

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SÍNTESE E AUTOASSOCIAÇÃO DE UM COPOLÍMERO
ANFIFÍLICO EM BLOCO INTEIRAMENTE À BASE DE
AÇÚCAR**

Samuel de Medeiros Modolon

Florianópolis
2013

Samuel de Medeiros Modolon

**SÍNTESE E AUTOASSOCIAÇÃO DE UM COPOLÍMERO
ANFIFÍLICO EM BLOCO INTEIRAMENTE À BASE DE
AÇÚCAR**

Tese em regime de co-tutela submetida à Universidade Federal de Santa Catarina e a Universidade Joseph Fourier-França, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Química.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientação: Prof. Dr. Edson Minatti e

Dr. Redouane Borsali

Coorientação: Dr. Sami Halila

Florianópolis

2103

Samuel de Medeiros Modolon

**SÍNTESE E AUTOASSOCIAÇÃO DE UM COPOLÍMERO
ANFIFÍLICO EM BLOCO INTEIRAMENTE À BASE DE
AÇÚCAR**

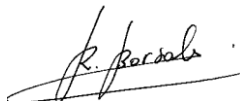
Esta Tese será julgada para a obtenção do Título de “Doutor em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química”.

Florianópolis, 23 de abril de 2013.

Prof. Almir Spinelli, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Edson Minatti, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



Redouane Borsali, Dr
Orientador
CERMAV, Grenoble-França



Sami Halila, Dr.
Co-orientador
CERMAV, Grenoble-França

Prof. Laurent David, Dr.
Relator-França
Université Claude Bernard Lyon 1



Prof. Edvani Curti Muniz,
Relator

Prof. Edvani Muniz, Dr.
Relator-Brasil
Universidade Estadual de Maringá-PR

Prof. Pedro Barreto, Dr.
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Edson Minatti e Redouane Borsali e ao meu co-orientador Sami Halila pela orientação, amizade, confiança e exemplo de competência, seriedade e ética.

Aos professores membros da comissão examinadora deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos do laboratório Polissol do Departamento de Química da UFSC.

Aos meus colegas e amigos do CERMAV vinculado a Universidade Joseph Fourier em Grenoble-França.

A minha família, principalmente ao meu irmão Sidnei, pelo carinho sincero, constante incentivo e compreensão.

Ao Departamento de Química da UFSC, especialmente aos amigos Grace e Jadir da secretaria de Pós-Graduação, pela sempre pronta ajuda durante esse período.

A todos os meus amigos, pelo carinho, incentivo, compreensão e pelas sábias palavras de um verdadeiro amigo.

À Capes pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, agradeço a Deus.

RESUMO

Sistemas macromoleculares formados por copolímeros anfífilos em bloco têm a capacidade de se autoassociar para formar objetos em nanoescala e morfologias em escala nanométrica. As propriedades de autoassociação desses copolímeros estão intrinsecamente ligados à sua arquitetura e sua composição. Essas características tornam estes compostos particularmente atraente para aplicações industriais como na indústria farmacêutica, especialmente no que se refere a capacidade de encapsular, transportar e liberar princípios ativos insolúveis em meio aquoso. Para isso, nanopartículas formadas pelos copolímeros anfífilos em bloco devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e de tamanhos entre 10 e 100 nm, ideal para a passagem intravenosa. Atualmente, a autoassociação de copolímeros anfífilos em bloco com base em polissacarídeos é uma das mais promissoras abordagens. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento do primeiro cooligômero anfílico em bloco linear constituído por maltoheptaose livre como bloco hidrofílico, e como bloco hidrofóbico maltoheptaose acetilada, ou seja, um copolímero constituído exclusivamente por unidades sacarídicas. Como prova do conceito, descreveu-se a sua preparação e os estudos das suas propriedades físico-químicas na autoassociação. Para isso, utilizou-se técnicas como espectroscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz estático e dinâmico. Os resultados mostraram que a autoassociação do cooligômero em água forma de micelas esféricas com tamanho médio de 30 nm de raio, ideal para a encapsulação de um princípio ativo. No mais, estudos de citotoxicidade, ensaios de encapsulação da curcumina e hidrólise enzimática apresentaram resultados satisfatórios.

Palavras Chaves: copolímero, maltoheptaose, autoassociação.

ABSTRACT

Macromolecular Systems formed by amphiphilic block copolymers have the ability to self-assembled to form nanoscale objects and morphologies in the nanometer range. The properties of these copolymers are intrinsically linked to its architecture and its composition. These characteristics make these compounds particularly attractive for industrial applications such as in pharmaceuticals, particularly as regards the ability to encapsulate, transport and release active ingredients insoluble in aqueous medium. For this, nanoparticles formed by amphiphilic block copolymers should be biocompatible, biodegradable and sizes between 10 and 100 nm, suitable for intravenous passage. The self-assembly of amphiphilic block copolymers displaying biosourced polysaccharides at the surface is one of the most promising approaches. The objective of this work is the preparation of “hybrid” amphiphilic oligosaccharide-based block copolymers, is shown here the design of a new generation of self-assembled nanoparticles composed entirely of oligosaccharide- based amphiphilic block co-oligomers. These systems are defined by a covalent linkage of the two saccharidic blocks through their reducing end units, resulting in a sweet “head-to-head”connection. As an example, was prepared and studied a amphiphilic block copolymers in which the hydrophilic part is composed of a free maltoheptaosyl derivative clicked to a hydrophobic part composed of a peracetylated maltoheptaosyl derivative. As a proof of concept, describes the preparation and studies of its physicochemical properties self-assembled. For this, was used techniques such as fluorescence spectroscopy, transmission electron microscopy and dynamic light scattering. This amphiphilic self-assembles to form spherical micelles in water with an average diameter of 30 nm. The efficient enzymatic hydrolysis of the maltoheptaose that constitutes the shell of the micelles was followed by light scattering and colorimetric methods. In further, studies of cytotoxicity and assays encapsulation of curcumin showed satisfactory results.

Keywords: copolymers, maltoheptaose, self-assembled

Lista de Figuras

- Figura 1.** Diferentes tipos de copolímeros em bloco: a) dibloco, b) tribloco, c) multibloco e d) estrela27
- Figura 2.** Esquema da autoassociação dos copolímeros anfifílicos em blocos em micelas.....28
- Figura 3.** Estudos da autoassociação de copolímeros formados por dextran-*b*-poliestireno em diferentes solventes..... 31
- Figura 4.** Síntese do copolímero híbrido e termossensível à base de maltoheptaose-*b*-poli(N-isopropilacrilamida).....32
- Figura 5.** Regioisômeros obtidos via cicloadição térmica [3+2] clássica de Huisgen.....35
- Figura 6.** A reação "click" ou CuAAC.....35
- Figura 7.** Espectros de fluorescência do pireno com o aumento da concentração de um surfactante (dodecil sulfato de sódio)....39
- Figura 8.** Gráfico mostrando o perfil da curva I_1/I_3 versus [surfactante].....40
- Figura 9.** Estratégia geral da síntese do cooligômero.....48
- Figura 10.** Rota Sintética para o copolímero Mal₇-“click”-AcMal₇..... 49
- Figura 11.** Espectro de Infravermelho de (A) Mal₇- "click"-AcMal₇ (4) e (B) Mal₇N₃ (2).....52
- Figura 12.** Espectro ¹H NMR de Mal₇-"click"-AcMal₇ (4) em THF-*d*₈/ D₂O (1:1 v/v) (acima) e D₂O (abaixo).....53
- Figura 13.** Espectros de fluorescência do pireno com o aumento da concentração de Mal₇-“click”-AcMal₇.....54

- Figura 14.** Perfis da razão I_1/I_3 dos espectros de fluorescência do pireno medidas em função da concentração de Mal₇-“click”-AcMal₇ em água a 25 °C. (concentração do pireno = $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L).....55
- Figura 15.** Função de correlação temporal típica adquirida no ângulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$ e a respectiva distribuição do tempo de relaxação $A(t)$, de uma solução aquosa de 3,0 mg/mL do Mal₇-“click”-AcMal₇ a 25 °C.....56
- Figura 16.** Variação típica da frequência angular $\Gamma = 1/\tau$ medida como uma função do vetor de onda q^257
- Figura 17.** Imagem obtida por MET da autoassociação do Mal₇-“click”-AcMal₇ em água, visualizada após coloração negativa juntamente com a distribuição de tamanho.....58
- Figura 18.** Imagem de AFM obtida para as micelas formadas por Mal₇-“click”-AcMal₇ no modo de fase AFM..... 59
- Figura 19.** Citotoxicidade do cooligômero sobre diferentes células de tumorais (B16F10, L929, Jurkat e K562)..... 60
- Figura 20.** (A) Aumento da intensidade do espalhamento de luz durante a hidrólise enzimática da corona nas micelas de Mal₇-“click”-AcMal₇. (B) raio hidrodinâmico médio das micelas durante um intervalo de tempo..... 62
- Figura 21.** Variação da absorvância ao longo do tempo de uma solução de 3 mg/mL de micelas de Mal₇-“click”-AcMal₇ hidrolisadas pela glicoamilase. O experimento foi realizado em duplicata e os valores representam a média dos resultados..... 63
- Figura 22.** Determinação da eficiência de encapsulação da curcumina..... 64
- Figura 23.** Efeito da adição de NaCl e LiCl em solução aquosa de concentração 3,0 mg/mL de Mal₇-“click”-AcMal₇..... 65

Figura 24. Mudança de morfologia de micelas (concentração 3,0 mg/mL) para uma morfologia *wormlike*.....66

Lista de Abreviaturas

A(t): Distribuição do tempo de relaxação;
AcMal₇ : Maltoheptaose funcionalizada por um grupamento alcino terminal;
CBO: Chemistry and biotechnology of oligosaccharides;
CCD: Cromatografia em camada delgada;
CERMAV: Centre de recherche de macromolécules végétales ;
C_{mc}: concentração micelar crítica;
C(q,t) : Função de auto-correlação;
Cu: Cobre;
D₀: Coeficiente de difusão;
DLS: Espalhamento de luz dinâmico;
DNA: Ácido desoxirribonucléico;
ESRF: European Synchrotron Radiation Facility;
ESI-MS: Electrospray ionization-mass spectrometry;
FTIR: Infravermelho por transformação de Fourier;
FCT: Função de correlação temporal;
HMSR: Espectrometria de massas de alta resolução;
I(q) : Intensidade de espalhamento em função da magnitude do vetor de Espalhamento;
J: Constante de acoplamento;
k_B: Constante de Boltzmann;
LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron;
MALDI-TOF MS: Matriz assisted laser desorption/ionization-time ;
MAL₇ : Maltoheptaose;
Mal₇N₃ : Maltoheptaose funcionalizada com um grupamento azida;
m/z: Razão massa carga;
TEM: do inglês “Transmission electron microscopy”;
MeOH: Metanol;
AFM: do inglês “Atomic force microscopy (AFM)”;
n₀: Índice de refração do solvente;

N_{agg}: Número de agregação;
NaN₃: Azida de sódio;
R_g: Raio de giro;
R_H: Raio hidrodinâmico;
RMN: Ressonância magnética nuclear;
RMN ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono;
RMN ¹³H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio;
THF: Tetrahydrofurano;
SAXS: Espalhamento de raios-X a baixos ângulos;
T_g: Temperatura de transição vítrea;
Γ: Taxa de relaxação;
θ: Ângulo entre o feixe incidente de raio X e o detector;
λ : Comprimento de onda;

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	21
CAPITULO 1	
OBJETIVOS.....	23
1.1 Objetivo Geral	23
1.2 Objetivos Específicos.....	23
CAPITULO 2	
REVISÃO BILIOGRÁFICA	25
2.1 Nanotecnologia.....	25
2.2 Copolímeros anfifílicos em bloco.....	26
2.2.1 Micelização.....	27
2.3 Copolímeros anfifílicos em bloco à base de polissacarídeo.....	29
2.4 Blocos de copolímeros para liberação controlada de fármacos.....	32
2.5 “Click Chemistry”.....	34
2.5.1 Aplicações da Click chemistry.....	36
2.6 Estudo da morfologia pelo aumento da concentração do copolímero.....	37
CAPITULO 3	
FUNDAMENTOS TEORICOS DAS TECNICAS.....	39
3.1 Fluorescência.....	39
3.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	40
3.3 Microscopia de Eletrônica Transmissão (MET).....	41
3.4 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	42
CAPITULO 4	
METODOLOGIA.....	43
4.1 Método fluorimétrico.....	43
4.2 Espalhamento de luz dinâmico	43
4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	44
4.4 Microscopia de Força Atômica.....	44
4.5 Avaliação da citotoxicidade in vitro.....	44
4.5.1 Cultura de células.....	44
4.6 Estudos de encapsulação.....	45
4.6.1 Determinação da eficiência de encapsulação da curcum.....	46
CAPITULO 5	
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6. 1 Síntese e Caracterização.....	47

6.1.2 Reagentes.....	47
6.1.3 Técnicas e instrumentação.....	47
6.1.4 Metodologia.....	48
6.2 Determinação da concentração micelar crítica (cmc).....	53
6.3 Morfologia das nanopartículas acessadas por DLS e MET.....	55
6.4 Microscopia de Força Atômica.....	59
6.5 Ensaios de citotoxicidade de carreadores de fármacos.....	59
6.6 Hidrolise enzimática por glucomilase da corona de nanopartículas de Mal ₇ -“click”-AcMal ₇	61
6.7 Determinação da eficiência de encapsulação da curcumina.....	64
6.8 Estudo do efeito no tamanho das micelas pela adição de solução salina.....	65
6.9 Estudo da morfologia pelo aumento da concentração do copolímero.....	66
CONCLUSÃO.....	67
Résumé en français.....	57

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos têm crescido muito os estudos relacionados à nanotecnologia devido à importância dos materiais nanoestruturados e suas aplicações, principalmente àquelas relacionadas à melhoria de qualidade de vida e preservação do meio ambiente. Nesse âmbito, estão os copolímeros anfifílicos em blocos que formam materiais nanoestruturados que podem ser utilizados para incorporação e liberação controlada de fármacos, na indústria eletrônica, em dispositivos médicos, etc. Destaca-se a importância dos copolímeros naturais por apresentarem características importantes como biodegradabilidade e biocompatibilidade.

Na literatura existem vários trabalhos que descrevem sobre os diferentes agregados nanoestruturados formados por copolímeros anfifílicos em bloco, principalmente os sintéticos, os copolímeros formados por um polímero sintético e um polímero natural (proteína, DNA ou um sacarídeo). Porém, existem poucos estudos relacionados a copolímeros anfifílicos em bloco totalmente naturais, totalmente biodegradáveis e biocompatíveis.

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo a síntese do primeiro copolímero linear em bloco anfifílico constituído exclusivamente de blocos sacarídeos, um cooligômero. Como estratégia de síntese, a maltoheptaose (MAL_7), constituída de sete unidades de glicose ligadas (α -1,4), foi utilizada como molécula de partida. Assim, MAL_7 foi funcionalizada por um grupamento alcino terminal ($AcMal_7$) e funcionalizada com um grupamento azida (Mal_7N_3). Em seguida, os dois grupos foram “clicados” através de reações de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen para obter o cooligômero (Mal_7 -“click”- $AcMal_7$).

Após a síntese foram realizados estudos de caracterização através de técnicas como, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa e infravermelho. Em seguida, foram feitos estudos da autoassociação do copolímero em nanoestruturas por Espalhamento de luz dinâmico (DLS), Microscopia de Força Atômica (AFM) e Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM).

Esse trabalho tem como principal característica a sua originalidade, pois abre uma nova linha de pesquisa para a realização de novos materiais nanoestruturados naturais, inteiramente à base de açúcares, importantes para a aplicação em nanotecnologia.

CAPITULO 1

OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar um copolímero (cooligômero) anfifílico em bloco inteiramente à base de açúcar através do uso de reações de “click chemistry” do tipo cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen. Estudar as propriedades de autoassociação do co-oligômero, sua citotoxicidade e teste de encapsulação.

1.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar um cooligômero anfifílico com a parte hidrofílica constituída por uma molécula de maltohepatose livre (Mal_7) e a parte hidrofóbica por uma molécula de maltoheptaose acetilada (Mal_7Ac).
- Caracterizar o anfifílico sintetizado quanto à estrutura química e composição através de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (FTIR) e espectrometria de massa (MALDI-TOF).
- Determinar a concentração micelar crítica por espectroscopia de fluorescência.
- Preparar e analisar a morfologia das nanopartículas obtidas pelo cooligômero através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz dinâmico.
- Realizar testes de citotoxicidade, ensaios de encapsulação e estudos de hidrólise enzimática.

CAPITULO 2

REVISÃO BILIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnologia

Nanotecnologia é a ciência que estuda a produção, caracterização e aplicação de materiais com dimensões extremamente pequenas, de tamanho entre um a cem nanômetros, ou seja, de sistemas e componentes em nanoescala.

Historicamente, em 1959, os trabalhos de um cientista chamado Richard Feynman marcaram o início da nanotecnologia. Feynman chegou à conclusão que, dependendo da forma como os átomos são organizados podemos ter matérias diferentes, inclusive novos materiais. Entretanto, o significado do termo *nanotecnologia* atualmente se aproxima mais da formulação de Eric Drexler, que em 1980 criou a nanotecnologia molecular. Drexler defendeu a metodologia de processamento envolvendo a manipulação átomo a átomo. Somado a isso, na mesma década, ocorreu o desenvolvimento dos chamados microscópios de varredura por sonda. Com esses microscópios tornou-se possível manipular individualmente nada menos do que um átomo, a menor unidade possível de um elemento químico [1].

Atualmente a nanotecnologia constitui um dos principais focos das atividades de pesquisa em todo o mundo. O investimento em pesquisas na área de nanotecnologia está voltado principalmente para o desenvolvimento e a preparação de nanopartículas a partir de moléculas naturais e o desenvolvimento de novas moléculas supramoleculares que possam apresentar propriedades bioquímicas e biológicas [2].

As nanopartículas são obtidas por diversos sistemas constituídos de colóides, polímeros, copolímeros, surfactantes, cristais líquidos, etc. São importantes porque apresentam novas propriedades mecânicas, ópticas ou químicas, possuem a capacidade de executar funções específicas que podem fornecer diferentes aplicações, como na liberação controlada de fármaco, na microeletrônica, na catálise e no controle ambiental. Além disso, podem ser trabalhadas quimicamente através da modificação de suas superfícies com moléculas específicas ou polímeros, o que amplia enormemente suas aplicações [2].

2.2 Copolímeros anfifílicos em bloco

Polímeros (do grego *poli* = muitos e *meros* = partes) são substâncias de alta massa molecular constituídas de unidades repetitivas ligadas covalentemente. Possuem importante papel biológico (carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucléicos). Podem ser encontrados diretamente na natureza e industrialmente possuem uma importante aplicação, principalmente na indústria petrolífera, farmacêutica, têxtil, de construção, etc.

Polímeros que possuem somente uma unidade de monômero em sua estrutura são chamados de homopolímeros. Se espécies diferentes de monômeros são empregadas, o polímero recebe a denominação de copolímero.

Os copolímeros podem ser divididos de acordo com a disposição de seus monômeros em quatro tipos: enxertado, alternado, estatístico e em bloco. Os copolímeros em bloco são formados por uma seqüência de monômeros ligados covalentemente a outra seqüência de monômeros e são classificados em grupos, de acordo com a disposição de seus blocos, como mostra a Figura 1.

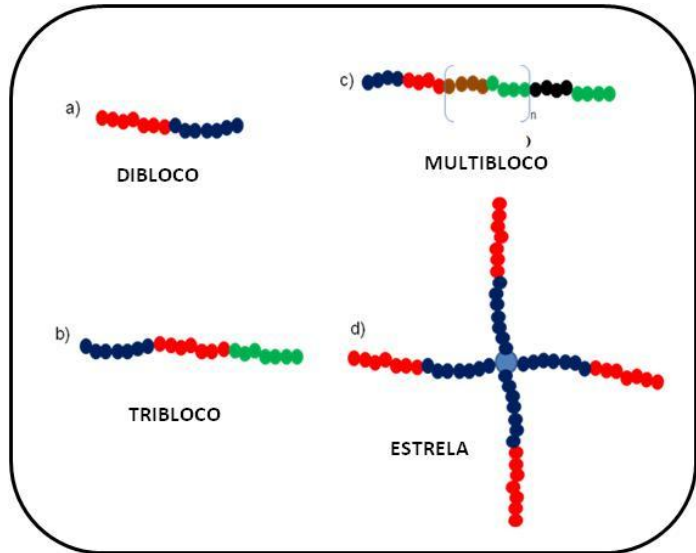


Figura 1. Diferentes tipos de copolímeros em bloco: a) dibloco, b) tribloco, c) multibloco e d) estrela [3].

Existem copolímeros em bloco que são anfifílicos, ou seja, possuem em sua estrutura pelo menos duas regiões de natureza distintas, uma hidrofílica e uma hidrofóbica, que quando submetidas a solventes que dissolvem seletivamente um dos blocos, promovem a associação das cadeias [4, 5]. Este processo ocorre devido à minimização das interações desfavoráveis e maximização das favoráveis, a fim de reduzir a energia livre do sistema e resulta na formação de estruturas supramoleculares nanoscópicas, normalmente em micelas poliméricas.

2.2.1 Micelização

Em solução aquosa e em baixas concentrações, os copolímeros apresentam-se como moléculas isoladas. À medida que a concentração aumenta, as interfaces do sistema começam a se saturar e as moléculas de copolímeros orientam-se de tal modo que os blocos hidrofóbicos tendem a ficarem afastados das moléculas de água. Em uma concentração específica, denominada de concentração micelar crítica

(cmc), os anfífilos se auto-organizam em estruturas denominadas de micelas (Figura 2).

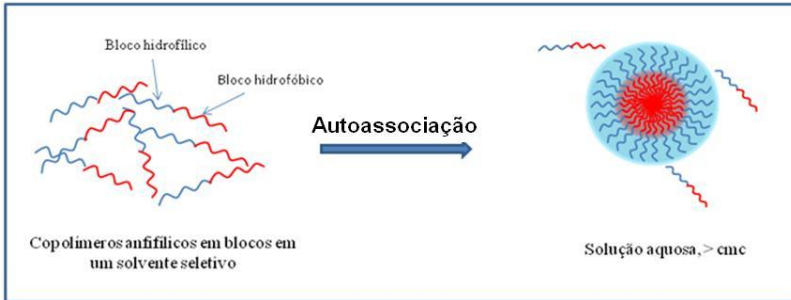


Figura 2. Esquema da autoassociação dos copolímeros anfífilos em blocos em micelas.

O processo de micelização pode ser explicado pelo modelo de ação das massas. Nesse modelo, a expressão da energia livre padrão de micelização para 1 mol de anfífilico é simplificada da seguinte maneira:

$$\frac{\Delta G_m^{\circ}}{n} = \Delta G^{\circ} \approx RT \ln cmc \quad \text{Equação 1}$$

Onde n é chamado de número de agregação da micela, R é a constante de Rutherford, ΔG é a variação da energia livre de Gibbs e T é a temperatura.

Quanto à variação de entalpia, o processo de micelização, em geral, é exotérmico ($\Delta H < 0$), mas também pode ser endotérmico ($\Delta H > 0$). Se o processo é endotérmico, a cmc do surfactante diminui com o aumento da temperatura, e quando é exotérmico, a cmc cresce com o aumento da temperatura. Quanto à variação de entropia, também contribui para a sua espontaneidade. Quanto à variação de entropia (ΔS), observa-se que ela é sempre positiva e suficiente para compensar qualquer entalpia positiva e tornar o processo espontâneo ($\Delta G < 0$), como mostra a equação a seguir:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Equação 2

Dessa forma, diz-se que micelização é um processo dirigido pelo aumento de entropia. A causa provável para esse aumento de entropia envolve a configuração das cadeias hidrocarbônicas do núcleo da micela, que provavelmente tem maior liberdade de movimento no interior da micela do que quando em contato com a água [6].

Além da cmc, existem outros parâmetros importantes no processo de micelização dos copolímeros como o raio hidrodinâmico (R_H) da micela, que corresponde ao tamanho das micelas. Esse parâmetro é obtido através da técnica de espalhamento de luz dinâmico.

Variando os comprimentos dos blocos hidrofílicos e hidrofóbicos, suas propriedades químicas e os métodos de preparação das nanopartículas, a autoassociação de copolímero pode produzir agregados de diferentes morfologias como esferas, cilindros, lamelas, discos, que são importantes na aplicação como liberação de fármacos [6-8], além de vesículas para nanoreatores [9] ou em filmes para nanotemplates [10].

2.3 Copolímeros anfífilicos em bloco à base de polissacarídeo.

Carboidratos ou sacarídeos são as biomoléculas mais abundantes na natureza. Sua estrutura é constituída principalmente por carbono, hidrogênio e oxigênio, podendo apresentar nitrogênio, fósforo ou enxofre na sua composição. A principal função atribuída aos carboidratos é a energética. Porém, atuam também como elementos estruturais e de proteção na parede celular das bactérias, fungos e vegetais, bem como em tecidos conjuntivos e envoltório celular de animais. Estruturalmente, apresentam como polihidroxi-aldeídos ou poli-hidroxicetonas, ou substâncias que produzem tais compostos em hidrólise.

Em relação à classificação os carboidratos são classificados em:

- Monossacarídeo: contém uma única unidade do grupo funcional aldeído ou cetona (por exemplo, glicose, frutose).
- Dissacarídeo: consiste em duas unidades de monossacarídeos ligados entre si por uma ligação covalente (por exemplo, sacarose, lactose, maltose).
- Oligossacarídeo: contém 3 a 10 unidades de monossacarídeos (por exemplo, rafinose).

Polissacarídeo: contém cadeias muito longas de centenas ou milhares de unidades de monossacarídeos que podem ser lineares ou ramificadas (por exemplo, celulose, glicogênio, amido, quitina).

Oligossacarídeos e polissacarídeos são componentes importantes nos sistemas biológicos porque possuem a função de armazenamento de energia e formação da matriz extracelular. Normalmente, esses compostos estão presentes na superfície da célula gliconjugados aos lipídios (glicolípídios) ou as proteínas (glicoproteínas).

A autoassociação de copolímeros à base de polissacarídeo tem sido relatada na literatura em diferentes aplicações. Por exemplo, Zhang e colaboradores descreveram a síntese e caracterização de copolímeros constituídos de um bloco hidrofílico composto por segmentos de maltoheptaose ou dextran e o bloco hidrofóbico composto por segmentos de poli (ε-caprolactona). Nesse trabalho foram realizados estudos característicos de autoassociação dos copolímeros em solução aquosa que obtiveram como resultados a formação de micelas esféricas nanométricas. Além disso, verificou-se que propriedades como a concentração micelar crítica e o tamanho das micelas dependem da poli (ε-caprolactona) [11].

Hougan e colaboradores relataram estudos da autoassociação de copolímeros formados por dextran-*b*-poliestireno em diferentes solventes (Figura 3). Verificou-se a formação de diferentes morfologias, como vesículas e esferas que dependem da composição química do bloco do copolímero [12].

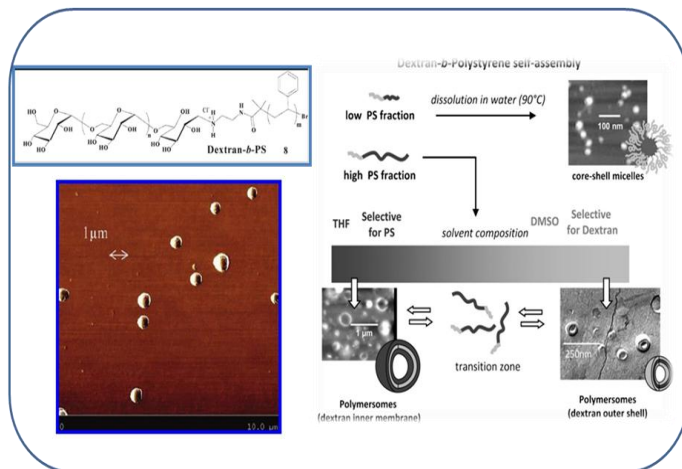


Figura 3. Estudos da autoassociação de copolímeros formados por dextran-*b*-poliestireno em diferentes solventes [12].

Otsuka e colaboradores relataram os estudos feitos de um copolímero híbrido e termossensível à base de maltoheptaose-*b*-poli(*N*-isopropilacrilamida) (Figura 4). Para a síntese do copolímero com diferentes pesos moleculares utilizou-se a “click chemistry”. Os resultados do estudo da autoassociação desse copolímero, através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz dinâmico, mostraram a formação de morfologias como vesículas [13].

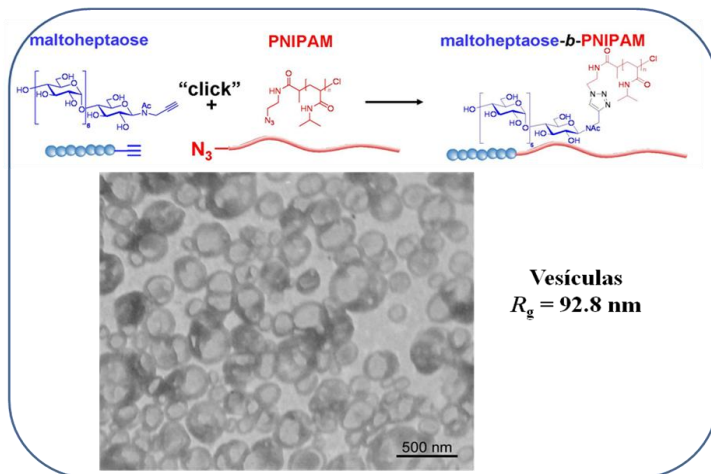


Figura 4. Síntese do copolímero híbrido e termossensível à base de maltoheptaose-b-poli(N-isopropilacrilamida) [13].

Sendo assim, devido a sua hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, os copolímeros anfífilicos em bloco à base de polissacarídeos [14] podem ser atraentes para diversas aplicações, como na indústria farmacêutica, de detergentes e de cosméticos [15, 16].

2.4 Blocos de copolímeros para liberação controlada de fármacos

Atualmente é grande o número de pesquisa na área da saúde, principalmente na indústria farmacêutica, com o objetivo de melhorar o processo de administração de medicamentos pelo organismo humano como: a diminuição das doses de administração, os efeitos colaterais, o nível de toxicidade, a rejeição e o aumento de sua eficiência.

Existem medicamentos que são eficientes para o tratamento de doenças, mas possuem baixa solubilidade em água e sua absorção pelo organismo se torna impossível, já que 80 % do corpo humano é constituído de água. Por isso, o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água é muito importante para incrementar sua taxa de absorção no organismo (biodesponibilidade).

Atualmente, o processo de encapsulação de fármacos para a liberação controlada é o método mais eficiente na administração pelo organismo. Seu objetivo é de estabilizar a concentração do medicamento no organismo dentro da sua faixa terapêutica, evitando as altas doses do medicamento e seus efeitos colaterais.

Como foi dito anteriormente, as propriedades funcionais de agregados formados a partir copolímeros anfífilos em bloco podem ser ideais para o encapsulamento e liberação de fármacos hidrofóbicos. Dentre eles, micelas poliméricas formadas por copolímeros em bloco têm atraído grande interesse [7].

Para ser utilizado como matriz de liberação do fármaco, o copolímero deve satisfazer alguns critérios importantes como:

- Biocompatível, ou seja, não produzir efeitos nefastos sobre os tecidos biológicos.

- Biodegradável dentro de um período razoável de tempo e os produtos de degradação resultantes não devem ser tóxicos;

- Pequena distribuição do tamanho das nanopartículas, entre 10 e 100 nm, ideal para a administração intravenosa. Muito menor que o diâmetro (≥ 4 mm) dos capilares sanguíneos [17-19].

- As micelas formadas a partir de copolímeros anfífilos em bloco são geralmente mais termodinamicamente estáveis do que as formadas a partir de surfactantes de baixo peso molecular. Essa estabilidade termodinâmica significa que micelas poliméricas sofrem menos a quebra de sua estrutura em baixas concentrações, ou seja, em soluções muito diluídas.

- Micelas de copolímeros anfífilos em bloco também possuem estabilidade cinética em que a dissociação de estruturas micelares em cadeias livres de monômeros é um processo lento, mesmo quando o sistema é submetido a uma forte diluição. Assim, muitos copolímeros anfífilos em bloco apresentam baixos valores de cmc, o que confere estabilidade às micelas mesmo após sua diluição no sangue.

- Baixa toxicidade [20, 21].

Sistemas micelares específicos de copolímeros anfífilos em bloco podem ser ainda subclassificados de acordo com o método usado para incorporar as drogas ou terapêuticos biológicos. Em geral, o método é determinado principalmente pela sua solubilidade e do fármaco. Existem vários métodos de solubilização de fármacos hidrofóbicos nas micelas dos copolímeros. Os métodos mais utilizados

incluem dissolução direta, diálise, emulsões, evaporação do solvente (Aliabadi e Lavasanifar (2006). Dependendo do método, o encapsulamento da droga pode ocorrer durante ou depois da micelização. Além disso, a maneira pela qual o fármaco é encapsulado varia de sistema para sistema, dependendo do método e do objetivo final da pesquisa.

Assim, muitos materiais poliméricos têm sido relatados incluindo Ácido poli-L-lático [22] e Polietileno glicol [17, 23], esses polímeros têm sido utilizados como materiais biodegradáveis e são conhecidos por serem biocompatíveis. Existem também copolímeros formados por poli (ϵ -caprolactona) [24], polipeptídios [25], proteínas [26] e mais raramente por polissacarídeos.

2.5 “Click Chemistry”

A “click chemistry” foi introduzida em 2001 por K. Barry Sharpless [27] onde em sua revisão descreve uma nova estratégia de síntese na química orgânica através de reações termodinamicamente favoráveis, simples de se realizar, produto final com alto rendimento, estereoespecífica e gera apenas subprodutos inofensivos que podem ser isolados facilmente.

Existem diferentes tipos de reações classificadas como “click chemistry”, atualmente a que mais se destaca é a cicloadição 1,3-dipolar entre um grupo alcino e um grupo azida catalisada por cobre (Cu(I)), com formação regioespecífica de 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos, também conhecida como reação CuAAC. A reação CuAAC foi desenvolvida pela primeira vez por Huisgen em 1967. Originalmente esta reação apresentou vários problemas devido à formação de uma mistura de produtos (regioisômeros triazólicos 1,4 e 1,5-dissubstituídos), necessidade de longos tempos reacionais e de altas temperaturas (Figura 5).

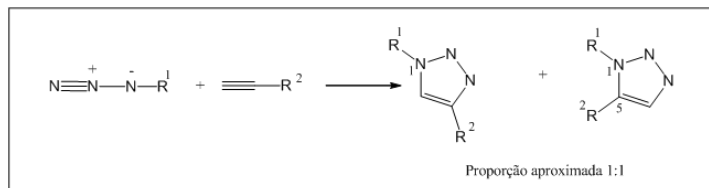


Figura 5. Regioisômeros obtidos via cicloadição térmica [3+2] clássica de Huisgen.

Em 2002, estudos feitos por Meldal [28] e Sharpless [29] mostraram que a utilização de Cu(I) acelerava a reação de forma surpreendente, resultando na formação exclusiva do regioisômero 1,4-dissubstituído com elevados rendimentos. A cicloadição de Huisgen na presença de cobre se tornou uma das reações mais utilizadas atualmente por muitos grupos de pesquisa em estratégias de síntese de 1,2,3-triazóis 1,4-substituídos comprovando seu amplo potencial de aplicação (Figura 6).

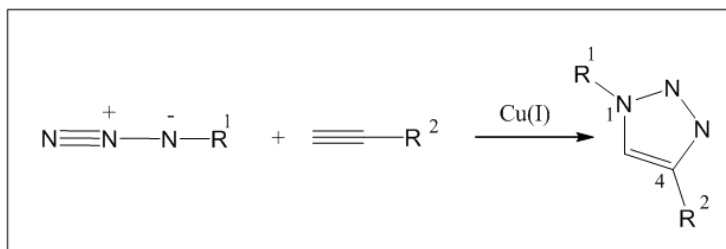


Figura 6. A reação "click" ou CuAAC.

Atualmente, a escolha da fonte de cobre é feita com base nas necessidades especiais de cada reação e são inúmeras as combinações já descritas na literatura [30]. O uso de sais estáveis de Cu (II), como o sulfato penta-hidratado (CuSO₄·5H₂O) ou o acetato de Cu(II), na presença de um agente redutor fraco como o ascorbato de sódio se tornou muito popular e prática para a reação "click" por não haver necessidade de se utilizar ligantes ou aditivos e por a reação sofre menor interferência do oxigênio atmosférico [29]. Como fonte alternativa de

cobre, pode-se ainda citar o uso de cobre metálico (fio, limalha, pó ou aglomerado) utilizado na presença ou ausência de sulfato de cobre que, após redução, leva à formação da espécie reativa Cu(I).

Existe também na literatura descrito o uso de ligantes em reações de CuAAC, como por exemplo o TBTA (tris-benziltriazolilmetilamina) [31]. Esses ligantes são frequentemente empregados para aumentar a velocidade da reação e para proteger o Cu(I) de oxidação na presença eventual de oxigênio. Apesar do grande número de possibilidades experimentais, não existe uma correlação óbvia entre o tipo de método empregado e o rendimento da reação e, por isso, cada caso deve ser otimizado.

Nos primeiros estudos envolvendo a reação CuAAC, Sharpless e colaboradores relataram o uso de água como solvente [27]. O uso da água, segundo os autores, apresentava como vantagens o fato de se tratar de um solvente benigno, universal, que dissolvia os sais inorgânicos de Cu(II) e o ascorbato de sódio e possuía capacidade de absorver a grande quantidade de calor gerada neste tipo de reação. Hoje em dia sabe-se que a maioria dos solventes conhecidos, puros ou na forma de sistemas bifásicos, pode ser empregada na reação “click” [32]. Apesar desta versatilidade, a decisão definitiva sobre o tipo de solvente a ser usado depende não só da fonte de cobre empregada, mas também das propriedades dos reagentes em questão.

2.5.1 Aplicações da Click chemistry

A reação “click” é uma importante ferramenta para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, além de possibilitar modificações daqueles já existentes, visando à melhoria das suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas [33].

Na química de materiais, a reação “click” vem sendo extensivamente utilizada na obtenção de diversos materiais, tais como dendrímeros, polímeros, fases estacionárias modificadas, organogéis, macrociclos, dentre outros [34].

A reação CuAAC tornou-se muito popular em áreas de interface com a química orgânica. A bioconjugação representa a interface entre a biologia molecular e a química orgânica e se refere à derivatização de biomoléculas, originando um novo composto que une as propriedades

dos componentes iniciais. A reação “click” torna-se ideal para aplicação em bioconjugação [34].

Outra área em que a reação “click” vem sendo muito aplicada é na química supramolecular, a qual se baseia nas interações não covalentes entre moléculas. A reação “click” tem sido aplicada também na obtenção de catalisadores.

2.6 Estudo da morfologia pelo aumento da concentração do copolímero

Alguns fatores termodinâmicos e cinéticos levam a formação de determinada morfologia na autoassociação de copolímeros anfífilos em bloco. Assim, é interessante estudar a relação entre esses fatores tanto no processo de micelização quanto nas transições morfológicas, já que, uma dada morfologia pode originar-se devido a manifestações da termodinâmica, ou por restrições cinéticas. Eisenberg e Zhang estudaram a influência da variação da concentração inicial de copolímero na morfologia sob os aspectos termodinâmicos e cinéticos. Termodinamicamente a estrutura dos agregados é controlada pelo balanço das forças envolvendo as interações repulsivas das cadeias da corona e a energia interfacial corona/núcleo [35]. O efeito de alterar-se a concentração inicial da morfologia pode ser estendida considerando que o número de agregação (N_{agg}) é em função da concentração (C) de copolímero e da cmc:

$$N_{agg} \sim (C/cmc)^2$$

Equação 3

As diferentes transições morfológicas ocorrem devido ao aumento da concentração inicial do copolímero já que as definições do núcleo são em função do número de agregação.

Cineticamente as transições morfológicas são devido a possíveis dois mecanismos. O primeiro envolve a continua inserção de cadeias isoladas a uma micela esférica. A inserção dessas cadeias aumenta o número de agregação e conseqüentemente as dimensões do núcleo, o

que levará eventualmente para uma morfologia cilíndrica (*wormlike*), quando o diâmetro da micela atingir a um valor crítico. Outro possível mecanismo envolve colisões de pequenas esferas as quais aumentam o número de agregação e formam micelas de diâmetros maiores e morfologia idêntica. Novamente, em um determinado ponto, a morfologia muda para cilíndrica.

2.7 Ensaios de citotoxicidade de carregadores de fármacos

Devido as suas diversas aplicações e funcionalidades, especialmente em terapias de liberação controlada do fármaco, os polímeros estão dentre os excipientes mais utilizados para a obtenção de formas farmacêuticas (RIOS, 2005).

A escolha de um polímero para um sistema de liberação de fármacos depende de vários fatores que correlacionam as propriedades do princípio ativo, dos polímeros e demais excipientes que irão fazer parte da formulação. Além disso, o mecanismo pretendido de liberação do fármaco também interfere nessa escolha [36]. Para se chegar ao mecanismo desejado de liberação do fármaco, os polímeros (sintéticos) podem ter suas propriedades moldadas ou pode-se trabalhar com uma mistura de polímeros que apresentam propriedades diversas e, com a modificação da proporção destes na formulação chegar ao sistema de liberação que satisfaça às necessidades do formulador. Avanços futuros na ciência dos polímeros deverão ser baseados em modificações de suas propriedades químicas e físicas, e em novas combinações de copolímeros. Dessa forma, podem-se obter novos componentes capazes de liberar uma ampla variedade de agentes bioativos de forma programada e controlada [36-39].

CAPITULO 3

FUNDAMENTOS TEÓRICOS DAS TÉCNICAS

3.1. Fluorescência

A espectrometria de fluorescência é uma importante técnica para o estudo de sistema micelares e tem sido amplamente utilizada nas diversas áreas da química, bioquímica e medicina.

Nessa técnica utilizam-se compostos chamados de sondas fluorescentes. O pireno é o composto mais usado como sonda fluorescente na investigação de variações de sistemas microorganizados (micelas, colóides). O espectro de emissão do pireno exibe bandas de vibração finas cujas intensidades relativas são sensíveis a polaridade do meio, ou seja, do ambiente onde se encontra solubilizada a sonda.

A razão entre as intensidades do primeiro e do terceiro pico (I_1/I_3) no espectro de emissão do pireno mostra a dependência da polaridade do solvente usado (Figura 7)

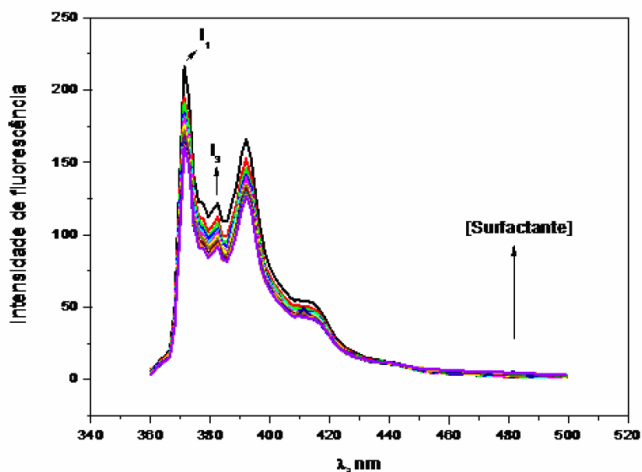


Figura 7. Espectros de fluorescência do pireno com o aumento da concentração de um surfactante (dodecil sulfato de sódio).

A concentração micelar crítica (cmc) pode ser obtida pela mudança de I_1/I_3 em função da concentração do anfifílico (Figura 8).

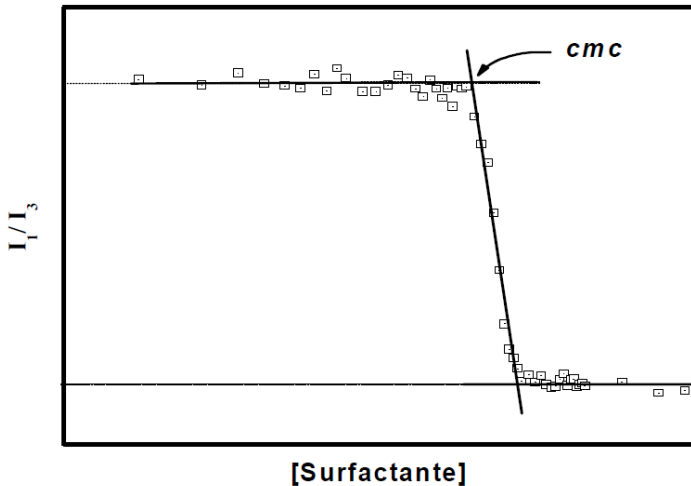


Figura 8. Gráfico mostrando o perfil da curva I_1/I_3 versus [surfactante].

Qualitativamente, a razão I_1/I_3 diminui com a redução da polaridade do ambiente, ou seja, no início da formação da micela ou agregados. Abaixo da cmc, a razão I_1/I_3 corresponde a um ambiente polar e quando a cmc é excedida, e a micela é formada, o pireno é preferencialmente solubilizado na região hidrofóbica da mesma diminuindo abruptamente a razão I_1/I_3 . Este parâmetro pode por esta razão ser usado para monitorar a concentração micelar crítica.

3.2 Espalhamento de Luz Dinâmico

O espalhamento de Luz Dinâmico é uma técnica largamente utilizada para medir o tamanho de partículas em solução, como polímeros, proteínas, vesículas lipídicas e vários outros tipos de agregados moleculares. A técnica baseia-se na detecção das flutuações temporais na intensidade de luz espalhada através de uma função de correlação temporal (FCT).

O conceito usa a idéia de que partículas dispersas em um meio líquido movem-se aleatoriamente (movimento Browniano) como consequência dos choques das moléculas do fluido nas partículas. Partículas menores movem-se mais rapidamente que partículas maiores.

Através da função de correlação temporal é possível obter a taxa de relaxação Γ e consequentemente o coeficiente de difusão translacional D , através da equação 4:

$$\left. \frac{\Gamma}{q^2} \right|_{q \rightarrow 0} = D$$

Equação 4

onde q é o vetor de onda definido pela equação 5:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Equação 5

onde λ é o comprimento de onda, θ é o ângulo de espalhamento e n é o índice de refração. Uma vez obtido o coeficiente de difusão é o raio hidrodinâmico, R_H , da macromolécula em solução é obtido aplicando-se a relação de Stokes-Einstein (Equação 6).

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

Equação 6

onde k_B é a constante de Boltzmann, η é a viscosidade do solvente e T é a temperatura na qual a medida é realizada.

3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A técnica de microscopia de transmissão eletrônica é aplicada em um vasto campo científico como na química, física e biologia, em

pesquisas relacionadas a ciências dos materiais, mas principalmente na nanotecnologia.

Em um microscópio eletrônico de transmissão detalhes de uma amostra, em alta resolução, são fornecidos por meio de um feixe de elétrons emitido em direção a amostra que são disparados por uma fonte. A interação dos elétrons através da amostra forma uma imagem que não pode ser vista por olho humano. Assim, a imagem é ampliada em um dispositivo de imagens, como uma tela fluorescente, e em seguida transmitida a uma camada de filme fotográfico ou captada por um sensor como uma câmera CCD.

Historicamente, a microscopia iniciou-se com a descoberta de que um feixe de elétrons comporta-se como onda e como partícula (Broglie, 1924). Em 1926, Bush demonstrou que lentes magnéticas podem ser propriamente projetadas para direcionar elétrons e desta forma poderiam ser usadas na construção de um microscópio. O termo “Microscópio Eletrônico” foi proposto pela primeira vez em 1932 por Knoll e Ruska.

As imagens geradas por um microscópio eletrônico de transmissão possuem uma resolução muito maior em comparação a um microscópio ótico devido ao pequeno comprimento de onda, os elétrons reagem diretamente com os núcleos atômicos e não com uma grande área, como faz a luz incidente em um microscópio ótico. Tal característica permite ao usuário obter com um microscópio eletrônico de transmissão imagens únicas com detalhes intrigantes.

Vários fatores estão relacionados à obtenção de uma boa imagem. Alguns se associam ao equipamento, como a formação do contraste, ou a amostra. Em relação à amostra, uma boa imagem depende da estrutura do material, da morfologia e do método de preparação, que influencia na espessura da amostra.

3.4 Microscopia de Força Atômica

Atualmente a microscopia de força atômica apresenta-se como uma técnica muito importante para a análise de filmes orgânicos frágeis como Langmuir-Blodgett (LB), biomoléculas, cerâmicas, soluções poliméricas, etc. O princípio básico desta técnica é medir forças ou interações entre uma ponteira (sonda) e a superfície da amostra, mais especificamente das deflexões de um suporte (de 100 a 200 μm de

comprimento) em cuja extremidade livre está montada a sonda. Estas deflexões são causadas pelas forças que agem entre a sonda e a amostra. Existem diferentes técnicas que fornecem diversas possibilidades para fazer imagens de diferentes tipos de amostras e para gerar uma ampla gama de informações. Os modos de fazer as imagens, também chamados modos de varredura ou de operação, referem-se fundamentalmente à distância mantida entre a ponteira e a amostra, no momento da varredura, e às formas de movimentar a ponteira sobre a superfície a ser estudada. A detecção da superfície realiza-se visando à criação de sua imagem [40, 41].

CAPITULO 4

METODOLOGIA

4.1 Método fluorimétrico

Para as medidas de fluorescência as soluções estoque do cooligômero Mal₇- "click"-AcMal₇ foram preparadas por dissolução em água milli-Q e agitação de no mínimo 12 h.

Os espectros de fluorescência foram registrados num Espectrofluorímetro F4500 Hitachi e a amostra agitada continuamente numa célula de quartzo, com 10 mm de percurso óptico. Ambas as fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas em 2,5 nm. As amostras excitadas a 339 nm e os espectros de emissão registrados em 360-500 nm. O espectro de fluorescência foi registrado após cada adição de microlitros da solução estoque do copolímero. A relação I_1/I_3 foi estimada tomando a razão entre a intensidade do pico máximo a 372,8 nm (I_1) e 384,0 nm (I_3). Concentração do pireno = 6.0×10^{-7} mol L⁻¹.

4.2 Espalhamento de luz dinâmico

O espalhamento de luz dinâmico das amostras foi investigado em um Goniômetro ALV com um laser de 35 mV HeNe operando a um comprimento de onda de 632,8 nm e um correlator múltiplo Tau digital ALV-5004 com 125ns de tempo inicial e temperatura controlada. As medidas foram realizadas na região angular de 40° até 140°. As soluções

aquosas de Mal₇-“click”-AcMal₇ foram filtradas em um filtro hidrofílico 0,45 µm (Millipore Millex PES).

Os dados foram coletados por meio de um software. As distribuições de tempo de relaxação A (t) foram obtidas na análise de Contin [42] a partir das funções de autocorrelação adquiridas C (q, t).

4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para as análises de microscopia de transmissão eletrônica as amostras foram preparadas da seguinte maneira: primeiramente, 4µL da solução aquosa do cooligômero foi depositada sobre uma grade de cobre revestida com uma fina camada de carbono. A seguir, a amostra foi marcada negativamente com a adição de 4µL de um colorante, acetato de uranila 2% (w / v), sobre a grade contendo a amostra. Por último, o solvente foi evaporado a temperatura ambiente para posterior observação.

As imagens foram feitas em filmes fotográficos Kodak SO163 usando um microscópio Philips CM200 operando em 18kV, digitalizadas com uma câmera Kodak Megaplus CCD e formatas usando um software.

4.4 Microscopia de Força atômica

Para as medidas da morfologia das nanopartículas por AFM utilizou-se um aparelho “AFM PicoPlus”(Molecular Imaging). Uma gota de uma solução micelar diluída foi colocada sobre um suporte de mica e após foi feito a secagem do solvente sob um fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente. As imagens foram feitas utilizando o “tapping mode” com frequência de 145–230 kHz.

4.5 Avaliação da citotoxicidade in vitro

4.5.1 Cultura de células

Para os estudos de citotoxicidade foram utilizadas quatro diferentes linhagens celulares (K562, Jurkat, B16F10 e L929). As células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 mM de tampão HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico) em pH 7.2. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Para a realização dos experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%). Um número variável de células viáveis, de acordo com o protocolo experimental, foi plaqueado em placas de cultura para posterior tratamento com os compostos naturais nanoencapsulados.

4.5.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Para avaliar o efeito citotóxico foi utilizado o método do MTT (brometo de dimetiazol difeniltetrazólio) [43]. As células de melanoma foram tratadas com concentrações crescentes (1-100 µM) do cooligômero e incubadas por 24 h, 48 h e 72 h estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Ao final de cada experimento, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante foi removido, e adicionado no meio de cultura fresco contendo 10% (v/v) de uma solução de MTT (5 mg/ml em PBS). Após 2 horas de incubação a 37°C, as placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em solução ácida de isopropanol (isopropanol/HCL 0,04 N) e, em seguida, foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda 540nm. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de células viáveis.

4.6 Estudos de encapsulação

Para o estudo de encapsulação foi utilizado o método de fluorescência. Os espectros de fluorescência foram registrados num Espectrofluorímetro F4500 Hitachi e a amostra agitada continuamente numa célula de quartzo, com 10 mm de percurso óptico. Ambas as fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas em 5,0 nm. As amostras excitadas a 397 nm e os espectros de emissão registrados em 440-600 nm. A intensidade relativa da fluorescência foi obtida em $\lambda_{emi} = 508$ nm.

4.6.1 Determinação da eficiência de encapsulação da curcumina

O teor de fármaco dentro da micela foi determinado utilizando o método analítico de adição padrão conforme a literatura [44]. Para esse experimento, uma alíquota de uma solução de micelas do copolímero foi dissolvida em THF a fim de induzir a dissociação das micelas e medir a quantidade de curcumina na solução. A intensidade de fluorescência foi medida em 397 nm após a adição de aliquotas (20, 30, 40, 50, 60, and 70 μ L) de uma solução 10 μ g/ μ L de curcumina. Os dados de intensidade de fluorescência obtidos geraram um gráfico linear, a partir do qual o "volume negativo" de curcumina correspondente a intensidade zero de fluorescência, e, conseqüentemente a quantidade de curcumina presente na solução de copolímero original foi calculada.

CAPITULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese e Caracterização

6.1.2 Reagentes

Os reagentes β -Ciclodextrina ($C_{42}H_{70}O_{35}$ Sigma-Aldrich, $\geq 97,0\%$), ascorbato de sódio ($C_6H_8O_6$, Acros, 99%), sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ Sigma-Aldrich, $\geq 98,0\%$), amiloglucosidase (Sigma-Aldrich, 67.4 U/mg), cloreto de ferro (III) anidro ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, Sigma-Aldrich, 97%), 4-Dimetilaminopiridina ($C_7H_{10}N_2$, DMAP, Sigma-Aldrich, 98%), azida de sódio (NaN_3 , Sigma-Aldrich, 99%), N-etildiisopropilamina ($C_8H_{19}N$, Sigma-Aldrich, $\geq 98,0\%$), propargilamina (C_3H_5N , Sigma-Aldrich, $\geq 98,0\%$) foram utilizados sem nenhum tipo de purificação. A água empregada no preparo das soluções foi obtida por sistema de purificação e filtração Milli-Q (Millipore, Billencia, EUA).

6.1.3 Técnicas e instrumentação

As reações serão seguidas por cromatografia em camada fina em sílica gel 60F₂₅₄ (E. Merck). A detecção foi conseguida por exposição a vapores de iodo ou pela carbonização com solução de ácido sulfúrico 3:45:45 H_2SO_4 :MeOH:H₂O. A purificação dos compostos foi realizada por cromatografia em coluna rápida (Flash) utilizando sílica gel 60 Merck.

Os espectros de 1H RMN foram obtidos usando um espectrofotômetro modelo Bruker Avance DRX, 400 MHz. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm usando a ressonância do solvente como padrão interno. Para as análises de espectrometria de infravermelho (IV), as amostras foram preparadas na forma de pastilha de KBr ou em filmes (esses filmes foram obtidos por evaporação de uma solução do produto num adequado solvente orgânico) e os espectros FTIR foram feitos em um Perkin-Elmer RXI. A determinação da massa molar foi realizada por espectrometria de massa

(MALDI-TOF MS) utilizando um espectrômetro Autoflex (Bruker Daltonics).

A colobaração com CERMAV, unidade de pesquisa do CNRS, se deu por competências em Físico-química (R. Borsali), em Glico-química (Sami Halila).

6.1.4 Metodologia

A estratégia geral da síntese utilizada para a elaboração do cooligômero é descrito na figura 9.

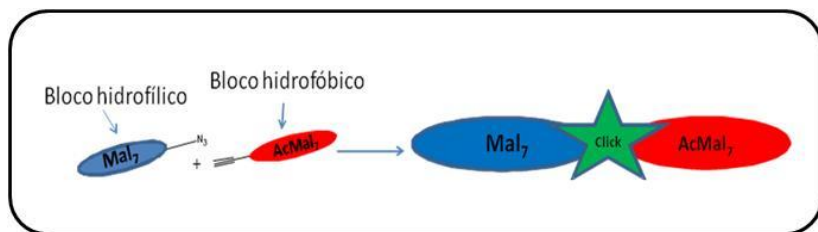


Figura 9. Estratégia geral da síntese do cooligômero.

A maltoheptaose (MAL₇), constituída de sete unidades de glicose ligadas (α -1,4), foi utilizada como molécula de partida. Assim, MAL₇ foi funcionalizada por um grupamento alcino terminal (AcMal₇) e funcionalizada com um grupamento azida (Mal₇N₃). Em seguida, os dois grupos foram “clizados” através de reações de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen para obter o cooligômero (Mal₇-“click”-AcMal₇).

A Maltoheptaose foi obtida em grande quantidade por acetólise da β -ciclodextrina em presença de um ácido de Lewis, o FeCl₃·6H₂O, e de um anidrido acético como descrito na literatura [45]. AcMal₇ foi obtida através de uma metodologia já descrito na literatura, porém com algumas pequenas modificações [13]. Para Mal₇N₃ foi utilizado o método de Shoda [46].

Como estratégia final para a obtenção do copolímero, foi utilizado a reação de “click chemistry” ou cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen entre o grupo azida e o alcino que tolera inúmeras condições e é quimio-seletiva. A figura 10 apresenta a rota sintética para a síntese do copolímero.

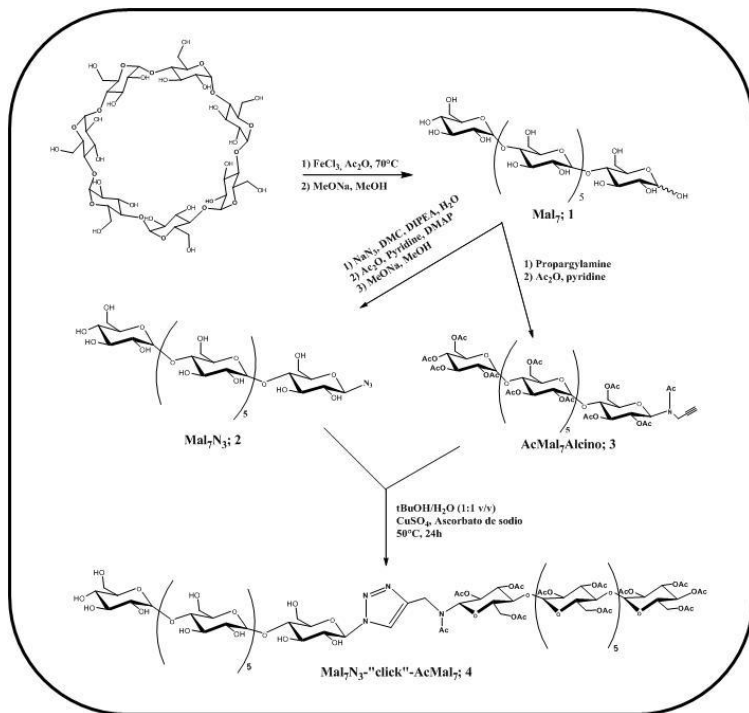


Figura 10. Rota Sintética para o copolímero Mal₇-‘click’-AcMal₇

Síntese de AcMal₇alcino (3): A síntese de *N*-(2^{I-VII},3^{I-VII},4^{VII},6^{I-VII}-docosa-O-acetil-β-maltoheptaosil)-3-acetamido-1-propina (3, AcMal₇alcino) foi realizada utilizando uma metodologia já publicada na literatura porém com algumas pequenas modificações. Primeiramente, uma suspensão de maltoheptaose (10.0 g, 8.67 mmol) em propargilamina (11.9 mL, 174 mmol) foi agitada vigorosamente em temperatura ambiente por 72 h. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando Acetonitrila/H₂O (7:3, v/v). A mistura reacional foi dissolvida em metanol (MeOH) e precipitada em diclorometano (CH₂Cl₂). O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com uma mistura de MeOH/CH₂Cl₂ (1:3, v/v). A acetilação foi realizada misturando o precipitado em piridina e anidrido acético. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando Acetato de etila/éter de petróleo (7:3, v/v). A

mistura reacional foi evaporada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (eluente: EtOAc/éter de petróleo, 70:30 → 90:10). O produto (3) após seco apresentou-se como um sólido branco, 9,4 g (rendimento de 50%), $R_f = 0,4$ (EtOAc/éter de petróleo, 70:30). IV (pastilha de KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): $\nu = 3100\text{--}2700$ (C–H, açúcares), 1644 (C=O, ésteres, amida) cm^{-1} ; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ ppm = 5.93 e 5.40 (d, $J_{1-2} = 9.35$ Hz, 1H, rotâmetros; H-1^{GlcI,Ac}), 5.40 (m, 6H; H-1^{GlcII-VII,Ac}), 5.30–4.80 (m, 44H; H-2, 3, 4, 5, 6^{GlcI-VII,Ac} e NCH_2), 2.32–1.96 ppm (m, 70H; CH_3 (OAc and NAc) and C–CH); MALDI-TOF: $M + \text{Na } m/z$: 2178.46.

Síntese de Mal₇-“click”-AcMal₇ (4). A síntese de 4-[maltoheptaosil]-1-[*N*-acetil-*N*-(2^{I-VII},3^{I-VII},4^{VII},6^{I-VII}-docosa-O-acetil- β -maltoheptaosil)]-5H-[1,2,3]-triazol (4, Mal₇-“click”-AcMal₇) foi realizada misturando **2** (270 mg, 0.24 mmol) e **3** (500 mg, 0.24 mmol) em $\text{H}_2\text{O}/t\text{-BuOH}$ (1:1 v/v). Em seguida foi adicionado ascorbato de sódio (95 mg, 0.48 mmol) e 0.1 M de sulfato de cobre (II) (2.5 mL, 0.25 mmol). A mistura reacional foi agitada a 50 °C por 24 h. A reação foi acompanhada por CCD utilizando Acetonitrila/ H_2O (8:2, v/v). O solvente foi evaporado na presença de sílica gel e o produto foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel (eluente: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 90:10 → 80:20). O produto puro após seco (**4**) apresentou-se como um sólido branco, 500 mg (rendimento de 63%). $R_f = 0.42$ (7:3 $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$); IV (pastilha de KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): $\nu = 3600\text{--}3100$ (O–H, açúcares), 3100–2700 (C–H, açúcares e acila), 1644 (C=O, ésteres, amida) cm^{-1} ; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{THF}-d_8/\text{D}_2\text{O}$): δ ppm 8.29 e 8.17 (2x s, 1H rotâmetros; H-5 triazol), 5.85 (m, 1H; H-1^{GlcI,Ac}), 5.60 (m, 6H; H-1^{GlcII-VII,Ac}), 5.00 (m, 6H; H-1^{GlcII-VII}), 4.60 (m, 1H; H-1^{GlcI}), 5.40–3.50 (m, 86H; H-2, 3, 4, 5, 6^{GlcI-VII} e NCH_2), 2.50–1.80 (m, 69H; CH_3 (OAc e NAc)); HRMS (ESI, m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculado de $\text{C}_{133}\text{H}_{192}\text{N}_4\text{O}_9\text{Na}$, 3356.0315; encontrado, 3356.0270.

Um dos principais problemas na síntese de moléculas anfífilicas é a dificuldade de solubilidade, decorrente da diferença de polaridade entre os dois blocos. Porém, a solubilidade pode ser obtida com o uso da combinação de solventes adequados (acetona, THF, álcool). A reação CuACC é perfeitamente adequada para reações em que o uso de misturas de solventes é necessário, pois esse tipo de reação é altamente

quimiosseletiva e é compatível com muitos grupos funcionais. Para abordar a reação CuAAC, os grupos azida e alcino foram introduzidos na parte redutora levando a Mal₇N₃ (**2**) e AcMal₇ (**3**), respectivamente. Como resultado obteve-se a formação do cooligômero. É claramente vantajoso modificar um açúcar nativo diretamente desprotegido porque com isto abre-se um caminho para a futura incorporação de polissacarídeos naturais sem extensivas manipulações sintéticas.

Maltoheptaose foi o bloco sacarídeo chave para a rota sintética. Mal₇ foi obtida pela abertura do anel de β-ciclodextrina utilizando Ac₂O/FeCl₃, seguida de uma deacetilação em Condições Zemplén (quantidade catalítica de metóxido de sódio em metanol) como relatado por Liptak e colaboradores [45]. Inicialmente Mal₇ (**1**) foi quimiosseletivamente funcionalizado com um grupamento propargilamina [13, 47, 48] e depois peracetilado para obter AcMal₇alcino (**3**, Esquema 1). Na segunda etapa, a maltoheptaosil azida, Mal₇N₃ (**2**), foi preparado utilizando o método de Shoda [46]. O reagente 2-cloro-1,3-di-cloreto dimethylimidazolium (DMC) apresentou-se como um excelente agente de desidratação para a ativação direta do grupo hidroxila anomérico de açúcares desprotegidos em meio aquoso. A substituição sequencial de íons azidas leva a formação de β-glicosil azidas em vários açúcares com rendimentos muito bons. Uma grande preocupação com esta abordagem é o uso de grandes quantidades de sais e bases como reagentes, o que torna difícil a purificação, especialmente em grande escala. Recentemente, Vinson e colaboradores[49] propuseram um procedimento de purificação que mostrou bons resultados. Assim, realizou-se a purificação por etapas sucessivas de acetilação e desacetilação levando a **2** com 77% de rendimento.

Na fase final da síntese, Mal₇N₃ (**2**) foi “clicado” com AcMal₇a (**3**) para produzir cooligômero em bloco Mal₇-“clique”-AcMal₇ (**4**) com um bom rendimento (64%). O produto foi purificado por cromatografia líquida em sílica gel e depois foi liofilizado. Para a reação de CuAAC necessita-se de um catalisador de cobre e sabe-se que o cobre é tóxico para células e organismos em altas concentrações micromolares. Assim, tomou-se o cuidado em remover a maior parte dos sais de cobre, especialmente através da cromatografia. Porém, na literatura é descrito outros sistemas catalíticos que podem resolver o problema do potencial de toxicidade do cobre.

Os espectros de infravermelho mostraram que o grupo azida de Mal₇N₃ (2), em 2105 cm⁻¹ (Figura 11 (B)), desapareceu completamente em Mal₇-"click"-AcMal₇ (4) (Figure 11 (A)). Entretanto o espectro mostra a presença do grupo acetil, como indicado pelo estiramento da ligação C=O em 1752 cm⁻¹ e da banda em 3400 cm⁻¹ confirmando a presença de hidroxilas livres devido ao bloco livre de maltoheptaose.

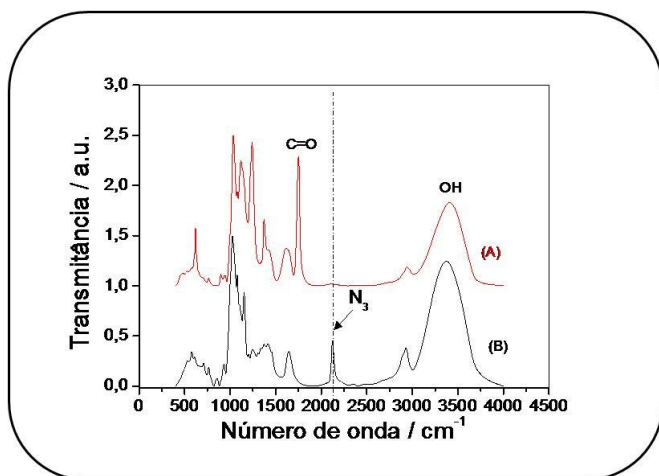


Figura 11. Espectro de Infravermelho de (A) Mal₇- "click"-AcMal₇ (4) e (B) Mal₇N₃ (2).

A figura 12 a mostra o espectro de ¹H NMR de Mal₇-"click"-AcMal₇ em THF-d₈/ D₂O obtido pela reação "click". Em um bom solvente para ambos os blocos, os sinais do próton podem ser claramente visto. Os blocos de Mal₇-"click"-AcMal₇ exibiram picos característicos de maltoheptaose livre e acetilada. Resultados obtidos por espalhamento de luz mostraram que o cooligômero Mal₇-"click"-AcMal₇ (4) está presente em solução como em unidades de cadeias livres.

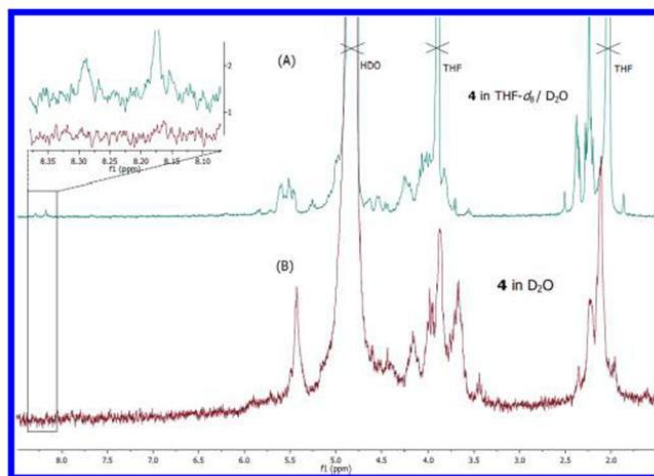


Figura 12. Espectro ¹H NMR de Mal₇-"click"-AcMal₇ (**4**) em THF-d₆/D₂O (1:1 v/v) (acima) e D₂O (abaixo).

O grupo *N*-acetil em 2,4 ppm exhibe rotações restritas (rotâmeros), dando origem a uma multiplicidade de sinais no RMN de prótons. Além disso, o espectro de ¹H NMR mostrou ressonâncias em $\delta \approx 8.2\text{--}8.3$ ppm, correspondente ao próton olefínico associado com a porção de isômeros 1,4-di-substituído 1,2,3-triazole indicando boa concordância com a estrutura atribuída.

6.2 Determinação da concentração micelar crítica (cmc)

Os valores da *cmc* de Mal₇-"click"-AcMal₇ foram obtidos a partir da razão das intensidades das bandas *I*₁ e *I*₃ do espectro de emissão de fluorescência do pireno (Figura 13). Essa razão *I*₁/*I*₃ do espectro de fluorescência do pireno diminuiu com o aumento da concentração do cooigômero. Isto mostra que o pireno está mudando de ambiente químico, ou seja, está passando da solução para o interior das micelas.

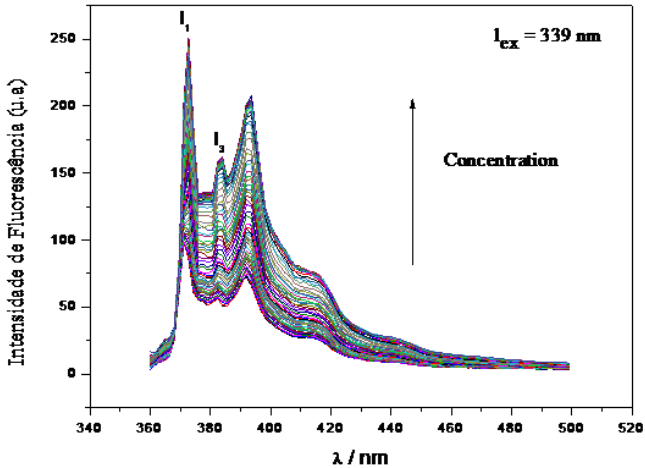


Figura 13. Espectros de fluorescência do pireno com o aumento da concentração de Mal₇-‘click’-AcMal₇.

A *cmc* foi definida como sendo o início da associação do pireno quando I_1/I_3 começa a variar bruscamente (Figura 14). O valor de *cmc* encontrado foi de 0,1 mg / mL. Esse valor de *cmc* está dentro do intervalo descrito para surfactantes não iônicos de baixo peso molecular como, por exemplo, o dodecilmaltosido (0,097 mg / mL) e o penta etileno glicol mono-n-dodecil éter (0,027 mg / mL). Para os sistemas de liberação controlada de fármacos, este pequeno valor de *cmc* é importante devido ao seu promissor desempenho in vivo e na estabilidade das micelas mesmo após sua diluição no sangue.

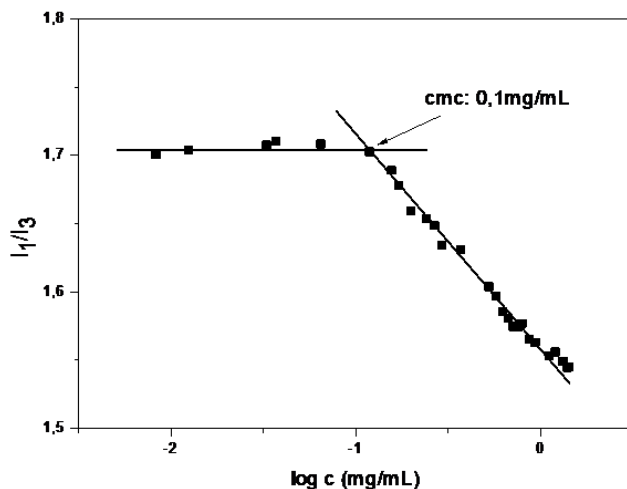


Figura 14. Perfis da razão I_1/I_3 dos espectros de fluorescência do pireno medidas em função da concentração de Mal₇-“click”-AcMal₇ em água a 25 °C. (concentração do pireno = $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L).

6.3 Morfologia das nanopartículas acessadas por DLS e TEM

As propriedades de autoassociação do Mal₇-“click”-AcMal₇, como o tamanho, foram investigadas por DLS a fim de destacar o seu comportamento micelar. As nanopartículas foram preparadas por dissolução direta em água Milli-Q em uma concentração acima da *cmc* (3,0 mg/mL).

A Figura 15 mostra a função de auto-correlação $C(q,t)$, medida a 90° e a respectiva distribuição do tempo de relaxação $A(t)$, como revelado pela análise do programa comercial CONTIN.

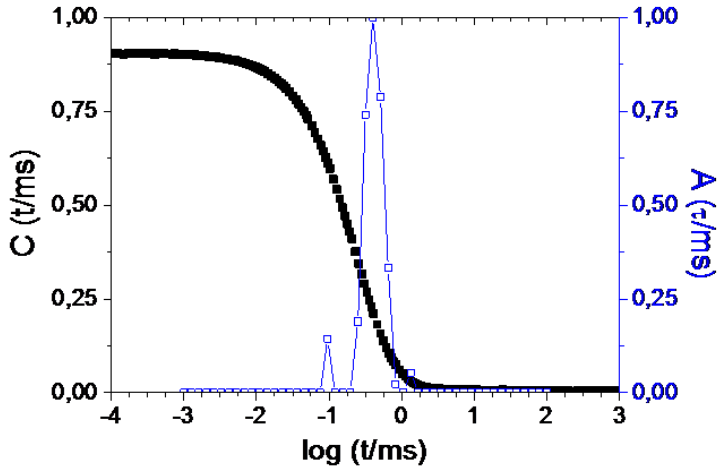


Figura 15. Função de correlação temporal típica adquirida no ângulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$ e a respectiva distribuição do tempo de relaxação $A(t)$, de uma solução aquosa de 3,0 mg/mL do Mal₇-"click"-AcMal₇ a 25 °C.

A Figura 16 mostra a variação típica da frequência angular $\Gamma = 1/\tau$ medida como uma função de q^2 indicando um comportamento difusivo do espalhamento das partículas para uma solução de 3,0 mg/mL do Mal₇-"click"-AcMal₇ em água Milli-Q.

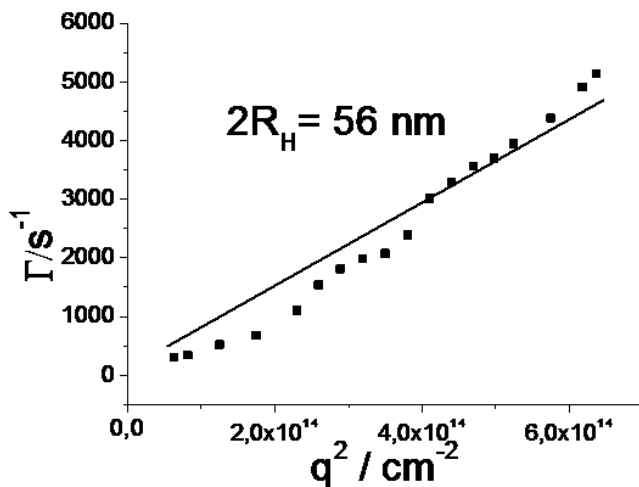
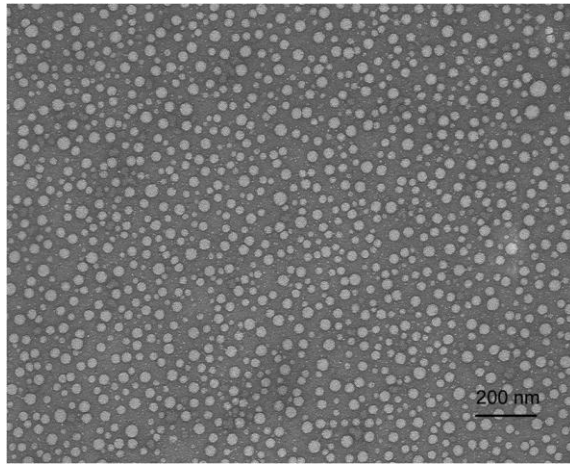


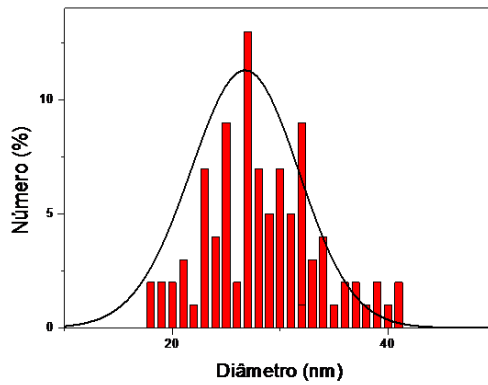
Figura 16. Variação típica da frequência angular $\Gamma = 1/\tau$ medida como uma função do vetor de onda q^2 .

Os resultados mostraram que a autoassociação do cooligômero em água forma micelas com um diâmetro de 56 nm. O pequeno desvio do fit linear da figura é devido à pequena polidispersidade no tamanho das micelas.

A imagem de TEM (Figura 17), mostra a autoassociação do Mal₇-"click"-AcMal₇ em nanoestruturas esféricas com tamanho médio das micelas de 27 ± 4 nm, apresentando uma baixa polidispersidade em água.



(A)



(B)

Figura 17. Imagem obtida por TEM da autoassociação do Mal₇-"click"-AcMal₇ em água, visualizada após coloração negativa juntamente com a distribuição de tamanho.

Os resultados vêm de encontro ao obtidos por espalhamento de luz, levando em conta a diferença de análise das duas técnicas. Para as

análises de microscopia foi necessário a secagem do solvente, para o espalhamento de luz as medidas foram feitas em solução. Assim o diâmetro das micelas obtido por TEM foi menor que o obtido por DLS.

6.4 Microscopia de Força Atômica

A figura 18 exibe a imagem de AFM obtidas para as partículas esféricas de Mal₇-"click"-AcMal₇ depositadas sobre a superfície de mica que se apresentaram relativamente uniforme em tamanho. Os resultados mostraram micelas de diâmetro de 30 - 35 nm, em bom acordo com os obtidos por TEM.

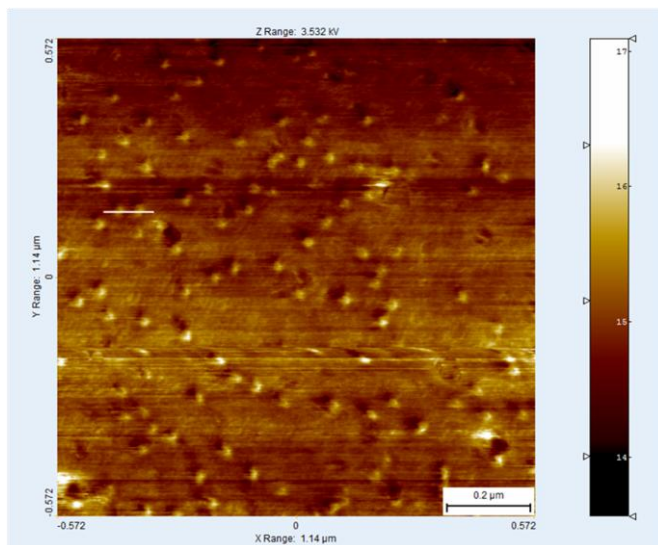


Figura 18. Imagem de AFM obtida para as micelas formadas por Mal₇-"click"-AcMal₇ no modo de fase AFM.

6.5 Ensaios de citotoxicidade de carregadores de fármacos

O cooligômero Mal₇-"click"-AcMal₇, inteiramente à base de açúcar, despertou grande interesse na formulação de compostos naturais com atividade citotóxica como a quercetina, curcumina e naringerina.

Antes da incorporação dos fármacos, o polímero foi avaliado em quatro diferentes linhagens celulares (K562, Jurkat, B16F10 e L929), com o objetivo de monitorar sua citotoxicidade

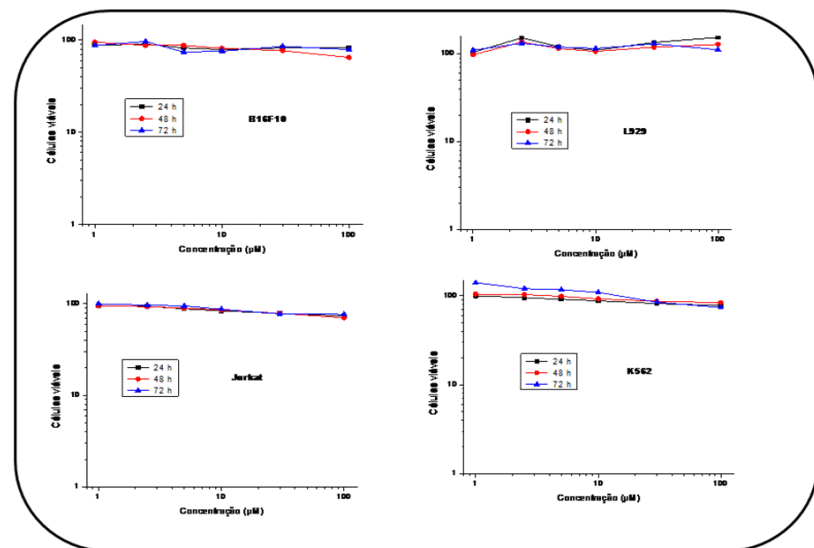


Figura 19. Citotoxicidade do cooligômero sobre diferentes células de tumorais (B16F10, L929, Jurkat e K562).

O cooligômero foi adicionado as diferentes células ($2,5 \times 10^4$ células/mL de B16F10 e de L929, $0,5 \times 10^5$ células/mL de Jurkat e $1,0 \times 10^5$ células/mL de K562 para incubação de 24 horas) em diferentes concentrações (0,1-100 µM) e incubadas por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica dos grupos controle foi considerada como 100% da viabilidade celular. A viabilidade celular foi avaliada no início do experimento o corante de exclusão Trypan Blue. Os resultados foram dados como a média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos independentes. Os grupos avaliados foram comparados com o grupo controle, utilizando ANOVA seguido de Bonferroni's t-test.

Como pode se observado na Figura 19, o cooligômero Mal₇-*"click"*-AcMal₇ não foi capaz de inibir significativamente o crescimento

celular para as diferentes células avaliadas. Sendo assim, pode-se concluir que este é um polímero promissor para a incorporação de fármacos com atividade antiproliferativa.

6.6 Hidrólise enzimática por glucomilase da corona de nanopartículas de Mal₇-“click”-AcMal₇.

A recuperação de maltoheptaose na superfície das nanoestruturas Mal₇-“click”-AcMal₇ oferece uma oportunidade para desestabilizar micelas visando como aplicação a liberação de fármacos bioestimulada. A Glicoamilase ou amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) catalisa a liberação de cadeias de glicose a partir da parte não redutora da cadeia de maltodextrinas como MAL₇. Assim, o monitoramento da degradação enzimática por glicoamilase de nanopartículas de Mal₇-“click”-AcMal₇ foram realizadas por espalhamento de luz estático e dinâmico e por dosagem de açúcares redutores. A variação na intensidade da luz espalhada e o raio hidrodinâmico das micelas, devido à adição de glicoamilase, são parâmetros importantes para analisar a sua hidrólise enzimática. A Figura 20 (A) mostra um aumento da intensidade da luz espalhada durante a hidrólise enzimática da corona e que se estabiliza a partir de 2 h de reação. Neste momento, foi observado um precipitado branco no meio reacional, provavelmente devido à insolubilidade do copolímero degradado. Na Figura 20 (B), o raio hidrodinâmico médio das micelas durante um intervalo de tempo revela a aparência de partículas cada vez maiores. E, certamente isso é devido a um recombinação das cadeias do cooligômero e da agregação das micelas durante a hidrólise da corona hidrofílica. A eliminação das unidades de glicose no final da estrutura da cadeia de maltoheptaose de DP7 conduz a unidades maltooligosacarídicas menores (DP <7), isso desfavorece alguns fatores importantes de estabilidade como repulsão estérica e a energia livre interfacial entre a água e o centro hidrofóbico até o fenômeno de precipitação.

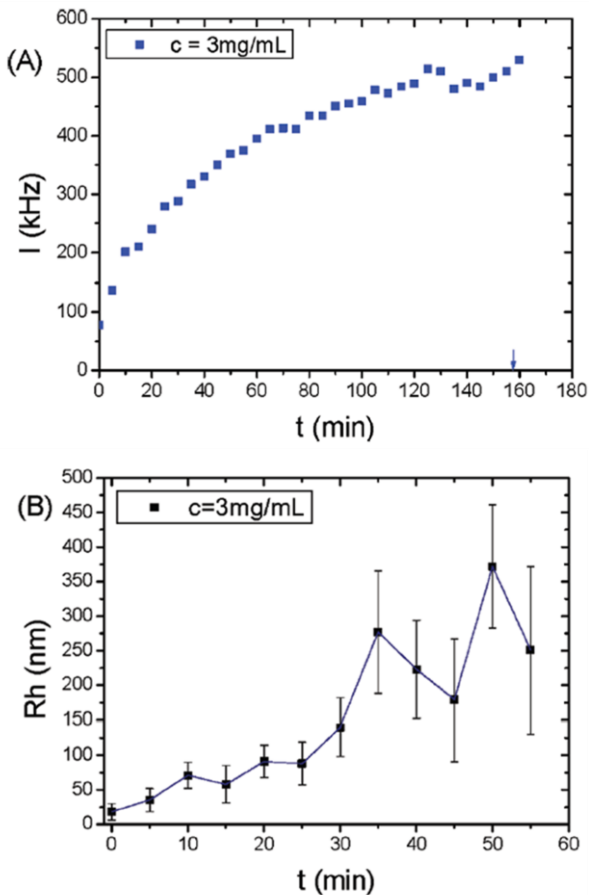


Figura 20. (A) Aumento da intensidade do espalhamento de luz durante a hidrólise enzimática da corona nas micelas de Mal₇-“click”-AcMal₇. (B) raio hidrodinâmico médio das micelas durante um intervalo de tempo.

Do mesmo modo, seguiu-se a hidrólise enzimática das micelas de Mal₇-“click”-AcMal₇ pelo método colorimétrico usando o ácido bicinonínico (BCA) que dosa os açúcares redutores, neste caso a glicose, durante a hidrólise. Este método tem sido amplamente utilizado em uma ampla gama de oligo-/poli-sacarídeos, como amido, ácido

poligalacturônico e quitina [50]. Este método apresenta uma boa precisão e reprodutibilidade, mesmo em baixa concentração de açúcar. A Figura 21 mostra inicialmente uma taxa constante de hidrólise até 30 min, nesse ponto, a velocidade de degradação diminui. Após 75 min, um aumento da atividade de hidrólise foi observado e, em 120 minutos a reação foi interrompida. Através deste estudo, sugere-se uma primeira fase em que a corona de Mal₇ é hidrolisada pela glicoamilase (t_0 a 30min) para dar pequenas estruturas de oligossacarídeos cada vez menos acessíveis (30 a 75 min). Numa segunda fase (75 min a 12 min), a reorganização das micelas permite um novo acesso da enzima nas cadeias de malto-oligossacarídeos, tendo como resultado, outra vez pequenas cadeias de oligossacarídeos (120 min) desestabilizando completamente a micela que precipitou.

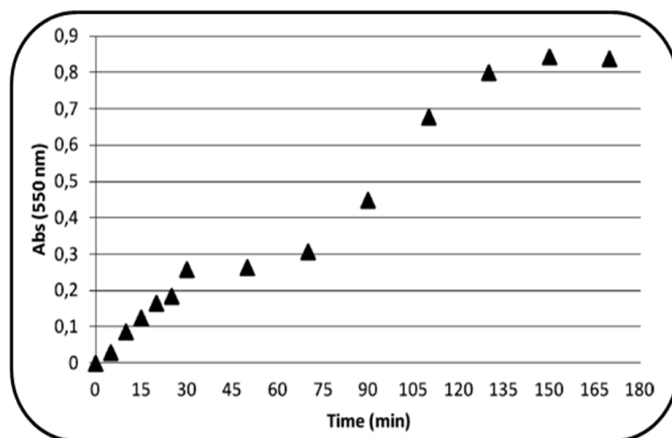


Figura 21. Variação da absorvância ao longo do tempo de uma solução de 3 mg/mL de micelas de Mal₇- "click"-AcMal₇ hidrolisadas pela glicoamilase. O experimento foi realizado em duplicata e os valores representam a média dos resultados.

Como foi visto, através do espalhamento de luz e da dosagem de glicose liberada, foi possível seguir a evolução da digestão enzimática da corona em Mal₇ das micelas de Mal₇-“click”-AcMal₇ e mostrar que a cadeia de Mal₇ foi largamente acessível as enzimas. Isso mostra o potencial que as nanopartículas bioestimuláveis de Mal₇-

“click”-AcMal₇ podem ser utilizadas transporte vetorizado de fármacos (medicamentos inteligentes).

6.7 Determinação da eficiência de encapsulação da curcumina

A curcumina é o pigmento principal da curcuma, também chamado de açafrão da Índia. Apresenta propriedades antibacterianas, antioxidante, antiinflamatória e antiviral. A figura 22 apresenta os resultados encontrados no estudo de encapsulação da curcumina pelo cooligômero Mal₇-“click”-AcMal₇.

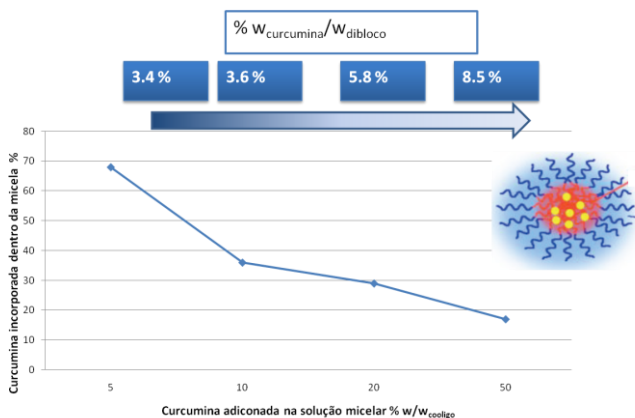


Figura 22. Determinação da eficiência de encapsulação da curcumina.

Os resultados relacionados a eficiência de encapsulação da curcumina são considerados preliminares, eles estão presentes nesse trabalho justamente para mostrar que as micelas formadas pelo cooligômero Mal₇-“click”-AcMal₇ podem encapsular um farmaco hidrofóbico, importante na liberação controlada de medicamentos. Neste caso, os resultados mostraram uma eficiência de encapsulação de 8,5%.

6.8 Estudo do efeito no tamanho das micelas pela adição de solução salina

A figura 23 mostra a diminuição do R_H devido a presença de NaCl e LiCl.

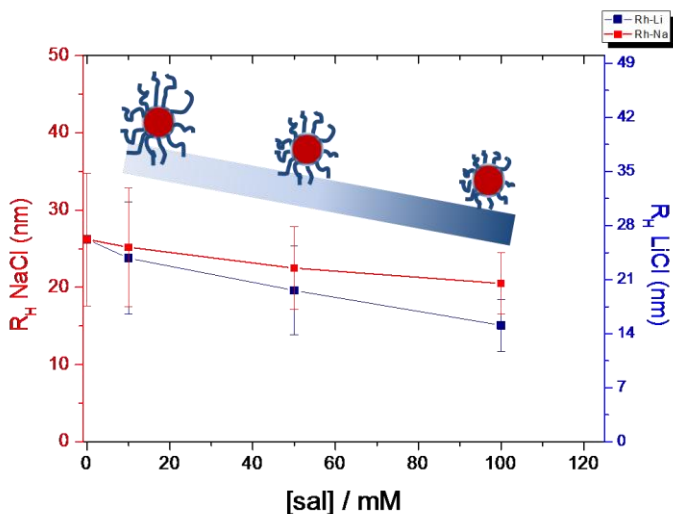


Figura 23. Efeito da adição de NaCl e LiCl em solução aquosa de concentração 3,0 mg/mL de Mal₇-“click”-AcMal₇.

A diminuição de R_H pode ser explicada pelo efeito de hidratação, os íons do sal, com alta solubilidade em água, competem com a macromolécula pelas moléculas de água, deste modo a camada de hidratação da macromolécula diminui. Este efeito é explicado pela série de Hofmeister. Os dois cátions (Na^+ e Li^+) apresentam uma mesma quantidade de carga, entretanto eles possuem uma diferença no grau de hidratação, essa diferença pode ser explicada pela diferença de tamanho dos cátions. O Li^+ possui um raio menor do que o Na^+ e a atração entre o cátion e os dipolos das moléculas de água aumenta à medida que o raio do cátion diminui, podendo ser explicado pelo aumento da interação eletrostática por causa da menor distância entre o cátion de raio menor e

os dipolos da molécula de água. Assim, comparando os dois cátions, o R_H apresentou menor valor na presença do íon Li^+ .

6.9 Estudo da morfologia pelo aumento da concentração do copolímero

Como foi relatado na introdução, alguns fatores termodinâmicos e cinéticos levam a formação de determinada morfologia na autoassociação de copolímeros anfifílicos em bloco. Assim, estudou-se a diferença da morfologia do coagigômero devido ao aumento da sua concentração em solução. Os resultados mostraram através de análises de MET, a mudança de morfologia de micelas (concentração 3,0 mg/mL) para uma morfologia *wormlike* (Figura 24).

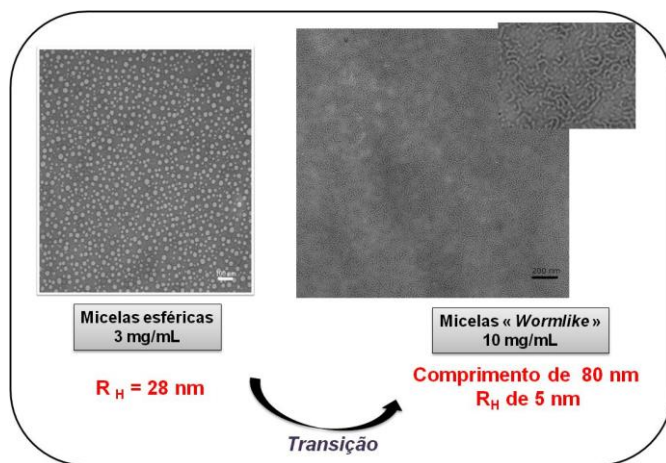


Figura 24. Mudança de morfologia de micelas (concentração 3,0 mg/mL) para uma morfologia *wormlike*.

CONCLUSÃO

Este trabalho relatou o estudo do primeiro copolímero anfifílico em bloco constituído exclusivamente de açúcar. A autoassociação do cooligômero Mal₇-"click"-AcMal₇ em solução (concentração 3,0 mg/mL) origina micelas esféricas de diâmetro médio de 30 nm. Quando a concentração é aumentada consegue-se outro tipo de morfologia, *wormlike*. Os resultados de espalhamento de luz e calorimetria mostraram que Mal₇ é sensível a degradação enzimática, isso é importante para a aplicação no transporte vetorizado de fármacos (medicamentos inteligentes). Além disso, utilizando a técnica de fluorescência foi possível demonstrar que os agregados formados pelo cooligômero podem encapsular um principio ativo hidrofóbico como a curcumina.

Graças à versatilidade dessa temática, é possível obter um grande conjunto de copolímeros anfifílico à base de oligossacarídeos, variando por exemplo, a natureza dos grupos de proteção, o tamanho dos blocos sacarídicos ou até mesmo a incorporação de carboidratos biologicamente relevantes. E essas modificações poderão ser importantes para inúmeras aplicações relacionadas em nanotecnologia.

Résumé en français

Introduction générale

Le domaine des nanotechnologies connaît un essor considérable depuis ces dernières années en raison de l'importance des matériaux nanostructurés dans l'industrie pharmaceutique, l'électronique, les biocapteurs ou encore la purification. Le contrôle de l'organisation tridimensionnelle des nano-objets peut se faire selon une approche bottom-up faisant intervenir la capacité d'auto-association des copolymères à blocs amphiphiles en solution ou sous forme de films minces. Les propriétés d'auto-assemblage des copolymères à blocs amphiphiles sont intrinsèquement liées à leur architecture et à leur composition. En solution, les micelles auto-assemblées trouvent une application importante dans le domaine pharmaceutique et plus particulièrement pour la vectorisation de principes actifs. En effet, de part leur taille et la nature hydrophobe du cœur des micelles, ces nano-objets sont capables d'encapsuler, de transporter et de libérer certaines molécules insolubles dans les milieux aqueux. Pour cette application, il est primordial que les nanovecteurs soient biocompatibles, biodégradables et présentent des tailles entre 10 et 100 nm (idéales pour le passage transmembranaire). L'emploi de polymères biosourcés comme les oligo-/poly-saccharides recouvrant la surface des micelles constitue un système attractif de part leur abondance naturelle, leur biocompatibilité, biodégradabilité et leurs propriétés physico-chimiques et biologiques.

Dans la littérature, on retrouve de nombreux exemples de copolymères à blocs issus de polymères de synthèse, quelques exemples de copolymères « hybrides » amphiphiles associant des polymères synthétiques à des polymères naturels (protéine, ADN, ou un saccharide) et de rares exemples de copolymères à blocs amphiphiles totalement naturels et aucun avec uniquement des oligo-/poly-saccharides.

Le travail de cette thèse est consacré au développement et à l'étude physico-chimique du premier dibloc linéaire amphiphile constitué exclusivement de blocs saccharidiques. Comme preuve de concept, nous avons étudié un dibloc à base de maltoheptaose (MAL₇).

Le bloc hydrophile est apporté par le MAL₇ tandis que le bloc hydrophobe est constitué du MAL₇ peracétylés (MAL₇Ac).

Des études de caractérisations structurales sur le copolymère MAL₇-*b*-MAL₇Ac, ont été réalisées en utilisant des techniques comme la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse et la spectroscopie infrarouge (FT-IR). Une analyse de la nanostructuration de MAL₇-*b*-MAL₇Ac a été réalisée par diffusion dynamique de la lumière (DLS), par microscopie à force atomique (AFM) et par microscopie électronique en transmission (MET). Des tests d'encapsulation, de cytotoxicité, et de susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique ont également fait partie de notre étude.

CHAPITRE 1

1. OBJECTIFS

1.1 Objectif Général

Ce travail a pour objectif de synthétiser d'étudier les propriétés physico-chimiques d'auto-assemblage du premier cooligomère à bloc linéaire amphiphile constitué exclusivement de blocs saccharidiques.

1.2 Objectifs Spécifiques

- Synthétiser un cooligomère amphiphile constitué du maltoheptaose libre comme bloc hydrophile (Mal₇) « clické » a son dérivé peracétylés comme bloc hydrophobe (Mal₇Ac).
- Caractériser la structure moléculaire du cooligomère amphiphile MAL₇-*b*-MAL₇Ac par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), par spectroscopie infrarouge (FT-IR) et par la spectrométrie de masse basse résolution (MALDI-TOF-MS et ESI-MS) et haute résolution (ESI-HRMS).
- Déterminer la concentration micellaire critique du cooligomère dans l'eau par spectroscopie de fluorescence du pyrène.
- Préparer et analyser la morphologie des nanoparticules de MAL₇-*b*-MAL₇Ac par les techniques de diffusion dynamique de la lumière (DLS), diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), par microscopie à force atomique (AFM) et par microscopie électronique en transmission (MET).
- Effectuer des tests de cytotoxicité, d'études d'encapsulation, et d'hydrolyse enzymatique de la couronne oligosaccharidique.

CHAPITRE 2

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Nanotechnologie

La nanotechnologie est la science qui étudie la production, la caractérisation et l'application de matériaux aux dimensions à l'échelle nanométrique. Actuellement, la nanotechnologie est un axe majeur de recherche avec de forts investissements de la part des agences et d'organismes de développement privé comme public. Dans le monde pharmaceutique, les nanotechnologies se concentrent principalement sur le développement et la préparation de nanovecteurs biocompatibles pour la libération contrôlée de médicaments.

Il existe différentes méthodes d'obtention des nanoparticules qui peuvent être sous forme de colloïdes, de polymères, de copolymères, d'agents tensioactifs, de cristaux liquides, etc. Les nanoparticules sont importantes parce qu'ils présentent des propriétés mécaniques, optiques ou chimiques améliorées et utiles pour la pharmacie, la microélectronique, la catalyse et le contrôle de l'environnement. En nanomédecine, la production de nano-objets capables de vectoriser des médicaments et/ou des agents d'imagerie jusqu'aux zones biologiques ciblées est très recherchée. On s'appuie ici sur leur petite taille qui leur permettent de traverser les membranes et ainsi de vectoriser des molécules hydrophobes encapsulées dans les milieux biologiques (aqueux) [2] mais aussi sur l'écran moléculaire de protection qui permet de limiter la toxicité intrinsèque des médicaments.

2.2 Copolymères à blocs amphiphiles

Un copolymère est un polymère issu de la copolymérisation d'au moins deux types de monomère, chimiquement différents, appelés comonomères. Les copolymères à blocs sont formés par une séquence de monomères liés de façon covalente à une autre séquence de monomères et sont classées en groupes en fonction de l'agencement de ses blocs.

Un copolymère « amphiphile » désigne une macromolécule constituée d'une partie hydrophile liée de manière covalente à une partie hydrophobe. Les propriétés d'auto-association des copolymères à blocs amphiphiles sont intrinsèquement liées à leur architecture et à leur composition. Placés dans un solvant sélectif, la solvation préférentielle de l'un des deux blocs entraîne l'auto-association du copolymère, conduisant à des structures de taille nanométrique et de morphologies variées couramment appelés « micelles » [4, 5] (Figure 1).

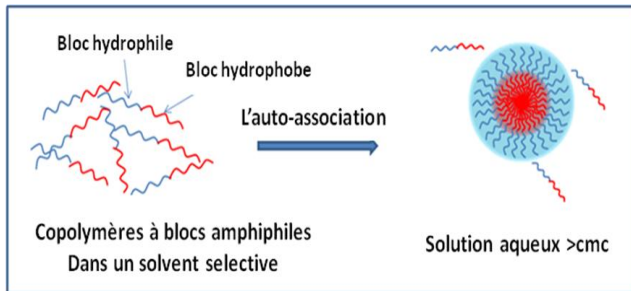


Figure 1. Schéma d'auto-association de Copolymères à blocs amphiphiles en micelles.

2.2.1 Micellisation

En milieu aqueux, à concentrations diluées, les copolymères se retrouvent sous forme d'unimères isolées. Quand la concentration augmente, les interfaces du système commencent à devenir saturées et les molécules de copolymères sont orientées de telle sorte que la partie hydrophobe est dirigée vers l'intérieur de la micelle (cœur) tandis que leur partie hydrophile est orientée vers la phase aqueuse (couronne). À une concentration spécifique, appelée la concentration micellaire critique (cmc), les amphiphiles s'auto-assemblent en structures appelées micelles. Cette association de copolymères à blocs amphiphiles s'explique en grande partie par l'interaction relative entre sa partie hydrophobe et la partie hydrophile afin d'atteindre un état d'énergie minimale [6].

Les paramètres comme la longueur des blocs hydrophiles et hydrophobes, la nature chimique et la méthodes de préparation des nanoparticules ont un fort impact sur l'auto-association de copolymères à blocs amphiphiles engendrant ainsi des agrégats de différentes morphologies telles que des sphères, des cylindres, des disques et des couches planes en solution [6-8] ou des vésicules [9] ou encore des films minces nanoorganisés [10].

2.3 Copolymères à blocs amphiphiles pour la libération contrôlée des médicaments

Les propriétés fonctionnelles des agrégats formés à partir de copolymères à blocs amphiphiles permettent de proposer l'encapsulation et la libération contrôlée des médicaments hydrophobes [7].

Pour être utilisé comme une matrice de délivrance de médicaments, le copolymère doit associer différents critères importants comme: biocompatible; biodégradable; d'une taille comprise entre 10 et 100 nm laquelle est appropriée pour une administration intraveineuse [18, 19] ; cytotoxicité faible [21].

Il existe plusieurs méthodes pour la « solubilisation » de médicaments hydrophobes dans les micelles de copolymères. Les méthodes les plus courantes comprennent la dissolution directe, la dialyse, les émulsions, l'évaporation du solvant. Selon la méthode, l'encapsulation du médicament peut survenir pendant ou après micellisation. Par ailleurs, la façon dont le médicament est encapsulé varie d'un système à l'autre, en fonction de la méthode et l'objectif final de la recherche.

Ainsi, de nombreux matériaux polymères ont été rapportés, comme le acide poly-L-lactique [22], le polyéthylène glycol [17] et le poly (oxyde d'éthylène) [23], ces polymères ont été utilisés comme matériaux biodégradables et sont connus pour être biocompatible. Il existe aussi des copolymères formés par poly (ϵ -caprolactone) [24], des polypeptides [25], des protéines [26] et plus rarement par des polysaccharides.

2.4 Copolymères à blocs amphiphiles à base de polysaccharides.

Les oligosaccharides et les polysaccharides sont des éléments importants dans des systèmes biologiques, car ils ont pour fonction de stocker de l'énergie et de la formation de la matrice extracellulaire. En raison de leur biocompatibilité et de leur biodégradabilité, les copolymères à blocs amphiphiles à base de polysaccharides trouvent un intérêt certain pour diverses applications comme dans l'industrie pharmaceutique, des détergents et des cosmétiques [15, 16].

L'auto-association des copolymères à blocs amphiphiles à base de polysaccharides a été rapportée dans la littérature pour différentes

applications. Par exemple, Zhang et al. ont décrit la synthèse et la caractérisation de copolymères à blocs constitués d'un bloc hydrophile à base de maltoheptaose ou de dextrane et d'un bloc hydrophobe à base de poly (caprolactone) [51].

Houga et al. ont étudié l'auto-association des copolymères à blocs formé par le dextrane-*b*-polystyrène dans différents solvants [12]. Au CERMAV, Otsuka et al. ont rapporté leurs études sur un copolymère thermosensible à base de maltoheptaose-*b*-poly(*N*-isopropylacrylamide) [13].

Différentes approches ont été développés pour l'obtention de copolymères à bloc linéaire à base de sucres qu'on peut résumer en une approche de type « grafting from » (Polymérisation à partir d'un macromonère) et une approche de type « grafting onto » (Couplage des blocs pré-contruits). Le dernier cas est l'approche que nous avons privilégié dans le cadre de notre étude en raison de l'impossibilité de polymériser de façon contrôler un oligo-/poly-saccharide. Toutefois, l'inconvénient réside dans la forte incompatibilité des blocs hydrophobe/hydrophile qui rend le couplage difficile dans les solvants usuels. Pour palier à ce problème, nous avons décidé de réaliser le couplage des blocs sucres par une chimie « click ».

2.5 « Chimie click »

La "chimie click" a été introduit en 2001 par K. Barry Sharpless [27] qui décrit une méthode douce pour faire réagir de façon chimio-sélective une fonction azoture et une fonction alcyne terminale par la catalyse au Cuivre (I). On peut également la noter comme la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen. Aujourd'hui différents types de réactions sont classées comme "chimie click", à partir du moment où la réaction est chimio-sélective, fonctionne avec une large gamme de solvants et génère peu ou pas de produits secondaires.

La réaction «chimie click» s'est étendu à de nombreux domaines de la science et notamment à la découverte et aux développement de nouveaux médicaments et aussi pour améliorer la pharmacologie et la pharmacocinétique [33]. Dans la science des matériaux, la réaction «chimie click» a été largement utilisé pour l'obtention de divers matériaux aux architecture contrôlées et parfois complexes ou encore pour la bioconjugaison [34].

CHAPITRE 3

METHODES ANALYTIQUES

3.1 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de resonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ^1H ont été enregistrés sur un appareil Brüker Avance 400 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en parties par million (ppm).

3.2 Spectroscopie infrarouge (IR)

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés avec un spectromètre Perkin-Elmer RXI en mode FT-IR. Les absorptions reportées sont exprimées en nombre d'ondes (cm^{-1}).

3.3 Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF ont été ont été enregistrés avec un spectromètre Autoflex (Bruker Daltonics).

3.4 Spectroscopie de fluorescence

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un appareil F4500 Hitachi. Les mesures de fluorescence sont réalisées dans une cuve en quartz de 10 mm de largeur. Les spectres d'émission ont été enregistrés en fixant la longueur d'onde d'excitation à 339 nm. Les largeurs des fentes ont été fixées à 2,5 nm. Le rapport I_1/I_3 est estimé par le maximum d'intensité à 372,8 nm (I_1) et 384,0 nm (I_3). Une concentration finale en pyrène ($6,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) pour chaque échantillon est utilisé.

3.5 Diffusion de la lumière

Les mesures en diffusion de la lumière ont été réalisées sur un système ALV-5004 polarisé verticalement à une longueur d'onde fixe de 632,8 nm et à un bain thermostaté (25°C). Les fonctions d'auto

corrélations sont analysées en termes de distribution de temps de relaxation $A(t)$ en utilisant un software Contin. Les mesures sont effectuées sur une gamme d'angles allant de 40 à 140°. Avant d'être analysées, les solutions de copolymère sont filtrées sur des filtres hydrophiles de 0,45 mm (Millipore Millex PES).

3.6 Microscopie électronique à transmission

Tous les échantillons sont observés avec un appareil Philips CM200 avec un potentiel d'accélération de 18 kV. Une goutte de solution diluée de copolymère (4 μ L) est déposée sur une grille de cuivre couverte d'un film de carbone puis est séchée à l'air. L'échantillon est coloré négativement avec l'acétate d'uranyle.

L'analyse des images est réalisée par un CCD Kodak Megaplug et numérisées avec un logiciel.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Synthèse du cooligomère Mal₇-“click”-AcMal₇

La stratégie de synthèse générale utilisée pour la préparation du copolymère est représentée dans la figure ci-dessous :

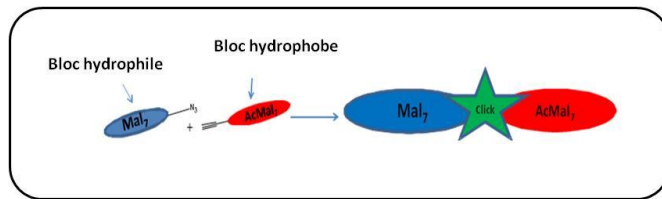


Figure 2. La stratégie de synthèse générale.

Le maltoheptaose (MAL₇) a été fonctionnalisée d'une part par une fonction alcyne terminal (AcMAL₇_alcyne) et d'autre part par une fonction azoture (Mal₇N₃). Ensuite, les deux fonctions sont "cliqués" par la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen pour obtenir le cooligomère (Mal₇-"click"-AcMal₇).

Le MAL₇ a été obtenu en grande quantité selon un procédé décrit dans la littérature, [45] mettant en jeu une acétylation de la β -cyclodextrine en présence d'un acide de Lewis, le FeCl₃.6H₂O, et de l'anhydride acétique pour donner majoritairement le MAL₇ percatétate (AcMAL₇). Après une purification par chromatographie liquide sur gel de silice, AcMAL₇ subit une désacétylation par action d'une solution 1M de MeONa dans le méthanol comme décrit dans la littérature. Le MAL₇ est fonctionnalisé en position réductrice par une fonction alcyne, selon un procédé développé au CERMAV, en utilisant la propargylamine comme réactif et comme solvant puis une peracétylation avec de l'anhydride acétique dans la pyridine fournit le AcMAL₇_alcyne.[13] Pour l'obtention du bloc Mal₇N₃, nous avons suivi un procédé développé par Shoda [46] et qui permet de fonctionnaliser directement la position anomère du MAL₇ grâce une activation sélective par le chlorure de 2-

chloro-1,3-diméthylimidazolium (DMC) en présence d'une base puis azidation en solution aqueuse. Étant donné les fortes proportions en sels et base, une étape de purification a été nécessaire. Cette observation fut également le cas pour les travaux récents de Vinson et al. [49] qui ont proposé une méthode de purification différente de la nôtre. Nous avons fait le choix de peracétyler le MAL₇N₃ afin d'éliminer par extraction et chromatographie sur gel de silice l'ensemble des contaminants. Puis une désacétylation dans les conditions précisées auparavant, nous a conduit au produit pur, le MAL₇N₃, avec un rendement général de 77%. Par la suite, le couplage des blocs a été réalisé par "chimie click" dans un milieu hydro-alcoolique (H₂O-tBuOH (1 :1, v/v)), qui permet une bonne solubilisation des deux blocs pour donner le cooligomère Mal₇-“click”-AcMal₇ avec un rendement de 64% (Schéma I).

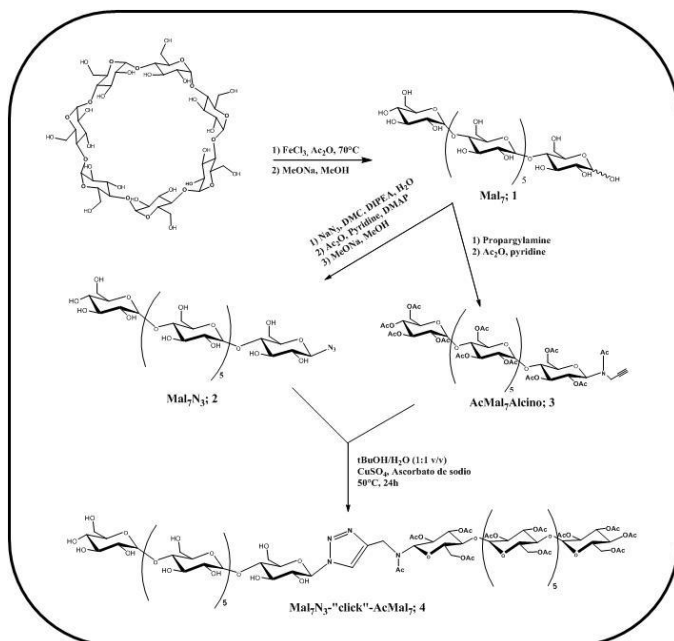


Schéma I. synthèse du cooligomère Mal₇-“click”-AcMal₇.

Une fois le cooligomère Mal₇-“click”-AcMal₇ à disposition, nous avons entrepris les études physico-chimiques dans l’eau et notamment ses propriétés d’auto-assemblage.

4.2 Etude de la cmc du coogolimère Mal₇-“click”-AcMal₇ par spectroscopie de fluorescence du pyrène

La cmc d’un système micellaire issu de copolymères à blocs amphiphiles peut être déterminée par spectroscopie de fluorescence. Cette méthode repose sur l’évolution de la fluorescence d’une sonde moléculaire libre ou liée de façon covalente aux copolymères. L’évolution de la fluorescence dépend de l’environnement de la sonde. En solution aqueuse, le pyrène est couramment utilisé comme sonde hydrophobe pour déterminer la cmc de systèmes micellaires parce que sa fluorescence est fortement dépendante de la polarité de son environnement. Ces caractéristiques permettent d’utiliser cette molécule comme sonde fluorescente afin de déterminer les cmc des micelles issues de copolymères à blocs amphiphiles.

Le spectre d’excitation du pyrène en solution aqueuse du copolymère Mal₇-“clic”-AcMal₇ à différentes concentrations est présenté sur la Figure 3.

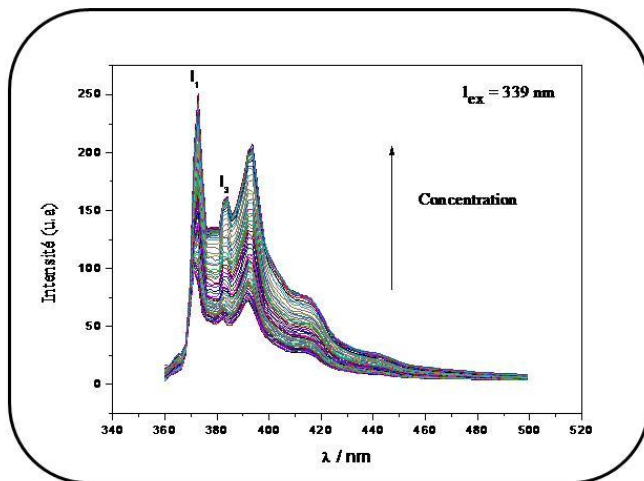


Figure 3. Evolution du spectre d'excitation du pyrène en fonction de la concentration en copolymère Mal₇-*"click"*-AcMal₇.

Lorsque l'environnement du pyrène change de polarité, le spectre d'émission est modifié, la bande vibrationnelle à 372,8 nm (I_1) à 384,0 nm (I_3) varie quand la concentration en copolymère augmente. Cette variation d'intensité met en évidence le transfert du pyrène d'un environnement polaire vers un environnement apolaire permettant de fournir des informations sur la localisation du pyrène dans le système étudié. L'évolution de la fluorescence du pyrène en fonction de la concentration peut donc être caractérisée par le rapport des intensités à 372,8 nm (I_1) à 384,0 nm (I_3) (Figure 4). Ce rapport des intensités (I_1/I_3) diminue avec la polarité du milieu dans lequel est dissous le pyrène.

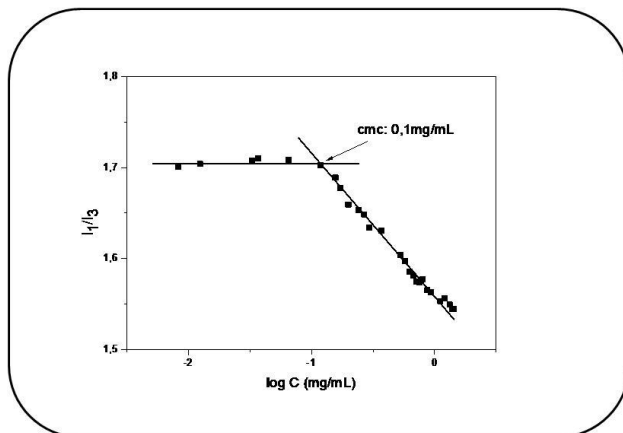


Figure 4. Evolution du rapport des intensités I_1/I_3 en fonction de la concentration en cooligomère Mal₇-"click"-AcMal₇ et détermination de la cmc du système à partir du spectre d'excitation du pyrène.

La valeur de cmc trouvé est de 0,1 mg/mL. Cette valeur de cmc est comparable à des tensioactifs non ioniques de faible poids moléculaire tels que dodecylmaltoside (0,097 mg / mL) et de l'éthylène glycol mono penta-n-dodécyl-éther (0,027 mg/mL). Pour des systèmes à libération contrôlée de médicaments, cette faible valeur de cmc est importante en raison de sa performance prometteuse et la stabilité *in vivo* des micelles, même après leur dilution dans le sang.

4.3 Détermination du du rayon hydrodynamique (R_H) par diffusion diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Les techniques de diffusion du rayonnement sont des méthodes d'analyse non destructives et particulièrement adaptées pour l'étude des solutions de copolymères à blocs et de leur processus d'agrégation. Elles permettent de déterminer les paramètres structuraux d'un système micellaire en solution tels que la masse molaire moyenne en poids (M_w), le nombre d'agrégation (N_{ag}), le rayon de giration (R_g) et les interactions entre les macromolécules et le solvant. Elles donnent aussi accès à des informations sur la dynamique des systèmes telles que le

coefficient de diffusion des particules (D_0) permettant de calculer le rayon hydrodynamique (R_H).

Pour notre étude le R_H des micelles du système étudié a été déterminé par diffusion dynamique de la lumière au travers de la relation de Stokes-Einstein décrite à dans la équation 1 :

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

équation 1

avec k_B la constante de Boltzmann, η_0 la viscosité du solvant, T la température et R_H le rayon hydrodynamique de la particule.

Les propriétés de l'auto-association du cooligomère Mal₇-"click"-AcMal₇, comme la taille et la morphologie a été étudiée par DLS pour mettre en évidence son comportement micellaire. Les nanoparticules ont été préparées par dissolution directe dans eau Milli-Q à une concentration supérieure à la cmc (3,0 mg/ml).

La figure 5 représente l'auto-corrélation $C(q, T)$ à 90° et sa distribution de temps de relaxation $A(t)$, comme l'a révélé par l'analyse du logiciel CONTIN.

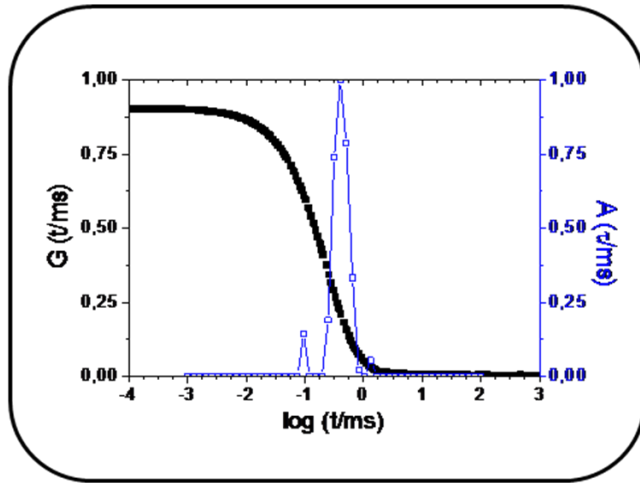


Figure 5. Fonction de corrélation dans l'angle de diffusion $\theta = 90^\circ$ et la répartition du temps de relaxation $A(t)$ d'une solution aqueuse de 3,0 mg / ml de Mal₇-"click"-AcMal₇ à 25°C.

La figure 6 représente la variation de la fréquence angulaire $\Gamma = 1/\tau$ en fonction du vecteur d'onde q^2 et indique un comportement diffusif des particules diffusantes dans une solution aqueuse de 3,0 mg/mL de Mal₇-"click"-AcMal₇.

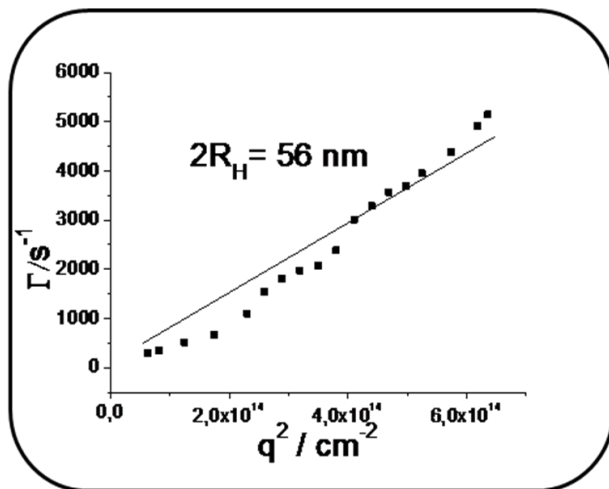


Figure 6. Variation typique de la fréquence angulaire $\Gamma = 1/\tau$ en fonction du vecteur d'onde q^2

Les résultats ont montré que l'auto-association de Mal₇-"click"-AcMal₇ dans l'eau forme des micelles avec un diamètre hydrodynamique de 56 nm

4.4 Caractérisation des solutions micellaires par microscopie électronique à transmission.

La morphologie et la taille des micelles issues de l'auto-association du copolymère Mal₇-"click"-AcMal₇ a été étudié par microscopie électronique à transmission (TEM). La préparation des échantillons pour les clichés TEM consiste à déposer une goutte de solution aqueuse sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de carbone, puis à la laisser sécher à l'air. Le cliché TEM obtenu après coloration négative par l'acétate d'uranyle permet d'observer les micelles de copolymères qui apparaissent en blanc sur un fond noir (Figure 7). Le cliché montre des objets sphériques de taille nanométrique avec une polydispersité en taille relativement étroite.

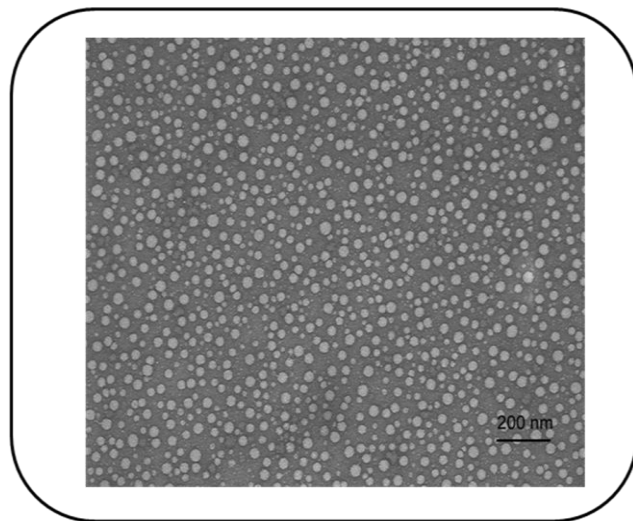


Figure 7 : Cliché TEM en coloration négative de micelles du cooligomère Mal₇-"clic"-AcMal₇.

La taille des micelles a été déterminée après analyse des clichés TEM. La Figure 8 représente les distributions en taille des micelles obtenues à partir du co-oligomère Mal₇-"click"-AcMal₇, établie après un comptage de plus de 200 micelles observées sur le cliché TEM.

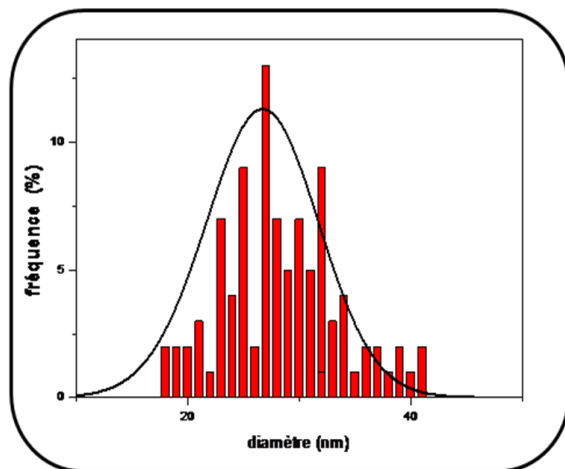


Figure 8 : Distribution en taille des micelles du co-oligomère Mal₇-
"click"-AcMal₇ déterminée à partir de l'analyse du cliché TEM.

Le diamètre moyen déduit de l'histogramme est de 27 ± 4 nm avec une faible polydispersité. Ce résultat est comparable à celle trouvée par diffusion de lumière en prenant en compte la différence de méthodologie dans les deux techniques, TEM vs. DLS.

4.5 Etudes de cytotoxicité

4.5.1 La culture cellulaire

Pour les études de cytotoxicité, la lignée cellulaire de mélanome murin (B16F10) a été choisie. Les cellules sont maintenues dans des bouteilles en plastique contenant du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 10 mM de tampon HEPES à pH 7,2. Les cellules sont maintenues dans un four humide à 37°C contenant 5% de CO₂. Pour les expériences, le nombre de cellules viables sont évaluées par la méthode de la coloration au bleu de trypan (0,5%). Un nombre variable de cellules viables est plaqué dans des boîtes de culture pour faire ensuite un traitement avec le co-oligomère Mal₇-
"click"-AcMal₇.

4.5.2 Evaluation de la cytotoxicité *in vitro*

Pour vérifier l'effet cytotoxique du Mal₇-*"click"*-AcMal₇, la méthode MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) est privilégiée. Les cellules du mélanome sont traitées avec des concentrations croissantes (1 à 100 µM) du Mal₇-*"click"*-AcMal₇ et incubées pendant 24 h, 48 h et 72 h en four humide à 37 ° C et contenant 5% de CO₂. À la fin de chaque expérience, les plaques sont centrifugées, le surnageant est éliminé et on rajoute du milieu de culture frais contenant 10% (v/v) de la solution de MTT (5 mg/ mL du PBS). Après 2 heures d'incubation à 37 ° C, les plaques sont centrifugées à nouveau et le surnageant éliminé. Les précipités formés dans chaque puits sont dissous dans une solution d'isopropanol contenant de l'acide chlorhydrique (isopropanol / HCl 0,04 N) et ensuite une mesure d'absorbance en spectrophotométrie UV-Vis à 540 nm de longueur d'onde est prise. La densité optique du groupe de contrôle (cellules non traitées) est prise comme référence et qui correspond à 100% des cellules viables.

4.5.3 Les tests de cytotoxicité du co-oligomère Mal₇-*"click"*-AcMal₇

En raison des applications visées de notre co-oligomère à bloc entièrement à base de sucres et notamment pour la vectorisation contrôlée de médicaments, le paramètre de cytotoxicité est un élément majeur.

Pour rappel, le choix de la nature du système de libération de médicaments dépend de plusieurs facteurs qui sont en corrélation avec la nature chimique du principe actif et aussi des autres excipients rentrant dans la formulation. En outre, le mécanisme de libération de médicaments choisi rentre en ligne de compte avec ce choix [36]. Ainsi le développement de plateformes modulaires et multifonctionnelles dont les propriétés physico-chimiques et chimiques peuvent varier à façon est largement requis. De la sorte, des vecteurs moléculaires devraient être capables de libérer une grande variété d'agents actifs de façon spatio-contrôlés [36, 38, 39].

Les copolymères à bloc sont capables de répondre à l'ensemble des conditions requises pour être considérées comme des vecteurs idéaux. Notre travail apporte une nouvelle brique pour le développement de ces systèmes qui peuvent être envisagés pour la formulation de médicaments. Le co-oligomère Mal₇-"click"-AcMal₇ a été étudié pour ses capacités à encapsuler des composés naturels ayant une activité cytotoxique comme la quercétine, la curcumine et naringenin, etc... Avant l'incorporation du médicament, le polymère a été évalué dans quatre lignées cellulaires différentes (K562, Jurkat, B16F10 et L929), afin de surveiller leur cytotoxicité.

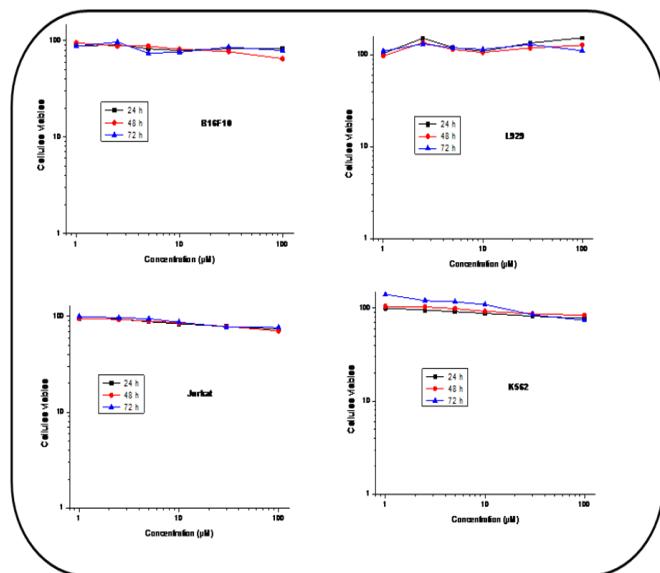


Figure 9. La cytotoxicité du co-oligomère sur différentes cellules tumorales (B16F10, L929, Jurkat et K562).

Le co-oligomère a été ajouté sur différentes cellules ($2,5 \times 10^4$ cellules/mL de B16F10 et L929 ; $0,5 \times 10^5$ cellules/mL de Jurkat et $1,0 \times 10^5$ cellules/mL de K562 à 24 heures d'incubation) à des concentrations variées (0,1 à 100 μM) et incubé pendant 24, 48 et 72 heures. La viabilité cellulaire a été évaluée par la méthode MTT. La

densité optique du groupe de contrôle a été considérée comme 100% de la viabilité cellulaire. La viabilité cellulaire a été évaluée au début de l'expérience. Les résultats sont une moyenne pondérée d'au moins 3 expériences indépendantes. Les groupes d'échantillons ont été comparés au groupe témoin, en utilisant ANOVA suivi par Bonferroni t-test.

Comme on peut le voir à la figure 9, le co-oligomère Mal₇ "click"-AcMal₇ n'était pas capable d'inhiber de manière significative la croissance des cellules pour les différentes cellules évaluées. Ainsi, on peut conclure qu'il s'agit d'un polymère prometteur pour l'incorporation de médicaments ayant une activité anti-proliférative.

4.6 Détermination de l'efficacité d'encapsulation de la curcumine.

La curcumine est le pigment principal du curcuma, aussi appelé safran des Indes, et présente des propriétés antibactériennes, antioxydantes, anti-inflammatoires et antivirales.

La concentration du médicament dans le micelles a été déterminée en utilisant la méthode décrit dans la littérature [44]. Pour cette expérience, un aliquot d'une solution de micelles du co-oligomère est dissous dans le THF pour induire la dissociation des micelles et la mesure de la quantité de curcumine dans la solution. L'intensité de fluorescence a été mesurée à 397 nm après addition d'aliquotes (20, 30, 40, 50, 60, et 70µL) d'une solution de 10 µg/µL curcumine. Les données d'intensité de fluorescence générés sont reportés sur un tracé linéaire obtenu à partir d'échantillons étalons en curcumine de concentrations connues. Ainsi la quantité de curcumine dans la solution du co-oligomère Mal₇-"click"-AcMal₇ initiale a été déterminée.

La figure 10 montre les résultats trouvés dans l'étude en encapsulant la curcumine par co-oligomère Mal₇-"click"-AcMal₇.

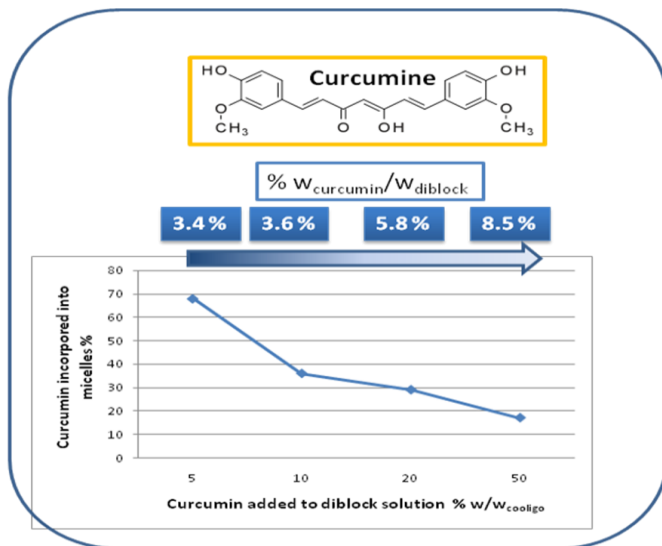


Figure 10. Détermination de l'efficacité d'encapsulation de la curcumine

Les résultats concernant l'efficacité d'encapsulation des préliminaires de la curcumine. Les résultats montrent que les micelles formées par co-oligomère Mal₇-"click"-AcMal₇ peuvent encapsuler un médicament hydrophobe comme la curcumine. Dans ce cas, les résultats ont montré une efficacité d'encapsulation de 8, 5%.

4.7 Hydrolyse enzymatique par la glucoamylase de la couronne de Mal₇-“click”-AcMal₇ nanoparticules.

Le recouvrement de maltoheptaose, un dérivé d'amidon, à la surface des nanostructures de Mal₇-“click”-AcMal₇ offre une opportunité de déstabiliser les micelles et d'envisager une libération de médicaments bio-stimulé. La glucoamylase ou amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) catalyse la libération du glucose à partir des bouts de chaîne de la partie non réductrice d'amidon et maltodextrines tels que le MAL₇. Ainsi, les suivi de dégradation enzymatique par la glucoamylase de nanoparticules auto-assemblées de Mal₇-“click”-AcMal₇ furent entreprises par diffusion statique et dynamique de la lumière et par

dosage des sucres réducteurs. La variation d'intensité de la lumière diffuse et du rayon hydrodynamique des micelles suite à l'ajout de la glucoamylase sont des paramètres importants pour suivre l'hydrolyse enzymatique. La figure 11 (A) montre une augmentation d'intensité de la lumière diffuse au cours de l'hydrolyse enzymatique de la couronne et se stabilise à partir de 2h de réaction. A ce temps, on observe un précipité blanc dans le milieu aqueux réactionnel certainement dû à une insolubilité du copolymère dégradé. Dans la figure 11 (B), le rayon hydrodynamique moyen des micelles au cours du temps révèle l'apparition de particules de plus en plus grosse certainement lié à une recombinaison des chaînes de co-oligomères et de l'agrégation des micelles au cours de l'hydrolyse de la couronne hydrophile. L'élimination d'unités glucose en bout de chaîne de maltoheptaose de DP7 et constituant la couronne de la micelle conduit à des unités maltooligosaccharidiques de plus en plus petites ($DP < 7$), ce qui défavorise des facteurs importants de stabilité comme la répulsion stérique et l'énergie libre inter-faciale entre l'eau et le cœur hydrophobe jusqu'au phénomène de précipitation.

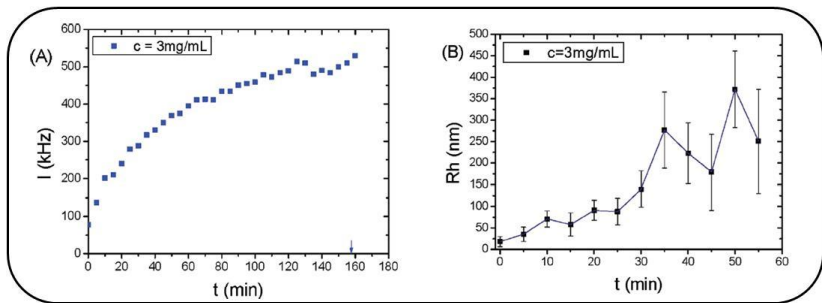


Figure 11. (A) La augmentation d'intensité de la lumière diffuse au cours de l'hydrolyse enzymatique de la couronne. (B) le rayon hydrodynamique moyen des micelles au cours du temps.

De la même manière, nous avons suivi l'hydrolyse enzymatique des micelles de Mal_7 -“click”- AcMal_7 par une méthode colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique qui dose les sucres réducteurs, ici le glucose, libérés lors de l'hydrolyse. Cette méthode a été largement utilisée sur une large gamme d'oligo-/poly-saccharides comme l'amidon,

l'acide polygalacturonique et la chitine et s'est révélée fidèle en reproductibilité et en précision de dosage même avec de faibles concentration en sucre [50]. La figure 12 montre au départ un taux d'hydrolyse constant jusqu'à 30 min, temps auquel la vitesse de dégradation décroît. Après 75 min, un regain d'activité d'hydrolyse est observé puis à 120 min la réaction semble stoppée. Au travers de cette étude, nous suggérons une 1^{ère} phase où la couronne de Mal₇ est hydrolysée par la glucoamylase (t_0 à 30min) pour donner des petits oligosaccharides de moins en moins accessibles (30 à 75 min). Dans une 2^{ème} phase (75 min à 12 min), la réorganisation des micelles a permis un nouvel accès de l'enzyme aux maltooligosaccharides pour donner encore des oligosaccharides de plus petites tailles (120 min) déstabilisant complètement la micelle qui a précipité.

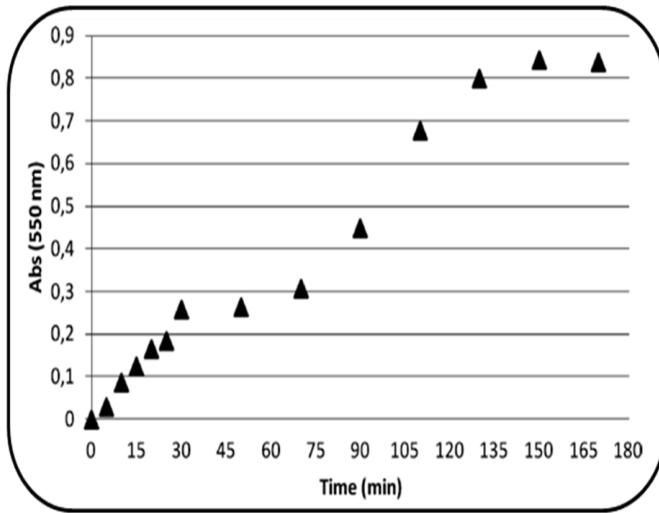


Figure 12. Variation de l'absorbance au cours du temps par 3 mg/mL de micelles de Mal₇-“click”-AcMal₇ sont hydrolysés par la glucoamylase. L'expérience a été réalisée en double et les valeurs représentent la moyenne.

Finalement, au travers de la diffusion de lumière et du dosage du glucose libéré, nous avons été capable de suivre l'évolution de la

digestion enzymatique de la couronne en Mal₇ des micelles de Mal₇-“click”-AcMal₇ et montré que le Mal₇ était largement accessible aux enzymes de dégradation qui rend possible l'utilisation de ces potentiels nanoparticules bio-stimulables comme outils de vectorisation intelligents de médicaments.

CONCLUSION

Le travail de cette thèse a présenté le développement et à l'étude physico-chimique du premier dibloc linéaire amphiphile constitué exclusivement de blocs saccharidiques, le co-oligomère Mal₇-“click”-AcMal₇. L'auto-assemblage en solution du Mal₇-“click”-AcMal₇ (concentration 3,0 mg / ml) permet d'obtenir des micelles sphériques d'un diamètre moyen de 30 nm. Les résultats de diffusion de la lumière et méthode colorimétrique ont montré que Mal₇ était largement accessible aux enzymes de dégradation qui rend possible l'utilisation de ces potentiels nanoparticules bio-stimulables comme outils de vectorisation intelligents de médicaments. En outre, en utilisant la technique de fluorescence a été démontré que les agrégats formés par cooligomère peut encapsuler un principe actif hydrophobe, comme la curcumine.

En raison de la polyvalence de ce thème, il est possible d'obtenir un grand nombre de copolymères amphiphiles à base d'oligosaccharides, allant par exemple, la nature des groupes protecteurs, le taille de bloc saccharide ou même l'incorporation de hydrates de carbone biologiquement pertinents. Ces modifications peuvent être importantes pour la suite de nombreuses applications dans la nanotechnologie.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira, H.S. and M.d.C. Rangel, *Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise*. Química Nova, 2009. **32**: p. 1860-1870.
2. Hamley, I.W., *Nanotechnology with Soft Materials*. Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(15): p. 1692-1712.
3. Kumar, N., M.N.V. Ravikumar, and A.J. Domb, *Biodegradable block copolymers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **53**(1): p. 23-44.
4. Lindman, B. and P. Alexandridis, *Amphiphilic molecules: Small and large*, in *Amphiphilic Block Copolymers*, A. Paschalis and L. Björn, Editors. 2000, Elsevier Science B.V.: Amsterdam. p. 1-12.
5. Linse, P., *Modelling of the self-assembly of block copolymers in selective solvent*, in *Amphiphilic Block Copolymers*, A. Paschalis and L. Björn, Editors. 2000, Elsevier Science B.V.: Amsterdam. p. 13-40.
6. Letchford, K. and H. Burt, *A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007. **65**(3): p. 259-269.
7. Miyata, K., R.J. Christie, and K. Kataoka, *Polymeric micelles for nano-scale drug delivery*. Reactive and Functional Polymers, 2011. **71**(3): p. 227-234.
8. Malam, Y., M. Loizidou, and A.M. Seifalian, *Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer*. Trends in Pharmacological Sciences, 2009. **30**(11): p. 592-599.

9. Chen, Q., et al., *Patterns of surface immobilized block copolymer vesicle nanoreactors*. *European Polymer Journal*, 2011. **47**(2): p. 130-138.
10. Chao, C.-C., et al., *Robust Block Copolymer Mask for Nanopatterning Polymer Films*. *ACS Nano*, 2010. **4**(4): p. 2088-2094.
11. Li, B.-G. and L.-M. Zhang, *Synthesis and characterization of novel amphiphilic block copolymers based on maltoheptaose and poly(ϵ -caprolactone)*. *Carbohydrate Polymers*, 2008. **74**(3): p. 390-395.
12. Houga, C.m., et al., *Micelles and Polymersomes Obtained by Self-Assembly of Dextran and Polystyrene Based Block Copolymers*. *Biomacromolecules*, 2008. **10**(1): p. 32-40.
13. Otsuka, I., et al., *Thermoresponsive Vesicular Morphologies Obtained by Self-Assemblies of Hybrid Oligosaccharide-block-poly(*N*-isopropylacrylamide) Copolymer Systems*. *Langmuir*, 2009. **26**(4): p. 2325-2332.
14. Bosker, W.T.E., et al., *Synthesis and Interfacial Behavior of Polystyrene–Polysaccharide Diblock Copolymers*. *Macromolecules*, 2003. **36**(6): p. 1982-1987.
15. Upadhyay, K.K., et al., *Biomimetic Doxorubicin Loaded Polymersomes from Hyaluronan-block-Poly(γ -benzyl glutamate) Copolymers*. *Biomacromolecules*, 2009. **10**(10): p. 2802-2808.
16. Bhadra, D., et al., *Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005. **295**(1–2): p. 221-233.
17. Thambi, T., et al., *Bioreducible Block Copolymers Based on Poly(Ethylene Glycol) and Poly(γ -Benzyl L-Glutamate) for Intracellular Delivery of Camptothecin*. *Bioconjugate Chemistry*, 2011. **22**(10): p. 1924-1931.
18. Yang, L., et al., *Aggregation behavior of self-assembling polylactide/poly(ethylene glycol) micelles for sustained drug*

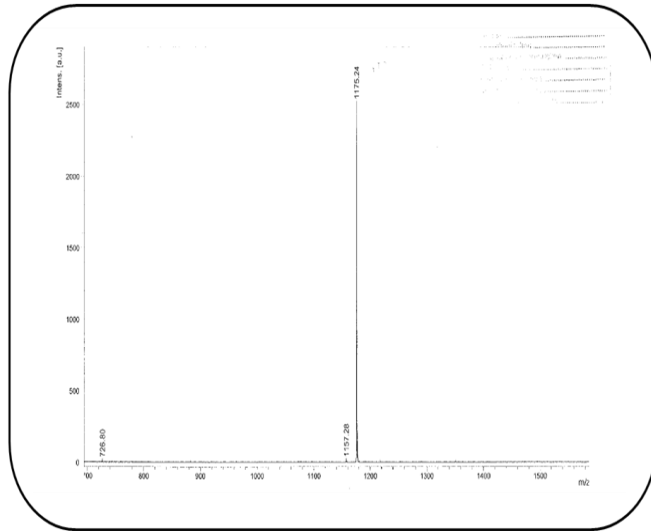
- delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **394**(1–2): p. 43-49.
19. Gaumet, M., et al., *Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **69**(1): p. 1-9.
 20. Kawaguchi, T., et al., *Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats*. Journal of Controlled Release, 2009. **136**(3): p. 240-246.
 21. Kim, S.C., et al., *In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy*. Journal of Controlled Release, 2001. **72**(1–3): p. 191-202.
 22. Hagan, S.A., et al., *Poly(lactide–Poly(ethylene glycol) Copolymers as Drug Delivery Systems. 1. Characterization of Water Dispersible Micelle-Forming Systems*. Langmuir, 1996. **12**(9): p. 2153-2161.
 23. Lavasanifar, A., J. Samuel, and G.S. Kwon, *Poly(ethylene oxide)-block-poly(l-amino acid) micelles for drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**(2): p. 169-190.
 24. Wang, T., et al., *Nanoparticle carriers based on copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and hyperbranched polymers for drug delivery*. Journal of Colloid and Interface Science, 2011. **353**(1): p. 107-115.
 25. Schnitzler, T. and A. Herrmann, *DNA Block Copolymers: Functional Materials for Nanoscience and Biomedicine*. Accounts of Chemical Research, 2012. **45**(9): p. 1419-1430.
 26. Rabotyagova, O.S., P. Cebe, and D.L. Kaplan, *Protein-Based Block Copolymers*. Biomacromolecules, 2011. **12**(2): p. 269-289.
 27. Sharpless, H.C.K.a.M.G.F.a.K.B., *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. Angewandte Chemie-international Edition, 2001. **40**(11): p. 2004--2021.
 28. Tornøe, C.W., C. Christensen, and M. Meldal, *Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by*

- Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides.* The Journal of Organic Chemistry, 2002. **67**(9): p. 3057-3064.
29. Rostovtsev, V.V., et al., *A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes.* Angewandte Chemie International Edition, 2002. **41**(14): p. 2596-2599.
30. Meldal, M. and C.W. Tornøe, *Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition.* Chemical Reviews, 2008. **108**(8): p. 2952-3015.
31. Díez-González, S. and S.P. Nolan, *[(NHC)₂Cu]X Complexes as Efficient Catalysts for Azide-Alkyne Click Chemistry at Low Catalyst Loadings.* Angewandte Chemie International Edition, 2008. **47**(46): p. 8881-8884.
32. Binder, W.H. and R. Sachsenhofer, *'Click' Chemistry in Polymer and Material Science: An Update.* Macromolecular Rapid Communications, 2008. **29**(12-13): p. 952-981.
33. Manetsch, R., et al., *In Situ Click Chemistry: Enzyme Inhibitors Made to Their Own Specifications.* Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(40): p. 12809-12818.
34. Moses, J.E. and A.D. Moorhouse, *The growing applications of click chemistry.* Chemical Society Reviews, 2007. **36**(8): p. 1249-1262.
35. Zhang, L. and A. Eisenberg, *Multiple Morphologies and Characteristics of "Crew-Cut" Micelle-like Aggregates of Polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) Diblock Copolymers in Aqueous Solutions.* Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(13): p. 3168-3181.
36. Pillai, O. and R. Panchagnula, *Polymers in drug delivery.* Current Opinion in Chemical Biology, 2001. **5**(4): p. 447-451.
37. *Polymeric Delivery Systems.* ACS Symposium Series. Vol. 520. 1993: American Chemical Society. 428.

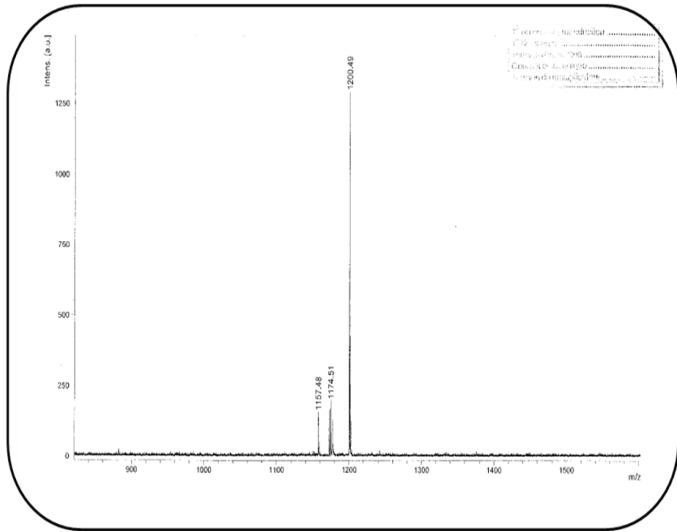
38. Jacobs, I.C. and N.S. Mason, *Polymer Delivery Systems Concepts*, in *Polymeric Delivery Systems*. 1993, American Chemical Society. p. 1-17.
39. Angelova, N. and D. Hunkeler, *Rationalizing the design of polymeric biomaterials*. Trends Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 409-21.
40. Duman, M., et al., *2.7 Atomic Force Microscopy*, in *Comprehensive Biophysics*, H.E. Editor-in-Chief: Edward, Editor. 2012, Elsevier: Amsterdam. p. 111-143.
41. Edwardson, J.M. and R.M. Henderson, *Atomic force microscopy and drug discovery*. Drug Discovery Today, 2004. **9**(2): p. 64-71.
42. Provencher, S.W., *CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations*. Computer Physics Communications, 1982. **27**(3): p. 229-242.
43. Loosdrecht, A.A.v.d., et al., *Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study*. J Immunol Methods, 1991. **141**(1): p. 15-22.
44. Giacomelli, C., et al., *Phosphorylcholine-Based pH-Responsive Diblock Copolymer Micelles as Drug Delivery Vehicles: Light Scattering, Electron Microscopy, and Fluorescence Experiments*. Biomacromolecules, 2006. **7**(3): p. 817-828.
45. Farkas, E., et al., *Synthesis of chromogenic substrates of α -amylases on a cyclodextrin basis*. Carbohydrate Research, 1997. **303**(4): p. 407-415.
46. Tanaka, T., et al., *One-step conversion of unprotected sugars to [small beta]-glycosyl azides using 2-chloroimidazolium salt in aqueous solution*. Chemical Communications, 2009(23): p. 3378-3379.

47. Aissou, K., et al., *Nano-Organization of Amylose-b-Polystyrene Block Copolymer Films Doped with Bipyridine*. *Langmuir*, 2011. **27**(7): p. 4098-4103.
48. Berson, S., et al., *Synthesis of New Cellobiose-Based Glycopolysiloxanes and their Use as Polymer Stabilizers in Miniemulsion Polymerisation*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2008. **209**(17): p. 1814-1825.
49. Vinson, N., et al., *Optimised 'click' synthesis of glycopolymers with mono/di- and trisaccharides*. *Polymer Chemistry*, 2011. **2**(1): p. 107-113.
50. Doner, L.W. and P.L. Irwin, *Assay of reducing end-groups in oligosaccharide homologues with 2,2'-bicinchoninate*. *Anal Biochem*, 1992. **202**(1): p. 50-3.
51. Liu, J.-Y. and L.-M. Zhang, *Preparation of a polysaccharide-polyester diblock copolymer and its micellar characteristics*. *Carbohydrate Polymers*, 2007. **69**(1): p. 196-201.

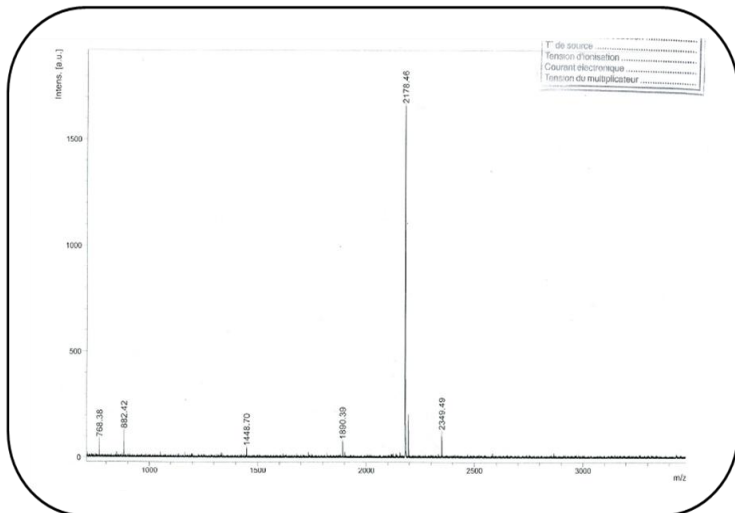
ANEXOS



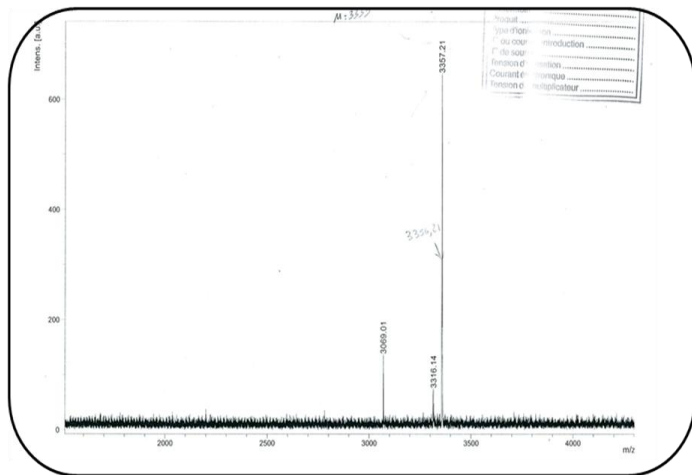
Espectro 1. Espectro de massa MALDI-TOF do composto **1**.



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



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



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