

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Derivados de ácidos orgânicos- β -ciclodextrina: síntese, purificação e avaliação da toxicidade *in vitro*

MARIA GABRIELE DELAGUSTIN

PORTO ALEGRE, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Derivados de ácidos orgânicos- β -ciclodextrina: síntese, purificação e avaliação da toxicidade *in vitro*

Tese apresentada por **Maria Gabriele Delagustin** para obtenção de grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Valquiria Linck Bassani
Co-orientadora: Prof. Dra. Eloane Malvessi

Porto Alegre, 2021

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23.09.2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna

Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Universidade de Caxias do Sul-UCS

Delagustin, Maria Gabriele

Derivados de ácidos orgânicos- β -ciclodextrina: síntese, purificação e avaliação da toxicidade in vitro / Maria Gabriele Delagustin. -- 2021. 173 f.

Orientador: Valquiria Linck Bassani.

Coorientador: Eloane Malvessi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. ácido lactobiônico. 2. poli-hidroxiácidos. 3. β -ciclodextrina. 4. toxicidade. 5. caracterização. I. Linck Bassani, Valquiria, orient. II. Malvessi, Eloane, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre e no Laboratório de Bioprocessos, Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA e no Laboratório de Produtos Naturais e Biossintéticos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul- UCS, na cidade de Caxias do Sul, com financiamento da CAPES e CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Valquiria Linck Bassani pela orientação, paciência, incentivo, dedicação e ensinamentos.

A minha coorientadora Eloane Malvessi, por toda dedicação, ensinamentos, amizade e conselhos por todos os anos de convivência.

Ao meu coorientador Thiago Barcellos pelos ensinamentos, apoio, paciência e todas as contribuições significativas para o meu crescimento profissional.

Aos colegas de trabalho dos laboratórios de Desenvolvimento Galênico do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Bioprocessos, Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA e no Laboratório de Produtos Naturais e Biossintéticos do Instituto de Biotecnologia da UCS. Em especial a Analia Folle, Sabrina Carra, Caroline Reginatto, Bruna Campos, Rafaele Frassini, Maiara de Moraes, Vinícius Molon e Gabriela Antonioli pelo companheirismo, amizade, apoio, incentivo e troca de conhecimentos.

Aos meus pais, minha família e amigos por sempre me apoiarem, pela paciência, incentivo, amizade e amor. E por sempre me guiarem.

A CAPES, UFRGS, UCS e CNPq pelo apoio estrutural e financiamento do projeto.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Estatuto do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos e organizada como segue:

Introdução geral

Objetivo geral e específico

Revisão da literatura

Capítulo I: Synthesis, characterization and toxicity of new polyhydroxy acids- β -Cyclodextrin derivatives.

Capítulo II: Vetorização hepática do derivado de ciclodextrina
_____ 6-XX- β -CD.

Discussão geral

Conclusões

Referências

ANEXO I: Parecer do comitê de ética

RESUMO

As ciclodextrinas (CDs) apresentam a propriedade de formar complexos de inclusão reversíveis com diversas moléculas. As CDs podem ser modificadas por meio da adição de grupamentos funcionais em sua estrutura visando à obtenção de derivados com características favoráveis a aplicações farmacêuticas. O número de derivados de ciclodextrinas hidrossolúveis e compatíveis com a via parenteral, comercialmente disponíveis, ainda é restrito e de domínio de empresas estrangeiras. Neste sentido, foi proposta a síntese de novos derivados de ciclodextrina ligados a ácidos orgânicos (poli-hidroxiácidos) visando obter melhores características, tais como, hidrossolubilidade, reduzida toxicidade e compatibilidade com a via parenteral. No presente trabalho, foi realizada a síntese de derivados de β -CD ligados ao ácido B, C, D ou E, devido as características de hidrossolubilidade e conhecida biocompatibilidade. Procedeu-se à ativação da β -CD pela adição do grupamento toсила, resultando em _____ (6-XA- β -CD) com rendimento de 32% e pureza 94,2% (p/p). Na análise de massas foi identificado o sinal com m/z de 667,1785 $[M+Na]^{+2}$, correspondente ao 6-XA- β -CD. Na análise de 1H RMN, foram identificados os sinais característicos do grupamento toсила (7,75 e 7,43 ppm do anel aromático e 2,43 ppm da metila). Na segunda etapa, o grupamento toсила foi substituído pela amina primária (-NH₂) da etilenodiamina, produzindo _____ (6-XXA - β -CD) com pureza de 94,9% (p/p). No espectro de massas identificou-se o 6-XXA - β -CD com m/z de 600,2127 $[M+Na+H]^{+2}$. A última etapa da síntese foi a reação do 6-XXA- β -CD com os ácidos lactobiônico, maltobiônico, glicônico ou galacturônico, que resultou em _____ (6-XB- β -CD), _____ (6-XC- β -CD), _____ (6-XD- β -CD), _____ (6-XE- β -CD), respectivamente. A síntese de 6-XB- β -CD teve rendimento de 68% e pureza de 90,6% (p/p). Na caracterização por espectrometria de massas identificou-se o m/z de 770,2630 $[M+H+Na]^{+2}$. 6-XC- β -CD apresentou rendimento de 64%, pureza de 89,0% (p/p) e m/z de 770,2651 $[M+H+Na]^{+2}$. Para o 6-XD- β -CD obteve-se rendimento de 70%, pureza de 89,8%

(p/p) e m/z de 689,2382 $[M+H+Na]^{+2}$. Para o 6-XE- β -CD, rendimento de 73% e pureza de 96,2% (p/p) foram obtidos e caracterizado com m/z de 688,2307 $[M+H+Na]^{+2}$. A solubilidade em água, a 30°C, dos derivados 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD, 6-XE- β -CD foi determinada em 820, 860, 760 e 780 mg mL⁻¹, respectivamente, valores que representam de 32 a 36 vezes a hidrossolubilidade da β -CD. Os compostos 6-EDA- β -CD (produto intermediário), 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD, 6-XE- β -CD e o ácido lactobiônico, não apresentaram sinais de toxicidade em células HepG2 e Hek293, em concentração de até 100 μ M, pelo ensaio de MTT. Os derivados sintetizados apresentaram baixa atividade hemolítica e baixa complexação com o colesterol, em comparação com a β -CD. Em seu conjunto os resultados demonstram que os derivados poli-hidroxilados de β -CD sintetizados são hidrossolúveis, não são citotóxicos, não causam hemólise ou complexação com o colesterol, o que revela seu alto potencial de utilização para a via parenteral.

Palavras-chave: ácido lactobiônico, ácido maltobiônico, derivado hidrossolúvel de β -ciclodextrina, *Zymomonas mobilis*, poli-hidroxiácido- β -ciclodextrina, toxicidade, teste de hemólise, complexação com colesterol.

ABSTRACT

Cyclodextrins (CDs) have the property of forming reversible inclusion complexes with various molecules. Natural CDs can be modified through the addition of functional groups in their structure aiming at the obtainment of derivatives with favorable characteristics for pharmaceutical applications. The number of commercially available cyclodextrin derivatives with water solubility and compatibility with the parenteral route is still limited, and its production belongs to few foreign companies. In this sense, the synthesis of new cyclodextrin derivatives linked to organic acids (polyhydroxy acids) was proposed to obtain better characteristics, such as water solubility, reduced toxicity and compatibility with the parenteral route. In the present thesis, the synthesis of β -CD derivatives linked to B, C, D or E acid was performed, due to the characteristics of water solubility and known biocompatibility. Firstly, the activation of β -CD was performed by the addition of the tosyl group. The synthesis of _____ (6-XA- β -CD) had a yield of 32% and purity of 94.2% (w/w). In HRMS analysis the signal with m/z of 667.1796 $[M+Na]^{+2}$ was identified as 6-XA- β -CD. In the analysis of 1H NMR, signals characteristic of the tosyl group were identified (7.75 and 7.43 ppm for the aromatic ring and 2.43 ppm for the methyl). In the second step, the tosyl group was replaced by the primary amine (-NH₂) from ethylenediamine, producing _____ (6-XXA- β -CD) with purity of 94.9% (w/w). In the mass spectrum, 6-XXA- β -CD was identified with m/z of 600.2127 $[M+Na+H]^{+2}$. The last step of the synthesis was the reaction of 6-XXA- β -CD with lactobionic, maltobionic, gluconic or galacturonic acid, resulting in _____ (6-XB- β -CD), _____ (6-XC- β -CD), _____ (6-XD- β -CD), _____ (6-DE- β -CD), respectively. The synthesis of 6-XB- β -CD had a yield of 68% and purity of 90.57% (w/w). In the characterization by mass spectrometry, the m/z of 770.2591 $[M+H+Na]^{+2}$. 6-XC- β -CD showed a yield of 64%, purity of 89.00% (w/w) and m/z of 770.2642 $[M+H+Na]^{+2}$. For 6-XD- β -CD a yield of 70% was obtained, purity of 89.85% (w/w) and m/z of 689.2382 $[M+H+Na]^{+2}$. For 6-XE- β -CD, yield of 73% and purity 96.26% (w/w). were

obtained and characterized with. m/z of 688.2307 $[M+H+Na]^{+2}$. The water solubility, at 30°C, of the 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD, 6-XE- β -CD derivatives was determined at 820, 860, 760 and 780 mg ml⁻¹, respectively. These water solubility values were 32 to 36 times higher than that β -CD exhibit. The compounds 6-XXA- β -CD, 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD, 6-XE- β -CD and lactobionic acid did not show toxicity in HepG2 and Hek293 cells, in concentration up to 100 μ M, in MTT assay. The synthesized derivatives showed low hemolytic activity and low complexation with the cholesterol molecule, compared to β -CD. Taken together, the results demonstrate that the synthesized polyhydroxylated derivatives of β -CD are water soluble, not cytotoxic, do not cause hemolysis or cholesterol complexation, which reveals their high potential for use in the parenteral route.

Keywords: lactobionic acid, maltobionic acid, water soluble derivative of β -cyclodextrin, *Zymomonas mobilis*, polyhydroxy acids, toxicity, hemolysis assay, cholesterol complexation.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: [A] Representação da unidade de glicose numerada de 1-6, [B] representação 3D da β -CD. Fonte: adaptado de (BENKOVICS, 2017).

Figura 2: Mecanismo enzimático do tipo “*ping-pong*” empregado na conversão da glicose em ácido D mediado pelo sistema GFOR/GL.

Figura 3: Mecanismo enzimático do tipo “*ping-pong*” empregado na conversão da lactose em ácido B mediado pelo sistema GFOR/GL.

Figura 4: Mecanismo enzimático do tipo “*ping-pong*” empregado na conversão da maltose em ácido C mediado pelo sistema GFOR/GL.

CAPÍTULO I

Figure 1: Synthetic route of obtainment of *p*-TsIm [A], 6-XA- β -CD [B], 6-XXAA- β -CD [C] and 6-XB- β -CD [D] (*p*-TsIm= 1-(*p*-toluenesulfonyl)imidazole; 6-XA- β -CD=_____ ; 6-XXA- β -CD=_____ ; 6-XB- β -CD=_____).

Figure 2: [A] Structure of 6-XA- β -CD, [B] mass spectrum obtained by direct infusion of ESI-HRMS and [C] MS/MS of 6-XA- β -CD (6-XA- β -CD _____ ; ESI-HRMS= Electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry).

Figure 3: [A] Structure of 6-XXA- β -CD, [B] mass spectrum obtained by direct infusion (ESI-HRMS) and [C] MS/MS of 6-XXA- β -CD (6-XXA- β -CD= _____ ; ESI-HRMS= Electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry).

Figure 4: [A] Structure of 6-XB- β -CD, [B] mass spectrum obtained by direct infusion (ESI-HRMS) and [C] MS/MS of 6-XB- β -CD (6-XB- β -CD= _____).

_____ ; ESI-HRMS= Electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry).

Figure 5: [A] Structure of 6-XC- β -CD, [B] mass spectrum obtained by direct infusion (ESI-HRMS) and [C] MS/MS of 6-XC- β -CD (6-XC- β -CD= _____ ; ESI-HRMS= Electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry).

Figure 6: [A] Structure of 6-XD- β -CD, [B] mass spectrum obtained by direct infusion (ESI-HRMS) and [C] MS/MS of 6-XD- β -CD (6-XD- β -CD= _____ ; ESI-HRMS= Electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry).

Figure 7: [A] Structure of 6-XE- β -CD, [B] mass spectrum obtained by direct infusion (ESI-HRMS) and [C] MS/MS of 6-XE- β -CD (6-DE- β -CD= _____ ; ESI-HRMS= Electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry).

Figure 8: *In vitro* cell viability (%) of HepG2 cells (48 h) [A] and Hek293 cells (24 h) [B], measured by MTT assay, incubated with 6-XXA- β -CD, 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD and 6-XE- β -CD (Cell viability expressed as mean \pm SD, n=9) (6-EDA- β -CD= _____ ; 6-XB- β -CD= _____ ; 6-XC- β -CD= _____ ; 6-XD- β -CD= _____ ; 6-XE- β -CD= _____).

Figure 9: [A] Hemolytic activity of β -CD, 6-XXAA- β -CD, 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD and 6-XE- β -CD on HRBCs in PBS (pH 7.4) at 37°C. Each point represents the mean \pm SD. [B] Expanded graphic until 6 % of hemolysis (HRBCs= Human red blood cells; 6-EDA- β -CD= Mono-6-ethylenediamine- β -cyclodextrin; 6-XB- β -CD= _____ ; 6-XC- β -CD= _____ ; 6-XD- β -CD= _____ ; 6-XE- β -CD= _____).

Figure 10: [A] Cholesterol solubilization, in water, by increased proportions of M- β -CD, HP- β -CD, 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD or 6-XE- β -CD (0.5:1, 1:1, 2:1, 4:1, 5:1 and 8:1). [B] Expanded graphic (M- β -CD= methyl- β -cyclodextrin; HP- β -CD= hydroxypropyl- β -cyclodextrin; 6-XB- β -CD= _____; 6-XC- β -CD= _____; 6-XD- β -CD= _____; 6-XE- β -CD= _____).

Figure S1: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) spectrum of β -CD.

Figure S2: ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) spectrum of β -CD.

Figure S3: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) spectrum of 6-XA- β -CD (6-XA- β -CD= _____).

Figure S4: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) spectrum of 6-XXA- β -CD (6-XXA- β -CD= _____).

Figure S5: ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) spectrum of 6-XXA- β -CD (6-XXA- β -CD= _____).

Figure S6: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) spectrum of 6-XB- β -CD (6-XB- β -CD= _____).

Figure S7: ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) spectrum of 6-XB- β -CD (6-XB- β -CD= _____).

Figure S8: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) spectrum of 6-XB- β -CD (6-XB- β -CD= _____).

Figure S9: ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) spectrum of 6-XC- β -CD (6-XC- β -CD= _____).

Figure S10: ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) spectrum of 6-XD- β -CD (6-XD- β -CD= _____).

Figure S11: ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) spectrum of 6-XD- β -CD (6-XD- β -CD= _____).

Figure S12: ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) spectrum of 6-XE- β -CD (6-XE- β -CD= _____).

Figure S13: ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) spectrum of 6-XE- β -CD (6-XE- β -CD= _____).

Figure S14: CG-MS of 1-(*p*-Toluenesulfonyl)imidazole (CG-MS= Gas chromatography- mass selective detector).

Figure S15: Direct injection high-resolution mass spectrometry analysis (ESI-HRMS) of β -CD.

Figure S16: HPLC-HRMS chromatogram of 6-XA- β -CD with 94.2 % of purity. The retention times of 6-XA- β -CD at 7.4 min and β -CD at 6.3 min (HPLC-HRMS= High-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry; 6-XA- β -CD= _____).

Figure S17: HPLC-HRMS chromatogram of 6-XXA- β -CD. The retention times of 6-XXA- β -CD (m/z 1177) at 4.5 min and β -CD (m/z 1135) at 6.1 min (HPLC-HRMS= High-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry; 6-XXA- β -CD= _____).

Figure S18: HPLC-HRMS chromatogram of 6-XB- β -CD. The retention times of 6-XXA- β -CD (m/z 1177) at 4.6 min, 6-XB- β -CD (m/z 770) at 5.0 min and B acid (m/z 381) at 6.5 min (HPLC-HRMS= High-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry; 6-XB- β -CD _____
_____. 6-XXA- β -CD= _____).

Figure S19: HPLC-HRMS chromatogram of 6-XC- β -CD. The retention times of 6-XXA- β -CD (m/z 1177) at 4.6 min, 6-XC- β -CD (m/z 770) at 5.0 min and C acid (m/z 381) at 6.5 min (HPLC-HRMS= High-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry; 6-XC- β -CD= _____
_____. 6-XXA- β -CD= _____).

Figure S20: HPLC-HRMS chromatogram of 6-XD- β -CD. The retention times of 6-XXA- β -CD (m/z 1177) at 4.6 min, 6-XD- β -CD (m/z 1355) at 5.1 min and D acid (m/z 219) at 6.7 min (HPLC-HRMS= High-performance liquid chromatography coupled to

high-resolution mass spectrometry; 6-XD- β -CD= _____
_____. 6-XXA- β -CD= _____).

Figure S21: HPLC-HRMS chromatogram of 6-XE- β -CD. The retention times of 6-XXA- β -CD (m/z 1177) at 4.6 min, 6-XE- β -CD (m/z 1353) at 5.0 min and E acid (m/z 217) at 6.7 min (HPLC-HRMS= High-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry; 6-XE- β -CD= _____
_____; 6-XXA- β -CD= _____
_____).

CAPÍTULO II

Figura 1: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, D_2O) do complexo 6-XB- β -CD/Fluoresceína sódica (6-XB- β -CD= _____).

Figura 2: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, D_2O) da Fluoresceína sódica.

Figura 3: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, D_2O) da 6-XB- β -CD (6-XB- β -CD= _____).

Figura 4: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, D_2O) da Fluoresceína sódica em comparação com o complexo 6-XB- β -CD/Fluoresceína sódica (6-XB- β -CD= _____).

Figura 5: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) da FDA (FDA= fluoresceína diacetato).

Figura 6: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) do complexo 6-XB- β -CD/FDA (FDA= fluoresceína diacetato; 6-XB- β -CD= _____).

Figura 7: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) da FDA em comparação com o complexo 6-XB- β -CD/FDA (FDA= fluoresceína diacetato; 6-XB- β -CD= _____).

Figura 8: Fluorescência das células HepG2 em relação a concentração do complexo 6-XB- β -CD/FDA (FDA= fluoresceína diacetato; 6-XB- β -CD= _____).

Figura 9: Regressão linear da fluorescência das células HepG2 em relação a concentração do complexo 6-XB- β -CD/FDA (FDA= fluoresceína diacetato; 6-XB- β -CD= _____).

Figura 10: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) do FITC (FITC= isotiocianato de fluoresceína).

Figura 11: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) do complexo 6-XB- β -CD/FITC (FITC= isotiocianato de fluoresceína; 6-XB- β -CD= _____).

Figura 12: Espectro de ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) da FITC em comparação com o complexo 6-XB- β -CD/FITC (FITC= isotiocianato de fluoresceína; 6-XB- β -CD= _____).

Figura 13: Fluorescência das células HepG2 em relação a concentração do complexo 6-XB- β -CD/FITC. (FITC= isotiocianato de fluoresceína; 6-XB- β -CD= _____).

Figura 14: Gráfico da fluorescência das células HepG2 em relação a concentração do complexo 6-LA- β -CD/FITC (FITC= isotiocianato de fluoresceína; 6-XB- β -CD= _____).

Figura 15: Gráfico da fluorescência das células HepG2 em relação a concentração do complexo 6-XB- β -CD/FITC (FITC= isotiocianato de fluoresceína; 6-LA- β -CD= _____).

DISCUSSÃO GERAL

Figura 1: Curva analítica do ácido B, C, D e E de 1 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtida por HPLC-HRMS (HPLC-HRMS = Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução).

Figura 2: Curva analítica do 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD de 20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtida por HPLC-HRMS (6-XB- β -CD= _____; 6-XC- β -CD= _____; 6-XD- β -CD= _____; 6-XE- β -CD= _____; HPLC-HRMS = Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução).

Figura 3: Curva analítica do β -CD, 6-XXA- β -CD e 6-XA- β -CD de 5 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtida por HPLC-HRMS (6-XXA- β -CD= _____; 6-XA- β -CD= _____. HPLC-HRMS = Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução).

Os nomes dos ácidos B,C D e E e do derivados 6-XA- β -CD, 6-XXA- β -CD 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD foram suprimidos devido ao pedido de depósito de patente ao INPI.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table S1: High-resolution mass analysis of β -CD, 6-XA- β -CD 6-XXA- β -CD, 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD and 6-XE- β -CD (β -CD= β -cyclodextrin; 6-XA- β -CD= _____; 6-XXA- β -CD= _____; 6-XB- β -CD= _____; 6-XC- β -CD= _____; 6-XD- β -CD= _____; 6-XE- β -CD= _____).

Os nomes dos derivados 6-XA- β -CD, 6-XXA- β -CD 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD foram suprimidos devido ao pedido de depósito de patente ao INPI.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG-MS: Gas chromatography- mass selective detector.

DCC: N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide.

DCU: Dicyclohexylurea.

ESI-HRMS: Electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry.

FDA: Fluoresceína diacetato.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

HPLC-HRMS= High-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução).

HP- β -CD: Hidroxipropil β -ciclodextrina (hydroxypropyl- β -cyclodextrin).

HRBCs: Human red blood cells.

M- β -CD: Metil- β -ciclodextrina (methyl- β -cyclodextrin).

NHS: N-Hydroxysuccinimide.

RMN ^{13}C : Ressonância magnética nuclear de ^{13}C .

RMN ^1H : Ressonância magnética nuclear de ^1H .

^{13}C NMR: Nuclear magnetic resonance of ^{13}C .

^1H NMR: Nuclear magnetic resonance of ^1H .

6-XXA- β -CD: _____ (_____
_____).

6-XXE- β -CD: _____ (_____
_____).

6-XXC- β -CD: _____ (_____
_____).

6-XB- β -CD: _____ (_____
_____).

6-XC- β -CD: _____ (_____
_____).

6-XA- β -CD: _____ (_____
_____).

p-TsIm: 1-(*p*-toluenesulfonyl)imidazole.

β -CD: β -ciclodextrina (β -cyclodextrin).

Os nomes dos derivados 6-XA- β -CD, 6-XXA- β -CD 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD foram suprimidos devido ao pedido de depósito de patente ao INPI.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral	35
2.1.1 Objetivos específicos.....	35
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	37
3.1 Ciclodextrinas	39
3.1.1 Características das ciclodextrinas.....	39
3.1.2 Aplicações das ciclodextrinas.....	40
3.1.3 Reações com as ciclodextrinas	43
3.1.4 Toxicidade das ciclodextrinas	45
3.2 Ácidos orgânicos.....	45
3.2.1 Bioprodução por <i>Zymomonas mobilis</i>	45
3.2.2 Poli-hidroxiácidos.....	47
4. CAPÍTULO I.....	27
5. CAPÍTULO II.....	109
6. DISCUSSÃO GERAL.....	135
7. CONCLUSÕES	151
8. REFERÊNCIAS	157
9. ANEXO I.....	167

1. INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Estes compostos apresentam uma cavidade hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica, conferindo-lhes a capacidade de formar, de forma reversível, complexos com diversas moléculas. A formação de complexos pode ser explorada com diversos objetivos, entre os quais, destaca-se a melhoria na hidrossolubilidade aparente e a estabilidade das moléculas hóspedes, além de atuar como transportadores de fármacos. O complexo ciclodextrina-molécula hóspede é estabilizado por forças de interações intermoleculares, não havendo formação ou rompimento de ligações covalentes não alterando a molécula das moléculas hóspedes. Em solução aquosa, os complexos dissociam-se, mantendo um equilíbrio entre a molécula livre e complexada (FOLCH-CANO; YAZDANI-PEDRAM; OLEA-AZAR, 2014; KURKOV; LOFTSSON, 2013; TIWARI; TIWARI; RAI, 2010).

As CDs naturais podem ser modificadas por meio da adição de grupamentos funcionais em sua estrutura, determinando mudanças em suas propriedades físicas, físico-químicas e/ou biológicas, como por exemplo, a hidrossolubilidade, toxicidade ou comportamento de ligação específico a alvos biológicos (vetorização) (CONCEIÇÃO et al., 2018; LOFTSSON T, JARHO P, MÁSSON M, 2005; MOHAPATRA et al., 2018). O número de derivados de ciclodextrinas com alta hidrossolubilidade e biocompatibilidade disponíveis no mercado ainda é restrito, especialmente os destinados à via parenteral. Neste sentido, novos derivados representam uma perspectiva promissora. Além disto, estes podem representar uma importante contribuição para o portfólio de excipientes para o setor farmacêutico do País, carente de autonomia.

Para a síntese de derivados de CD a monotosilação na posição C6 é uma típica reação inicial para a formação de um intermediário reativo podendo, assim, formar uma variedade de derivados de β -CD. A estrutura da β -CD apresenta quatorze hidroxilas secundárias nos átomos de carbonos C2, C3 e seis hidroxilas primárias nos átomos de C6. A reação de tosilação pode ocorrer em todas elas, tornando a monossustituição seletiva um desafio. No caso da β -CD, as hidroxilas secundárias estão localizadas na parte mais larga do cone truncado e formam um cinturão de

ligações hidrogênio entre si. As hidroxilas primárias ligadas aos carbonos C6 estão localizadas no lado mais estreito, são mais acessíveis e reativas (FOLCH-CANO; YAZDANI-PEDRAM; OLEA-AZAR, 2014; KURKOV; LOFTSSON, 2013; TIWARI; TIWARI; RAI, 2010).

Por outro lado, o ácido lactobiônico e maltobiônico são formados pela ligação entre um poli-hidroxiácidos (PHA), o ácido glicônico, e um açúcar, a galactose e glicose, respectivamente (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009). O ácido lactobiônico, maltobiônico e glicônico podem ser obtidos biotecnologicamente pelo complexo enzimático GFOR/GL, presente no periplasma da bactéria anaeróbia *Zymomonas mobilis*, pela oxidação da lactose, maltose e glicose, respectivamente (CARRA et al., 2020; DELAGUSTIN et al., 2017; FOLLE et al., 2018). O ácido galacturônico é um açúcar ácido sendo o principal constituinte da pectina, cujos monômeros são ligados por meio de ligações α -1,4 (PICOT-ALLAIN; RAMASAWMY; EMMAMBUX, 2020). Todos esses ácidos apresentam alta hidrossolubilidade e biocompatibilidade, o que denota seu potencial para servir como substituinte para a derivação da β -CD.

Neste panorama, visando à obtenção de ciclodextrinas mais hidrossolúveis, menos tóxicas, com melhor biocompatibilidade e potencial emprego para a via parenteral, o presente trabalho propõe a síntese de derivados da β -CD por meio de sua ligação a diferentes poli-hidroxiácidos (PHAs) por reação dos grupos hidroxila do carbono C6 da β -CD com o ácido B, C, D e E.

Adicionalmente cabe destacar que, muito embora a hidrossolubilidade seja uma característica comum dos PHA, estes podem diferir em suas características frente aos sistemas biológicos. O ácido B, por exemplo, destaca-se por apresentar uma propriedade adicional a sua alta hidrossolubilidade, que é a sua afinidade pelos receptores asialoglicoproteínas (ASGP-R) que estão superexpressos em doenças hepáticas. Os receptores ASGP-R são considerados promissores marcadores de células hepáticas tumorais, pois estão presentes em grandes quantidades em hepatócitos e de forma seletiva. (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2013; GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012). A afinidade do ácido lactobiônico pelo ASGP-R se dá pela presença da galactose em sua estrutura (BANSAL et al., 2016; CHEN et al., 2015;

DANGI et al., 2014; DU et al., 2016; LY; NGUYEN; JOO, 2018; VILLA et al., 2013; ZHAO et al., 2017). Esta característica torna seu derivado com a β -CD um potencial carreador hepático para fármacos antitumorais ou outros.

Em suma, o presente trabalho propõe a síntese química de derivados de ácidos poli-hidroxilados da β -CD, que apresentem como propriedade comum a característica de hidrossolubilidade e baixa toxicidade, com vistas nas suas potenciais aplicações para produtos destinados à via parenteral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar, purificar e avaliar a toxicidade de derivados da β -ciclodextrina ligados a ácidos poli-hidroxiados orgânicos (ácido B, C, D e E). Tendo em vista, à obtenção de ciclodextrinas com característica de hidrossolubilidade e com menor toxicidade em relação à β -CD. Ainda, com potenciais aplicações para a via parenteral e/ou vetorização de fármacos para tecidos e alvos terapêuticos específicos.

2.1.1 Objetivos específicos

- Produzir biotecnologicamente o ácido B e C por células imobilizadas de *Z. mobilis*.
- Propor uma rota sintética para a obtenção e purificação dos derivados de β -CD ligado ao ácido B, C, D ou E (Poli-hidroxiácidos- β -CD).
- Realizar a caracterização química, dos derivados de β -CD sintetizados, por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas de alta resolução.
- Desenvolver um método para quantificação, dos derivados de β -CD sintetizados, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.
- Determinar a hidrossolubilidade dos derivados Poli-hidroxiácidos- β -CD sintetizados.
- Avaliar a toxicidade dos derivados de β -CD, *in vitro*, utilizando cultura de células HepG2 e Hek293.
- Determinar a toxicidade das β -CD sintetizadas, em células sanguíneas, pelo ensaio de hemocompatibilidade.
- Determinar a complexação e solubilidade do colesterol com os derivados de β -CD sintetizados.

- Avaliar da ligação e especificidade do derivado ácido lactobiônico- β -ciclodextrina em células hepáticas que expressam e que não expressam ASGP-R.

Os nomes dos ácidos B,C D e E foram suprimidos devido ao pedido de depósito de patente ao INPI.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Ciclodextrinas

3.1.1 Características das ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são oligômeros cíclicos derivados do amido que tem capacidade de formar complexos reversíveis com diversas moléculas. Devido a esta propriedade, estes compostos têm sido amplamente utilizados para melhorar a hidrossolubilidade aparente e estabilidade de moléculas hóspedes e, em alguns casos para transportar fármacos até um alvo terapêutico (CONCEIÇÃO et al., 2018; LEPRÊTRE et al., 2009; TIWARI; TIWARI; RAI, 2010). As CDs são constituídas por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, apresentando-se na forma de cones truncados, com um lado mais estreito e um mais largo. Todas as hidroxilas secundárias (dos carbonos C2 e C3) das subunidades de glicose estão localizadas na borda mais larga (face secundária), e todas as hidroxilas primárias (do carbono C6) estão situadas no lado mais estreito (face primária) do cone (Figura 2). As CDs naturais são constituídas por 6 (α -ciclodextrina/ α -CD), 7 (β -ciclodextrina/ β -CD) ou 8 (γ -ciclodextrina/ γ -CD) unidades de glicose. Existem CDs com mais unidades, entretanto são difíceis de serem produzidas e formam complexos de inclusão com um número limitado de moléculas. A β -CD é uma das ciclodextrinas produzidas em maior abundância por via biotecnológica, sendo, também, a de menor custo (FOLCH-CANO; YAZDANI-PEDRAM; OLEA-AZAR, 2014; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; KURKOV; LOFTSSON, 2013; TIWARI; TIWARI; RAI, 2010).

As CDs naturais têm solubilidade limitada em água, característica que restringe suas aplicações como agentes complexantes e solubilizantes. A β -CD é a menos solúvel, entretanto, possui um tamanho de cavidade adequado para a formação de complexos com muitas moléculas bioativas. Uma das razões da baixa solubilidade da β -CD em água é a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre suas hidroxilas secundárias. O grupamento hidroxila de C2 de uma unidade de glicose forma ligação de hidrogênio com o grupamento hidroxila de C3 da glicose adjacente, formando um cinturão (anel completo). Estas interações resultam em estrutura inflexível e reduzida capacidade de formar ligações de hidrogênio intermoleculares com moléculas de água circundantes. A α -CD não forma um cinturão completo de

ligações de hidrogênio e a γ -CD tem estrutura não planar e conseqüentemente, tanto α -CD quanto γ -CD apresentam maior solubilidade em água (CAI et al., 2008; KURKOV; LOFTSSON, 2013; LÁSZLÓ JICSINSZKY, 2019; LOFTSSON; DUCHENE, 2007; SAOKHAM et al., 2018)

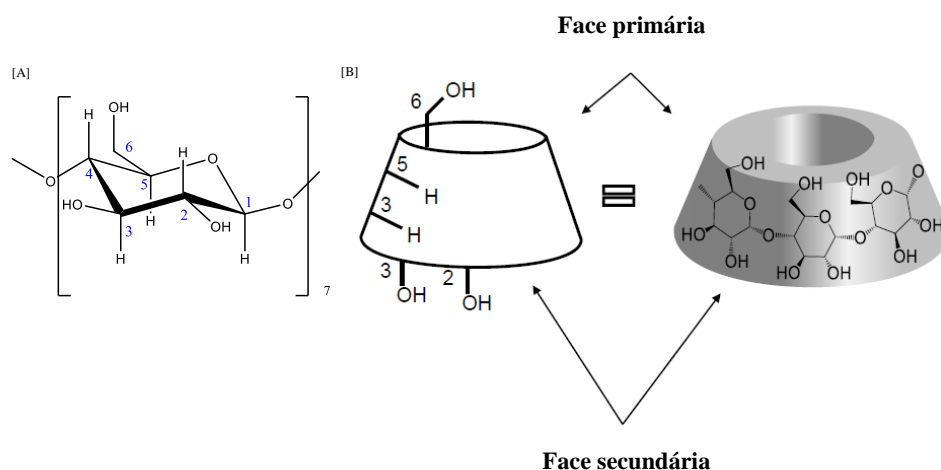


Figura 1: [A] Representação da unidade de glicose numerada de 1-6, [B] representação 3D da β -CD. Fonte: adaptado de (BENKOVICS, 2017).

A introdução de substituintes em uma ou mais hidroxilas, por um lado, faz com que o cinturão se desestabilize, resultando em maior solubilidade em água. Por outro, em tratando-se de substituintes altamente hidrofílicos a hidrossolubilidade dos derivados de ciclodextrinas naturais tende a aumentar. A hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), sulfobutiléter- β -CD (SBE- β -CD), e metil- β -ciclodextrina (M- β -CD) são exemplos de derivados mais solúveis do que a β -CD. Entretanto, a adição de substituintes com características apolares, pode levar a uma diminuição da hidrossolubilidade (CAI et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2018; FISCHER; MEYER, 1889; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; KURKOV; LOFTSSON, 2013; SAOKHAM et al., 2018; SZEJTLI, 1998).

3.1.2 Aplicações das ciclodextrinas

Uma das mais importantes características das CDs é a sua capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos. Isso ocorre devido ao exterior da cavidade ter característica hidrofílica, e o interior hidrofóbico, conferindo à

capacidade de encapsular porções hidrofóbicas de moléculas hóspedes. A complexação de uma molécula pode ser completa ou parcial. Na formação de complexos de CD-molécula hóspede não são formadas ou quebradas ligações covalentes. A complexação ocorre principalmente devido a interações hidrofóbicas e forças de van der Waals entre a CD e a molécula hóspede. Entretanto, a estabilização do complexo pode ocorrer especialmente por meio de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio com as hidroxilas da face externa da CD (LIU; GUO, 2002; SANDILYA; NATARAJAN; PRIYA, 2020; TANG; SUN; NG, 2013).

Do ponto de vista termodinâmico, a inclusão de uma molécula hidrofóbica na cavidade das ciclodextrinas é energeticamente favorecida. Em solução aquosa, na ausência de uma molécula hóspede, a cavidade da ciclodextrina é ocupada por moléculas de água. A β -CD é capaz de acomodar uma média de 6,5 moléculas de água, entretanto é um estado de alta energia sendo energeticamente desfavorável (SANDILYA; NATARAJAN; PRIYA, 2020). A liberação das moléculas de água da cavidade ocorre na medida em que o ligante, de polaridade, tamanho e forma adequada, entra na cavidade, tornando a complexação cavidade-ligante um processo energeticamente favorável (LIU; GUO, 2002; ŘEZANKA, 2016; SANDILYA; NATARAJAN; PRIYA, 2020; SZEJTLI, 1998). Na formação de complexos de inclusão em meio aquoso, ocorre um equilíbrio entre as moléculas do fármaco livre e as moléculas incluídas no interior da cavidade da CD (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; KURKOV; LOFTSSON, 2013; ŘEZANKA, 2019; SANDILYA; NATARAJAN; PRIYA, 2020)

A formação de complexos de inclusão com as CDs pode levar a mudanças nas propriedades físico-químicas da molécula hóspede, em relação à molécula não complexada. Por exemplo, pode melhorar a hidrossolubilidade aparente, aumentar a estabilidade química e física, alterar a absorção da luz UV/visível, o tempo de retenção em sistemas de cromatografia líquida, os deslocamentos químicos na análise por ressonância magnética nuclear (RMN) e, ainda, pode atuar como transportadores de fármacos (CONCEIÇÃO et al., 2018; DI CAGNO et al., 2014; FOLCH-CANO; YAZDANI-PEDRAM; OLEA-AZAR, 2014; SAOKHAM et al., 2018; TIWARI; TIWARI; RAI, 2010).

A aplicação farmacêutica mais comum das ciclodextrinas é auxiliar no aumento da hidrossolubilidade aparente de fármacos. Esta característica pode resultar na melhora da permeabilidade, dissolução e biodisponibilidade dos mesmos (MOHAPATRA et al., 2018; TIWARI; TIWARI; RAI, 2010). Quando aplicada a fármacos que fazem parte de medicamentos há muito tempo comercializados, a complexação com ciclodextrina é referida como sendo uma tecnologia de rejuvenescimento de “velhos” fármacos, sendo uma estratégia apreciada pela indústria, dada a relativa facilidade de registro junto aos órgãos de regulação. Quanto à promoção da estabilidade, a complexação pode proteger moléculas incluídas em sua cavidade do ataque por moléculas reativas, reduzindo a ocorrência de hidrólise, oxidação, rearranjos, degradação enzimática, fotodegradação, entre outras reações (BREWSTER; LOFTSSON, 1996; MOHAPATRA et al., 2018; TIWARI; TIWARI; RAI, 2010).

Substâncias que irritam o estômago, pele ou olhos podem ser complexadas com as CDs para reduzir este efeito adverso. O complexo se dissocia gradualmente e o fármaco livre é liberado podendo diminuir a ocorrência de irritações. Ainda, na forma complexada, pode ser evitada a interação direta dessas substâncias com membranas biológicas podendo, reduzir os efeitos colaterais e irritação sem perda dos efeitos terapêuticos (MOHAPATRA et al., 2018; TIWARI; TIWARI; RAI, 2010).

Moléculas ou grupos funcionais que tem odores ou sabores indesejáveis podem ser ocultados dos receptores sensoriais encapsulando-os dentro da cavidade da CD. Os complexos resultantes não apresentam sabor/odor, ou têm essas características atenuadas e, conseqüentemente, são mais aceitas pelo paciente (KURKOV; LOFTSSON, 2013; MOHAPATRA et al., 2018).

As propriedades das CDs também vêm sendo exploradas para a obtenção de sistemas de liberação de fármacos para as mais. Há relatos da utilização de CDs como sistema de liberação para as diversas vias de administração: oral, sublingual, retal, ocular, nasal, vaginal, pulmonar, dérmica e intravenosa (CONCEIÇÃO et al., 2018; LOFTSSON T, JARHO P, MÁSSON M, 2005; MOHAPATRA et al., 2018). As CDs também têm sido estudadas como carreadores de fármacos em sistemas nanométricos com, por exemplo, nanopartículas, lipossomas, nanogéis, nanoesponjas. e

nanopartículas como sistema de transporte de genes (CONCEIÇÃO et al., 2018; GÓMEZ-GRAÑA; PÉREZ-JUSTE; HERVÉS, 2021; LEMOS-SENNA et al., 1998; MENEZES et al., 2019; MURA, 2020; PANDEY, 2021). As CDs também são utilizadas como sistemas carreadores, vetorizados ou não, de peptídeos, proteínas e fármacos (MURA, 2020; PANDEY, 2021; TIWARI; TIWARI; RAI, 2010). Para a obtenção de transportadores de CD vetorizados, podem ser realizadas modificações em sua estrutura. Assim, obtendo-se um derivado com afinidade e seletividade por algum sítio específico de ligação no organismo.

3.1.3 Reações com as ciclodextrinas

A modificação das ciclodextrinas pode ser, portanto, realizada por meio da adição de grupamentos funcionais em sua estrutura, com vistas a modificar suas propriedades físicas, químicas, físico-químicas ou biológicas. Muito embora, a maioria das modificações realizadas nas ciclodextrinas naturais, especialmente na β -CD, tenha sido motivada pela necessidade de aumentar a hidrossolubilidade e reduzir a toxicidade, outras finalidades tem sido alvo dessas modificações. Entre essas estão a melhoria da complexação com moléculas específicas, obtenção de um carreador alvo-específico (vetorização), introdução de um cromóforo na estrutura, separação quiral em análises cromatográficas, entre outros. O tipo de modificação depende, portanto, do objetivo do produto final (ŘEZANKA, 2016; SAOKHAM et al., 2018; SZEJTLI, 1998, 2004).

As reações para a obtenção de derivados de CDs ocorrem nos grupamentos hidroxila (OH) (Figura 1). A substituição seletiva é um desafio devido à presença de três tipos de grupamentos hidroxila nas subunidades de glicose (dos carbonos C2, C3 e C6), que competem entre si (KHAN et al., 1998; ŘEZANKA, 2019). Entretanto existem algumas diferenças químicas entre elas, as hidroxilas da posição C6 são as mais básicas e com menor impedimento estérico, em C2 são as mais ácidas e em C3 são as com maior impedimento estérico (KHAN et al., 1998; ŘEZANKA, 2016, 2019).

Quando todos os grupos hidroxila são desprotonados na presença de base em excesso, um reagente eletrofílico atacará preferencialmente na posição C6, por ser a de

menor impedimento estérico. O oxianion formado é mais nucleofílico do que outros grupos hidroxila não desprotonados. Agentes mais reativos atacarão os grupos hidroxila menos seletivamente e, portanto, reagirão não apenas com os grupos hidroxila na posição C6, mas também com os grupos hidroxila da borda secundária da CD (C2 e C3). Reagentes menos reativos irão reagir seletivamente na posição C6 (KHAN et al., 1998; ŘEZANKA, 2019).

A monossustituição de derivados de CDs ocorre quando apenas uma hidroxila é substituída por outro grupamento funcional (SZEJTLI, 1998). A monossustituição pode ocorrer nas hidroxilas das posições C2, C3 e C6 (ŘEZANKA, 2019). A substituição na posição C6 deixa a borda mais larga (face secundária) da CD livre para interações das moléculas hóspedes. Além disso, as ciclodextrinas monossustituídas na posição C6 são fáceis de sintetizar em comparação com as hidroxilas de C2 e C3 (ŘEZANKA, 2019).

Para a síntese de derivados de CD monossustituídos, a tosilação da hidroxila C6 é uma típica reação inicial para a formação de um intermediário mais reativo, assim, podendo formar uma variedade de derivados de β -CD (ŘEZANKA, 2019; SZEJTLI, 1998). A tosilação consiste na reação da CD com o cloreto de tosilato (TsCl) em piridina resultando na monotosilação (6-O-toluenesulfonil- β -CD) (KHAN et al., 1998; MELTON; SLESSOR, 1971). A escolha do solvente tem um grande efeito no resultado da tosilação, a piridina forma um complexo de inclusão com a ciclodextrina e direciona a reação para a posição C6. Entretanto, a piridina é um solvente tóxico e forma um complexo estável com a cavidade da ciclodextrina dificultando a purificação (KHAN et al., 1998; SZEJTLI, 1998).

Métodos com outros solventes também são descritos, como por exemplo, a reação da β -CD com o TsCl em meio reacional aquoso, na presença de NaOH, com rendimento de 11% (PETTER et al., 1990). O rendimento de 6-O-toluenesulfonil- β -CD pode ser melhorado utilizando um reagente menos eletrofílico como, por exemplo, 1-(*p*-toluenesulfonil)imidazol ou *p*-toluenesulfônico anidrido (BYUN; ZHONG; BITTMAN, 2000; MARTIN POPR, 2016). Independente do método utilizado, o rendimento de CD monotosilada purificada, em torno de 30%, têm sido considerado adequado, face a seletividade proporcionada.

3.1.4 Toxicidade das ciclodextrinas

No organismo as CDs são capazes de formar complexos com várias biomoléculas, incluindo lipídios (LECLERCQ, 2016). A interação das CDs com o colesterol e outros lipídios das membranas pode alterar a integridade e as funções de certos domínios da membrana. A β -CD tem maior capacidade de extração de colesterol de membranas, em comparação com a α -CD e γ -CD (SZENTE et al., 2018). A extração de componentes da membrana celular, como o colesterol, pode levar a hemólise, ou seja, à lise dos glóbulos vermelhos (eritrócitos) e à liberação de seu conteúdo no plasma sanguíneo. Esta atividade hemolítica, no entanto, pode ser influenciada pelos substituintes ligados as CDs (LECLERCQ, 2016). A presença de substituintes hidrofílicos (por exemplo, 2-hidroxipropil, 3-hidroxipropil, sulfato, éter sulfobutílico, etc.) reduz a atividade hemolítica em comparação com as CDs naturais, enquanto os ligantes lipofílicos (por exemplo, CDs metilados) demonstram atividades hemolíticas mais pronunciadas (LECLERCQ, 2016). Assim, devido ao seu efeito hemolítico, as CDs-metiladas não são utilizadas pela via parenteral (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; KURKOV; LOFTSSON, 2013; SZENTE et al., 2018).

3.2 Ácidos orgânicos

3.2.1 Bioprodução por *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa, que se apresenta na forma de bastonetes e é fermentativa. No periplasma destas células estão presentes as enzimas glicose-frutose oxidoredutase (GFOR, EC 1.1.99.28) e glicono- δ -lactonase (GL, EC 3.1.1.17). O mecanismo catalítico do complexo GFOR/GL opera em “*ping-pong*”, onde a glicose é oxidada a glicono- δ -lactona pela redução do NADP^+ a NADPH, após esta coenzima é reoxidada pela redução da frutose à sorbitol (Figura 2) (HARDMAN; SCOPES, 1988; ZACHARIOU; SCOPES, 1986).

As paginas 45-50 foram suprimidas por conterem informações contidas na proposta de depósito de patente junto ao INPI.

4. CAPÍTULO I

Synthesis, characterization and toxicity of new polyhydroxy acids- β -Cyclodextrin derivatives

**Proposto para depósito de patente junto ao INPI
Artigo elaborado correspondente a ser submetido ao
periódico Carbohydrate Polymers**

Synthesis, characterization and toxicity of new polyhydroxy acids- β -Cyclodextrin derivatives

Maria Gabriele Delagustin^{ab}, Sabrina Carra^{ab}, Rafael Frassini^b, Mariana Roesch Ely^b, Thiago Barcellos^b, Eloane Malvessi^b, Valquiria Linck Bassani^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Av. Ipiranga, 2752. Porto Alegre, RS – Brasil. CEP 90610-000. Faculdade de Farmácia – UFRGS.

^bPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil.

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Petrópolis, Caxias do Sul, RS- Brasil. CEP 95070-560.

Maria Gabriele Delagustin: mgdelagu@ucs.br (54) 99955 2837

Sabrina Carra: scarra@ucs.br (54) 99183 6015

Rafael Frassini: rfrassin@ucs.br (54) 99915 3047

Mariana Roesch Ely: mrely@ucs.br

Thiago Barcellos: thiago.barcellos@ucs.br (54) 99659 4499

Eloane Malvessi: emalvess@ucs.br (54) 99997 4503

Valquiria Linck Bassani: valquiria.bassani@ufrgs.br (51) 99962 0162

Capítulo I é constituído por artigo científico Synthesis, characterization and toxicity of new polyhydroxy acids- β -Cyclodextrin derivatives. Proposto para depósito de patente junto ao INPI

Artigo elaborado correspondente a ser submetido ao periódico Carbohydrate Polymers que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 54 – 108.

5 CAPÍTULO II

Vetorização hepática do derivado de ciclodextrina _____
_____ (6-XB- β -CD)

Capítulo II I é constituído por Vetorização hepática do derivado de _____ (6-LA- β -CD). Proposto para depósito de patente junto ao INPI

No texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 115 – 133.

O nome do derivado 6-LA- β -CD foi suprimido devido ao pedido de depósito de patente ao INPI.

6 DISCUSSÃO GERAL

Dentre as ciclodextrinas naturais (α -CD, β -CD e γ -CD) a β -CD é a menos solúvel, contudo, possui tamanho adequado de cavidade para a formação de complexos com diversas moléculas de interesse no campo farmacêutico. No entanto, β -CD apresenta atividade hemolítica e toxicidade renal, o que limita seu emprego pela via parenteral ou por outras vias de administração, como a ocular (KURKOV; LOFTSSON, 2013; SZEJTLI, 1998; TIWARI; TIWARI; RAI, 2010). Neste panorama, a síntese de derivados tem trazido perspectivas promissoras para superar essas limitações. No entanto, o número de derivados ainda é limitado e restrito ao domínio de poucas empresas estrangeiras. Neste contexto, no presente trabalho foi proposta a síntese e caracterização de derivados de β -CD ligados a ácido poli-hidroxilados orgânicos, que apresentem como propriedade comum alta hidrossolubilidade e baixa toxicidade, com vistas nas suas potenciais aplicações para produtos destinados à via parenteral ou para a vetorização de fármacos para tecidos e alvos terapêuticos específicos.

Para a síntese de derivados de CDs, primeiramente a β -CD foi ativada pela adição do grupamento tosila (Figura 1). A tosilação da hidroxila C6 é uma reação inicial típica para a obtenção de derivados monossustituídos. Nesta etapa ocorre a obtenção de um intermediário mais reativo podendo, assim, sintetizar uma variedade de derivados de β -CD (ŘEZANKA, 2019; SZEJTLI, 1998). A reação pode ocorrer nas hidroxilas das posições dos carbonos C2, C3 e C6 das sete unidades de glicose (ŘEZANKA, 2019).

A reação de monotosilação da β -CD foi inicialmente realizada segundo a metodologia descrita por Petter et al, 1990. Que consiste na reação da β -CD com o cloreto de *p*-toluenossulfonila (*p*-TsCl) (1:1) em meio aquoso e presença de NaOH concentrado (PETTER et al., 1990). Utilizou-se uma solução de HCl 1 mol L⁻¹ para neutralizar a reação. A recuperação foi realizada por precipitação em acetona e a purificação por meio de diversas lavagens com acetona e água a 45°C. O produto 6-XA- β -CD foi obtido com rendimento de aproximadamente 10%, com pureza acima de 90% (m/v). Entretanto, este resultado não se mostrou reprodutível, observando-se rendimento variável. Para contornar este problema, tem sido realizada a monotosilação

utilizando-se o 1-(*p*-toluenosulfonil)imidazol (*p*-TsIm). Com este reagente é possível obter rendimentos de até 36% (TANG; SUN; NG, 2013).

Com base nessas experiências anteriormente relatadas, no presente trabalho, a síntese do 6-Ts- β -CD foi realizada utilizando-se *p*-TsIm, segundo metodologia descrita por Byun et al (2000). Primeiramente o *p*-TsIm foi sintetizado pela reação do *p*-TsCl com o imidazol (Figure 1). Posteriormente, foi realizada a reação do β -CD com o reagente sintetizado, em meio aquoso e na presença de NaOH. Para finalizar a reação utilizou-se cloreto de amônio. A purificação foi realizada por lavagem com acetona e água (BYUN; ZHONG; BITTMAN, 2000). O rendimento foi de 32%. A pureza foi determinada por HPLC-HRMS, 4,2% (p/p) de 6-XA- β -CD e 5,8% (p/p) de β -CD (Figure S16).

O produto 6-XA- β -CD foi caracterizado por ^1H RMN e HRMS-ESI. No espectro de massas (Figure 2B) o sinal com maior intensidade, m/z de 667,1785, é correspondente ao 6-XA- β -CD ($\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{O}_{37}\text{S}$) $[\text{M}+\text{Na}]^{+2}$ (erro experimental de 0 ppm). Também foi detectado o pico do β -CD com m/z de 590,1766 $[\text{M}+\text{Na}]^{+2}$ (erro experimental de 4,23 ppm). Para a fragmentação (MS/MS) selecionou-se m/z 1289 correspondente a $[\text{M}+\text{H}]^{+1}$ (6-XA- β -CD/ $\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{O}_{37}\text{S}$) chegando na energia de 100 eV. Observou-se a fragmentação de seis unidades de 162 u, referentes à quebra da ligação glicosídica entre as unidades de glicose. O fragmento de menor valor de m/z (325,1150) é correspondente a uma unidade de glicose ligada ao grupamento tosila. No espectro de ^1H RMN (Figure S5) observou-se a presença de um duplete em 7,75 ppm e outro em 7,43 ppm característicos de anel aromático e que não estavam presentes no espectro do β -CD. Os valores das integrais correspondem a 2 H por duplete, e os valores de integrais do H-1 e H-1*, picos referentes ao β -CD, somam-se 7 H, confirmando a relação de um grupamento tosila por unidade de ciclodextrina. O pico em 2,43 ppm é característico de uma metila, que está presente no grupamento tosila. A integral deste pico é referente a 3 H, corroborando com a relação de um grupamento tosila por unidade de ciclodextrina.

Na segunda etapa o grupamento tosila, que é um bom grupamento abandonador, foi facilmente substituído pela amina primária ($-\text{NH}_2$) da etilenodiamina. A síntese foi realizada pela reação entre 6-XA- β -CD e excesso de etilenodiamina (Figure 1). Foram

realizados dois procedimentos, o primeiro utilizando-se chapa de aquecimento com agitação magnética por 6h e a segunda em micro-ondas (Anton Paar Microwave Digesters) por 15 min, ambas a 80°C. Os resultados de rendimento foram semelhantes (90 % m/v), sendo a utilização de micro-ondas uma alternativa viável e rápida para a obtenção de 6-XXA- β -CD.

O excesso da etilenodiamina foi removido no rota-evaporador, a temperatura do banho foi ajustada para 45°C e a pressão reduzida em 20 mbar. O produto resultante apresentou coloração amarela (referente à etilenodiamina) e aparência viscosa. Seguindo a etapa de purificação, a amostra foi solubilizada em água e precipitada com acetona. A precipitação foi repetida de 3 a 4 vezes e observando a gradual perda da coloração amarela. O resíduo de acetona foi removido por rota-evaporador e o produto final seco em liofilizador. O produto 6-EDA- β -CD foi caracterizado por HRMS-ESI, ^1H , ^{13}C RMN e HPLC-HRMS.

No espectro de massas, obtido por HRMS-ESI, (Figure 3B) observa-se o sinal de maior intensidade, com m/z de 600,2127 $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{+2}$ (erro experimental de 0.83 ppm), correspondente ao 6-XXA- β -CD. Não foi detectado sinal referente ao material de partida, 6-XA- β -CD, entretanto foi identificado o sinal da β -CD. A β -CD foi quantificada por HPLC-HRMS em 3,1% (p/p) (Figure S17). Na fragmentação (Figure 3C) observou-se o mesmo padrão que 6-XA- β -CD. O fragmento final, m/z de 205,1198, foi identificado como uma unidade de glicose ligada ao grupamento etilenodiamina. No espectro de ^1H RMN observou-se que os sinais referentes ao grupamento tosila não foram mais detectados (7,75, 7,43 e 2,43 ppm), corroborando os resultados da espectrometria de massas, em que não há indícios do material de partida (Figure S4). Observou-se a presença de novos sinais em 2,86, 2,79–2,65, 2,64–2,54 ppm referentes aos H dos carbonos adjacentes aos grupamentos amina. No espectro de ^{13}C NMR, novos sinais foram observados em comparação com o espectro ^{13}C NMR da β -CD. Os sinais em 83,37, 70,48 e 49,93 ppm correspondem ao C-4 *, C-5 * e C-6*, da unidade de glicose que o grupo etilenodiamina está ligado. Um novo sinal em δ 49,13 ppm é correspondente ao C ligado a NH (C8) (Figure S5).

A adição de um espaçador, contendo grupamentos NH_2 , entre a β -CD e os PHA foi escolhido visando à formação de uma ligação amida. A ligação direta entre a

hidroxila da β -CD e o ácido carboxílico dos ácidos orgânicos resultaria na formação de um éster. Este grupamento é muito mais suscetível à hidrólise, acarretando em menor estabilidade dos derivados.

As paginas 140- 143 foram suprimidas por conter informações contidas na patente que está em processo de submissão ao INPI.

Visto a necessidade de quantificar os componentes da reação, foi desenvolvido um método de quantificação para os materiais de partida assim como para os produtos intermediários e finais: ácido B, C, D e E, 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD, 6-XE- β -CD, β -CD, 6-XA- β -CD, 6-XXAA- β -CD.

Para isso, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração e coluna para carboidratos Aminex HPX-87H (Bio-Rad Labs, Richmond, CA, USA). No entanto, não foi possível obter separação dos picos da β -CD, 6-XA- β -CD, 6-XXA- β -CD, 6-XB- β -CD e do ácido B independentemente da fase móvel utilizada. Posteriormente, foi utilizada a coluna C₁₈ LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 μ m) LiChroCART[®] 250 x 4mm. Para a fase móvel, foram testadas diferentes proporções de metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e H₂O. Utilizando-se uma mistura de MeOH:H₂O (1:1), fluxo de eluição 0,4 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 30°C, foi possível separar os picos da β -CD, 6-XA- β -CD e ácido lactobiônico. Entretanto não foi possível separar os picos de 6-XXAA- β -CD e 6-XB- β -CD.

Face a esta limitação, foi proposta a utilização de método por CLAE acoplado ao detector de massas de alta resolução (HRMS). Utilizou-se a coluna Shim-pack CLC-ODS(M)[®] C18 Shimadzu 250 x 4.6 mm. Fase móvel MeOH: ácido fórmico 0,1% em água, na proporção de 1:1, modo isocrático e com fluxo de 0,4 ml min⁻¹. Após a definição do método, foram preparadas curvas de analíticas de cada composto individualmente em água. Para o ácido lactobiônico, maltobiônico, glicônico e galacturônico a faixa de concentração foi de 1-20 μ g mL⁻¹ (Figura 1). 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD de 20 até 200 μ g mL⁻¹ (Figura 2). β -CD, 6-XXA- β -CD e 6-XA- β -CD de 5 até 200 μ g mL⁻¹ (Figura 3). A pureza dos produtos 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD foi determinada em 90,6, 89,0, 89,8 e 96,2% (p/p), respectivamente. A pureza de 6-XA- β -CD e 6-XXA- β -CD foi, respectivamente, 94,2% e 96,9% (p/p).

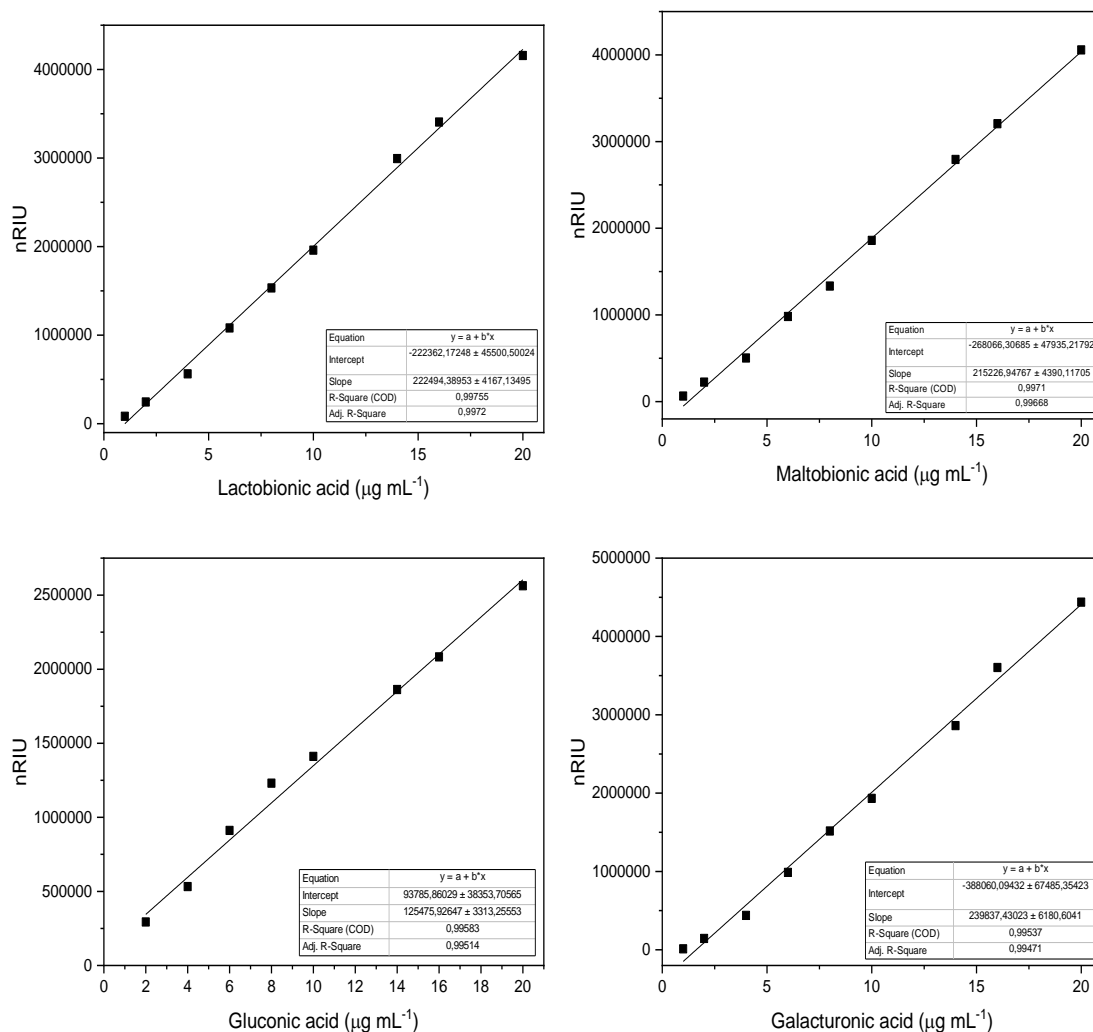


Figura 1: Curva analítica do ácido A, B, C e D de 1 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtida por HPLC-HRMS. HPLC-HRMS= Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução

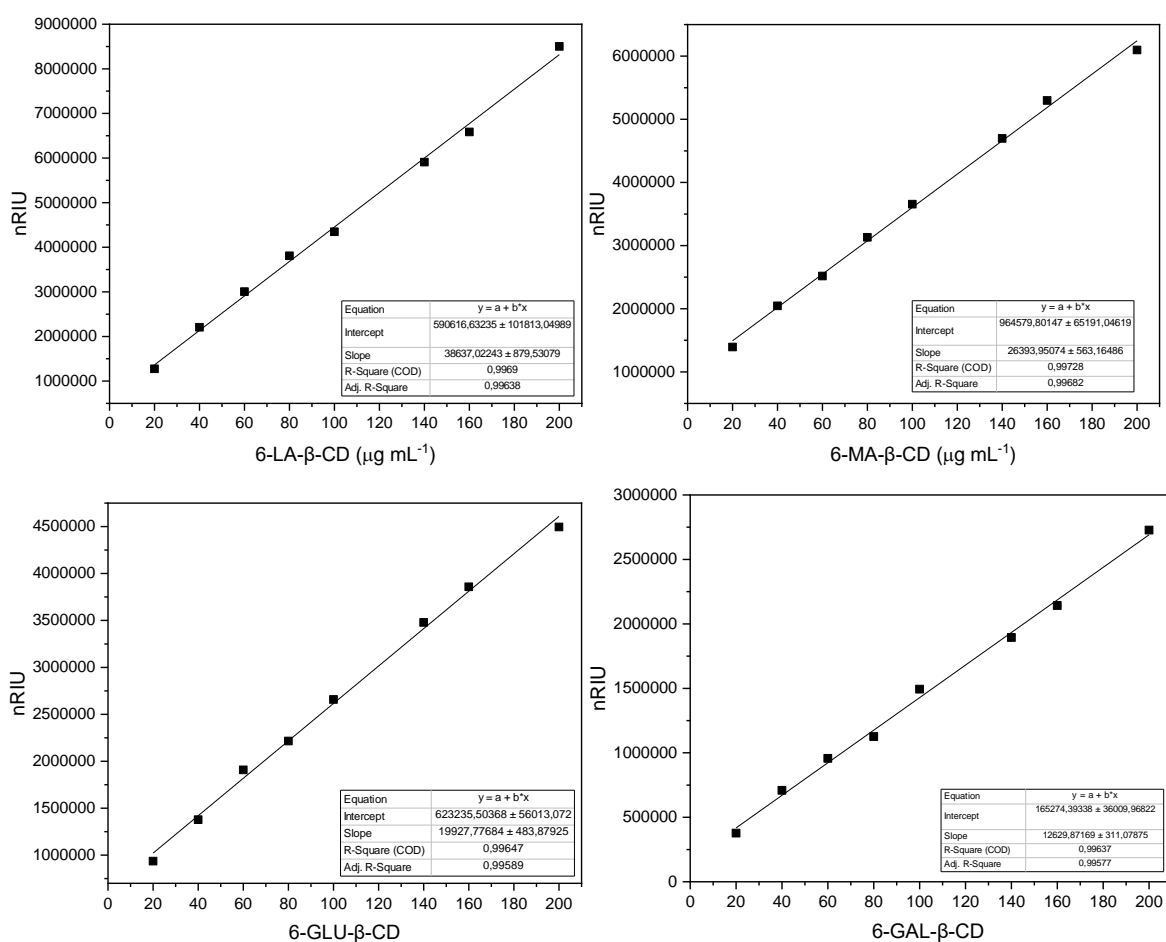


Figura 2: Curva analítica do 6-XB-β-CD, 6-XC-β-CD, 6-XD-β-CD e 6-XE-β-CD de 20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtida por HPLC-HRMS (6-XB-β-CD= _____; 6-XC-β-CD= _____; 6-XD-β-CD= _____; 6-XE-β-CD= _____; HPLC-HRMS= Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução).

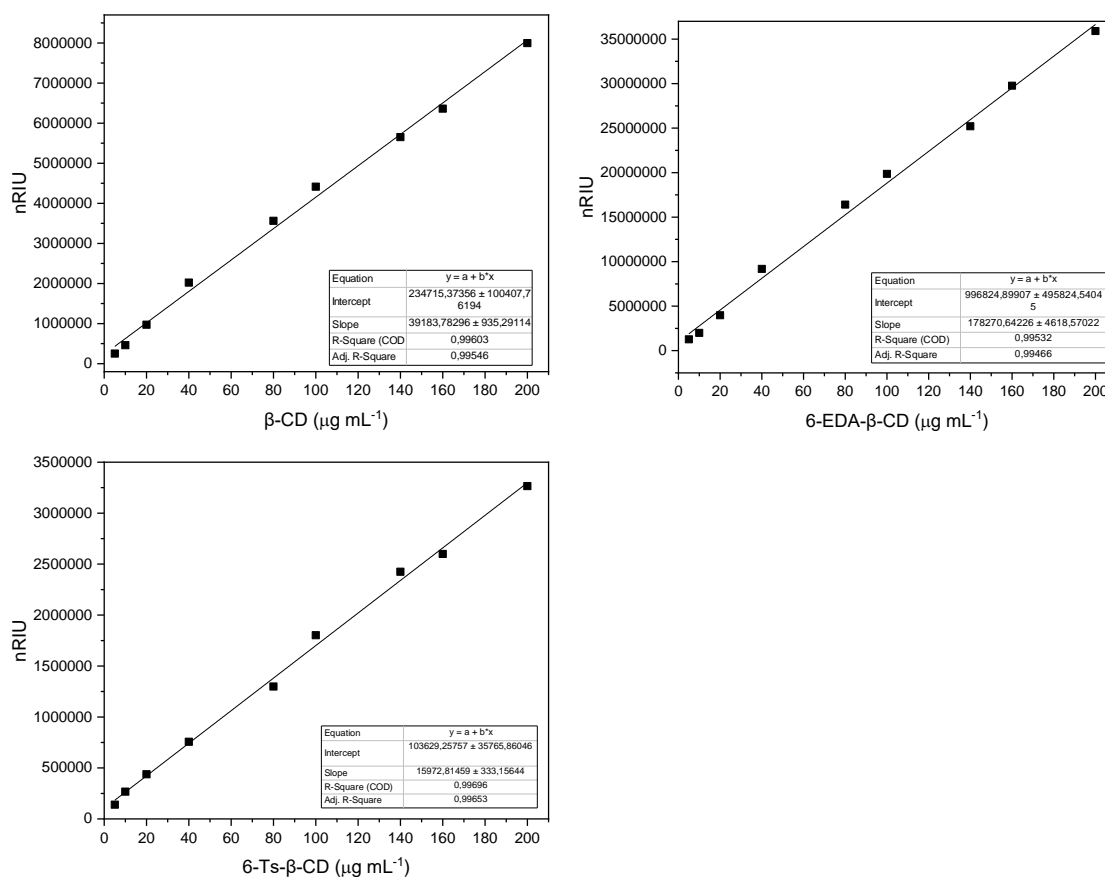


Figura 3: Curva analítica do $\beta\text{-CD}$, 6-XXA- $\beta\text{-CD}$ e 6-XA- $\beta\text{-CD}$ de 5 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtida por HPLC-HRMS (6-XXA- $\beta\text{-CD}$ = _____; 6-XA- $\beta\text{-CD}$ = 6 _____; HPLC-HRMS= Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução).

Um dos objetivos para a síntese dos derivados de $\beta\text{-CD}$ ligados á ácidos orgânicos é a obtenção de produtos com melhor perfil de hidrossolubilidade e menor toxicidade. Para isso foram realizados os testes de determinação da hidrossolubilidade intrínseca, citotoxicidade em cultura de células, hemocompatibilidade e complexação com o colesterol.

A hidrossolubilidade foi determinada pela agitação de um excesso de ciclodextrina até o equilíbrio, em temperatura de 30°C (BERGSTRÖM et al., 2002). A solubilidade intrínseca de 6-XB- $\beta\text{-CD}$, 6-XC- $\beta\text{-CD}$, 6-XD- $\beta\text{-CD}$ e 6-XE- $\beta\text{-CD}$ observada, utilizando este método, foi de 820, 860, 760 e 780 mg mL^{-1} , respectivamente. Comparando os resultados obtidos, com a hidrossolubilidade da $\beta\text{-CD}$

CD (18,5 mg mL⁻¹ a 25°C, 24,3 mg mL⁻¹ a 30°C, 45 mg mL⁻¹ a 45°C e 91 mg mL⁻¹ a 60°C) (HEDGES, 2009; LÁSZLÓ JICSINSZKY, 2019; SZEJTLI, 1998), observa-se um incremento de 31 a 36 vezes para os derivados sintetizados.

O aumento da hidrossolubilidade pode ocorrer devido a dois fatores: primeiro, pela adição de ácidos orgânicos (PHA) que são compostos altamente hidrossolúveis; segundo, devido à desestabilização do anel secundário da β -CD composto por ligações de hidrogênio entre as hidroxilas de C2 e C3 e promoção de ligações hidrogênio das hidroxilas correspondentes com a água (CAI et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2018; FISCHER; MEYER, 1889; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; KURKOV; LOFTSSON, 2013; SAOKHAM et al., 2018; SZEJTLI, 1998). Muito embora a substituição tenha sido planejada para ocorrer, prioritariamente, nas hidroxilas primárias (derivado monosubstituído) devendo predominar o efeito da hidrofilia do substituinte sobre a hidrossolubilidade do derivado. No entanto, não há como descartar totalmente a possibilidade de ocorrência do segundo efeito, mesmo que em pequenas proporções, tendo em vista a impossibilidade de se obter exclusivamente um tipo de derivado.

A avaliação da citotoxicidade dos derivados 6-XXA- β -CD, 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD foi realizada pelo ensaio de MTT em cultura de células HepG2 (hepatocarcinoma humano) e Hek293 (rim embrionário não tumoral). Foram escolhidos dois tipos de células, uma linha celular não tumoral (Hek 293) e uma linha celular tumoral (HepG2). O HepG2 foi escolhido devido à afinidade do ácido lactobiônico, do derivado 6-XB- β -CD, para os receptores de asialoglicoproteína (ASGP-R) presentes na membrana dessas células. Os ensaios foram realizados em concentração de 5 até 200 μ M, os resultados indicaram, que os compostos sintetizados, não são citotóxicos e são biocompatíveis.

A β -CD administrada por via oral, induz toxicidade limitada, entretanto a administração parenteral resulta em maior toxicidade. A β -CD apresenta a propriedade de formar complexos de inclusão com alguns lipídeos de membrana, como o colesterol, podendo acarretar em alterações na integridade da membrana celular. Essas interações podem levar a hemólise das hemácias, assim como formar complexos pouco

solúveis nos rins, acarretando toxicidade renal (LECLERCQ, 2016; RAJEWSKI et al., 1995; STELLA; HE, 2008; STELLA; RAJEWSKI, 2020; SZENTE et al., 2018).

O rim é o órgão mais afetado após a absorção sistêmica das CDs. Tanto o β -CD quanto a HP- β -CD formam um complexo com o colesterol no sangue. Ambos os complexos carregam o colesterol para o rim por filtração glomerular. Entretanto, o complexo β -CD/colesterol tem solubilidade limitada em água. A cristalização deste complexo no tecido renal explica a nefrotoxicidade da β -CD administrada pela via parenteral (FRIJLINK et al., 1991; GOULD; SCOTT, 2005; STELLA; HE, 2008).

Para as CDs e os seus derivados há uma correlação entre citotoxicidade em cultura de células, atividade hemolítica e propriedades de complexação com o colesterol (KISS et al., 2010; SZENTE et al., 2018). A adição de substituintes na β -CD influencia a capacidade de formação de complexo com o colesterol, por exemplo, grupos hidrofílicos (2-hidroxipropil, 3-hidroxipropil, sulfato e éter sulfobutílico) tem mostrado redução da atividade hemolítica em relação à ciclodextrina natural. Entretanto, a adição de grupos metila levam a maiores efeitos citotóxicos (KISS et al., 2010; LECLERCQ, 2016; SZENTE et al., 2018). Também, é relatado que a quantidade de lipídeos/colesterol no sangue atenua significativamente a atividade hemolítica de derivados de metil- β -CD (M- β -CD). A hipótese é que os lipídios/lipoproteínas do plasma sanguíneo podem competir com os lipídios associados à membrana (colesterol principalmente) para formar complexos de inclusão com o M- β -CD, assim atenuando a atividade hemolítica (SZENTE et al., 2018).

A capacidade das CDs de complexar o colesterol também tem ensejado pesquisas com vistas no seu potencial uso no tratamento de doenças em que o colesterol tem papel importante no seu desenvolvimento. Por exemplo, em doenças virais, como é o caso da síndrome da imunodeficiência adquirida, influenza, dengue entre outras. Também apresentando atividade antiparasitária contra Leishmaniose e malária. Além de doenças cardiovasculares e Niemann-Pick Tipo C. Ainda há muito a ser estudado sobre as aplicações terapêuticas das CDs (BRAGA, 2019).

Com a finalidade de caracterizar os derivados sintetizados quanto a sua toxicidade, os efeitos hemolíticos e de complexação com o colesterol dos derivados sintetizados foram avaliados. O ensaio de hemólise foi realizado com sangue humano

coletado em tubos com anticoagulante EDTA (BD Vacutainer®). Utilizou-se somente com o soro, o plasma foi removido por centrifugação. Então os glóbulos vermelhos humanos foram incubados a 37°C na presença dos derivados 6-XXA- β -CD, 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD em diferentes concentrações (1, 5, 10, 20 e 40 mM). Para fins de comparação, o ensaio também foi realizado com a β -CD. A β -CD induziu 11,3% \pm 2,8% de hemólise na concentração de 10 mM e 99,7% \pm 0,51% na concentração de 20 mM, confirmando a extensa hemólise de glóbulos vermelhos, relatada anteriormente, pela β -CD (ANNO et al., 2011; RAJEWSKI et al., 1995; TAVORNVIPAS et al., 2002). Um percentual de 100% de hemólise, em glóbulos vermelhos humanos, foi detectado para a β -CD, na concentração de 15 mM (RAJEWSKI et al., 1995; STELLA; RAJEWSKI, 2020).

Os derivados sintetizados apresentaram menor atividade hemolítica expressivamente inferior à apresentada pela β -CD. Nas concentrações de até 20 mM a atividade hemolítica permaneceu menor que 5%. Derivados descritos na literatura como, Sulfopropiléter- β -ciclodextrina (SPE- β -CD) com grau de substituição 3,6 (SPE_{3,6}- β -CD) e 7 (SPE₇- β -CD) e Sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE₇- β -CD) com grau de substituição 7 (SBE₇- β -CD), em concentração de até 20 mM, também apresentaram atividade hemolítica inferior a 5%. Contudo, a SBE₁- β -CD, que apresenta somente uma substituição, apresentou maior atividade hemolítica, em torno de 50% de hemólise na concentração de 20 mM (RAJEWSKI et al., 1995; STELLA; RAJEWSKI, 2020). A HP- β -CD e Randomicamente metilada- β -ciclodextrina (RAMEB) induziram 50% de hemólise (HC₅₀) nas concentrações de 57,0 \pm 1,4 mM e 1,80 \pm 0,09 mM, respectivamente (KISS et al., 2010). Esses resultados corroboram a teoria de que a adição de grupamentos metila leva a um aumento no efeito hemolítico e o grupamento hidroxipropil o diminui. Os resultados obtidos para os derivados de CDs sintetizados são promissores visto que apresentaram perfil semelhante a HP- β -CD. Os resultados sugerem que as modificações implementadas na estrutura da β -CD resultaram em derivados com efeito hemolítico expressivamente menor que o efeito determinado pela CD natural e comparável ao efeito de derivados correntemente usados pela via parenteral como a HP- β -CD.

Também, foi avaliada a afinidade e complexação dos derivados sintetizados com o colesterol. A solubilização do colesterol ocorreu em maior proporção conforme o aumento da quantidade de CD utilizada. Como comparação, utilizou-se a HP- β -CD e a M- β -CD, sendo que a HP- β -CD ($0,0793 \pm 0,0015 \text{ mg ml}^{-1}$, na proporção 8:1) apresentou menor capacidade de solubilizar o colesterol do que a M- β -CD ($0,1418 \pm 0,0035 \text{ mg ml}^{-1}$, na proporção 8:1). A presença de ligantes lipofílicos, como no caso da M- β -CD, apresentam maiores atividades hemolíticas quando comparados com as CDs naturais (LECLERCQ, 2016; SZENTE et al., 2018). O derivados 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD solubilizaram o colesterol em $0,0668 \pm 0,0038 \text{ mg ml}^{-1}$, $0,0767 \pm 0,0035 \text{ mg ml}^{-1}$, $0,0865 \pm 0,0052 \text{ mg ml}^{-1}$ e $0,1155 \pm 0,0055 \text{ mg ml}^{-1}$, respectivamente, na proporção 8:1. Os derivados de CDs foram sintetizados com ligantes hidrofílicos e apresentaram menor complexação e solubilização do colesterol em comparação com a M- β -CD ($0,1418 \pm 0,0035 \text{ mg ml}^{-1}$, na proporção 8:1).

Ao demonstrar que os derivados sintetizados apresentam pouca afinidade pelo colesterol, atividade hemolítica inferior a 5% e baixa citotoxicidade a células HepG2 e Hek293, os resultados revelam que estes apresentam promissoras características de biocompatibilidade com a via parenteral. Estas características, adicionadas da sua elevada solubilidade em água, revela o potencial destes novos derivados de ácidos orgânicos- β -CD como uma alternativa aos derivados existentes no mercado.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente tese permitem formular as seguintes conclusões:

- O B de sódio e C de sódio foram obtidos com rendimento de 74,84% e 83%, respectivamente, pelas enzimas GFOR/GL da bactéria *Z. mobilis* imobilizada. Estes compostos foram purificados (ácido B 95,6% e ácido C 98% de pureza) e caracterizados sob o ponto de vista químico.

- Uma rota sintética para a obtenção dos derivados ácidos B, C, D ou E - β -ciclodextrina é proposta, a qual compreende as seguintes etapas: (i) ativação da β -CD por meio da tosilacção do grupamento hidroxila em C6 (6-XA- β -CD); (ii) substituição do grupamento tosila pela _____(6-XXAA- β -CD); este grupamento tem a finalidade de atuar como um espaçador entre a β -CD e o ácido orgânico. (iii) ligação entre a 6-XXA- β -CD e o ácido orgânico, obtendo-se, 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD; (iv) purificação por sucessivas precipitações em acetona. O rendimento de síntese foi superior a 64%.

- Os derivados sintetizados (6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-DE- β -CD) e os produtos intermediários (6-XA- β -CD e 6-XXA- β -CD) puderam ser caracterizados por HRMS-ESI e ^1H e ^{13}C RMN. Estas análises permitiram identificar os sinais de m/z , (HRMS-ESI), para cada composto sintetizado e, ao seleccionar-se o sinal base de m/z correspondente, na análise de MS/MS, foi possível observar a quebra, em sequência, da ligação glicosídica entre as unidades de glicose. Os sinais dos espectros de ^1H e ^{13}C RMN foram identificados e comparados com os sinais da β -CD, sendo possível observar a efetividade das modificações ensejadas pela derivatização.

- O método desenvolvido utilizando HPLC-HRMS permitiu quantificar os materiais de partida, ácido lactobiônico, maltobiônico, glicônico e galacturônico e β -CD, os produtos intermediários e os finais 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD, 6-XE- β -CD, 6-Ts- β -CD e 6-EDA- β -CD e determinar a pureza dos produtos sintetizados. Os valores de pureza obtidos para o 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD e 6-XE- β -CD, respectivamente, foram 90,6, 89,0, 89,8 e 96,2%.

- A síntese da série de derivados de β -CD revela o potencial da rota sintética de constituir-se numa plataforma de produção de derivados de ácidos poli-hidroxilados da β -CD.
- Os valores de hidrossolubilidade dos derivados 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD, 6-XE- β -CD foram, respectivamente, 820, 860, 760 e 780 mg mL⁻¹. Estes valores de hidrossolubilidade são de 32 a 36 vezes superiores à hidrossolubilidade da β -CD.
- Os ensaios de citotoxicidade (*in vitro*) dos derivados 6-XXA- β -CD, 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XE- β -CD, realizados utilizando cultura de células HepG2 e Hek293, sugerem que todos derivados sintetizados de poli-hidroxiácidos- β -CD não são citotóxicos até concentração de 200 μ M e são biocompatíveis com as células testadas.
- Os ensaios de citotoxicidade (*in vitro*) do derivado 6-XC- β -CD, realizados utilizando cultura de células HepG2 e Hek293, sugerem que este produto não é citotóxico até concentração de 100 μ M.
- Os derivados sintetizados apresentaram baixo efeito hemolítico até concentração de 20 mM. Resultado semelhante ao efeito produzido pela HP- β -CD, derivado amplamente utilizado em produtos destinados à via parenteral e expressivamente inferior ao efeito apresentado pela β -CD.
- Os derivados 6-XXA- β -CD e 6-XE- β -CD apresentaram efeito hemolítico quando a concentração foi extrapolada para 40 mM.
- A capacidade de complexação e solubilização de moléculas de colesterol pelos derivados 6-XB- β -CD, 6-XC- β -CD, 6-XD- β -CD mostraram-se baixa e concentração dependente. Entretanto para o derivado 6-XE- β -CD observou-se uma maior capacidade de complexação com o colesterol em relação aos demais derivados.
- Para o derivado 6-XE- β -CD observou-se uma correlação entre efeito hemolítico e complexação com a molécula do colesterol, principalmente em altas concentrações.
- O conjunto dos resultados demonstrou o sucesso da síntese de uma série de derivados de poli-hidroxiácido- β -CD apresentando alta solubilidade em água, sem efeito citotóxico e baixa atividade hemolítica. Essas características revelam o potencial

dos derivados sintetizados como alternativas para formas farmacêuticas parenterais ou outras aplicações.

- O complexo 6-XB- β -CD/FITC foi caracterizado e utilizado nos ensaios de captação celular e de competição. Os resultados obtidos são promissores, mas, ainda, não foi possível determinar a afinidade do derivado 6-XB- β -CD aos ASGP-R presentes nas células HepG2.

8 REFERÊNCIAS

ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1275–1291, 2013.

ANNO, T. et al. Preparation and evaluation of polyamidoamine dendrimer (G2)/branched- β -cyclodextrin conjugate as a novel gene transfer carrier. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 70, n. 3–4, p. 339–344, 2011.

BANSAL, D. et al. Lactobionic acid coupled liposomes: An innovative strategy for targeting hepatocellular carcinoma. **Drug Delivery**, v. 23, n. 1, p. 140–146, 2016.

BENKOVICS, G. **Selectively substituted cyclodextrins for analytical and pharmaceutical applications**. Charles University in Prague, 2017.

BERGSTRÖM, C. A. S. et al. Experimental and computational screening models for prediction of aqueous drug solubility. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 2, p. 182–188, 2002.

BRAGA, S. S. Cyclodextrins: Emerging Medicines of the New Millennium. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 801, 2019.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins . 1 . Drug Solubilization and Stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 10, p. 1017–1025, 1996.

BRITISH PHARMACOPOEIA. British Pharmacopoeia Commission. **British Pharmacopoeia 2009**, v. I & II, n. 4, p. 418–420, 2009.

BYUN, H.; ZHONG, N.; BITTMAN, R. 6A-O-p-TOLUENESULFONYL-b-CYCLODEXTRIN. **Organic Syntheses**, v. 77, p. 225, 2000.

CAI, W. et al. Can the anomalous aqueous solubility of β -cyclodextrin be explained by its hydration free energy alone? **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 22, p. 3236, 2008.

CAÑETE-RODRÍGUEZ, A. M. et al. Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 1891–1903, 2016.

CAO, L. et al. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 242, p. 116389, 2020.

CAO, Y. et al. Targeted CT imaging of human hepatocellular carcinoma using low-generation dendrimer-entrapped gold nanoparticles modified with lactobionic acid. **J. Mater. Chem. B**, v. 3, n. 2, p. 286–295, 2015.

CARRA, S. **Estudo cinético da produção de ácido lactobiônico e sorbitol por enzimas periplasmáticas de *Zymomonas mobilis***. Universidade de Caxias do Sul, 2012.

CARRA, S. et al. High lactobionic acid production by immobilized *Zymomonas mobilis* cells: a great step for large-scale process. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 7, p. 1265–1276, 2020.

CHARLOUX, C. et al. Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 5, p. 699–704, 1995.

CHEN, G. et al. Targeted doxorubicin delivery to hepatocarcinoma cells by lactobionic acid-modified laponite nanodisks. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 2847–2855, 2015.

CHOI, I.; ZHONG, Q. Gluconic acid as a chelator to improve clarity of skim milk powder dispersions at pH 3.0. **Food Chemistry**, v. 344, n. 12, p. 128639, 2021.

CONCEIÇÃO, J. et al. Cyclodextrins as Drug Carriers in Pharmaceutical Technology: The State of the Art. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 1405–1433, 2018.

DANGI, R. et al. Targeting liver cancer via ASGP receptor using 5-FU-loaded surface-modified PLGA nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 5, p. 479–487, 2014.

DELAGUSTIN, M. G. et al. Bioproduction and characterization of sodium, potassium, and calcium lactobionates. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1003–1009, 22 ago. 2017.

DELAGUSTIN, M. G. et al. Sodium, potassium, calcium lactobionates, and lactobionic acid from *Zymomonas mobilis*: A novel approach about stability and stress

tests. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 104–114, 2019.

DI CAGNO, M. et al. β -Cyclodextrin-dextran polymers for the solubilization of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 468, n. 1–2, p. 258–263, 2014.

DU, C. et al. Hepatocyte targeting and sustained release activity of water-soluble anti-HBV prodrug: Lactobionic acid grafted chitosan-lamivudine conjugate. **Reactive and Functional Polymers**, v. 98, p. 48–55, 2016.

FISCHER, E.; MEYER, J. Oxydetion delr Milchsuckers. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 22, p. 361–364, 1889.

FLORES, M. L. **SÍNTESE BIOCATALÍTICA, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÁCIDO MALTOBIÔNICO**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, 2019.

FOLCH-CANO, C.; YAZDANI-PEDRAM, M.; OLEA-AZAR, C. Inclusion and functionalization of polymers with cyclodextrins: Current applications and future prospects. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14066–14079, 2014.

FOLLE, A. B. et al. Assessment of different systems for the production of aldonic acids and sorbitol by calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 2, p. 185–194, 2018.

FRIJLINK, H. W. et al. **The Effect of Parenterally Administered Cyclodextrins on Cholesterol Levels in the Rat** *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 1991.

FUKAMI, K. et al. Effect of Water Content on the Glass Transition Temperature of Calcium Maltobionate and its Application to the Characterization of Non-Arrhenius Viscosity Behavior. **Food Biophysics**, v. 11, n. 4, p. 410–416, 2016.

GÓMEZ-GRAÑA, S.; PÉREZ-JUSTE, J.; HERVÉS, P. Cyclodextrins and inorganic nanoparticles: Another tale of synergy. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 102338, 2021.

GOULD, S.; SCOTT, R. C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 10, p. 1451–1459, 2005.

GREEN, B. After 30 years ... the future of hydroxyacids. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 1, p. 44–45, 2005.

GREEN, B. A.; YU, R. J.; VAN SCOTT, E. J. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 495–501, 2009.

GRIMES, P. E. et al. The use of polyhydroxy acids (PHAs) in photoaged skin. **Cutis**, v. 73, n. 2 Suppl, p. 3–13, 2004.

GUTIÉRREZ, L. F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 103–111, 2012.

HARDMAN, M. J.; SCOPES, R. K. The kinetics of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. **European Journal of Biochemistry**, v. 173, n. 1, p. 203–209, 1988.

HEDGES, A. Cyclodextrins. In: **Starch**. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 833–851.

HU, Y. et al. Facile Synthesis of Lactobionic Acid-Targeted Iron Oxide Nanoparticles with Ultrahigh Relaxivity for Targeted MR Imaging of an Orthotopic Model of Human Hepatocellular Carcinoma. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 34, n. 1, p. 1600113, 2017.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, 2018.

KHAN, A. R. et al. Methods for selective modifications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1977–1996, 1998.

KISS, T. et al. Evaluation of the cytotoxicity of β -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 376–380, 2010.

KORNHAUSER, A.; COELHO, S. G.; HEARING, V. J. Applications of hydroxy

acids: classification, mechanisms, and photoactivity. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 3, p. 135–142, 2010.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167–180, 2013.

LÁSZLÓ JICSINSZKY. Some comments on the Cyclodextrin solubilities. **MOJ Biorg Org Chem.**, v. 3, n. 1, p. 11–13, 2019.

LECLERCQ, L. Interactions between cyclodextrins and cellular components: Towards greener medical applications? **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 2644–2662, 2016.

LEMOS-SENNA, E. et al. Amphiphilic cyclodextrin nanospheres: particle solubilization and reconstitution by the action of a non-ionic detergent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 10, p. 291–301, 1998.

LEPRÊTRE, S. et al. Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 6086–6093, 2009.

LIU, L. G. Hydrates of erythromycin salts, the preparation and the use thereof hydrate. **Patente de invenção**, p. EP 2 301 945 B1, 2014.

LIU, L.; GUO, Q. X. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena**, v. 42, n. 1–2, p. 1–14, 2002.

LOFTSSON T, JARHO P, MÁSSON M, J. T. Cyclodextrins in drug delivery system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 335–346, 2005.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1–2, p. 1–11, 2007.

LY, N. H.; NGUYEN, T. D.; JOO, S. Raman spectroscopy of pH-induced release of zidovudine from lactobionic acid-conjugated PEGylated gold colloids. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, n. November 2017, p. 49–57, 2018.

MALVESSI, E. et al. Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Industrial**

Microbiology and Biotechnology, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2013.

MARTIN POPR. Synthesis of Cyclodextrin Derivatives for practical applications. **CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE Study programme: Organic chemistry**, p. 57–103, 2016.

MELTON, L. D.; SLESSOR, K. N. Synthesis of monosubstituted cyclohexaamyloses. **Carbohydrate Research**, v. 18, n. 1, p. 29–37, 1971.

MENEZES, P. DOS P. et al. Advances of nanosystems containing cyclodextrins and their applications in pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 559, p. 312–328, 2019.

MOHAPATRA, S. et al. Impact of Cyclodextrin in Drug Delivery System. In: **Sustainable Agriculture Reviews**. p. 271–293, 2018.

MURA, P. Advantages of the combined use of cyclodextrins and nanocarriers in drug delivery: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 579, p. 119181, 2020.

OLIVIERI, M. et al. Experimental Evidence of the Healing Properties of Lactobionic Acid for Ocular Surface Disease. **Cornea**, v. 37, n. 8, p. 1058–1063, 2018.

PAN, Q. et al. Lactobionic acid and carboxymethyl chitosan functionalized graphene oxide nanocomposites as targeted anticancer drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 812–820, 2016.

PANDEY, A. Cyclodextrin-based nanoparticles for pharmaceutical applications: a review. **Environmental Chemistry Letters**, 2021.

PETTER, R. C. et al. Cooperative Binding by Aggregated Mono-6-(alkylamino)- β -cyclodextrins. **American Chemical Society**, v. 112, p. 3860–3868, 1990.

PICOT-ALLAIN, M. C. N.; RAMASAWMY, B.; EMMAMBUX, M. N. Extraction, Characterisation, and Application of Pectin from Tropical and Sub-Tropical Fruits: A Review. **Food Reviews International**, v. 00, n. 00, p. 1–31, 2020.

RAJEWSKI, R. A. et al. Preliminary Safety Evaluation of Parenterally Administered Sulfoalkyl Ether β -Cyclodextrin Derivatives. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.

84, n. 8, p. 927–932, 1995.

RAMACHANDRAN, S. et al. Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 185–195, 2006.

ŘEZANKA, M. Monosubstituted Cyclodextrins as Precursors for Further Use. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2016, n. 32, p. 5322–5334, 2016.

ŘEZANKA, M. Synthesis of substituted cyclodextrins. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 49–63, 2019.

SANDILYA, A. A.; NATARAJAN, U.; PRIYA, M. H. Molecular View into the Cyclodextrin Cavity: Structure and Hydration. **ACS Omega**, v. 5, n. 40, p. 25655–25667, 2020.

SAOKHAM, P. et al. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1161, 2018.

SOUTHARD, J. H.; BELZER, F. O. The University of Wisconsin organ preservation solution: Components, comparisons, and modifications. **Transplantation Reviews**, v. 7, n. 4, p. 176–190, 1993.

STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 30–42, 2008.

STELLA, V. J.; RAJEWSKI, R. A. Sulfobutylether- β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 583, n. May, p. 119396, 2020.

SUEHIRO, D. et al. Maltobionic acid enhances intestinal absorption of calcium and magnesium in rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 83, n. 9, p. 1766–1773, 2019.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **American Chemical Society**, v. 98, p. 1743–1753, 1998.

SZEJTLI, J. Past, present and future of cyclodextrin research. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 1825–1845, 2004.

SZENTE, L. et al. Cyclodextrins: Assessing the impact of cavity size, occupancy, and substitutions on cytotoxicity and cholesterol homeostasis. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1–

15, 2018.

TANG, W.; SUN, D.; NG, S. C. **Modified Cyclodextrins for Chiral Separation**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. v. 9783642376

TAVORNVIPAS, S. et al. 6-O- α -(4-O- α -d-glucuronyl)-d-glucosyl- β -cyclodextrin: solubilizing ability and some cellular effects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1–2, p. 199–209, 2002.

THAPA, B. et al. Asialoglycoprotein receptor-mediated gene delivery to hepatocytes using galactosylated polymers. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 9, p. 3008–3020, 2015.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; RAI, A. K. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 2, n. 2, p. 72–9, 2010.

VILLA, R. et al. Targeted doxorubicin delivery by chitosan-galactosylated modified polymer microbubbles to hepatocarcinoma cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, p. 434–442, 2013.

YU, R. J.; VAN SCOTT, E. J. Alpha-hydroxyacids and carboxylic acids. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 3, n. 2, p. 76–87, 2004.

ZACHARIOU, M.; SCOPES, R. K. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. **Journal of Bacteriology**, v. 167, n. 3, p. 863–869, set. 1986.

ZHAO, R. et al. Simultaneous inhibition of growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by co-delivery of ursolic acid and sorafenib using lactobionic acid modified and pH-sensitive chitosan-conjugated mesoporous silica nanocomplex. **Biomaterials**, v. 143, p. 1–16, out. 2017.

9. ANEXO I

Parecer do comitê de ética

UNIVERSIDADE DE CAXIAS
DO SUL - RS



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação do efeito hemolítico de derivados poli-hidroxiácidos- β -ciclodextrina

Pesquisador: ELOANE MALVESSI

Versão: 3

CAAE: 52517821.0.0000.5341

Instituição Proponente: Fundação Universidade de Caxias do Sul - FUCS/RS

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 118716/2021

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Determinação do efeito hemolítico de derivados poli-hidroxiácidos- β -ciclodextrina que tem como pesquisador responsável ELOANE MALVESSI, foi recebido para análise ética no CEP Universidade de Caxias do Sul - RS em 13/10/2021 às 14:09.

Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, bairro Petrópolis, Campus-sede, Bloco M, sala 306
Bairro: PETROPOLIS **CEP:** 95.070-560
UF: RS **Município:** CAXIAS DO SUL
Telefone: (54)3218-2829 **E-mail:** cep-ucs@ucs.br

UNIVERSIDADE DE CAXIAS
DO SUL - RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação do efeito hemolítico de derivados poli-hidroxiácidos- β -ciclodextrina

Pesquisador: ELOANE MALVESSI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52517821.0.0000.5341

Instituição Proponente: Fundação Universidade de Caxias do Sul - FUCS/RS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.158.146

Apresentação do Projeto:

As ciclodextrinas (CDs) apresentam a propriedade de formar complexos de inclusão reversíveis com diversas moléculas. As CDs podem ser modificadas por meio da adição de grupamentos funcionais em sua estrutura visando à semi- síntese de derivados com características favoráveis a aplicações farmacêuticas. A -CD não é administrada pela via parenteral devido a sua toxicidade. Isso ocorre devido à capacidade de formar complexos de inclusão com alguns lipídeos de membrana, como o colesterol, podendo acarretar em alterações na integridade da membrana celular. Essas interações podem levar a hemólise das hemácias, assim como, formar complexos pouco solúveis nos rins, acarretando toxicidade renal. O número de derivados de ciclodextrinas com alta hidrossolubilidade e compatível com a via parenteral, comercialmente disponíveis, ainda é restrito e de domínio de grandes empresas estrangeiras. Neste sentido, foi proposta a síntese de novos derivados de ciclodextrina ligados a ácidos orgânicos (poli-hidroxiácidos) visando obter melhores características, tais como, maior hidrossolubilidade aparente, reduzida toxicidade e compatibilidade com a via parenteral.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do ensaio de determinação da hemólise de glóbulos vermelhos humanos é verificar a hemocompatibilidade dos derivados de -CD sintetizados mono-6-ácido lactobiónico--ciclodextrina (6-LA--CD), mono-6-ácido maltobiónico--ciclodextrina (6-MA--CD), mono-6-

Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, bairro Petrópolis, Campus-sede, Bloco M, sala 306
Bairro: PETROPOLIS **CEP:** 95.070-560
UF: RS **Município:** CAXIAS DO SUL
Telefone: (54)3218-2829 **E-mail:** cep-ucs@ucs.br

As paginas 171 e 172 foram suprimidos, pois contêm informações contidas no pedido de depósito de patente ao INPI.

UNIVERSIDADE DE CAXIAS
DO SUL - RS



Continuação do Parecer: 5.158.146

Declaração de Pesquisadores	Termosigilo.pdf	06/10/2021 10:20:55	ELOANE MALVESSI	Aceito
Cronograma	CronogramaHemolise.pdf	06/10/2021 10:10:13	ELOANE MALVESSI	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	06/10/2021 10:09:33	ELOANE MALVESSI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMODEANUENCIAINSTITUCIONAL.pdf	06/10/2021 10:04:53	ELOANE MALVESSI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimentoTCLE.pdf	06/10/2021 09:55:18	ELOANE MALVESSI	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAXIAS DO SUL, 10 de Dezembro de 2021

**Assinado por:
Magda Bellini
(Coordenador(a))**