



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**



**.SISTEMA LIPOSSOMAL MODIFICADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO:  
PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO**

**PEDRO HENRIQUE CORREIA DE LIMA**

**Orientador: Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana**  
**Coorientador: Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça**

**CAMPUS Londrina, 2020**



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**



**PEDRO HENRIQUE CORREIA DE LIMA**

**SISTEMA LIPOSSOMAL MODIFICADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO:  
PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO**

**Liposomal system modified with hyaluronic acid: preparation and  
characterization**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana.

Coorientador: Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça

**LONDRINA**

**2020**



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**



01/02/2021



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
**Câmpus Londrina**



PEDRO HENRIQUE CORREIA DE LIMA

**SISTEMA LIPOSSOMAL MODIFICADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciência E Engenharia De Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Materiais Para Aplicação Em Engenharia E Tecnologia.

Data de aprovação: 14 de Dezembro de 2020

Prof Renato Marcio Ribeiro Viana, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Fabio Vandresen, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Gustavo Henrique Ribeiro Viana, Doutorado - Universidade Federal de São João Del Rei (Ufsj)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 14/12/2020.



## RESUMO

Os lipídios são compostos bioquímicos que acompanham a evolução humana a milhares de anos e são essenciais para várias funções dos organismos vivos. Eles são compostos anfóteros e alguns quando em contato com a água formam nanovesículas, bicamadas automontadas chamadas de lipossomas. Os lipossomas foram descobertos em meados dos anos 60 e desde então vêm sendo aplicados em vários segmentos da nanotecnologia. Uma das características principais dos lipossomas é que eles são excelentes nanocarreadores, capazes de entregar fármacos de forma mais efetiva no combate a doenças. Na busca da melhoria na entrega de fármacos, cientistas começaram a modificar a sua superfície através de sínteses químicas. A funcionalização de lipossomas é uma estratégia criada a partir dessas modificações que tem como maior vantagem o reconhecimento de células-alvo. Uma das técnicas de funcionalização mais recente é a bioconjugação, onde uma molécula é conectada a uma biomolécula através de um espaçador. Foi por esse caminho que esse trabalho teve como objetivo modificar quimicamente um lipídio, o colesterol, e bioconjugá-lo ao ácido hialurônico na formulação de um lipossoma funcionalizado. Isso foi proposto porque o ácido hialurônico é um polissacarídeo que está presente nas superfícies das células endoteliais e, de acordo com algumas publicações, têm afinidade aos eritrócitos infectados pelo parasito da malária. Para isso, um derivado do colesterol foi preparado através de cinco etapas de modo a ter um grupo amino terminal e um espaçador baseado no trietilenoglicol. Eles foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), no infravermelho e monitorados por método cromatográfico. Ao final, pôde-se observar um êxito na obtenção da molécula colesterol-ácido hialurônico, que posteriormente foi usada em formulações lipídicas para encapsular uma substância bioativa desenvolvida no grupo no combate à malária, o 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol. Pelo teste de eficiência de encapsulamento se pôde notar que o fármaco que estava carregado na formulação lipossomal com o ácido hialurônico apresentou melhor encapsulamento do que o fármaco carregado no lipossoma convencional, o que indicou uma melhor eficiência nos lipossomas superficialmente modificados.

**Palavras-chave:** lipossoma, bioconjugação, colesterol, ácido hialurônico, malária.



## ABSTRACT

Lipids are biochemical compounds that have followed human evolution for thousands of years and are essential for various functions of living organisms. They are amphoteric compounds and some of them when in contact with water form nanovesicles, self-assembled bilayers named liposomes. Liposomes were discovered in the mid-1960s and since then they have been applied to various segments of nanotechnology. One of the main characteristics of liposomes is that they are excellent nanocarriers, capable of delivering drugs more effectively against diseases. In the research of drug delivery improvement, scientists began to modify the surface of liposomes through chemical syntheses. Liposome's functionalization is a strategy created from these modifications that has an advantage of recognizing target cells. One of the most recent functionalization techniques is bioconjugation, where a molecule is connected to a biomolecule through a spacer. That said, this work aimed to chemically modify a lipid, cholesterol, and bioconjugate it to hyaluronic acid in the formulation of a functionalized liposome. This was proposed because hyaluronic acid is a polysaccharide that is present on the surfaces of endothelial cells and, according to some publications, has an affinity for erythrocytes infected by malaria parasite. For this, a cholesterol derivative was prepared through five steps in order to have an amino terminal group and a spacer based on triethyleneglycol. They were characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), infrared and monitored by the chromatographic method. In the end, it was possible to observe a successful cholesterol-hyaluronic acid molecule, which was later used in lipid formulations to encapsulate a bioactive substance developed to combat malaria, 10 - ((4,5-dihydrothiazole-2 -yl) thio) decan-1-ol. By the encapsulation efficiency test, it was possible to notice that the drug carried in the liposomal formulation with hyaluronic acid showed better results than the drug carried in the conventional liposome, which indicated a better efficiency in superficially modified liposomes.

**Keywords:** liposome, bioconjugation, cholesterol, hyaluronic acid, malaria.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura dos fosfolipídios.....	16
Figura 2 – Variações da parte da cabeça dos fosfoglicerídeos.....	17
Figura 3 - Representação do lipossoma e de um lipídeo. ....	18
Figura 4- Ilustração de um lipossoma modificado com vários tipos de moléculas funcionais (representadas em vermelho) .....	19
Figura 5- Rotas para bioconjugação de lipossomas.....	20
Figura 6 – Reação click-chemistry .....	21
Figura 7 – Estrutura do colesterol .....	22
Figura 8 - Estrutura da composição colesterol/fosfolipídios. ....	23
Figura 9 –Representação de um lipossoma bioconjugado.....	23
Figura 10 – Estrutura do PEG .....	24
Figura 11 – Estrutura do Ácido Hialurônico.....	26
Figura 12 – Representação da amina reductiva na porção glucorônica do AH.....	26
Figura 13 – Ciclo do parasito da malária em humanos .....	27
Figura 14 - Estrutura química do 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol .....	28
Figura 15- Síntese do colesterol conjugado ao ácido hialurônico .....	38
Figura 16 - Reação de esterificação do colesterol .....	39
Figura 17 - Cromatografia por Camada Delgada do CHEMS.....	40
Figura 18 – Espectro <sup>1</sup> H RMN 400MHz para frequência do H do hemisuccinato de colesterol.....	41
Figura 19 – Espectro de <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) do hemisuccinato de colesterol .....	42
Figura 20– Reação de substituição do cloro pela azida .....	43
Figura 21– Espectro <sup>13</sup> C RMN (100 MHz) do álcool com a azida.....	43
Figura 22 – Esterificação do colesterol modificado com anidrido succínico.....	44
Figura 23– Mecanismo da esterificação de Steglich .....	45
Figura 24 – Cromatografia por camada delgada do COL-N <sub>3</sub> .....	46
Figura 25- Espectro de absorção na região do infravermelho do material com espaçador.....	46
Figura 26 - Espectro <sup>1</sup> H RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do Col-N <sub>3</sub> .....	47
Figura 27– Etapa de hidrogenação catalítica .....	48



Figura 28 – Cromatografia por camada delgada do COL-NH <sub>2</sub> .....	49
Figura 29– Espectro de absorção na região do infravermelho após a hidrogenação catalítica .....	49
Figura 30 - Espectro <sup>1</sup> H RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) depois da hidrogenação catalítica.	50
Figura 31 – Formação da imina.....	51
Figura 32 – Aminoação redutiva com cianoborohidreto de sódio.....	51
Figura 33– Acoplamento do ácido hialurônico.....	52
Figura 34– Imagem da CDD da reação.....	53
Figura 35– Curva de calibração do 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol.....	54
Figura 36 - <sup>1</sup> H RMN (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da molécula 2-(2-(2-azidaetoxi)etoxi)etanol .	66



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Composição das formulações lipossomais para 2 mL de solução tampão .....	36
Tabela 2 – Tabela com valores de absorbância e concentração.....	54





## LISTA DE SIGLAS

AcOEt – Acetato de Etila

AH - Ácido Hialurônico

CDD – Cromatografia em Camada Delgada (do inglês *Thin Layer chromatography*)

CHEMS - Hemissuccinato de colesterol

COL - Colesterol

COL-N<sub>3</sub> – Colesterol com terminal azida

COL-NH<sub>2</sub>- AH – Colesterol modificado com Ácido hialurônico

COL-NH<sub>2</sub> – Colesterol com terminal amina

DIC – *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

DMAP – 4-*N,N*-dimetilaminopiridina

DMF – *N,N*-dimetilformamida

EE% - Eficiência de Encapsulamento

FDA - Food and Drug Administration

Hex – Hexano

IC<sub>50</sub> - Concentração Inibitória

IS - Índice de seletividade

IV - Infravermelho

LP - Lipossoma Convencional

LPF – Lipossoma Convencional com fármaco

LPA – Lipossoma modificado com Ácido Hialurônico

LPAF- Lipossoma modificado com Ácido Hialurônico e fármaco

mM – Milimol

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - Fosfato de sódio dibásico heptahidratado

NQBio - Núcleo de Pesquisa em Química Biológica

PBS - Phosphate Buffered Saline

PC- Fosfatidilcolina

PE - Fosfatidiletanolamina

PEG - Polietilenoglicol

PG - Fosfatidilglicerol



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**



PS - Fosfatidilserina

RES – Sistema Reticuloendotelial

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SPC – Fosfatidilcolina de Soja (do inglês *Soybean phosphatidylcholine*)

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

UFSJ - Universidade Federal de São João de Del-Rey



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
4. MATERIAIS.....	30
5. METODOLOGIA.....	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
9. ANEXOS.....	66



## 1. INTRODUÇÃO

A nanomedicina é a aplicação direta da nanotecnologia para tratamento, prevenção, controle e monitoramento de doenças biológicas. Nesse mundo, o uso dos nanocarreadores como lipossomas auxilia pesquisadores no campo farmacêutico e causa um grande impacto no meio acadêmico. Os lipossomas são vesículas esféricas automontadas em bicamadas que apresentam características singulares como a capacidade de aprisionar fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos (Adekiya *et al.*, 2020; Crommelin *et al.*, 2020; Duan *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2016). Eles são formados por fosfolipídios, compostos anfóteros que apresentam uma cabeça polar e uma cauda apolar provenientes da esterificação de ácidos graxos e álcoois (Eloy *et al.*, 2014; Koleini *et al.*, 2019; Poon & Patel, 2020; Sułkowski *et al.*, 2005). Em sua bicamada lipídica também são usadas moléculas de colesterol com o propósito de modificar algumas propriedades, como aumentar a densidade, decrescer a fluidez, aumentar a força mecânica da membrana etc (Ibaraki *et al.*, 2019; W. Zhang *et al.*, 2019).

Em virtude da sua boa biocompatibilidade e baixa toxicidade, lipossomas são amplamente utilizados como carreadores de fármacos. A encapsulação de fármacos e sua liberação controlada prolonga o tempo de circulação do fármaco no sangue, diminui sua toxicidade em comparação ao ativo na forma livre, melhora sua biodisponibilidade etc (Mo *et al.*, 2018; Torchilin, 2005). Outra vantagem apresentada é que as vesículas lipossomais podem direcionar o fármaco para um sítio específico desejado (Eloy *et al.*, 2014; Hossen *et al.*, 2019). E para que isso ocorra com uma maior efetividade, modificações químicas são realizadas na superfície dos lipossomas ou mesmo nas moléculas de colesterol que fazem parte das vesículas. Essas modificações, além de melhorarem processos físicos como prazo de vida útil, dão uma maior estabilidade e também direcionam os lipossomas à células-alvo (Briuglia *et al.*, 2015; Ju *et al.*, 2018; Lila & Ishida, 2017; Sercombe *et al.*, 2015).

O colesterol faz parte da família dos esteróis, moléculas complexas resultantes de uma longa evolução bioquímica (Kumari *et al.*, 2019; Urbina *et al.*, 1995). Ele é bastante utilizado na síntese orgânica devido a sua disponibilidade na natureza, seu



baixo custo e ao seu grupo funcional, hidroxila, o qual se pode reagir como nucleófilo (Albuquerque *et al.*, 2019). Por isso, ele também serve como uma âncora eficiente na união de várias moléculas na formação de lipossomas funcionais por uma técnica chamada de bioconjugação. Nela, ligantes são conectados a biomoléculas por intermédio de espaçadores através de sínteses orgânicas (Hermanson, 2013). Entretanto, esse processo só é viável se as moléculas envolvidas tiveram grupos funcionais capazes de formar ligações entre si em determinadas condições. Em formulações lipossomais, os colesteróis são bioconjugados ao ligantes com o intuito de serem direcionados à células-alvo (Elzahhar *et al.*, 2019; Eroğlu & İbrahim, 2020; Hermanson, 2013; Kalia & Raines, 2009; Kölmel & Kool, 2017; Marqués-Gallego & De Kroon, 2014; Turánek *et al.*, 2019; C. Zhang *et al.*, 2019).

Para essa aplicação existem vários tipos de ligantes orgânicos como anticorpos, peptídeos, proteínas e carboidratos (Sercombe *et al.*, 2015). Entre eles, os polissacarídeos são amplamente usados. Eles são biopolímeros comumente encontrados nos organismos-vivos e têm alta afinidade com alguns receptores no corpo, o que os tornam atraentes no direcionamento de sistemas de administração de fármacos (Saadat *et al.*, 2014; Severian Dumitriu, 2004). Um polissacarídeo conhecido é o Ácido Hialurônico (AH). Ele é não-tóxico, biodegradável, não imunogênico e aprovado para injeções pela Food and Drug Administration (FDA) (Ito *et al.*, 2008; Mo *et al.*, 2018; M. Song *et al.*, 2019; Q. Zhang *et al.*, 2016). O uso do ácido hialurônico como molécula funcional é relatado por alguns pesquisadores, tanto em sua ligação direta aos fosfolípidios, quanto em formulações em sistemas lipossomais à base de colesterol no combate a tumores (Dufaÿ Wojcicki *et al.*, 2012; M. Song *et al.*, 2019). Porém, ainda não foi explorado em formulações lipossomais no combate à malária.

A malária é uma doença infecciosa causada por parasitos do gênero *Plasmodium* (*vivax*, *falciparum*, *malariae*, *ovale*, *knowlesi*) em humanos e transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles*. Em 2016, foram registrados 216 milhões de casos de malária e 445.000 mortes (Carlton, 2018; Molina-Franky *et al.*, 2020). A ascensão da resistência aos fármacos disponíveis, como a cloroquina (Devaux *et al.*, 2020), faz com que haja uma necessidade de investir em pesquisas com desenvolvimento de



novas estratégias terapêuticas para combater o parasito (Marques *et al.*, 2017; Prudêncio *et al.*, 2006).

Com base no exposto, este trabalho objetivou sintetizar e caracterizar um sistema lipossomal à base de colesterol modificado com ácido hialurônico. Esta estratégia levou em consideração que eritrócitos infectados pelo parasito apresentam uma afinidade por este polissacarídeo e, portanto, sistemas do tipo de entrega de fármacos que apresentam ácido hialurônico podem direcionar seu conteúdo de modo seletivo a estas células.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização do sistema lipossomal com colesterol modificado com ácido hialurônico, para carreamento e direcionamento do 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol para melhoria do seu índice de seletividade frente ao *Plasmodium falciparum*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conjugar o ácido hialurônico (AH) a um derivado do colesterol;
- Caracterizar o conjugado AH-Colesterol;
- Preparar e caracterizar o sistema lipossomal com o sistema HA-colesterol;
- Encapsular do fármaco 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol no sistema lipossomal;
- Caracterizar o sistema lipossomas/AH-colesterol/fármaco.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. LIPÍDIOS

Os lipídios são moléculas orgânicas primordiais para os seres vivos e são pouco polares com ampla diversidade estrutural. Eles abrangem os esteroides, fosfolipídios, ácidos graxos, derivados do ácido araquidônico e algumas vitaminas. Alguns deles são capazes de formar membranas, compartimentalizando ambientes e fornecem um meio de comunicação regulado, o que faz com que eles sejam plataformas para muitas reações. Eles também têm um papel essencial na sinalização, estoque de energia e formação das membranas, além de ter uma grande diversidade de estruturas (Acoba *et al.*, 2020; Briuglia *et al.*, 2015; Fahy *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2020; Harayama & Riezman, 2018).

##### 3.1.1. Fosfolipídios

Eles são formados principalmente por fosfoglicerídeos, componentes constituídos de um cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica, onde o glicerol é esterificado nas posições **1** e **2** com ácidos graxos (cauda) e na posição **3** com um diésterfosfato (cabeça) (Acoba *et al.*, 2020) (Figura 1).

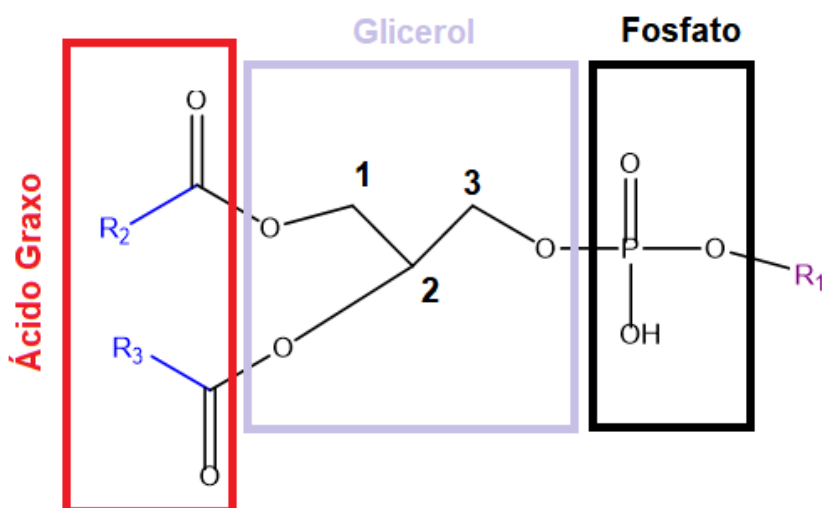


Figura 1- Estrutura dos fosfolipídios (Autoria própria, 2020).



Há diferentes fosfoglicerídeos obtidos como resultado das diversas variações da cabeça ( $R_1$ ) (Figura 2) e os ácidos graxos podem variar no número de carbonos de seus hidrocarbonetos ( $R_2$  e  $R_3$ ). (Ahmed *et al.*, 2019; Sargent *et al.*, 1952; van Hoogevest, 2017).

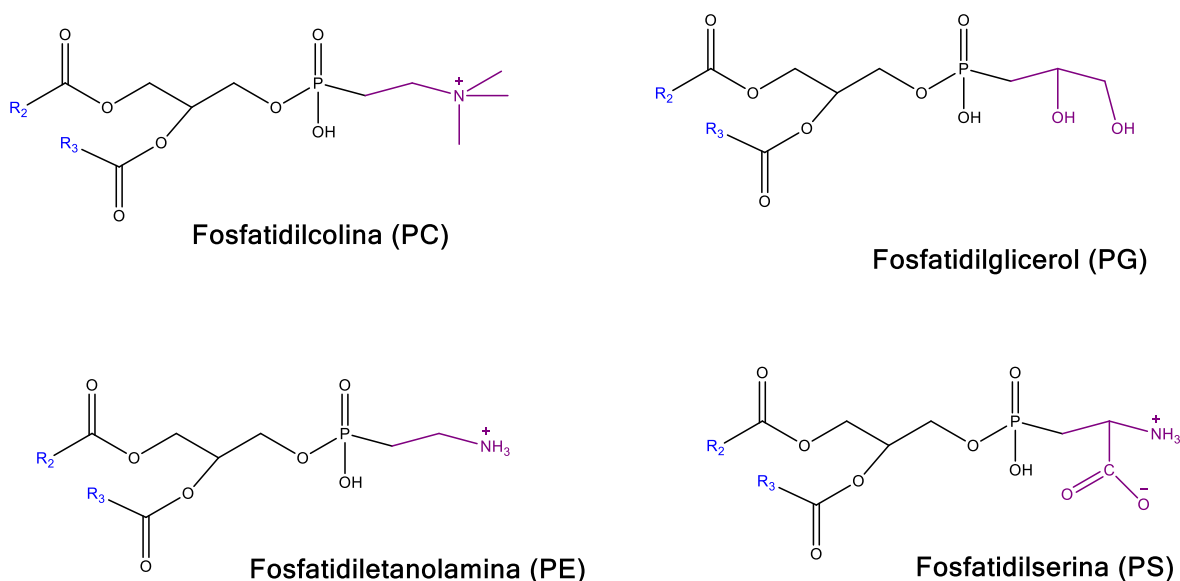


Figura 2 – Variações da parte da cabeça dos fosfoglicerídeos (Autoria própria, 2020).

Os fosfolipídios quando dispersam em solução aquosa naturalmente dão origem a estruturas em camadas chamadas de lipossomas (Briuglia *et al.*, 2015; de Araújo *et al.*, 2019; Ju *et al.*, 2018; Torchilin, 2005).

### 3.2. LIPOSSOMAS

Recentemente, a nanotecnologia tem sido amplamente aplicada para fornecer altas concentrações de fármacos para tratamento de diversas doenças através de sistemas nanocarreadores (Ismail *et al.*, 2018). Entre os sistemas de nanopartículas, os lipossomas (Figura 3) têm apresentado maiores vantagens, eles podem incorporar tanto fármacos hidrofílicos no cerne aquoso, como também fármacos hidrofóbicos na bicamada lipídica. Também, apresentam grandes vantagens como boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (Akbarzadeh *et al.*, 2013).

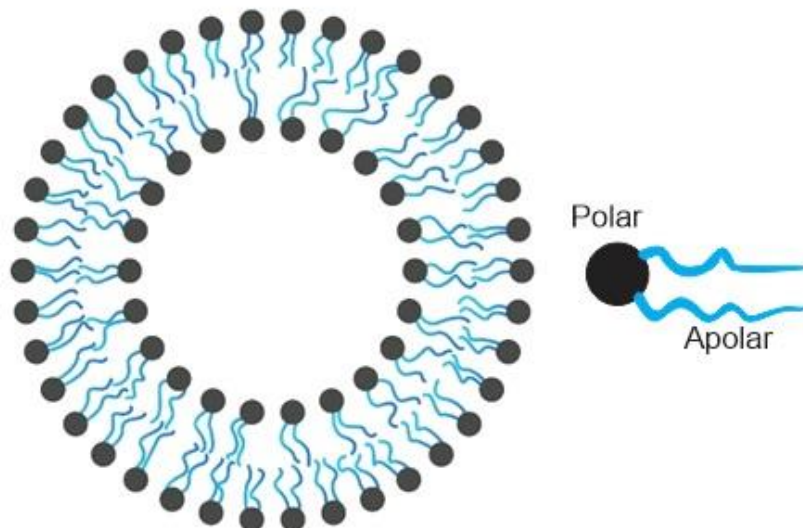


Figura 3 - Representação do lipossoma e de um lipídeo (Autoria própria, 2020).

### 3.2.1. Funcionalização de lipossomas

Os primeiros lipossomas foram descritos em meados dos anos 60 e não continham modificações na superfície (Bangham *et al.*, 1965; Hashemzadeh *et al.*, 2020; Riaz *et al.*, 2018). Entretanto, eles demonstraram algumas limitações como baixa retenção de fármaco e uma alta tendência a liberação prematura de fármacos hidrofílicos e lipofílicos. Além de terem uma depuração sanguínea acelerada pelo sistema reticuloendotelial (RES) (Le *et al.*, 2019; Saraf *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2019). Para superar essas limitações, estratégias de modificações superficiais foram desenvolvidas desde dos anos 70, ao revestirem os lipossomas convencionais com uma ampla gama de moléculas poliméricas consideradas inertes para estabilizar os lipossomas e fornecer impedimento estérico. Um deles foi o polietilenoglicol (PEG), usado pela capacidade de escapar do sistema reticuloendotelial (Thi *et al.*, 2020).

Posteriormente, o uso de sínteses orgânicas para mudar a superfície dos lipossomas e potencializar essas nanopartículas começou a ser amplamente



explorado. Atualmente, uma das aplicações mais requintadas é a modificação superficial com ligantes. Ela proporciona uma propriedade de carreamento e liberação em sítios ativos específicos, o reconhecimento de algumas células específicas do corpo humano e melhoria da eficácia na entrega de fármacos para diversas doenças L(Ali & Islam, 2019; Zylberberg & Matosevic, 2016). A funcionalização de lipossomas pode ser possível de diversas maneiras (Figura 4). Uma delas é através de uma técnica chamada bioconjugação (Elzahhar *et al.*, 2019).

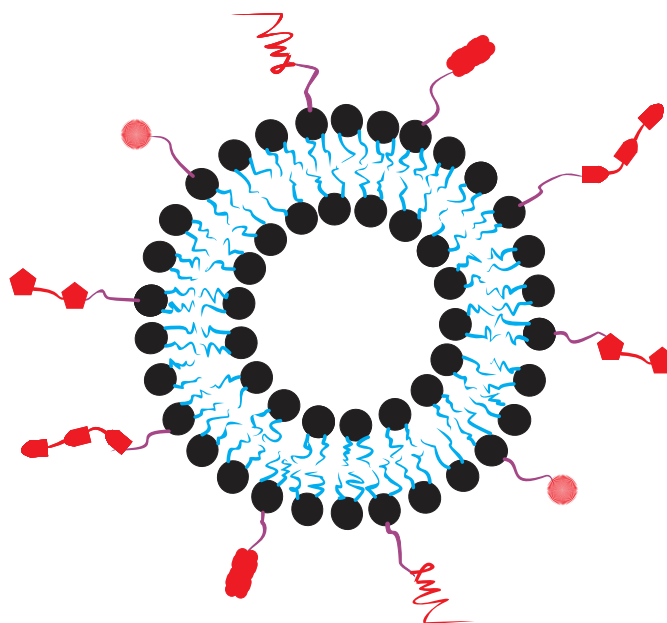


Figura 4- Ilustração de um lipossoma modificado com vários tipos de moléculas funcionais (representadas em vermelho) (Autoria própria, 2020).

### 3.3. BIOCONJUGAÇÃO

É um campo de pesquisa em ascensão que abrange um amplo conhecimento em química e biologia e pode englobar o uso de bionanomateriais (Narain, 2014). A bioconjugação é o ato de ligar uma biomolécula à outra, de origem biológica ou não, muitas vezes por intermédio de um espaçador. Os pesquisadores utilizam de metodologias de síntese orgânica para realizar essas uniões, mas isso só é possível se os componentes apresentarem grupos funcionais reativos capazes de interagir e formar ligações, covalentes ou não, nas condições corretas. O caminho tomado é bem variado e depende exclusivamente da jornada científica de cada trabalho, pois há uma

pluralidade de reagentes e grupos funcionais envolvidos (Elzahhar *et al.*, 2019; Wadhawan *et al.*, 2019; C. Zhang *et al.*, 2019). A bioconjugação proporciona alguns benefícios como: a melhora na entrega entre a nanopartícula terapêutica e o sítio específico da doença, redução da toxicidade, otimização farmacocinética, melhora da eficácia, segurança e tolerabilidade (Liu *et al.*, 2020).

Os três componentes de um sistema lipossomal bioconjugado são: um lipídio, um espaçador e um ligante. Analogicamente, o espaçador tem a função de uma corrente, ele conecta o lipídio (âncora) ao ligante (navio). O espaçador pode existir de diversas formas, ser pré-sintetizado ou não. Já a molécula funcional ou ligante, depende da célula de interesse que o pesquisador quer atingir. Não há uma maneira padronizada de funcionalizar um lipossoma, então, o pesquisador pode começar pelo lipídio ou pelo ligante para obtenção do produto final (Figura 5) (Eroğlu & İbrahim, 2020).

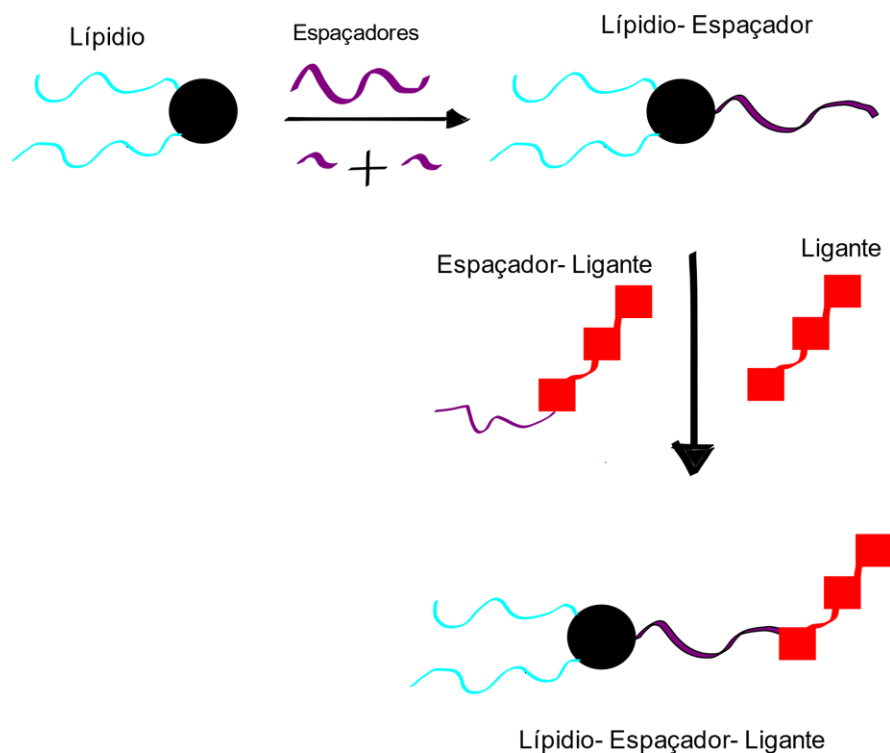


Figura 5- Rotas para bioconjugação de lipossomas (Autoria própria, 2020).



Pode-se notar a formação de muitas ligações covalentes na bioconjugação de lipossomas. Elas podem ser bem variadas como click-chemistry (Figura 6) com formação de triazol, amida, ester, oxima, dissulfeto, carbamato, hidrazona etc (Ali & Islam, 2019; Kalia & Raines, 2009; Kölmel & Kool, 2017; Marqués-Gallego & De Kroon, 2014; Werengowska-Ciećwierz *et al.*, 2015).

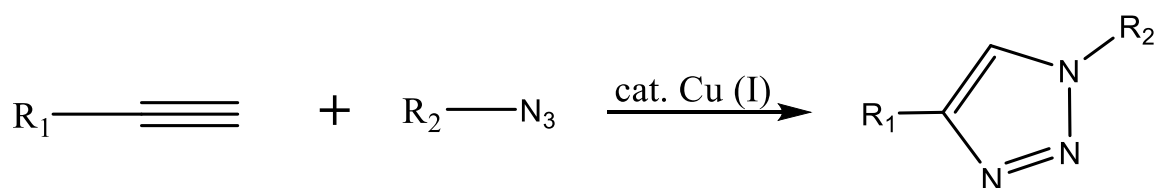


Figura 6 – Reação click-chemistry (Autoria própria, 2020).

Se o pesquisador pretende começar a modificar quimicamente a parte lipídica, a grande maioria das reações vistas na literatura é pelo grupo da cabeça-polar, pois ele é mais propenso a sofrer modificação química e criar ligações com outros grupos reativos. E a ativação do lipídio pode ser feita antes da incorporação na estrutura da bicamada ou após a formação do lipossoma intacto (Chen *et al.*, 2020; Eroğlu & İbrahim, 2020; Kohli *et al.*, 2014).

### 3.3.1. Uso do Colesterol na Bioconjugação

O colesterol (Figura 7) é um lipídio vital que exerce várias funções no organismo humano. Ele está presente nas membranas celulares eucarióticas e modula a fluidez e permeabilidade delas. Nos animais, ele serve como precursor de todos os hormônios que contém esteroides como a vitamina D e o ácido da bile (Ercole *et al.*, 2015). O colesterol tem uma pequena porção polar hidroxilada (posição C-3) junta a um anel esterol rígido. Quando em presença de água, o grupo hidroxila tem a interface virada para a parte polar da água, enquanto a parte do esterol é hidrofóbica (Kumari *et al.*, 2019).

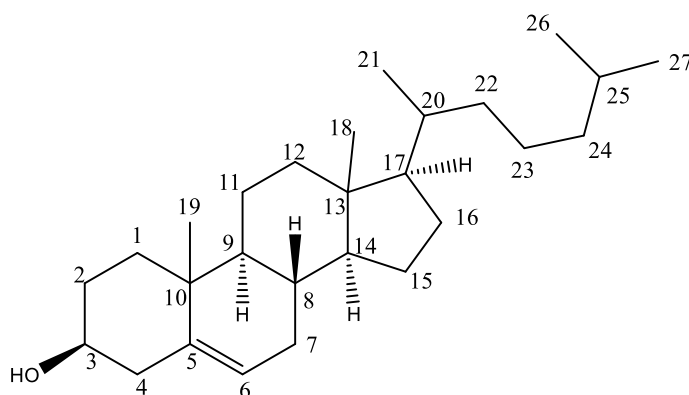


Figura 7 – Estrutura do colesterol (Autoria própria, 2020).

O colesterol não forma uma bicamada lipídica sozinho, mas ele pode ser incorporado em membranas fosfolipídicas (Figura 8). A alta solubilidade do colesterol no lipossoma fosfolipídico é atribuído pelo fato de que ambos apresentam polaridades similares, e assim, uma interação entre as cadeias (Daraee *et al.*, 2016). Tal interação faz com que eles se ordenem e como consequência da diminuição do impedimento estérico, resulta em empacotamento mais eficaz da estrutura supramolecular (Briuglia *et al.*, 2015; Kumari *et al.*, 2019). Uma outra importante variante é que seu efeito na estrutura e propriedade nas membranas naturais e sintéticas é bem estabelecido. Estudos sobre o uso de colesterol como estabilizador em bicamadas lipídicas foram realizados, e mostram que este esteroide pode além de aumentar o empacotamento de lipossomas, pode reduzir a permeabilidade da bicamada para não-eletrólitos e solutos eletrolíticos, melhorar a resistência da vesícula à agregação, alterar a fluidez etc (Briuglia *et al.*, 2015; Kaddah *et al.*, 2018).

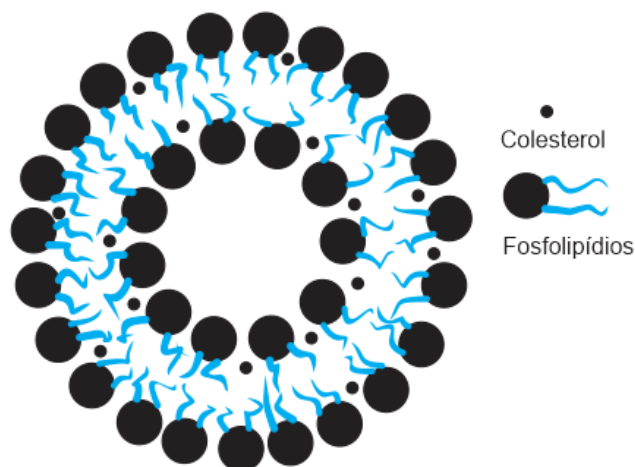


Figura 8 - Estrutura da composição colesterol/fosfolípidios (Autoria própria, 2020).

As modificações químicas no colesterol foram estudadas durante anos. Descobriu-se que o hidrogênio da dupla ligação da parte cíclica pode ser manipulado, assim como mais alguns carbonos. Entretanto, as modificações no grupo hidroxila (-OH) do colesterol são as mais aplicadas. O grupo funcional é facilmente oxidado e se tornou uma boa via na bioconjugação de formulações lipossomais (Figura 9) (Albuquerque *et al.*, 2019; Morzycki, 2014).

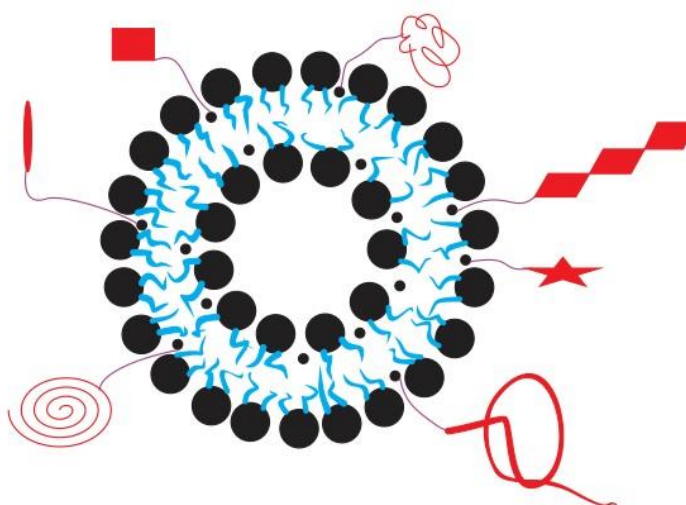


Figura 9 –Representação de um lipossoma bioconjugado (Autoria própria, 2020).



### 3.3.2. Espaçadores

Uma das chaves para formar um bioconjugado de sucesso está na seleção de moléculas que formem espaçadores adequados, elas devem ser escolhidas com cuidado e é necessário que o pesquisador tenha um bom conhecimento da estrutura, química e características delas. Portanto, os espaçadores têm, como todas as outras partes do lipossoma bioconjugado, que conter grupos reativos que possam fazer ligações com outras moléculas. Eles podem ser feito através de sínteses de várias moléculas, que podem ser pequenas ou não (Hermanson, 2013).

Um grande exemplo é o PEG (Figura 10), um polímero que serve na funcionalização de lipossomas furtivos, capazes de não serem capturados pelo RES. Porém, também serve como espaçador na bioconjugação dessas nanopartículas (Bandara *et al.*, 2020; Mohamed *et al.*, 2019; Olsman *et al.*, 2020; Patra *et al.*, 2018; S. Song *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2019). Isso é possível pois o PEG apresenta grupo funcional passível de funcionalização, uma característica que contribuiu para que muitos trabalhos apresentassem lipídios PEGlados funcionalizados com diversas moléculas na literatura nos últimos anos (Valcourt *et al.*, 2018; D. Zhang & Zhang, 2020).

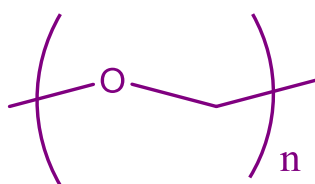


Figura 10 – Estrutura do PEG (Autoria própria, 2020).

Porém, estudos recentes indicaram que os lipossomas PEGlados impedem a interação do fármaco com células tumorais por causa do impedimento estérico causado pelo polímero (D. Zhang & Zhang, 2020). Além disso, injeções múltiplas de nanopartículas PEGladas demonstraram uma depuração sanguínea acelerada principalmente pelo baço, que cria anticorpos contra a porção do PEG (Mohamed *et al.*, 2019; M. Song *et al.*, 2019; Zahednezhad *et al.*, 2019). Por isso, há uma procura





pela substituição do polímero como espaçador e pesquisadores têm explorado potenciais sintéticos e naturais na tentativa de descobrir um sistema efetivo de entrega de fármacos sem o PEG (Thi *et al.*, 2020).

### 3.3.3. Ligantes

De igual importância aos lipídios e espaçadores utilizados na formação do lipossoma bioconjugado, as moléculas funcionais (ligantes) também depende do enredo da pesquisa (Elzahhar *et al.*, 2019; Noble *et al.*, 2014). A maioria delas têm uma origem biológica como as enzimas, peptídeos, proteínas, vitaminas, anticorpos, carboidratos e pequenas moléculas (Khan *et al.*, 2020; Molavipordanjani & Hosseinimehr, 2019). Pode-se dar um destaque aos polissacarídeos, carboidratos importantes na biologia, especialmente no reconhecimento celular. Muitos são manuseados na modificação de superfícies por terem efeito estabilizante durante processos como liofilização e spray-drying, também têm uma habilidade de rejeitar proteínas, são biodegradáveis e exibem baixa toxicidade. Em aplicações biomédicas, um dos polissacarídeos mais pesquisados é o Ácido Hialurônico (Turánek *et al.*, 2019).

#### 3.3.3.4. Ácido Hialurônico

O Ácido Hialurônico (AH) é um composto linear formado por unidades repetidas e alternadas de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina unidos pelas ligações  $\beta$ -1,4 (Figura 11). Ele não é tóxico, é biocompatível e usado amplamente na bioconjugação de nanocarreadores (Dufay Wojcicki *et al.*, 2012; Mansoori *et al.*, 2020; Saadat *et al.*, 2014; Zylberberg & Matosevic, 2017).

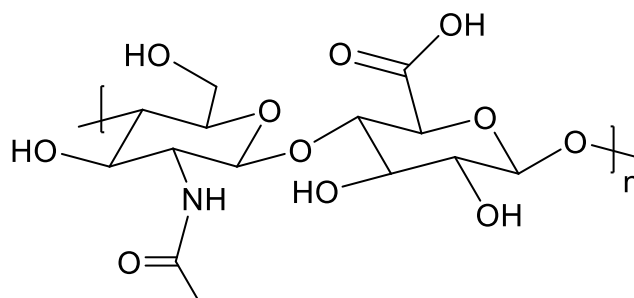


Figura 11 – Estrutura do Ácido Hialurônico (Autoria própria, 2020).

Na bioconjugação de um Ácido Hialurônico é comum observar a junção de um grupo amina a uma carbonila de aldeído do oligômero do polissacarídeo em meio ácido e na presença de um agente redutor, este processo é conhecido como aminação redutiva (Figura 12) (Buffa *et al.*, 2019; Tokita & Okamoto, 1995). O AH é um ligante usado no combate a algumas doenças tumorais (M. Song *et al.*, 2019). Porém, estudos demonstraram que ele também pode aderir à células infectadas pelo *Plasmodium falciparum*, transmissor da malária (Barateiro *et al.*, 2019).

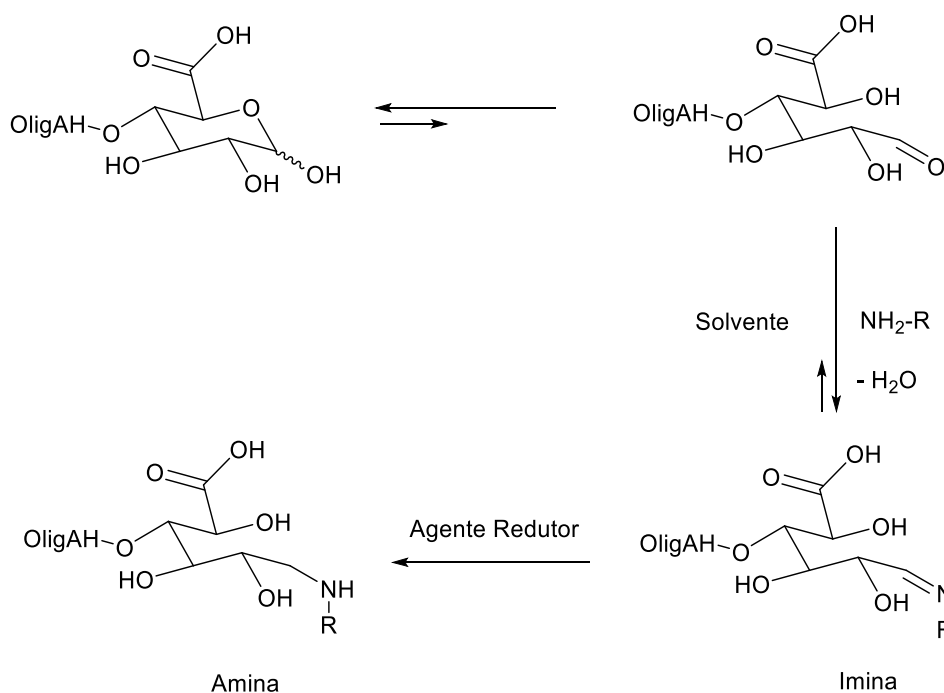


Figura 12 – Representação da aminação redutiva na porção glucorônica do AH (Autoria própria., 2020).

### 3.4. MALÁRIA

A malária ainda representa uma grande ameaça à saúde pública, estima-se que em 2017 pelo menos 219 milhões de pessoas contraíram a doença e quase meio milhão vieram a óbito (Barateiro *et al.*, 2019). Sabe-se que o ciclo da malária em humanos (Figura 13) começa quando a forma esporozoíta do parasito é transmitida para os humanos durante a picada do mosquito fêmea *Anopheles* (Molina-Franky *et al.*, 2020).

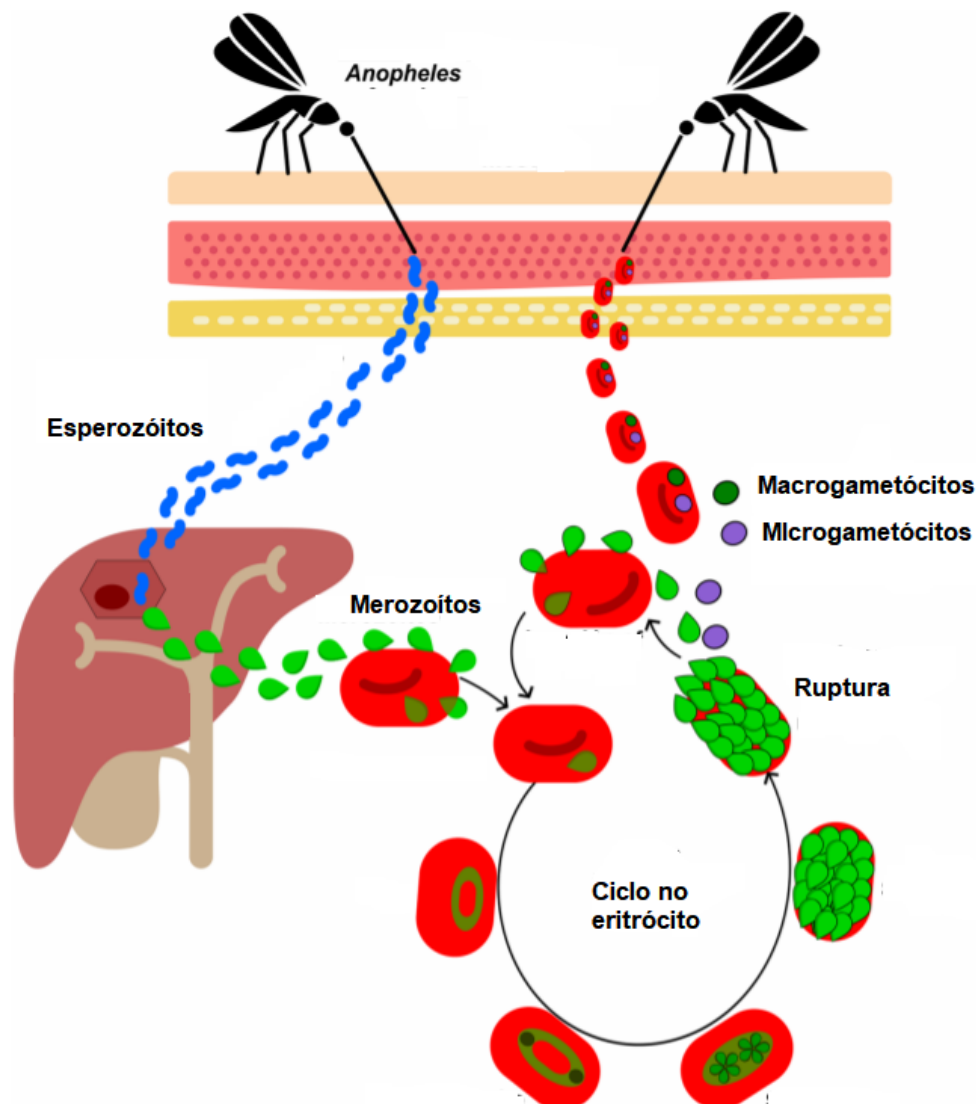


Figura 13 – Ciclo do parasito da malária em humanos. Adaptado de Molina-Franky *et al.*, 2020.



Posteriormente, ele migra para células hepáticas, onde o parasito passa para sua forma merozoíta. Os merozoítos são liberados para a corrente sanguínea e invadem os glóbulos vermelhos. Há um ciclo de reprodução assexuada dentro dos eritrócitos infectados e a multiplicação do parasito leva a uma explosão da célula. Na eclosão, além da liberação de mais merozoítos, que invadem mais eritrócitos, há a liberação de outra forma do parasito: a gametócita (macrogametocitos e microgametócitos). Quando ocorre o repasto sanguíneo, os gametócitos vão para o intestino do mosquito e lá o ciclo se renova, pois o parasito passa da sua forma gametócita para a esporozoíta (Molina-Franky *et al.*, 2020). No combate à malária, a cloroquina é o fármaco mais usado no mundo. Ele é relativamente seguro e barato, além de ser um bom fármaco contra doenças virais, bacterianas e inflamatórias (Coban, 2020; Welles & Plowe, 2001). Existem mais alguns fármacos disponíveis para o tratamento da malária humana. Porém, o parasito criou resistência a todos existentes, inclusive a cloroquina, e isso torna a busca por novos fármacos no combate à doença primordial ( Mosqueira *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2020).

### 3.5. 10-((4,5-DIHDROTIAZOL-2-IL)TIO)DECAN-1-OL.

Recentemente, um bom candidato foi notificado pelo núcleo de pesquisa em Química Biológica da Universidade Federal de São João de Del-Rey (UFSJ) (Guimarães *et al.*, 2019). Identificou-se por meio de síntese orgânica de uma série de análogos de alcaloides marinhos a substancia 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol (Tiazolina) (Figura 14).

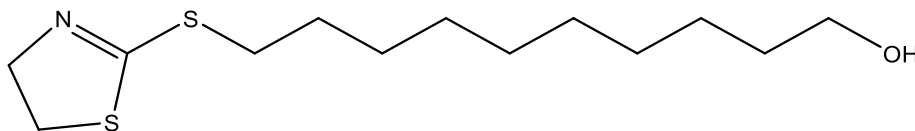


Figura 14 - Estrutura química do 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol (Autoria própria., 2020).



Essa substância proporcionou uma alta atividade antimalárica *in vitro* e foi capaz de induzir a morte do parasito pelo acúmulo do composto porque apresentou uma concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) de 1.55 próxima à da cloroquina ( $\sim 0.38$ ). Porém, seu índice de seletividade (IS) foi mais baixo (74.5) comparado com o da cloroquina ( $>250$ ) (Guimarães *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020).

Há um conhecimento interessante de como se dá a infecção de células hospedeiras na doença fetal. Os eritrócitos infectados pelo parasito podem aderir às células endoteliais hospedeiras devido ao reconhecimento molecular do HA que está presente em uma quantidade maior nas superfícies das células fetais. É por este caminho que alguns pesquisadores sugerem que a malária consegue direcionar e infectar as células endoteliais microvasculares, especialmente da placenta, o que conduziria ao quadro de malária gestacional (Beeson *et al.*, 2000; Chai *et al.*, 2001). E isso pode abrir espaço para novas linhas de pesquisas com o uso de lipossomas modificados no combate à doença, ao utilizar o mesmo par de receptores como ligantes das membranas lipídicas. Por isso, baseado no que exposto, a estratégia de sintetizar um lipossoma revestido com ácido hialurônico na tentativa de aumentar o índice de seletividade do fármaco é de grande valia para futuras comprovações.



#### 4. MATERIAIS

Foram utilizados os seguintes reagentes para a síntese do colesterol modificado: azida de sódio, dimetilformamida (99,8%), clorofórmio (99,8%), ácido acético glacial (99,8%), éter etílico (98%), metanol (99,8%), diclorometano (99,5%), hexano (98,5%), acetato de etila (99,5%), acetona (99,5%), ácido clorídrico (37%), colesterol, anidrido succínico, *N,N*-dimetilaminopiridina, 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etanol, diisopropilcarbodiimida, paládio em carvão 10%, cianoborohidreto de sódio, fosfato de sódio dibásico heptahidratado, hidróxido de sódio, permanganato de potássio, bicarbonato de sódio, ninidrina e placas cromatográficas (CDD) de alumínio com sílica gel sem indicador de fluorescência. Todos reagentes foram comprados da empresa Sigma-Aldrich e os solventes descritos como anidro foram secados em peneira molecular 3A após estarem em contato por no mínimo 48 horas. Fosfatidilcolina de Soja (SPC) proveniente da Lipid Ingredients and Technologies. Ácido hialurônico proveniente de *Streptococcus equi* (MM 8~10 KDa) proveniente da empresa Pitney Bowes (USA), solução tampão (pH = 7,4) e água deionizada proveniente da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - Londrina. 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol proveniente foi cedido pelo grupo do Núcleo de Pesquisa em Química Biológica (NQBio) da UFSJ.



## 5. METODOLOGIA

### 5.1. SOLUÇÃO TAMPÃO E REVELADORES

Para solução tampão solução tampão- PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH=7,4) foram pesados 3,35 g de fosfato de sódio dibásico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em um Becker, depois 250 mL de água deionizada foram acrescentados e misturados. Por fim, o pH 7,4 foi atingido com a adição gradativa de uma solução de 0,1 M de HCl e mensurado com o auxílio do medidor de pH. O revelador de permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) foi feito quando 3 g de  $\text{KMnO}_4$  foram misturados a 2 g de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) em 5 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH). O revelador de ninidrina foi feito quando 2 mL de ninidrina foram adicionados a 94 mL de água deionizada e 6 mL de acetona, o material foi aquecido até a temperatura de 100 °C até manchas vermelhas começarem a aparecer. Os reveladores foram selados e guardados posteriormente no refrigerador.

### 5.2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras foram obtidos no espectrofotômetro FT-IR Spectrometer Spectrum Two, Perkin Elmer, acoplado ao acessório de reflectância total atenuada (ATR/FTIR) sendo as medidas feitas no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A análise de RMN foi registrada num espectrômetro Bruker Avance III, 400 MHz operado a uma frequência de 400,6 MHz para  $^1\text{H}$  e a 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , usando uma sonda direta de 5 mm, BBo, a 25 °C. Os espectros são expressos em ppm e calibrado de acordo com o sinal de solvente residual por deslocamentos químicos ( $\delta$ ).

### 5.4. SÍNTESE DO HEMISUCCINATO DE COLESTEROL

Para síntese do hemisuccinato de colesterol, 5,0 g de colesterol (13 mmol) e 3,9 g do anidrido succínico (39 mmol) foram vertidos em balão de fundo redondo de 150 mL juntos com 0,79 g de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) (6 mmol) e um volume



de 50 mL de diclorometano anidro por 3 dias. O solvente foi evaporado em rotaevaporador e depois 50 mL de éter etílico foram adicionados ao balão. O material foi misturado e vertido no funil de separação. Então, uma solução de 30 mL de HCl na concentração de 0,1 mol/L foi adicionada, o funil foi fechado e agitado e as fases separadas até o ponto que o pH da fase aquosa chegou a 3. Depois, a fase orgânica etérea foi vertida novamente no funil e lavada 10 vezes com 10 mL de água destilada. Ela foi separada e o sulfato de sódio anidrido foi adicionado para retirar o restante da água. Por fim, ela foi filtrada e o éter etílico evaporado. Observou-se o surgimento de um pó branco e a obtenção de 5,1 g do material, o que indica um rendimento de 81%.  
 $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.4 (1H, t, H-6), 4.66 (1H, m, H-3), 2.70 (2H, t, H-29), 2.62 (2H, t, H-30), 1.05 (3H, d, H-21), 0.94 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, d, H-27), 0.88 (3H, d, H-26), 0.70 (3H, s, H-18).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_{\text{C}}$ : 177.73, 171.53, 139.50, 122.75, 77.43, 76.71, 74.50, 56.70, 56.11, 50.01, 42.33, 39.74, 39.53, 36.98, 36.20, 35.82, 31.91, 31.87, 28.24, 28.04, 24.29, 23.85, 22.83, 22.60, 21.03, 19.32, 18.74, 11.84.

#### 5.5. SÍNTESE DA MOLÉCULA 2-(2-(2-AZIDOETOXI)ETOXI)ETANOL

Para formação da molécula azida, 1,724 mL de 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etanol (12 mmol) e 1,156 g de Azida de Sódio (17,8 mmol) foram misturados na presença de 10 mL de Dimetilformamida (DMF) em um balão de fundo redondo de 25 mL à temperatura de 50 °C por 4 dias. O produto foi levado ao rotavapor e a DMF foi evaporado. Posteriormente, foram acrescentados uma quantidade de 10 mL de água destilada e 10 mL de acetato de etila no balão junto com o produto em um funil de separação. Uma separação de fases foi observada. O funil foi levemente agitado e depois as fases foram separadas. A fase orgânica foi lavada mais três vezes no funil de separação com 10 mL de água, no final o material com a fase orgânica foi levado ao rotavapor e seu solvente evaporado. O material encontrado foi um óleo de aparência amarelada, com o rendimento de 88%.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_{\text{H}}$ : 3.75 (2H, t, H-32), 3.72-3.63 (8H, m, H-33, H-34, H-35, H-36), 3.42 (t, 2H, H-37).





$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_c$ : 70.69, 70.37, 70.31, 70.04, 61.76, 50.53.

#### 5.6. SÍNTESE DO COLEST-5-EN-3-OL ( $3\beta$ )-, 2-[2-(2-AZIDOETOXI)ETOXI] BUTANOATO DE ETILA (COL- $\text{N}_3$ )

Nessa etapa para a obtenção do colesterol com o espaçador 1g do hemisuccinato de colesterol (2,055 mmol) foram vertidos em um balão de fundo redondo de 50 mL juntos com 0,54 g da molécula 2-(2-(2-azidaetoxi)etoxi)etanol (3,08 mmol), 0,125 g de DMAP (1,03 mmol) e 0,512 mL/0,415 g de diisopropilcarbodiimida (DIC) (3,29 mmol). Por fim, uma quantia de 10 mL de diclorometano anidro foi utilizada como solvente. Após 24 horas o solvente foi evaporado em rotaevaporador e o material foi purificado por cromatografia em coluna (2 cm diâmetro, 16 cm de altura, eluente: Hex/AcOEt 75/25 – 400 mL) e foi obtido 0,471 g de um óleo transparente com rendimento de 35%.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_H$ : 5.38 (1H, t, H-6), 4.63 (1H, m, H-3), 4.28 (2H, t, H-32), 3.75-3.63 (10H, m, H-33, H-34, H-35, H-36, H-37), 2.67 (2H, t, H-29), 2.63 (2H, t, H-30), 1.03 (3H, d, H-21), 0.91 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, d, H-27), 0.88 (3H, d, H-26), 0.70 (3H, s, H-18).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_c$ : 172.38, 171.64, 139.55, 122.63, 77.40, 77.07, 76.76, 74.36, 70.69, 70.31, 69.06, 63.76, 56.68, 56.14, 50.03, 42.30, 41.58, 39.72, 39.51, 36.96, 36.58, 36.18, 35.79, 31.89, 31.84, 28.23, 28.01, 24.28, 23.82, 22.82, 22.57, 21.03, 19.30, 18.71, 11.85.

IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2391 (carbono alifático, C-H), 2103 (azida, C- $\text{N}_3$ ), 1734 (carbonila, C=O), 1540 (carbono olefínico, C=C).

#### 5.7. SÍNTESE DO COLEST-5-EN-3-OL ( $3\beta$ ) -, 2-[2-(2-AMINOETOXI)ETOXI] BUTANOATO DE ETILA (COL - $\text{NH}_2$ )

Para etapa de hidrogenação foram utilizados 98,2 mg do COL- $\text{N}_3$  (0,378 mmol) junto com 45 mg de carvão de paládio (0,378 mmol) em uma atmosfera de hidrogênio a pressão atmosférica e usando-se 10 mL de acetato de etila como solvente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até se observar todo o consumo do material de partida. Por fim, o meio reacional foi filtrado



em papel de filtro (usando-se três folhas) para retirada do carvão e depois o solvente foi evaporado em rotaevaporador. Um material sólido amarronzado foi observado. Foi-se mensurado a quantidade de material, e uma quantidade de 59 mg foi obtida como um óleo, isso corresponde a um rendimento de 62,1%.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.4 (1H, t, H-6), 4.66 (1H, m, H-3), 4.26 (2H, t,  $\text{H}_2\text{COOC}$ ), 3.75-3.52 (8H, m, H-33, H-34, H-35, H-36), 2.64 (2H, t, H-30), 2.63 (2H, t, H-37), 2.61 (2H, t, H-29), 1.05 (3H, d, H-21), 0.93 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, d, H-27), 0.88 (3H, d, H-26), 0.70 (3H, s, H-18).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_{\text{C}}$ : 172.40, 171.66, 139.65, 112.63, 77.40, 77.07, 76.76, 74.36, 70.69, 70.31, 69.06, 63.76, 56.68, 56.14, 50.03, 42.30, 41.58, 39.72, 39.51, 36.96, 36.58, 36.18, 35.79, 31.89, 31.84, 28.23, 28.01, 24.28, 23.82, 22.82, 22.57, 21.03, 19.30, 18.71, 11.85.

IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2391 (carbono alifático, C-H), 1734 (carbonila, C=O), 1540 (carbono olefínico, C=C).

#### 5.8. CONJUGAÇÃO DO COLESTEROL MODIFICADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO (COL-AH)

O procedimento foi feito quando 50 mg de ácido hialurônico (0,005 mmol) foram mensurados e adicionados à quantia de 5 mL de água destilada e 0,9 mL de uma solução de 99,8% de ácido acético em um balão de fundo redondo de 50 mL à temperatura de 60 °C, tudo foi deixado em agitação magnética por alguns minutos. Posteriormente, foram acrescentados 3 mg de cianoborohidreto de sódio (0,048 mmol). E, subsequentemente, foi adicionada uma alíquota de 1 mL, em uma concentração de 2 mg/mL em metanol, de COL-NH<sub>2</sub> (0,003 mmol), a reação foi monitorada por 48 horas por cromatografia de camada delgada. O consumo total do material foi conformado por cromatografia em camada delgada usando metanol e diclorometano (0,5:9,5 v/v) e ninidrina como revelador. Depois de observar o consumo total da amina, foram acrescentados 20 mL da solução do COL-NH<sub>2</sub> (0,030 mmol) e 7 mg de cianoborohidreto de sódio (0,112 mmol), o material reagido por mais 48 horas. Por fim, foi feita uma purificação do material através de uma coluna sephadex LH-20 com a água como solvente. As frações contendo o polissacarídeo tiveram solvente



evaporado em rotaevaporador. O material obtido foi um sólido transparente com o rendimento de 26,2%.

#### 5.9. FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS

Depois da síntese do colesterol modificado, quatro formulações de filmes lipídicos foram estabelecidas em proporções pré-estabelecidas (Tabela 1). Todos os componentes, tanto em estado sólido quanto em solução em metanol foram vertidos em viais de 10 mL para as formações dos filmes lipídicos. Logo após, 2 mL de uma solução contendo clorofórmio e metanol (1:1) foram vertidos e os materiais foram deixados para secar à temperatura ambiente.

Depois dos filmes lipídicos formados, 2 mL de solução tampão- PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH=7,4) foram vertidos nos viais, onde ocorreu a hidratação e formação dos lipossomas. As proporções e a concentração em milimol (mM) do fármaco estão descritos no texto, já a quantidade de massa referente a essas proporções e concentração do fármaco estará explícita na Tabela 1. Todos os valores foram relacionados aos 2 mL de solução tampão.

O filme lipídico convencional foi feito na proporção 7:3 de SPC (Fosfatidilcolina de Soja):Colesterol (COL), que posteriormente foi hidratado para formar o lipossoma convencional (LP), e extrudado por um sistema extrusor Avanti Polar Lipids®. As formulações restantes não conseguiram ser extrudadas, então seguiram um protocolo diferente.

Na continuação, houve a formulação do filme lipídico convencional carregado com o fármaco na proporção 7:3 de SPC:COL mais 1mM do fármaco para posteriormente formar o lipossoma convencional com fármaco (tiazolina) (LPF). A terceira formulação foi a do filme lipídico na proporção 7:2:1 de SPC:Colesterol modificado com Ácido Hialurônico (COL-AH):COL, que posteriormente com a hidratação formou o lipossoma modificado com AH (LPA). Por último, o filme lipídico na proporção 7:2:1 de SPC:COL-HA:COL mais 1mM do fármaco foi formulado para que houvesse a formação do lipossoma modificado com AH e carregado com o fármaco (LPAF). Depois de hidratados, foram sonicados em uma cuba ultrassônica L200-



Schuster por 2 minutos. Todas os lipossomas obtiveram uma cor esbranquiçadas ao final dos processos. Elas foram acondicionadas em frascos fechados e resfriadas à temperatura de 8°C.

Para obtenção da concentração de 1 mM do fármaco, primeiro foi necessário fazer uma solução estoque com uma maior concentração, ela foi de 3 mM em metanol. Então, utilizou-se da fórmula de diluição para obtenção da concentração necessária para que 2 mL de água, o resultado foi de 667 µL. O SPC e COL também foram obtidos através de soluções estoques, que estavam em concentrações de 6 mM e 10mM, respectivamente. Pela fórmula de diluição, foram utilizados 0,2152 µL de SPC para cada formulação lipossomal, 0,02 µL de colesterol para o COL na proporção 7:2:1 (LPAF e LPA) e de 0,06 µL na proporção 7:3 (LPF e LP).

Composições	SPC	COL	COL-AH	FÁRMACO (TIAZOLINA)
LP	1,078 mg (1,4 mmol)	0,2319 mg (0,6 mmol)	-	-
LPF	1,078 mg (1,4 mmol)	0,2319 mg (0,6 mmol)	-	0,55 mg (2 mmol)
LPA	1,078 mg (1,4 mmol)	39 µg (0,2 mmol)	3,86 mg (0,4mmol)	-
LPAF	1,078 mg (1,4 mmol)	39 µg (0,2 mmol)	3,86 mg (0,4mmol)	0,55 mg (2 mmol)

Tabela 1 – Composição das formulações lipossomais para 2 mL de solução tampão (Autoria própria, 2020).

#### 5.10. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

A medida do conteúdo de 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol encapsulado nos sistemas LPF e LPAF foi executada utilizando um espectrofotômetro UV/Vis – Modelo: Libra Biochromem comprimento de onda fixo de 232 nm. Primeiramente uma curva de calibração da 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol foi realizada usando



soluções padrões em 2 mL de metanol com concentrações variando entre de 0,125 e 1,5 mM.

Depois, a eficiência de 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol encapsulada nas amostras lipossomais LPF e LPAF foi determinada utilizando a técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação (Millipore, USA, ME Cut-off 10,000Da). Uma quantidade de 400 µL das amostras LPF e LPAF foram colocadas em eppendorfs com filtro e submetidas a uma ultracentrifugação por 1 hora (13000 rpm). A quantidade da substância bioativa que passou através do filtro foi determinada utilizando espectrofotometria no UV no comprimento de onda de 232 nm. O cálculo de eficiência foi realizado através da Equação 1:

$$\%Encapsulada = (C_i - C_x) / C_i \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que  $C_i$  e  $C_x$  representam, respectivamente, as concentrações iniciais e a analisada.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposta inicial deste projeto foi modificar a molécula de colesterol ao acoplá-la ao polissacarídeo, ácido hialurônico, para que ela possa ser incorporada como componente em um sistema lipossomal. Na Figura 15 está representado o esquema sintético para se obter a modificação desejada.

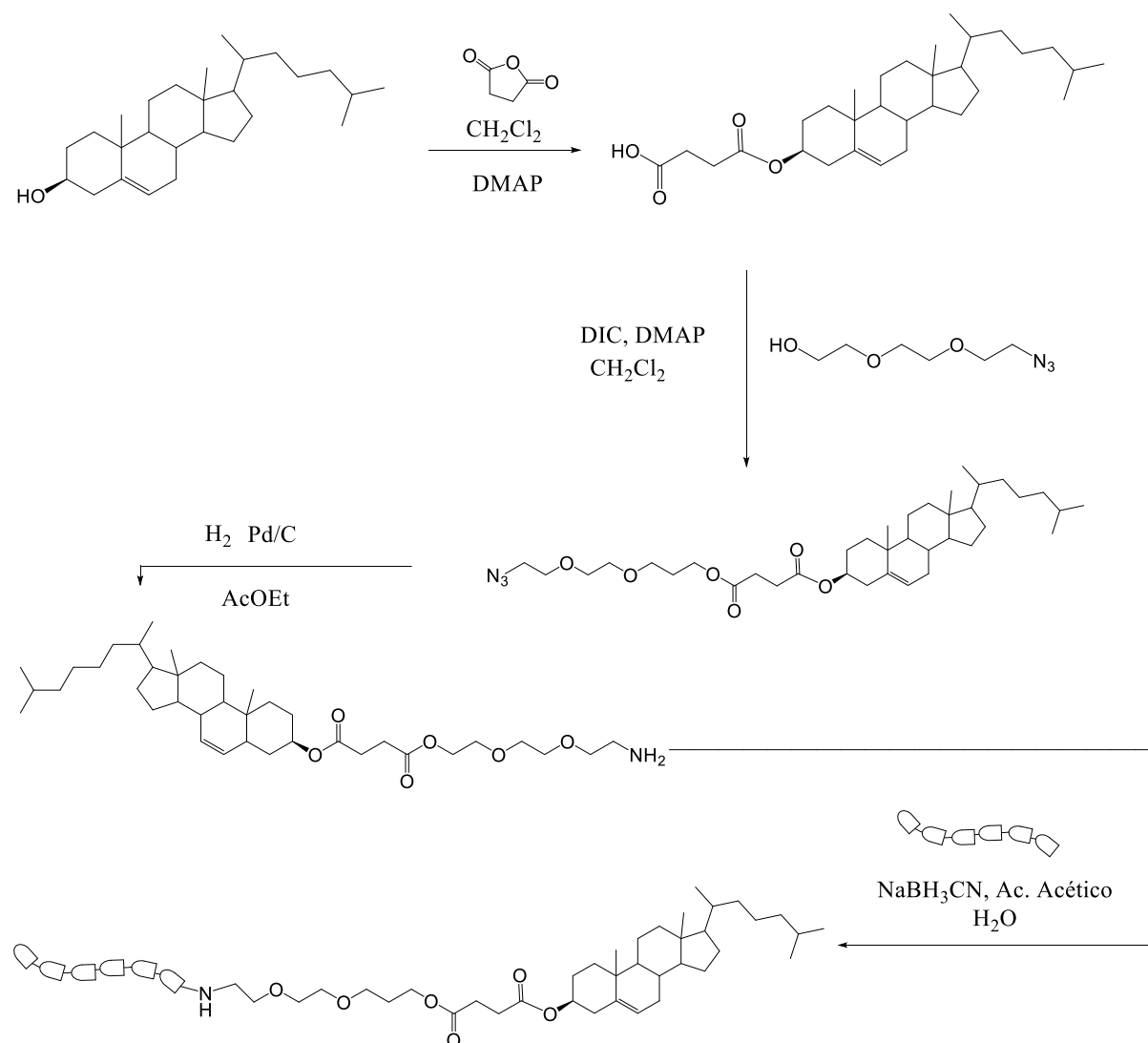


Figura 15- Síntese do colesterol conjugado ao ácido hialurônico (Autoria própria, 2020).

### 6.1. SÍNTESE DO HEMISUCCINATO DE COLESTEROL

Para primeira etapa foi necessário fazer a esterificação do colesterol usando-se anidrido succínico (Figura 16). Este material já foi relatado em algumas publicações e é chamado comercialmente por hemisuccinato de colesterol (CHEMS) (Bergstrand *et al.*, 2003; Hafez & Cullis, 2000; Sánchez *et al.*, 2011). Nessa etapa o DMAP foi utilizado como base da carbonila do anidrido succínico para uma maior rapidez da reação.

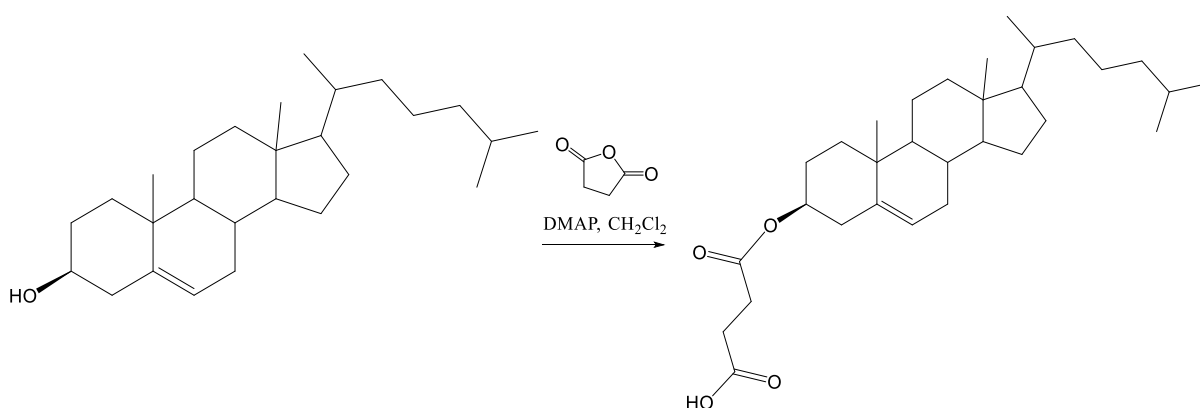


Figura 16 - Reação de esterificação do colesterol (Autoria própria, 2020).

Uma cromatografia por camada delgada foi realizada com um eluente composto por hexano e acetato de etila (v/v = 0,75/0,25) (Figura 17). Nela, pode-se observar que o colesterol (R) por apresentar caráter mais apolar, é mais arrastado na placa pelo eluente e se encontra na porção central da placa cromatográfica. Já o CHEMS (P), que apresenta um caráter mais polar, e interage mais fortemente com a fase estacionária e apresenta fator de retenção menor. Além disso, a ausência de mancha referente ao colesterol no ponto de aplicação P é indicativo de que a reação havia terminado. O ponto intermediário (I) é constituído pelo R e P, ele é feito para averiguar se há sobreposição de dos elementos envolvidos. Caso não houvesse, como é o caso, a reação teria ocorrida com sucesso.



Figura 17 - Cromatografia por Camada Delgada do CHEMS (Autoria Própria, 2020). Revelador: solução de permanganato de potássio e efluente: hexano/acetato de etila (v=0,75/0,25).

A confirmação da obtenção do produto foi feita por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e é ilustrada na Figura 18. Para facilitar o entendimento, os hidrogênios serão numerados de acordo com a numeração dos carbonos nas moléculas e a quantidade de hidrogênios será exposta no texto. Na Figura 18 se verifica que há um sinal característico em 5.40 ppm que é referente a 1 hidrogênio (H-6) ligado ao carbono da dupla ligação do esterol. Já o pico apresentado em 4.66 ppm é referente a 1 hidrogênio carbinólico (H-3) ligado ao carbono com a ligação éster, que apresenta deslocamento químico mais desblindado em relação ao mesmo hidrogênio no colesterol de partida o que indica a reação de esterificação. Há também dois picos característicos, um tripleto em 2.62 ppm e outro tripleto em 2.70 ppm referentes a 2 hidrogênios (H-29, H-30) dos metilenos do grupo succínico, o que indicou um sucesso na esterificação. As integrais foram mensuradas e se obteve uma proporção de 1:1:2:2 (H-6; H-3; H-29, H-30), o que corroborou a formação da molécula CHEMS. Quando comparado aos dados publicados na literatura, observam-se picos similares ao trabalho pesquisado por Wang *et al.* 2020.



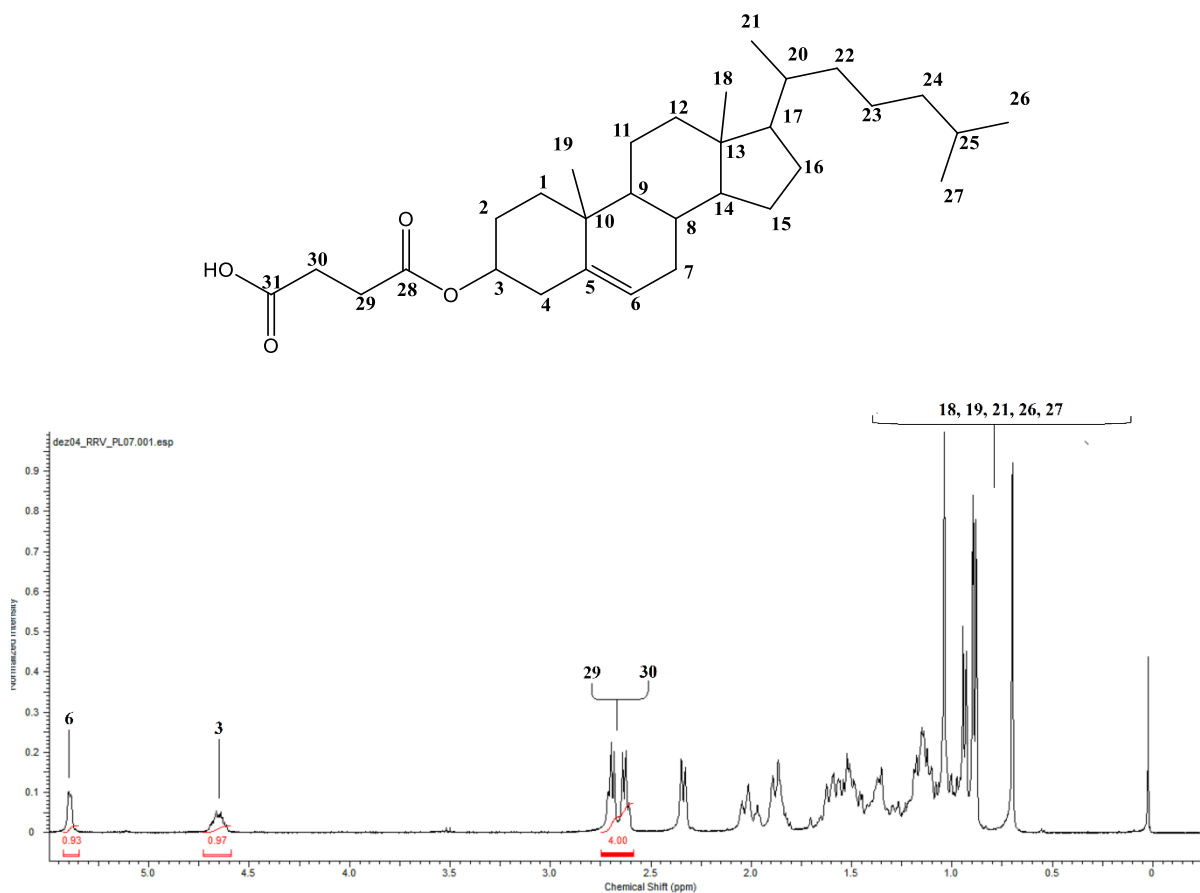


Figura 18 – Espectro  $^1\text{H}$  RMN 400MHz para frequência do H do hemisuccinato de colesterol. Solvente: clorofórmio deuterado. (Autoria própria, 2020).

Além destes sinais, observam-se também picos característicos de hidrogênios do colesterol, um singlete em 0.70 ppm característico de 3 hidrogênios (H-19) ligados ao C-19 e outro singlete é visto no pico 1.05 ppm pertencente aos 3 hidrogênios (H-18). Um duplete pertencente aos hidrogênios metílicos (H-21) de mesma numeração. E, por fim, dois dupletos em 0.88 ppm e 0.89 ppm característicos dos hidrogênios H-26 e H-27, respectivamente. O espectro  $^{13}\text{C}$  RMN apresentado na Figura 19 abaixo reforça o sucesso da reação.

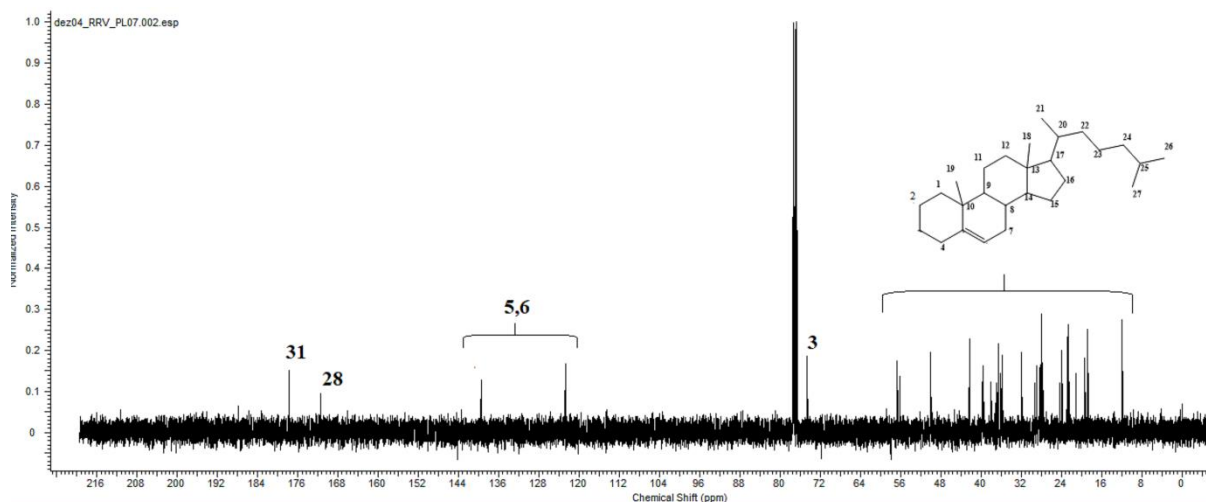


Figura 19 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) do hemissuccinato de colesterol (Autoria Própria, 2020). Solvente: clorofórmio deuterado.

Ao analisar o espectro  $^{13}\text{C}$  RMN da Figura 19 se pode observar a presença do esqueleto alifático do colesterol com picos entre 11.84 ppm e 56 ppm. Em 138 e 124 ppm estão os sinais relativos aos carbonos olefínicos (C-5; C-6) da estrutura e em 74 ppm o sinal do metileno ligado ao oxigênio. Os sinais do grupo succínico aparecem em duas regiões distintas do espectro, sendo uma de mais difícil identificação, localizados juntamente aos sinais do esqueleto alifático do colesterol. Ainda é possível identificar dois sinais de carbonilas, em 177.73 e 171.52 ppm, correspondentes às carbonilas dos grupos funcionais ácido succínico e éster do grupo succínico.

## 6.2. SÍNTESE DA MOLÉCULA 2-(2-(2-AZIDAETOXI)ETOXI)ETANOL

Essa etapa é importante para a formação do futuro espaçador. Nela houve a reação de substituição nucleofílica bimolecular ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) do cloro pela azida. Ela foi possível pois a azida faz o papel de um bom nucleófilo (Figura 20). Após quatro dias do início da reação sob aquecimento e em presença de excesso de azida de sódio, foi feita purificação do material por extração líquido/líquido e obteve-se um líquido viscoso amarelado com o rendimento de 88%

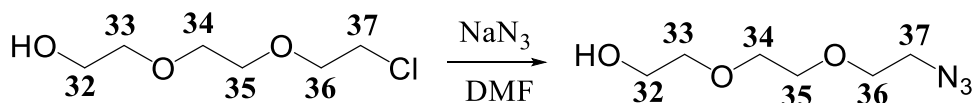


Figura 20– Reação entre de substituição do cloro pela azida (Autoria própria, 2020).

Para caracterização desta molécula, foram realizadas análises por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . No espectro de  $^1\text{H}$  RMN não ocorre alteração significativa dos deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios quando ocorre troca do grupo cloreto pelo grupo azida. Por outro lado, no espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 21), pode-se ver o pico em 50.68 ppm característico do carbono ligada a azida. Além disso não se observa sinal típico de carbono ligado a cloro na região de 43.3 ppm, o que confirmou a finalização da reação. Na literatura pode ver um trabalho feito por Baker *et al.*, 2013, que corrobora com os dados obtidos. Há uma marcação no pico 162.52 ppm que indica que não houve a retirada total do solvente DMF.

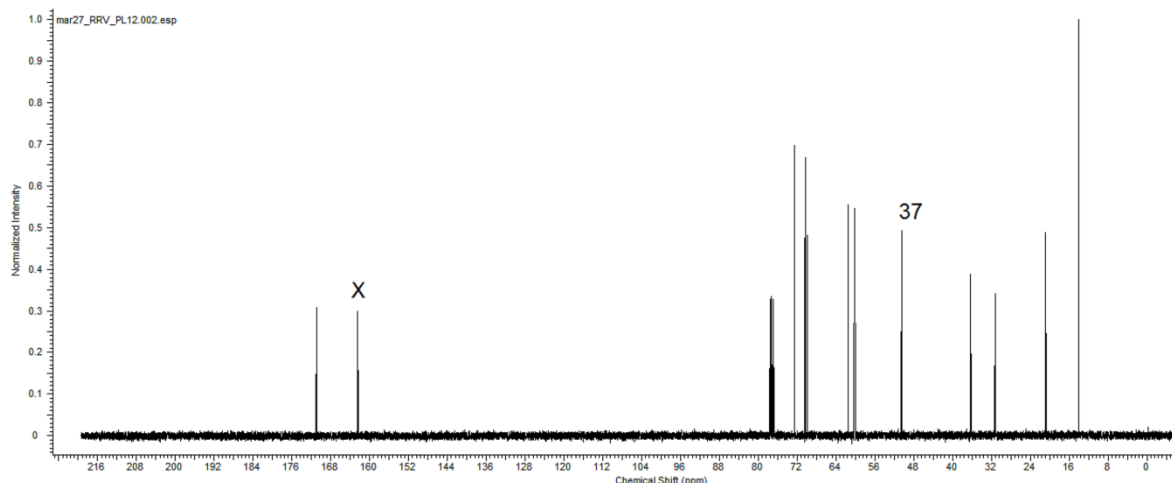


Figura 21– Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) do álcool com a azida. Solvente: clorofórmio deuterado (Autoria própria, 2020).

### 6.3. SÍNTESE DO COLEST-5-EN-3-OL ( $3\beta$ )-, 2-[2-(2-AZIDOETOXI)ETOXI] BUTANOATO DE ETILA) (COL-N<sub>3</sub>)

A próxima etapa foi a realização de uma reação de esterificação para obtenção do colesterol com o espaçador contendo grupo azida. Nessa reação, a utilização do DIC foi fundamental como ativador do ácido carboxílico ligado ao colesterol (Figura 22).

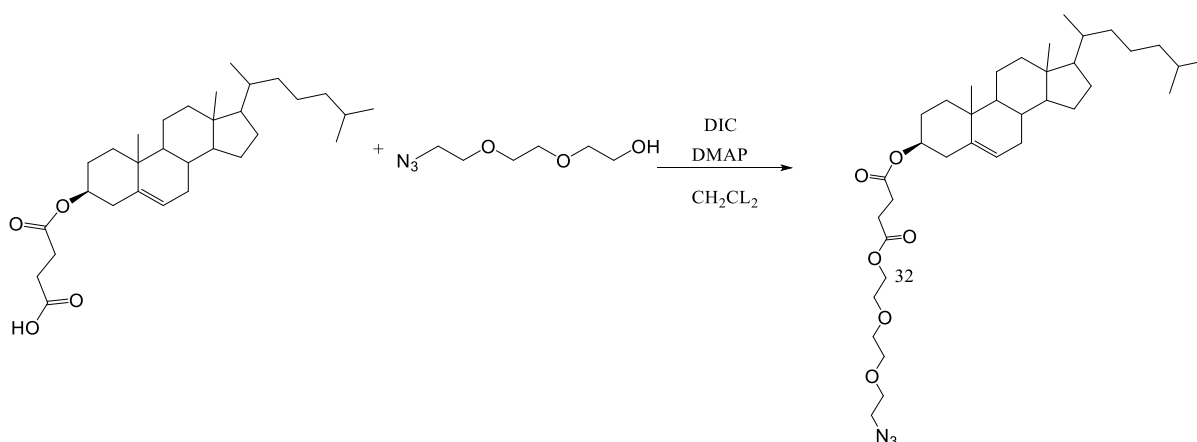


Figura 22 – Esterificação do colesterol modificado com anidrido succínico (Autoria própria, 2020).

O mecanismo (Figura 23) foi baseado na esterificação de Steglich. A esterificação de Steglich utiliza uma carbodiimida ao longo com 4-*N*, *N*-dimetilaminopiridina (DMAP) para ativar um ácido e permitir a formação de éster. Nesta reação, o ácido é primeiro ativado pela carbodiimida, nesse caso foi usada a *N*, *N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), para formar um intermediário ureia **5**. Para a síntese do composto éster, a adição do DMAP auxilia a reação. Já que o composto **5** forma um outro subproduto **6**, que é competitivo com o ataque nucleofílico do álcool **11**. A formação do subproduto **6** é lenta em comparação com o ataque nucleofílico de grupos amino. Então, um intermediário **8** é formado e reage com o álcool para regenerar DMAP e formar o composto éster **13**. As reações de acoplamento de carbodiimida são frequentemente realizadas em solventes clorados anidros (Lutjen et al., 2018).

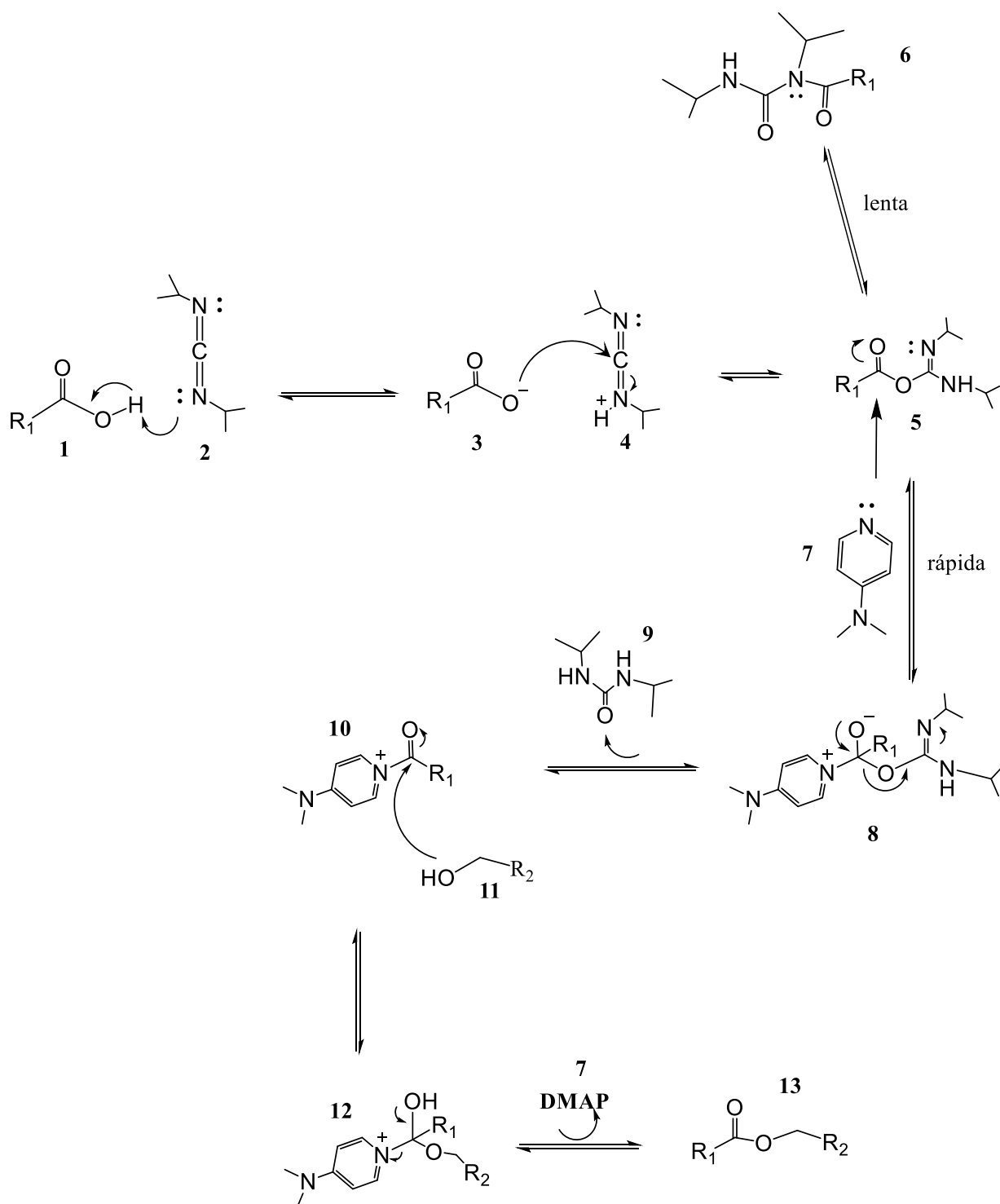


Figura 23– Mecanismo da esterificação de Steglich (Autoria própria, 2020).



Uma cromatografia por camada delgada foi logo feita para confirmar o final da reação, antes da purificação (Figura 24). Observou-se que o produto final (COL-N<sub>3</sub>) voltou a ter um caráter menos polar e que o CHEMS (R) foi totalmente consumido. Isso corroborou para indicar que houve o acoplamento.



Figura 24 – Cromatografia por camada delgada do COL-N<sub>3</sub> (Autoria Própria, 2020). Revelador: solução de permanganato de potássio e efluente: hexano/acetato de etila ( $v=0,75/0,25$ ).

Uma análise por espectroscopia no infravermelho do material purificado foi indicativa do sucesso da reação de esterificação. Na Figura 25 é destacada uma banda em 2103 cm<sup>-1</sup>, que é característica da presença de azida devido ao estiramento N=N.

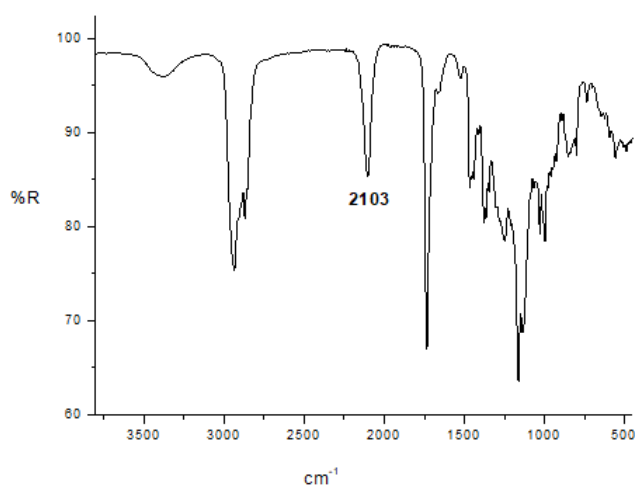


Figura 25- Espectro de absorção na região do infravermelho do material com espaçador (Autoria própria, 2020).



Pelo espectro  $^1\text{H}$  RMN (Figura 26) pode-se indicar que o acoplamento foi efetivado com sucesso. Tem-se um tripleto em 4.28 ppm característico de dois hidrogênios (H-32) do metileno diretamente ligado ao oxigênio que participa da função éster entre a molécula 2-(2-(2-azidaetoxi)etoxi)etanol e o CHEMS. Há também os picos observados entre 3.63 e 3.75 ppm, integral aproximadamente igual a 10, característicos dos hidrogênios dos metilenos apresentados pela molécula 2-(2-(2-azidaetoxi)etoxi)etanol (H-33; H-34; H-35; H-36; H-37). Por fim, além dos picos característicos dos metilenos do colesterol, dois tripletos em 2.70 e 2.66 ppm (H-29; H-30) relativos aos metilenos do succínico foram apresentados. Pode-se ver na literatura uma similaridade com o trabalho realizado por Mahou & Wandrey, 2012, que corrobora com o RMN apresentado.

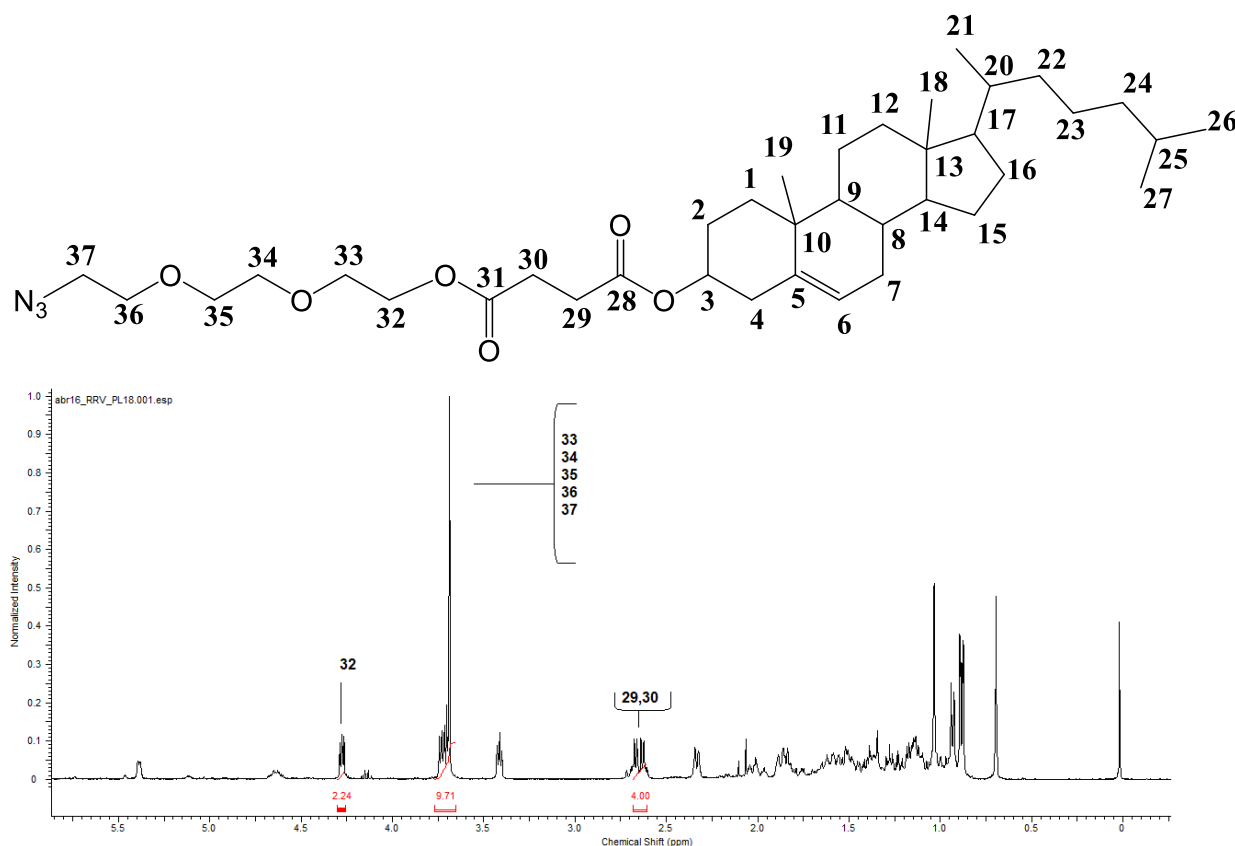


Figura 26 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do Col-N<sub>3</sub>. Solvente: clorofórmio deuterado (Autoria própria, 2020).

#### 6.4. SÍNTESE DO COLEST-5-EN-3-OL ( $3\beta$ )-, 2-[2-(2-AMINOETOXI)ETOXI]BUTANOATO DE ETILA (COL-NH<sub>2</sub>)

Na etapa da hidrogenação catalítica ocorreu a redução do grupo azida para amina (Figura 27).

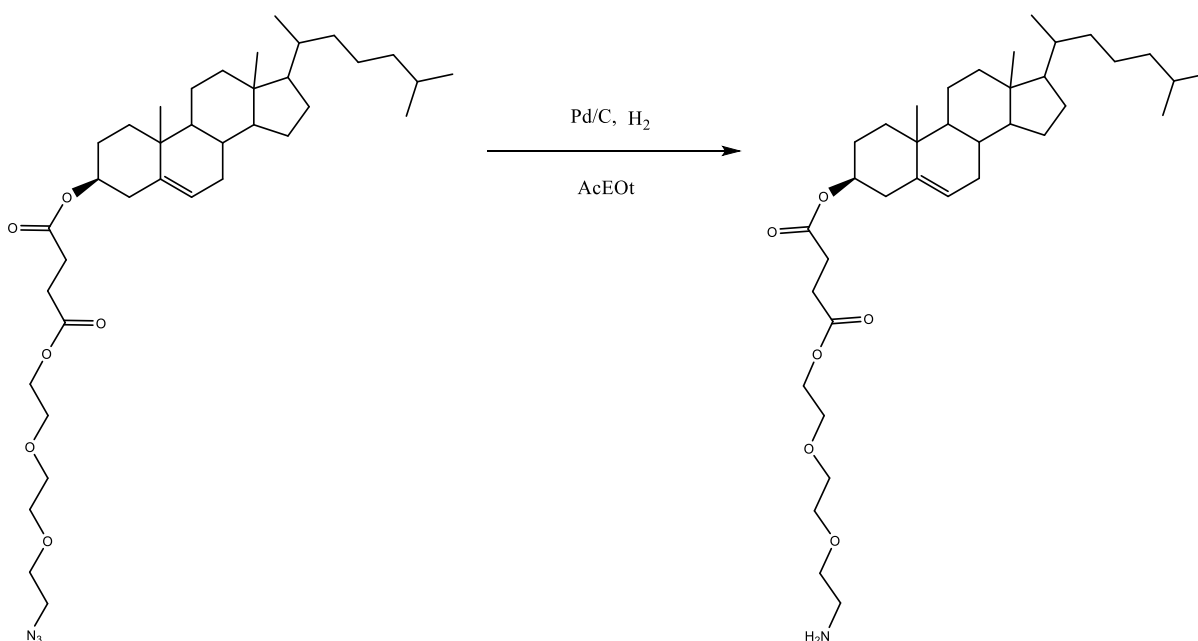


Figura 27– Etapa de hidrogenação catalítica (Autoria própria, 2020).

Para analisar o consumo do material de partida, uma cromatografia em camada delgada (Figura 28) em um eluente composto por hexano e acetato de etila (v/v= 0,75/0,25) foi realizada. Vê-se que o COL-N<sub>3</sub> (R) foi totalmente consumido e que o COL-NH<sub>2</sub> apresenta caráter mais polar, pois não foi arrastado pelo sistema de eluente. Este fato indicou o fim da reação e um possível sucesso na hidrogenação. Adicionalmente se identificou que no ponto de aplicação da reação, surgiu uma mancha, que não eluía em placa, que corava em rosa quando revelado com ninhidrina, indicando redução do grupo azida.



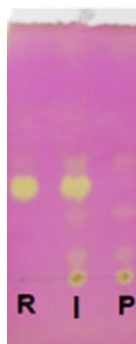


Figura 28 – Cromatografia por camada delgada do COL-NH<sub>2</sub> (Autoria própria, 2020). Revelador: solução de permanganato de potássio e efluente: hexano/acetato de etila (v=0,75/0,25).

O sucesso da reação foi confirmado por espectroscopia no infravermelho (Figura 29) e de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H (Figura 30). Na Figura 29 é observado o espectro no infravermelho desta substância. Além das demais bandas típicas do colesterol, se observou que não havia mais a banda típica de estiramento N=N de azida. Além disso, pode-se observar em aproximadamente 2931 cm<sup>-1</sup> e em aproximadamente 1734 cm<sup>-1</sup>, que são típicas de C-H e C=O. Outra banda que lhe é interessante de ver está em aproximadamente 1540 cm<sup>-1</sup>, que é uma banda de C=C, o que demonstrou que a redução foi quimiosseletiva para o grupo azida e não reduziu a dupla ligação.

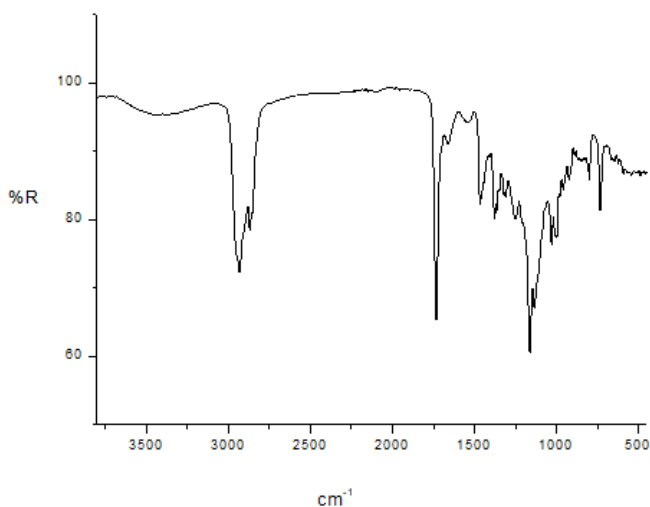


Figura 29– Espectro de absorção na região do infravermelho após a hidrogenação catalítica



Já na Figura 30 se pode ver uma mudança no espectro de  $^1\text{H}$  RMN feito do produto resultante da hidrogenação, onde na região onde haviam 10 sinais dos metilenos do grupo trietilenoglicol agora possuem somente 8 (H-33; H-34; H-35; H-36). Isto aconteceu, pois houve a redução do grupo azida para amino, portanto, um deslocamento químico do metileno ligado ao grupo foi apresentado. Ao mesmo tempo que na região do grupo succínico, onde antes apareciam 4 hidrogênios agora estão presentes 6 hidrogênios (H-29; H-30; H-37), isso indicou que o metileno citado acima agora absorve nessa região. Por fim, ainda é possível identificar o sinal em 5 ppm relativo ao hidrogênio olefínico, confirmando que a redução foi seletiva para grupo azida. Assim, pode-se falar que a reação de hidrogenação ocorreu com sucesso. Dois trabalhos corroboram com o RMN apresentado, Mahou & Wandrey. 2012 e Song *et al.* 2019.

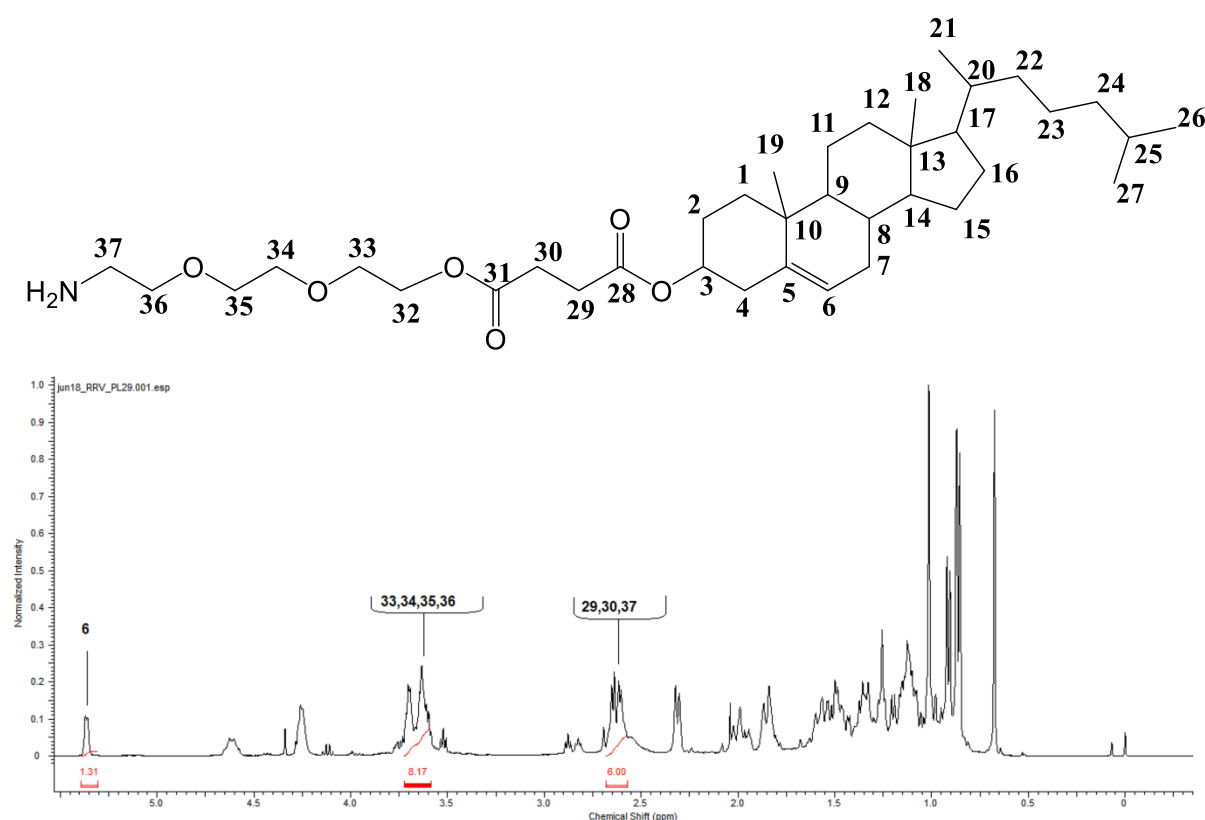


Figura 30 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) depois da hidrogenação catalítica (Autoria, própria, 2020).



## 6.5. SÍNTESE DO COLESTEROL MODIFICADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO

Essa é última etapa antes das formulações lipossomais, onde se obteve o acoplamento do ácido hialurônico ao COL-NH<sub>2</sub>. O processo ocorreu em meio aquoso com caráter ácido, houve a adição de uma pequena quantia de ácido acético para que pH ficasse em torno de 4.0~5.0. O meio ácido faz com que haja um equilíbrio da forma carbonílica e hemicetálica em meio aquoso da carbonila da unidade redutora do polissacarídeo (Buffa *et al.*, 2019). A função aldeído/cetona e a amina primária reagem posteriormente e a originam o intermediário **1**, então uma base de Schiff (imina) é formada a partir deste como resultado da eliminação da água **2** (Afanasyev *et al.*, 2019; Gusak *et al.*, 2015; Smith, 2020) (Figura 31).

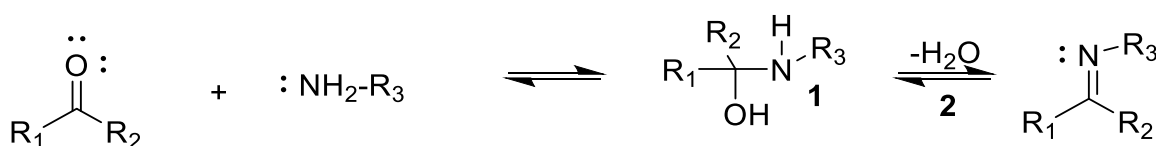


Figura 31 – Formação da imina (Autoria própria, 2020).

A reação procede facilmente de imina para amina com o auxílio de vários agentes de redução. Agentes oriundos dos complexos borohidretos estão entre os mais populares, entre eles se destaca o cianoborohidreto de sódio (NaBH<sub>3</sub>CN). A reação ocorre, pois, a imina pode ser protonada e gerar um carbono mais eletrofílico e assim permite o ataque do hidreto (Afanasyev *et al.*, 2019; Gusak *et al.*, 2015; Smith, 2020). Além disso, o cianoborohidreto de sódio é um agente redutor fraco e é pouco eficiente na redução de outros compostos carbonílicos, portanto sendo quimiosseletivo para iminas (Figura 32).

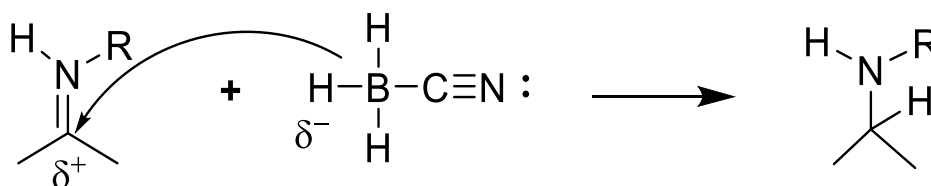


Figura 32 – Aminação redutiva com cianoborohidreto de sódio (Autoria própria, 2020).



Na Figura 33 é ilustrada a reação para obtenção do colesterol modificado com o ácido hialurônico. A técnica utilizada para analisar a reação foi a cromatografia de camada delgada. A estratégia foi baseada pelo conhecimento de que o ácido hialurônico não elui facilmente na cromatografia, então monitorou-se o derivado de colesterol. A tática foi acrescentar uma pequena quantidade do COL-NH<sub>2</sub> para observar o consumo total da molécula e analisar se esta molécula foi conjugada ao ácido hialurônico. Na Figura 34, pode-se ver placa cromatográfica obtida após 48 horas do início da reação. O eluente utilizado foi metanol e diclorometano (v/v = 0,05:0,95). O metanol apresenta uma polaridade muito superior à do diclorometano, por isso ele foi utilizado em uma pequena quantidade, ele foi capaz de arrastar o COL-NH<sub>2</sub>, que é uma molécula menor do que o COL-AH, isso foi visto na placa cromatográfica e corroborou com a estratégia ao demonstrar o consumo total da molécula.

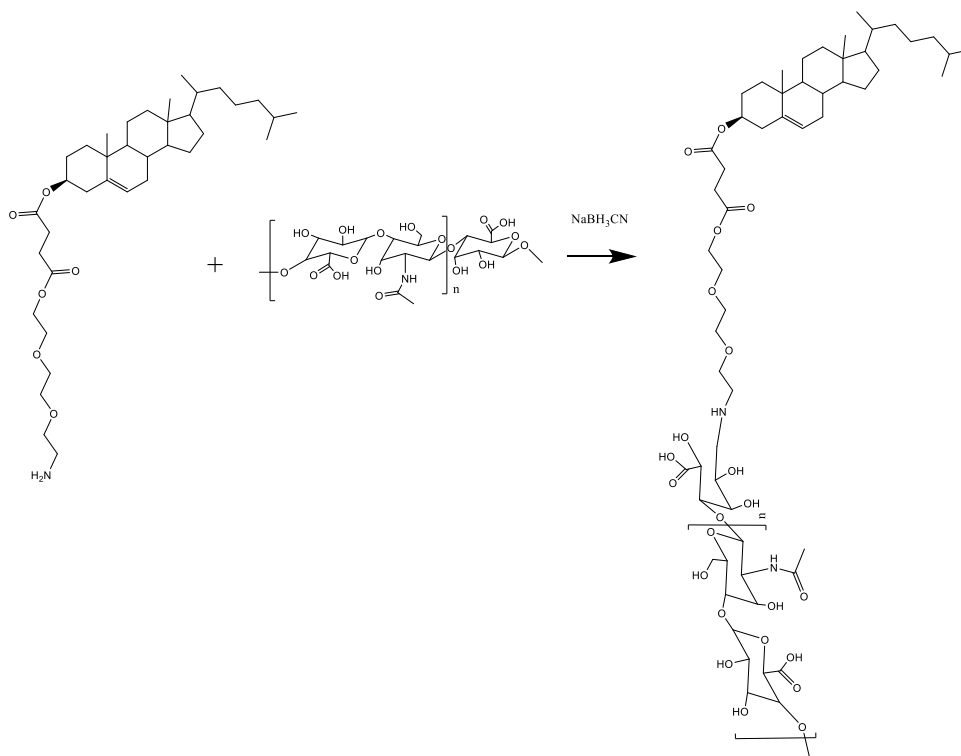


Figura 33– Acoplamento do ácido hialurônico (Autoria própria, 2020).



Por fim, o COL- NH<sub>2</sub> foi acrescentado em excesso por mais 48 horas para que permitisse que no final se obtivesse apenas o derivado de ácido hialurônico conjugado ao colesterol e o COL-NH<sub>2</sub>. Como o colesterol com terminação amino é uma molécula bem menor comparada ao COL-AH, foi possível conseguir purificá-la através da cromatografia por exclusão de tamanho.



Figura 34– Imagem da CDD da reação (Autoria própria, 2020). Revelador: solução de ninidrina e eluente: metanol/diclorometano (v=0,05/0,95).

#### 6.6. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DO 10-((4,5-DIHIDROTHIAZOL-2-IL)TIO)DECAN-1-OL

Após preparado o colesterol modificado com AH, uma formulação lipossomal foi feita utilizando SPC e colesterol normal e modificado nas razões 7:3, gerando duas formulações: um SPC:Colesterol convencional sem e com fármaco (LP; LPF). E outra formulação utilizando SPC, colesterol modificado com AH e colesterol na proporção 7:2:1, gerando duas formulações, um com e outra sem o fármaco (LPA; LPAF). Pela curva de calibração obtida (Figura 35), pôde-se obter a Eficiência de Encapsulamento (EE%). A curva de calibração serviu de base para medir a eficiência de encapsulamento das formulações LPF e LPAF, onde alíquotas de 400 µL foram retiradas com uma concentração de 1 mM do fármaco e centrifugadas por 1 hora em ponteiras com filtro. Porém, essa quantia não foi suficiente para que ocorresse a leitura no UV/Vis, então foram adicionados mais 300 µL de solução tampão (pH =7,4) para que as leituras fossem realizadas. Utilizou-se a fórmula de diluição para achar a concentração nova de 0,571428 mM (Ci)

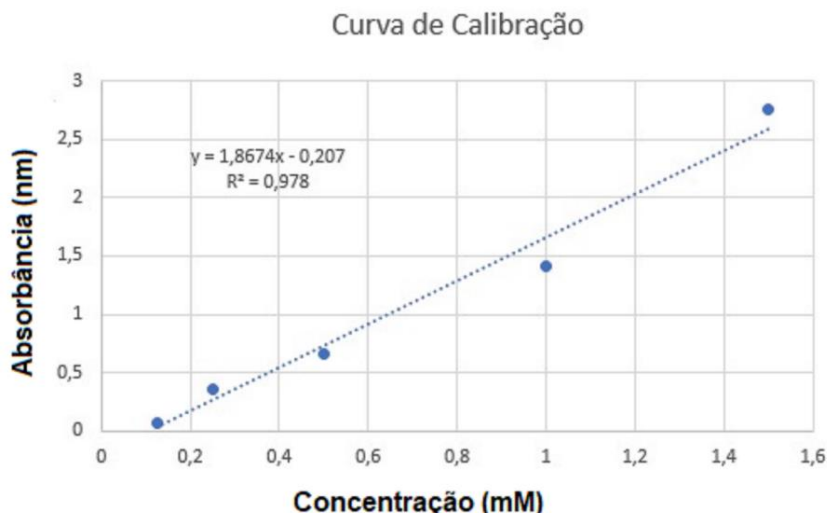


Figura 35– Curva de calibração do 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol (Autoria própria, 2020).

As absorbâncias obtidas foram de LPF = 0,248 nm e LPAF = 0,137 nm, elas foram usadas para calcular as concentrações de cada formulação através da equação da reta da Figura 35. A concentrações obtidas estão ilustradas na Tabela 2.

Formulações	Absorbância (nm)	Concentração (mM) (Cx)
<b>LPF</b>	<b>0,248</b>	<b>0,243654</b>
<b>LPAF</b>	<b>0,137</b>	<b>0,184213</b>

Tabela 2 – Tabela com valores de absorbância e concentração (Autoria própria, 2020).

A eficiência de encapsulamento (EE%) foi calculada pela Equação 1, a formulação LPF então obteve uma eficiência de encapsulamento de acordo com a Equação 2.

$$EE\% = \frac{0,571428 - 0,243654}{0,571428} \times 100 = 57,36\% \quad \text{Eq. 2}$$

Já o LPAF teve a eficiência de acordo com a Equação.



$$EE\% = \frac{0,571428 - 0,184213}{0,571428} \times 100 = 67,76\% \quad \text{Eq. 3}$$

Pôde-se perceber que houve uma melhoria no encapsulamento do lipossoma modificado.



## **7. CONCLUSÃO**

Através das análises de RMN, IV e cromatografia em camada delgada se pode concluir que houve um êxito na bioconjugação do ácido hialurônico à molécula do colesterol por meio de sínteses químicas. A proposta deste lipídio modificado permite a conjugação deste carboidrato e possivelmente outras biomoléculas.

Foram feitas quatro formulações protocoladas sem e com o fármaco 10-((4,5-dihidrotiazol-2-il)tio)decan-1-ol. Quando analisadas as eficiências de encapsulamento, percebeu-se que houve uma melhoria ao comparar a formulação modificada com ácido hialurônico à formulação convencional, isso indicou que o ácido hialurônico impediu a saída prematura do fármaco.

As próximas etapas serão focadas no método de extrusão, para medir os tamanhos das partículas e suas eficiências de encapsulamento. E, posteriormente, as formulações serão levadas para análise biológica e assim, observar-se alterações no índice de seletividade.





## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acoba, M. G., Senoo, N., & Claypool, S. M. (2020). Phospholipid ebb and flow makes mitochondria go. *Journal of Cell Biology*, 219(8 August), 1–21. <https://doi.org/10.1083/JCB.202003131>
- Adekiya, T. A., Kondiah, P. P. D., Choonara, Y. E., Kumar, P., & Pillay, V. (2020). A Review of Nanotechnology for Targeted Anti-schistosomal Therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(January), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00032>
- Afanasyev, O. I., Kuchuk, E., Usanov, D. L., & Chusov, D. (2019). Reductive Amination in the Synthesis of Pharmaceuticals [Review-article]. *Chemical Reviews*, 119(23), 11857–11911. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00383>
- Ahmed, K. S., Hussein, S. A., Ali, A. H., Korma, S. A., Lipeng, Q., & Jinghua, C. (2019). Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting*, 27(7), 742–761. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>
- Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., & Zarghami, N. (2013). *Liposome : classification , preparation , and applications*. 1–9.
- Albuquerque, H. M. T., Santos, C. M. M., & Silva, A. M. S. (2019). Cholesterol-based compounds: Recent advances in synthesis and applications. *Molecules*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/molecules24010116>
- Ali, M. A., & Islam, M. T. (2019). Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-06115-9>
- Baker, Y. R., Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., & Spring, D. R. (2013). Design and synthesis of a biotinylated chemical probe for detecting the molecular targets of an inhibitor of the production of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin. *Molecules*, 18(10), 11783–11796. <https://doi.org/10.3390/molecules181011783>
- Bandara, S. R., Molley, T. G., Kim, H., Bharath, P. A., Kilian, K. A., & Leal, C. (2020). The structural fate of lipid nanoparticles in the extracellular matrix. *Materials Horizons*, 7(1), 125–134. <https://doi.org/10.1039/c9mh00835g>
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238–252. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
- Barateiro, A., Pereira, M. L. M., Epiphanyo, Os., & Marinho, C. R. F. (2019). Contribution of murine models to the study of malaria during pregnancy. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01369>
- Beeson, J. G., Rogerson, S. J., Cooke, B. M., Reeder, J. C., Chai, W., Lawson, A. M., Molyneux, M. E., & Brown, G. V. (2000). Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nature Medicine*, 6(1), 86–90. <https://doi.org/10.1038/71582>
- Bergstrand, N., Arfvidsson, M. C., Kim, J. M., Thompson, D. H., & Edwards, K. (2003). Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes. *Biophysical Chemistry*, 104(1), 361–379. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(03\)00011-5](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00011-5)
- Briuglia, M. L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D. A. (2015). Influence of



- cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, 5(3), 231–242. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>
- Buffa, R., Nešporová, K., Basarabová, I., Halamková, P., Svozil, V., & Velebný, V. (2019). Synthesis and study of branched hyaluronic acid with potential anticancer activity. *Carbohydrate Polymers*, 223(July). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115047>
- Carlton, J. M. (2018). *and Resistance Mechanisms*. 359(6372), 2017–2019.
- Chai, W., Beeson, J. G., Kogelberg, H., Brown, G. V., & Lawson, A. M. (2001). Inhibition of adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by structurally defined hyaluronic acid dodecasaccharides. *Infection and Immunity*, 69(1), 420–425. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.420-425.2001>
- Chen, C., Ng, D. Y. W., & Weil, T. (2020). Polymer bioconjugates: Modern design concepts toward precision hybrid materials. *Progress in Polymer Science*, 105, 101241. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101241>
- Coban, C. (2020). The host targeting effect of chloroquine in malaria. *Current Opinion in Immunology*, 66, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.07.005>
- Crommelin, D. J. A., van Hoogevest, P., & Storm, G. (2020). The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? *Journal of Controlled Release*, 318(November 2019), 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.023>
- Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., & Akbarzadeh, A. (2016). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(1), 381–391. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633>
- de Araújo, D. R., Ribeiro, L. N. de M., & de Paula, E. (2019). Lipid-based carriers for the delivery of local anesthetics. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16(7), 701–714. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1629415>
- Devaux, C. A., Rolain, J. M., Colson, P., & Raoult, D. (2020). New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(5). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105938>
- Duan, Y., Dhar, A., Patel, C., Khimani, M., Neogi, S., Sharma, P., Siva Kumar, N., & Vekariya, R. L. (2020). A brief review on solid lipid nanoparticles: Part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC Advances*, 10(45), 26777–26791. <https://doi.org/10.1039/d0ra03491f>
- Dufaÿ Wojcicki, A., Hillaireau, H., Nascimento, T. L., Arpicco, S., Taverna, M., Ribes, S., Bourge, M., Nicolas, V., Bochot, A., Vauthier, C., Tsapis, N., & Fattal, E. (2012). Hyaluronic acid-bearing lipoplexes: Physico-chemical characterization and in vitro targeting of the CD44 receptor. *Journal of Controlled Release*, 162(3), 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.015>
- Eloy, J. O., Claro de Souza, M., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J., & Marchetti, J. M. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345–363. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.029>



- Elzahhar, P., Belal, A. S. F., Elamrawy, F., & Helal, N. A. (2019). Chapter 11 and Future Perceptions. In *Pharmaceutical Nanotechnology: Basic Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 2000). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9516-5>
- Ercole, F., Whittaker, M. R., Quinn, J. F., & Davis, T. P. (2015). Cholesterol modified self-assemblies and their application to nanomedicine. *Biomacromolecules*, *16*(7), 1886–1914. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00550>
- Eroğlu, İ., & İbrahim, M. (2020). Liposome–ligand conjugates: a review on the current state of art. *Journal of Drug Targeting*, *28*(3), 225–244. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2019.1648479>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *107*(5), 337–364. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200405001>
- Flores, J., White, B. M., Brea, R. J., Baskin, J. M., & Devaraj, N. K. (2020). Lipids: chemical tools for their synthesis, modification, and analysis. *Chemical Society Reviews*, *49*(14), 4602–4614. <https://doi.org/10.1039/d0cs00154f>
- Guimarães, D. S. M., de Sousa Luz, L. S., do Nascimento, S. B., Silva, L. R., de Miranda Martins, N. R., de Almeida, H. G., de Souza Reis, V., Maluf, S. E. C., Budu, A., Marinho, J. A., Abramo, C., Carmona, A. K., da Silva, M. G., da Silva, G. R., Kemmer, V. M., Butera, A. P., Ribeiro-Viana, R. M., Gazarini, M. L., Júnior, C. S. N., ... de Pilla Varotti, F. (2019). Improvement of antimalarial activity of a 3-alkylpyridine alkaloid analog by replacing the pyridine ring to a thiazole-containing heterocycle: Mode of action, mutagenicity profile, and Caco-2 cell-based permeability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *138*(July), 105015. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105015>
- Gusak, K. N., Ignatovich, Z. V., & Koroleva, E. V. (2015). New potential of the reductive alkylation of amines. *Russian Chemical Reviews*, *84*(3), 288–309. <https://doi.org/10.1070/rcr4443>
- Hafez, I. M., & Cullis, P. R. (2000). Cholesteryl hemisuccinate exhibits pH sensitive polymorphic phase behavior. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1463*(1), 107–114. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00186-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00186-8)
- Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(5), 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Hashemzadeh, H., Javadi, H., & Darvishi, M. H. (2020). Study of Structural stability and formation mechanisms in DSPC and DPSM liposomes: A coarse-grained molecular dynamics simulation. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58730-z>
- Hermanson, G. T. (2013). Bioconjugate Techniques: Third Edition. In *Bioconjugate Techniques: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>
- Hossen, S., Hossain, M. K., Basher, M. K., Mia, M. N. H., Rahman, M. T., & Uddin, M. J. (2019). Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. In *Journal of Advanced Research* (Vol. 15). Cairo



- University. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.005>
- Ibaraki, H., Kanazawa, T., Oogi, C., Takashima, Y., & Seta, Y. (2019). Effects of surface charge and flexibility of liposomes on dermal drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 50(December 2018), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.028>
- Ismail, M., Ling, L., Du, Y., Yao, C., & Li, X. (2018). Liposomes of dimeric artesunate phospholipid: A combination of dimerization and self-assembly to combat malaria. *Biomaterials*, 163, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.026>
- Ito, T., Iida-Tanaka, N., & Koyama, Y. (2008). Efficient in vivo gene transfection by stable DNA/PEI complexes coated by hyaluronic acid. *Journal of Drug Targeting*, 16(4), 276–281. <https://doi.org/10.1080/10611860801900728>
- Ju, R. J., Cheng, L., Qiu, X., Liu, S., Song, X. L., Peng, X. M., Wang, T., Li, C. Q., & Li, X. T. (2018). Hyaluronic acid modified daunorubicin plus honokiol cationic liposomes for the treatment of breast cancer along with the elimination vasculogenic mimicry channels. *Journal of Drug Targeting*, 26(9), 793–805. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1428809>
- Kaddah, S., Khreich, N., Kaddah, F., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2018). Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. *Food and Chemical Toxicology*, 113(November 2017), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.017>
- Kalia, J., & Raines, R. (2009). Advances in Bioconjugation. *Current Organic Chemistry*, 14(2), 138–147. <https://doi.org/10.2174/138527210790069839>
- Khan, A. A., Allemailem, K. S., Almatroodi, S. A., Almatroudi, A., & Rahmani, A. H. (2020). Recent strategies towards the surface modification of liposomes: an innovative approach for different clinical applications. *3 Biotech*, 10(4). <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2144-3>
- Kohli, A. G., Kierstead, P. H., Venditto, V. J., Walsh, C. L., & Szoka, F. C. (2014). Designer lipids for drug delivery: From heads to tails. *Journal of Controlled Release*, 190, 274–287. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.047>
- Koleini, N., Nickel, B. E., Edel, A. L., Fandrich, R. R., Ravandi, A., & Kardami, E. (2019). Oxidized phospholipids in Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 303(November 2018), 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.032>
- Kölmel, D. K., & Kool, E. T. (2017). Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chemical Reviews*, 117(15), 10358–10376. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>
- Kumari, P., Kumari, M., & Kashyap, H. K. (2019). Counter-effects of ethanol and cholesterol on the heterogeneous PSM-POPC lipid membrane: A molecular dynamics simulation study. *Journal of Physical Chemistry B*. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07107>
- Le, N. T. T., Cao, V. Du, Nguyen, T. N. Q., Le, T. T. H., Tran, T. T., & Thi, T. T. H. (2019). Soy lecithin-derived liposomal delivery systems: Surface modification and current applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194706>
- Lila, A. S. A., & Ishida, T. (2017). Liposomal delivery systems: Design optimization and



- current applications. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00624>
- Liu, H., Bolleddula, J., Nichols, A., Tang, L., Zhao, Z., & Prakash, C. (2020). Metabolism of bioconjugate therapeutics: why, when, and how? *Drug Metabolism Reviews*, 52(1), 66–124. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1716784>
- Lutjen, A. B., Quirk, M. A., Barbera, A. M., & Kolonko, E. M. (2018). Synthesis of (E)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(19), 5291–5298. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.04.007>
- Mahou, R., & Wandrey, C. (2012). Versatile route to synthesize heterobifunctional poly(ethylene glycol) of variable functionality for subsequent pegylation. *Polymers*, 4(1), 561–589. <https://doi.org/10.3390/polym4010561>
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Abedi-Gaballu, F., Abbaspour, S., Ghasabi, M., Yekta, R., Shirjang, S., Dehghan, G., Hamblin, M. R., & Baradaran, B. (2020). Hyaluronic acid-decorated liposomal nanoparticles for targeted delivery of 5-fluorouracil into HT-29 colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), 6817–6830. <https://doi.org/10.1002/jcp.29576>
- Marqués-Gallego, P., & De Kroon, A. I. P. M. (2014). Ligation strategies for targeting liposomal nanocarriers. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/129458>
- Marques, J., Valle-Delgado, J. J., Urbán, P., Baró, E., Prohens, R., Mayor, A., Cisteró, P., Delves, M., Sinden, R. E., Grandfils, C., de Paz, J. L., García-Salcedo, J. A., & Fernández-Busquets, X. (2017). Adaptation of targeted nanocarriers to changing requirements in antimalarial drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(2), 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.09.010>
- Mo, L., Song, J. G., Lee, H., Zhao, M., Kim, H. Y., Lee, Y. J., Ko, H. W., & Han, H. K. (2018). PEGylated hyaluronic acid-coated liposome for enhanced in vivo efficacy of sorafenib via active tumor cell targeting and prolonged systemic exposure. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(2), 557–567. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.12.003>
- Mohamed, M., Abu Lila, A. S., Shimizu, T., Alaaeldin, E., Hussein, A., Sarhan, H. A., Szebeni, J., & Ishida, T. (2019). PEGylated liposomes: immunological responses. *Science and Technology of Advanced Materials*, 20(1), 710–724. <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1627174>
- Molavipordanjani, S., & Hosseinimehr, S. J. (2019). Strategies for Conjugation of Biomolecules to Nanoparticles as Tumor Targeting Agents. *Current Pharmaceutical Design*, 25(37), 3917–3926. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190903154847>
- Molina-Franky, J., Cuy-Chaparro, L., Camargo, A., Reyes, C., Gómez, M., Salamanca, D. R., Patarroyo, M. A., & Patarroyo, M. E. (2020). Plasmodium falciparum pre-erythrocytic stage vaccine development. *Malaria Journal*, 19(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-3141-z>
- Morzycki, J. W. (2014). Recent advances in cholesterol chemistry. *Steroids*, 83, 62–79. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.02.001>



- Narain, R. (2014). Chemistry of Bioconjugates. In *Chemistry of Bioconjugates*. <https://doi.org/10.1002/9781118775882>
- Noble, G. T., Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T., & Bilgicer, B. (2014). Ligand-targeted liposome design: Challenges and fundamental considerations. *Trends in Biotechnology*, 32(1), 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.007>
- Olsman, M., Sereti, V., Andreassen, K., Snipstad, S., van Wamel, A., Eliassen, R., Berg, S., Urquhart, A. J., Andresen, T. L., & Davies, C. de L. (2020). Ultrasound-mediated delivery enhances therapeutic efficacy of MMP sensitive liposomes. *Journal of Controlled Release*, 325(June), 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.024>
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects 10 Technology 1007 Nanotechnology 03 Chemical Sciences 0306 Physical Chemistry (incl. Structural) 03 Chemical Sciences 0303 Macromolecular and Materials Chemistry 11 Medical and He. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- Poon, C., & Patel, A. A. (2020). Organic and inorganic nanoparticle vaccines for prevention of infectious diseases. *Nano Express*, 1(1), 012001. <https://doi.org/10.1088/2632-959x/ab8075>
- Prudêncio, M., Rodriguez, A., & Mota, M. M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: The Plasmodium liver stage. *Nature Reviews Microbiology*, 4(11), 849–856. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1529>
- Riaz, M. K., Riaz, M. A., Zhang, X., Lin, C., Wong, K. H., Chen, X., Zhang, G., Lu, A., & Yang, Z. (2018). Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010195>
- Saadat, E., Amini, M., Khoshayand, M. R., Dinarvand, R., & Dorkoosh, F. A. (2014). Synthesis and optimization of a novel polymeric micelle based on hyaluronic acid and phospholipids for delivery of paclitaxel, in vitro and in-vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 475(1–2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.030>
- Sánchez, M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2011). New pH-sensitive liposomes containing phosphatidylethanolamine and a bacterial dirhamnolipid. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.09.008>
- Saraf, S., Jain, A., Tiwari, A., Verma, A., Panda, P. K., & Jain, S. K. (2020). Advances in liposomal drug delivery to cancer: An overview. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56(January), 101549. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101549>
- Sargent, J. R., Tocher, D. R., & Bell, J. G. (1952). The Lipids. *Nature*, 170(4331), 727. <https://doi.org/10.1038/170727c0>
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in*



- Pharmacology*, 6(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>
- Severian Dumitriu. (2004). *Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility*.
- Silva, M. G. Da, Cardoso, J. F., Perasoli, F. B., Branquinho, R. T., Mourão, R. S., Tavares, H. D. S., Xocaira, M. L. C. T., Guimarães, D. S. M., Viana, G. H. R., Varotti, F. D. P., & Silva, G. R. Da. (2020). Nanoemulsion composed of 10-(4,5-dihydrothiazol-2-yl)thio)decan-1-ol), a synthetic analog of 3-alkylpyridine marine alkaloid: development, characterization, and antimalarial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105382>
- Smith, M. (2020). *Marchs Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms, and Structure* (Eight).
- Song, M., Liang, Y., Li, K., Zhang, J., Zhang, N., Tian, B., & Han, J. (2019). Hyaluronic acid modified liposomes for targeted delivery of doxorubicin and paclitaxel to CD44 overexpressing tumor cells with improved dual-drugs synergistic effect. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53(July), 101179. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101179>
- Song, S., Liu, D., Peng, J., Sun, Y., Li, Z., Gu, J. R., & Xu, Y. (2008). Peptide ligand-mediated liposome distribution and targeting to EGFR expressing tumor in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1–2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.012>
- Sułkowski, W. W., Pentak, D., Nowak, K., & Sułkowska, A. (2005). The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*, 744–747(SPEC. ISS.), 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.075>
- Thi, T. T. H., Pilkington, E. H., Nguyen, D. H., Lee, J. S., Park, K. D., & Truong, N. P. (2020). The Importance of Poly ( ethylene glycol ) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug. *Polymers*, 12(298).
- Tokita, Y., & Okamoto, A. (1995). Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability*, 48(2), 269–273. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(95\)00041-J](https://doi.org/10.1016/0141-3910(95)00041-J)
- Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), 145–160. <https://doi.org/10.1038/nrd1632>
- Turánek, J., Mašek, J., Raška, M., Ledvina, M., Paulovičová, E., Hubatka, F., & Kotouček, J. (2019). Modification of liposomal surface by polysaccharides: Preparation, characterization, and application for drug targeting. In *Functional Polysaccharides for Biomedical Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102555-0.00013-3>
- Urbina, J. A., Pekerar, S., Le, H. biao, Patterson, J., Montez, B., & Oldfield, E. (1995). Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using  $^2\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - and  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. *BBA - Biomembranes*, 1238(2), 163–176. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00117-L](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00117-L)
- Valcourt, D. M., Harris, J., Riley, R. S., Dang, M., Wang, J., & Day, E. S. (2018). Advances in targeted nanotherapeutics: From bioconjugation to biomimicry. *Nano*



- Research*, 11(10), 4999–5016. <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2083-z>
- van Hoogevest, P. (2017). Review – An update on the use of oral phospholipid excipients. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.07.008>
- Wadhawan, A., Chatterjee, M., & Singh, G. (2019). Present scenario of bioconjugates in cancer therapy: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms20215243>
- Wang, K., Xu, J., Liu, Y., Cui, Z., He, Z., Zheng, Z., Huang, X., & Zhang, Y. (2020). Self-assembled *Angelica sinensis* polysaccharide nanoparticles with an instinctive liver-targeting ability as a drug carrier for acute alcoholic liver damage protection. *International Journal of Pharmaceutics*, 577(December 2019), 118996. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118996>
- Wellems, T. E., & Plowe, C. V. (2001). *Chloroquine-Resistant Malaria*. 770–776.
- Werengowska-Ciećwierz, K., Wiśniewski, M., Terzyk, A. P., & Furmaniak, S. (2015). The chemistry of bioconjugation in nanoparticles-based drug delivery system. *Advances in Condensed Matter Physics*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/198175>
- Xiao, W., Fu, Q., Zhao, Y., Zhang, L., Yue, Q., Hai, L., Guo, L., & Wu, Y. (2019). Ascorbic acid-modified brain-specific liposomes drug delivery system with “lock-in” function. *Chemistry and Physics of Lipids*, December 2017, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.01.005>
- Xing, H., Hwang, K., & Lu, Y. (2016). Recent developments of liposomes as nanocarriers for theranostic applications. *Theranostics*, 6(9), 1336–1352. <https://doi.org/10.7150/thno.15464>
- Yan, W., Leung, S. S. Y., & To, K. K. W. (2019). Updates on the use of liposomes for active tumor targeting in cancer therapy. *Nanomedicine*, 15(3), 303–318. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0308>
- Zahednezhad, F., Saadat, M., Valizadeh, H., Zakeri-Milani, P., & Baradaran, B. (2019). Liposome and immune system interplay: Challenges and potentials. *Journal of Controlled Release*, 305(May), 194–209. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.05.030>
- Zhang, C., Vinogradova, E. V., Spokoiny, A. M., Buchwald, S. L., & Pentelute, B. L. (2019). Arylation Chemistry for Bioconjugation. *Angewandte Chemie - International Edition*, 58(15), 4810–4839. <https://doi.org/10.1002/anie.201806009>
- Zhang, D., & Zhang, J. (2020). Surface engineering of nanomaterials with phospholipid-polyethylene glycol-derived functional conjugates for molecular imaging and targeted therapy. *Biomaterials*, 230. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119646>
- Zhang, Q., Deng, C., Fu, Y., Sun, X., Gong, T., & Zhang, Z. (2016). Repeated Administration of Hyaluronic Acid Coated Liposomes with Improved Pharmacokinetics and Reduced Immune Response. *Molecular Pharmaceutics*, 13(6), 1800–1808. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00952>
- Zhang, W., Coughlin, M. L., Metzger, J. M., Hackel, B. J., Bates, F. S., & Lodge, T. P. (2019). Influence of Cholesterol and Bilayer Curvature on the Interaction of PPO-PEO Block Copolymers with Liposomes [Research-article]. *Langmuir*, 35(22),





- 7231–7241. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00572>
- Zylberberg, C., & Matosevic, S. (2016). Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Delivery*, 23(9), 3319–3329. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1177136>
- Zylberberg, C., & Matosevic, S. (2017). Bioengineered liposome-scaffold composites as therapeutic delivery systems. *Therapeutic Delivery*, 8(6), 425–445. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0014>



## 9. ANEXOS

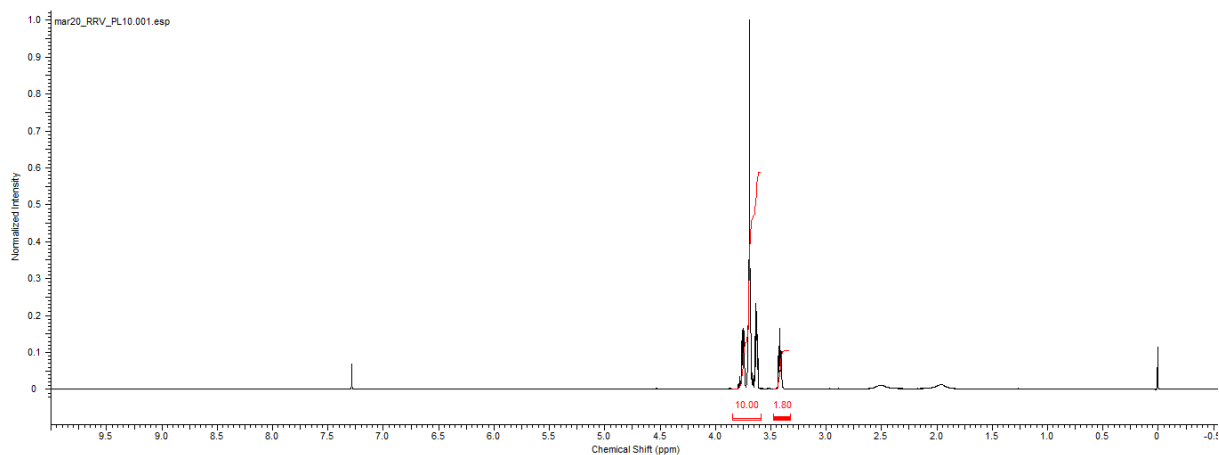


Figura 36 -  $^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da molécula 2-(2-(2-azidaetoxi)etoxi)etanol (Autoria própria, 2020).