6eq/OH). Ao fim de 15 minutos adicionou-se BnBr (5 mL; 4,06mmol; 14eq.) gota a gota. Deixou-se atingir a temperatura ambiente ao fim de 2 horas, uma vez que a reação foi controlada por TLC (AcOEt/Acetona/H<sub>2</sub>O 10:10:1) e ao fim deste tempo, obteve-se uma solução laranja (acastanhada). Arrefeceu-se a 0°C e adicionou-se gelo à mistura reacional. Extraiu-se com éter (100mL + 50mL). Secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidrido, filtrou-se e concentrou-se.

Posteriormente purificou-se o produto de reação, por cromatografia em coluna (hexano/AcOEt 5:1) obtendo assim o composto **(6)** (3,590 g; 2,96 mmol; 87 %) sob a forma de um óleo amarelo.

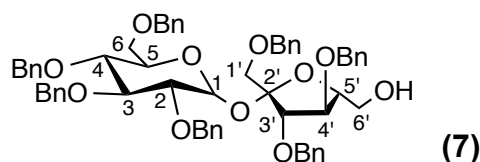
$R_f$  0,54 (Hexano/AcOEt 3:1);  $[\alpha]_D^{20} = +31,6^\circ$  (C=1, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta_H$  (ppm): 7,68 – 7,53 (m, 4H, H-Ar); 7,41 – 7,06 (m, 41H, H-Ar); 5,64 (m, 1H, H-1); 4,87 – 4,74 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,75 – 4,25 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,23 – 4,12 (m, 6H); 3,97 – 3,82 (m, 1H); 3,75 – 3,62 (m, 1H); 3,55 – 3,47 (m, 1H); 3,47 – 3,28 (m, 1H); 3,24 (d, J = 7,2 Hz, 1H); 2,49 (s, 1H); 0,95 (s, 16H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz; DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm): 139,22 (C(Ar)); 138,90 (C(Ar)); 138,73 (C(Ar)); 138,61 (C(Ar)); 138,54 (C(Ar)); 138,49 (C(Ar)); 128,71 – 127,81 (C-H(Ar)); 104,65 (C2'); 89,51 (C1); 83,81; 82,20; 81,72; 81,35; 79,85; 77,72; 74,90 (CH<sub>2</sub>-Ar); 74,32 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,96 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,83 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,51 (CH<sub>2</sub>-Ar); 71,92 (CH<sub>2</sub>-Ar); 71,34 (CH<sub>2</sub>-Ar); 70,71; 68,95 (C-6); 65,24 (C-6').

### III.3.3 Síntese do composto 1',2,3,3',4,4',6 – hepta – O – benzil sacarose **(7)**

Dissolveu-se o composto **(6)** (3,590 g; 2,96 mmol; 1eq.) em 40 mL de THF. Adicionou-se TBAF gota a gota. A reação ficou sob agitação e atmosfera de árgon durante 12 horas e foi controlada por TLC



(Hexano/AcOEt 3:1). Diluiu-se a solução em 80 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Lavou-se com de H<sub>2</sub>O (2x 15 mL). Secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidrido. Filtrou-se o agente exsiccante e concentrou-se a mistura reacional.

Posteriormente purificou-se o produto de reação, por cromatografia em coluna com o eluente hexano/AcOEt 3:2, obtendo-se assim o composto **(7)** (2,324 g; 2,39 mmol; 81 %), sob a forma de óleo incolor.

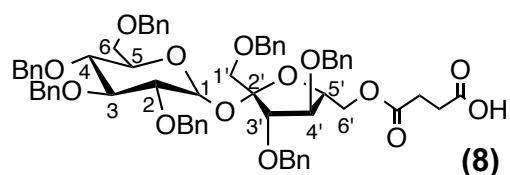
$R_f$  0,26 (Hexano/AcOEt 3:1);  $[\alpha]_D^{20} = +53,6^\circ$  (C=1, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta_H$  (ppm): 7,38 – 7,11 (m, 35H, H-Ar); 5,67 (d, 1H, H-1); 4,78 (d; J = 11,2 Hz; 1H); 4,74 – 4,27 (m; 15H; CH<sub>2</sub>-Ar); 4,06 (t, J = 7,2 Hz, 1H); 4,02 – 3,92 (m; 1H); 3,85 – 3,73 (m; 2H); 3,70 – 3,56 (m; 3H); 3,53 – 3,24 (m + DMSO-*d*6, 36H).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm): 139,24 (C(Ar)); 138,88 (C(Ar)); 138,80 (C(Ar)); 138,75 (C(Ar)); 138,65 (C(Ar)); 138,44 (C(Ar)); 128,73 – 127,80 (C-H(Ar)); 104,25 (C2'); 89,37 (C1); 83,65; 82,05; 81,83; 81,66; 79,75; 77,80; 74,86 (CH<sub>2</sub>-Ar); 74,37 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,93 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,81 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,29 (CH<sub>2</sub>-Ar); 71,95 (CH<sub>2</sub>-Ar); 71,85 (CH<sub>2</sub>-Ar); 71,57; 70,63; 68,93 (C-6); 62,81 (C-6').

### III.3.4 Síntese do composto 6' – O – (3-carboxipropanoil) – 1',2,3,3',4,4',6 – hepta – O – benzil sacarose (8)

Dissolveu-se o composto (7) (2,324 g; 2,39 mmol; 1eq.) em 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. Adicionou-se anidrido succínico (0,48 g; 4,78 mmol; 2eq.), DMAP (0,29 g; 2,39 mmol; 1eq.) e 0,2 mL de TEA.



A reação foi controlada por TLC (Hexano/AcOEt 3:2) e parou-se ao fim de 48 horas. Diluiu-se a solução em 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, lavou-se com uma solução de HCl 0,1 M (5x10 mL), seguido de uma solução aquosa de NaCl (3x 10 mL) e por fim com H<sub>2</sub>O (2x 10 mL). Secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidrido, filtrou-se e concentrou-se.

Posteriormente purificou-se o produto de reação, por cromatografia em coluna com o eluente hexano/AcOEt 3:2, obtendo-se assim o composto (8) (2,28 g; 2,12 mmol; 89 %), sob a forma de um óleo incolor.

$R_f$  0,38 (Hex/AcOEt 3:2);  $[\alpha]_D^{20} = +27,1^\circ$  (C=1, CHCl<sub>3</sub>).

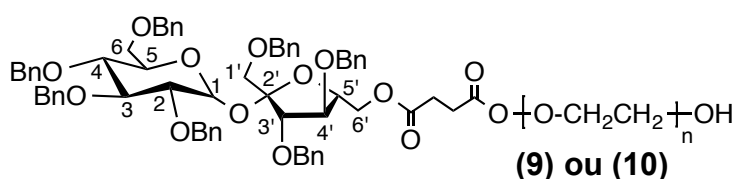
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$ (ppm): 7,40 – 7,19 (m, 35H, H-Ar); 5,69 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H, H-1); 4,96 (d,  $J = 10,9$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,85 (d,  $J = 10,9$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,80 (d,  $J = 10,9$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,70 – 4,25 (m, 11H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,21 – 4,13 (m, 1H); 4,11 – 4,04 (m, 2H); 3,97 (t,  $J = 8,0$  Hz, 1H); 3,76 (d,  $J = 10,9$  Hz, 1H); 3,66 (t,  $J = 9,6$  Hz, 1H); 3,60 – 3,48 (m, 3H); 3,46 – 3,38 (m, 1H); 2,59 – 2,45 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 174,89 (COOH); 171,95 (C(=O)O); 138,92 (C(Ar)); 138,27 (C(Ar)); 138,00 (C(Ar)); 137,94 (C(Ar)); 137,74 (C(Ar)); 137,70 (C(Ar)); 128,41 (C-H(Ar)); 128,35 (C-H(Ar)); 128,30 (C-H(Ar)); 128,13 (C-H(Ar)); 128,09 (C-H(Ar)); 127,97 (C-H(Ar)); 127,83 (C-H(Ar)); 127,72 (C-H(Ar)); 127,66 (C-H(Ar)); 127,56 (C-H(Ar)); 127,51 (C-H(Ar)); 104,51 (C2'); 89,97 (C1); 83,99; 81,82; 81,47; 79,56; 77,99; 77,55; 75,60 (CH<sub>2</sub>-Ar); 74,99 (CH<sub>2</sub>-Ar); 73,49 (CH<sub>2</sub>-Ar); 73,36 (CH<sub>2</sub>-Ar); 73,17 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,85 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,25 (CH<sub>2</sub>-Ar); 71,00 (C1'); 70,34; 68,25 (C6); 64,88 (C6'); 29,26 (CH<sub>2</sub>COOH); 28,82 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH).

## III.4 Método Geral para a Síntese do composto Sac. – PEG – Cólico

A partir deste passo de síntese, e para obter o polímero conjugado final fez-se os mesmos tipos de reações fazendo apenas variar a massa molecular média do PEG (400 e 6000).

### III.4.1 Síntese do composto 6' – O – (3-carboxipropanoil) – 1',2,3,3',4,4',6 – hepta – O – benzil sacarose com o PEG (9) ou (10)



A uma solução do composto (8) (1 g; 0,934 mmol; 1,2eq.), em 15 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, adicionou-se DCC (0,321g; 1,56 mmol; 2eq.), DMAP (0,114g; 0,934 mmol; 1,2eq.). Ao fim de

20 minutos adicionou-se PEG (1 eq.). Ao fim de 24 horas colocou-se a mistura reacional a 5°C. Filtrou-se o precipitado de ureia sobre celite previamente lavada com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Posteriormente purificou-se o produto de reação, por cromatografia em coluna com um gradiente de CH<sub>3</sub>OH (1 a 10%) em CHCl<sub>3</sub>, obtendo assim o composto **(9)** (1,12 g; 0,773 mmol; 56 %) e **(10)** (2,13 g; 0,303 mmol; 73 %).

O composto **(9)** apresenta um *R<sub>f</sub>* 0,42 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1), sob a forma de um óleo incolor,  $[\alpha]_D^{20} = +20,3$  (C=1, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$ (ppm): 7,63 – 7,20 (m, 33H, H-Ar); 7,16 (d, J = 5,3 Hz, 2H, Ar); 5,68 – 5,66 (m, 1H, H-1); 4,95 (d, J = 10,9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,87 – 4,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,71 – 4,31 (m, 14H, H-5', H-6', CH<sub>2</sub>-Ar); 4,27 – 4,18 (m, 2H, -C(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-); 4,04 – 3,92 (m, 3H); 3,80 – 3,42 (m, 1H, H-3); 2,81 – 2,47 (m; 4H; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

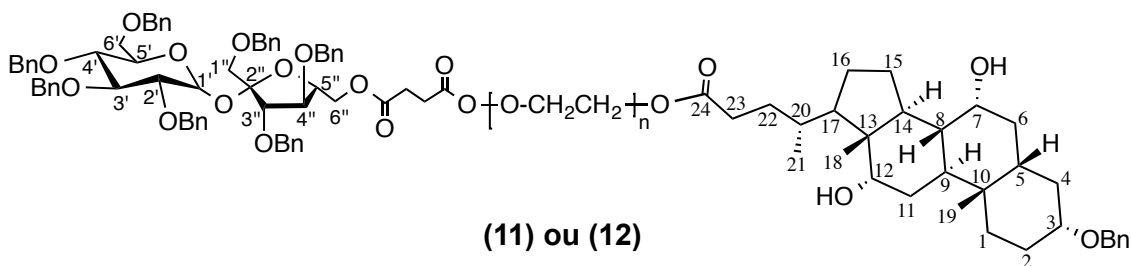
<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 172,12 (C(=O)O-PEG); 171,95 (C(Ar)); 157,11; 153,87; 138,79 (C(Ar)); 138,42 (C(Ar)); 138,20 (C(Ar)); 137,98 (C(Ar)); 137,86 (C(Ar)); 137,71 (C(Ar)); 134,38 (C-H(Ar)); 132,82 (C-H(Ar)); 129,85 (C-H(Ar)); 129,65 (C-H(Ar)); 128,91 (C-H(Ar)); 128,28 (C-H(Ar)); 128,24 (C-H(Ar)); 128,19 (C-H(Ar)); 127,85 (C-H(Ar)); 127,81 (C-H(Ar)); 127,72 (C-H(Ar)); 127,64 (C-H(Ar)); 127,58 (C-H(Ar)); 127,52 (C-H(Ar)); 127,45 (C-H(Ar)); 104,55 (C2'); 90,03 (C1); 83,64; 81,95; 81,81; 79,63; 78,18; 77,57; 77,32; 77,01; 76,69; 75,45 (CH<sub>2</sub>-Ar); 74,76 (CH<sub>2</sub>-Ar); 73,29 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,77 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,51 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,42 (CH<sub>2</sub>-Ar); 70,86 (CH<sub>2</sub>-Ar); 70,57; 70,44; 70,18; 68,94; 68,37; 65,47; 63,69 (-C(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-); 61,57; 49,82; 49,08; 33,76; 32,43; 30,63; 29,60; 29,21; 28,74 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

O composto **(10)** sob a forma de um sólido branco apresenta um *R<sub>f</sub>* 0,42 (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1); p.f. 57 – 60°C;  $[\alpha]_D^{20} = +4,8^\circ$  (C=1, CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$ (ppm): 7,41 – 7,17 (m, 33H, H-Ar); 7,17 – 7,06 (m, 2H, Ar); 5,65 (d, J = 2,6 Hz, 1H, H-1); 4,92 (d, J = 10,8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,87 – 4,73 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,68 – 4,29 (m, 15H, CH<sub>2</sub>-Ar); 4,27 – 4,16 (m, 2H, -C(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-); 4,15 – 4,01 (m, 3H); 3,96 (t, J = 9,4 Hz, 1H, H-3); 2,73 – 2,44 (m; 4H; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 167,45 (C(=O)O-PEG); 167,27 (C(=O)O); 134,13 (C(Ar)); 133,75 (C(Ar)); 133,53 (C(Ar)); 133,33 (C(Ar)); 133,31 (C(Ar)); 133,18 (C(Ar)); 133,04 (C-H(Ar)); 127,89 (C-H(Ar)); 123,61 (C-H(Ar)); 123,57 (C-H(Ar)); 123,55 (C-H(Ar)); 123,54 (C-H(Ar)); 123,52 (C-H(Ar)); 123,18 (C-H(Ar)); 123,16 (C-H(Ar)); 123,13 (C-H(Ar)); 123,05 (C-H(Ar)); 122,97 (C-H(Ar)); 122,91 (C-H(Ar)); 122,84 (C-H(Ar)); 122,78 (C-H(Ar)); 104,65 (C2'); 90,88 (C1); 85,36; 78,97; 77,29; 77,15 (CH<sub>2</sub>-Ar); 74,96 (CH<sub>2</sub>-Ar); 73,51 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,90 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,63 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,31 (CH<sub>2</sub>-Ar); 72,00 (CH<sub>2</sub>-Ar); 70,78; 70,09; 68,61; 68,11; 68,01; 67,83; 67,76; 65,81; 64,29; 63,70 (-C(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-); 60,81; 59,02; 24,07 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

## III.4.2 Síntese do composto Sac. – PEG – Cólico Benzilado (11) ou (12)



Dissolveu-se 1 equivalente do composto (9) ou (10) em 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco em ambiente inerte, árgon. De seguida, adicionou-se 2 eq. do composto (3), 3 eq. de DCC e 1,2 eq. de DMAP e arrefeceu-se a  $0^\circ\text{C}$ . A reação foi controlada por TLC ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1) e ao fim de 48 horas arrefeceu-se a mistura reacional.

Posteriormente purificou-se o produto de reação, por cromatografia em coluna com um gradiente de  $\text{CH}_3\text{OH}$  (1 a 10%) em  $\text{CHCl}_3$ , obtendo assim o composto (11) (0,885 g; 0,729 mmol; 71 %) e (12) (0,647 g; 0,092 mmol; 37 %).

O composto (11) apresenta um  $R_f$  0,40 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1);  $[\alpha]_D^{20} = +29,2^\circ$  ( $C=1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), sob a forma de um óleo incolor.

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_H$ (ppm): 7,48 – 7,20 (m, 38H, H-Ar); 7,16 (d,  $J = 5,4$  Hz, 2H, Ar); 5,67 (m, 1H, H-1); 4,95 (d,  $J = 10,9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ -Ar); 4,89 – 4,75 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -Ar); 4,71 – 4,29 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -Ar); 4,69 – 4,26 (m, 14H,  $\text{CH}_2$ -Ar); 4,29 – 4,19 (m, 4H,  $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ); 4,17 – 4,06 (m, 3H); 4,02 – 3,92 (m, 2H); 3,87 – 3,79 (m, 1H); 3,76 – 3,43 (m, PEG); 3,32 – 3,20 (m, 1H); 2,66 – 2,53 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); 2,47 – 2,19 (m, 4H, H-23 $\alpha_{\text{col}}$ ); 2,01 – 1,48 (m, 8H); 1,46 – 1,23 (m, 10H); 1,21 – 1,07 (m, 2H); 1,05 – 0,95 (m, 3H, 21- $\text{CH}_{3\text{col}}$ ); 0,91 (s, 3H, 19- $\text{CH}_{3\text{col}}$ ); 0,70 (s, 3H, 18- $\text{CH}_{3\text{col}}$ ).

$^{13}\text{C RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 174,23 ( $\text{C}_{24\text{col}}$ ); 172,23 ( $\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{PEG}$ ); 172,04 ( $\text{C}(=\text{O})\text{O}$ ); 139,22 ( $\text{C}(\text{Ar})$ ); 139,12 ( $\text{C}(\text{Ar})$ ); 138,91 ( $\text{C}(\text{Ar})$ ); 138,53 ( $\text{C}(\text{Ar})$ ); 138,31 ( $\text{C}(\text{Ar})$ ); 138,11 ( $\text{C}(\text{Ar})$ ); 138,09 ( $\text{C}(\text{Ar})$ ); 137,97 ( $\text{C}(\text{Ar})$ ); 137,82 ( $\text{C}(\text{Ar})$ ); 128,30 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 128,22 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 128,02 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,96 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,93 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,91 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,83 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,75 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,69 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,62 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,56 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,51 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,38 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,31 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 127,25 ( $\text{C}-\text{H}(\text{Ar})$ ); 104,66 ( $\text{C}2''$ ); 90,14 ( $\text{C}1'$ ); 83,75; 82,07; 81,92; 79,74; 78,79; 78,74; 78,29; 77,68; 77,41; 77,29; 77,09; 76,77; 75,56; 74,87; 73,40 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 72,88 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 72,83 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 72,61; 72,54 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 70,97 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 70,92 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 70,68 ( $\text{C}1''$ ); 70,58; 69,96; 69,69 ( $\text{CH}_2$ -Ar $_{\text{col}}$ ); 69,21; 69,06; 68,48; 68,23; 65,59; 63,80 ( $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ); 63,44 ( $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ); 47,08; 46,52; 46,00; 44,19; 41,96; 41,49; 39,67; 38,37; 36,28; 35,15; 34,46; 33,84; 28,29 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); 27,13; 26,70; 25,59; 24,92; 23,20; 22,65 ( $\text{C}19_{\text{col}}$ ); 17,34 ( $\text{C}21_{\text{col}}$ ); 12,60 ( $\text{C}18_{\text{col}}$ ).

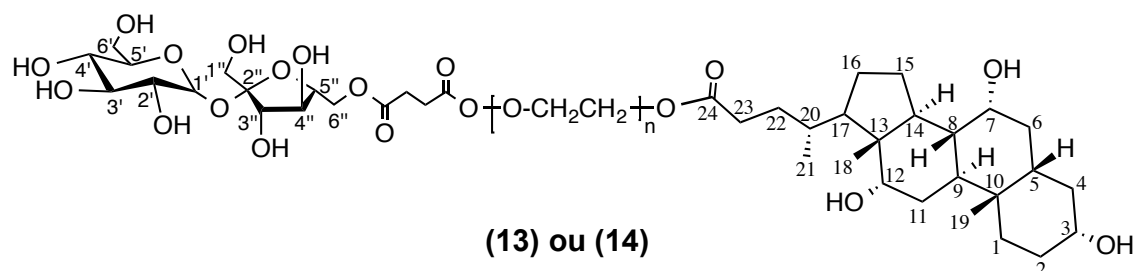
O composto (12) apresenta um  $R_f$  0,40 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  9:1); **p.f.** 59 –  $61^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{20} = +31,8^\circ$  ( $C=1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), sob a forma de um sólido branco.

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_H$ (ppm): 7,39 – 7,20 (m, 38H, H-Ar); 7,16 – 7,08 (m, 2H, Ar); 5,65 (m, 1H, H-1); 5,31 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -Ar); 4,92 (d,  $J = 10,9$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ -Ar); 4,80 (dd,  $J = 15,3$  e  $11,0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -Ar); 4,68 – 4,28 (m, 14H); 4,27 – 4,15 (m, 4H,  $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ); 4,15 – 4,03 (m,

3H); 4,00 – 3,90 (m, 2H); 3,87 – 3,79 (m, 1H); 3,78 – 3,39 (m, PEG); 3,28 – 3,20 (m, 1H); 2,71 – 2,46 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); 2,44 – 2,36 (m, 1H, H-23 $\alpha_{\text{col}}$ ); 2,35 – 2,15 (m, 3H); 2,01 – 1,74 (m, 8H); 1,71 – 1,50 (m, 10H); 1,46 – 1,23 (m, 1H); 1,22 – 1,04 (m, 1H); 0,99 (d,  $J = 5,9$ , Hz, 3H, 21- $\text{CH}_{3\text{col}}$ ); 0,90 (s, 3H, 19- $\text{CH}_{3\text{col}}$ ); 0,70 (s, 3H, 18- $\text{CH}_{3\text{col}}$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 174,14 (C24 $_{\text{col}}$ ); 172,15 (C(=O)O-PEG); 171,97(C(=O)O); 139,17 (C(Ar)); 138,83 (C(Ar)); 138,45 (C(Ar)); 138,23 (C(Ar)); 138,04 (C(Ar)); 138,01 (C(Ar)); 137,89 (C(Ar)); 137,75 (C(Ar)); 137,11 (C-H(Ar)); 131,82 (C-H(Ar)); 128,31 (C-H(Ar)); 128,28 (C-H(Ar)); 128,24 (C-H(Ar)); 128,22 (C-H(Ar)); 127,89 (C-H(Ar)); 127,86 (C-H(Ar)); 127,84 (C-H(Ar)); 127,76 (C-H(Ar)); 127,68 (C-H(Ar)); 127,62 (C-H(Ar)); 127,55 (C-H(Ar)); 127,48 (C-H(Ar)); 127,23 (C-H(Ar)); 104,58 (C2''); 90,07 (C1'); 83,67; 81,85; 79,66; 78,59; 78,22; 77,59; 77,32; 77,21; 77,00; 76,68 ; 75,48 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 74,80 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 73,31 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 72,81 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 72,68; 72,54 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 72,46 ( $\text{CH}_2$ -Ar); 70,90 (C1''); 70,51; 69,62 ( $\text{CH}_2$ -Ar $_{\text{col}}$ ); 69,14; 68,99; 68,41; 68,17; 65,51; 63,72 ( $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ); 63,37 ( $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ); 47,01; 46,46; 46,14; 45,52; 41,96; 41,40; 39,62; 36,19; 34,96; 34,54; 31,06; 30,73; 28,77 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); 28,39; 27,35; 27,19; 26,69; 23,10; 22,60 (C19 $_{\text{col}}$ ); 17,27 (C21 $_{\text{col}}$ ); 12,54 (C18 $_{\text{col}}$ ).

### III.4.3 Síntese do composto Sac. – PEG – Cólico (13) ou (14)



O composto **(11)** ou **(12)** foi dissolvido em Etanol:AcoEt:H<sub>2</sub>O (7:7:1) (25 mL). Adicionou-se 0,2 g de Paládio/C (10%). A mistura foi agitada durante 24 horas sobre 50 psi de hidrogénio. Filtrou-se o paládio sobre celite e evaporou-se o solvente. Obteve-se o composto **(13)** (0,943 g; 0,729 mmol; 83 %) e **(14)** (0,634 g; 0,092 mmol; 85 %).

O composto **(13)** apresenta um p.f. 45,7°C;  $[\alpha]_D^{20} = +29,2^\circ$  (C=1,  $\text{CHCl}_3$ ), e tem a forma de um sólido branco.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_H$  (ppm): 5,77 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H, -OH); 5,37 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H, -OH); 5,19 – 5,08 (m, 1H, H-1); 5,03 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H, -OH); 4,89 – 4,53 (m, 3H, -OH); 4,51 – 4,25 (m, 2H); 4,18 – 4,05 (m, 6H,  $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ); 4,03 – 3,95 (m, 1H, -OH); 3,94 – 3,84 (m, 1H); 3,83 – 3,66 (m, 2H); 3,65 – 3,55 (m, 2H); 3,54 – 3,25 (m, PEG); 3,22 – 3,12 (m, 2H); 3,09 (m, 1H); 2,62 – 2,42 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); 2,36 – 2,25 (m, 1H, H-23 $\alpha_{\text{col}}$ ); 2,25 – 2,05 (m, 3H); 2,02 – 1,90 (m, 1H, H-14 $\alpha_{\text{col}}$ ); 1,83 – 1,56 (m; 6H); 1,55 – 0,96 (m, 12H); 0,89 – 0,84 (m, 1H); 0,91 (d, 3H, 21- $\text{CH}_{3\text{col}}$ ); 0,79 (s, 3H, 19- $\text{CH}_{3\text{col}}$ ); 0,57 (s, 3H, 18- $\text{CH}_{3\text{col}}$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 171,97 (C(=O)O-PEG); 171,87 (C(=O)O); 156,64; 104,25 (C2''); 91,74 (C1'); 79,16; 76,40; 74,74; 72,77; 71,62; 70,03; 69,77; 68,21 ( $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ); 66,24 ( $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ); 65,92; 63,47; 60,72; 47,50; 46,05; 45,76;

41,51; 41,36; 40,12; 39,91; 39,70; 39,50; 39,29; 39,08; 38,87; 35,00; 34,86; 34,38; 33,33; 30,38; 28,46 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 25,31; 24,45; 22,61 (C19<sub>col</sub>); 16,87 (C21<sub>col</sub>); 12,30 (C18<sub>col</sub>).

O composto (**14**) apresenta um p.f. 54,9°C;  $[\alpha]_D^{20} = + 12,4^\circ$  (C=1, CHCl<sub>3</sub>), e tem a forma de um sólido branco.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_H$ (ppm): 5,77 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, -OH); 5,37 (m, *J* = 5,2 Hz, 1H, -OH); 5,19 – 5,08 (m, 1H, H-1); 5,03 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H, -OH); 4,89 – 4,53 (d, , 3H, -OH); 4,51 – 4,25 (m, 2H); 4,18 – 4,05 (m, 6H, -C(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 4,03 – 3,95 (m, 1H, -OH); 3,94 – 3,84 (m, 1H); 3,83 – 3,66 (m, 2H); 3,65 – 3,55 (m, 2H); 3,54 – 3,25 (m, PEG); 3,22 – 3,12 (m, 2H); 3,09 (m, 1H); 2,62 – 2,42 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 2,36 – 2,25 (m, 1H, H-23 $\alpha_{col}$ ); 2,25 – 2,05 (m, 3H); 2,02 – 1,90 (m, 1H, H-14 $\alpha_{col}$ ); 1,83 – 1,56 (m; 6H); 1,55 – 0,96 (m, 12H); 0,89 – 0,84 (m, 1H, H-1 $\beta_{col}$ ); 0,91 (d, 3H, 21-CH<sub>3col</sub>); 0,79 (s, 3H, 19-CH<sub>3col</sub>); 0,57 (s, 3H, 18-CH<sub>3col</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 171,99 (C(=O)O-PEG); 171,90 (C(=O)O); 104,30 (C2''); 91,79 (C1'); 79,17; 76,51; 74,75; 72,85; 72,81; 71,99; 71,97; 71,95; 71,68; 71,01; 69,80; 68,35 (-C(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-); 68,23 (-C(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-); 67,62; 66,26; 63,49; 63,07; 45,78; 41,53; 40,13; 39,92; 39,71; 39,50; 39,29; 39,08; 38,87; 35,32; 35,02; 34,88; 34,39; 30,72; 30,68; 30,40; 28,47 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 27,28; 26,22; 25,27; 22,82; 22,62 (C19<sub>col</sub>); 16,88 (C21<sub>col</sub>); 12,32 (C18<sub>col</sub>).

## III.5 Métodos de Preparação das Nanopartículas

As nanopartículas foram produzidas por vários métodos, como a emulsificação com evaporação do solvente, a nanoprecipitação e em fluido supercrítico.

A preparação das nanopartículas foram feitas em copos de precipitação (LINEX) de 20 ml, a água desionizada e o(s) solvente(s) utilizado(s) foram filtrados antes do método ser colocado em prática, por filtros de seringa de PE 0,45  $\mu$ m (LABOR SPIRIT, Lda).

### III.5.1 Emulsificação com Evaporação do Solvente

Dissolveu-se o polímero (20 mg) no respetivo solvente orgânico (2 mL) (THF para o composto Sac. – PEG 400 – Cólico e acetona para o composto Sac. – PEG 6000 – Cólico). Adicionou-se a solução orgânica gota a gota a uma solução aquosa de PVA (3%) sobre agitação. Uma vez obtida a emulsão colocou-se 1 minuto no Vortex e de seguida num banho de Ultra-Sons (Elma, S 100 H Elmasonic) durante 3 minutos. Iniciou-se durante um período de 2 minutos, com uma pausa de 30 segundos e finalizou-se com 1 minuto. Deixou-se a agitar durante 12 horas para remover o solvente orgânico. A suspensões coloidais obtidas foram liofilizadas a -55°C e 0,5 kPa. Os sólidos obtidos foram guardados a 5°C.

### III.5.2 Nanoprecipitação

Dissolveu-se o composto (20 mg) no respetivo solvente orgânico (2 mL) (THF para o composto Sac. – PEG 400 – Cólico e acetona para o composto Sac. – PEG 6000 – Cólico). Adicionou-se a solução orgânica gota a gota à solução aquosa (4 mL) sobre agitação. Deixou-se a agitar

durante 12 horas, até a completa evaporação do solvente orgânico. As suspensões coloidais obtidas foram liofilizadas a  $-55^{\circ}\text{C}$  e 0,5 kPa. Os sólidos obtidos foram guardados a  $5^{\circ}\text{C}$ .

### III.5.3 Tecnologia de Fluido Supercrítico

Inicialmente não havia possibilidade para realizar este método, até que surgiu uma ideia muito simplista, que consiste na adição de 10 g de gelo seco num tubo Falcon de 15 mL. Em seguida colocou-se o composto Sac. – PEG 6000 – Cólico (20 mg), fechou-se o tubo e colocou-se dentro de um banho de água a  $60^{\circ}\text{C}$ . Uma vez formado o  $\text{CO}_2$  líquido, esperou-se até que este evaporasse na sua totalidade. Retirou-se o tubo de dentro do banho. Posteriormente colocou-se os tubos num exsiccador com pentóxido de fósforo para evaporar resíduos de água.

Numa outra metodologia, adicionou-se 30 g de gelo seco à autoclave artesanal, juntamente com 50 mg de Sac. – PEG 400 – Cólico. Fechou-se a câmara e de forma gradual aumentou-se a temperatura no exterior, com um banho de água em que a temperatura deste foi controlada por um termómetro (de forma a provocar o aumento da pressão). Quando a autoclave apresentou uma pressão de 80 Bar (a temperatura do banho estava entre os  $50^{\circ}\text{C}$  e os  $60^{\circ}\text{C}$ ), abriu-se a válvula de segurança e libertou-se o  $\text{CO}_2$  para a atmosfera. A descompressão fez-se durante 20 minutos, ou seja, com uma velocidade de descompressão de 4 Bar/min. A temperatura final do banho foi de  $42^{\circ}\text{C}$ .

#### III.5.3.1 Descrição da Autoclave

A representação das peças desenhadas obteve-se com recurso ao software AutoCAD, cujas dimensões são expressas em milímetros.

As peças apresentadas (corpo, cabeça, suporte de anilha e manómetro) compõem a Autoclave, que permite a formação do fluido supercrítico.

A totalidade das peças é em aço inox e a construção das mesmas teve origem na oficina da empresa Metalocachoeira.

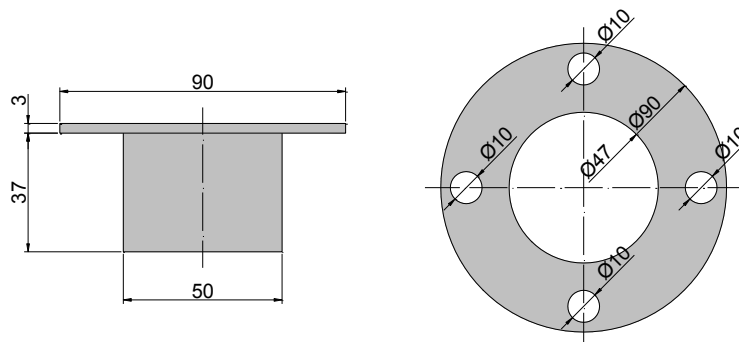


Figura III-1 – Corpo da Autoclave, em perfil e planta, respetivamente

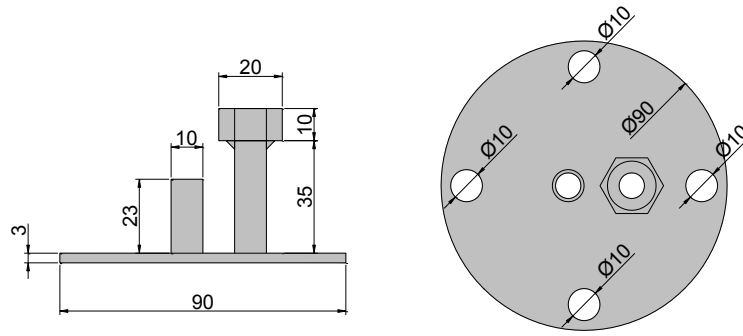


Figura III-2 – Cabeça da Autoclave, em perfil e planta, respetivamente

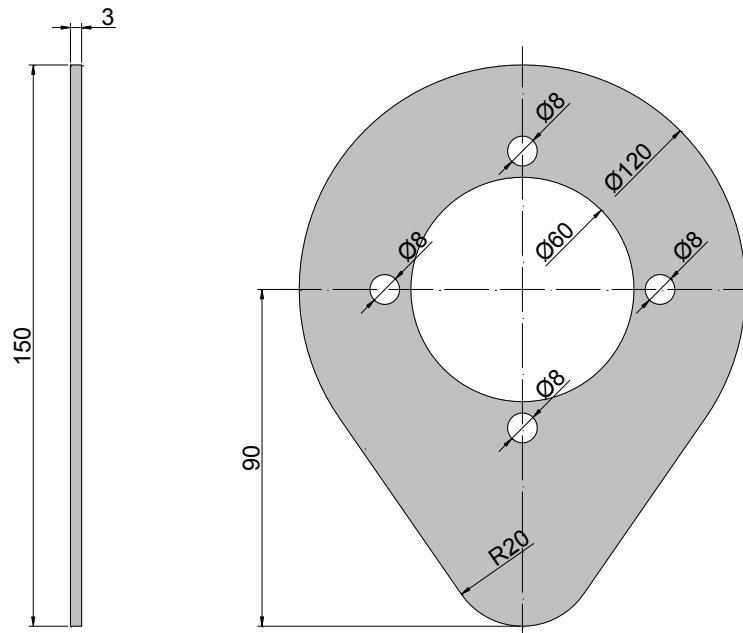


Figura III-3 – Suporte de anilha para a Autoclave, em perfil e planta, respetivamente

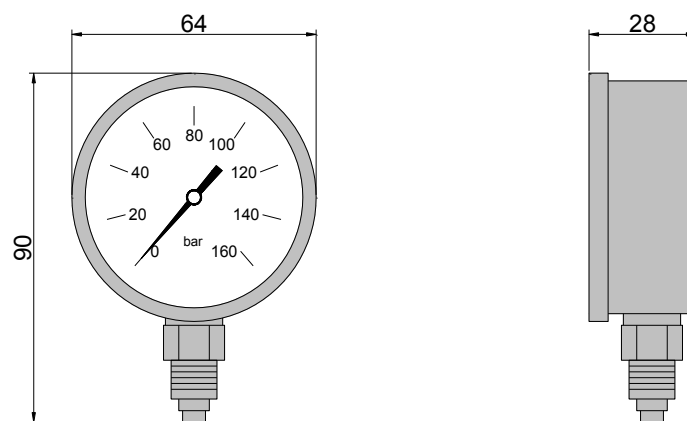


Figura III-4 – Manómetro para a Autoclave, em representação frontal e lateral, respetivamente

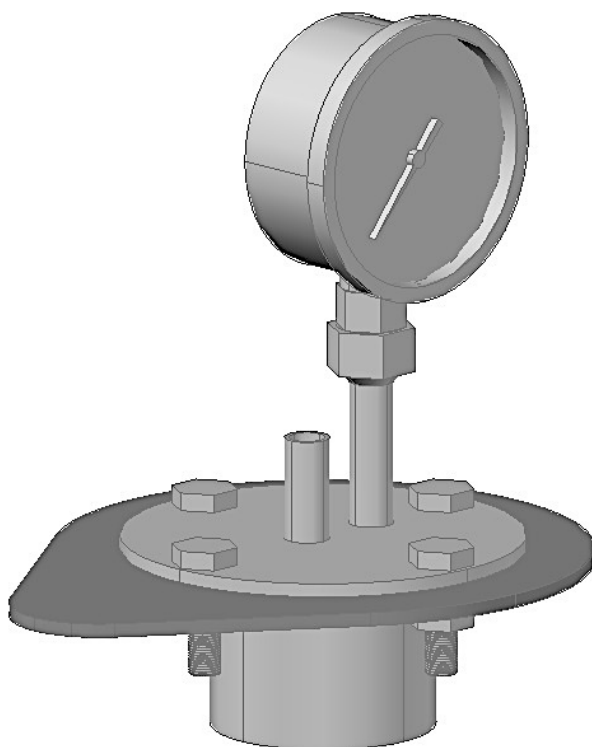


Figura III-5 – Representação 3D da montagem da Autoclave

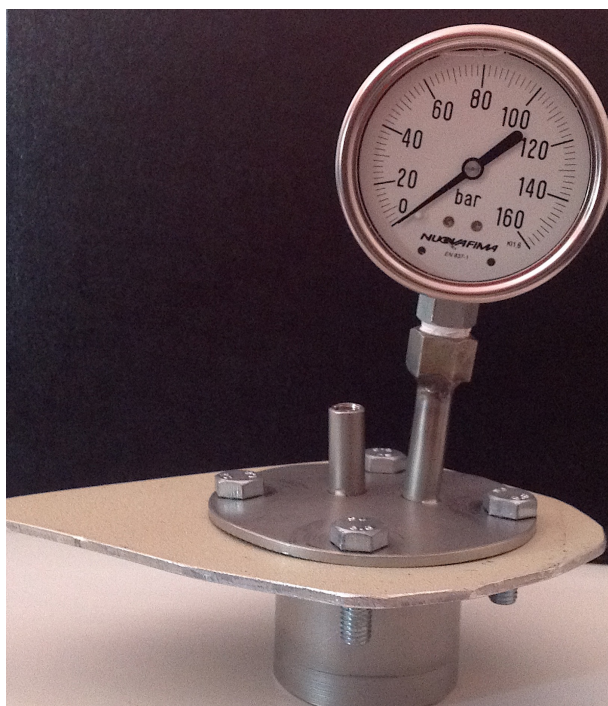


Figura III-6 – Autoclave

### **III.6 Caracterização morfológica das NPPs por AFM, SEM e TEM**

O modo de preparação das amostras teve com base a preparação de uma solução de NPPs, com a concentração de 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL.

Para a técnica de AFM colocou-se um gota da solução de NPPs numa folha de mica e deixou-se durante 12 horas a 5°C. Para o SEM também se prepararam as amostras da mesma maneira que para o AFM, no entanto, antes da análise ser feita, depositou-se uma fina camada de ouro. Para o TEM, colocou-se uma gota no porta amostras e esperou-se que a água evaporasse. Tanto no SEM como no TEM foi feita a admissão de vácuo para a respetiva análise.

As imagens obtidas pelas técnicas referidas anteriormente, foram tratadas com auxílio a dois programas o Gwyddion 2.32 e o ImageJ.

### **III.7 Método de preparação das amostras para a Espectroscopia de Fluorescência**

Uma quantidade conhecida de pireno foi dissolvido em acetona e adicionado a uma série de *vials* de 4 mL. Deixou-se evaporar a acetona durante a noite num exsiccador. O pireno foi ajustado para uma concentração final para  $6 \times 10^{-7}$  M em 3 mL de solução aquosa de polímero com uma gama de concentrações de 1 a  $10^{-4}$  g/L. As amostras ficaram durante 12 horas à temperatura ambiente para equilibrar o pireno com o polímero. O comprimento de onda emitido para de excitação foi de 340 nm.

## **Capítulo IV – Bibliografia**

- [1] Atwood J. L., Steed J. V., "Organic Nanostructures", Editor WILEY-VCH, (2008) preface. [Acedido em: 07-Jan.-2013].
- [2] Ochekepe N. A., Olorunfemi P. O., Ngwuluka N. C., Trop. J. Ararm. Res. 8 (3) (2009) 265-274.
- [3] Leucuta S. E., Curr. Clin. Ararmcol. 5 (2010) 257-280.
- [4] Ochekepe N. A., Olorunfemi P. O., Ngwuluka N. C., Trop. J. Ararm. Res. 8 (3) (2009) 275-287.
- [5] Singh S., J. Nanosci. Nanotechnol. 10 (2010) 7906-7918.
- [6] Liu Z., Jiao Y., Wang Y., Zhou C., and Zhang Z, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (15) (2008) 1650-1662.
- [7] Kumari A., Yadav S. K., Yadav S. C., Colloids Surf. B: Biointerfaces 75 (2010) 1-18.
- [8] Pinto Reis C., Neufeld R. J., Ribeiro A. J., Veiga F., *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2 (2006) 8-21.
- [9] Vauthier C., Bouchemal K., Ararm. Res. 26 (2009) 1025-1058.
- [10] Rao J. P., Geckeler K. E., Prog. Polym. Sci. 36 (2011) 887-913.
- [11] Hassani L. N., Hendra F., and Bouchemal K., *Discovery Today* 17 (2012) 608-614.
- [12] Butsele K. V., Jerome R., Jerome C., *Polymer* 48 (2007) 7431-7443.
- [13] Carneiro M. J., Fernandes A., Figueiredo C. M., Fortes A. G., Freitas A. M., *Carbohydr. Polym.* 45 (2001) 135.
- [14] Goto M., Yura H., Chang C. W., Kobayashi A., Shinoda T., Maeda A., Kojima S., Kobayashi K., Akaike T. J., *Control Rel.* 28 (1994) 223-233.
- [15] Klein J., Kunz M., Kowalczyk J., *Makromol. Chem.* 191 (1990) 517-528.
- [16] Barros M. T., Petrova K. T., *Eur. Pol. J.* 45 (2009) 295-301.
- [17] Barros M. T., Petrova K. T., Singh R. P., *Eur. Pol. J.* 46 (2010) 1151-1157.
- [18] Barros M. T., Petrova K. T., Singh, R. P. *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 1792-1807.
- [19] M. Boscolo, *Quim. Nova* 26 (6) (2003) 906-912.
- [20] Lichtenthaler F.W., Peters S., *C. R. Chimie* 7 (2004) 65-90.
- [21] Chauvin C., Baczko K., Plusquellec D., *Journal of Organic Chemistry*, 58 (2003) 2291-2295.
- [22] Barros M. T., Maycock C. D., Siferiz F., Thomassigny C., *Tetrahedron* 56 (2000) 6511-6516.
- [23] Hu L., Liu B., Yu C., *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 4281.
- [24] Inamoto Y., Nishimoto Y., Yasuda M., Baba A., *Org. Lett.* 14 (2012) 1168-1171.
- [25] Bellini A., Mencini E., Quaglio M., Guarneri M., Fini A. *Steroids* 56 (7) (1991) 395-398.
- [26] Whitmarsh S. D., Redmond A. P., Sgarlata V., Davis A. P., *Chem. Commun.* (2008) 3669-3671.
- [27] McCallion O. N., Taylor K. M., Thomas M., Taylor A. J., Ararm. Res. 12 (1995) 1682-1688.
- [28] Basarkar, A., Singh J. *Int. J. Nanomed.* 2 (2007) 353-360.

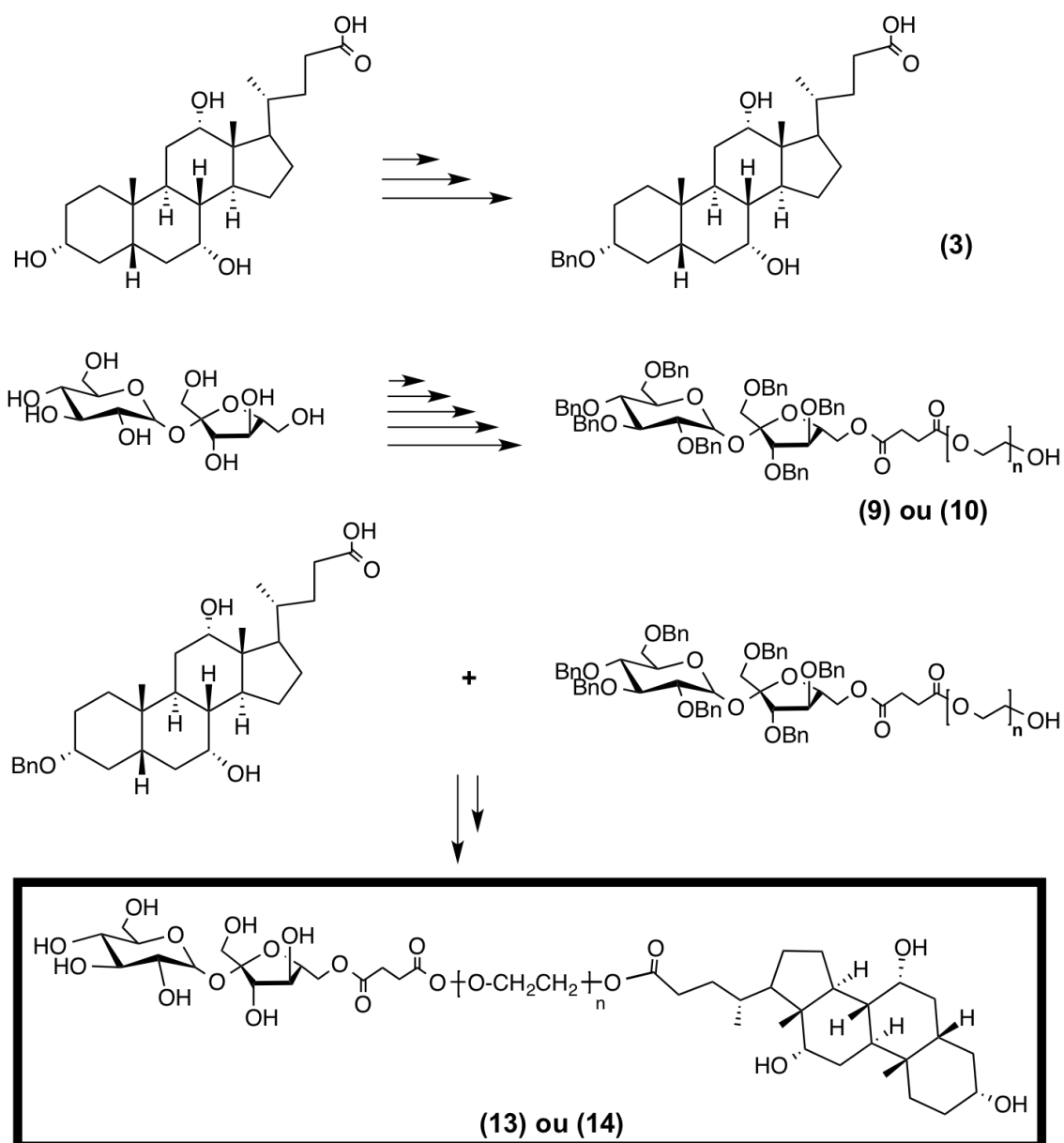
- [29] Hasadsri L., Kreuter J., Hattori H., Iwasaki T., George J. M., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 6972-6981.
- [30] Quintanar-Guerrero D., Alléman E., Doelker E., Fessi H., *Colloid. Polym. Sci.* 275 (1997) 640-647.
- [31] Avgoustakis K., *Curr. Drug Deliv.* 1 (2004) 321-333.
- [32] Vicennati, P., Giuliano A., Ortaggi G., Masotti A., *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 2826-2839.
- [33] Kreuter J., Mauler R., Gruschkau H., Speiser, P. P., *Cell Biol.* 44 (1976) 12-19.
- [34] Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J. L., Alonso M. J., *Ararm. Res.* 14 (1997) 1431-1436.
- [35] Eldridge J. H., Hammond C. J., Meulbroek J. A., Staas J. K., Gilley R. M., *J. Contr. Rel.* 11 (1990) 205-214.
- [36] Jani P., McCarthy D. E., Florence A. T., *Int. J. Ararm.* 86 (1992) 239-246.
- [37] Nagarwal R. C., Kant S., Singh P. N., Maiti P., Pandit J. K., *J. Control Rel.* 136 (2009) 2-13.
- [38] Gomez-Gaete C., Tsapis N., Besnard M., Bochot A., Fattal E., *Int. J. Ararm.* 331 (2007) 38-45.
- [39] Zanetti-Ramos B. G., Fritzen-Garcia M. B., de Oliveira C. S., Pasa A. A., Soldi V., Borsali R., Creczynski-Pasa T. B., *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 638-640.
- [40] Zhao Y. S., Fu H., Peng A., Ma Y., Xiao D., and Yao J., *Adv. Mater.* 20 (15) (2008) 2859-2876.
- [41] Dong W. Y., Korber M., Esguerra V. L., Bodmeier R., *J. Control. Release.* 115 (2006) 158-167.
- [42] Moinard-Chécot D., Chevalier Y., Briançon B. L., Fessi E., *J. Colloid Interface Sci.* 317 (2008) 458-468.
- [43] Delie F., Berton M., Alléman E., Gurny R., *Int. J. Ararm.* 214 (2001) 25-30.
- [44] Bilati U., Alléman M., Doelker E., *J. Microencapsul.* 22 (2005) 205-214.
- [45] Gurny R., Peppas N. A., Harrington D. D., Banker G. S., *Drug Dev. Ind. Ararm.* 7 (1981) 1-25.
- [46] Anton N., Benoit J. P., Saulnier P., *J. Control. Release.* 128 (2008) 185-199.
- [47] Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E., *J. Control. Release* 70 (2001) 1-20.
- [48] Avgoustakis K., *Curr. Drug Deliv.* 1 (2004) 321-333.
- [49] Leroux J. C., Alleman E., Doelker E., Gurny R., *Eur. J. Ararm. BioArarm.* 41 (1995) 14-18.
- [50] Quintanar-Guerrero D., Alléman E., Doelker E., Fessi H., *Colloid. Polym. Sci.* 275 (1997) 640-647.
- [51] Moinard-Chécot D., Chevalier Y., Briançon S., Fessi H., Guinebretière S., *J. Nanosci. Nanotechol.* 6 (2006) 2664-2681.
- [52] Ibrahim H., Bindschaedler C., Doelker E., Buri P., Gurny R., *Int. J. Ararm.* 87 (1992) 239-246.

- [53] Quintanar-Guerrero D., Alléman E., Fessi H., Doelker E., *Drug. Dev. Ind. Ararm.* 24 (1998) 1113-1128.
- [54] Alléman E., Gurny R., Doelker E., *Eur. J. Ararm. BioArarm.* 39 (1993) 13-18.
- [55] Kostog, M., Kohler, S., Liebert, T., Heinze, T., *Macromol. Symp.* 294 (2010) 96-106.
- [56] Akagi, T., Kaneko, T., Kida, T., Akashi, M., *J. Control Release* 108 (2005) 226-236.
- [57] Chronopoulou, L., Fratoddi, I., Palocci, C., Venditti, I., Russo, M. V., *Langmuir* 25 (2009) 1487-1492.
- [58] Wang Y., Dave R. N., Pfeffer R., *J. Supercrit. Fluids* 28 (2004) 85-99.
- [59] Site:  
<http://eng.ege.edu.tr/~otles/SupercriticalFluidsScienceAndTechnology/Wc488d76f2c655.htm>  
 [Acedido em: 27-Jan.-2013].
- [60] Dobbs J. M., Wong J.M., Lahiere R. J., Johnston K. P., *Ind. Eng. Chem. Res.* 26 (1987) 56-65.
- [61] Hedrick J. L., Mulcahey L. J., Taylor L. T., *Mikrochim. Acta* 108 (1992) 115 -132.
- [62] Gomez-Gaete C., *Int. J. Ararm.* 331 (2007) 153-159.
- [63] Mu L., Feng S. S., *J. Control. Release* 86 (2003) 33-48.
- [64] Coester C., Kreuter J., Briesen H., Langer K., *Int. J. Ararm.* 196 (2000) 147-149.
- [65] Damge C., Maincent P., Ubrich N., *J. Control. Release* 117 (2007) 163-170.
- [66] Date A. A., Joshi M. D., Patravale V. B., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 505-521.
- [67] Calvo P., Gouritin B., Brigger I., Lasmezas C., Deslys J., Williams A., *J. Neurosci. Methods* 111 (2001) 151-155.
- [68] Ahmad Z., Pandey R., Sharma S., Khuller G. K., *Indian J. Chest Dis. Allied Sci.* 48 (2006) 171-176.
- [69] Gipps E. M., Arshady R., Kreuter J., Groscurth, P., Speiser, P. P., *J. Ararm. Sci.* 75 (1986) 256-258.
- [70] Das D., Lin S., *J. Ararm. Sci.* 94 (2005) 1343-1353.
- [71] Allemann E., Leroux J. C., Gurny R., *Adv. Drug Del. Rev.* 34 (1998) 171-189.
- [72] Seyler I., Appel M., Devissaguet J. P., Legrand P., Barratt G., *J. Nanoparticle Res.* 1 (1999) 91-97.
- [73] Chen Y., Mohanraj V. J., Parkin J. E., *Lett. Peptide Sci.* 10 (2003) 621-629.
- [74] Acharya S., Sahoo S. K., *Adv. Drug Del. Rev.* 63 (2011) 170-183.
- [75] Derakhshandeh K., Erfan M., Dadashzadeh S., *Eur. J. Ararm. BioArarm.* 66 (2007) 34-41.
- [76] Avgoustakis K., Beletsi A., Panagi Z., Klepetsanis P., Karydas A. G., Ithakissios D.S., *J. Control. Release* 79 (2002) 123-135.
- [77] Shenoy D.B., Amiji M. M., *Int. J. Ararm.* 293 (2005) 261-270.
- [78] Gaument M., Vargas A., Gurny R., Delie F., *Eur. J. Ararm. BioArarm.* 69 (2008) 1-9.
- [79] Mansour H. M., Rhee Y-S., Wu X., *Int. J. Nanomed.* 4 (2009) 299-319.
- [80] Dailey L. A., Schmehl T., Gessler T., Wittmar M., Grimminger F., *J. Contr. Rel.* 86 (2003) 131-144.

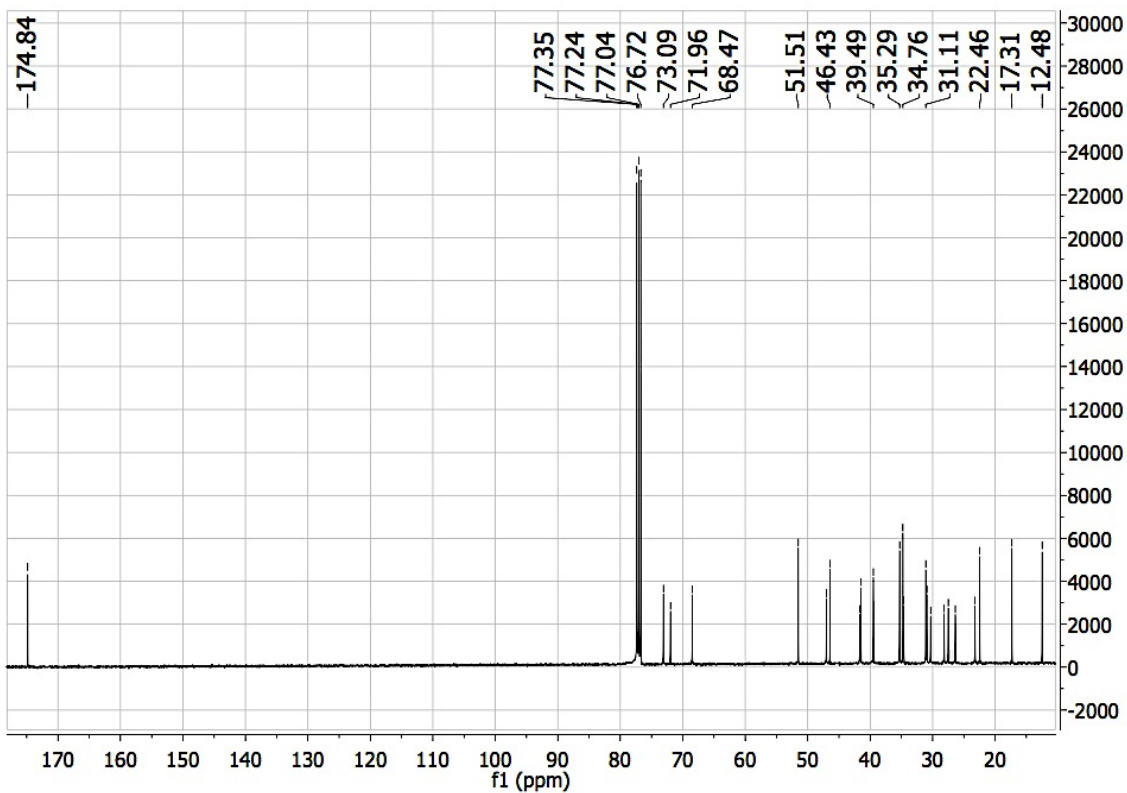
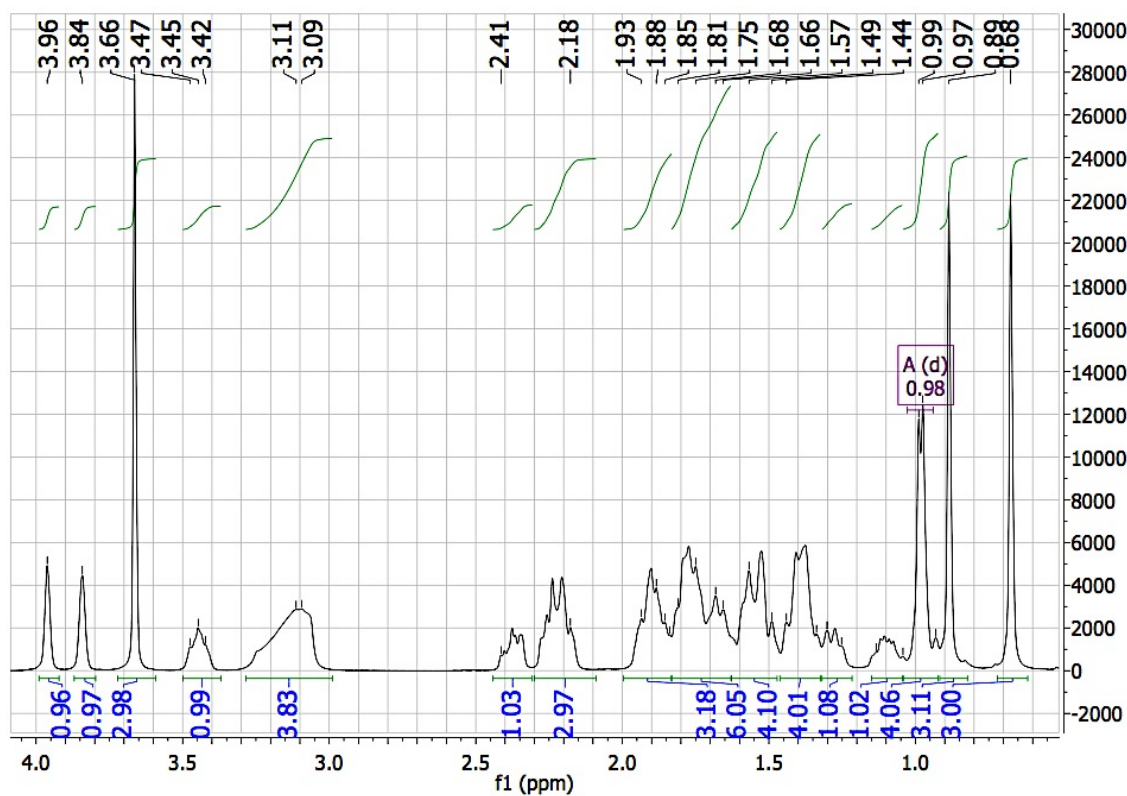
- [81] McCallion O. N., Taylor K. M., Thomas M., Taylor A. J., *Ararm. Res.* 12 (1995) 1682-1688.
- [82] Basarkar, A., Singh J. *Int. J. Nanomed.* 2 (2007) 353-360.
- [83] Hasadsri L., Kreuter J., Hattori H., Iwasaki T., George J. M., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 6972-6981.
- [84] Berne B. J., Pecora R., *“Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics”*, General Publishing Company (2000) [Acedido em: 14-Fev.-2013].
- [85] Goldberg W. I., *Am. J. Phys.* 67 (12) (1999) 1152-1160.
- [86] Blanchard C. R., *The Chemical Educator* 1 (1996) 1-8.
- [87] Goldstein J., Newbury D. E., Joy D. C., Lyman C. E., Echlin P., Lifshin E., Sawyer, L., Michael J. R., Plenum Publishers *“Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis”* (2007) [Acedido em: 16-Fev.-2013].
- [88] Williams D. B., Carter C.B., *“The Transmission Electron Microscope”* (1996) [Acedido em: 16-Fev.-2013].
- [89] Kim I.-S., Kim S.-H., *International Journal of Pharmaceutics* 257 (2003) 195-203.
- [90] Site: <http://www.organic-chemistry.org/chemicals/reductions/silanes.shtm> [Acedido em: 24-Maio-2013].



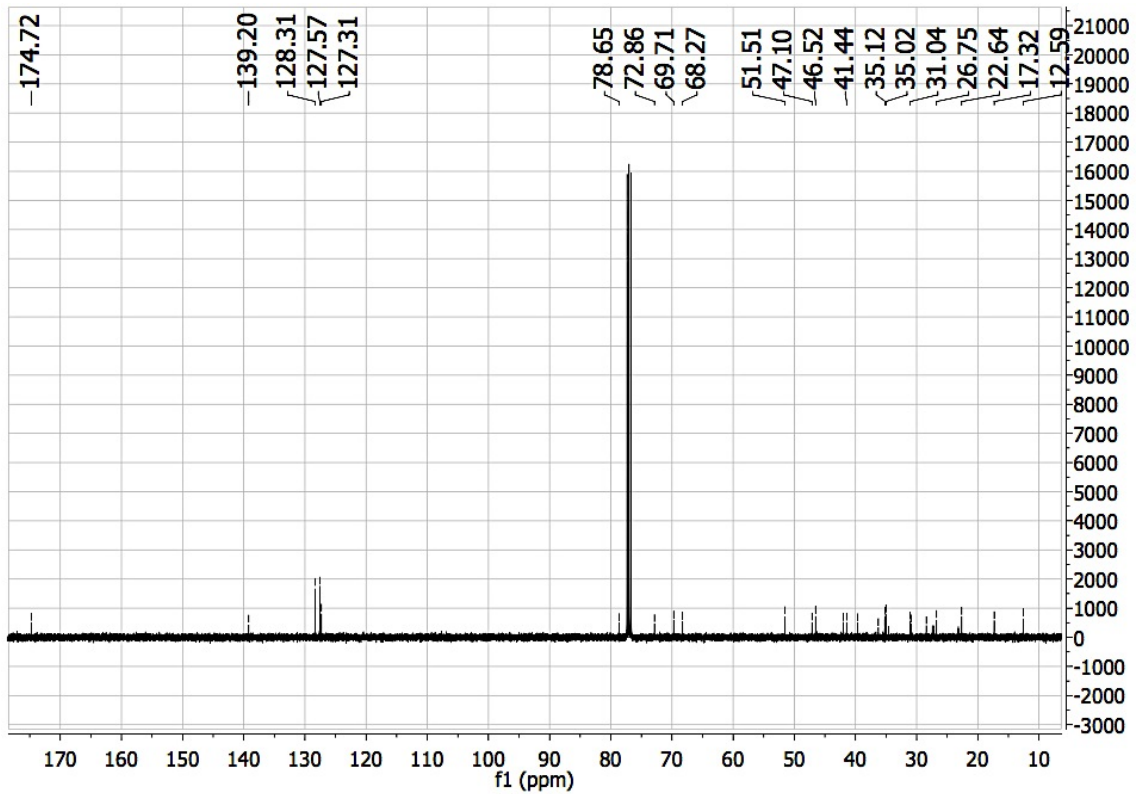
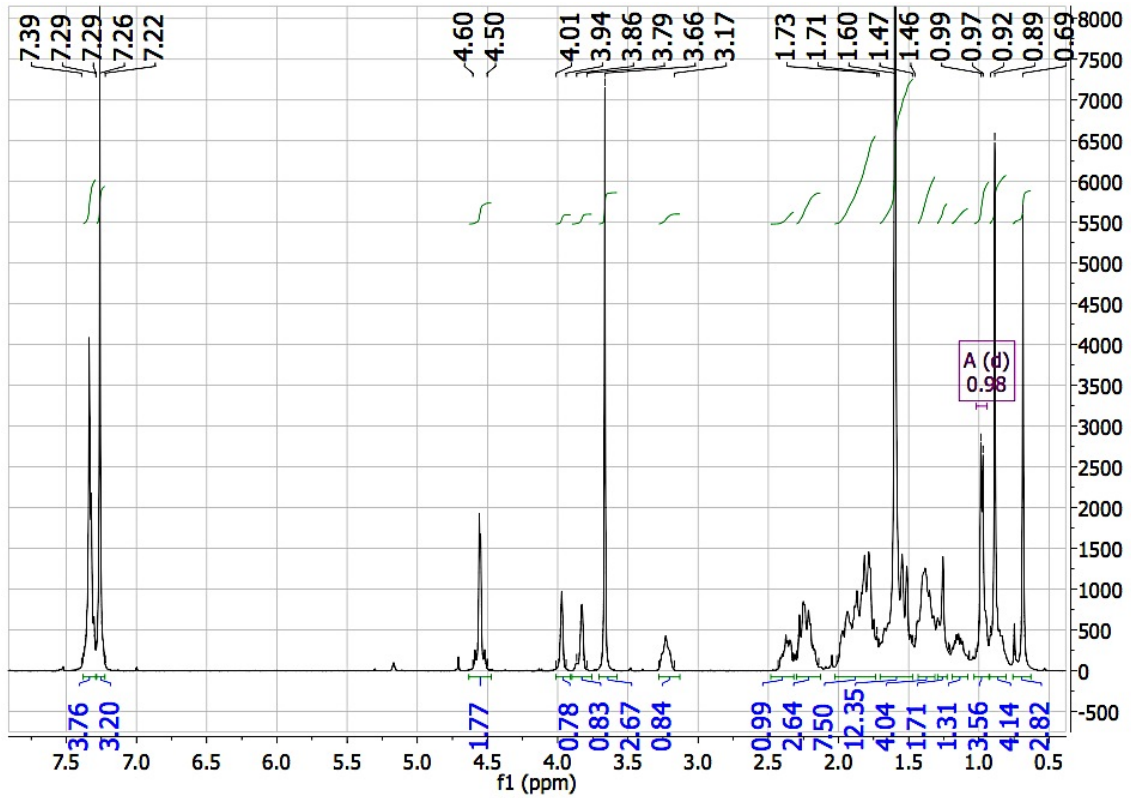
## Anexo 1 – Esquema geral da síntese processada



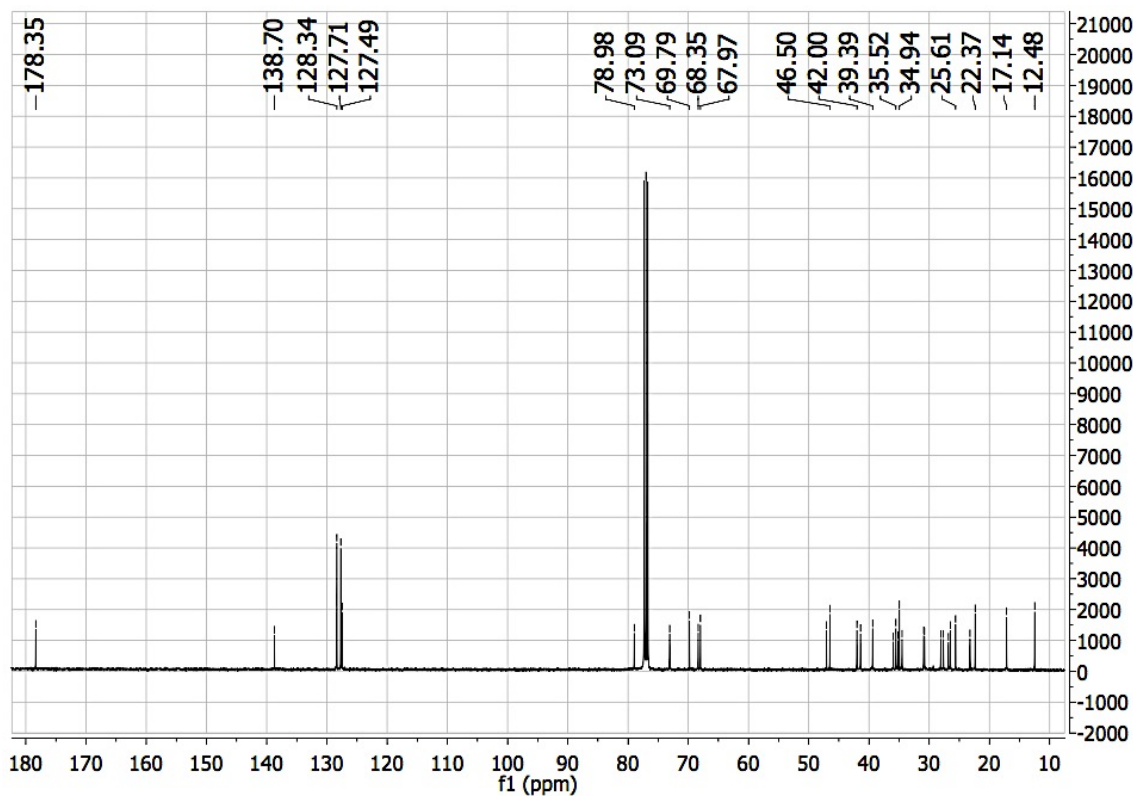
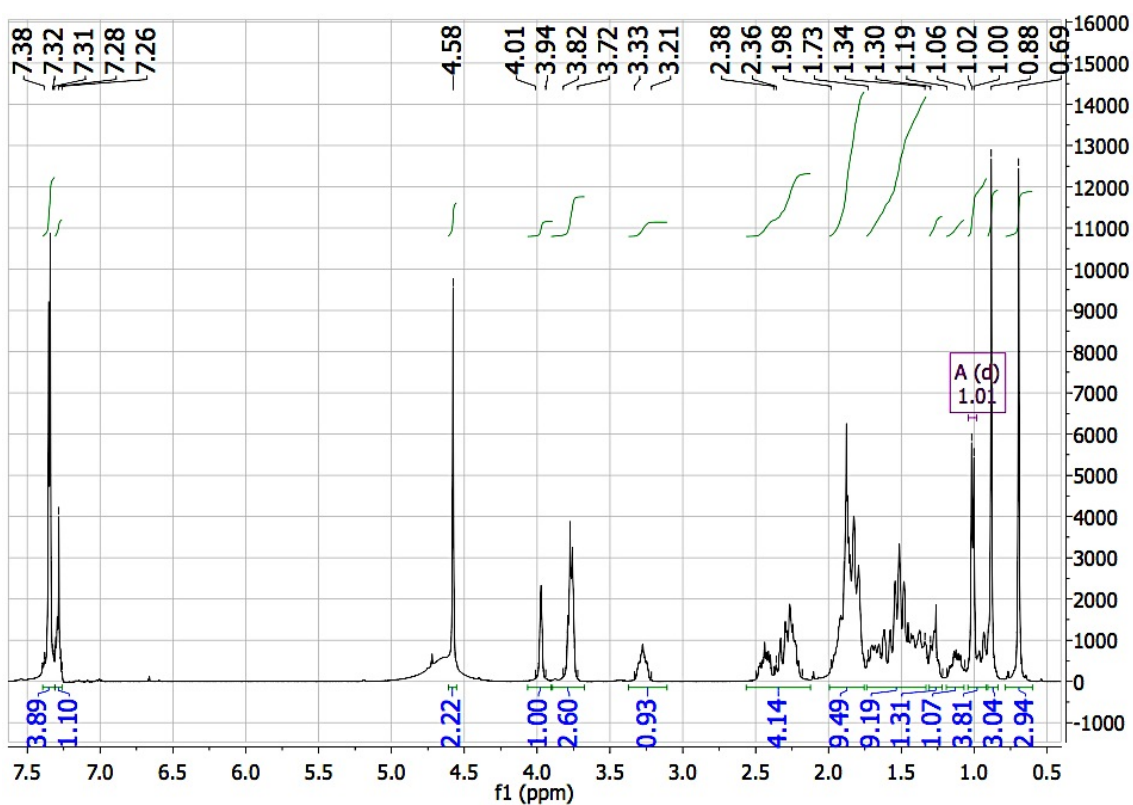
## Anexo 2 – Espetros do composto (1)



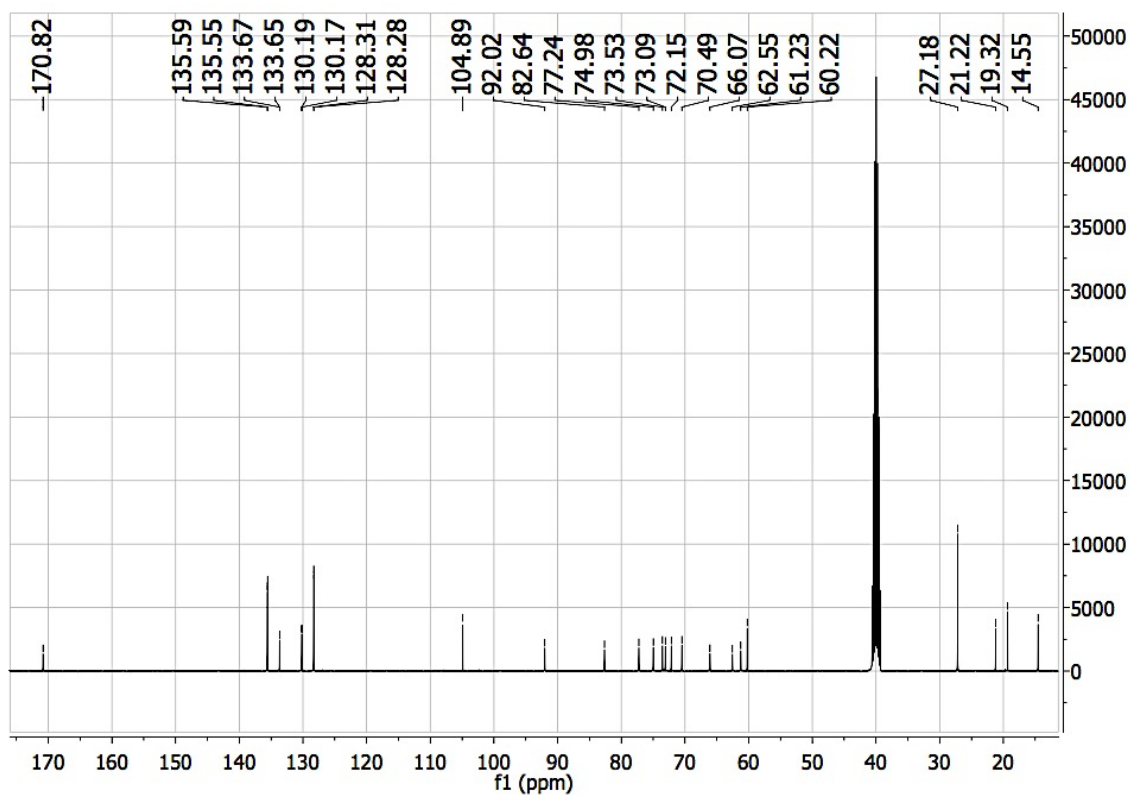
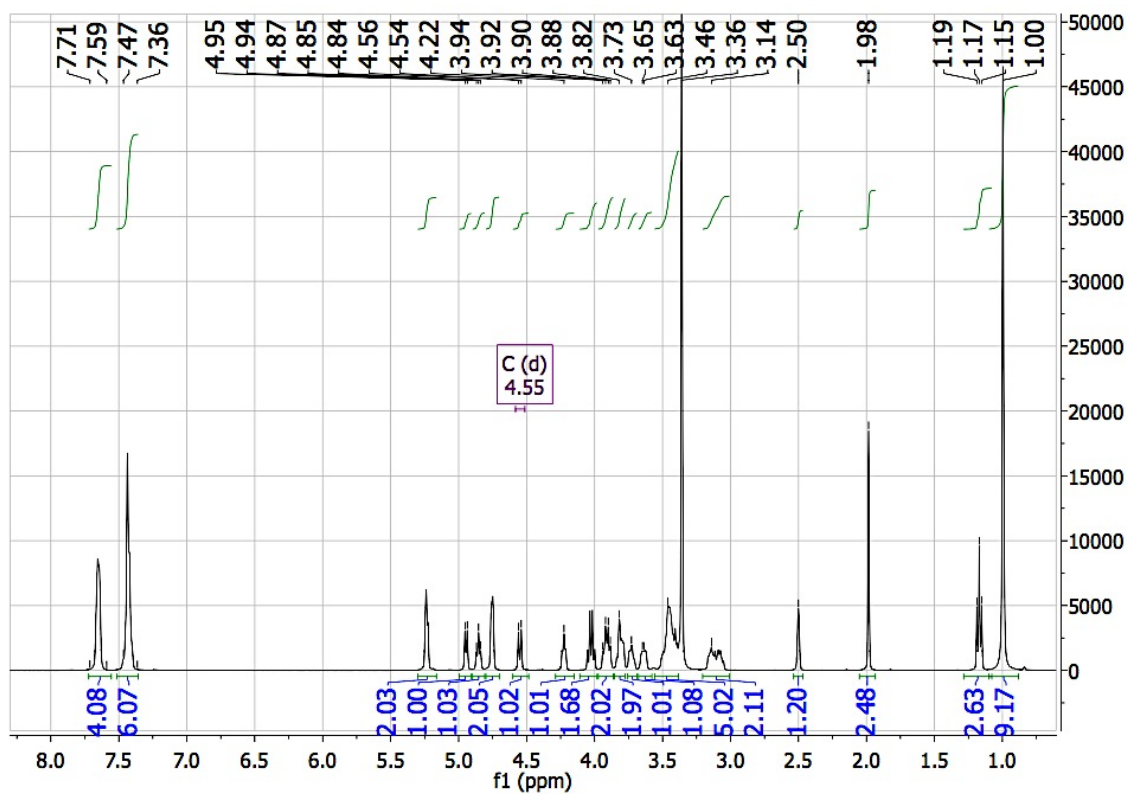
### Anexo 3 – Espetros do composto (2)



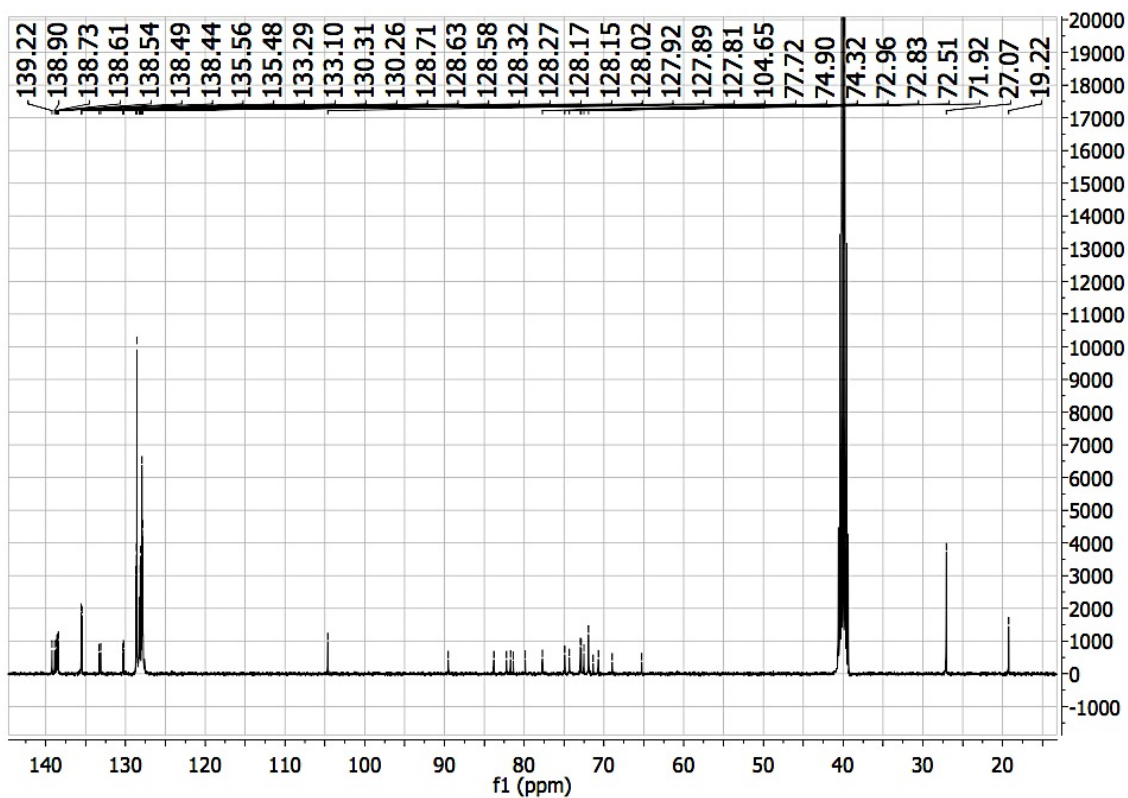
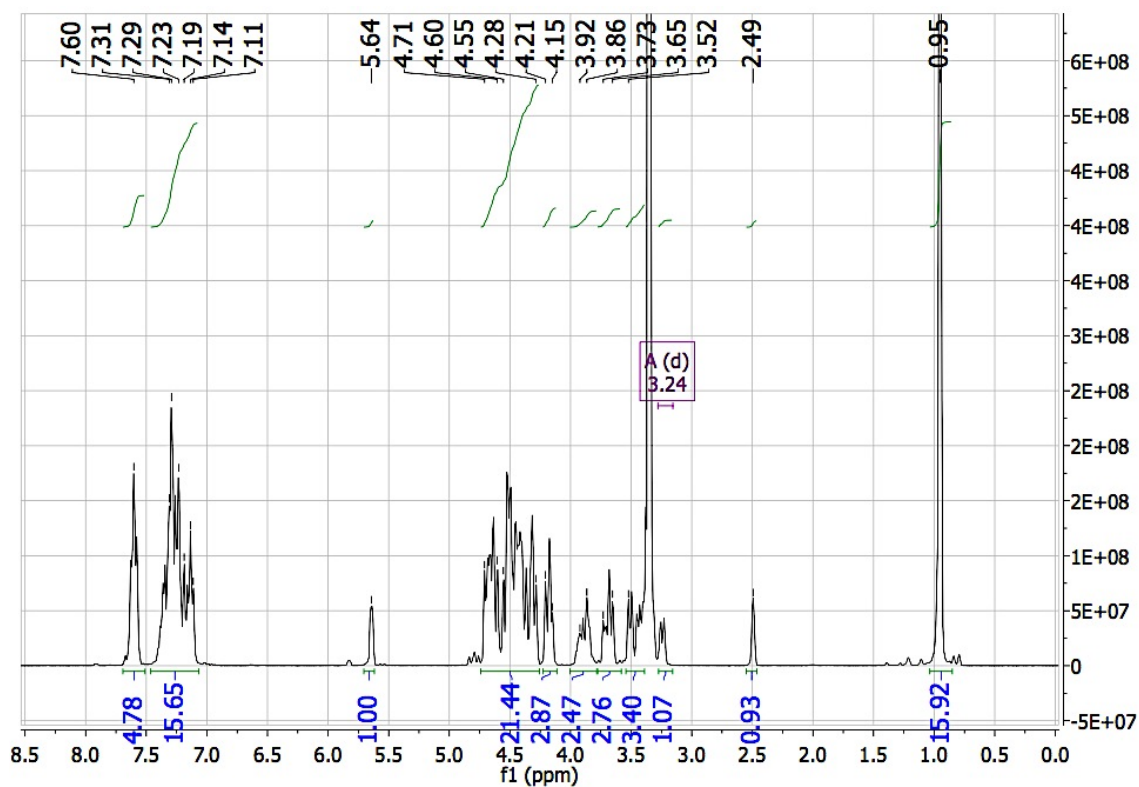
## Anexo 4 – Espectros do composto (3)



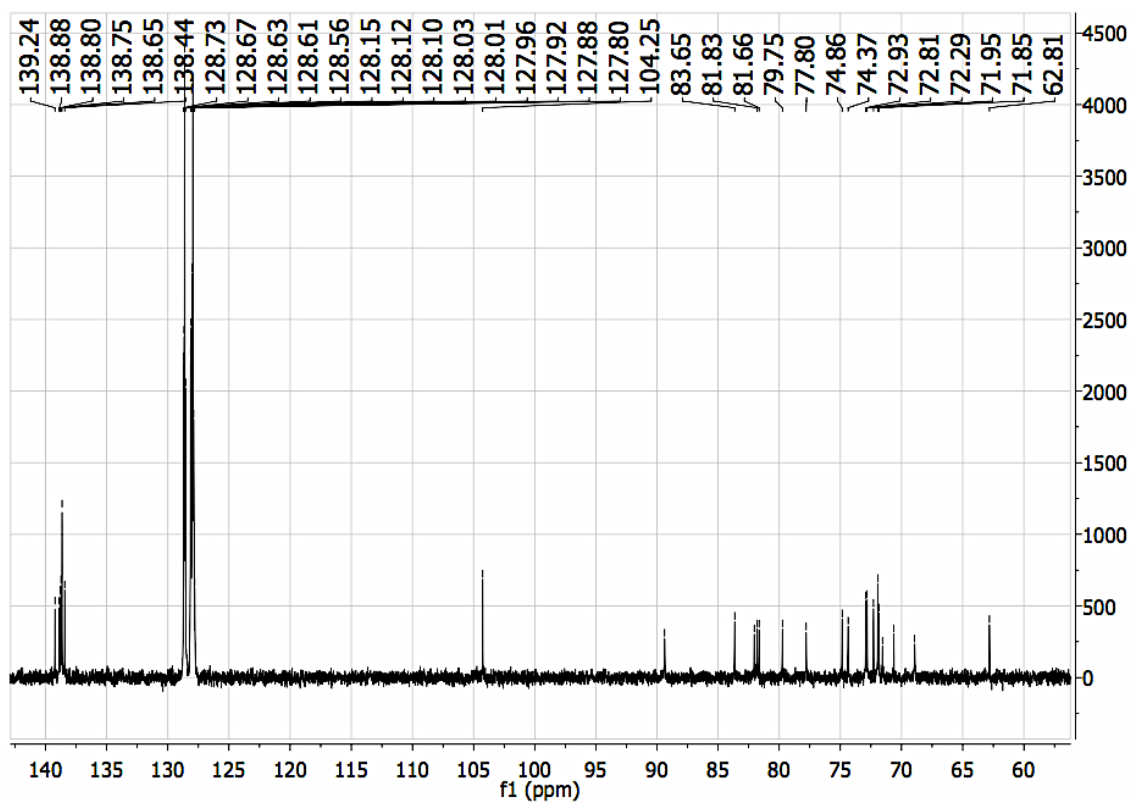
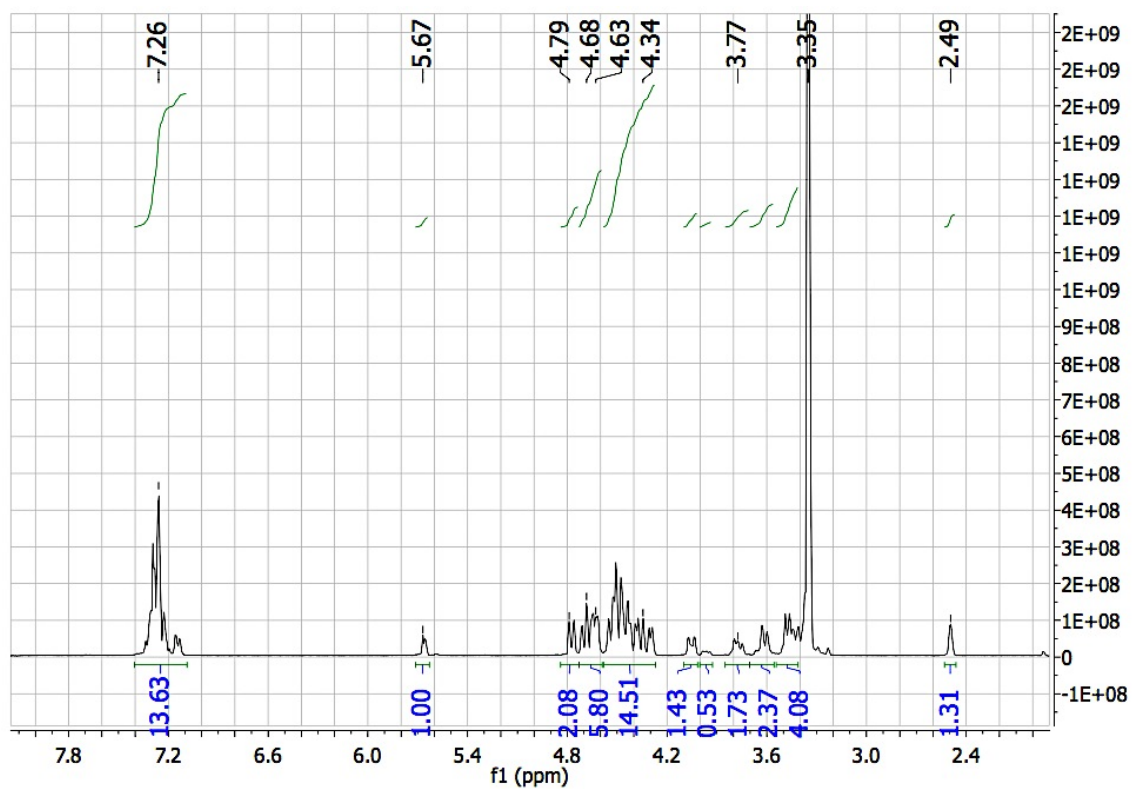
## Anexo 5 – Espetros do composto (4)



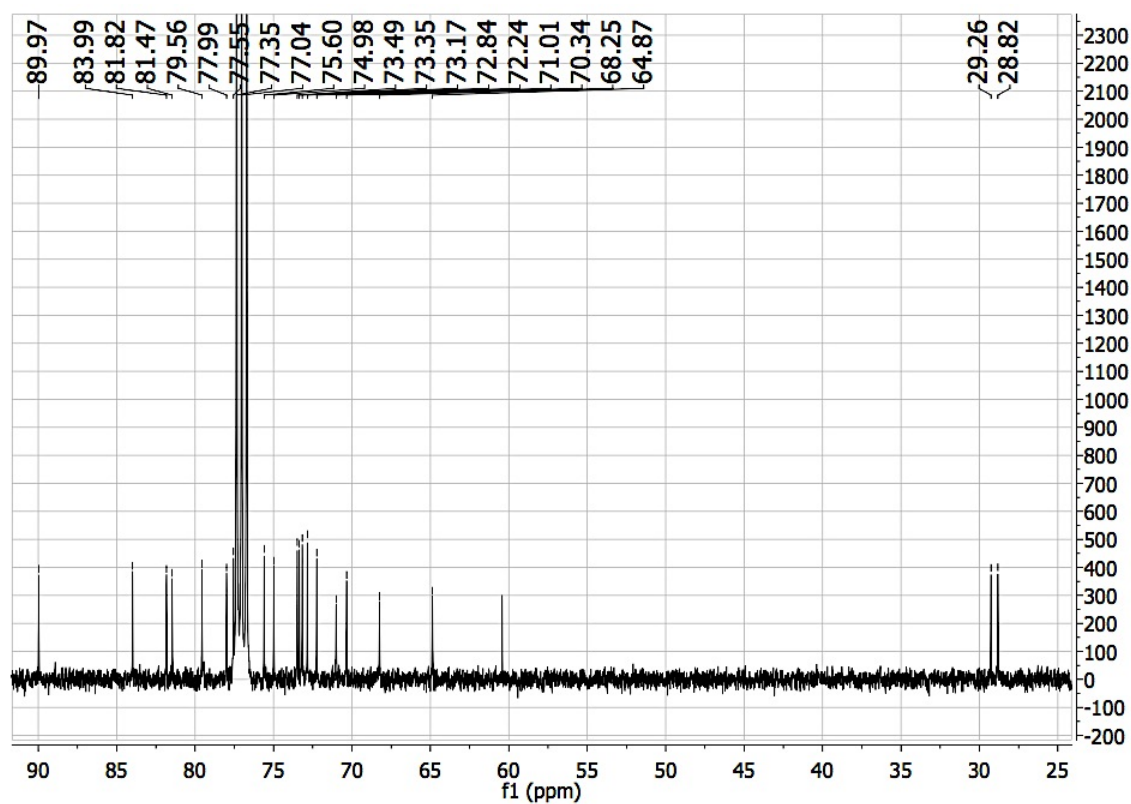
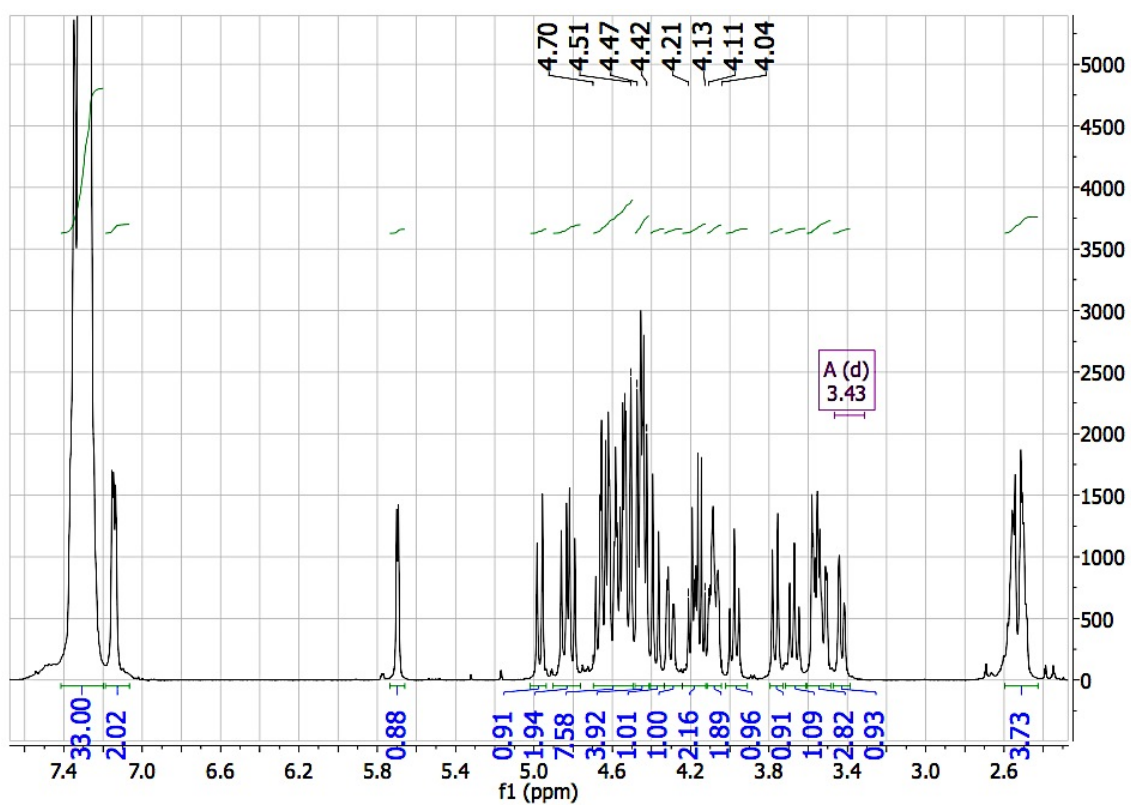
## Anexo 6 – Espetros do composto (6)



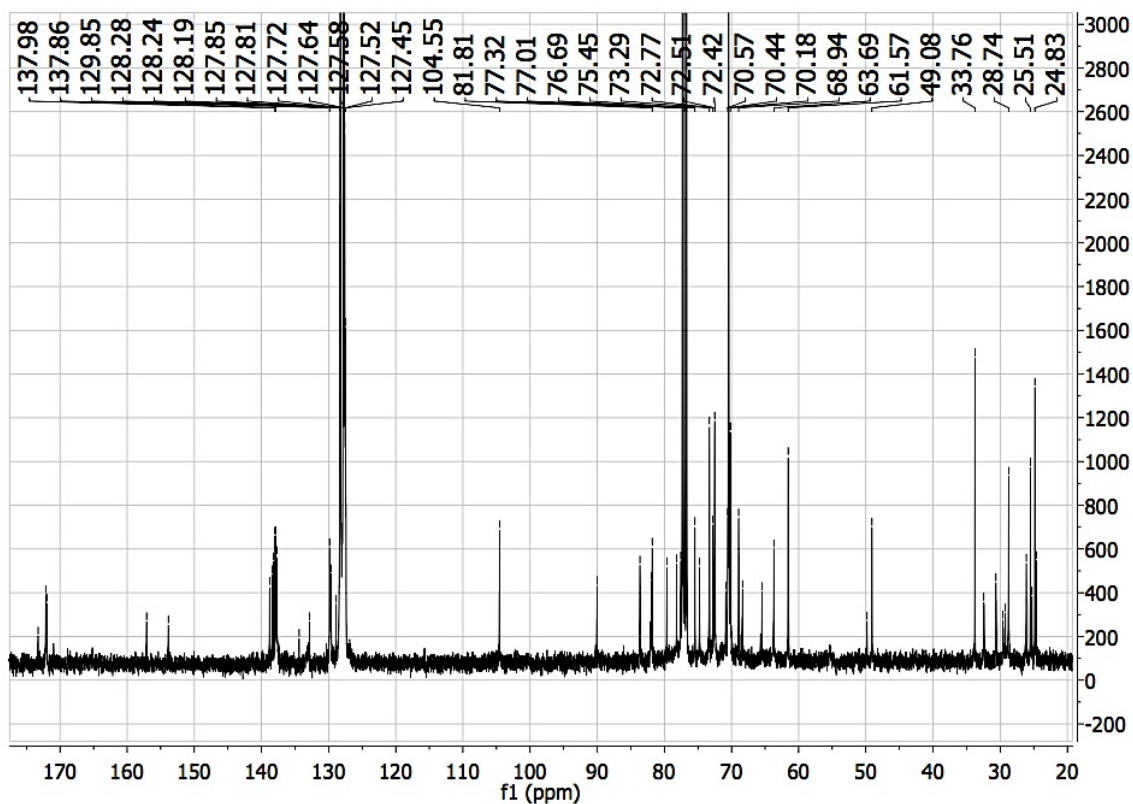
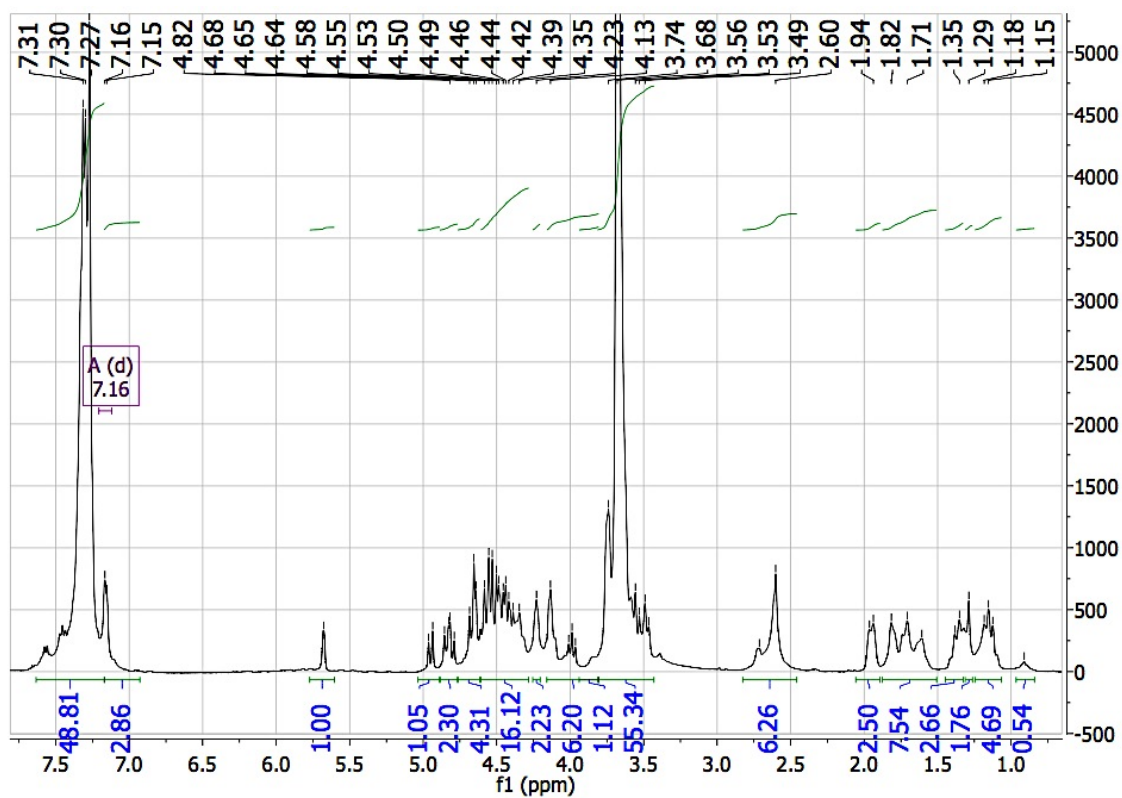
## Anexo 7 – Espetros do composto (7)



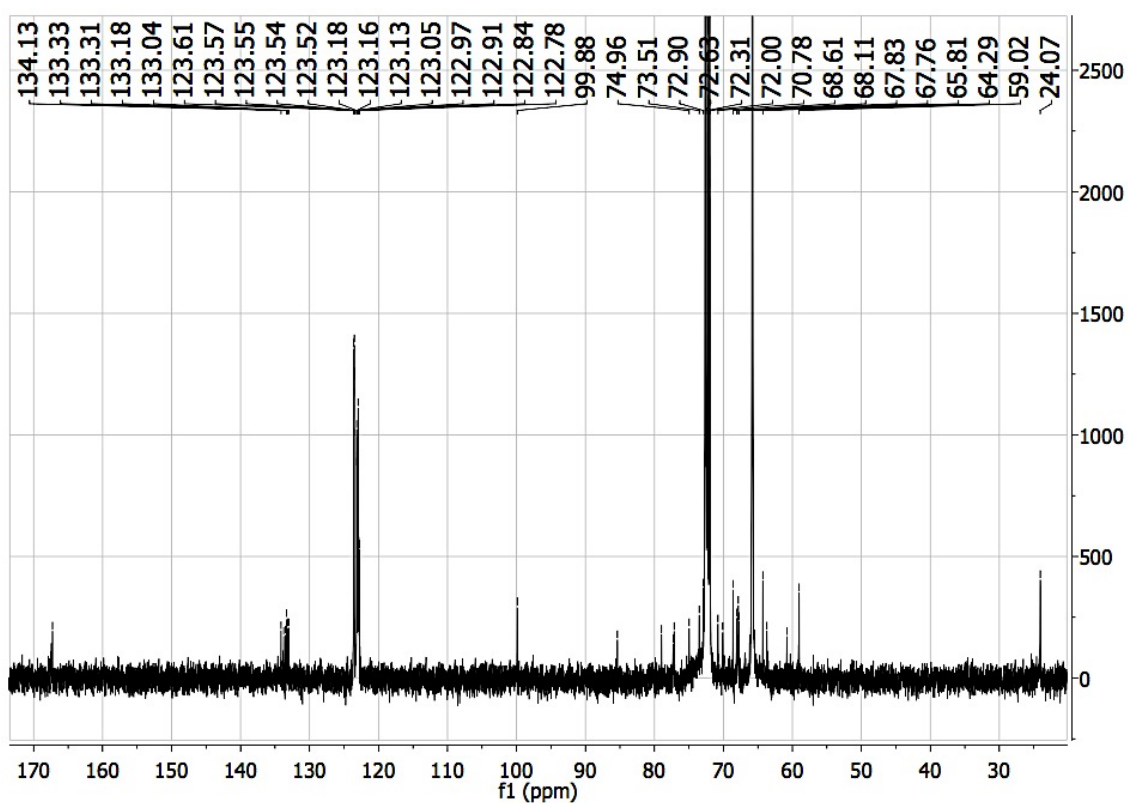
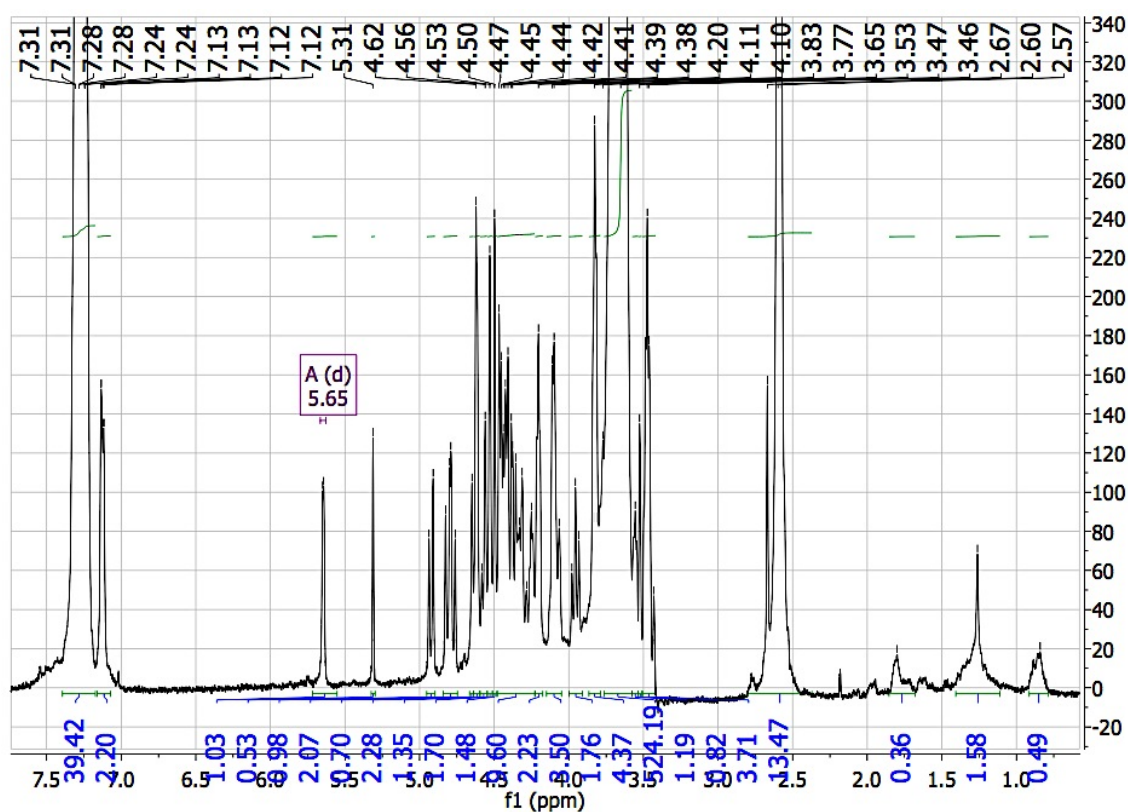
## Anexo 8 – Espetros do composto (8)



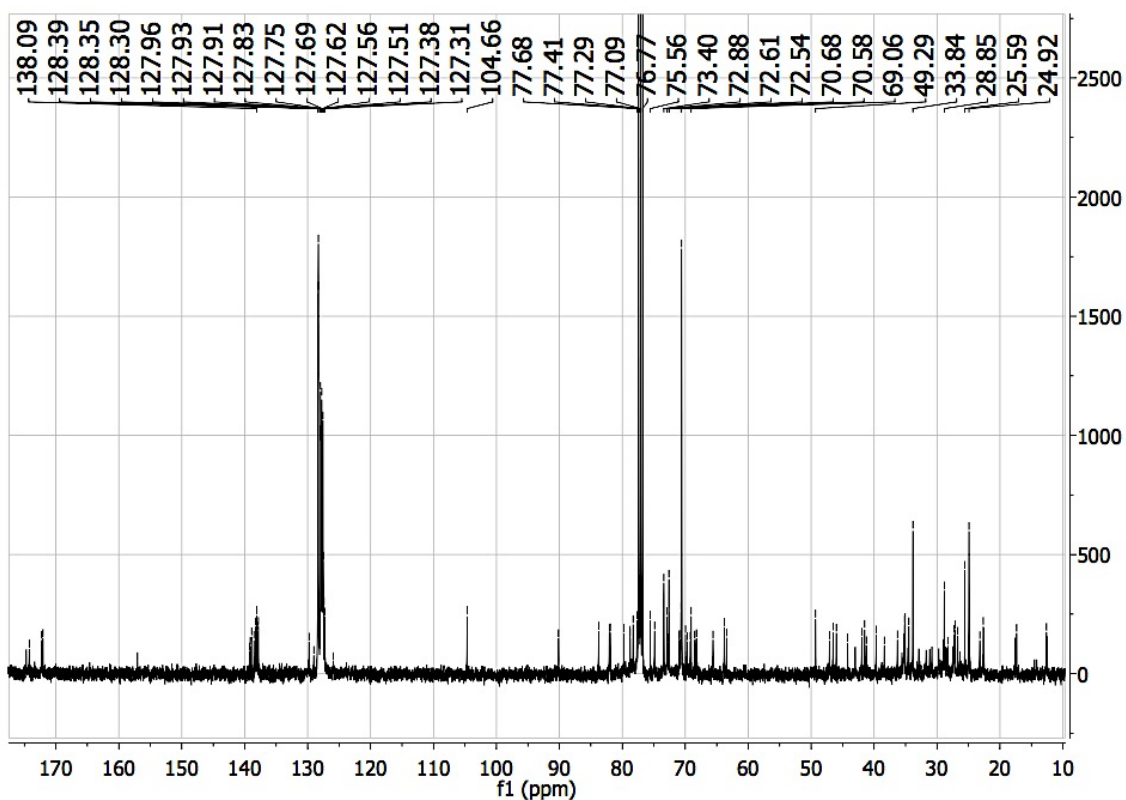
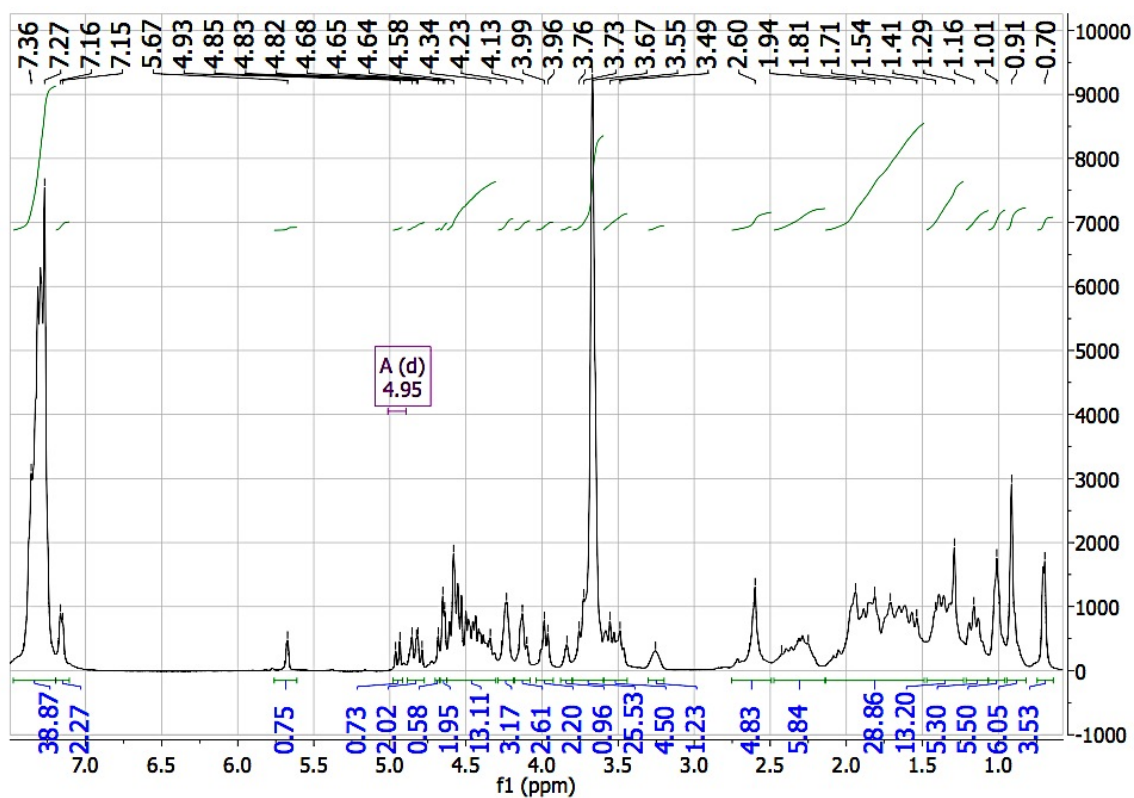
## Anexo 9 – Espetros do composto (9)



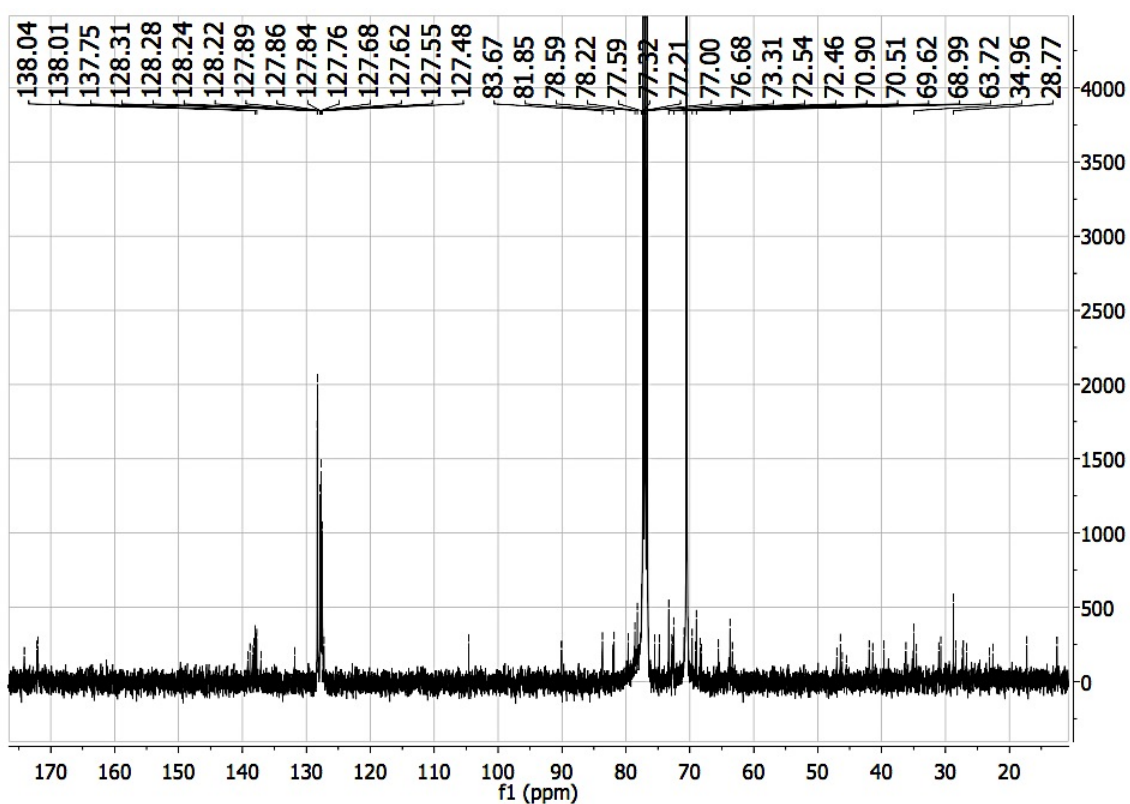
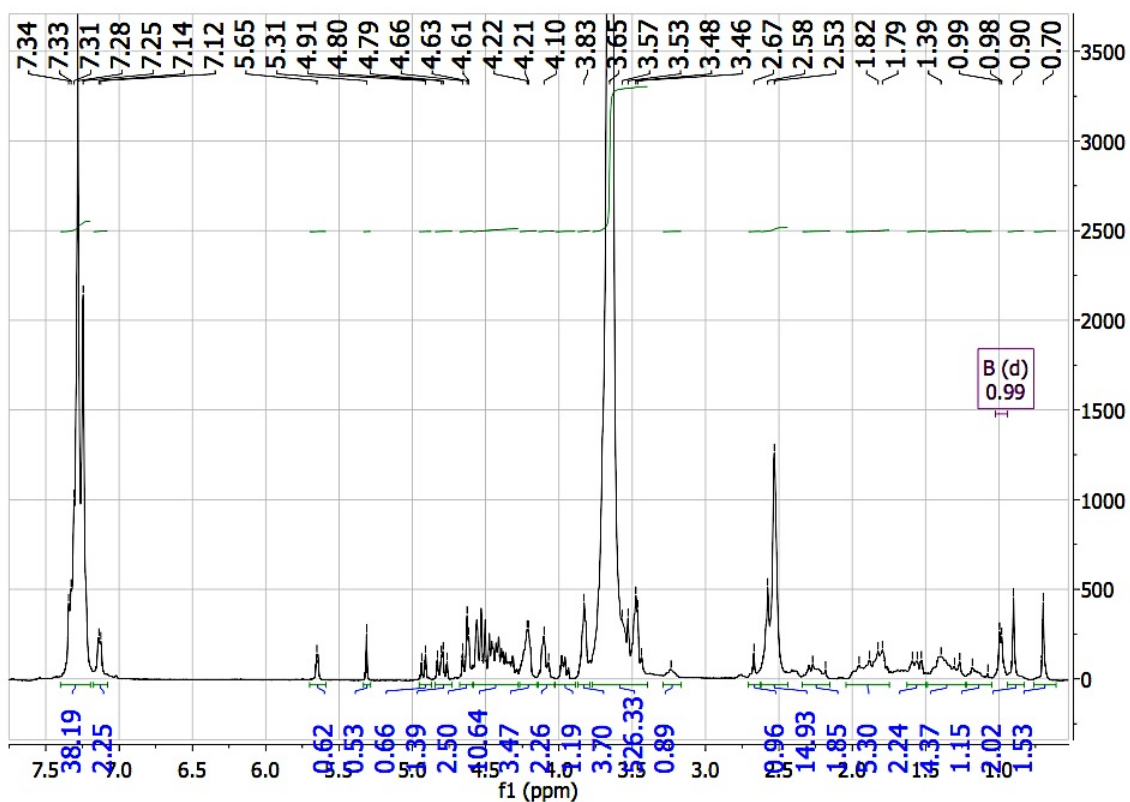
## Anexo 10 – Espetros do composto (10)



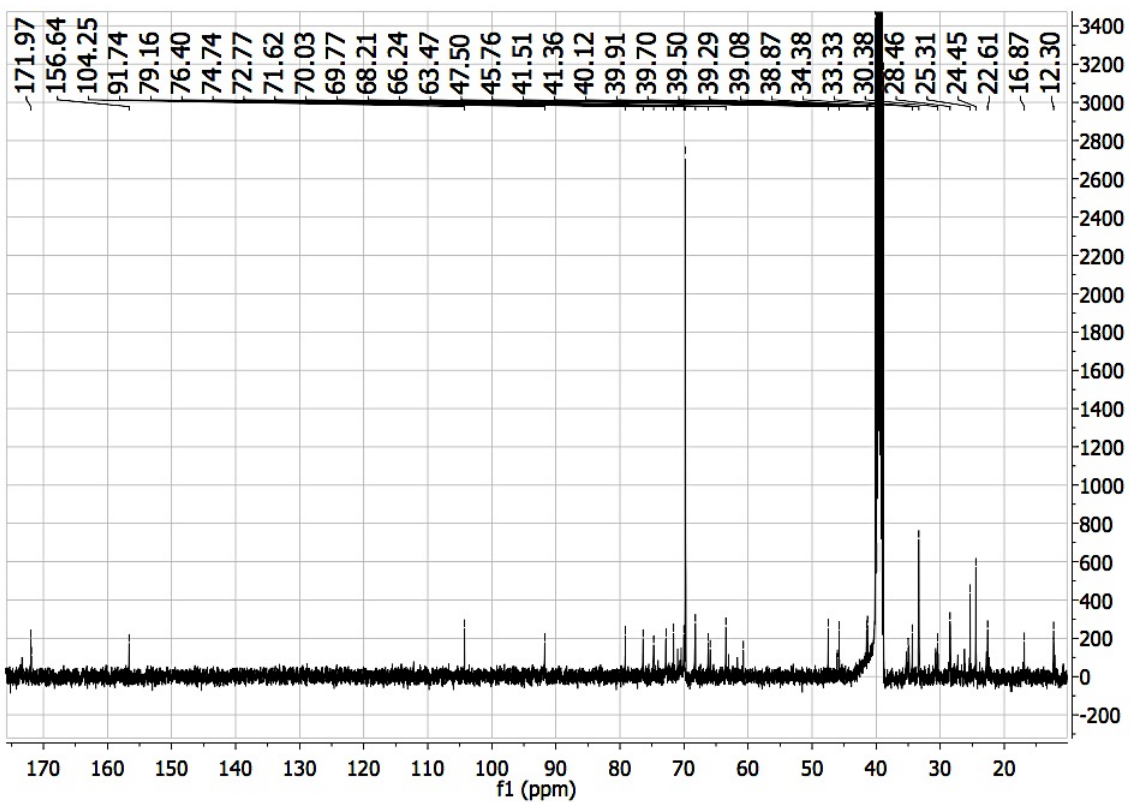
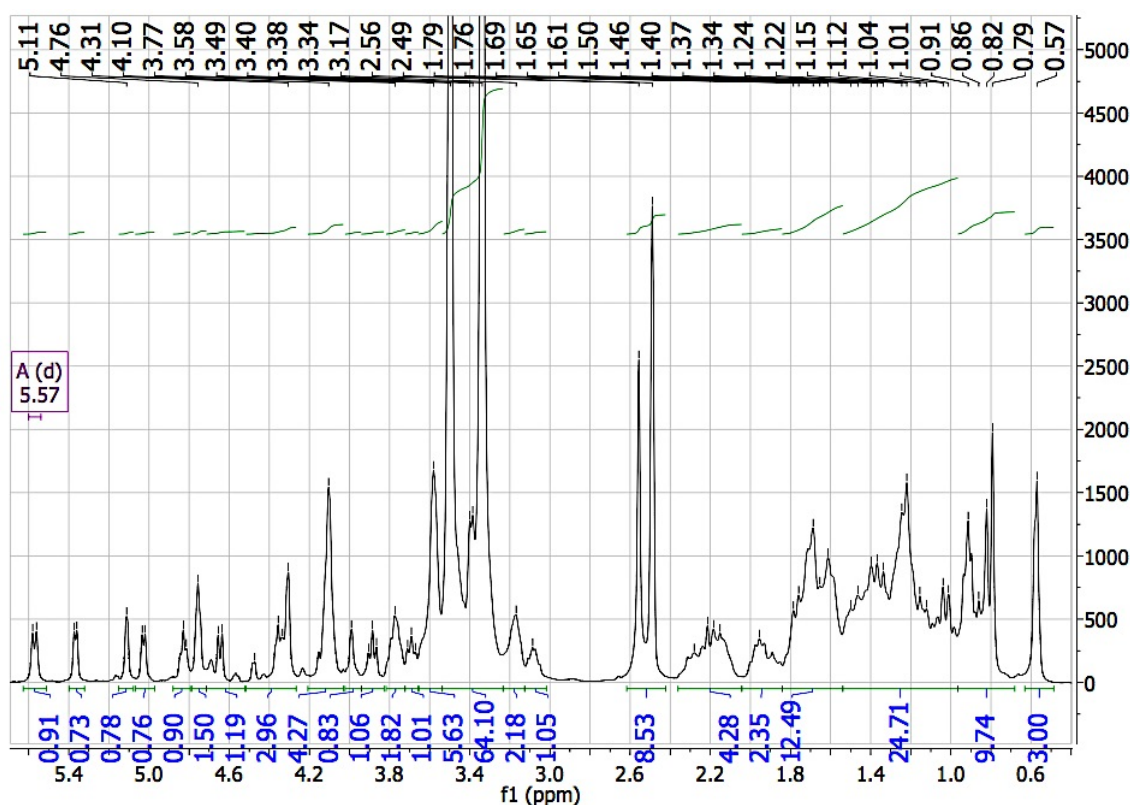
## Anexo 11 – Espectros do composto (11)

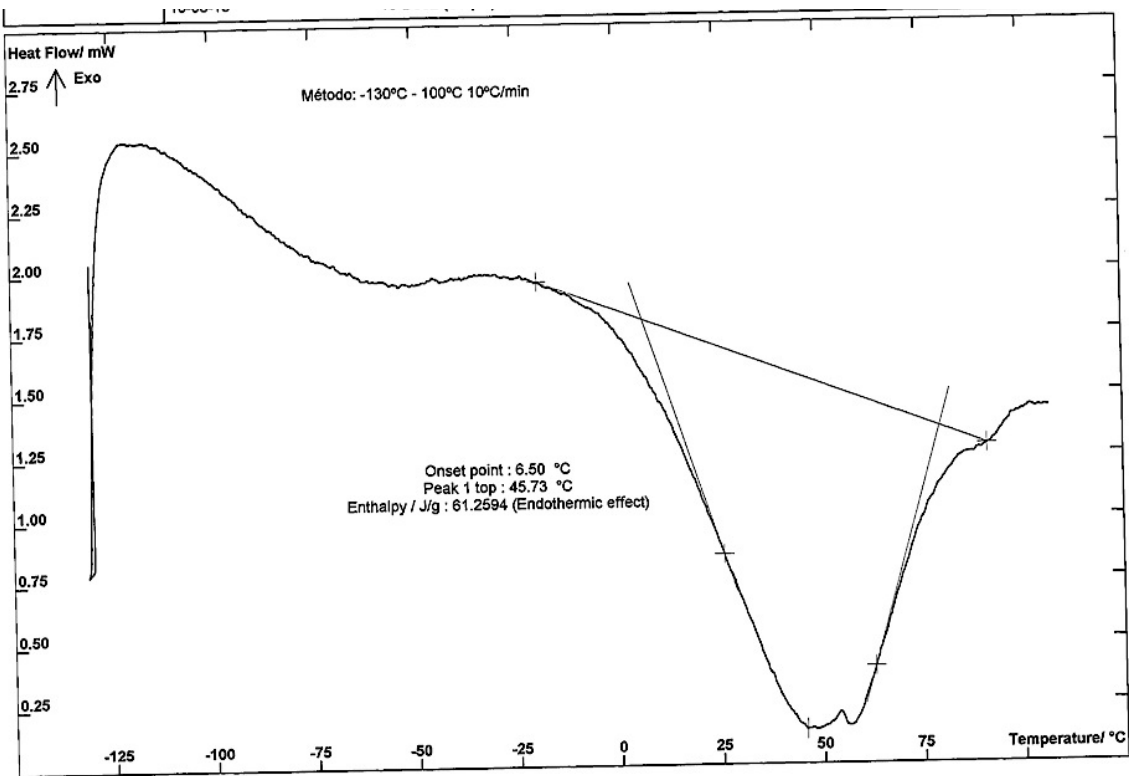
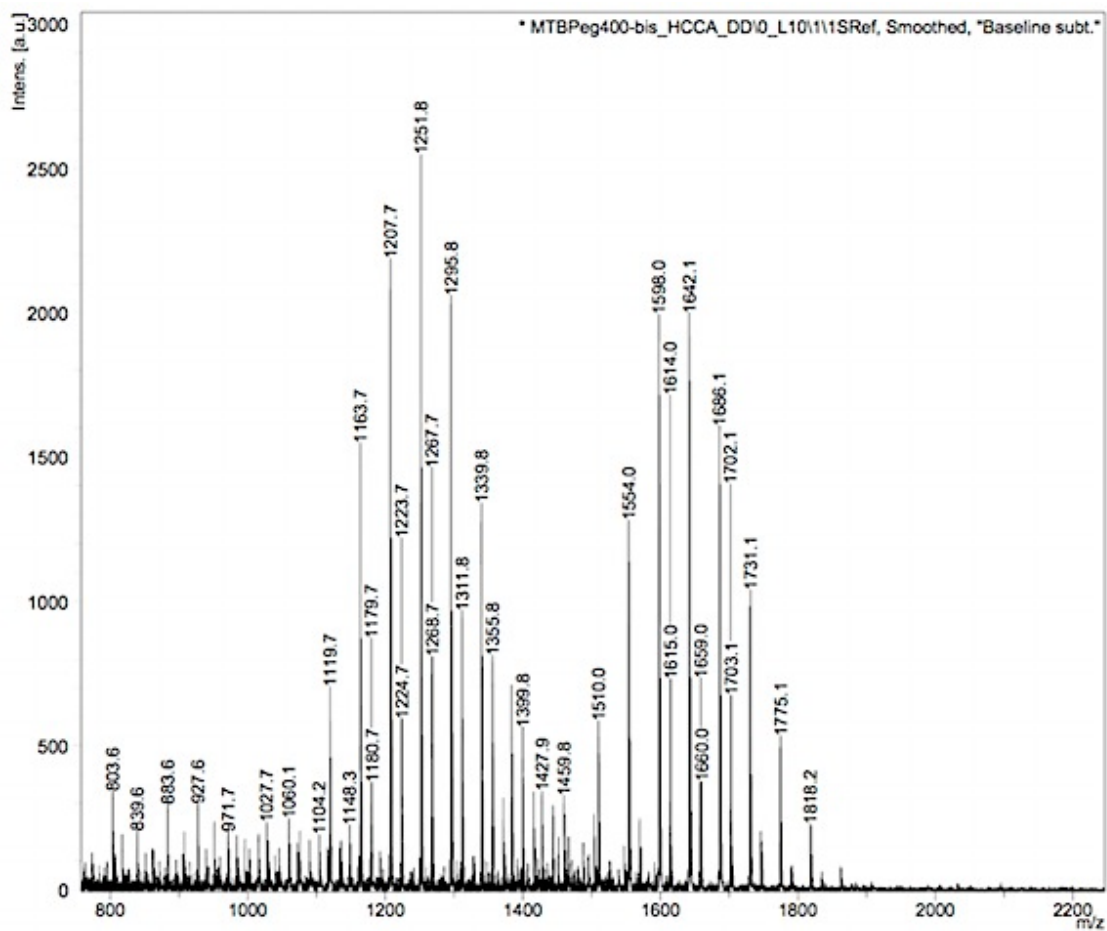


## Anexo 12 – Espetros do composto (12)



## Anexo 13 – Espectros do composto (13)





## Anexo 14 – Espetros do composto (14)

