



HAL
open science

Synthèse et études de l'auto-assemblage en solution de diblocs amphiphiles à base de xyloglucanes et application pour la stabilisation de protéines

Cony Gauche

► **To cite this version:**

Cony Gauche. Synthèse et études de l'auto-assemblage en solution de diblocs amphiphiles à base de xyloglucanes et application pour la stabilisation de protéines. Sciences agricoles. Université de Grenoble; UNIVERSIDADE FEDERAL SANTA CATARINA UFSC, 2013. Français. NNT : 2013GRENV020 . tel-00949397

HAL Id: tel-00949397

<https://theses.hal.science/tel-00949397>

Submitted on 19 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E
UNIVERSITÉ DE GRENOBLE
CENTRE DE RECHERCHES SUR LES MACROMOLÉCULES
VÉGÉTALES**

Cony Gauche

**SÍNTESE E ESTUDOS DE AUTO-ASSOCIAÇÃO EM ÁGUA DE
DIBLOCOS ANFIFÍLICOS OBTIDOS A PARTIR DE
XILOGLUCANA E APLICAÇÃO NA DECORAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE BASE PROTÉICA**

Tese em regime de co-tutela submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina e à Universidade de Grenoble para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Orientadores: Prof. Dr. Valdir Soldi e Dr. Redouane Borsali

Co-orientador: Dr. Sami Halila

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gauche, Cony

Síntese e estudos de auto-associação em água de diblocos anfifílicos obtidos a partir de xiloglucana e aplicação na decoração de nanopartículas de base protéica / Cony Gauche ; orientador, Valdir Soldi - Florianópolis, SC, 2013.

206 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. dibloco anfifílico. 3. xiloglucana. 4. surfactante. 5. nanopartículas protéicas. I. Soldi, Valdir. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Cony Gauche

**SÍNTESE E ESTUDOS DE AUTO-ASSOCIAÇÃO EM ÁGUA DE
DIBLOCOS ANFIFÍLICOS OBTIDOS A PARTIR DE
XILOGLUCANA E APLICAÇÃO NA DECORAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE BASE PROTÉICA**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de abril de 2013.

Prof. Dr. Almir Spinelli
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Adley F. Rubira
Relator (UEM)

Prof. Dr. Valdir Soldi
Orientador (UFSC)

Prof. Laurent David
Relator (UCBL)

Dr. Redouane Borsali
Orientador (UJF – CERMAV)

Dr. Sami Halila
Co-orientador (UJF – CERMAV)

Prof. Dr. Pedro L. M. Barreto
(UFSC)



UNIVERSITÉ DE
GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

préparée dans le cadre d'une cotutelle entre
*l'Université de Grenoble et Universidade Federal de
Santa Catarina*

Spécialité : **Sciences des Polymères**

Arrêté ministériel : le 6 janvier 2005 - 7 août 2006

Présentée par

« **Cony / GAUCHE** »

Thèse dirigée par « **Redouane/BORSALI** » et « **Valdir/SOLDI** »
codirigée par « **Sami/HALILA** »

préparée au sein des Laboratoires **CERMAV** et **POLIMAT**

dans les Écoles Doctorales Chimie et Sciences du Vivant et
Departamento de Pós-Graduação em Química

Synthèse et études de l'auto- assemblage en solution de diblocs amphiphiles à base de xyloglucane et application pour la stabilisation de protéines

Thèse soutenue publiquement le « 24/04/2013 »,
devant le jury composé de :

M., Laurent, DAVID

Professeur / Université Claude Bernard Lyon 1 – UCBL (Rapporteur)

M., Adley F., RUBIRA

Professeur / Universidade Estadual de Maringá – UEM (Rapporteur)

M., Redouane, BORSALI

Directeur de Recherche / CERMAV (Directeur de thèse)

M., Valdir, SOLDI

Professeur / Universidade Federal de Santa Catarina (Directeur de thèse)

M., Sami, HALILA

Chargé de Recherche / CERMAV (Co-directeur de thèse)

M., Pedro L. M., BARRETO

Professeur / Universidade Federal de Santa Catarina (Membre)

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP



AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem a experiência e a confiança do prof. Valdir Soldi, que me recebeu como ninguém no Departamento de Química da UFSC. Serei eternamente grata pela sua orientação e pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa. Aos meus orientadores franceses, Redouane Borsali e Sami Halila, agradeço pela experiência enriquecedora de participar da equipe de pesquisa no CERMAV (Grenoble, França), pela orientação e incentivo prestados.

Ao grupo POLIMAT, à equipe CBO e à equipe PDG, agradeço pela companhia. Um agradecimento especial a duas pessoas, Ismael e Alex, pelo apoio imprescindível no decorrer do projeto. Agradeço aos meus amigos, pelas palavras de conforto, pela compreensão, por entenderem minha “presença quase ausente”, muitas vezes. Aos professores do Departamento de Química da UFSC, pela contribuição em minha formação e, aos membros da banca, pela participação e contribuição prestada ao trabalho. Aos pesquisadores, técnicos e funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina e do *Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales* por possibilitarem o andamento e o sucesso deste trabalho.

Agradeço aos órgãos de financiamento de pesquisa, CNPq e CAPES, pelas bolsas concedidas no país, e no exterior.

À minha família, meu muito obrigado, por mais uma vez apoiarem meu trabalho.

“Não pretendemos que as coisas mudem, se sempre fazemos o mesmo. A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, porque a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia, como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise, supera a si mesmo sem ficar superado”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Este trabalho descreve uma nova rota sintética para a obtenção de diblocos anfifílicos, exclusivamente a partir de oligossacarídeos de xiloglucana. Os oligossacarídeos foram obtidos a partir da digestão enzimática de xiloglucana de sementes de tamarindo, seguida por funcionalização dos oligossacarídeos pela adição de grupos azida (bloco hidrofílico) e propargila, via reação de aminação redutiva assistida por um sistema de micro-ondas. O bloco hidrofóbico foi obtido após a peracetilação do oligossacarídeo funcionalizado com o grupo propargila, sendo possível, então, a ligação dos blocos via reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, '*click chemistry*', obtendo-se o dibloco anfifílico. Os co-oligômeros foram sintetizados tanto a partir da mistura dos oligossacarídeos de xiloglucana (XGO-*b*-XGO,Ac), como a partir da fração DP7 isolada (DP7-*b*-DP7,Ac). Os diblocos foram caracterizados quanto às suas características de auto-associação em água. A eliminação das unidades de galactose (DP7-*b*-DP7,Ac) conferiu um aumento no valor da concentração micelar crítica comparada ao XGO-*b*-XGO,Ac, determinada por espectroscopia de fluorescência. A determinação do diâmetro das micelas foi realizada pelas técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e confirmada por microscopia em transmissão eletrônica (MET). Micelas esféricas com tamanho médio de 25 nm (XGO-*b*-XGO,Ac) e 6 nm (DP7-*b*-DP7,Ac) foram observadas por MET. A digestão enzimática parcial das micelas formadas a partir do dibloco XGO-*b*-XGO,Ac em água, levando a formação de micelas de DP7-*b*-XGO,Ac conferiu menor polidispersão ao sistema e uma diminuição no tamanho médio do diâmetro micelar em 50%, determinado por DLS. Nanopartículas de gliadina e zeína foram preparadas pelo método de dessolvatação e o co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac foi utilizado como surfactante em comparação ao surfactante não iônico comercial Pluronic F68. Os resultados sugerem a adequabilidade do dibloco sintetizado neste trabalho em estabilizar nanopartículas de zeína, levando à formação de nanopartículas esféricas e monodispersas. O sistema formado por partículas elaboradas a partir de proteínas de origem vegetal, aliada à estabilização por um surfactante sintetizado exclusivamente por oligossacarídeos surge como uma ferramenta útil na busca por um sistema de liberação controlada de fármacos biocompatível e biodegradável obtido totalmente a partir de matéria-prima de origem natural.

Palavras-chave: dibloco anfifílico, xiloglucana, nanopartículas.

ABSTRACT

This work describes a new synthetic route to obtain fully oligosaccharides-based amphiphilic diblock copolymers, made from tamarind seeds xyloglucan. A mixture of well size-defined xyloglucooligosaccharides (XGO of 7, 8 and 9 carbohydrate units) were obtained from the cellulose-mediated enzymatic digestion of xyloglucanes. To perform the Huisgen click reaction the oligosaccharides were reducing end functionalized by azide and propargyl functions via microwave-catalyzed reductive amination. The hydrophobic block was obtained after peracetylation of alkyne-containing XGO. The amphiphilic co-oligomers were synthesized either from the mixture of xyloglucan oligosaccharides to give XGO-*b*-XGO,Ac, either from the monodisperse XGO of 7 carbohydrate units (DP7), obtained by a degalactosylation process involving another specific enzymatic hydrolysis (β -galactosidase from *Aspergillus Niger*), to give DP7-*b*-DP7,Ac. The XGO-based diblocks were characterized according to the state-of-the-art in structural characterization (NMR, MS, FT-IR) and Soft Matter physico-chemistry (SLS, DLS, CMC, TEM) techniques. The removal of galactose units (DP7-*b*-DP7,Ac) conferred an increase in the critical micellar concentration value compared to XGO-*b*-XGO,Ac, which were determined by fluorescence spectroscopy. The size diameter of the micelles were carried out by dynamic light scattering (DLS) and confirmed by transmission electron microscopy (TEM). Spherical micelles with an average size of 25 nm for XGO-*b*-XGO,Ac and 6 nm DP7-*b*-DP7,Ac nanoparticles were observed by TEM. The partial enzymatic digestion of the shell constituting XGO-*b*-XGO,Ac micelles in water led to formation of DP7-*b*-XGO,Ac micelles with a lowest polydispersity and a decrease in the average size diameter by 50 %, as determined by DLS. XGO-*b*-XGO,Ac was tested as a nonionic block copolymer surfactant to stabilize zein and gliadin nanoparticles, which come from gluten of wheat and maize and were prepared by the method of desolvation. Its stabilizing properties were compared to Pluronic F68 surfactant belonging to poloxamers' family. The results suggest the suitability of the XGO-based diblock to stabilize zein aggregates, resulting in stable, monodisperse and spherical nanoparticles. Finally, this work proposed a system consisting in potential nanocarriers prepared from vegetable proteins stabilized by biosourced oligosaccharide surfactants.

Keywords: diblock copolymers, xyloglucan, protein, stabilizer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem ilustrativa da formação micelar com o aumento da concentração de copolímero (C = concentração do copolímero; CMC = concentração micela crítica).34
- Figura 2.** Exemplos de morfologias micelares em solução aquosa.....35
- Figura 3.** Imagens obtidas por microscopia de força atômica para copolímeros formados a partir de dextrana e diferentes frações volumétricas de poliestireno (A - dextrana40-b-poliestireno5; B - dextrana40-b-poliestireno270; C - dextrana40-b-poliestireno775).40
- Figura 4.** Auto-associação em água de copolímeros formados a partir de diferentes oligossacarídeos como bloco hidrofílico unidos via ‘click chemistry’ ao polímero PNIPAM como bloco hidrofóbico (A – β -ciclodextrina-b-PNIPAM; B – xiloglucana-b-PNIPAM; C – maltoheptaose-b-PNIPAM).41
- Figura 5.** Representação dos monossacarídeos constituintes dos oligossacarídeos obtidos a partir de xiloglucanas de sementes de tamarindo. ...47
- Figura 6.** Esquema representativo da rota sintética do co-oligômero anfifílico em bloco obtido a partir de oligossacarídeos de xiloglucana de sementes de tamarindo.57
- Figura 7.** Aminoação redutiva de oligossacarídeos.....58
- Figura 8.** Acetilação de álcoois a partir de anidrido acético e DMAP como catalisador nucleofílico.59
- Figura 9.** Representação simplificada das etapas de formação das ligações C-N na reação de cicloadição catalisada por Cu(I).....61
- Figura 10.** Espectro de Infravermelho do bloco hidrofílico (3), bloco hidrofóbico (5) e do co-oligômero XGO-b-XGO,Ac (6).64
- Figura 11.** Espectro de ^1H RMN do co-oligômero XGO-b-XGO,Ac (6).65
- Figura 12.** Rota da síntese do XGO-b-XGO,Ac e DP7-b-DP7,Ac (em azul são assinalados os resíduos de galactose, representando a fração dos oligossacarídeos DP8 e DP9).82
- Figura 13.** Determinação da cmc dos co-oligômeros sintetizados a partir de oligossacarídeos de xiloglucana. Espectros de emissão do pireno e variação

correspondente da razão I1/I3 em função do aumento da concentração de XGO-*b*-XGO,Ac (A,B) e DP7-*b*-DP7,Ac (C,D).85

Figura 14. Função de correlação e distribuição do tamanho das micelas obtidas a partir da técnica de espalhamento de luz dinâmico para o co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac (A,B: 1 mg mL⁻¹; C,D: 3 mg mL⁻¹; E,F: 5 mg mL⁻¹).87

Figura 15. Micrografia de MET e distribuição médio do tamanho das micelas de XGO-*b*-XGO,Ac (3 mg mL⁻¹ em água).88

Figura 16. Função de correlação e distribuição do tamanho das micelas obtidas a partir da técnica de espalhamento de luz dinâmico para o co-oligômero DP7-*b*-DP7,Ac (A,B: 1 mg mL⁻¹; C,D: 3 mg mL⁻¹; E,F: 5 mg mL⁻¹).89

Figura 17. Micrografia de MET e distribuição médio do tamanho das micelas de DP7-*b*-DP7,Ac (3 mg mL⁻¹ em água).90

Figura 18. Digestão parcial do bloco hidrofílico do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac por β-galactosidase (1U mL⁻¹, 5 horas, 37 °C).....91

Figura 19. Variação da intensidade de espalhamento de luz e do diâmetro das micelas de XGO-*b*-XGO,Ac (3 mg mL⁻¹) durante digestão enzimática por β-galactosidase (1U mL⁻¹, 5 horas, 37 °C).92

Figura 20. Micrografia de MET e distribuição médio do tamanho das micelas de DP7-*b*-XGO,Ac (3 mg mL⁻¹ em água).....93

Figura 21. Micrografia de MET e distribuição médio do tamanho das micelas de DP7-*b*-XGO,Ac (3 mg mL⁻¹ em água).....94

Figura 22. Micrografia de MET de nanopartículas de gliadina na ausência de surfactante.....96

Figura 23. Micrografia de MET de nanopartículas de gliadina na presença de Pluronic F68 (0,05%).97

Figura 24. Micrografia de MET de nanopartículas de gliadina na presença de XGO-*b*-XGO,Ac (0,05%).....97

Figura 25. Estrutura química do surfactante Pluronic F68 (A) e do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac (B).....98

Figura 26. Micrografia de MET de nanopartículas de zeína na ausência de surfactante.....99

Figura 27. Micrografia de MET e distribuição de tamanho em diâmetro de nanopartículas de zeína na presença de Pluronic F68 (0,05%).100

Figura 28. Micrografia de MET e distribuição de tamanho em diâmetro de nanopartículas de zeína na presença de XGO-b-XGO,Ac (0,05%).100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da presença do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac e do surfactante Pluronic F-68 em diferentes concentrações no diâmetro médio e na polidispersão (PDI) de nanopartículas de gliadina.....95

Tabela 2. Efeito da presença do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac e do surfactante Pluronic F-68 em diferentes concentrações no diâmetro médio e na polidispersão (PDI) de nanopartículas de zeína.99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMC – concentração micelar crítica

D – coeficiente de difusão

DLS – espalhamento de luz dinâmico

DMAP – dimetil amino piridina

MALDI-TOF – *Matrix-Assisted Laser Ionization – Time of Flight*

MET – Microscopia Eletrônica em Transmissão

nm – nanômetro

n – índice de refração do meio

PCL – poli(caprolactona)

PDI – índice de polidispersão

PEG – poli(etilenoglicol)

PEO – poli(óxido de etileno)

PLA – poli(ácido láctico)

PNIPAM – poli(N-isopropilacrilamida)

R_c – raio de giração da secção transversal

R_g – raio de giração

R_h – raio hidrodinâmico

q – vetor de onda

Γ – frequência de relaxação

λ – comprimento de onda

η – viscosidade

θ – ângulo de espalhamento

κ_B – constante de Boltzmann

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos	25
1 Introdução.....	27
1.2 Objetivos	29
1.2.1 Objetivo Geral	29
1.2.2 Objetivos Específicos	29
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	31
2.1 Copolímeros anfifílicos em bloco	33
2.2 Copolímeros em bloco contendo polissacarídeos como bloco hidrofílico.....	37
2.3 Surfactantes não-iônicos e estabilidade de dispersões coloidais	42
2.4 Xiloglucana	45
2.5 Gliadina	49
2.6 Zeína	51
Capítulo 3 – Metodologia	55
3.1 Síntese e Caracterização de Co-oligômeros Anfifílicos em Bloco Sintetizados a partir de Xiloglucana.....	57
3.1.1 Aminoação reductiva	58
3.1.2 Acetilação	59
3.1.3 ‘ <i>Click chemistry</i> ’	60
3.1.4 Reagentes.....	62
3.1.5 Instrumentação.....	62
3.1.6 Procedimento Experimental para as Reações	63

3.2 Preparação e Caracterização de micelas (XGO- <i>b</i> -XGO,Ac / DP7- <i>b</i> -DP7,Ac) e nanopartículas (gliadina / zeína).....	72
3.2.1 Materiais.....	72
3.2.2 Metodologia.....	72
Preparo das micelas de XGO- <i>b</i> -XGO, Ac e DP7- <i>b</i> -DP7,Ac	72
Preparo das micelas de DP7- <i>b</i> -XGO,Ac	72
Preparo das nanopartículas de proteína.....	73
3.2.3 Caracterização das micelas e nanopartículas	73
Espectroscopia de Fluorescência	73
Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	75
Microscopia Eletrônica em Transmissão	76
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	79
4.1 Síntese e caracterização estrutural dos co-oligômeros XGO- <i>b</i> -XGO,Ac e DP7- <i>b</i> -DP7,Ac.....	81
4.2 Auto-associação dos co-oligômeros XGO- <i>b</i> -XGO,Ac e DP7- <i>b</i> -DP7,Ac em água.....	84
4.3 Degradação parcial do bloco hidrofílico do XGO- <i>b</i> -XGO,Ac	91
4.4 Nanopartículas de proteína.....	94
Capítulo 5 – Conclusão	103
Capítulo 6 – Referências Bibliográficas	107
Apêndice.....	123
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	155

Capítulo 1 – Introdução e Objetivos

1 Introdução

Os copolímeros anfifílicos em bloco são definidos como macromoléculas compostas por dois ou mais blocos quimicamente distintos e imiscíveis, ligados covalentemente em arranjo linear ou ramificado. A complexa estrutura destes materiais leva a uma variedade de propriedades abordadas por décadas em aplicações industriais tais como elastômeros termoplásticos, espumas, adesivos, entre outras. Recentemente, a principal atenção tem sido direcionada ao uso destes materiais em aplicações que envolvem alta-tecnologia. Copolímeros anfifílicos em bloco em solução apresentam grande interesse, em particular, no que diz respeito a micelas empregadas na liberação controlada de substâncias ativas e outras aplicações médicas. Além de apresentarem a capacidade de auto-associação em diferentes formas (micelas esféricas, micelas cilíndricas, vesículas), os copolímeros em bloco lineares em solução comportam-se como agentes tensoativos, úteis na estabilização de sistemas coloidais.

Diferentes técnicas de síntese de copolímeros surgiram nos últimos anos, especialmente os métodos de polimerização iônica e polimerização controlada via radicais livres, empregados no preparo de copolímeros em bloco de composições bem definidas e estruturas de arquiteturas variadas. Recentemente, o interesse na reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen “*click chemistry*” no desenvolvimento de copolímeros em bloco vem aumentando. Esta estratégia apresenta vantagens em comparação às outras técnicas de polimerização, contornando problemas de incompatibilidade em relação à baixa reação de acoplamento entre os blocos.

Entre os diversos sistemas transportadores de fármacos em escala nanométrica, os sistemas elaborados a partir de proteínas são promissores devido às características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade. Proteínas fazem parte de uma classe de moléculas naturais, possuindo funcionalidades únicas, com aplicações potenciais tanto no campo de materiais quanto no campo biológico. Devido à sua estrutura primária bem definida e à presença de aminoácidos carregados positiva e negativamente, nanopartículas à base de proteínas sugerem a possibilidade de alteração superficial pela adsorção eletrostática de moléculas carregadas sem a necessidade de

outros compostos. Além disso, proteínas apresentam a capacidade de ligar moléculas hidrofóbicas e de interagir com outros biopolímeros, onde inúmeras pesquisas demonstram a utilização de proteínas como materiais para elaboração de nanopartículas carreadoras de compostos nutracêuticos, agentes antioxidantes, quimioterápicos, óleos, *flavors*, entre outros.

Nanopartículas protéicas podem ser facilmente preparadas em condições amenas, como por coacervação. No entanto, a maioria das proteínas e peptídeos são instáveis e propensos à agregação desordenada. O método mais simples e comum de superar essas limitações é a modificação do meio no qual a proteína se encontra pelo ajuste de condições como pH ou pela adição de estabilizantes. Surfactantes não-iônicos podem ser empregados para proteger e estabilizar as proteínas contra a agregação, minimizando a adsorção entre as cadeias protéicas, diminuindo conseqüentemente as alterações conformacionais e o processo de agregação. Entre os surfactantes não-iônicos, os copolímeros anfifílicos em bloco fazem parte de uma classe de surfactantes amplamente utilizada em aplicações farmacêuticas, apresentando, entretanto, degradabilidade lenta no ambiente, sendo um obstáculo no desenvolvimento industrial.

Motivados pelas necessidades industriais por produtos não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis, a utilização de carboidratos como cabeça polar de copolímeros anfifílicos em bloco vem sendo estudada. Os carboidratos representam uma classe de biopolímeros com uma ampla diversidade estrutural, desempenhando importantes propriedades biológicas tais como aumento na permeabilidade, biocompatibilidade e bioadesão. Neste trabalho, nós apresentamos um surfactante recém-desenvolvido, totalmente sintetizado a partir de oligossacarídeos de xiloglucana. O dibloco anfifílico sintetizado, constituído exclusivamente por blocos sacarídicos biocompatíveis e biodegradáveis, pode ser útil como surfactante de baixa massa molar, na estabilização de proteínas e inibição da agregação de nanopartículas protéicas formadas a partir de gliadina e zeína.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de uma rota de síntese de co-oligômeros obtidos exclusivamente a partir de oligossacarídeos de xiloglucana (XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac), bem como estudar a auto-associação destes co-oligômeros em água. Além disso, avaliar a capacidade do XGO-*b*-XGO,Ac em estabilizar nanopartículas de gliadina e zeína em soluções aquosas.

1.2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Digestão enzimática da xiloglucana de sementes de tamarindo (XGOs = DP9, DP8, DP7);
- ✓ Funcionalização dos oligossacarídeos de xiloglucana (DP9, DP8, DP7) através da adição de um grupo propargila ou azida via reação de aminação redutiva assistida por micro-ondas;
- ✓ Peracetilação dos oligossacarídeos de xiloglucana (DP9, DP8, DP7) funcionalizados com o grupo propargila;
- ✓ Síntese do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac via reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen '*click chemistry*';
- ✓ Obtenção exclusiva da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana;
- ✓ Funcionalização da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana através da adição de um grupo propargila ou azida via reação de aminação redutiva assistida por micro-ondas;
- ✓ Peracetilação da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com o grupo propargila;
- ✓ Síntese do co-oligômero DP7-*b*-DP7,Ac via reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen '*click chemistry*';
- ✓ Caracterização dos co-oligômeros sintetizados, assim como dos produtos intermediários, por espectrometria de massas MALDI-TOF, espectroscopia de infravermelho e ¹H RMN;
- ✓ Determinação da concentração micelar crítica de XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac por espectroscopia de fluorescência;

- ✓ Avaliação da auto-associação de XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac em água por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e por microscopia em transmissão eletrônica (MET);
- ✓ Digestão enzimática parcial do bloco hidrofílico do XGO-*b*-XGO,Ac, monitorada por DLS e MET;
- ✓ Estabilização de nanopartículas de gliadina e zeína por XGO-*b*-XGO,Ac em comparação ao surfactante não-iônico comercial Pluronic F68.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Copolímeros anfifílicos em bloco

A pesquisa direcionada aos copolímeros em bloco tem recebido grande atenção nos últimos 40 anos, mas somente na última década o interesse foi voltado à aplicação na área da nanotecnologia (PARK, YOON, & THOMAS, 2003). A aplicação de nanopartículas em eletrônica, medicina, têxteis, alimentos, agricultura, cosméticos e outras áreas já são uma realidade e suas aplicações começam a ter impacto no setor industrial (BOUWMEESTER, et al., 2009). Os dispositivos em nanoescala são frequentemente produzidos na intenção de reproduzir os nanodispositivos já encontrados na natureza, como proteínas, DNA, membranas e outras biomoléculas naturais (SOZER & KOKINI, 2009), onde os benefícios de seu desenvolvimento e utilização são amplamente enfatizados tanto para os produtores quanto para os consumidores destes novos materiais (BOUWMEESTER, et al., 2009).

Copolímeros anfifílicos em bloco são caracterizados por apresentarem segmentos com grande diferença de solubilidade, normalmente um bloco hidrofílico e outro hidrofóbico, ligados covalentemente (DARLING, 2007), e por apresentarem a capacidade de auto-associação, formando micelas em um meio seletivo para um dos blocos acima da concentração micelar crítica (KATAOKA, HARADA, & NAGASAKI, 2001).

A formação micelar é resultado de dois tipos de forças, uma atrativa que leva à associação das moléculas e uma força repulsiva que previne o crescimento ilimitado das micelas que leva à formação de uma fase macroscópica distinta (PRICE, 1983; ASTAFIEVA, ZHONG, & EISENBERG, 1993). Em concentrações muito baixas, os polímeros se encontram como cadeias simples. À medida que esta concentração aumenta, a concentração micelar crítica (CMC) é alcançada e as cadeias poliméricas começam a associar-se levando à formação das micelas, de tal forma que o bloco hidrofóbico do copolímero evitará o contato com o meio aquoso em que o copolímero está disperso. Em concentrações próximas à CMC, uma quantidade importante de solvente ainda pode ser encontrada no interior micelar (GAO & EISENBERG, 1993); a partir

dessa concentração, o equilíbrio irá favorecer a formação das micelas, que adotam, então, sua configuração de estado de menor energia e o solvente remanescente é gradualmente liberado a partir do núcleo, resultando na diminuição do tamanho micelar (JONES & LEROUX, 1999) (Figura 1).

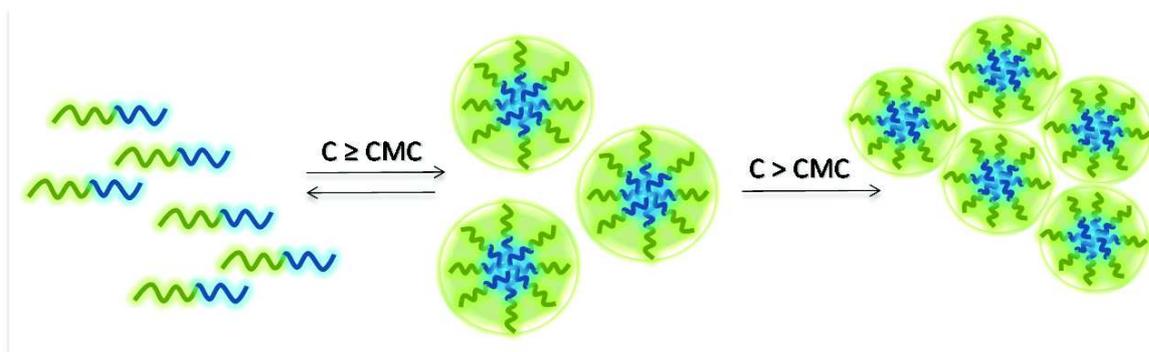


Figura 1. Imagem ilustrativa da formação micelar com o aumento da concentração de copolímero (C = concentração do copolímero; CMC = concentração micela crítica).

Micelas poliméricas obtidas a partir de copolímeros anfifílicos em bloco surgem como potenciais carreadores para fármacos pouco solúveis em água devido a sua capacidade de solubilizar compostos hidrofóbicos em seu núcleo interno e por oferecerem características atrativas tais como tamanho geralmente pequeno (< 100 nm) e uma propensão em evitar o sistema de limpeza mononuclear fagocitário (JONES & LEROUX, 1999). Em solução, as estruturas básicas formadas pela auto-associação de copolímeros em bloco são micelas esféricas, micelas cilíndricas e vesículas (Figura 2) (CARLSEN & LECOMMANDOUX, 2009). Os sistemas micelares são caracterizados por sua arquitetura única núcleo-casca, onde em um ambiente aquoso os blocos hidrofóbicos dos copolímeros são separados do meio externo aquoso para formar um núcleo interior, cercado por uma casca ou coroa formada pelos blocos hidrofílicos (KATAOKA, HARADA, & NAGASAKI, 2001).

Vale ressaltar que, no caso da aplicação destes sistemas como sistemas de liberação de fármacos, a taxa de dissociação das micelas poliméricas em cadeias simples e sua interação com os componentes do plasma são tão importantes quanto a CMC e o tamanho micelar (JONES & LEROUX, 1999). Copolímeros anfifílicos com alto valor de CMC podem não ser adequados, uma vez que são instáveis em ambientes aquosos e se dissociam facilmente quando diluídos e, uma vez administradas, as micelas poliméricas deveriam manter sua integridade

por um período de tempo suficiente para liberar o princípio ativo no sítio de ação desejado (ALLEN, MAYSINGER, & EISENBERG, 1999).

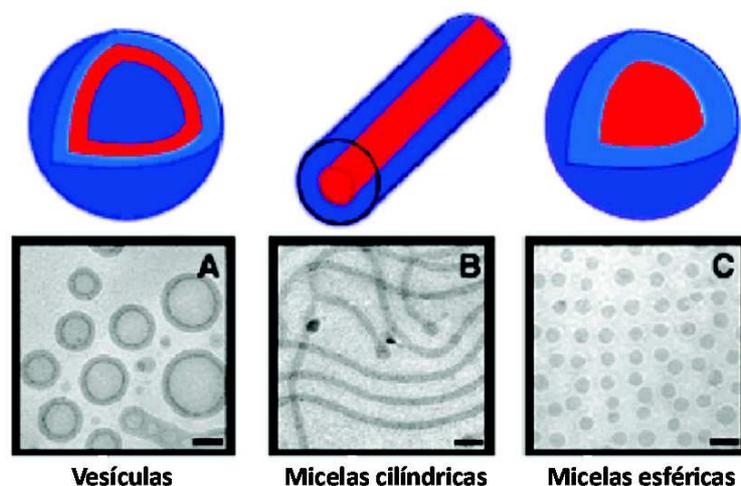


Figura 2. Exemplos de morfologias micelares em solução aquosa (GIACOMELLI, SCHMIDT, AISSOU, & BORSALI, 2010).

A obtenção de micelas a partir de copolímeros em bloco é possível através de duas metodologias principais: dissolução direta e diálise, dependendo, sobretudo da solubilidade do copolímero. Se o copolímero for relativamente hidrossolúvel, a dissolução direta é empregada, enquanto que a diálise é empregada quando o copolímero não apresenta boa solubilidade em solução aquosa. Neste caso, o copolímero é primeiramente solubilizado em solvente orgânico miscível em água, tal como dimetilformamida ou tetrahidrofurano e então dialisado contra água bidestilada, levando à remoção do solvente simultaneamente à formação da micela (ALLEN, MAYSINGER, & EISENBERG, 1999). A auto-associação ocorre quando uma quantidade crítica de água é adicionada à mistura, dependente das propriedades físicas do copolímero em bloco, como o comprimento do bloco hidrofóbico e a concentração do copolímero. Além disso, diferenças na morfologia e no tamanho micelar podem ser observadas, dependendo do solvente utilizado, assim como da velocidade da adição de água ao sistema (ALLEN, MAYSINGER, & EISENBERG, 1999).

No caso de copolímeros não iônicos, por exemplo, as interações intermicelares podem ser governadas pela arquitetura das cadeias. Quando o interior da micela é formado pelo bloco de menor tamanho (micela do tipo estrela), uma fase cúbica de face centrada pode ser observada em altas concentrações. Por sua vez, quando o interior da micela é formado pelo bloco maior, matrizes de esferas rígidas se tornam dominantes. Copolímeros em bloco iônicos, no entanto, são mais

interessantes, pois podem exibir uma variedade de morfologias micelares tais como micelas elipsoides, cilíndricas, vesículas ou multicamadas (BORSALI, et al., 2003).

Muitos materiais poliméricos sintéticos têm sido estudados como substratos no desenvolvimento de sistemas micelares com aplicação na liberação controlada de fármacos e substâncias hidrofóbicas. Na sua maioria, a literatura descreve em algumas revisões a intensa utilização de poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) constituindo o interior hidrofóbico da micela, enquanto o poli(óxido de etileno) (PEO) e polietilenoglicol (PEG) constituem a coroa hidrofílica (ALLEN, MAYSINGER, & EISENBERG, 1999; JONES & LEROUX, 1999; KATAOKA, HARADA, & NAGASAKI, 2001). As diversas combinações entre PEO-bloco hidrofóbico deram origem a diferentes sistemas micelares com propriedades físico-químicas distintas importantes à sua adequabilidade como transportadores de fármacos (ALLEN, MAYSINGER, & EISENBERG, 1999). Em associação com o PLA, copolímeros em bloco sintetizados a partir de diferentes razões PLA/PEO foram avaliados na liberação de fármacos quimioterápicos (JIE, VENKATRAMAN, MIN, FREDDY, & HUAT, 2005). Os resultados indicam que o fármaco paclitaxel apresenta perfil de liberação controlada por até duas semanas quando encapsulado em micelas formadas pelo copolímero em bloco PEO-PLA, independente da alteração estrutural do copolímero em di-bloco, tri-bloco ou ramificado em forma de estrela.

Nanopartículas com cargas superficiais elevadas exibem normalmente forte interação não-específica com várias células e tecidos, tornando-se indesejáveis em muitas aplicações *in vitro* e *in vivo*. PEG ou PEO são conhecidos por estabilizarem nanopartículas em meio aquoso através do impedimento estérico, sendo normalmente utilizados para reduzir interações celulares não-específicas. O recobrimento de nanocristais pelo copolímero PEO-*b*-P γ MPS reduziu a captação destas partículas por macrófagos e pelo sistema reticuloendotelial devido à carga superficial próxima à neutralidade (CHENG & CAO, 2009). Nanopartículas obtidas a partir de PEG-PLA apresentam distribuição de tamanho variando de várias dezenas a algumas centenas de nanômetros, com uma camada superficial hidrofílica e inativa de PEG, o que leva ao aumento do tempo de circulação sistêmica (SASATSU, ONISHI, & MACHIDA, 2005). O efeito da encapsulação de betametasona, um fármaco com ação anti-inflamatória, foi avaliado em nanopartículas de PEG-PLA. A camada externa de PEG levou ao aumento da

permeabilidade e da retenção do fármaco na área lesionada. A liberação gradual da betametasona ocorrida durante a hidrólise do polímero foi devido à sua internalização nos macrófagos inflamatórios como consequência da perda da camada superficial de PEG em um período de poucos dias (ISHIHARA, TAKAHASHI, HIGAKI, MIZUSHIMA, & MIZUSHIMA, 2010).

PEO e PEG apresentam propriedades químicas e biológicas marcantes, sendo conhecidos por sua alta solubilidade em água, pela excelente biocompatibilidade e por serem atóxicos. Além disso, não apresentam antigenicidade e imunogenicidade, no entanto, apresentam a desvantagem de não serem biodegradáveis (JIE, VENKATRAMAN, MIN, FREDDY, & HUAT, 2005; STEFANI, COUDANE, & VERT, 2006). Métodos biológicos, normalmente adotados no tratamento de efluentes, não são satisfatoriamente empregados na eliminação do PEG de alta massa molar em água. A efetividade do processo de degradação biológica é intensamente reduzida para cadeias poliméricas que excedem 10 unidades monoméricas (ANDREOZZI, CAPRIO, & INSOLA, 1996). Particularmente interessantes são os copolímeros em bloco que combinam características vantajosas de polímeros sintéticos (solubilidade, processabilidade, elasticidade, etc..) com aquelas de polímeros naturais tais como polissacarídeos e proteínas (estrutura secundária, funcionalidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, etc..) (CARLSEN & LECOMMANDOUX, 2009). Neste contexto, é particularmente importante o estabelecimento de uma nova e efetiva rota sintética para copolímeros em bloco anfífilos funcionalizados e que apresentem biodegradabilidade e biocompatibilidade (KATAOKA, HARADA, & NAGASAKI, 2001).

2.2 Copolímeros em bloco contendo polissacarídeos como bloco hidrofílico

Nos últimos anos, o interesse na auto-associação em nanoescala de copolímeros em bloco ‘híbridos’, formados a partir de um bloco natural biodegradável e um bloco polimérico sintético vem aumentando em relação às suas aplicações na área biomédica, como a liberação controlada de fármacos. Copolímeros que apresentam um bloco constituído por polissacarídeo apresentam propriedades físico-químicas, não só próximas aos copolímeros totalmente sintéticos, como também trazem um valor adicional referente à biodegradabilidade,

biocompatibilidade e, em alguns casos, atividade biológica (SCHATZ & LECOMMANDOUX, 2010).

Carboidratos estão entre as matérias-primas mais abundantes na utilização como bloco natural apresentando biodegradabilidade, biocompatibilidade e capacidade de bioreconhecimento. Embora esse tópico seja de grande importância, existem poucos relatos na literatura sobre a síntese de copolímeros em bloco híbridos a partir de sacarídeos envolvendo diferentes estratégias (OTSUKA, et al., 2010). A disponibilidade limitada de polissacarídeos com uma porção final redutora, a dificuldade de encontrar um solvente comum para ambos os blocos e a necessidade de, ocasionalmente, proteger os grupos hidroxila laterais da cadeia polissacarídica podem explicar o número relativamente baixo de estudos baseados neste tipo de copolímero, apesar do seu potencial interesse (SCHATZ & LECOMMANDOUX, 2010).

Os carboidratos são úteis não somente como um ligante da síntese do copolímero em bloco, mas também como um componente na redução de interações não-específicas dos sistemas veiculadores com proteínas e células, assim como outras cadeias poliméricas hidrofílicas (GREF, MINAMITAKE, PERACCHIA, TRUBETSKOY, TORCHILIN, & LANGER, 1994). As cadeias de carboidratos na camada superficial das nanopartículas podem prevenir a agregação devido ao ‘efeito de exclusão’ ou ‘efeito de escova polimérica’ (MARUYAMA, ISHIHARA, KIM, KIM, & AKAIKE, 1997).

Assim como no caso dos copolímeros em bloco sintéticos, as propriedades e aplicações de copolímeros à base de polissacarídeos são relacionadas principalmente com a sua capacidade em induzir a separação de fases em solventes seletivos. Os copolímeros em bloco com um segmento formado por carboidratos poderiam substituir os copolímeros em bloco de origem totalmente sintética como surfactantes ambientalmente corretos ou como materiais funcionais ‘verdes’.

Quitosana foi utilizada como bloco hidrofílico na síntese de diferentes copolímeros à base de derivados de metil metacrilato (QIAN, CUI, DING, TANG, & YIN, 2006), devido às suas características hidrofílicas e às propriedades físico-químicas e biológicas reconhecidas, o que a torna promissora no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. A encapsulação de insulina em nanopartículas formadas a partir de quitosana como bloco hidrofílico foi favorecida, como resultado do complexo iônico formado entre as partículas e a insulina, devido à característica catiônica das nanopartículas. O aumento

da carga superficial do sistema aumentou a eficiência de encapsulação de insulina, como também diminuiu a taxa de liberação do fármaco em estudos *in vivo*, o que torna este sistema promissor como veículo para administração oral de fármacos (QIAN, CUI, DING, TANG, & YIN, 2006).

Com o objetivo de substituir o bloco hidrofílico formado por PEO ou PEG, pesquisadores desenvolveram a síntese de um copolímero formado por dextrana-*b*-PCL, que apresenta a capacidade de auto-associação em soluções aquosas, levando à formação de micelas esféricas nanométricas na faixa de 20 a 50 nm (LIU & ZHANG, 2007). A concentração micelar crítica, assim como o tamanho das micelas puderam ser alteradas através da modificação da fração volumétrica do poliéster no copolímero em bloco formado por maltoheptaose-*b*-PCL (LI & ZHANG, 2008), uma vez que o bloco hidrofóbico do copolímero apresenta um importante papel na micelização. O aumento no comprimento do bloco hidrofóbico aumenta a hidrofobicidade do polímero no solvente levando à consequente diminuição no valor da cmc (LIU, ZHOU, WU, NACE, & CHU, 1997).

Copolímeros em bloco anfifílicos flexíveis com a fração em peso do bloco hidrofílico em torno de 35% são propensas a formar vesículas em solução, de acordo com a lei postulada por Discher e Eisenberg (2002). Baseando-se nessa teoria, Houga e colaboradores (2009) investigaram as propriedades da auto-associação de uma variedade de copolímeros em bloco formados por dextrana-*b*-poliestireno, mantendo constante o grau de polimerização do polissacarídeo (aproximadamente 40) variando, no entanto, o grau de polimerização do poliestireno de 5 a 775. Micelas esféricas foram observadas com raio hidrodinâmico médio de 28 nm a partir da auto-associação de dextrana₄₀-*b*-poliestireno₅, enquanto vesículas com tamanhos na faixa de 65 a 140 nm foram formadas a partir de copolímeros com elevado grau de polimerização do poliestireno (dextrana₄₀-*b*-poliestireno₂₇₀ e dextrana₄₀-*b*-poliestireno₇₇₅) (Figura 3) (HOUGA, et al., 2009).

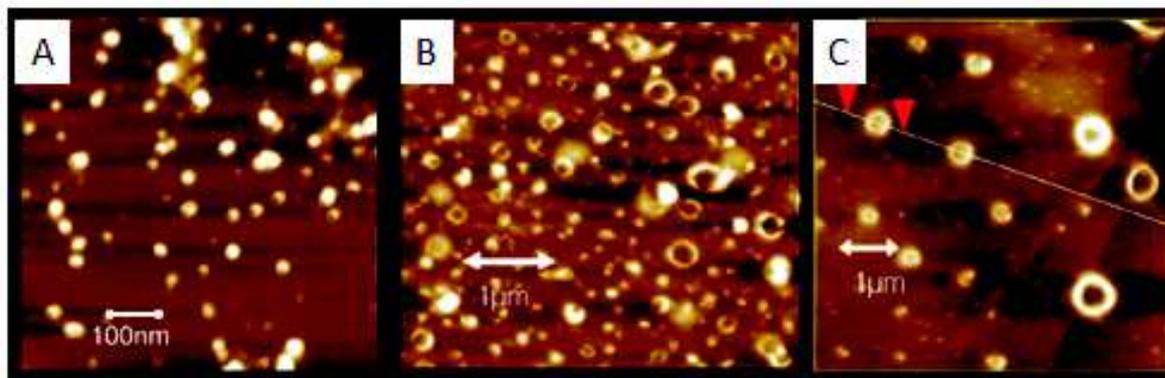


Figura 3. Imagens obtidas por microscopia de força atômica para copolímeros formados a partir de dextrana e diferentes frações volumétricas de poliestireno (A - dextrana40-b-poliestireno5; B - dextrana40-b-poliestireno270; C - dextrana40-b-poliestireno775), adaptado do trabalho de Houga e colaboradores (2009).

Nos últimos anos, algumas vias sintéticas têm sido propostas no desenvolvimento de copolímeros ‘híbridos’ formados a partir de polissacarídeos (LOOS & STADLER, 1997; HERNANDEZ, SOLIMAN, & WINNIK, 2007). Uma das primeiras técnicas foi baseada no acoplamento de um polímero sintético com um grupo amino terminal ao grupo aldeído terminal de um oligossacarídeo, seguido eventualmente de um crescimento por via enzimática do bloco formado pelo açúcar (LOOS & STADLER, 1997; LOOS & MÜLLER, 2002). Uma segunda rota sintética sugere a modificação química das extremidades redutoras e subsequente polimerização radicalar controlada do bloco hidrofílico (HADDLETON & OHNO, 2000; KAKUCHI, et al., 2003).

O desenvolvimento de copolímeros ‘híbridos’ via ciclo-adição 1,3-dipolar catalisada por cobre (*click chemistry*) vem sendo abordada por alguns autores. Esta estratégia apresenta vantagens em relação às outras, contornando os problemas de incompatibilidade entre os sacarídeos e outros blocos em relação à baixa reação de acoplamento (OTSUKA, et al., 2010). Estudos relatam a síntese de copolímeros formados a partir de oligossacarídeos como bloco hidrofílico e um polímero sensível à temperatura (PNIPAM) como bloco hidrofóbico. Em dois diferentes trabalhos a morfologia micelar é discutida, onde é possível verificar a forte influência da estrutura do oligossacarídeo empregado no momento da auto-associação em água. A formação de micelas esféricas é observada quando a solução contendo o copolímero é submetida a uma temperatura acima da temperatura crítica de miscibilidade do bloco hidrofóbico para os copolímeros formados por um oligossacarídeo cíclico (β -ciclodextrina-*b*-PNIPAM) e outro ramificado (xiloglucana-*b*-

PNIPAM) (OTSUKA, et al., 2012). Enquanto o copolímero formado por um oligossacarídeo linear, maltoheptaose-*b*-PNIPAM, levou à formação de micelas vesiculares (OTSUKA, et al., 2010) (Figura 4).

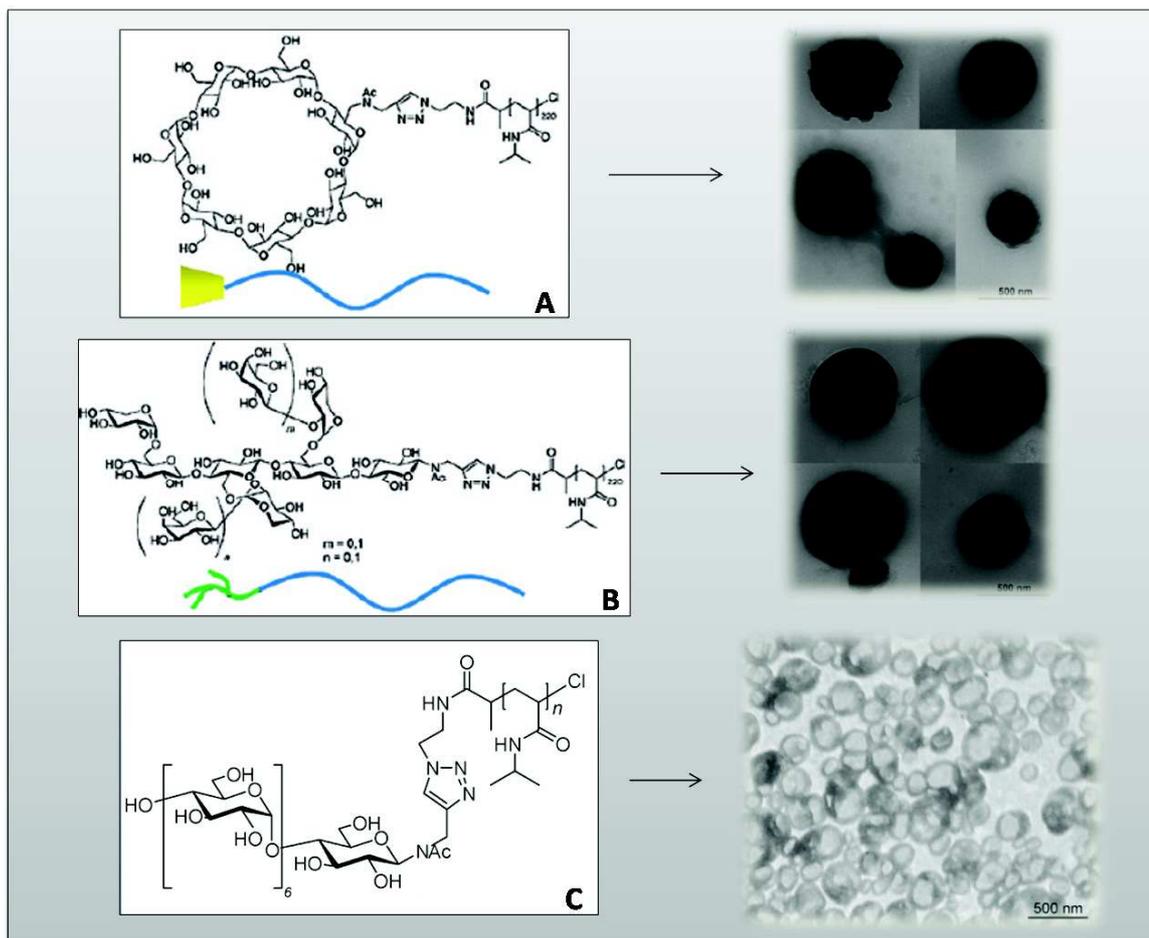


Figura 4. Auto-associação em água de copolímeros formados a partir de diferentes oligossacarídeos como bloco hidrofílico unidos via ‘click chemistry’ ao polímero PNIPAM como bloco hidrofóbico (A – β -ciclodextrina-*b*-PNIPAM; B – xiloglucana-*b*-PNIPAM; C – maltoheptaose-*b*-PNIPAM). Adaptado de (OTSUKA, et al., 2010) e (OTSUKA, et al., 2012).

Motivados pelas exigências industriais por estabilizantes não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis, a utilização de carboidratos como grupos da cabeça polar em agentes tensoativos de copolímeros anfífilos em bloco tem sido estudados (KIDA, et al., 2004; GREFFE, BESSUEILLE, BULONE, & BRUMER, 2005; HALILA, et al., 2008; NOWICKI, SOKOLOWSKI, & REKSA, 2011). Os carboidratos representam uma grande quantidade de biopolímeros produzidos anualmente por uma ampla variedade de plantas e microorganismos. Devido à capacidade de possuírem uma grande variedade estrutural, os

carboidratos exibem várias propriedades biológicas como em interações e comunicações celulares. Motivados por estas características, um grupo de pesquisa desenvolveu uma nova classe de cooligômeros anfifílicos em bloco linear, constituídos exclusivamente por blocos sacarídicos biocompatíveis e biodegradáveis. O cooligômero desenvolvido foi obtido a partir de maltoheptaose livre, como bloco hidrofílico, unida via reação ‘click’ ao bloco hidrofóbico formado por maltoheptaose peracetilada. O valor de CMC encontrado de 0,1 mg/mL está dentro da faixa dos valores de CMC observados para surfactantes não iônicos, além disso a auto-associação deste cooligômero em água levou à formação de micelas esféricas com diâmetro hidrodinâmico médio de 56 nm (MODOLON, OTSUKA, FORT, MINATTI, BORSALI, & HALILA, 2012). No campo do desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, o baixo valor de CMC encontrado é promissor e permite antecipar o desempenho *in vivo* eficiente pela manutenção da integridade micelar mesmo após a diluição no sistema circulatório sanguíneo. Além disso, esta primeira abordagem abre a possibilidade do desenvolvimento de uma nova série de copolímeros em bloco anfifílicos a partir de fontes naturais na busca pelo conceito de surfactantes e/ou sistemas de liberação controlada totalmente biodegradáveis e biocompatíveis.

2.3 Surfactantes não-iônicos e estabilidade de dispersões coloidais

Surfactantes são moléculas anfifílicas constituídas por uma porção hidrofóbica não-polar, normalmente uma cadeia linear ou ramificada de hidrocarbonetos contendo 8 – 18 átomos de carbono, ligada à uma porção hidrofílica polar ou iônica. A porção hidrofílica pode, entretanto, ser não-iônica, iônica ou zwitteriônica, acompanhada de contra íons nos dois últimos casos. Em meio aquoso, as cadeias hidrocarbônicas interagem fracamente com as moléculas de água, enquanto os grupos polares ou a cabeça iônica interagem fortemente via interações dipolo ou íon-dipolo. Esta forte interação com as moléculas de água é o que torna os surfactantes solúveis em água (TADROS, 2005).

Devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos em uma mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuírem entre as fases fluidas de sistemas heterogêneos com diferentes graus de polaridade, na superfície de líquidos, sólidos e em macromoléculas. A formação de um filme molecular ordenado nestas interfaces reduz a tensão interfacial e

superficial, conferindo, então, as características únicas atribuídas aos surfactantes. Estas propriedades tornam os surfactantes adequados em uma ampla variedade de aplicações industriais tais como emulsificação, detergência, lubrificação, molhabilidade, estabilização de dispersões coloidais e solubilização de moléculas hidrofóbicas (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A redução da tensão superficial ou interfacial está entre as propriedades dos surfactantes mais importantes avaliadas em solução, sendo dependente diretamente da substituição de moléculas de solvente na interface por moléculas de surfactante. A energia interfacial livre por unidade de área da interface, a tensão interfacial, é dada pela seguinte equação:

$$\gamma_I = \gamma_A + \gamma_B - 2\gamma_{AB}$$

Sendo: γ_A e γ_B as energias de superfície por unidade de área dos líquidos puros e γ_{AB} a energia de interação entre eles na interface.

Moléculas de natureza similar apresentam valor de energia de interação por unidade de área na interface grande e conseqüente menor tensão superficial, enquanto moléculas de natureza distintas, ao contrário, apresentam grande tensão interfacial devido à baixa interação de superfície, levando à separação de fases. Adicionando-se um agente tensoativo a um sistema de fases imiscíveis (água/solvente orgânico), este é adsorvido na interface. A cabeça hidrofílica é orientada para a fase composta por água, enquanto a cauda hidrofóbica, orientada para o solvente orgânico. Quando moléculas de surfactante substituem moléculas de solvente ou água na interface original, a interação na interface predomina entre o grupo hidrofílico do surfactante com as moléculas de água de um lado da interface, e o grupo hidrofóbico com o solvente orgânico do outro lado da interface. Uma vez que estas interações são muito mais fortes que a interação inicial entre as moléculas diferenciadas, a tensão interfacial é significativamente reduzida na presença do surfactante em solução (ROSEN, 2004).

Em uma dispersão coloidal a área interfacial (σ) é grande em relação ao volume do sistema, em conseqüência, a energia de Gibbs do sistema é aumentada, resultando em uma dispersão termodinamicamente instável, onde o equilíbrio termodinâmico é encontrado com a segregação de fases (ATKINS & de PAULA, 2007). A redução da tensão interfacial de uma dispersão pela adição de surfactantes, por exemplo, é necessária para o aumento da estabilidade termodinâmica do sistema coloidal, diminuindo a energia interfacial do sistema.

$$\gamma_I = \left(\frac{\delta G}{\delta \sigma} \right)_{p,T,n}$$

Surfactantes não-iônicos adsorvem na interface de maneira a se orientarem dependendo da natureza da superfície. Se grupos polares capazes de promover ligações de hidrogênio estão presentes, o surfactante adsorve provavelmente com estes grupos hidrofílicos orientado em direção à superfície, tornando assim, a superfície do sistema mais hidrofóbica. Se tais grupos forem ausentes, então o surfactante se orienta com os grupos hidrofóbicos, tornando a superfície mais hidrofílica (ROSEN, 2004). Os surfactantes não-iônicos são responsáveis por conferir a estabilidade estérica de sistemas coloidais em meio aquoso, proveniente dos grupos hidrofílicos localizados na superfície das partículas, como resultado da atração da água ao redor da partícula, criando assim uma barreira protetora que previne a coagulação (de OLIVEIRA & MEI, 2009).

A conformação das macromoléculas na interface torna-se importante na teoria de estabilização estérica, uma vez que as cadeias devem estar bem fixas se a estabilização é requerida. Quando duas partículas se aproximam, a compressão ou a interpenetração das cadeias estabilizantes podem ocorrer. Nos dois casos uma conformação termodinamicamente desfavorável é alcançada pela diminuição da entropia conformacional das cadeias levando, conseqüentemente, ao aumento da energia de Gibbs do sistema. A entropia configuracional é restabelecida pelo afastamento das partículas, diminuindo a energia do sistema e favorecendo a estabilidade da dispersão (NAPPER, 1977).

O interesse por surfactantes poliméricos vem aumentando consideravelmente nos últimos anos devido à ampla aplicação como estabilizadores em emulsões e suspensões (MYERS, 1999). Inúmeros surfactantes poliméricos foram introduzidos e são comercializados, onde se pode ressaltar a extensa utilização dos copolímeros em bloco formados por poli-óxido de etileno – poli-óxido de propileno – poli-óxido de etileno (PEO-PPO-PEO), comercialmente disponíveis como co-polímeros anfifílicos não-iônicos (Pluronic®), e são empregados como estabilizantes de dispersões, ingredientes farmacêuticos, materiais biomédicos e na formação de nanopartículas (SAKAI, KUROSAWA, OKADA, & MISHIMA, 2011).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis hoje comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. No entanto, o aumento da

preocupação ambiental entre os consumidores, aliado às novas legislações de controle do meio ambiente levou as indústrias à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (BARROS, de QUADROS, JUNIOR, & PASTORE, 2007). A utilização de carboidratos como grupos da cabeça polar de surfactantes anfifílicos vem sendo amplamente estudada, motivada em grande parte pela necessidade industrial por produtos não tóxicos e biodegradáveis. Uma vez que os carboidratos, como já mencionado anteriormente, são fontes renováveis e biodegradáveis, atenção tem sido direcionada na sua utilização na síntese de novos surfactantes, como sugere o trabalho onde é apresentada a síntese de surfactantes a partir de silicone e dois diferentes oligossacarídeos. A metodologia desenvolvida permite a obtenção de um copolímero em bloco anfifílico, através da reação de ‘*click chemistry*’, com boas propriedades surfactantes, incluindo capacidade emulsificante e espumante de interesse na área cosmética e de detergentes (HALILA, et al., 2008). Uma nova classe de surfactantes não iônicos foi sintetizada utilizando o oligossacarídeo xiloglucana como cabeça polar do tensoativo, acoplado a diferentes ácidos graxos variando a cadeia carbônica de C8 a C18. Os compostos resultantes foram facilmente obtidos, apresentaram propriedades surfactante notáveis, expandindo a variedade de surfactantes derivados de fontes naturais com diversas aplicações (GREFFE, BESSUEILLE, BULONE, & BRUMER, 2005).

2.4 Xiloglucana

As células vegetais se diferenciam das células animais pela presença na sua periferia do envoltório intracelular, de um envelope: a parede celular vegetal. Esta apresenta em parte um papel estrutural, pois confere à célula sua morfologia e permite o controle do crescimento, e por outro lado desempenha um papel nas trocas intercelulares através dos plasmodesmos, conexões entre áreas diferentes das células, garantindo a continuidade do simplasto – que compreende todos os citoplasmas e núcleos celulares em uma planta, interrompidos pela membrana celular (CARPITA & McCANN, 2000).

A parede celular dos vegetais superiores é uma estrutura dinâmica que se altera no decorrer da vida celular. Dois tipos de parede celular são observados, a parede primária e a secundária, diferenciadas por suas composições químicas e pelo período em que surgem no decorrer do

desenvolvimento celular. A parede primária aparece durante a divisão celular e aumenta sua área de superfície durante a expansão da célula. Enquanto a parede secundária se forma internamente à primária na diferenciação, formando uma estrutura complexa adaptada à função celular. Entre as paredes primárias de células vizinhas encontra-se uma estrutura denominada lamela média (O'NEILL & YORK, 2003).

A parede celular primária se apresenta como uma rede livre de microfibrilas de celulose englobadas em uma matriz amorfa fortemente hidratada de pectinas e hemiceluloses. A parede secundária, por sua vez, é uma estrutura inextensível e levemente hidrofóbica, constituída por celulose e ligninas. Ela possui três camadas sucessivas, que se diferenciam pela orientação de suas fibras de celulose conferindo uma grande resistência à parede. As hemiceluloses são polissacarídeos amorfos, constituídos de um esqueleto de unidades neutras de piranosila (exemplo: glucose, manose, xilose), substituídas por outras unidades piranosila ou furanosila e por ácidos urônicos (exemplo: ácido glucurônico, ácido 4-*O*-metilglucurônico). As hemiceluloses são classificadas em quatro grupos de polissacarídeos, as xilanas, mananas, β -glucanas e xyloglucanas.

As xiloglucanas da parede primária são os componentes majoritários das hemiceluloses, ligando as microfibrilas de celulose entre elas por ligações de hidrogênio, conferindo a flexibilidade necessária para seu movimento (CARPITA & GIBEAUT, 1993). Além do papel estrutural, as xiloglucanas atuam como material de reserva de nutrientes em sementes de certas espécies de dicotiledôneas e podem apresentar ainda função regulatória, pois seus oligossacarídeos regulam o crescimento celular (McNEIL, DARVILL, & FRY, 1984; HAYASHI, 1989).

As xiloglucanas são heteropolissacarídeos ramificados, apresentam uma cadeia principal constituída por unidades de D-glucose unidas por ligações glucosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Esta é substituída por ramificações laterais, cuja composição varia em função da origem das xiloglucanas consideradas. A cadeia principal pode ser substituída em *O*-6 por unidades de α -D-xilopirranose, a qual pode também ser substituída em *O*-2 por unidade de β -D-galactopirranose (HAYASHI, 1989; CARPITA & McCANN, 2000). Certa regularidade existe na distribuição das unidades de D-xylopirranose, ramificadas em α -(1,6). A cadeia principal é composta por uma sequência de três resíduos de D-glucose substituídas por xilose consecutivas, seguidas por uma glucose não substituída. Entre estas substituições, 30 a 50% dos resíduos de D-xilose

são substituídos por unidades de β -D-galactopiranosose ou mais raramente por resíduos de α -L-arabinofuranosila. Além disso, os resíduos de D-galactosila podem também apresentar na posição *O*-2, uma unidade α -L-fucopiranosila (CARPITA & GIBEAUT, 1993).

No caso particular deste trabalho, a xyloglucana utilizada foi o polissacarídeo obtido a partir de sementes de tamarindo, constituída pela cadeia principal substituída por unidades de D-glucopiranosila, parcialmente substituídas na posição 6 por unidades de α -D-xylopiranosila. Certas unidades de xylopiranosila são ainda substituídas na posição 2 por β -D-galactopiranosila, sendo que estas substituições são regulares em toda a extensão da cadeia principal. A regularidade das substituições ao longo da cadeia principal permite a obtenção de oligossacarídeos definidos a partir da digestão enzimática da xiloglucana de sementes de tamarindo com uma endoglucanase. Esta enzima cliva especificamente a ligação glicosídica da glucose não ramificada da cadeia e produz quatro oligossacarídeos em uma cadeia baseada em 4 glucoses: XXXG, XXLG/XLXG e XLLG (FRY, et al., 1993), em uma razão de 15:35:50 (Figura 5).

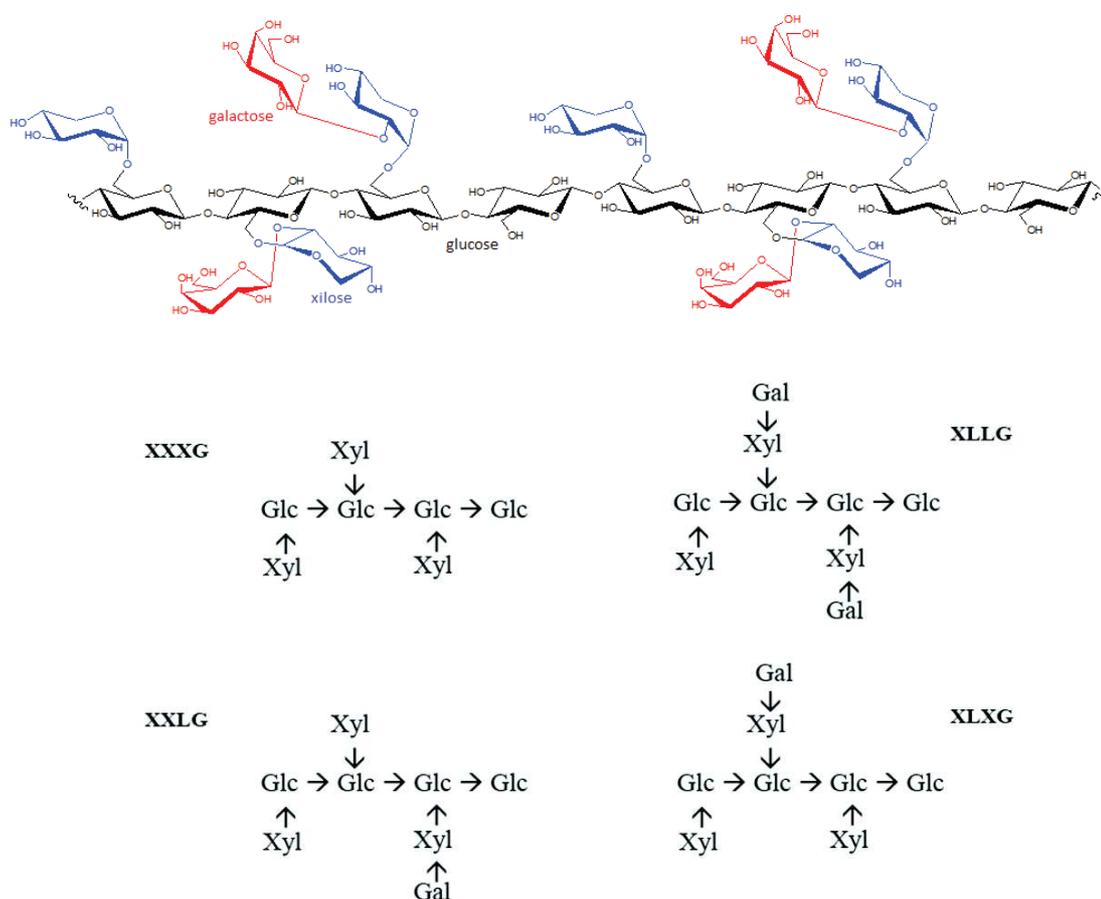


Figura 5. Representação dos monossacarídeos constituintes dos oligossacarídeos obtidos a partir de xiloglucanas de sementes de tamarindo.

A nomenclatura para os oligossacarídeos obtidos a partir de xiloglucanas foi sugerida por Fry e colaboradores (1993), onde as cadeias laterais são nomeadas através das unidades monossacarídicas não substituídas, da esquerda para direita. As unidades de glucose da cadeia principal, substituídas por xilose são representadas pela letra X, enquanto que as unidades não substituídas, pela letra G e para as unidades substituídas por galactose, emprega-se a letra L (FRY, et al., 1993) (Figura 5).

Este biopolímero, assim como outros polissacarídeos, apresenta aplicações potenciais importantes na área médica e comercial. Na indústria alimentícia, pode ser utilizado como modificador de textura devido à sua capacidade gelificante, enquanto na área médica, pode ser empregado na elaboração de sistemas de liberação controlada de fármacos (COVIELLO, MATRICARDI, MARIANECCI, & ALHAIQUE, 2007; LUBAMBO, et al., 2011). A xiloglucana é utilizada em sistemas carreadores de fármacos devido à sua solubilidade em água, por ser um polímero natural biodegradável e não antigênico. Suas hidroxilas podem ser substituídas por derivados carboxílicos modificáveis para o acoplamento de derivados de fármacos, podendo ser também covalentemente ligada ao fármaco puro ou a uma molécula de direcionamento ao alvo específico de ação (SUISSA, et al., 1998; LUBAMBO, et al., 2011).

Xyloglucana foi ligada à doxorubicina, um agente quimioterápico, e à galactosamina, uma porção terminal que pode ser utilizada para direcionar conjugados poliméricos aos hepatócitos do fígado. A auto-associação deste sistema em nanopartículas conferiu maior efeito terapêutico ao fármaco quando comparado às nanopartículas não direcionadas ou à doxorubicina livre (CAO, et al., 2010). Outros importantes trabalhos vêm sendo publicados com a aplicação da xyloglucana na área médica. Géis de xyloglucana foram testados como administração intraperitoneal, conferindo nível sustentável da concentração plasmática do fármaco, por longo período de tempo (SUISSA, et al., 1998). Além disso, o gel de xyloglucana também foi investigado na liberação ocular de pilocarpina e timolol (MIYAZAKI, SUZUKI, KAWASAKI, ENDO, TAKAHASHI, & ATTWOOD, 2001; BURGALASSI, CHETONI, PANICHI, BOLDRINI, & SAETTONE, 2000), como também na liberação percutânea controlada de fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (TAKAHASHI, et al., 2002).

2.5 Gliadina

As prolaminas, proteínas de reserva do grão de trigo, podem ser divididas em duas classes baseadas na sua solubilidade em solução aquosa alcoólica: gliadina e gluteninas (THOMSON, MILES, POPINEAU, HARRIES, SHEWRY, & TATHAM, 1999). As gliadinas são proteínas monoméricas, solúveis em solução alcoólica, associadas por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, que contribuem para a natureza viscosa do gluten. As gluteninas são estruturalmente relacionadas às gliadinas, mas formam polímeros unidos por ligações dissulfeto intermoleculares e são insolúveis em soluções aquosas alcoólicas na ausência de agentes redutores (PAANANEN, et al., 2006).

A gliadina apresenta elevados conteúdos de prolina (14 – 17 g / 100 g) e glutamina (38 – 40 g / 100 g). O alto conteúdo de prolina influencia a estrutura secundária destas proteínas e interrompe as α -hélices ou as zonas em folha β (CHEFTEL, CUQ, & LORIENT, 1989). O seu conteúdo de aminoácidos carregados positiva e negativamente é abaixo de 6 g / 100 g, tornando a gliadina uma espécie fracamente ionizada por toda a faixa de pH (GUILBERT, GONTARD, MOREL, CHALIER, MICARD, & REDL, 2002).

Os padrões de gliadina do trigo compreendem 20 – 30 polipeptídios diferentes na faixa de massa molar de 30 – 74 kDa. De acordo com o aumento da mobilidade eletroforética em pH ácido, os polipeptídios são classificados em α -gliadina, β -gliadina, γ -gliadina e ω -gliadina. A gliadina contém sequências repetitivas ricas em prolina e glutamina que formam estruturas helicoidais soltas constituídas de folhas β reversas repetitivas, associadas normalmente com regiões mais extensas não repetidas, que são compactas e globulares. A falta de resíduos de cisteína distingue os polipeptídios ω -gliadina. Os outros tipos de gliadina incluem 6 (α e β) e 8 (γ) resíduos de cisteína, todos envolvidos em ligações dissulfetos intramoleculares (GUILBERT, GONTARD, MOREL, CHALIER, MICARD, & REDL, 2002).

As frações das gliadinas α , β e γ são monoméricas em solução, enquanto a ω -gliadina apresenta-se em agregados, provavelmente devido às ligações de hidrogênio entre os resíduos de glutamina localizados principalmente nos seus domínios repetitivos. Todas as gliadinas podem ser modeladas como esferoides prolatos, com conformação estendida de aproximadamente 15,5 nm de comprimento e diâmetro em torno de 3,2 nm (THOMSON, MILES, POPINEAU,

HARRIES, SHEWRY, & TATHAM, 1999). Suas características de hidrofobicidade e solubilidade permitem o desenvolvimento de nanopartículas, a partir da gliadina, capazes de proteger o material encapsulado e controlar a liberação de fármacos (JAHANSHAHI & BABAEI, 2008). Por serem proteínas de origem vegetal, as gliadinas são preferidas em relação às proteínas de origem animal, além de apresentarem a capacidade de interagir com a queratina epidérmica devido a sua riqueza em prolina (TEGLIA & SECCHI, 1994; DUCLAIROIR, ORECCHIONI, DEPRAETERE, & NAKACHE, 2002). Além disso, as gliadinas apresentam alta capacidade de interagir com a mucosa intestinal; esta atividade bioadesiva pode ser explicada por sua composição aminoacídica, rica em resíduos neutros e lipofílicos (ARANGO, PONCHEL, ORECCHIONI, RENEDO, DUCHÊNE, & IRACHE, 2000).

Recentemente, as gliadinas foram utilizadas para elaborar nanopartículas com o objetivo da encapsulação de fármacos, diminuindo desvantagens relacionadas à taxa de degradação (EZPELETA, et al., 1996; DUCLAIROIR, ORECCHIONI, DEPRAETERE, OSTERSTOCK, & NAKACHIE, 2003). Através da técnica de dessolvatação, nanopartículas de gliadina foram preparadas com rendimento de 90 % e tamanho médio de 500 nm. A reticulação protéica com glutaraldeído conferiu aumento significativo na estabilidade das partículas em solução salina com tripsina, sem alterar suas características físicas. Neste trabalho, o ácido trans-retinóico foi encapsulado de maneira satisfatória, apresentando eficiência de encapsulação em torno de 85 – 97 %, dependendo da concentração do fármaco utilizada (EZPELETA, et al., 1996).

A encapsulação de diferentes fármacos (vitamina E, linalol/acetato de linalila, cloreto de benzalcônio) foi avaliada em nanopartículas de gliadina, onde Duclairoir e colaboradores (2003) produziram partículas segundo a metodologia proposta pelo trabalho anterior (EZPELETA, et al., 1996). Observou-se a formação de partículas com tamanho médio na faixa de 900 – 950 nm, sendo que o tamanho destas partículas parece aumentar com o aumento da polaridade do fármaco encapsulado e a eficiência de encapsulação é dependente da concentração do fármaco utilizada (DUCLAIROIR, ORECCHIONI, DEPRAETERE, OSTERSTOCK, & NAKACHIE, 2003).

A utilização de nanopartículas com o objetivo de encapsular fármacos hidrofóbicos envolve a formação de partículas ativas carregadas na faixa de 1 a 1000 nm (FANG & BHANDARI, 2010), no

entanto, diversas pesquisas incentivam o desenvolvimento de partículas com tamanhos em torno de 100 nm, considerando suas propriedades físicas únicas e, conseqüentemente, propriedades biológicas potencialmente úteis e diferenciadas (GUPTA B. R., 2006). Partículas maiores são removidas mais rapidamente pelo fígado e baço do que partículas menores. Portanto, a redução do tamanho das partículas dos transportadores coloidais em torno de um limiar de 100 a 200 nm, introduz a possibilidade de desvio do sistema vascular através das cavidades na parede dos vasos sanguíneos (RAHIMNEJAD, MOKHTARIAN, & GHASEMI, 2009).

Os trabalhos sugeridos pela utilização da gliadina como material na produção de nanopartículas mostram partículas com tamanho médio superior a 500 nm, apresentando provavelmente pouca aplicação prática como carreadoras de fármacos de liberação controlada. No entanto, recentemente, nanopartículas de gliadina com tamanho médio na faixa de 200 nm foram obtidas através da técnica de *electrospray*, possibilitando a liberação controlada de ciclofosfamida, um fármaco utilizado no tratamento de câncer de mama (GULFAM, KIM, LEE, KU, & CHUNG, 2012).

Gliadinas são proteínas que apresentam baixo conteúdo de aminoácidos carregados, favorecendo a agregação desordenada em soluções aquosas. Portanto, a busca por novas técnicas ou a incorporação de moléculas com o objetivo de diminuir a agregação protéica no momento da formação das partículas é de grande importância, garantindo a formação de nanopartículas com tamanho médio reduzido.

2.6 Zeína

A zeína é uma proteína que também pertence à classe das prolamínas, é encontrada no endosperma do grão de milho, conferindo sua rigidez. As proteínas do milho são divididas em quatro classes, definidas principalmente pela sua solubilidade em solventes selecionados. Enquanto a grande maioria da zeína é encontrada no endosperma, a glutelina é distribuída entre o endosperma e o germe; as albuminas e globulinas estão presentes principalmente no germe (SHUKLA & CHERYAN, 2001).

As zeínas por sua vez, podem ser classificadas em quatro grupos, dependendo de sua solubilidade e da sequência de aminoácidos em α -

zeína, β -zeína, γ -zeína e δ -zeína, sendo que as frações α - e β - são majoritárias (McKINNEY, 1958). Por serem deficientes em aminoácidos essenciais, tais como lisina e triptofano, as zeínas são consideradas proteínas de baixa qualidade nutricional, e são, portanto, direcionadas para aplicação industrial. Este grupo de proteínas é particularmente rico em ácido glutâmico (22 %), leucina (20 %), prolina (10 %) e alanina (10 %), mas deficiente em aminoácidos básicos e ácidos (POMES, 1971). A alta proporção de resíduos de aminoácidos não polares e a deficiência em aminoácidos básicos e ácidos são responsáveis pelo comportamento de solubilidade da zeína, alcançada em água somente na presença de álcool, altas concentrações de ureia, base (pH > 11) ou detergentes aniônicos. Soluções aquosas alcoólicas são utilizadas para a extração da α -zeína, enquanto a extração das outras frações requer a adição de um agente redutor (THOMPSON & LARKINS, 1989).

Aproximadamente 70 % da zeína do milho é representada pela α -zeína, que apresenta duas bandas em gel de eletroforese correspondentes à massa molecular de 19 e 22 kDa (THOMPSON & LARKINS, 1989). Uma análise sequencial mostrou a presença de três domínios únicos na α -zeína. Um domínio N-terminal de 36 – 37 resíduos seguidos por repetições em tandem possuindo comprimento médio de 20 resíduos de aminoácidos, finalizada por um domínio C-terminal de 10 resíduos. A diferença entre as massas moleculares de 19 e 22 kDa é resultado da inserção de uma unidade repetida adicional na porção C-terminal da proteína. Esta inserção fornece um total de 10 repetições na zeína de 22 kDa comparada às 9 repetições na zeína de 19 kDa (PEDERSEN, DEVEREUX, WILSON, SHELDON, & LARKINS, 1982).

Um modelo estrutural em forma helicoidal foi proposto para a zeína, onde nove unidades repetitivas homólogas estão arranjadas em uma forma anti-paralela, estabilizadas por ligações de hidrogênio, resultando em uma molécula protéica levemente assimétrica (ARGOS, PEDERSEN, MARKS, & LARKINS, 1982), sugerindo que a zeína se apresenta na forma de estrutura globular em soluções não aquosas. Através da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) foi possível determinar a morfologia assimétrica da α -zeína em solução alcoólica a 70 %, pela comparação dos valores de R_g e R_c . Os resultados indicam que a α -zeína adota uma estrutura molecular alongada de comprimento em torno de 13 nm e razão axial aproximada de 6:1 (MATSUSHIMA, DANNO, TAKEZAWA, & IZUMI, 1997).

Devido à composição aminoacídica rica em resíduos hidrofóbicos, a zeína tem sido estudada como biomaterial potencial na elaboração de sistemas coloidais, tornando-a forte candidata para o desenvolvimento de partículas biopoliméricas em nanoescala com aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos, *flavors* e micronutrientes. Classificada como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pela FDA (US Food and Drug Administration), a zeína é uma proteína natural que apresenta boa biodegradabilidade *in vivo* (WANG, et al., 2007), cujo produto de degradação apresenta boa compatibilidade celular (DONG, SUN, & WANG, 2004; LIU, SUN, WANG, ZHANG, & WANG, 2005; WANG, LIN, LIU, SHENG, & WANG, 2005), apresentando propriedades adequadas de liberação controlada de compostos hidrofóbicos (LIU, SUN, WANG, ZHANG, & WANG, 2005; PARRIS, COOKE, & HICKS, 2005; TORRES-GINER, GIMENEZ, & LAGARON, 2008; MASTROMATTEO, BARBUZZI, CONTE, & DEL NOBILE, 2009; ZHONG & JIN, 2009).

Nanopartículas esféricas de zeína foram obtidas com tamanho médio na faixa de 100 – 200 nm através da técnica de dispersão líquido-líquido, controlando fatores como porcentagem de etanol e concentração de zeína nas soluções estoque. Partículas de tamanho reduzido foram obtidas pelo emprego de alta velocidade de agitação do sistema, utilização de alta porcentagem de etanol (85 %) e baixa concentração protéica (ZHONG & JIN, 2009), garantindo o tamanho na faixa de uma centena de nanômetros, ideal na aplicação como sistema veiculador de moléculas hidrofóbicas (GUPTA B. R., 2006).

Seguindo a mesma técnica de preparação, a zeína foi utilizada como material na encapsulação de três óleos essenciais, devido à rapidez e facilidade do preparo, comparado às técnicas convencionais de emulsão solido-óleo-água na encapsulação de moléculas em partículas biodegradáveis. A encapsulação de óleos foi eficiente, levando à formação de nanopartículas com tamanho médio na faixa de 100 nm. Estas partículas apresentaram digestibilidade limitada no estômago após período de 4 horas, baixa liberação no intestino delgado e liberação acelerada dos óleos no intestino grosso, sendo consideradas potencialmente úteis na administração de substâncias por via oral ou injetável (PARRIS, COOKE, & HICKS, 2005).

Partículas coloidais de zeína próximas ao pH neutro perdem a estabilidade física tanto quando aplicadas em produtos como no pH fisiológico do intestino, levando à agregação. Este inconveniente pode ser minimizado pela adição de estabilizadores ou surfactantes. Visto que

a estabilização de partículas coloidais utilizando biopolímeros naturais vem apresentando aumento do interesse nos últimos anos, Patel e colaboradores (2010) sugerem a utilização do caseinato de sódio como estabilizante de partículas de zeína, devido à combinação dos efeitos de estabilização estérica e eletrostática (DICKINSON, 1997), tornando-as mais adequadas no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos totalmente naturais. Enquanto uma rápida agregação foi observada em pH 6,2 no sistema constituído por partículas de zeína não estabilizadas, as partículas resultantes da estabilização por caseinato de sódio apresentaram-se estáveis em valores de pH próximo à neutralidade e à alta força iônica. Amostras submetidas à liofilização puderam ser facilmente redispersas, abrindo novas possibilidades para a utilização de nanopartículas de zeína na forma sólida (PATEL, BOUWENS, & VELIKOV, 2010). Este sistema nos motiva na busca por formas farmacêuticas elaboradas totalmente a partir de fontes naturais renováveis, com alta estabilidade e potencialmente aplicáveis na área médica e na indústria alimentícia.

3.1 Síntese e Caracterização de Co-oligômeros Anfílicos em Bloco Sintetizados a partir de Xiloglucana

Nesta seção serão abordadas as rotas sintéticas utilizadas no desenvolvimento dos co-oligômeros anfílicos em bloco obtidos neste trabalho a partir de xiloglucana, assim como o detalhamento das reações empregadas, com o suporte da literatura.

A síntese dos co-oligômeros foi realizada a partir da obtenção dos oligossacarídeos de xiloglucana através da digestão enzimática da xiloglucana de sementes de tamarindo, seguida pela funcionalização da extremidade redutora dos oligossacarídeos através de uma modificação regioseletiva utilizando a reação de aminação redutiva, com auxílio de um sistema de micro-ondas.

A funcionalização dos blocos foi realizada pela adição de um grupo azida (bloco hidrofílico) ou propargila ao oligossacarídeo, seguida pela peracetilação do oligossacarídeo adicionado do resíduo de propargila, obtendo-se assim o bloco hidrofóbico. Finalmente, os blocos foram ligados via reação de ciclo-adição 1,3-dipolar de Huisgen catalisada por Cu(I) (CuAAC), ‘click chemistry’, resultando assim, no co-oligômero anfílico linear obtido exclusivamente a partir de xiloglucana (Figura 6).

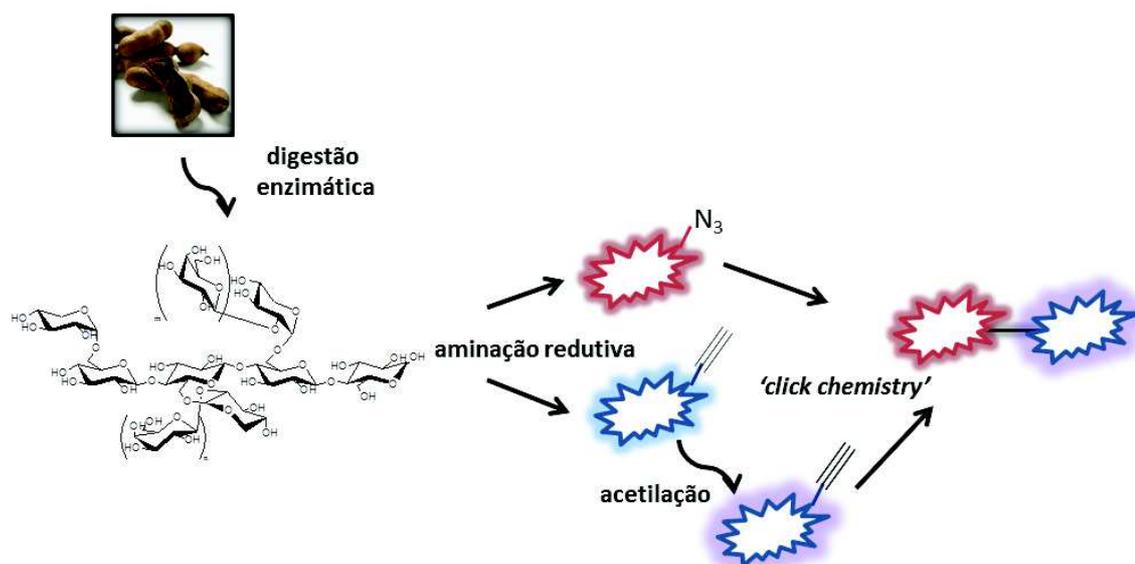


Figura 6. Esquema representativo da rota sintética do co-oligômero anfílico em bloco obtido a partir de oligossacarídeos de xiloglucana de sementes de tamarindo.

3.1.1 Aminoação redutiva

Aminas são compostos orgânicos importantes industrialmente que apresentam aplicações difundidas como intermediários farmacêuticos, aditivos têxteis, desinfetantes, na produção de plásticos e detergentes, entre outros. Um dos métodos de preparo de aminas mais comuns é a aminoação redutiva (GOMEZ, PETERS, & MASCHMEYER, 2002). A síntese de aminas secundárias e terciárias por aminoação redutiva de aldeídos e cetonas é normalmente uma reação relativamente rápida e eficiente que fornece intermediários sintéticos orgânicos úteis relevantes farmacologicamente. Vários métodos estão disponíveis para a reação de aminoação redutiva direta de aldeídos e cetonas, sendo que as mais populares utilizam NaBH_3CN ou $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ como agentes redutores. Essas reações oferecem as vantagens da simplicidade, ampla variedade de substratos, condições amenas de reação e tolerância a outros grupos funcionais (KANGASMETSA & JOHNSON, 2005).

A aminoação redutiva de aldeídos ou cetonas ocorre em vários passos consecutivos (Figura 7). A condensação do grupo carbonila da forma aberta do anel de um carboidrato com uma amina leva à formação de uma carbinolamina, que elimina uma molécula de água resultando em uma imina ou base de Schiff. Esta base é comparativamente instável e é reduzida à correspondente amina secundária quando um agente redutor, como o cianoborohidreto de sódio, é adicionado (DALPATHADO, JIANG, KATER, & DESAIRE, 2005).

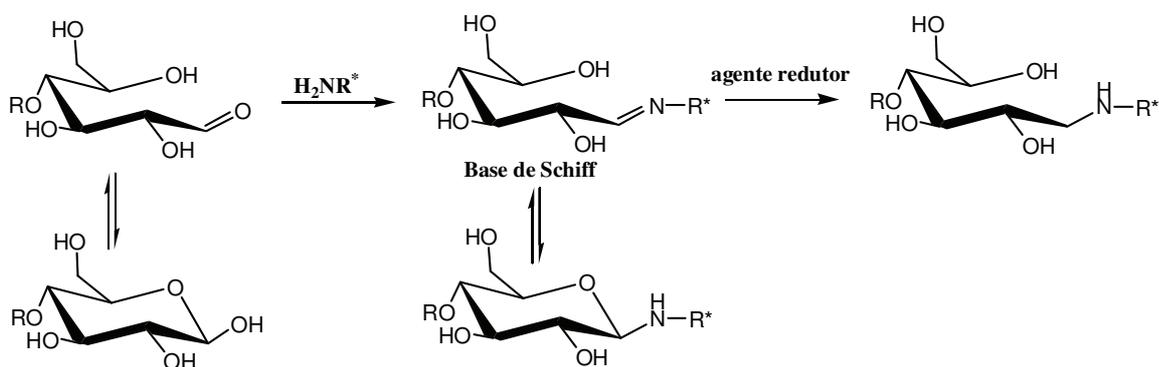


Figura 7. Aminoação redutiva de oligossacarídeos (DALPATHADO, JIANG, KATER, & DESAIRE, 2005).

3.1.2 Acetilação

A reação de acetilação consiste na introdução de um grupo acilo (COCH_3) em uma molécula que contenha hidrogênios, tais como grupos hidroxila, amino e tióis. No caso específico dos álcoois, estes reagem na presença de um grupo acilo formando ésteres. Nestas reações, o grupo hidroxila atua como nucleófilo, atacando o grupo carbonila do derivatizante. O procedimento mais utilizado para a acetilação de álcoois em carboidratos envolve a utilização de um excesso de anidrido acético junto com piridina, que serve de solvente catalisador para a reação. A utilização de derivados de piridina, como por exemplo, a 4-dimetilaminopiridina (DMAP), como co-catalisador para acelerar a reação, também é amplamente aplicada.

No caso da esterificação utilizando o anidrido acético e o DMAP como catalisador nucleofílico, o processo inicia pela formação de um equilíbrio entre as formas lábeis do íon acetato e do íon acetilpiridínio. Em seguida, o álcool ataca o grupo acetil levando à formação do éster. Neste passo, o contra-íon acetato afasta o próton do álcool, enquanto o álcool forma a ligação covalente com o grupo acetila. A ligação do grupo acetila do catalisador é clivada, gerando o éster desejado e o catalisador (XU, HELD, KEMPF, MAYR, STEGLICH, & ZIPSE, 2005) (Figura 8).

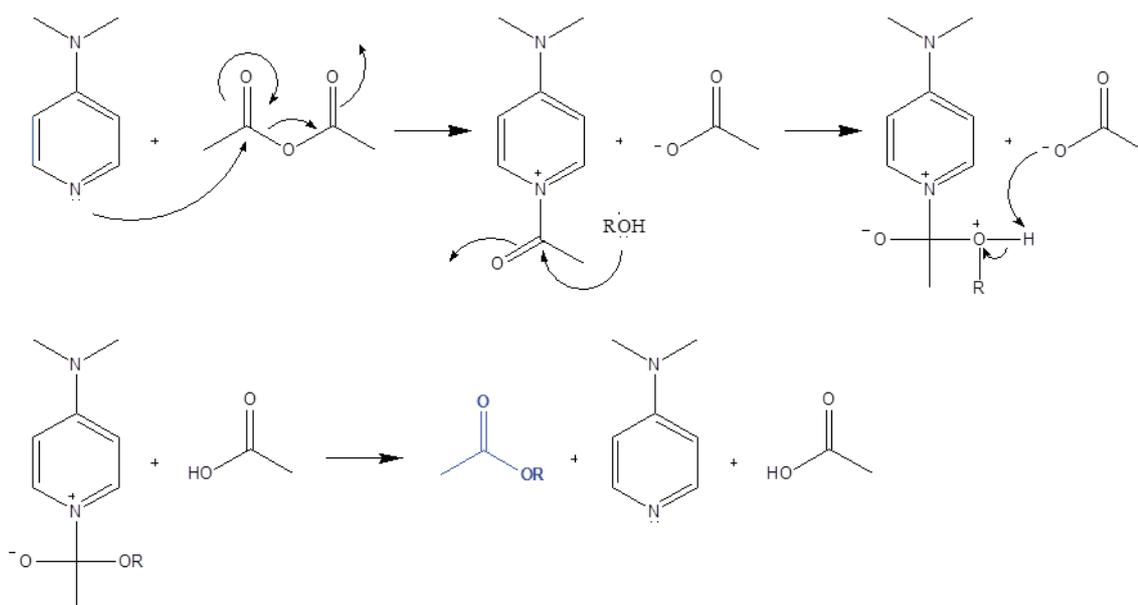


Figura 8. Acetilação de álcoois a partir de anidrido acético e DMAP como catalisador nucleofílico.

3.1.3 'Click chemistry'

A química 'click' é um conceito introduzido por Sharpless e colaboradores (KOLB, FINN, & SHARPLESS, 2001), que descreve reações termodinamicamente favoráveis, capazes de conectar duas moléculas de forma simples e com altos rendimentos, sendo de grande aplicabilidade. Dentre as reações compreendidas neste conceito, o exemplo mais difundido como reação 'click' é a cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino terminal e uma azida orgânica catalisada por Cu(I), com a formação regioespecífica de 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos, conhecida como reação CuAAC.

Inicialmente desenvolvida por Huisgen e colaboradores (HUISGEN, SZEIMIES, & MOEBIUS, 1967), esta reação de cicloadição apresentou vários problemas como a necessidade de longos tempos reacionais, alta temperatura, baixo rendimento e a formação de uma mistura de regioisômeros triazólicos 1,4 e 1,5-dissubstituídos, quando alcinos assimétricos estão envolvidos na reação. Com a descoberta da versão da cicloadição catalisada por Cu(I) pelos estudos realizados concomitantemente pelos grupos de Sharpless e Meldal, a aplicabilidade desta reação começou a mudar, visto que a utilização de Cu(I) levou ao aumento da velocidade de reação em torno de 7 vezes, além da formação exclusiva do regioisômero 1,4-dissubstituído em condições mais brandas e com alto rendimento (ROSTOVTSEV, GREEN, FOKIN, & SHARPLESS, 2002; TORNOE, CHRISTENSEN, & MELDAL, 2002).

A presença do Cu(I) transforma o mecanismo de reação concertado em uma sequência de rápidas etapas envolvendo intermediários polares cujas estruturas definem a regioespecificidade da reação. Um dos mecanismos propostos para elucidar esta reação, de maneira simplificada, define que na presença de Cu(I) ocorre a formação inicial do acetilato do metal (A), que se complexa também ao nitrogênio nucleofílico da azida (B), favorecendo o ataque do carbono do tipo β -vinilidênico do acetilato de Cu(I) ao nitrogênio eletrofílico terminal da azida orgânica, com formação da ligação C-N e obtenção do metalociclo instável (C). A contração do anel leva à formação do triazolila de cobre (D), que sofre protonólise para formação do 1,2,3-triazol 1,4 dissubstituído (E) (ROSTOVTSEV, GREEN, FOKIN, & SHARPLESS, 2002) (Figura 9).

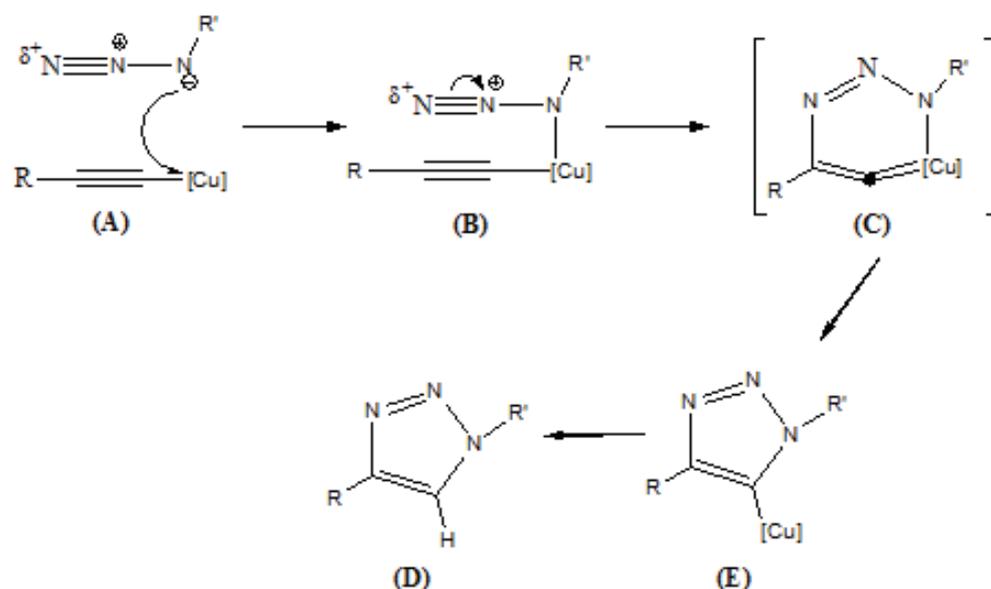


Figura 9. Representação simplificada das etapas de formação das ligações C-N na reação de cicloadição catalisada por Cu(I) (ROSTOVTSEV, GREEN, FOKIN, & SHARPLESS, 2002).

Desde o descobrimento da reação de cicloadição entre alcinos e azidas catalisada por cobre, referida como ‘*click chemistry*’, muita atenção tem sido direcionada na aplicação desta reação nas mais diversas áreas tais como bioconjugação *in vitro* (GUPTA, KUZELKA, SINGH, LEWIS, MANCHESTER, & FINN, 2005) e *in vivo* (LINK & TIRRELL, 2003; BEATTY, XIE, WANG, & TIRRELL, 2005), síntese de dendrímeros (QINGCHUN, PENG, & YONGMING, 2007), ligação entre polímeros (FOURNIER, HOOGENBOOM, & SCHUBERT, 2007) e na ciência de superfícies (NADIVADA, JIANG, & LAHANN, 2007). A síntese de copolímeros em bloco anfífilicos, foco deste trabalho, surge como uma aplicação promissora da ‘*click chemistry*’ no desenvolvimento de estruturas com características aplicáveis na elaboração de sistemas carreadores de fármacos (OTSUKA, et al., 2010; MODOLON, OTSUKA, FORT, MINATTI, BORSALI, & HALILA, 2012; OTSUKA, et al., 2012) e de surfactantes (HALILA, et al., 2008).

3.1.4 Reagentes

A xyloglucana de sementes de tamarindo (pureza $\geq 95\%$) foi gentilmente fornecida pela Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd (Osaka, Japão). Cianoborohidreto de sódio, dimetilformamida anidra e brometo de propargila foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), propargilamina (pureza de 99%) da ACROS Organics e 4-dimetilaminopiridina da Lancaster Synthesis Inc. Metanol, etanol, ácido acético, anidrido acético, acetato de etila, piridina e acetonitrila foram adquiridos da SDS (Carlo Erba) com grau de pureza analítica. Todos os materiais foram utilizados como recebidos, sem purificação prévia. Água foi purificada por um sistema de purificação Milli-Q (Billerica, MA, USA).

3.1.5 Instrumentação

As reações realizadas neste trabalho foram monitoradas por cromatografia em camada delgada, utilizando sílica gel 60F₂₅₄ (E. Merck) a partir da detecção por carbonização em solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄/MeOH/H₂O, 3:45:45). A purificação por coluna cromatográfica foi realizada utilizando sílica gel 60 (40 – 63 μm , E. Merck) ou coluna C18 (Grace Reveleris Silica Flash Cartridges, 12g).

Os compostos foram caracterizados através de medidas de ¹H RMN, infravermelho e espectroscopia de massas (MALDI-TOF). Os espectros de ¹H RMN foram obtidos em aparelho de RMN modelo Bruker Avance DRX400 operando a 400 MHz. Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrômetro de infravermelho Perkin-Elmer Spectrum RXI, com registro na região de 4000 a 400 cm^{-1} , a partir de pastilhas de KBr para os compostos hidrossolúveis, enquanto para as amostras solúveis em solventes orgânicos, um filme foi formado em pastilhas de KCl pela dissolução do composto em diclorometano, seguida pela evaporação do solvente. As medidas de espectrometria de massas (MALDI-TOF) foram realizadas em aparelho Bruker Daltonics Autoflex.

Síntese do co-oligômero XGO-*b*-XGOAc

Os oligossacarídeos de xiloglucana (**1**) utilizados na síntese do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac foram obtidos a partir da digestão enzimática da xiloglucana de sementes de tamarindo. A xiloglucana foi dissolvida em água e mantida em agitação constante, *overnight*. A esta solução, uma endoglucanase comercial foi adicionada, e a mistura foi mantida por 5 horas em estufa à temperatura controlada de 37 °C. A reação foi interrompida pela inativação enzimática à alta temperatura, após a observação da completa digestão dos polissacarídeos de xiloglucana por cromatografia de camada delgada. A completa digestão dos polissacarídeos foi comprovada por espectrometria de massas (MALDI-TOF) pela observação dos oligossacarídeos resultantes (DP7, DP8 e DP9).

A funcionalização dos oligossacarídeos de xiloglucana com um grupamento azida foi obtida através da reação de aminação reductiva, utilizando-se a 2-azidoetilamina (**2**) e NaBH₃CN como agente redutor. Os oligossacarídeos foram dissolvidos em uma mistura de água:metanol, a solução foi acidificada com ácido acético e esta mistura foi submetida a um sistema de micro-ondas por 2 horas à temperatura de 80 °C. A purificação do produto foi realizada por uma simples precipitação em etanol, seguida por *flash chromatography* em C18 e liofilização, resultando no bloco hidrofílico do co-oligômero desejado (**3**).

Utilizando-se o mesmo procedimento de aminação reductiva, a porção redutora dos oligossacarídeos de xiloglucana foi então funcionalizada pela adição de um grupo propargila (**4**). Vale ressaltar que o rendimento obtido para as reações de aminação reductiva não ultrapassou o valor de 65%. Tentativas foram realizadas na busca pelo aumento do rendimento da reação aumentando-se o número de equivalentes do agente redutor e da amina utilizada em questão, assim como diferentes técnicas de purificação foram empregadas, como a utilização de carvão ativo, resina ou coluna de sílica, sem sucesso no aumento do rendimento obtido.

Para a obtenção do bloco hidrofóbico, a xiloglucana funcionalizada com o grupo propargila (**4**) foi submetida a uma reação de acetilação, em que todas as hidroxilas do açúcar foram protegidas por ésteres, pela reação com anidrido acético, piridina e DMAP. Após 5 horas de agitação em temperatura ambiente, observou-se o consumo completo do

material de partida por cromatografia de camada delgada, sendo facilmente purificado por coluna cromatográfica (SiO_2 , acetato de etila), obtendo-se, portanto o bloco hidrofóbico (**5**) do co-oligômero com rendimento considerável de 82%.

Como passo final desta rota de síntese do co-oligômero XGO-*b*-XGOAc, o bloco hidrofílico (**3**) foi ligado ao bloco hidrofóbico (**5**) via reação de ciclo-adição catalisada por cobre CuAAC. O sucesso da reação foi confirmado pelo desaparecimento da banda de azida no espectro de infravermelho, referente ao bloco hidrofílico (**3**). Além disso, o espectro de infravermelho do co-oligômero demonstra a presença de grupos acetato do bloco hidrofóbico, como indicado pela banda de estiramento de C=O em 1753 cm^{-1} e uma banda larga em 3425 cm^{-1} confirmando a presença dos grupos hidroxila da xiloglucana não acetilada do bloco hidrofílico (Figura 10). Para consolidar o resultado obtido, observamos a presença dos picos característicos da xiloglucana livre e acetilada por ^1H RMN (Figura 11), assim como os sinais referentes ao próton do anel do triazol, formado a partir da reação de ‘click’.

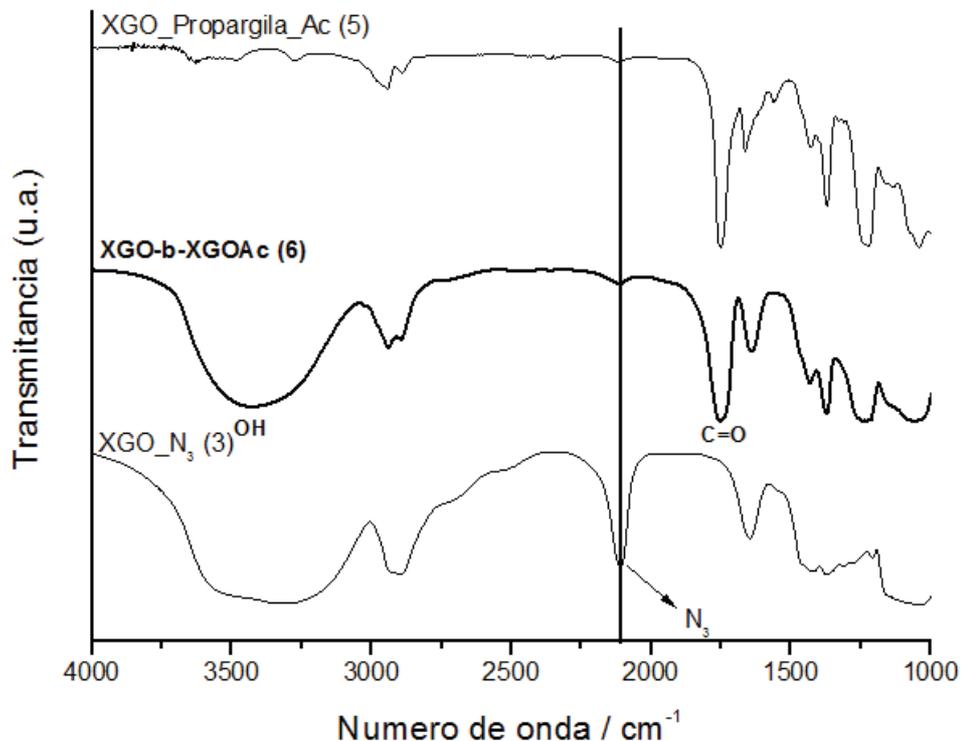


Figura 10. Espectro de Infravermelho do bloco hidrofílico (**3**), bloco hidrofóbico (**5**) e do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac (**6**).

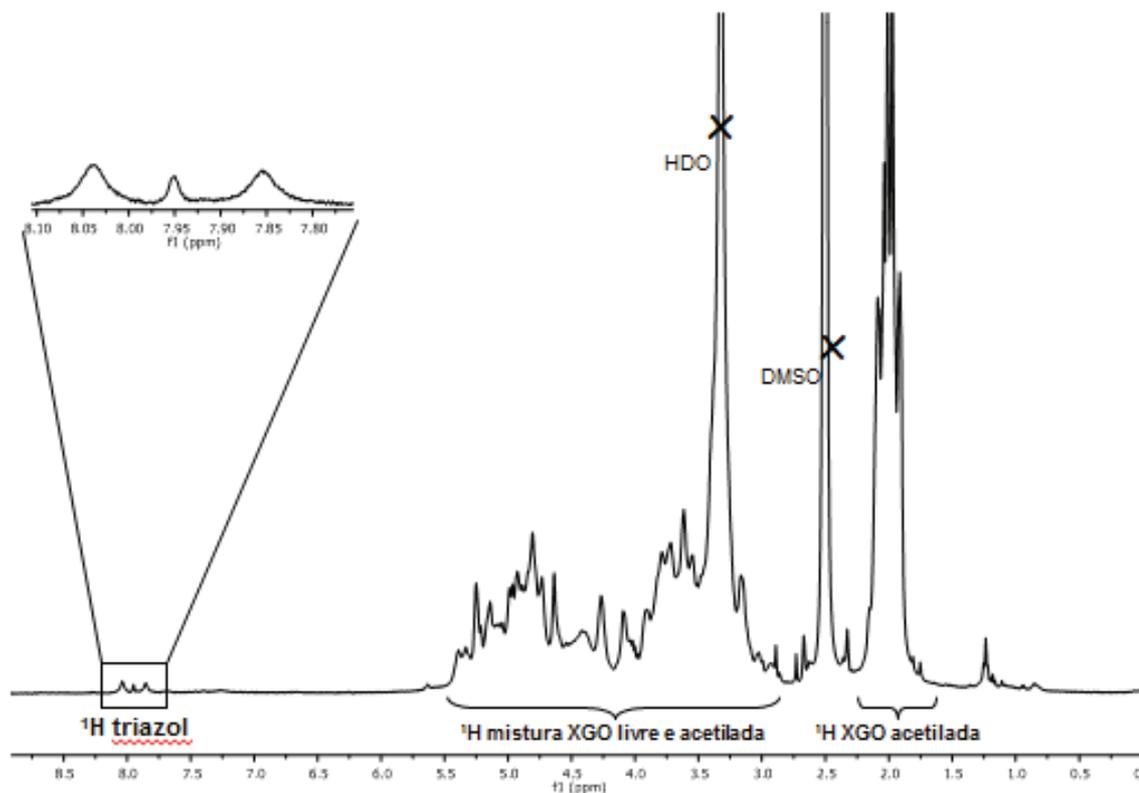


Figura 11. Espectro de ¹H RMN do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac (6).

Síntese do co-oligômero DP7-*b*-DP7,Ac

Com o objetivo de avaliar a influência do volume dos blocos hidrofílicos e hidrofóbicos do co-oligômero na sua auto-associação em solução aquosa, decidiu-se realizar a síntese, a partir da mesma rota sintética do XGO-*b*-XGO,Ac, partindo-se apenas da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana para a obtenção do co-oligômero DP7-*b*-DP7,Ac (**11**). Para alcançar este objetivo, a digestão da xiloglucana de sementes de tamarindo foi realizada pela adição da mesma endoglucanase comercial, acrescida de uma β-galactosidase, uma enzima com a capacidade de hidrolisar os resíduos terminais não reduzidos da β-D-galactose de oligossacarídeos e polissacarídeos (NICHTL, BUCHNER, JAENICKE, RUDOLPH, & SCHEIBEL, 1998). A partir de então, o procedimento utilizado para a síntese do co-oligômero seguiu a rota sintética descrita anteriormente, passando pela funcionalização dos oligossacarídeos por aminação reductiva, pela acetilação de um dos blocos e ligação destes via ‘*click chemistry*’, resultando no composto (**11**).

Todas as reações foram caracterizadas por espectrometria de massas, infravermelho e RMN de ^1H . Uma observação deve ser ressaltada com relação à caracterização por espectrometria de massas da fração DP7 dos oligossacarídeos funcionalizados com o grupo azida (**8**). O espectro de massas (MALDI-TOF) do composto (**8**) indicou a presença do produto esperado, assim como a presença do oligossacarídeo com o grupo azida reduzido na sua forma de amina primária. A técnica de espectrometria de massas por MALDI (em inglês, *matrix assisted laser desorption ionization*) baseia-se na ionização do analito adsorvido em uma matriz ácida por um feixe de *laser*, cuja energia causa a dessorção da molécula. A matriz ácida transfere prótons para as moléculas do oligossacarídeo, fazendo que fiquem ionizadas positivamente, passando para o estado gasoso sendo, desta forma, capazes de serem analisadas (CUNHA, CASTRO, & FONTES, 2006).

Azidas podem ser susceptíveis à degradação fotolítica, mesmo quando submetidas a exposições brandas como luz laboratorial à temperatura ambiente, podendo ser convertidas em aminas. Um rearranjo de Schmidt pode explicar a formação da amina quando o material é submetido à pirólise, termólise prolongada ou intensa radiação (ABBENANTE, LE, & FAIRLIE, 2007). Dessa maneira a ionização por um feixe de *laser* na técnica de espectrometria por MALDI pode levar à degradação do material de partida. Como forma de comprovar a formação da amina primária decorrente da técnica empregada, e não da degradação inicial do produto analisado, a análise de espectrometria de massas por ESI também foi realizada. A ESI é uma técnica de ionização suave, provocando pouca (ou nenhuma) fragmentação dos analitos estudados, envolvendo somente o rompimento gradual de interações não covalentes, principalmente a remoção de moléculas de solventes (ABBENANTE, LE, & FAIRLIE, 2007). A partir desta análise observou-se, portanto, a presença de um sinal único referente à massa do oligossacarídeo funcionalizado com o grupo azida, acrescido da massa de um hidrogênio, comprovando, então a pureza da amostra.

Oligossacarídeos de Xiloglucana (1)

13 g de xiloglucana de sementes de tamarindo foram dissolvidas em 1 litro de água destilada, *overnight*. Após completa solubilização, a endoglucanase comercial (E.C.3.2.1.4) foi adicionada (2,7 mL) e a solução foi mantida à temperatura de 37 °C por 5 horas, ou até completa digestão da xiloglucana em oligossacarídeos. A digestão enzimática foi acompanhada por cromatografia de camada delgada, utilizando-se como eluente uma mistura de acetonitrila/água (70/30). Após desaparecimento total do produto de partida, a inativação enzimática foi alcançada pelo aquecimento súbito da solução em banho de óleo mineral a 150 °C. A solução foi submetida em seguida à filtração em filtro de papel Whatman, seguida por evaporação em rotaevaporador para redução do volume de água e liofilização, para fornecer (1) como sólido branco. MALDI-TOF: M + Na⁺ m/z: 1085,3 (hepta-); 1247,3 (octa-); 1409,4 (nona-sacarídeo). ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ = 5,25-5,20 (m, H-1 Xyl^{II,III}); 4,97-4,96 (m, H-1 Xyl^{IV}); 4,55-4,70 (m, H-1 Glc^{II-IV}, Gal^{II,III}); 3,35-4,01 (m, H-2 – H-6 Glc^{II-IV} e Gal^{II-III}, H-2 – H-5 Xyl^{II-IV} H-1 Glc^I-itol) ppm.

2-Azidoetilamina (2)

A uma solução de NaN₃ (23,8 g; 366 mmol) em água (200 mL), adicionou-se hidrobrometo de 2-bromoetilamina (25 g; 122 mmol) e esta solução foi aquecida a 75 °C. A mistura reacional foi mantida nesta temperatura em agitação por 24 horas, e então resfriada em banho de gelo. A esta solução, adicionou-se NaOH (28,5 g; 712,5 mmol), mantendo-a sob agitação até completa dissolução. Em seguida, uma extração com Et₂O foi realizada 3 vezes, as frações orgânicas foram coletadas e, após secagem em Na₂SO₄, a solução resultante foi evaporada em rotaevaporador, fornecendo (2) como um óleo claro (8,9 g; 30%).

Xiloglucana_Azida (3)

A uma suspensão de oligossacarídeos de xiloglucana (1) (1 g; 0,78 mmol) (composta por uma mistura de hepta-, octa-, e nona-sacarídeos na razão de 15:35:50, respectivamente) em água/metanol (8 mL), acidificada com ácido acético (pH~5,0), foram adicionados NaBH₃CN (98,0 mg; 1,56 mmol) e 2-azidoetilamina (134,0 mg; 1,56 mmol). A mistura foi submetida a um sistema de micro-ondas, por 2 horas à temperatura de 80 °C. Precipitação foi realizada pela adição de 80 mL de etanol, e a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a 8000 rpm e 4 °C. O

sobrenadante foi removido e este procedimento foi repetido 2 vezes. O resíduo foi dissolvido em água, evaporado em rotaevaporador para eliminação do etanol residual, liofilizado e purificado por *flash chromatography* em coluna C18 (Metanol:H₂O) para fornecer (**3**) como um sólido branco (0,68 g; 65%). IV (KBr): $\nu = 3300$ (O-H, açúcar), 2894 (C-H, açúcar), 2100 (N₃, azida) cm⁻¹. MALDI-TOF: M + Na⁺ *m/z*: 1155,3 (hepta-); 1317,3 (octa-); 1479,4 (nona-sacarídeo). ¹H RMN (400 MHz, D₂O): $\delta = 5,2$ (m, H-1 Xyl^{II,III}); 4,97-4,96 (m, H-1 Xyl^{IV}); 4,62-4,50 (m, H-1 Glc^{II-IV}, Gal^{II,III}); 4,04-2,88 (m, H-2 – H-6 Glc^{II-IV} e Gal^{II-III}, H-2 – H-5 Xyl^{II-IV} H-1 Glc^I-itol, NCH₂), 1,94 ppm (s, CH₂N₃).

Xiloglucana_Propargila (4)

A uma suspensão de oligossarídeos de xiloglucana (**1**) (1 g; 0,78 mmol) (composta por uma mistura de hepta-, octa-, e nona-sacarídeos na razão de 15:35:50, respectivamente) em água/metanol (8 mL), acidificada com ácido acético (pH~5,0), foram adicionados NaBH₃CN (98,0 mg; 1,56 mmol) e propargilamina (86,3 mg; 1,56 mmol). A mistura foi submetida a um sistema de micro-ondas, por 2 horas à temperatura de 80 °C. Precipitação foi realizada pela adição de 80 mL de etanol, e a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a 8000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi removido e este procedimento foi repetido 2 vezes. O resíduo foi dissolvido em água, evaporado em rotaevaporador para eliminação do etanol residual, liofilizado e purificado por *flash chromatography* em coluna C18 (Metanol:H₂O) para fornecer (**4**) como um sólido branco (0,51 g; 50%). IV (KBr): $\nu = 3390$ (O-H, açúcar), 2924 (C-H, açúcar), 2110 (C≡C, alcino) cm⁻¹; MALDI-TOF: M + Na⁺ *m/z*: 1124,3 (hepta-); 1286,4 (octa-); 1448,5 (nona-sacarídeo).). ¹H RMN (400 MHz, D₂O): $\delta = 5,09$ (m, H-1 Xyl^{II,III}); 4,88-4,85 (m, H-1 Xyl^{IV}); 4,58-4,44 (m, H-1 Glc^{II-IV}, Gal^{II,III}); 3,89-3,37 (m, m, H-2 – H-6 Glc^{II-IV} e Gal^{II-III}, H-2 – H-5 Xyl^{II-IV} H-1 Glc^I-itol, NCH₂); 2,80-2,78 (m, C≡CH) ppm.

Xiloglucana_Propargila_Acetilada (5)

Uma solução de Xiloglucana_propargila (**4**) (500 mg; 0,38 mmol) em piridina (50 mL), anidrido acético (20 mL) e DMAP foi mantida sob agitação em temperatura ambiente até desaparecimento total do material de partida, monitorada por cromatografia de camada delgada (acetone/água, 7:3). Metanol foi adicionado e o solvente removido por evaporação. Em seguida, realizou-se diluição com acetato de etila

(150 mL), seguida por extrações sucessivas com HCl 1 mol L⁻¹ e água, a fração orgânica foi seca com Na₂SO₄, concentrada até eliminação completa do solvente por evaporação em rotaevaporador. A purificação foi realizada por coluna cromatográfica (SiO₂, acetato de etila), fornecendo **(5)** como pó amarelo (0,74 g; 82%). IV: $\nu = 2110$ (C≡C, alcino), 1751 (C=O, éster) cm⁻¹; MALDI-TOF: M + Na⁺ m/z : 2006,6 (hepta-); 2294,7 (octa-); 2584,3 (nona-sacarídeo). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,39$ -3,65 (m, H-1 Xyl^{II,III,IV}, H-2 – H-6 Glc^{II-IV} e Gal^{II,III}, H-2 – H-5 Xyl^{II-IV}, H-1 Glc^I-itol, NCH₂); 2,24-1,86 (m, OCH₃); 1,26-1,22 (m, C≡CH) ppm.

XGO-*b*-XGOAc (6)

Em uma solução de **(5)** (100,0 mg; 0,039 mmol) e **(3)** (53,2 mg; 0,039 mmol) em 1 mL de dimetilformamida anidra adicionou-se CuI.P(OEt)₃ (6,9 mg; 0,0195 mmol) sob atmosfera de argônio. A mistura reacional foi mantida em agitação a 68 °C por 3 horas, até que nenhuma alteração fosse observada no consumo do material de partida da reação. Metanol foi adicionado e o solvente evaporado na presença de sílica. O sólido obtido foi submetido à purificação por coluna cromatográfica (SiO₂, eluente – acetobitrila-água, 8:2 e 7:3), conferindo o composto **(6)** como um sólido branco (135,0 mg; 95%). IV (KBr): $\nu = 3455$ -3395 (O-H, açúcar), 2939-2894 (C-H, açúcar), 1751 (C=O, éster) cm⁻¹; MALDI-TOF: M + Na⁺ m/z : 3300,9 (DP8OH-*b*-DP7Ac); 3462,9 (DP9OH-*b*-DP7Ac); 3589,0 (DP8OH-*b*-DP8Ac); 3751,1 (DP9OH-*b*-DP8Ac); 3877,1 (DP8OH-*b*-DP9Ac); 4039,2 (DP9OH-*b*-DP9Ac). ¹H RMN (400 MHz, ((CD₃)₂SO): $\delta = 8,04$; 7,97 e 7,87 (3x s, H5-triazol); 5,37-2,86 (m, H-1 Xyl^{II,III,IV}, H-2 – H-6 Glc^{II-IV} e Gal^{II-III}; H-2 – H-5 Xyl^{II-IV}, H-1 Glc^I-itol, NCH₂); 2,17-1,82 (m, CH₃ (OAc))ppm.

Fração DP7 dos Oligossacarídeos de Xiloglucana (7)

5 g de xiloglucana de sementes de tamarindo foram dissolvidas em 385 mL de água destilada, *overnight*. Após completa solubilização, endoglucanase (1 mL) e β -galactosidase (0,6 mL) foram adicionadas e a solução foi mantida à temperatura de 37 °C por 5 horas, ou até completa digestão da xiloglucana em oligossacarídeos na fração DP7. A digestão enzimática foi acompanhada por cromatografia de camada delgada, utilizando-se como eluente uma mistura de acetonitrila/água (70/30). Após desaparecimento total do produto de partida, a inativação enzimática foi alcançada pelo aquecimento súbito da solução em banho de óleo mineral a 150 °C. A solução foi submetida em seguida à

filtração em filtro de papel Whatman, seguida por evaporação em rotaevaporador para redução do volume de água e liofilização, para fornecer (7) como sólido branco. IV (KBr): $\nu = 3368$ (O-H, açúcar), 2924 (C-H, açúcar). MALDI-TOF: $M + Na^+ m/z$: 1085,3. 1H RMN (400 MHz, D_2O): $\delta = 5,20-5,16$ (m, H-1 Xyl^{IV}); 4,90-4,86 (m, H-1 Xyl^{II,III}); 4,59-4,48 (m, H-1 Glc); 3,94-3,23 (m, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl) ppm.

DP7_Azida (8)

A uma suspensão da fração DP7 de oligossarídeos de xiloglucana (7) (1 g; 0,94 mmol) em água/metanol (8 mL), acidificada com ácido acético (pH~5,0), foram adicionados $NaBH_3CN$ (118,7 mg; 1,88 mmol) e 2-azidoetilamina (135,6 mg; 1,88 mmol). A mistura foi submetida a um sistema de micro-ondas, por 2 horas à temperatura de 80 °C. Precipitação foi realizada pela adição de 80 mL de etanol, e a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a 8000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi removido e este procedimento foi repetido 2 vezes. O resíduo foi dissolvido em água, evaporado em rotaevaporador para eliminação do etanol residual, liofilizado e purificado por *flash chromatography* em coluna C18 (Metanol: H_2O) para fornecer (8) como um sólido branco (0,40 g; 40%). IV (KBr): $\nu = 3368$ (O-H, açúcar), 2922 (C-H, açúcar), 2110 (N_3 , azida) cm^{-1} ; MALDI-TOF: $M (N_3) + Na^+ m/z$: 1155,3; $M (NH_2) + Na^+ m/z$: 1129,3; $M (NH_2) + H^+ m/z$: 1107,4. ESI: $M + H^+ m/z$: 1156,5. 1H RMN (400 MHz, D_2O): $\delta = 4,98-4,96$ (m, H-1 Xyl^{IV}); 4,69-4,56 (m, H-1 Glc); 4,09-3,36 (m, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl e NCH_2); 2,89-2,83 (CH_2N_3) ppm.

DP7_Propargila (9)

A uma suspensão da fração DP7 de oligossarídeos de xiloglucana (7) (1,05 g; 0,99 mmol) em água/metanol (8 mL), acidificada com ácido acético (pH~5,0), foram adicionados $NaBH_3CN$ (124,86 mg; 1,98 mmol) e propargilamina (108,9 mg; 1,98 mmol). A mistura foi submetida a um sistema de micro-ondas, por 2 horas à temperatura de 80 °C. Precipitação foi realizada pela adição de 80 mL de etanol, e a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a 8000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi removido e este procedimento foi repetido 2 vezes. O resíduo foi dissolvido em água, evaporado em rotaevaporador para eliminação do etanol residual, liofilizado e purificado por *flash chromatography* em coluna C18 (Metanol: H_2O) para fornecer (9) como um sólido branco (0,52 g; 47,5%). IV (KBr): $\nu = 3385$ (O-H, açúcar),

2905 (C-H, açúcar) 2115 (C≡C, alcino) cm^{-1} ; MALDI-TOF: $\text{M} + \text{Na}^+$ m/z : 1124,6. ^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ = 4,99-4,96 (m, H-1 Xyl^{IV}); 4,69-4,56 (m, H-1 Glc); 4,21-3,35 (m, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl, e NCH_2C); 3,36-2,99 (m, $\text{C}\equiv\text{CH}$) ppm.

DP7_Propargila_Acetilada (10)

Uma solução de Xiloglucana_propargila (**9**) (407,0 mg; 0,37 mmol) em piridina (50 mL), anidrido acético (20 mL) e DMAP foi mantida sob agitação em temperatura ambiente até desaparecimento total do material de partida, monitorada por cromatografia de camada delgada (acetonitrila/água, 7:3). Metanol foi adicionado e o solvente removido por evaporação. Em seguida, realizou-se diluição com acetato de etila (150 mL), seguida por extrações sucessivas com HCl 1 mol L^{-1} e água, a fração orgânica foi seca com Na_2SO_4 , concentrada até eliminação completa do solvente por evaporação em rotaevaporador. A purificação foi realizada por coluna cromatográfica (SiO_2 , acetato de etila), fornecendo (**10**) como sólido amarelo (0,29 g; 40%). IV: ν = 3277 (C-H, alcino), 2941 (C-H, açúcar), 2117 (C≡C, alcino), 1749 (C=O, éster) cm^{-1} ; MALDI-TOF: $\text{M} + \text{Na}^+$ m/z : 2006,5. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ = 5,38-3,63 (m, H-1 Xyl^{IV}, Xyl^{II,III}, Glc; H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl e NCH_2C); 2,14-1,93 (m, OCH_3); 1,67-1,52 (m, $\text{C}\equiv\text{CH}$) ppm.

DP7-b-DP7Ac (11)

Em uma solução de (**10**) (154,0 mg; 0,077 mmol) e (**8**) (87,9 mg; 0,077 mmol) em 1 mL de dimetilformamida anidra adicionou-se CuI.P(OEt)_3 (13,8 mg; 0,039 mmol) sob atmosfera de argônio. A mistura reacional foi mantida em agitação a 68 °C por 3 horas, até que nenhuma alteração fosse observada no consumo do material de partida da reação. Metanol foi adicionado e o solvente evaporado na presença de sílica. O sólido obtido foi submetido à purificação por coluna cromatográfica (SiO_2 , eluente – acetobitrila-água, 8:2 e 7:3), conferindo o composto (**11**) como um sólido branco (100,0 mg; 41%). IV (KBr): ν = 3455-3395 (O-H, açúcar), 2939-2894 (C-H, açúcar), 1751 (C=O, éster) cm^{-1} ; MALDI-TOF: $\text{M} + \text{Na}^+$ m/z : 3300,9 (DP8OH-*b*-DP7Ac); 3462,9 (DP9OH-*b*-DP7Ac); 3589,0 (DP8OH-*b*-DP8Ac); 3751,1 (DP9OH-*b*-DP8Ac); 3877,1 (DP8OH-*b*-DP9Ac); 4039,2 (DP9OH-*b*-DP9Ac). ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ = 8,05; 7,95 e 7,86 (3x s, H5-triazol); 5,38-3,15 (m, H-1 Xyl^{IV}, Xyl^{II,III}, Glc; H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl); 2,08-1,91 (m, CH_3 (OAc)) ppm.

3.2 Preparação e Caracterização de micelas (XGO-*b*-XGO,Ac / DP7-*b*-DP7,Ac) e nanopartículas (gliadina / zeína)

3.2.1 Materiais

Os co-oligômeros anfifílicos em bloco XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac foram obtidos a partir da síntese descrita no Capítulo 3 deste trabalho. As proteínas (gliadina e zeína), o surfactante Pluronic-F68® e o pireno foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, M.O.), enquanto a enzima β -galactosidase foi gentilmente cedida pela Megazyme (Wicklow, Irlanda). A água utilizada para o preparo das micelas e das nanopartículas foi purificada por um sistema de purificação Milli-Q (Billerica, MA, U.S.A.).

3.2.2 Metodologia

Preparo das micelas de XGO-*b*-XGO, Ac e DP7-*b*-DP7,Ac

As micelas obtidas a partir dos co-oligômeros anfifílicos sintetizados neste trabalho foram preparadas pela dissolução direta em água. As soluções aquosas de XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac em diferentes concentrações foram mantidas em agitação branda (300 rpm) à 40°C, *overnight*, seguida por resfriamento até temperatura ambiente e filtração em membrana hidrofílica (0,45 μm Millipore Millex LCR).

Preparo das micelas de DP7-*b*-XGO,Ac

As micelas de DP7-*b*-XGO,Ac foram obtidas com o objetivo de verificar a influência da diminuição do volume do bloco hidrofílico na morfologia e tamanho micelares. Uma solução aquosa de XGO-*b*-XGO,Ac foi preparada na concentração de 3 mg mL⁻¹, mantida em agitação branda (300 rpm) à 40 °C, *overnight*, seguida por resfriamento

até temperatura ambiente e filtração em membrana hidrofílica (0,45 μm Millipore Millex LCR). A enzima β -galactosidase foi, então, adicionada a esta solução (1 U mL^{-1}), mantida à 37 °C por 5 horas, tempo suficiente para a digestão total da galactose do bloco hidrofílico, comprovada por espectrometria de massas MALDI-TOF.

Preparo das nanopartículas de proteína

A avaliação da capacidade surfactante do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac, sintetizado neste trabalho, foi realizada a partir da elaboração de nanopartículas protéicas formadas a partir de gliadina e zeína, em solução aquosa, e sua capacidade em estabilizar estas partículas em solução. As nanopartículas foram elaboradas através do método de dispersão líquido-líquido, como sugerido por Zhong e Jin com pequenas modificações (ZHONG & JIN, 2009).

Primeiramente, as soluções protéicas foram preparadas pela solubilização da gliadina em etanol 62% (DUCLAIROIR, NAKACHE, & MARCHAIS, 1998) e da zeína em etanol 85% (ZHONG & JIN, 2009) (5 g L^{-1}). Estas soluções foram então filtradas em membrana hidrofílica (0,45 μm Millipore Millex LCR) e gotejadas em uma solução em constante agitação (1000 rpm) contendo Pluronic F-68® ou o co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac, como estabilizadores, em diferentes concentrações.

3.2.3 Caracterização das micelas e nanopartículas

Espectroscopia de Fluorescência

Sabe-se que copolímeros anfifílicos em bloco apresentam a capacidade de auto-associação em solução, sendo que a determinação da concentração micelar crítica (CMC) torna-se de grande importância na determinação das propriedades físico-químicas de surfactantes, por exemplo. Existem vários métodos frequentemente utilizados para esta determinação, tais como tensiometria, condutimetria, fluorimetria, espalhamento de luz dinâmico, calorimetria (RAY, CHAKRABORTY, & MOULIK, 2006). Os métodos espectrais que utilizam sondas, como o

pireno, na determinação da CMC são muito utilizados, onde a técnica de sonda fluorescente é um método sensível para a detecção da formação de micelas poliméricas.

O pireno é uma das sondas mais utilizadas na determinação da CMC por fluorescência, apresentando cinco picos na banda de emissão entre 370 e 395 nm. A razão entre as intensidades entre o primeiro e o terceiro pico é sensível às mudanças de polaridade do meio. Devido à sua natureza hidrofóbica, o pireno se direciona preferencialmente ao núcleo das micelas em soluções aquosas, e como consequência da transferência do meio polar para o meio não polar, a razão entre as bandas I_1/I_3 sofre alteração, sendo possível então a determinação da CMC de compostos anfifílicos. Valores extremos da escala de polaridade compreendem os valores de 1,84 para a água e de 0,6 para o hexano, sendo que, dependendo do surfactante, a razão I_1/I_3 pode variar entre 0,8 e 1,4 (KALYANASUNDARAM & THOMAS, 1977).

A técnica de espectroscopia de fluorescência foi utilizada na determinação da CMC dos co-oligômeros XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac. As medidas de fluorescência do estado estacionário do pireno foram realizadas em água deionizada seguido de purificação com sistema Millipore Milli-Q a $25,0\text{ }^\circ\text{C} \pm 1,0\text{ }^\circ\text{C}$. Uma solução estoque de pireno foi preparada em etanol absoluto ($1,0\text{ mmol L}^{-1}$) e, a partir desta, uma solução de pireno em água foi preparada na concentração de $1,0 \times 10^{-3}\text{ mmol L}^{-1}$, utilizada então para a solubilização dos co-oligômeros em estudo. As soluções foram preparadas pela dissolução dos co-oligômeros XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac (2 mg mL^{-1}) na solução de pireno em água ($1,0 \times 10^{-3}\text{ mmol L}^{-1}$), mantidas em agitação constante (300 rpm) por 12 horas à temperatura ambiente.

Os espectros de fluorescência foram obtidos em espectrofluorímetro HITACHI F4500, equipado com uma cela termostatizada a $25\text{ }^\circ\text{C}$, e a amostra mantida em agitação em uma cela de quartzo com 10 mm de caminho óptico. As fendas de excitação e de emissão do monocromador foram ajustadas em 2,5 nm. A excitação das amostras foi realizada em 336 nm e a emissão, registrada na faixa entre 360 – 450 nm. Neste caso, os espectros de fluorescência foram realizados após a adição de volumes conhecidos da solução estoque do co-oligômero na cela contendo 1,5 mL de solução de pireno na mesma concentração ($1,0 \times 10^{-3}\text{ mmol L}^{-1}$). Para cada leitura, a concentração foi corrigida devido à diluição decorrente da presença da solução de pireno. A razão I_1/I_3 foi estimada pela razão entre as intensidades dos picos em 372,8 nm (I_1) e 384,0 nm (I_3).

O tamanho das nanopartículas é considerado um dos principais parâmetros que influenciam na absorção em mucosas e tecidos. Partículas menores são capazes de penetrar através das camadas submucosas, enquanto partículas de tamanho maiores se encontram localizadas no revestimento epitelial (NAFEE, TAETZ, SCHNEIDER, SCHAEFER, & LEHR, 2007). O monitoramento do tamanho das nanopartículas obtidas a partir de diferentes condições experimentais é de extrema importância, pois fatores como velocidade de agitação (KWON, LEE, JANG, & KIM, 2001) e presença de macromoléculas em solução (NAFEE, TAETZ, SCHNEIDER, SCHAEFER, & LEHR, 2007) podem influenciar o tamanho das partículas obtidas.

O espalhamento de luz é um método eficaz para a caracterização estrutural de polímeros e nanopartículas em solução, pois a intensidade e a distribuição angular da luz espalhada dependem do tamanho e da forma das partículas que provocam o espalhamento em solução. A técnica de espalhamento dinâmico de luz mede, basicamente, a intensidade de luz espalhada pela amostra, com a qual se calcula a função de autocorrelação da intensidade, que é usada para calcular o coeficiente de difusão e o diâmetro médio das partículas. Ela é adequada para a determinação do tamanho de partículas dispersas em líquido, na faixa de dezenas de nanômetros a micrômetros.

Partículas em suspensão estão em movimento aleatório constante (movimento Browniano) devido à interação com as moléculas presentes no fluido dispersante. A técnica de espalhamento de luz é eficaz para se detectar flutuações temporais na intensidade de luz espalhada devido a flutuações de concentração e densidade da amostra. A flutuação medida do sinal da luz espalhada é autocorrelacionada no tempo através de uma função de correlação temporal, sendo possível a obtenção da frequência de relaxação (Γ), obtendo-se a partir dela o coeficiente de difusão translacional (D). Sendo que, o valor de coeficiente de difusão D é obtido pela determinação do coeficiente angular de um gráfico da frequência de relaxação (Γ) em função de q^2 .

$$\frac{\Gamma}{q^2} \Big|_{q \rightarrow 0} = D$$

Onde Γ é a frequência de relaxação e q é o vetor de onda definido conforme equação abaixo.

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

Onde λ é o comprimento de onda do feixe de luz incidente (632,8 nm), θ é o ângulo de espalhamento e n é o índice de refração do meio.

A função de autocorrelação serve não apenas para fornecer tamanho de partículas, mas também para mostrar a ocorrência de associação e entrelaçamento entre elas. A equação de Stokes-Einstein permite a determinação do raio hidrodinâmico (R_h) das partículas quando os valores de temperatura (T) e viscosidade (η) são conhecidos.

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) das amostras foi investigado em um Goniômetro ALV-CGS 8F S/N 069, equipado por quatro detectores, com um laser de 22 mV HeNe operando a um comprimento de onda de 632,8 nm. Para os experimentos, amostras contendo 1 mL de cada suspensão foram mantidas em temperatura constante de $25,0 \pm 0,1$ °C e analisadas em cubetas cilíndricas. As medidas foram realizadas a 90°, durante 300s. Os valores de raio hidrodinâmico (R_h) das micelas dos co-oligômeros e nanopartículas de proteína em suspensão foram obtidos a partir da análise de CONTIN, usando a equação de Stokes-Einstein, com base na determinação do valor do coeficiente de difusão aparente (D).

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi \eta D}$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e η é a viscosidade do meio.

Microscopia Eletrônica em Transmissão

As análises de microscopia eletrônica em transmissão (MET) são empregadas com objetivo de adquirir informações sobre tamanho, dispersão e forma de sistemas nanoparticulados em soluções, sendo possível a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas, por exemplo (SCHAFFAZICK, GUTERRES, FREITAS, & POHLMANN, 2003).

As imagens de MET obtidas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME, Florianópolis, Brasil) foram registradas utilizando um microscópio eletrônico JEM-1011 TEM com voltagem de aceleração máxima de 100 kV, operando a 80 kV. As medidas

realizadas no CERMAV (Grenoble, França) foram registradas sobre filmes fotográficos Kodak SO163 utilizando um microscópio eletrônico (Philips CM200) operando a uma voltagem de 80 kV, posteriormente reveladas e digitalizadas com o auxílio de uma câmera Kodak Megaplug e do software Analysis 3.2. O procedimento de preparo das amostras baseou-se na deposição de 4 μ L da suspensão aquosa de nanopartículas sobre grades de cobre revestidas com uma fina camada de carbono, previamente tratadas com UV ou ozônio, tornando as superfícies hidrofílicas. As amostras foram secas a temperatura ambiente antes da observação. As amostras de XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac foram coradas pela adição de uma gota de acetato de uranila 2 % (4 μ L) após a remoção de uma parte da solução contida na grade, seguida pela secagem em temperatura ambiente.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4 Resultados e Discussão

4.1 Síntese e caracterização estrutural dos co-oligômeros XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac

Os oligossacarídeos de xiloglucana (XGOs) foram o bloco sacarídico de escolha para a rota sintética deste trabalho (Figura 12). Os oligossacarídeos (XGOs) foram obtidos a partir da digestão enzimática do pó de xiloglucana de sementes de tamarindo por uma celulase comercial, enquanto a fração DP7 dos oligossacarídeos foi obtida pela adição conjunta da enzima β -galactosidase ao sistema. Com o objetivo de formar os diblocos XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac decidiu-se introduzir a função azida aos XGOs e DP7 livres, enquanto os blocos funcionalizados pela função propargila foram os blocos selecionados para a reação de peracetilação e formação do bloco hidrofóbico (Figura 12).

Primeiramente, os oligossacarídeos livres foram seletivamente funcionalizados com 2-azidoetilamina via aminação redutiva através do auxílio de um sistema de micro-ondas a 80 °C por 2 horas. Esta reação envolve a condensação da forma aberta do anel (carbonila) da extremidade redutora de oligossacarídeos com a amina em questão. A base de Schiff intermediária resultante é relativamente instável (APODACA & XIAO, 2001) e é rapidamente reduzida à amina secundária correspondente por ação do agente redutor, NaBH₃CN. A funcionalização dos oligossacarídeos levou ao surgimento da banda no espectro de infravermelho na região de 2100 cm⁻¹, devido às vibrações de deformação axial das duplas ligações conjugadas do grupo N₃. A confirmação da massa molar dos intermediários sintetizados foi realizada por espectrometria de massas MALDI-TOF, pela obtenção de uma mistura dos hepta-, octa- e nona-sacarídeos funcionalizados para o composto (3) e pela determinação isolada da massa molar do hepta-sacarídeo funcionalizado (8). XGO_Azida (3) e DP7_Azida (8) foram obtidos por precipitação em etanol simples com rendimento de 66 % e 40 %, respectivamente. Todas as fases de derivatização podem ser convenientemente realizadas em uma única reação (HARVEY, 2000; DALPATHADO, JIANG, KATER, & DESAIRE, 2005).

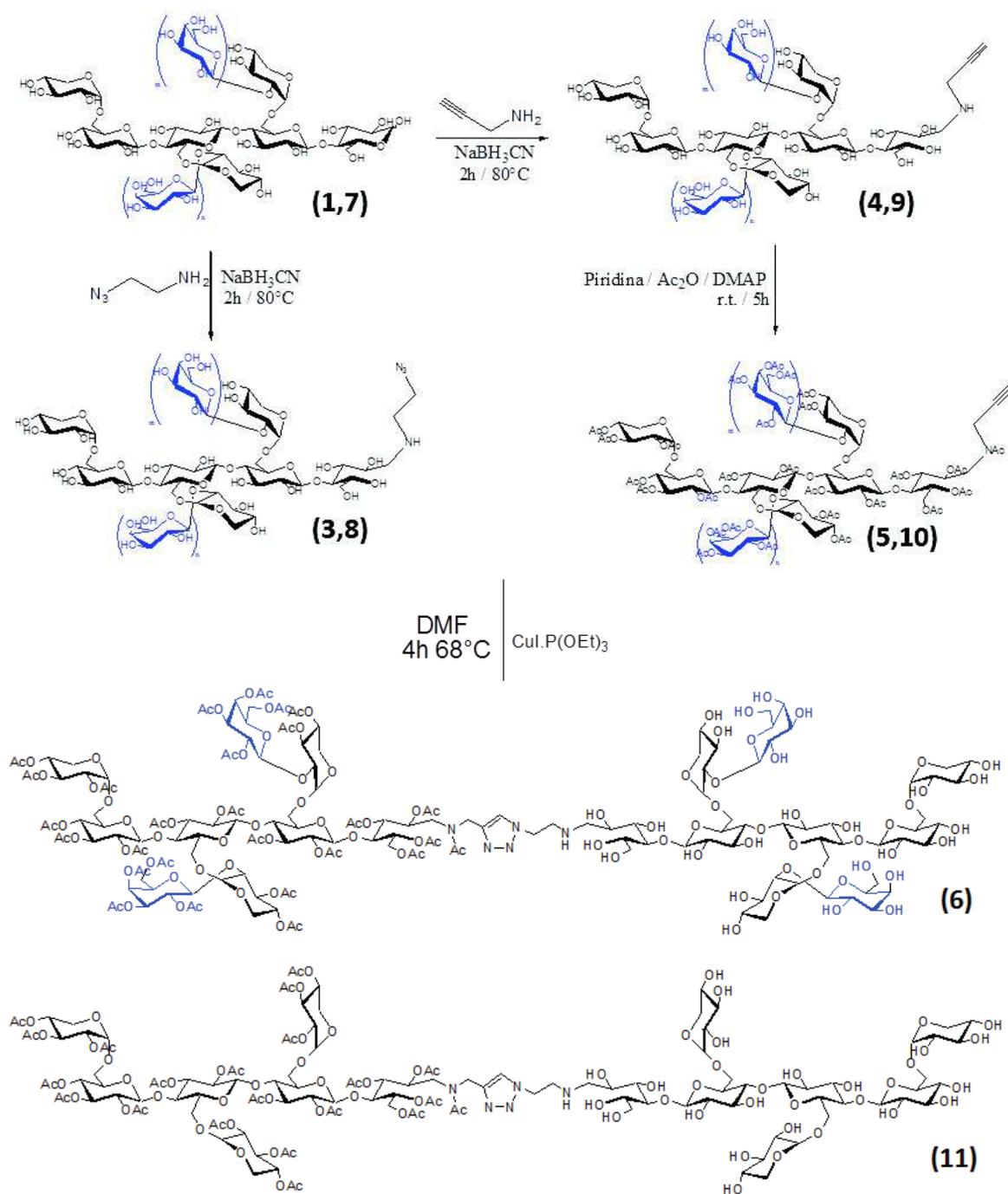


Figura 12. Rota da síntese do XGO-b-XGO,Ac e DP7-b-DP7,Ac (em azul são assinalados os resíduos de galactose, representando a fração dos oligossacarídeos DP8 e DP9).

Em segundo lugar, seguindo o mesmo procedimento, os oligossacarídeos foram funcionalizados com um grupo propargila via aminação redutiva fornecendo XGO_Propargila (**4**) e DP7_Propargila (**9**) com rendimento de 58% e 48%, respectivamente. A funcionalização dos compostos foi comprovada pela presença da banda em 2115 cm^{-1} no espectro de infravermelho resultante do estiramento da tripla ligação do alcino, e da massa molar dos oligossacarídeos funcionalizados (**4**) e (**9**) determinada por espectrometria de massas. A peracetilação dos oligossacarídeos funcionalizados pelo grupo propargila com anidrido acético e DMAP em piridina foi o passo seguinte deste trabalho, fornecendo os blocos hidrofóbicos, XGO_Propargila_Ac (**5**) e DP7_Propargila_Ac (**10**). A formação do bloco hidrofóbico via peracetilação das hidroxilas dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com propargilamina foi confirmada pelo desaparecimento da banda referente às hidroxilas e pela presença da banda no espectro de infravermelho referente ao estiramento da carbonila do grupo acetato em 1751 cm^{-1} (**5**) e 1794 cm^{-1} (**10**), além dos picos referentes ao deslocamento químico dos hidrogênios dos grupos acetato no espectro de ^1H RMN compreendidos na região de 2,24-1,86 ppm. A acetilação de todas as hidroxilas dos oligossacarídeos foi confirmada por espectrometria de massas MALDI-TOF.

Apesar do rendimento moderado, em torno de 60%, a aminação redutiva assistida pelo sistema de micro-ondas permite a formação dos dois produtos alvo purificados para a síntese de um co-oligômero em menos de 1 dia, e de acordo com o procedimento de purificação, pode ser transportado em grande escala.

Em seguida, a reação ‘click’ foi realizada em DMF anidro entre XGO_Azida (**3**) / XGO_Propargila_Ac (**5**) e DP7_Azida (**8**) / DP7_Propargila_Ac (**10**) utilizando $\text{CuI}\cdot\text{P}(\text{OEt})_3$ como catalisador, sob atmosfera de argônio a $68\text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 horas, seguida de agitação à temperatura ambiente durante 48 horas (Figura 12). A reação foi monitorada por cromatografia de camada delgada e o produto foi isolado por cromatografia *flash* em sílica gel. O espectro de infravermelho dos produtos purificados mostrou o desaparecimento completo do sinal de transmitância em função do grupo azida (2100 cm^{-1}), indicando a inexistência de qualquer grupo azida remanescente sem reagir na formação dos co-oligômeros XGO-*b*-XGO,Ac (**6**) e DP7-*b*-DP7,Ac (**11**). Além disso, o espectro de ^1H RMN apresentou picos na região entre 7,85-8,00 ppm, correspondentes ao próton olefínico dos co-

oligômeros associados com o isômero 1,4 dissustituído do anel triazol. Os sinais característicos devido aos prótons dos oligossacarídeos do bloco hidrofílico e os prótons dos oligossacarídeos acetilados do bloco hidrofóbico, também foram observados. Os espectros referentes à caracterização dos compostos podem ser encontrados na sessão de Apêndice deste trabalho.

4.2 Auto-associação dos co-oligômeros XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac em água

A concentração micelar crítica (CMC) é um dos parâmetros clássicos na caracterização da micelização de compostos anfifílicos, constituindo uma medida que descreve as propriedades físicas da micela, referindo-se a estabilidade termodinâmica micelar (KWON, NAITO, YOKOYAMA, OKANO, SAKURAI, & KATAOJA, 1993). É definida como a concentração do polímero, a partir da qual ocorre a formação de micelas. A CMC dos co-oligômeros obtidos a partir dos oligossacarídeos de xiloglucana foi determinada por fluorescência, utilizando pireno como sonda, a qual tem sido extensivamente utilizada na determinação da CMC de uma variedade de processos de micelização.

Os oligossacarídeos de xiloglucana de sementes de tamarindo são constituídos por uma cadeia linear de $\beta(1\rightarrow4)$ glucana, regularmente substituída por unidades de $\alpha(1\rightarrow6)$ xilose, que por sua vez podem ser substituídas por $\beta(1\rightarrow2)$ galactose (FRY, et al., 1993). A síntese dos co-oligômeros neste trabalho foi baseada no preparo de um dibloco – XGO-*b*-XGO,Ac (**6**) – formado pela mistura das três frações dos oligossacarídeos (DP7, DP8, e DP9) e outro dibloco – DP7-*b*-DP7,Ac (**11**) – formado por uma única fração (DP7), sem os resíduos de galactose, com o objetivo de verificar a influência da homogeneidade dos blocos na formação micelar.

Os diblocos sintetizados apresentaram valores de CMC próximos a $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ (XGO-*b*-XGO,Ac) e $0,22 \text{ mg mL}^{-1}$ (DP7-*b*-DP7,Ac) (Figura 13), estando dentro da faixa de valores de CMC reportados para surfactantes não-iônicos de baixa massa molar (ZHANG, ZHANG, & SOMASUNDARAN, 2004).

Quando falamos em copolímeros anfifílicos em bloco, a arquitetura do copolímero, a natureza química e o comprimento dos blocos são parâmetros moleculares que podem alterar o valor da CMC. O bloco

hidrofóbico do copolímero apresenta um importante papel na micelização, sendo que um aumento no comprimento do bloco hidrofóbico irá aumentar a hidrofobicidade do polímero no solvente levando à consequente diminuição no valor da CMC (LIU, ZHOU, WU, NACE, & CHU, 1997). Neste trabalho, um aumento na ordem de 5 vezes foi observado para o valor da CMC encontrado para o co-oligômero anfifílico DP7-*b*-DP7,Ac comparado ao co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac. Estudos mostram que para uma série de copolímeros, se o bloco hidrofílico é mantido constante, um aumento do bloco hidrofóbico irá diminuir o valor da CMC, enquanto a alteração do comprimento do bloco hidrofílico não apresenta um efeito significativo na alteração do processo de micelização (ALLEN, MAYSINGER, & EISENBERG, 1999; BONNÉ, LÜDTKE, JORDAN, & PAPADAKIS, 2007).

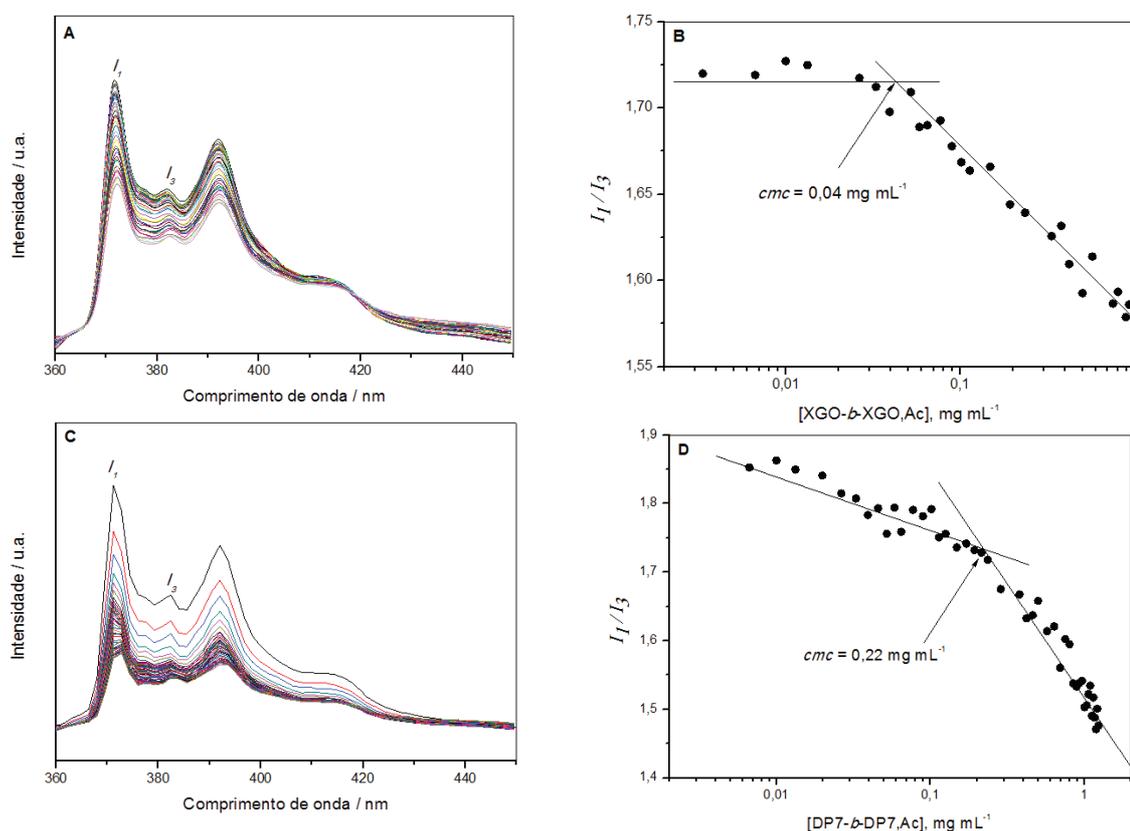


Figura 13. Determinação da cmc dos co-oligômeros sintetizados a partir de oligossacarídeos de xiloglucana. Espectros de emissão do pireno e variação correspondente da razão I_1/I_3 em função do aumento da concentração de XGO-*b*-XGO,Ac (A,B) e DP7-*b*-DP7,Ac (C,D).

A arquitetura dos copolímeros em bloco apresenta uma forte influência na formação micelar (BONNÉ, LÜDTKE, JORDAN, & PAPADAKIS, 2007), uma vez que a CMC é consequência da competição dos efeitos de entropia e entalpia do sistema (CHENG & CAO, 2009). O co-oligômero DP7-*b*-DP7,Ac apresentou um valor de CMC de 0,22 mg mL⁻¹, maior que o valor obtido para o co-oligômero Mal₇-“click”-AcMal₇, sintetizado a partir de maltoheptaose, um oligossacarídeo linear com sete unidades sacarídicas (MODOLON, OTSUKA, FORT, MINATTI, BORSALI, & HALILA, 2012), que foi de 0,1 mg mL⁻¹. Como mencionado anteriormente, os oligossacarídeos de xiloglucana são ramificados (FRY, et al., 1993), e o aumento do grau de ramificação das cadeias leva a um aumento do valor da CMC do sistema. Cadeias ramificadas apresentam menor entropia configuracional e perdem menos entropia configuracional no processo de agregação (VOROV, LIVESAY, & JACOBS, 2008). Enquanto cadeias lineares apresentam uma ampla interface exposta a outras cadeias, favorecendo a interação com as cadeias de outras moléculas o que leva à formação de micelas em concentrações inferiores aos copolímeros constituídos por blocos de estrutura ramificada (CHENG & CAO, 2009).

A auto-associação dos co-oligômeros anfifílicos foi avaliada através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) pela diluição direta de XGO-*b*-XGO,Ac e DP7-*b*-DP7,Ac em água. Micelas preparadas em diferentes concentrações foram submetidas à análise de DLS com detecção a 90°. Os resultados da distribuição de tamanho em número mostram a auto-associação de XGO-*b*-XGO,Ac em micelas com tamanho médio na faixa de 20 nm, independente da concentração do co-oligômero utilizada em solução (Figura 14). Partículas grandes ou agregados de micelas espalham mais luz do que partículas pequenas. A Figura 14 (A, C, E) ilustra a distribuição do tamanho das partículas em função da massa, indicando a presença de agregados micelares com tamanho médio na faixa de 150 nm, enquanto a distribuição em número (Figura 14 B, D, F) indica um pico de distribuição referente apenas às micelas individuais (~20 nm), em maior número na solução.

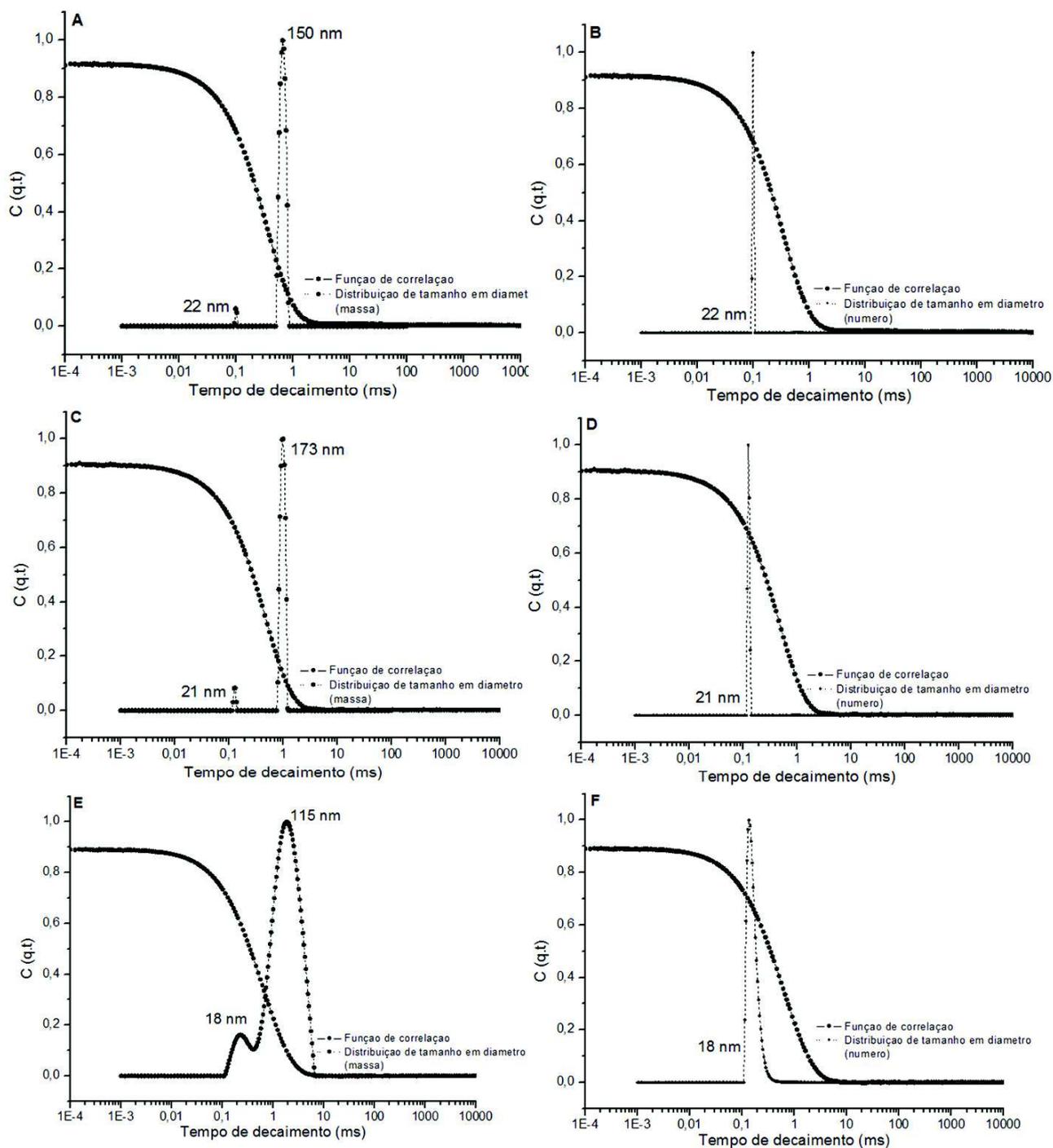


Figura 14. Função de correlação e distribuição do tamanho das micelas obtidas a partir da técnica de espalhamento de luz dinâmica para o co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac (A,B: 1 mg mL^{-1} ; C,D: 3 mg mL^{-1} ; E,F: 5 mg mL^{-1}).

Com o objetivo de confirmar o tamanho e verificar a morfologia das micelas de XGO-*b*-XGO,Ac a análise por microscopia em transmissão eletrônica (MET) foi realizada e comparada com os dados obtidos por DLS. A imagem obtida por MET para uma solução de XGO-*b*-XGO,Ac em água (3 mg mL^{-1}) (Figura 15) mostra que as micelas apresentam forma esférica e tamanho médio na faixa de 25 nm, o que corrobora os resultados obtidos por DLS. Normalmente, o tamanho de nanopartículas visualizadas por MET é menor comparado ao tamanho obtido utilizando a técnica de DLS, devido à desidratação da amostra. Nota-se, entretanto que no presente trabalho o tamanho médio das partículas obtidas por MET (25 nm) é ligeiramente superior ao observado por DLS (22 nm). Esta diferença pode ser atribuída a um conjunto de fatores tais como o achatamento das micelas na gride, por se tratarem de micelas flexíveis, à polidispersidade do sistema e ao menor número de partículas (~30 partículas) visualizadas por MET comparadas às partículas medidas por DLS.

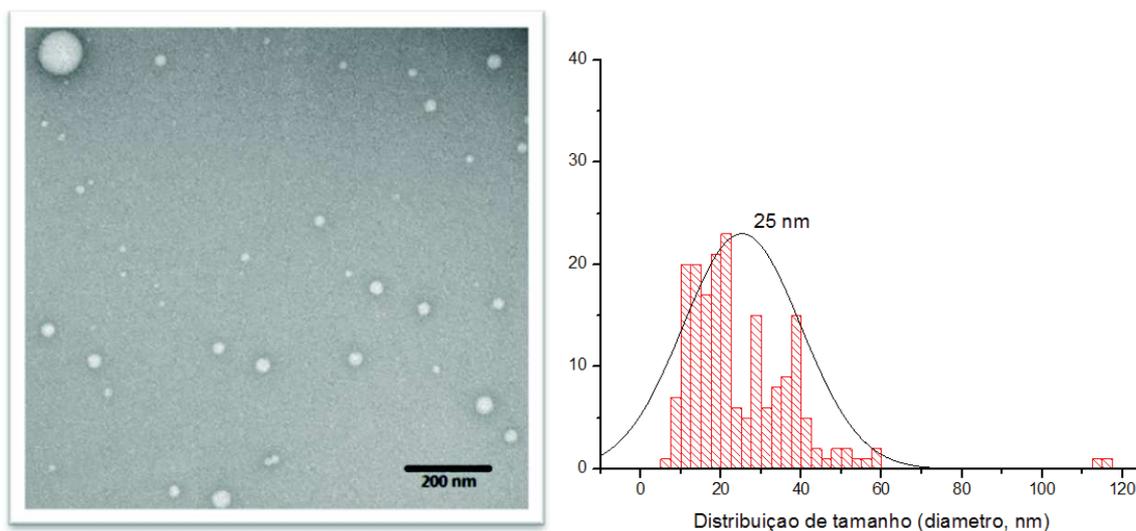


Figura 15. Micrografia de MET e distribuição médio do tamanho das micelas de XGO-*b*-XGO,Ac (3 mg mL^{-1} em água).

Micelas com distribuição de tamanho médio na faixa de 6 nm foram observadas por DLS em soluções preparadas a partir da dissolução do co-oligômero DP7-*b*-DP7,Ac em água em diferentes concentrações (Figura 16). A eliminação de duas unidades de galactose do bloco hidrofílico e duas unidades de galactose acetiladas do bloco hidrofóbico levou a uma diminuição na ordem de aproximadamente 4 vezes ao tamanho médio das micelas. Nota-se que, a diminuição de apenas 10% no valor da massa molar do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac ($\bar{M} = 3644,9 \text{ g.mol}^{-1}$) em comparação ao DP7-*b*-DP7,Ac ($M =$

3148,0 $g \cdot mol^{-1}$) conferiu um decréscimo de 70% no tamanho médio micelar. Além da influência na CMC, o tamanho e a arquitetura dos copolímeros influenciam no tamanho da micela formada pela auto-associação em soluções aquosas, pois a situação estérica em que os blocos se encontram no meio poderá levar à otimização ou ao bloqueio das interações hidrofóbicas (BONNÉ, LÜDTKE, JORDAN, & PAPADAKIS, 2007).

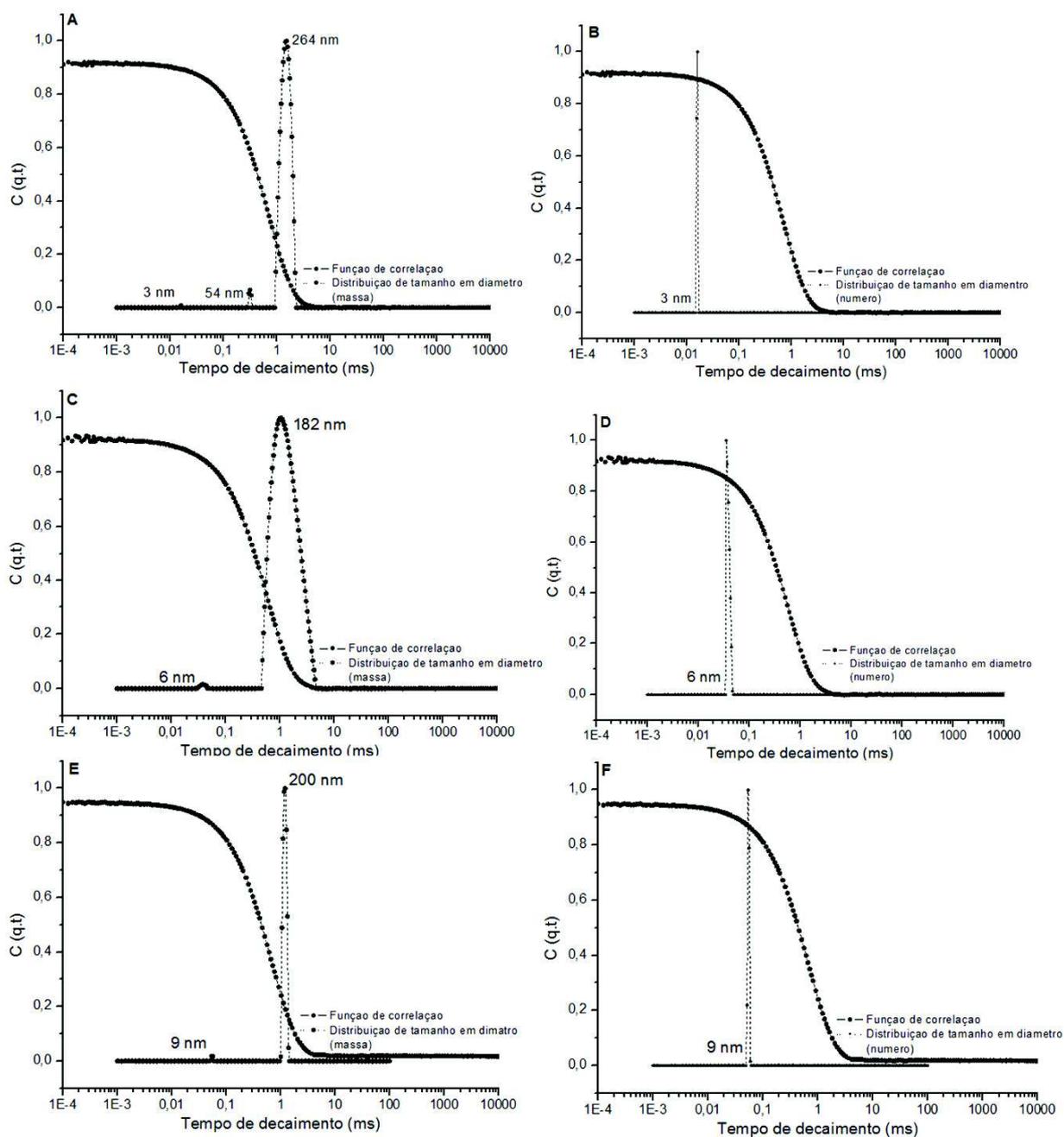


Figura 16. Função de correlação e distribuição do tamanho das micelas obtidas a partir da técnica de espalhamento de luz dinâmico para o co-oligômero DP7-*b*-DP7,Ac (A,B: 1 mg mL⁻¹; C,D: 3 mg mL⁻¹; E,F: 5 mg mL⁻¹).

A interação entre as cadeias dos blocos hidrofóbicos é favorecida pela diminuição do grau de ramificação estrutural (DP7-*b*-DP7,Ac), onde o empacotamento das cadeias é favorecido levando à aproximação, e consequente diminuição do núcleo da micela. Por outro lado, as moléculas de água do meio formam uma rede aleatória de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas da xiloglucana do bloco hidrofílico. A remoção dos resíduos de galactose (DP7-*b*-DP7,Ac) tem um efeito importante na solubilidade e no grau de associação entre as moléculas de xiloglucana, diminuindo a camada de hidratação micelar (EMEMURA & YUGUCHI, 2009). A combinação de fatores como diminuição da massa molar do co-oligômero, aumento da interação hidrofóbica e diminuição do grau de hidratação da coroa hidrofílica pode explicar a intensa diminuição no tamanho médio das micelas.

A auto-associação do DP7-*b*-DP7,Ac em água levou à formação de micelas esféricas com diâmetro médio de 5 nm observadas pela imagem revelada por MET (Figura 17), confirmando as medidas realizadas por DLS (Figura 16).

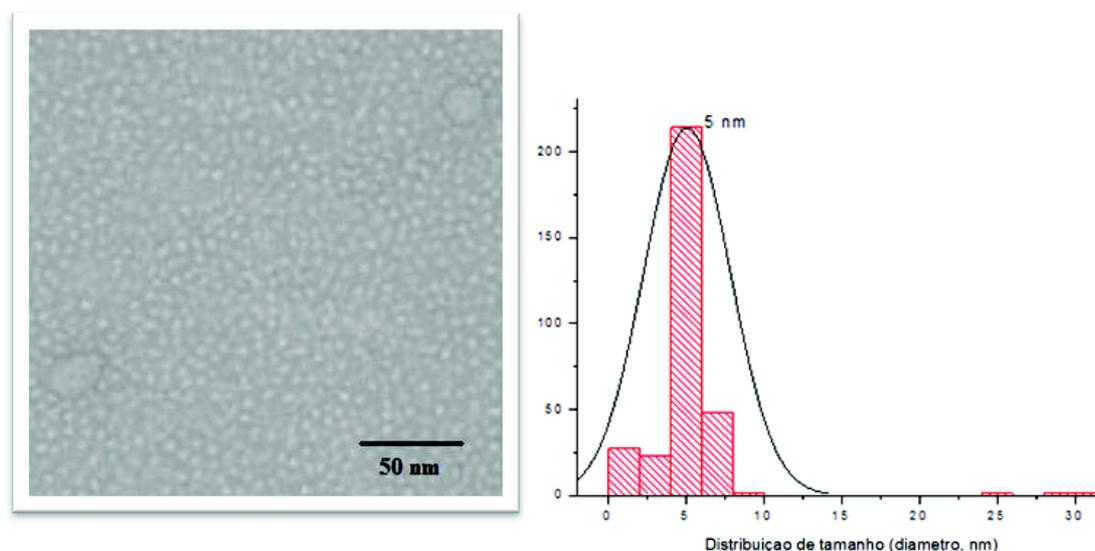


Figura 17. Micrografia de MET e distribuição médio do tamanho das micelas de DP7-*b*-DP7,Ac (3 mg mL⁻¹ em água).

4.3 Degradação parcial do bloco hidrofílico do XGO-*b*-XGO,Ac

O efeito da diminuição do bloco hidrofílico do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac no diâmetro médio das micelas foi avaliado pela remoção das unidades de galactose a partir da digestão enzimática parcial por β -galactosidase, uma enzima que apresenta capacidade de hidrolisar os resíduos terminais não reduzidos β -D-galactose de oligossacarídeos (NICHTL, BUCHNER, JAENICKE, RUDOLPH, & SCHEIBEL, 1998) (Figura 18).

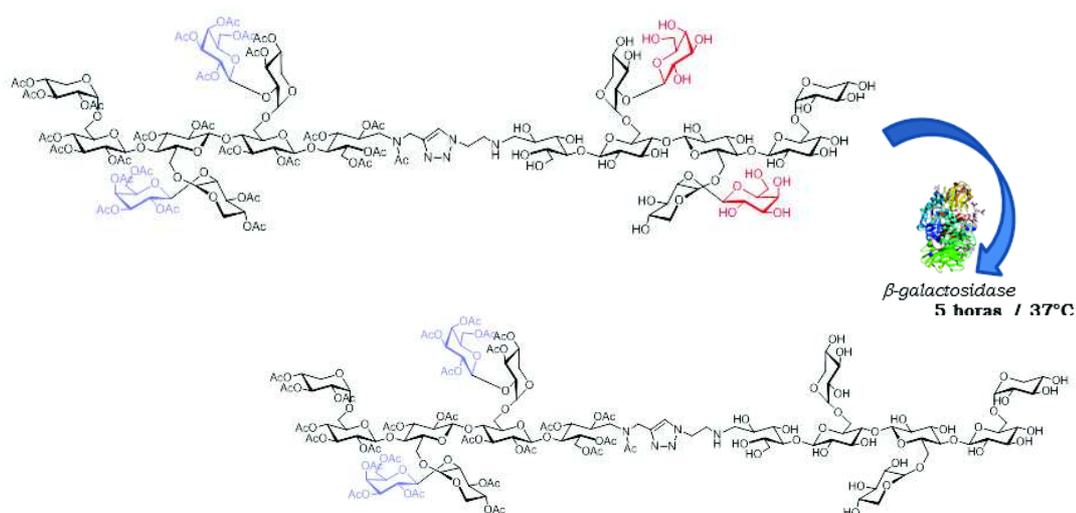


Figura 18. Digestão parcial do bloco hidrofílico do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac por β -galactosidase (1U mL^{-1} , 5 horas, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$).

A digestão enzimática parcial do XGO-*b*-XGO,Ac foi monitorada pela variação do diâmetro das micelas e da intensidade de espalhamento da luz registrados por DLS a cada 5 minutos, durante 5 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após cerca de 1 hora de reação, a intensidade da luz espalhada reduziu intensamente, mantendo-se constante durante o período restante de reação (Figura 19A). A diminuição da intensidade da luz espalhada ocorre devido a redução gradual do diâmetro das micelas (Figura 19B) em função da atividade enzimática exercida sobre o co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac levando à formação de DP7-*b*-XGO,Ac. A eliminação dos resíduos de galactose do bloco hidrofílico conferiu uma diminuição no diâmetro das micelas de 22 nm (XGO-*b*-XGO,Ac) para 10 nm (DP7-*b*-XGO,Ac).

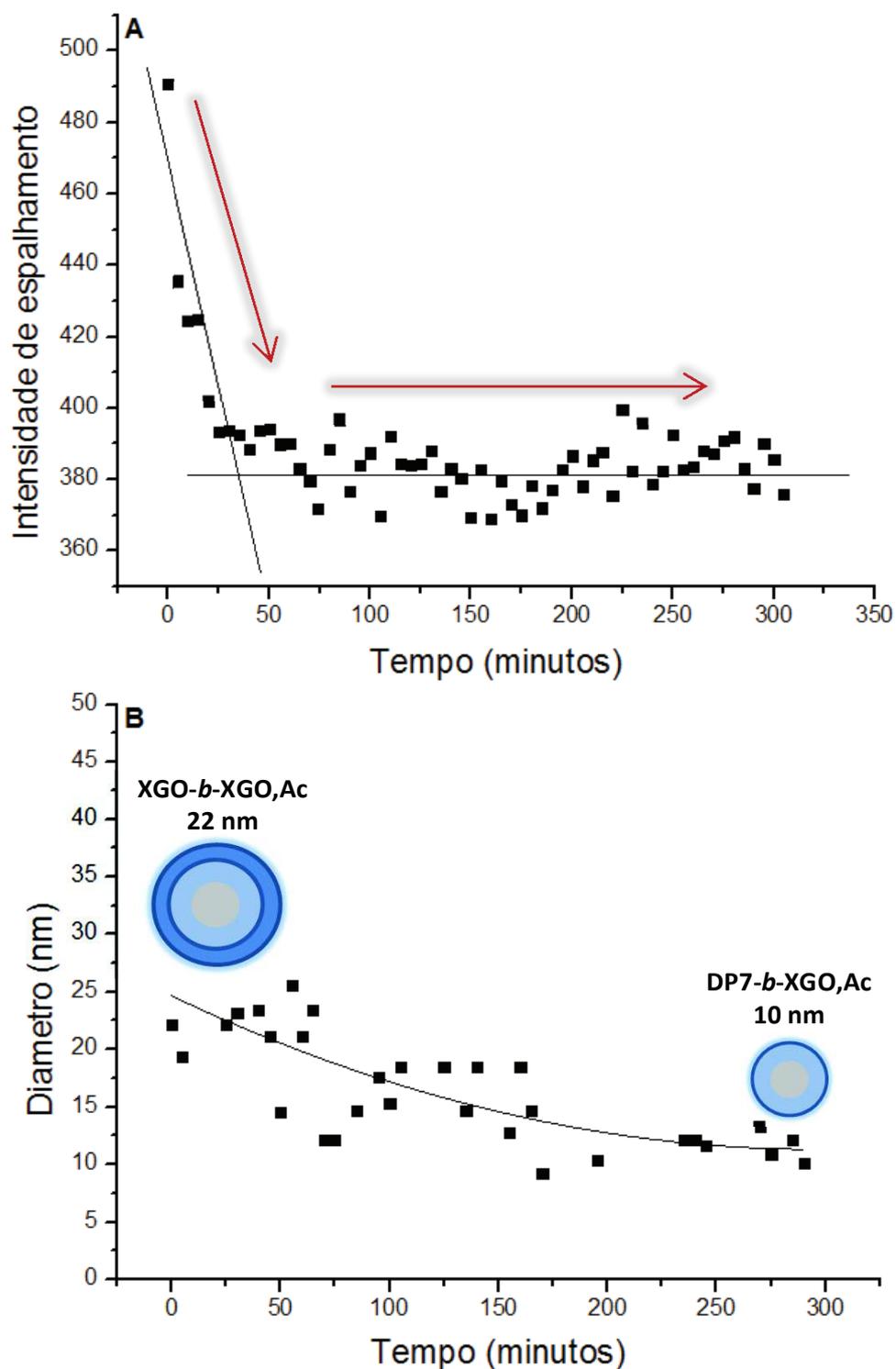


Figura 19. Variação da intensidade de espalhamento de luz e do diâmetro das micelas de XGO-*b*-XGO,Ac (3 mg mL^{-1}) durante digestão enzimática por β -galactosidase (1 U mL^{-1} , 5 horas, 37°C).

O objetivo da eliminação das unidades de galactose do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac foi tornar a cadeia mais homogênea, verificando a influência da diminuição da massa molar e da ramificação do bloco hidrofílico no tamanho e na morfologia micelar. A micrografia de MET da solução de DP7-*b*-XGO,Ac foi obtida logo após o término da reação de digestão enzimática e revelou a presença de micelas esféricas com diâmetro médio de 17 nm (Figura 20). A redução do volume do bloco hidrofílico levou à redução do diâmetro das micelas em torno de 50% (Figura 19) comparadas às micelas de XGO-*b*-XGO,Ac devido à menor hidratação da camada hidrofílica composta por oligossacarídeos de xiloglucana, além de contribuir com a diminuição da polidispersão do sistema (Figura 20).

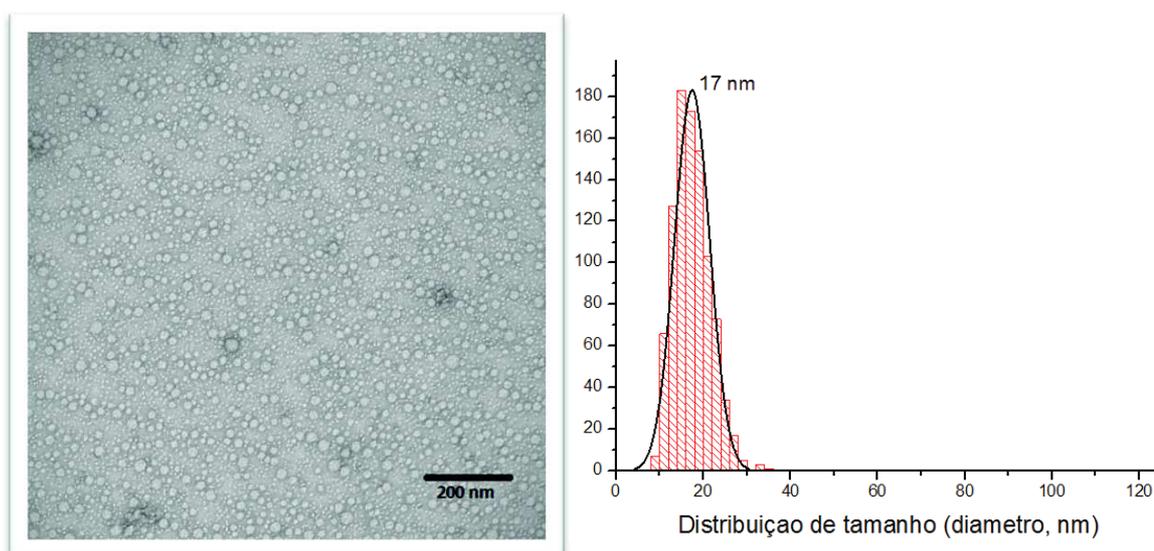


Figura 20. Micrografia de MET e distribuição médio do tamanho das micelas de DP7-*b*-XGO,Ac (3 mg mL⁻¹ em água).

Após o término da reação, a solução contendo o co-oligômero DP7-*b*-XGO,Ac foi submetida ao processo de liofilização. O material recuperado foi então novamente dissolvido em água (3 mg mL⁻¹) a fim de verificar o comportamento de auto-associação do DP7-*b*-XGO,Ac. A micrografia de MET revelou a formação de nanopartículas esféricas (Figura 21), de grande similaridade com a imagem obtida diretamente após a reação de digestão enzimática parcial (Figura 20), e com diâmetro médio em torno de 18 nm. Os resultados confirmam a influência direta da homogeneidade do bloco hidrofílico na formação de micelas com distribuição de tamanho homogênea. Além disso, podemos verificar que, no caso do co-oligômero DP7-*b*-XGO,Ac, em que a fração em peso do bloco hidrofílico é em torno de 32%, não foi possível a

obtenção de vesículas pelo método de dissolução direta em água, conforme a lei postulada por Discher e Eisenberg (2002). Esses autores afirmam que copolímeros anfifílicos em bloco com a fração em peso do bloco hidrofílico em torno de 35% são propensos a formar vesículas em solução. Diferentes morfologias podem ser obtidas, provavelmente, pelo emprego de diferentes técnicas de preparação, tal como a técnica de dissolução do co-oligômero em um solvente bom para ambos os blocos seguida da adição de um solvente seletivo para um dos blocos, com o objetivo de formar vesículas em solução.

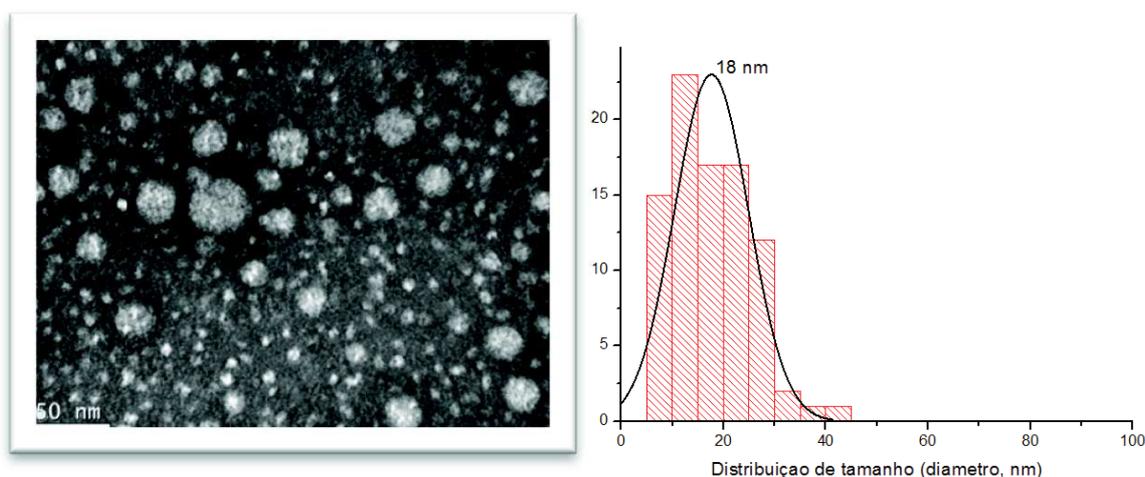


Figura 21. Micrografia de MET e distribuição média do tamanho das micelas de DP7-*b*-XGO,Ac (3 mg mL⁻¹ em água).

4.4 Nanopartículas de proteína

Sistemas coloidais preparados a partir de proteínas vegetais como gliadina e zeína são considerados nanocarreadores promissores. Graças às características de biodegradabilidade e biocompatibilidade estas proteínas são adequadas na elaboração de nanopartículas, no entanto a maioria dos peptídios e proteínas apresenta baixa estabilidade, com tendência à desnaturação e agregação (YADAV, KUMARI, & YADAV, 2011). O método mais simples e normalmente empregado para superar essas limitações é a alteração do meio em torno da proteína pelo ajuste de condições como pH ou adição de estabilizadores. Surfactantes não iônicos podem ser utilizados para proteger e estabilizar proteínas contra a agregação, tanto por ligação às proteínas, prevenindo as associações proteína-proteína, como por saturação da interface,

minimizando assim a adsorção e subsequentes alterações conformacionais (LEE, McAULEY, SCHILKE, & McGUIRE, 2011).

Neste trabalho, as propriedades de estabilização do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac e do surfactante não-iônico Pluronic-F68 foram avaliadas em suspensões de nanopartículas de gliadina e zeína. Esses estabilizantes deveriam atuar como uma barreira energética em torno das partículas, prevenindo dessa maneira, o fenômeno de agregação (TADROS, 2005). A dessolvatação foi o método empregado no preparo das nanopartículas, pela adição da solução contendo a proteína em um bom solvente (etanol:água) à fase não solvente (água) (EZPELETA, et al., 1996; ZHONG & JIN, 2009), e estabilização pela adição dos surfactantes.

O diâmetro médio das nanopartículas de gliadina, assim como o índice de polidispersão das amostras não foram significativamente ($p > 0,05$) influenciados pela utilização dos diferentes surfactantes, nem pela alteração da sua concentração em solução (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da presença do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac e do surfactante Pluronic F-68 em diferentes concentrações no diâmetro médio e na polidispersão (PDI) de nanopartículas de gliadina.

Proteína	Concentração surfactante	Diâmetro nanopartícula \pm SD	PDI \pm SD
	sem surfactante	436,8 \pm 85,5 ^a	0,68 \pm 0,04 ^a
	Pluronic F68 (0,01%)	398,4 \pm 30,2 ^a	0,48 \pm 0,05 ^a
	Pluronic F68 (0,05%)	382,9 \pm 3,8 ^a	0,52 \pm 0,05 ^a
Gliadina	Pluronic F68 (0,1%)	401,4 \pm 17,5 ^a	0,76 \pm 0,05 ^a
	XGO- <i>b</i> -XGO,Ac (0,01%)	410,4 \pm 15,7 ^a	0,55 \pm 0,19 ^a
	XGO- <i>b</i> -XGO,Ac (0,05%)	371,2 \pm 39,9 ^a	0,51 \pm 0,03 ^a
	XGO- <i>b</i> -XGO,Ac (0,1%)	306,0 \pm 22,8 ^a	0,47 \pm 0,01 ^a

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em triplicata.

** Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si com nível de 5% de significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

*** SD = desvio padrão; PDI = índice de polidispersão.

Apesar das medidas obtidas por DLS não indicarem diferença significativa entre os valores do diâmetro das nanopartículas de gliadina na presença ou ausência de surfactantes em solução, as imagens de MET revelam diferenças morfológicas importantes. A formação de nanopartículas de gliadina irregulares foi observada na ausência de

qualquer agente estabilizador, compostas por agregados de pequenas partículas (Figura 22). O alto desvio padrão dos valores de diâmetro determinado por DLS, acompanhado do elevado valor de índice de polidispersão corroboram com a imagem visualizada dos agregados protéicos em solução.

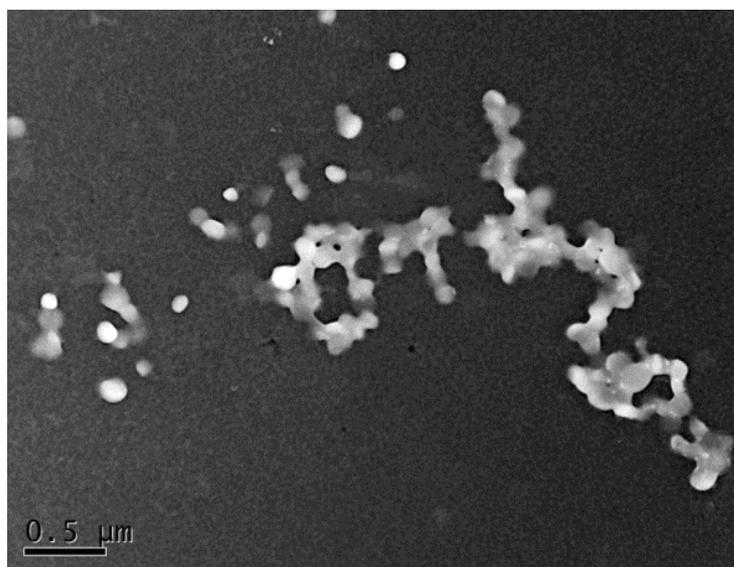


Figura 22. Micrografia de MET de nanopartículas de gliadina na ausência de surfactante.

A formação de nanopartículas esféricas sólidas, com bordas bem definidas foi observada após a utilização de XGO-*b*-XGO,Ac e Pluronic F-68 no preparo de nanopartículas de gliadina. (Figuras 23 e 24), onde o núcleo protéico hidrofóbico foi encapsulado pela coroa estabilizante do surfactante. A imagem referente à estabilização por XGO-*b*-XGO,Ac (Figura 23) indica a presença de inúmeras micelas do co-oligômero, indicando quantidade excessiva de surfactante, sugerindo que a estabilização poderia ser alcançada em menor concentração de XGO-*b*-XGO,Ac.

O recobrimento de partículas oriundas de proteínas vegetais por um dibloco constituído exclusivamente por polissacarídeos surge como uma alternativa viável no desenvolvimento de sistemas transportadores de fármacos hidrofóbicos. Trabalhos demonstram que materiais empregados na área biomédica decorados com polissacarídeos exibem normalmente uma melhora nas propriedades de absorção, permeabilidade e bioadesão, favorecendo a biocompatibilidade e os processos de reconhecimento celular (BARSETT, et al., 2005).

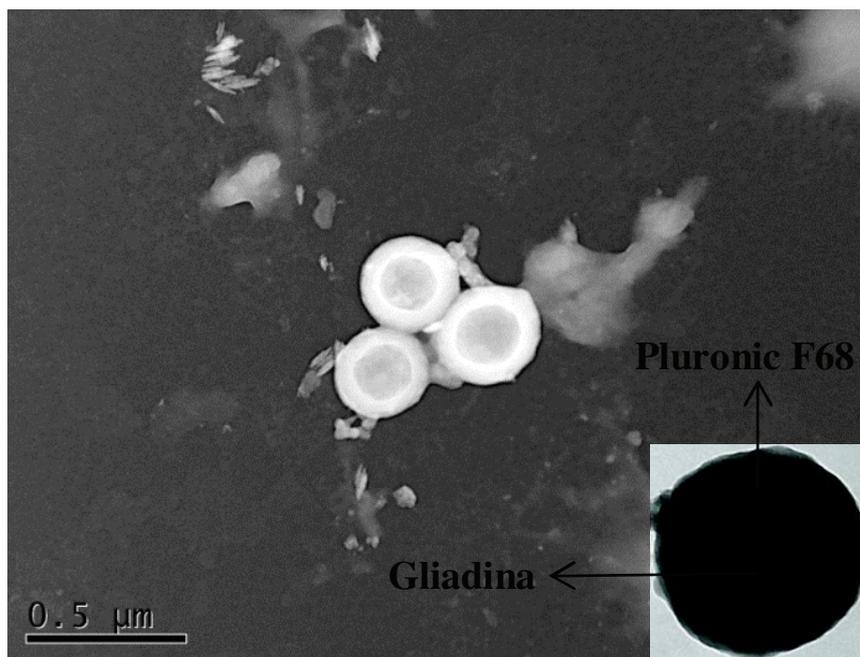


Figura 23. Micrografia de MET de nanopartículas de gliadina na presença de Pluronic F68 (0,05%).

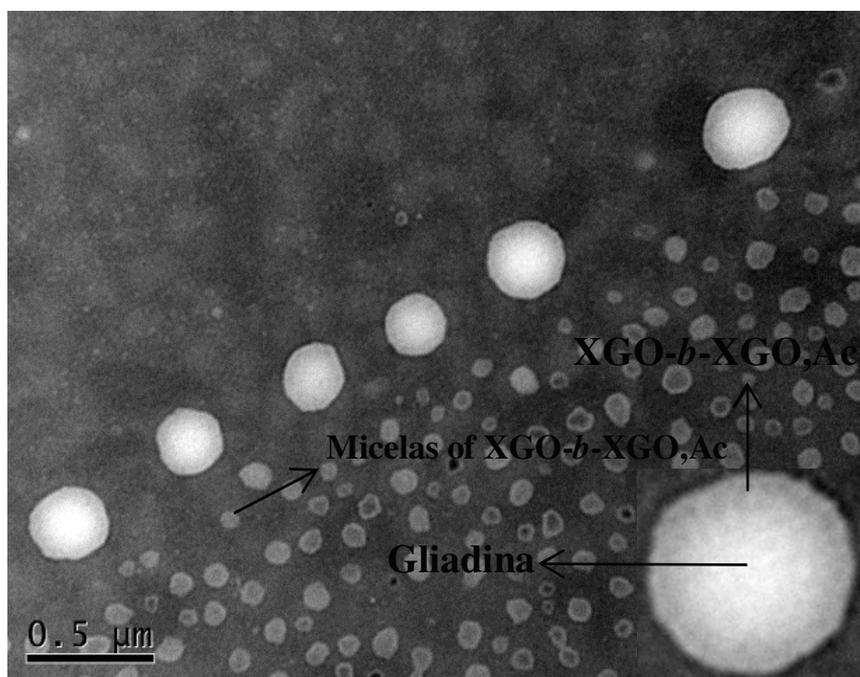


Figura 24. Micrografia de MET de nanopartículas de gliadina na presença de XGO-b-XGO,Ac (0,05%).

As imagens de MET referentes às nanopartículas elaboradas com os diferentes surfactantes revelaram o núcleo protéico de coloração clara, comparado à coroa de Pluronic F68, enquanto as partículas com a coroa formada por XGO-*b*-XGO,Ac apresentaram o núcleo protéico em coloração mais escura. Em MET, o feixe de elétrons atravessa a amostra e o espalhamento ocorre dependendo das interações físicas entre os elétrons e a amostra além das diferentes densidades eletrônicas do sistema. Levando em consideração a estrutura molecular do Pluronic F68 e do XGO-*b*-XGO,Ac (Figura 25), o primeiro apresenta maior densidade eletrônica que o segundo e, esta grande diferença, comparada à densidade eletrônica da proteína constituinte do núcleo hidrofóbico, justifica as diferenças de coloração observadas nas diferentes imagens.

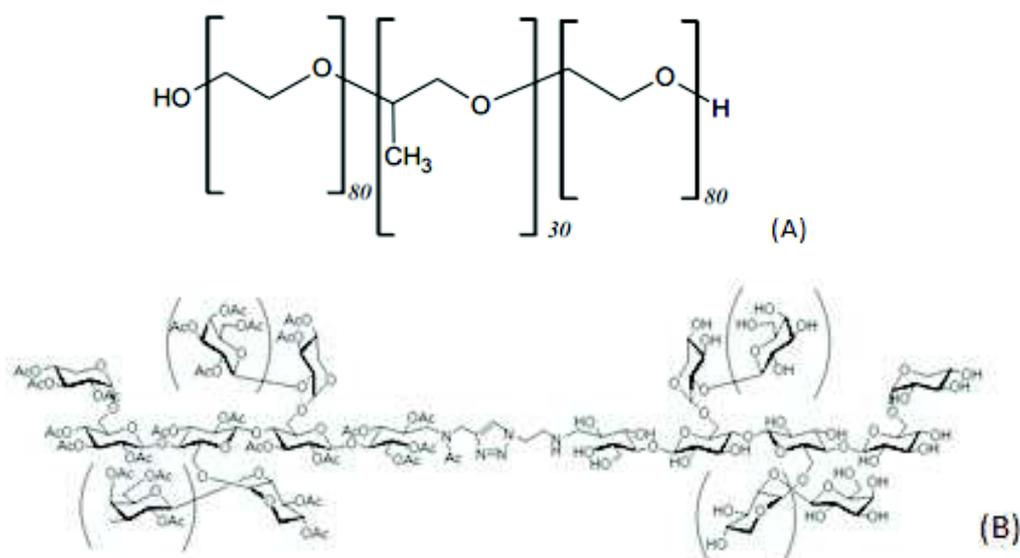


Figura 25. Estrutura química do surfactante Pluronic F68 (A) e do co-oligômero XGO-*b*-XGO,Ac (B).

Com relação às nanopartículas de zeína, influência significativa foi observada com a alteração do sistema de estabilização ($p < 0,05$) e à variação de sua concentração ($p < 0,05$) (Tabela 2). A ausência de qualquer agente de estabilização na solução de nanopartículas de zeína levou à agregação desordenada da proteína em água, resultando na formação de nanopartículas irregulares, tal como observado no caso da gliadina (Figura 26).

Tabela 2. Efeito da presença do co-oligômero XGO-b-XGO,Ac e do surfactante Pluronic F-68 em diferentes concentrações no diâmetro médio e na polidispersão (PDI) de nanopartículas de zeína.

Proteína	Concentração surfactante	Diâmetro nanopartícula \pm SD	PDI \pm SD
Zeína	sem surfactante	164,5 \pm 2,1 ^c	0,12 \pm 0,02 ^a
	Pluronic F68 (0,01%)	128,9 \pm 1,3 ^a	0,12 \pm 0,01 ^a
	Pluronic F68 (0,05%)	140,9 \pm 2,6 ^b	0,19 \pm 0,02 ^b
	Pluronic F68 (0,1%)	125,2 \pm 0,6 ^a	0,28 \pm 0,03 ^c
	XGO-b-XGO,Ac (0,01%)	200,3 \pm 1,2 ^d	0,08 \pm 0,01 ^a
	XGO-b-XGO,Ac (0,05%)	269,5 \pm 4,6 ^f	0,10 \pm 0,01 ^a
	XGO-b-XGO,Ac (0,1%)	220,6 \pm 7,5 ^e	0,14 \pm 0,04 ^{a,b}

* Os valores correspondem às médias dos valores obtidos em triplicata.

** Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si com nível de 5% de significância ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

*** SD = desvio padrão; PDI = índice de polidispersão.

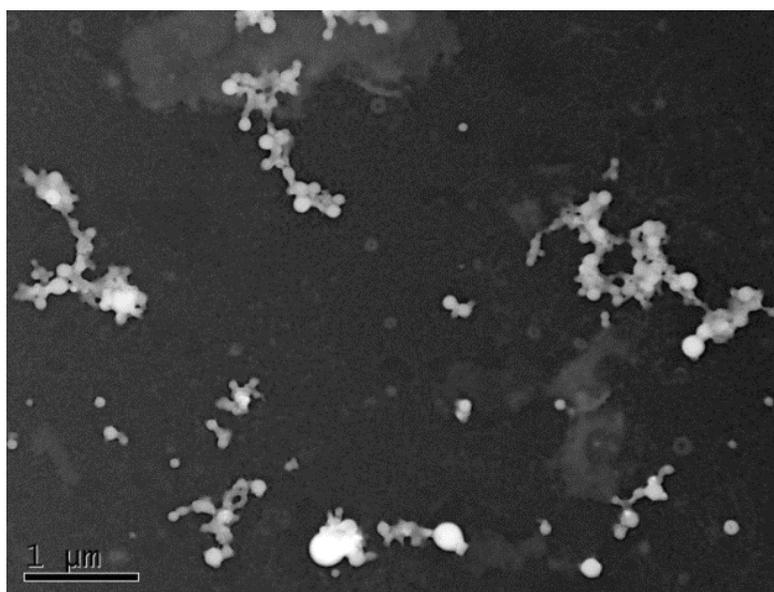


Figura 26. Micrografia de MET de nanopartículas de zeína na ausência de surfactante.

A utilização de XGO-b-XGO,Ac induziu a formação de nanopartículas de zeína com valores médios de diâmetro superiores às nanopartículas estabilizadas por Pluronic F68 (Tabela 2). Nanopartículas com morfologia esférica sólida foram observadas, independente do surfactante (Figuras 27 e 28), no entanto, efeito significativo foi observado com relação ao PDI das amostras ($p < 0,05$) (Tabela 2), onde

a utilização de XGO-*b*-XGO,Ac levou à formação de nanopartículas com menor índice de polidispersão. Nanopartículas com distribuição bimodal de tamanho foram observadas pelo emprego do Pluronic F68 como surfactante (Figura 26), enquanto uma distribuição estreita foi alcançada pela estabilização com XGO-*b*-XGO,Ac (Figura 27).

As imagens de MET corroboram com os valores de tamanho determinados por DLS (Tabela 2), sendo possível confirmar por imagens a formação de nanopartículas de zeína de tamanho superior quando elaboradas pela adição de XGO-*b*-XGO,Ac em solução comparado às nanopartículas elaboradas com Pluronic F68, mostrando a capacidade deste dibloco anfifílico em encapsular maior quantidade de proteína no interior hidrofóbico.

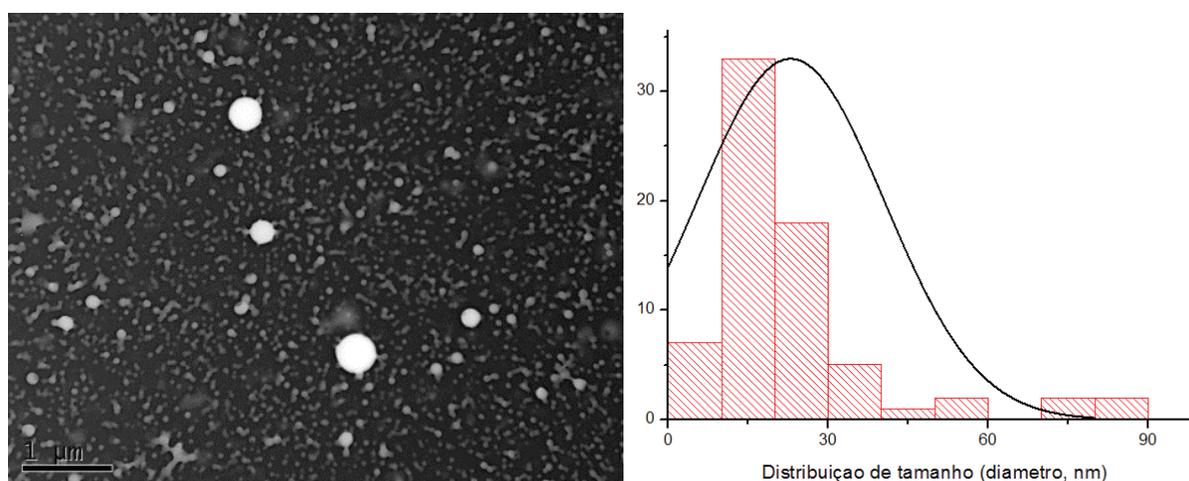


Figura 27. Micrografia de MET e distribuição de tamanho em diâmetro de nanopartículas de zeína na presença de Pluronic F68 (0,05%).

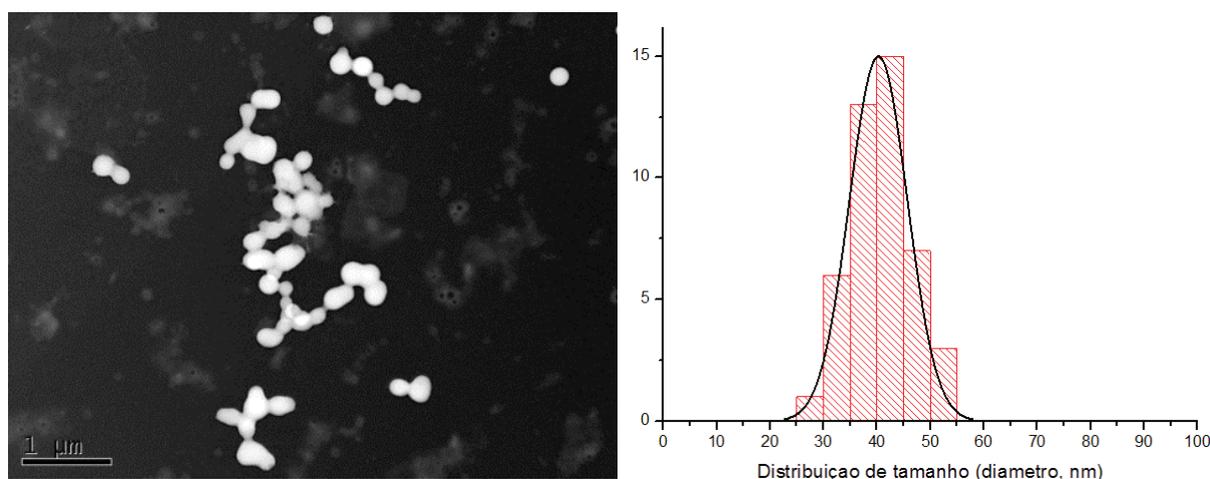


Figura 28. Micrografia de MET e distribuição de tamanho em diâmetro de nanopartículas de zeína na presença de XGO-*b*-XGO,Ac (0,05%).

Os resultados deste trabalho revelaram um melhor desempenho do XGO-*b*-XGO,Ac comparado ao Pluronic F68 na formação de nanopartículas de zeína, com distribuição de tamanho homogênea. No que diz respeito à gliadina, esta influência não foi observada, apresentando o mesmo comportamento comparado ao Pluronic F68. Esta diferença entre os dois tipos de nanopartículas pode ser devido ao tamanho molecular das proteínas nativas. Enquanto a zeína é uma mistura de proteínas que variam em tamanho molecular na faixa de 17-27 kDa (MEJIA, MAUER, & HAMAKER, 2007), a gliadina varia na faixa de 30-74 kDa (GUILBERT, GONTARD, MOREL, CHALIER, MICARD, & REDL, Formation and properties of wheat gluten films and coatings, 2002). Durante a formação das nanopartículas de gliadina, o comportamento de precipitação da proteína em água torna-se mais difícil de controlar devido à ampla faixa de tamanho molecular, exigindo provavelmente, outro tipo de agente de estabilização para o controle da polidispersão do sistema.

Capítulo 5 – Conclusão

5 Conclusão

Este trabalho reportou a síntese de novos copolímeros anfifílicos em bloco constituídos exclusivamente por blocos sacarídicos, obtidos a partir de xiloglucana de sementes de tamarindo. Em água, a auto-associação destes diblocos levou à formação de micelas esféricas com tamanho médio de 22 (XGO-*b*-XGO,Ac) e 6 (DP7-*b*-DP7,Ac) nm.

A partir desses resultados foi possível observar a importante influência do tamanho e da ramificação estrutural dos blocos no processo de auto-associação em água, uma vez que, uma leve redução na massa molar do co-oligômero conferiu um aumento em torno de 5 vezes no valor da CMC e uma diminuição em torno de 70% no tamanho médio micelar. A combinação de fatores como diminuição da massa molar do co-oligômero, aumento da interação hidrofóbica e diminuição do grau de hidratação da coroa hidrofílica pode explicar a intensa diminuição no tamanho médio das micelas.

O efeito da eliminação dos resíduos de galactose do bloco hidrofílico pela enzima β -galactosidase destaca a influência da hidratação da coroa hidrofílica no tamanho da micela. A eliminação de duas unidades de galactose não acetiladas levou à formação de micelas esféricas de tamanho 50% inferior, além de diminuir a polidispersão do sistema, indicando a forte influência da organização estrutural em decorrência da hidratação dos oligossacarídeos na formação micelar.

O dibloco XGO-*b*-XGO,Ac apresentou habilidade em revestir proteínas, tais como gliadina e zeína, formando nanopartículas estáveis em comparação ao surfactante não iônico comercial Pluronic F68. O complexo formado pela proteína/co-oligômero anfifílico em bloco, levando à formação das nanopartículas do tipo núcleo/casca foi claramente identificado, em que o co-oligômero constitui o invólucro de proteção do núcleo interno constituído de proteína. Tais sistemas obtidos exclusivamente a partir de fontes naturais, como proteínas vegetais e um co-oligômero sintetizado a partir de xiloglucana, poderiam constituir um sistema biocompatível e biodegradável com perspectivas interessantes em aplicações como sistemas de liberação controlada de fármacos.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

6 Referências Bibliográficas

- ABBENANTE, G., LE, G. T., & FAIRLIE, D. P. (2007). Unexpected photolytic decomposition of alkyl azides under mild conditions. *Chemical Communications*(43), pp. 4501-4503.
- ALLEN, C., MAYSINGER, D., & EISENBERG, A. (1999). Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 16, pp. 3-27.
- APODACA, R., & XIAO, W. (2001). Direct reductive amination of aldehydes and ketones using phenylsilane: Catalysis by dibutyltin dichloride. *Organic Letters*, 3, pp. 1745-1748.
- ARANGO, M. A., PONCHEL, G., ORECCHIONI, A. M., RENEDO, M. J., DUCHÊNE, D., & IRACHE, J. M. (2000). Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, pp. 333-341.
- ARGOS, P., PEDERSEN, K., MARKS, M. D., & LARKINS, B. A. (1982). A structural model for maize zein proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 257, pp. 9984-9990.
- ASTAFIEVA, I., ZHONG, X. F., & EISENBERG, A. (1993). Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules*, 26, pp. 7339-7352.
- ATKINS, P. W., & de PAULA, J. (2007). *Físico-Química*. Rio de Janeiro: LTC.
- BARROS, F. F., de QUADROS, C. P., JUNIOR, M. R., & PASTORE, G. M. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, 30, pp. 409-414.
- BARSETT, H., EBRINGEROVÁ, A., HARDING, S. E., HEINZE, T., HROMÁDKOVÁ, Z., MUZZARELLI, C., et al. (2005). *Polysaccharides I: Structure, Characterisation and Use*.
- BEATTY, K. E., XIE, F., WANG, Q., & TIRRELL, D. A. (2005). Selective dye-labeling of newly synthesized proteins in bacterial cells. *Journal of the American Chemical Society*, 127, pp. 14150-14151.

- BONNÉ, T., LÜDTKE, K., JORDAN, R., & PAPADAKIS, C. (2007). Effect of polymer architecture of amphiphilic poly(2-oxazoline) copolymers on the aggregation and aggregate structure. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 208, pp. 1402-1408.
- BORSALI, R., MINATTI, E., PUTAUX, J.-L., SCHAPPACHER, M., DEFFIEUX, A., VIVILLE, P., et al. (2003). From “Sunflower-like” assemblies toward giant wormlike micelles. *Langmuir*, 19, pp. 6-9.
- BOUWMEESTER, H., DEKKERS, S., NOORDAM, M., HAGENS, W., BULDER, A., de HEER, C., et al. (2009). Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53, pp. 52–62.
- BURGALASSI, S., CHETONI, P., PANICHI, L., BOLDRINI, E., & SAETTONI, M. F. (2000). Xyloglucan as a novel vehicle for timolol: pharmacokinetics and pressure lowering activity in rabbits. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 16, pp. 497-509.
- CAO, Y., GU, Y., MA, H., BAI, J., LIU, L., ZHAO, P., et al. (2010). Self-assembled nanoparticle drug delivery systems from galactosylated polysaccharide-doxorubicin conjugate loaded doxorubicin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, pp. 245-249.
- CARLSEN, A., & LECOMMANDOUX, S. (2009). Self-assembly of polypeptide-based block copolymer amphiphiles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14, pp. 329-339.
- CARPITA, N. C., & GIBEAUT, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3, pp. 1-30.
- CARPITA, N., & McCANN, M. (2000). The cell wall. *American Society of Plant Physiologists*, pp. 52-108.
- CHEFTEL, J. C., CUQ, J. L., & LORIENT, D. (1989). *Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Modificaciones químicas*. Zaragoza: Acribia, S. A.
- CHEN, H., WANG, L., YEH, J., WU, X., CAO, Z., WANG, Y. A., et al. (2010). Reducing non-specific binding and uptake of

- nanoparticles and improving cell targeting with an antifouling PEO-b-PyMPS copolymer coating. *Biomaterials*, 31, pp. 5397-5407.
- CHENG, L., & CAO, D. (2009). Effect of tail architecture on self-assembly of amphiphiles for polymeric micelles. *Langmuir*, 25, pp. 2749-2756.
- COVIELLO, T., MATRICARDI, P., MARIANECCI, C., & ALHAIQUE, F. (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*, 119, pp. 5-24.
- CUNHA, R. B., CASTRO, M. S., & FONTES, W. (Janeiro/Junho de 2006). Espectrometria de massas. O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*(36), pp. 40-46.
- DALPATHADO, D. S., JIANG, H., KATER, M. A., & DESAIRE, H. (2005). Reductive amination of carbohydrates using NaBH(OAc)₃. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, pp. 1130-1137.
- DARLING, S. (2007). Directing the self-assembly of block copolymers. *Progress in Polymer Science*, 32, pp. 1152–1204.
- de OLIVEIRA, J. M., & MEI, L. H. (2009). Surfactantes reativos não-iônicos em polimerização em emulsão de látices de acetato de vinila - vinil neodecanoato: influência nas propriedades de barreira à água. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19, pp. 22-30.
- DICKINSON, E. (1997). Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments. *Journal of Dairy Science*, 80, pp. 2607-2619.
- DISCHER, D. E., & EISENBERG, A. (2002). Polymer vesicles. *Science*, 967, pp. 967-973.
- DONG, J., SUN, Q. S., & WANG, J. Y. (2004). Basic study of corn protein, zein, as a biomaterial in tissue engineering, surface morphology and biocompatibility. *Biomaterials*, 25, pp. 4691-4697.
- DUCLAIROIR, C., NAKACHE, E., & MARCHAIS, H. O.-M. (1998). Formation of gliadin nanoparticles: Influence of the solubility parameter. *Colloid and Polymer Science*, 276, pp. 321-327.

- DUCLAIROIR, C., ORECCHIONI, A. M., DEPRAETERE, P., OSTERSTOCK, F., & NAKACHIE, E. (2003). Evaluation of gliadins nanoparticles as drug delivery systems: a study of three different drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 253, pp. 133-144.
- DUCLAIROIR, C., ORECCHIONI, A.-M., DEPRAETERE, P., & NAKACHE, E. (2002). Alpha-tocopherol encapsulation and in vitro release from wheat gliadin nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, 19, pp. 53-60.
- EMEMURA, M., & YUGUCHI, Y. (2009). Solvation of xyloglucan in water/alcohol systems by molecular dynamics simulation. *Cellulose*, 16, pp. 361-371.
- EZPELETA, I., IRACHE, J. M., STAINMESSE, S., CHABENAT, C., GUEGUEN, J., POPINEAU, Y., et al. (1996). Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 131, pp. 191-200.
- FANG, Z., & BHANDARI, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, pp. 510-523.
- FOURNIER, D., HOOGENBOOM, R., & SCHUBERT, U. S. (2007). Clicking polymers: a straightforward approach to novel macromolecular architectures. *Chemical Society Reviews*, 36, pp. 1369-1380.
- FRY, S. C., YORK, W. S., P., A., DARVILL, A., HAYASHI, T., JOSELEAU, J. P., et al. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derival oligosaccharides. *Journal of Plant Physiology*, 89, pp. 1-3.
- GAO, Z., & EISENBERG, A. (1993). Model of micellization for block copolymers in solutions. *Macromolecules*, 26, pp. 7353-7360.
- GIACOMELLI, C., SCHMIDT, V., AISSOU, K., & BORSALI, R. (2010). Block copolymer systems: from single chain to self-assembled nanostructures. *Langmuir*, 26, pp. 15734-15744.

- GOMEZ, S., PETERS, J. A., & MASCHMEYER, T. (2002). The reductive amination of aldehydes and ketones and the hydrogenation of nitriles: mechanistic aspects and selectivity control. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 344, pp. 1037-1057.
- GRAF, R., MINAMITAKE, Y., PERACCHIA, T. M., TRUBETSKOY, V., TORCHILIN, V., & LANGER, R. (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, 263, pp. 1600-1603.
- GREFFE, L., BESSUEILLE, L., BULONE, V., & BRUMER, H. (2005). Synthesis, preliminary characterization and application of novel surfactants from highly branched xyloglucan oligosaccharides. *Glycobiology*, 15, pp. 437-445.
- GUILBERT, S., GONTARD, N., MOREL, M. H., CHALIER, P., MICARD, V., & REDL, A. (2002). Formation and properties of wheat gluten films and coatings. In: *Protein-Based films and coatings*. Florida: Corporate Blvd, Boca Raton.
- GULFAM, M., KIM, J., LEE, J. M., KU, B., & CHUNG, B. H. (2012). Anticancer drug-loaded gliadin nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells. *Langmuir*, 28, p. 8216–8223.
- GUPTA, R. B. (2006). Fundamentals of Drug Nanoparticles. In: *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*. New York: Taylor and Francis Group.
- GUPTA, S. S., KUZELKA, J., SINGH, P., LEWIS, W. G., MANCHESTER, M., & FINN, M. G. (2005). Accelerated bioorthogonal conjugation: a practical method for the ligation of diverse functional molecules to a polyvalent virus scaffold. *Bioconjugate Chemistry*, 16, pp. 1572-1579.
- HADDLETON, D. M., & OHNO, K. (2000). Well-defined oligosaccharide-terminated polymers from living radical polymerization. *Biomacromolecules*, 1, pp. 152-156.
- HALILA, S., MANGUIAN, M., FORT, S., COTTAZ, S., HAMAIDE, T., FLEURY, E., et al. (2008). Syntheses of well-defined glycopolyorganosiloxanes by <<click>> chemistry and their surfactant properties. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 209, pp. 1282-1290.

- HARVEY, D. J. (2000). Electrospray mass spectroscopy and fragmentation of N-linked carbohydrates derivatized at the reducing terminus. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 11, pp. 900-915.
- HAYASHI, T. (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, pp. 139-168.
- HERNANDEZ, O. S., SOLIMAN, G. M., & WINNIK, F. M. (2007). Synthesis, reactivity, and pH-responsive assembly of new double hydrophilic block copolymer of carboxymethyl dextran and poly(ethylene glycol). *Polymer*, 48, pp. 921-930.
- HOUGA, C., GIERMANSKA, J., LECOMMANDOUX, S., BORSALI, R., TATON, D., GNANOU, Y., et al. (2009). Micelles and polymersomes obtained by self-assembly of dextran and polystyrene based block copolymers. *Biomacromolecules*, 10, pp. 32-40.
- HUISGEN, R., SZEIMIES, G., & MOEBIUS, L. (1967). 1,3-Dipolar cycloadditions. XXXII. Kinetics of the addition of organic azides to carbon-carbon multiple bonds. *Chemische Berichte*, 100, pp. 2494-2507.
- ISHIHARA, T., TAKAHASHI, M., HIGAKI, M., MIZUSHIMA, Y., & MIZUSHIMA, T. (2010). Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, pp. 170-175.
- JAHANSHAHI, M., & BABAEI, Z. (2008). Protein nanoparticle: a unique system as drug delivery vehicles. *African Journal of Biotechnology*, 7, pp. 4926-4934.
- JIE, P., VENKATRAMAN, S., MIN, F., FREDDY, B., & HUAT, G. (2005). Micelle-like nanoparticles of star-branched PEO-PLA copolymers as chemotherapeutic carrier. *Journal of Controlled Release*, 110, pp. 20-33.
- JONES, M., & LEROUX, J. (1999). Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 48, pp. 101-111.

- KAKUCHI, T., NARUMI, A., MIURA, Y., MATSUYA, S., SUGIMOTO, N., SATOH, T., et al. (2003). Glycoconjugated polymer.4. Synthesis and aggregation property of well-defined end-functionalized polystyrene with beta-cyclodextrin. *Macromolecules*, 36, pp. 3909-3913.
- KALYANASUNDARAM, K., & THOMAS, J. K. (1977). Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *Journal of the American Chemical Society*, 99, pp. 2039-2044.
- KANGASMETSA, J. J., & JOHNSON, T. (2005). Microwav-accelerated methodology for the direct reductive amination of aldehydes. *Organic Letters*, 7, pp. 5653-5655.
- KATAOKA, K., HARADA, A., & NAGASAKI, Y. (2001). Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, pp. 113-131.
- KIDA, T., KAJIHARA, K., ISOGAWA, K., ZHANG, W., NAKATSUJI, Y., IKEDA, I., et al. (2004). Sugar-amide surfactant micelles as effective reaction fields for enantioselective hydrolysis of alpha-amino acid esters. *Langmuir*, 20, pp. 8504-8509.
- KOLB, H. C., FINN, M. g., & SHARPLESS, K. B. (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, pp. 2004-2021.
- KWON, G. S., NAITO, M., YOKOYAMA, M., OKANO, T., SAKURAI, Y., & KATAOJA, K. (1993). Micelles based on AB block copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(.beta,-benzyl L-aspartate). *Langmuir*, 9, pp. 945-949.
- KWON, H. Y., LEE, S. W., JANG, Y., & KIM, J. H. (2001). Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 182, pp. 123-130.
- LEE, H. J., McAULEY, A., SCHILKE, K. F., & McGUIRE, J. (2011). Molecular origins of surfactant-mediated stabilization of

- protein drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, pp. 1160-1171.
- LI, B.-G., & ZHANG, L.-M. (2008). Synthesis and characterization of novel amphiphilic block copolymers based on maltoheptaose and poly(ϵ -caprolactone). *Carbohydrate Polymers*, 74, pp. 390-395.
- LINK, A. J., & TIRRELL, D. A. (2003). Cell surface labeling of *Escherichia coli* via copper(I)-catalyzed [3 + 2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 125, pp. 11164-11165.
- LIU, J.-Y., & ZHANG, L.-M. (2007). Preparation of a polysaccharide-polyester diblock copolymer and its micellar characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 69, pp. 196-201.
- LIU, T., ZHOU, Z., WU, C., NACE, V., & CHU, B. (1997). Effects of block lengths on the association numbers and micellar sizes of BnEmBn type triblock copolymer micelles in aqueous solution. *Macromolecules*, 30, pp. 7624-7626.
- LIU, X., SUN, Q., WANG, H., ZHANG, L., & WANG, J. (2005). Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. *Biomaterials*, 26, pp. 109-115.
- LOOS, K., & MÜLLER, A. H. (2002). New routes to the synthesis of amylose-block polystyrene rod-coil block copolymers. *Biomacromolecules*, 3, pp. 368-373.
- LOOS, K., & STADLER, R. (1997). Synthesis of amylose-block-polystyrene rod-coil block copolymers. *Macromolecules*, 30, pp. 7641-7643.
- LUBAMBO, A. F., LUCYSZYN, N., PETZHOLD, C. L., de CAMARGO, P. C., SIERAKOWSKI, M. R., SCHREINER, W. H., et al. (2011). Self-assembled polystyrene/xyloglucan nanospheres from spin coating evaporation mixtures. *Carbohydrate Polymers*, 84, pp. 126-132.
- LUBAMBO, F., A., LUCYSZYN, N., PETZHOLD, C. L., de CAMARGO, P. C., SIERAKOWSKI, M. R., et al. (2011). Self-assembled polystyrene/xyloglucan nanospheres from spin coating evaporation mixtures. *Carbohydrate Polymers*, 84, pp. 126-132.

- MARUYAMA, A., ISHIHARA, T., KIM, J.-S., KIM, S. W., & AKAIKE, T. (1997). Nanoparticle DNA carrier with poly(L-lysine) grafted polysaccharide copolymer and poly(D,L-lactic acid). *Bioconjugate Chemistry*, 8, pp. 735-742.
- MASTROMATTEO, M., BARBUZZI, G., CONTE, A., & DEL NOBILE, M. A. (2009). Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, pp. 222-227.
- MATSUSHIMA, N., DANNO, G., TAKEZAWA, H., & IZUMI, Y. (1997). Three-dimensional structure of maize alpha-zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1339, pp. 14-22.
- McKINNEY, L. L. (1958). Zein. In: G. L. CLARK, *The Encyclopedia of Chemistry* (pp. 319-320). New York: Reinhold.
- McNEIL, M., DARVILL, A. G., & FRY, S. C. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53, pp. 625-663.
- MEJIA, C. D., MAUER, L. J., & HAMAKER, B. R. (2007). Similarities and differences in secondary structure of viscoelastic polymers of maize alpha-zein and wheat gluten proteins. *45*, pp. 353-359.
- MIYAZAKI, S., SUZUKI, S., KAWASAKI, N., ENDO, K., TAKAHASHI, A., & ATTWOOD, D. (2001). In situ gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics*, 229, pp. 29-36.
- MODOLON, S. M., OTSUKA, I., FORT, S., MINATTI, E., BORSALI, R., & HALILA, S. (2012). Sweet block copolymer nanoparticles: preparation and self-assembly of fully oligosaccharide-based amphiphile. *Biomacromolecules*, 13, pp. 1129-1135.
- MYERS, D. (1999). *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications*. New York: John Wiley and Sons.
- NADIVADA, H., JIANG, X., & LAHANN, J. (2007). Click Chemistry: versatility and control in the hands of materials scientists. *Advanced Materials*, 19, pp. 2197-2208.

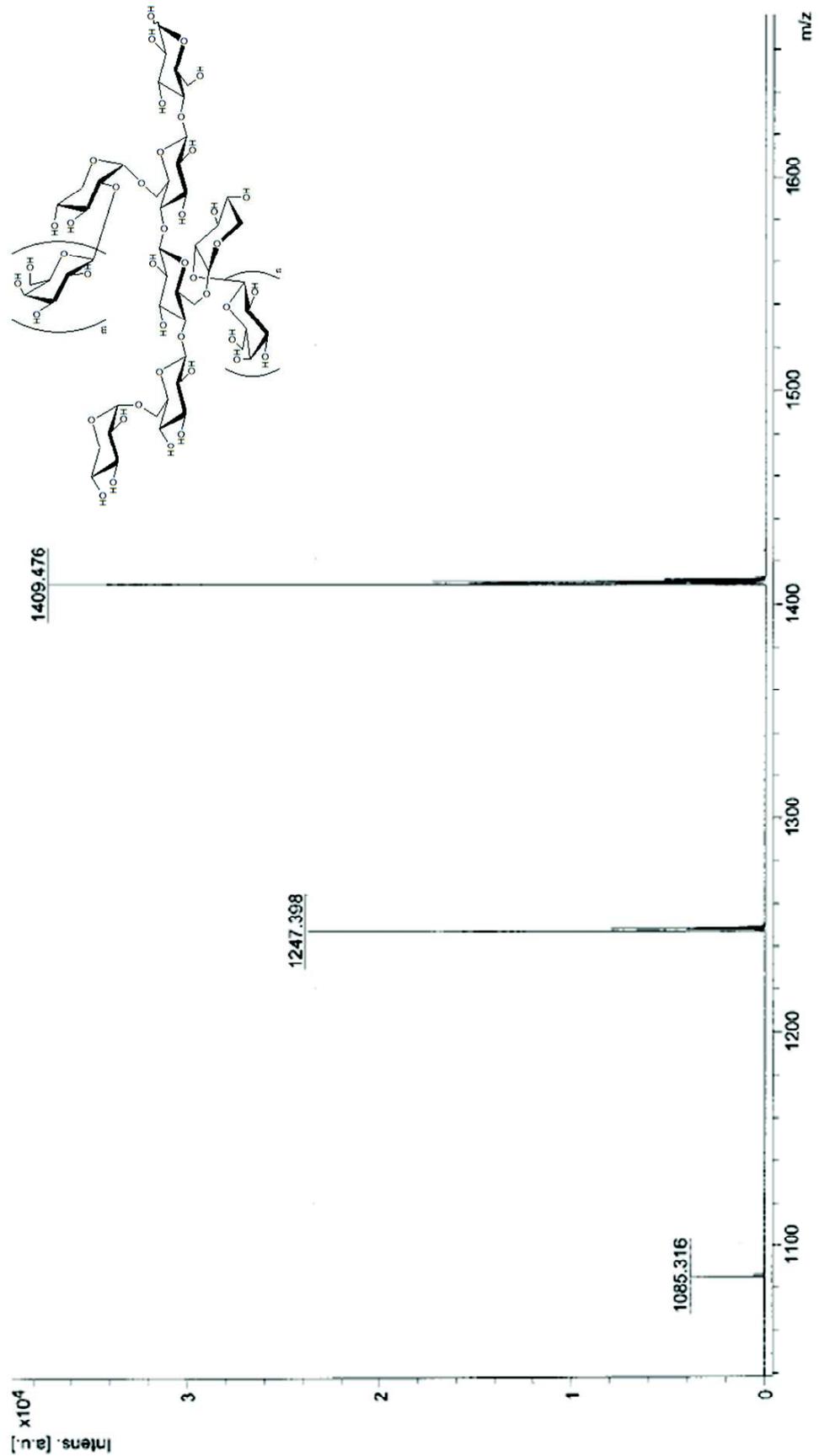
- NAFEE, N., TAETZ, S., SCHNEIDER, M., SCHAEFER, U. F., & LEHR, C. M. (2007). Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine: nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3, pp. 173-183.
- NAPPER, D. H. (1977). Steric stabilization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 58, pp. 390-407.
- NICHTL, A., BUCHNER, J., JAENICKE, R., RUDOLPH, R., & SCHEIBEL, T. (1998). Folding and association of beta-galactosidase. *Journal of Molecular Biology*, 282, pp. 1083-1091.
- NITSCHKE, M., & PASTORE, G. M. (2002). Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25, pp. 772-776.
- NOWICKI, J., SOKOLOWSKI, A., & REKSA, D. (2011). Synthesis and surface active properties of novel carbohydrate-based cationic surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 14, pp. 179-184.
- O'NEILL, M. A., & YORK, W. S. (2003). The composition and structure of plant primary cell walls. In: *The plant cell wall. Annual Plant Review* (Vol. 8, pp. 1-54). JKC Rose Press.
- OTSUKA, I., FUCHISE, K., HALILA, S., FORT, S., AISSOU, K., PIGNOT-PAINTRAND, I., et al. (2010). Thermoresponsive vesicular morphologies obtained by self-assemblies of hybrid oligosaccharide-block-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer systems. *Langmuir*, 26, pp. 2325-2332.
- OTSUKA, I., TRAVELET, C., HALILA, S., FORT, S., PIGNOT-PAINTRAND, I., NARUMI, A., et al. (2012). Thermoresponsive self-assemblies of cyclic and branched oligosaccharide-block-poly(N-isopropylacrylamide) diblock copolymers into nanoparticles. *Biomacromolecules*, 13, pp. 1458-1465.
- PAANANEN, A., TAPPURA, K., TATHAM, A. S., FIDO, R., SHEWRY, P. R., MILES, M., et al. (2006). Nanomechanical force measurements of gliadin protein interactions. *Biopolymers*, 83, pp. 658-667.

- PARK, C., YOON, J., & THOMAS, E. (2003). Enabling nanotechnology with self-assembled block copolymer patterns. *Polymer*, *44*, pp. 6725-6760.
- PARRIS, N., COOKE, P. H., & HICKS, K. B. (2005). Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *53*, pp. 4788-4792.
- PATEL, A. R., BOUWENS, E. C., & VELIKOV, K. P. (2010). Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *58*, pp. 12497-12503.
- PEDERSEN, K., DEVEREUX, J., WILSON, D. R., SHELDON, E., & LARKINS, B. A. (1982). Cloning and sequence analysis reveal structural variation among related zein genes in maize. *Cell*, *29*, pp. 1015-1026.
- POMES, A. F. (1971). Zein. In: H. MARK, *Encyclopedia of Polymer Science* (pp. 125-132). New York: Wiley.
- PRICE, C. (1983). Micelle formation by block copolymers in organic solvents. *Pure and Applied Chemistry*, *55*, pp. 1563-1572.
- QIAN, F., CUI, F., DING, J., TANG, C., & YIN, C. (2006). Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: preparation and characterization. *Biomacromolecules*, *7*, pp. 2722-2727.
- QINGCHUN, L., PENG, Z., & YONGMING, C. (2007). Divergent synthesis of dendrimer-like macromolecules through a combination of atom transfer radical polymerization and click reaction. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, *45*, pp. 3330-3341.
- RAHIMNEJAD, M., MOKHTARIAN, N., & GHASEMI, M. (2009). Production of protein nanoparticles for food and drug delivery system. *African Journal of Biotechnology*, *8*, pp. 4738-4743.
- RAY, G. B., CHAKRABORTY, I., & MOULIK, S. P. (2006). Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. *Journal of Colloid and Interface Science*, *294*, pp. 248-254.
- ROSEN, M. J. (2004). *Surfactants and Interfacial Phenomena*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.

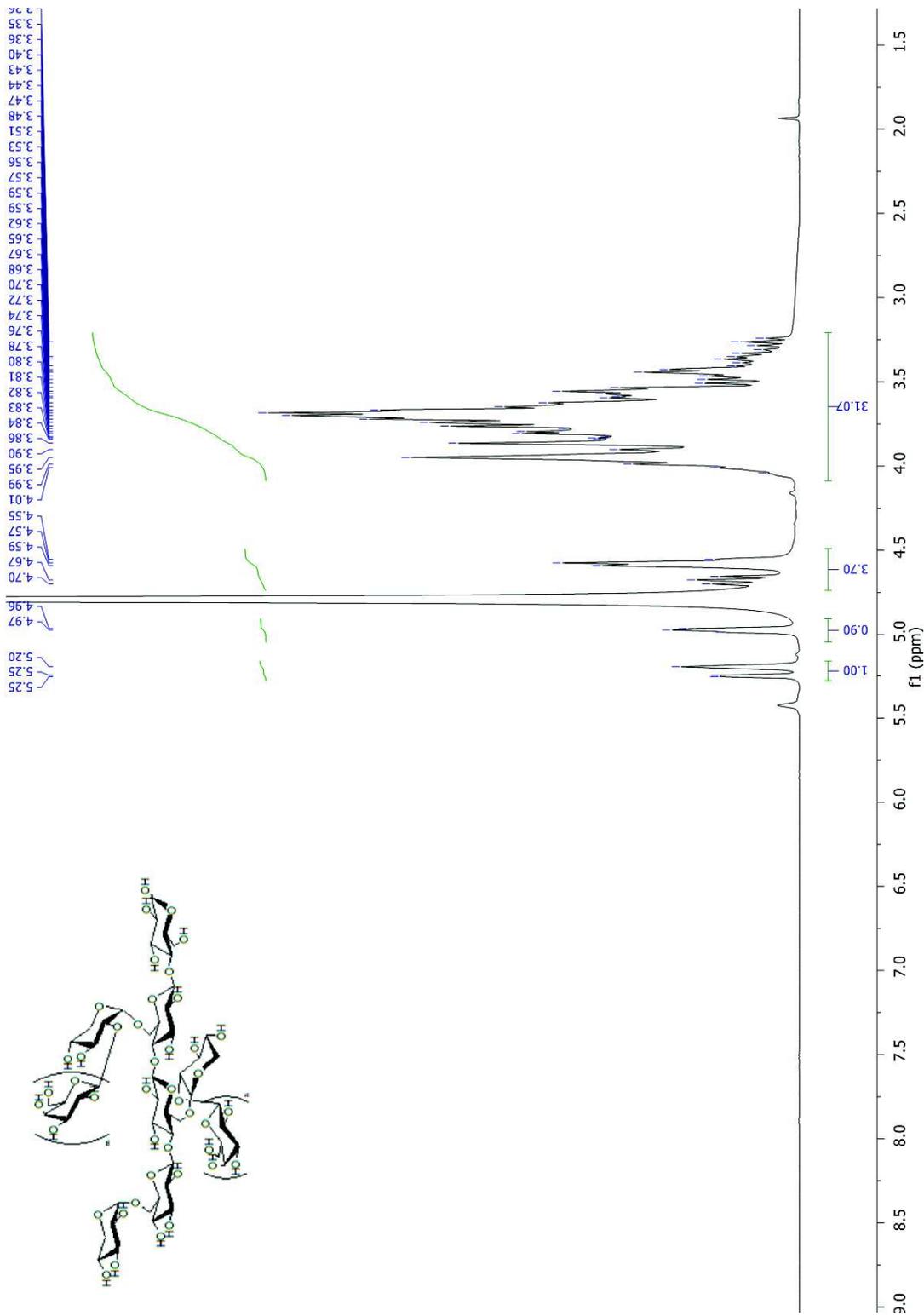
- ROSTOVTSEV, V. V., GREEN, L. G., FOKIN, V. V., & SHARPLESS, K. B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, *41*, pp. 2596-2599.
- SAKAI, T., KUROSAWA, H., OKADA, T., & MISHIMA, S. (2011). Vesicle formation in mixture of a PEO-PPO-PEO block copolymer (Pluronic P123) and a nonionic surfactant (Span 65) in water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *389*, pp. 82-89.
- SASATSU, M., ONISHI, H., & MACHIDA, Y. (2005). Preparation of a PLA-PEG block copolymer using a PLA derivative with a formyl terminal group and its application to nanoparticulate formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, *294*, pp. 233-245.
- SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L., & POHLMANN, A. R. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Química Nova*, *26*, pp. 726-737.
- SCHATZ, C., & LECOMMANDOUX, S. (2010). Polysaccharide-containing block copolymers: synthesis, properties and applications of an emerging family of glycoconjugates. *31*, pp. 1664-1684.
- SHUKLA, R., & CHERYAN, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, *13*, pp. 171-192.
- SOZER, N., & KOKINI, J. (2009). Nanotechnology and its application in the food sector. *Trends in Biotechnology*, *27*(2), pp. 82-89.
- STEFANI, M., COUDANE, J., & VERT, M. (2006). In vitro ageing and degradation of PEG-PLA diblock copolymer-based nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability*, *91*, pp. 2554-2559.
- SUIHA, F., KAWASAKI, N., MIYAZAKI, S., SHIRAKAWA, M., YAMATOYA, K., SASAKI, M., et al. (1998). Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mitomycin C. *International Journal of Pharmaceutics*, *172*, pp. 27-32.

- TADROS, T. F. (2005). *Applied Surfactants: Principles and Applications*. Wokingham: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- TAKAHASHI, A., SUZUKI, S., KAWASAKI, N., KUBO, W., MIYAZAKI, S., LOEBENBERG, R., et al. (2002). Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from in situ gelling xyloglucan formulations in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 246, pp. 179-186.
- TEGLIA, A., & SECCHI, G. (1994). New protein ingredients for skin detergency: relative wheat protein-surfactant complexes. *International Journal of Cosmetic Science*, 16, pp. 235-246.
- THOMPSON, G. A., & LARKINS, B. A. (1989). Structural elements regulating zein gene expression. *BioEssays*, 10, pp. 108-113.
- THOMSON, N. H., MILES, M. J., POPINEAU, Y., HARRIES, J., SHEWRY, P., & TATHAM, A. S. (1999). Small angle X-ray scattering of wheat seed-storages proteins: alpha-, gama, omega-gliadins and the high molecular weight (HMW) subunits of glutenin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1430, pp. 359-366.
- TORNOE, C. W., CHRISTENSEN, C., & MELDAL, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 67, pp. 3057-3064.
- TORRES-GINER, S., GIMENEZ, E., & LAGARON, J. M. (2008). Characterization of the morphology and thermal properties of zein prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 22, pp. 601-614.
- VOROV, O., LIVESAY, D., & JACOBS, D. (2008). Conformational entropy of an ideal cross-linking polymer chain. *Entropy*, 10, pp. 285-308.
- WANG, H. J., GONG, S. J., LIN, Z. X., FU, J. X., XUE, S. T., HUANG, J. C., et al. (2007). In vivo biocompatibility and mechanical properties of porous zein scaffolds. *Biomaterials*, 20, pp. 3952-3964.
- WANG, H. J., LIN, Z. X., LIU, X. M., SHENG, S. Y., & WANG, J. Y. (2005). Heparin-loaded zein microsphere film and

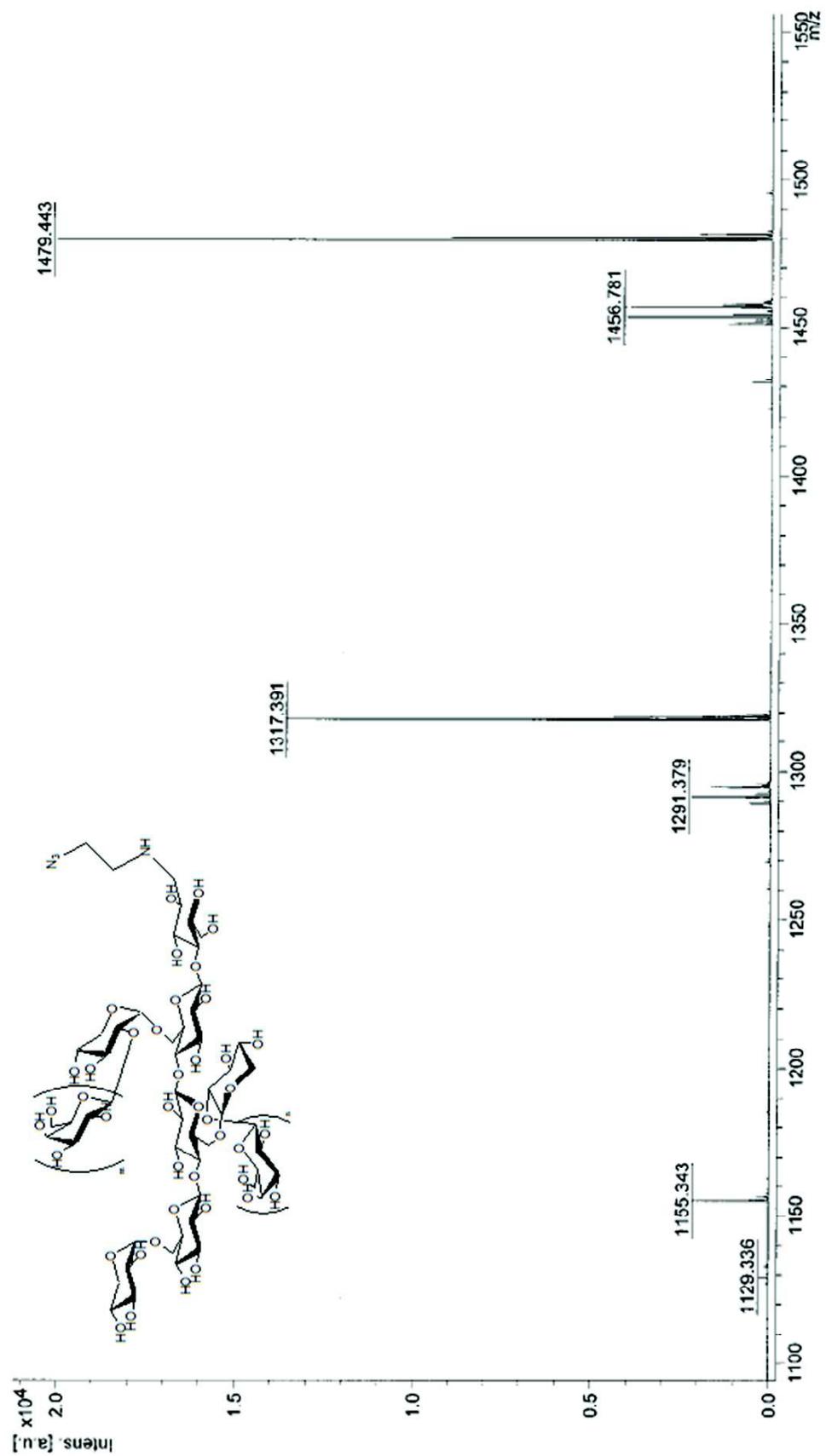
- hemocompatibility. *Journal of Controlled Release*, 105, pp. 120-131.
- XU, S., HELD, I., KEMPF, B., MAYR, H., STEGLICH, W., & ZIPSE, H. (2005). The DMAP-catalyzed acetylation of alcohols - a mechanistic study (DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridine). *Chemistry - A European Journal*, 11, pp. 4751-4757.
- YADAV, S. C., KUMARI, A., & YADAV, R. (2011). Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides*, 32, pp. 173-187.
- ZHANG, R., ZHANG, L., & SOMASUNDARAN, P. J. (2004). Study of mixtures of n-dodecyl-beta-D-maltoside with anionic, cationic, and nonionic surfactant in aqueous solutions using surface tension and fluorescence techniques. *Journal of Colloid and Interface Science*, 278, pp. 453-460.
- ZHONG, Q., & JIN, M. (2009). Nanoscalar structures of spray-dried zein microcapsules and in vitro release kinetics of the encapsulated lysozyme as affected by formulations. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, pp. 3886-3894.
- ZHONG, Q., & JIN, M. (2009). Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion. *Food Hydrocolloids*, 23, pp. 2380-2387.



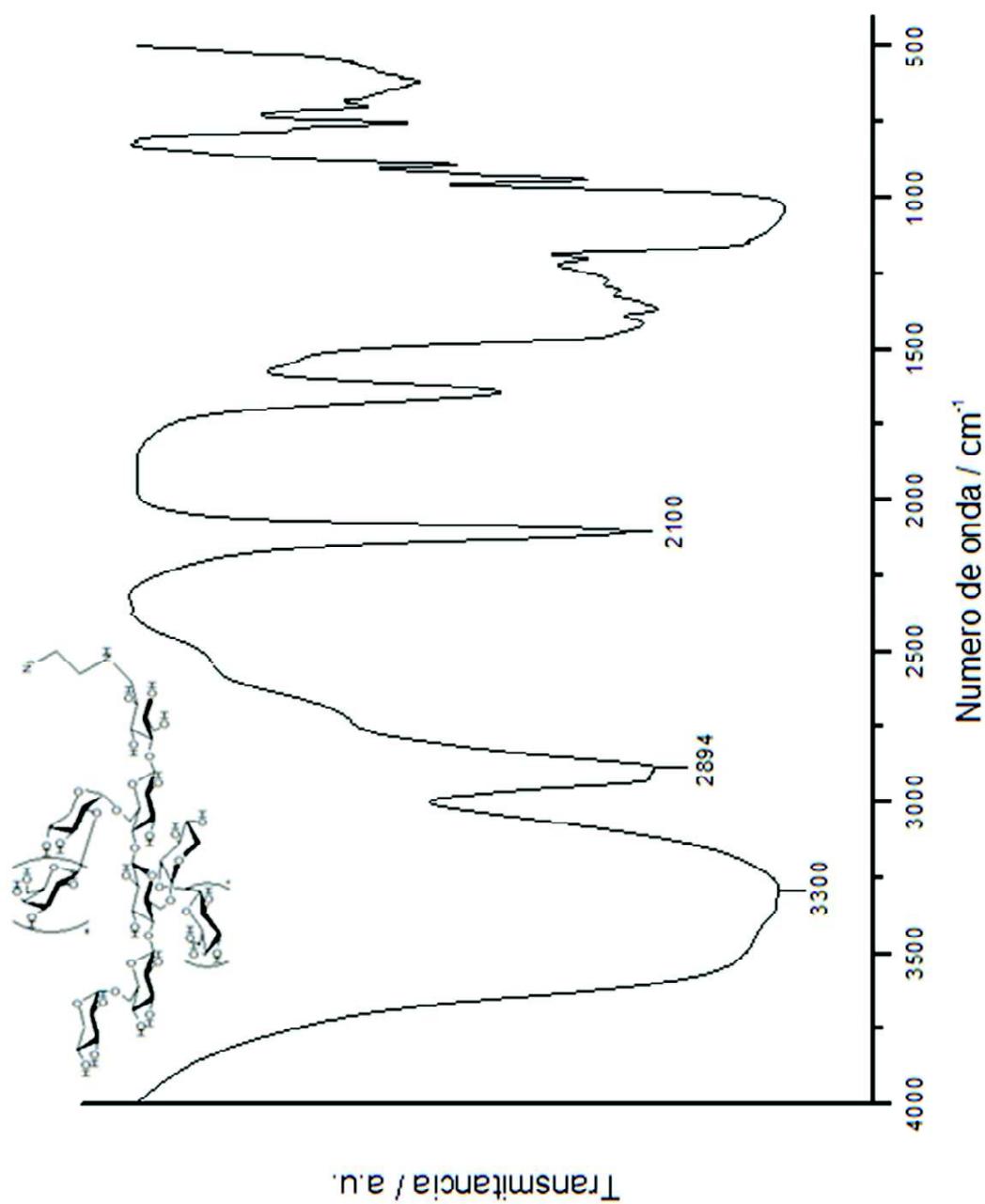
Espectro de massa MALDI-TOF dos oligossacarídeos de xiloglucana (1).



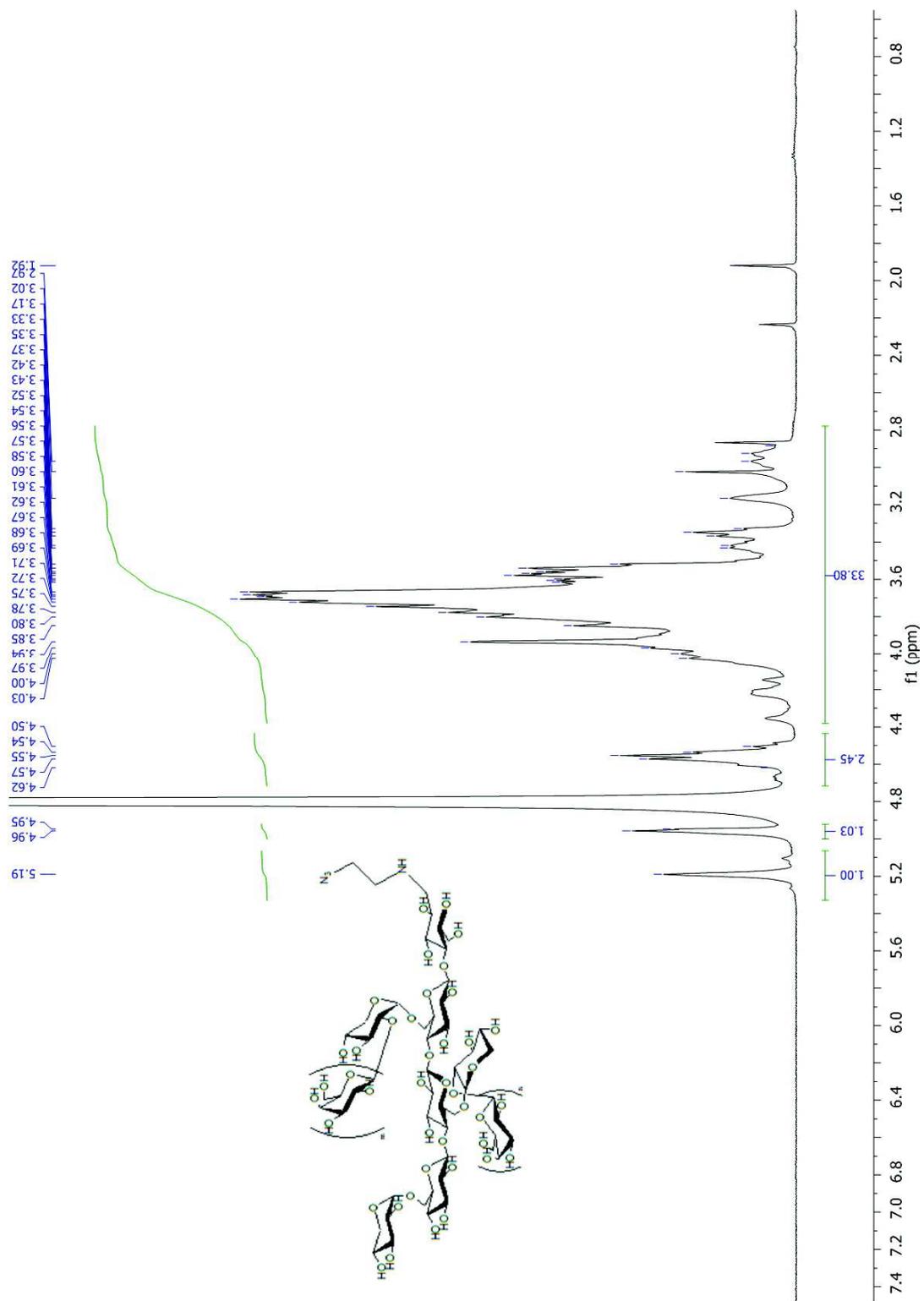
Espectro de ¹H RMN dos oligossacarídeos de xiloglucana (1).



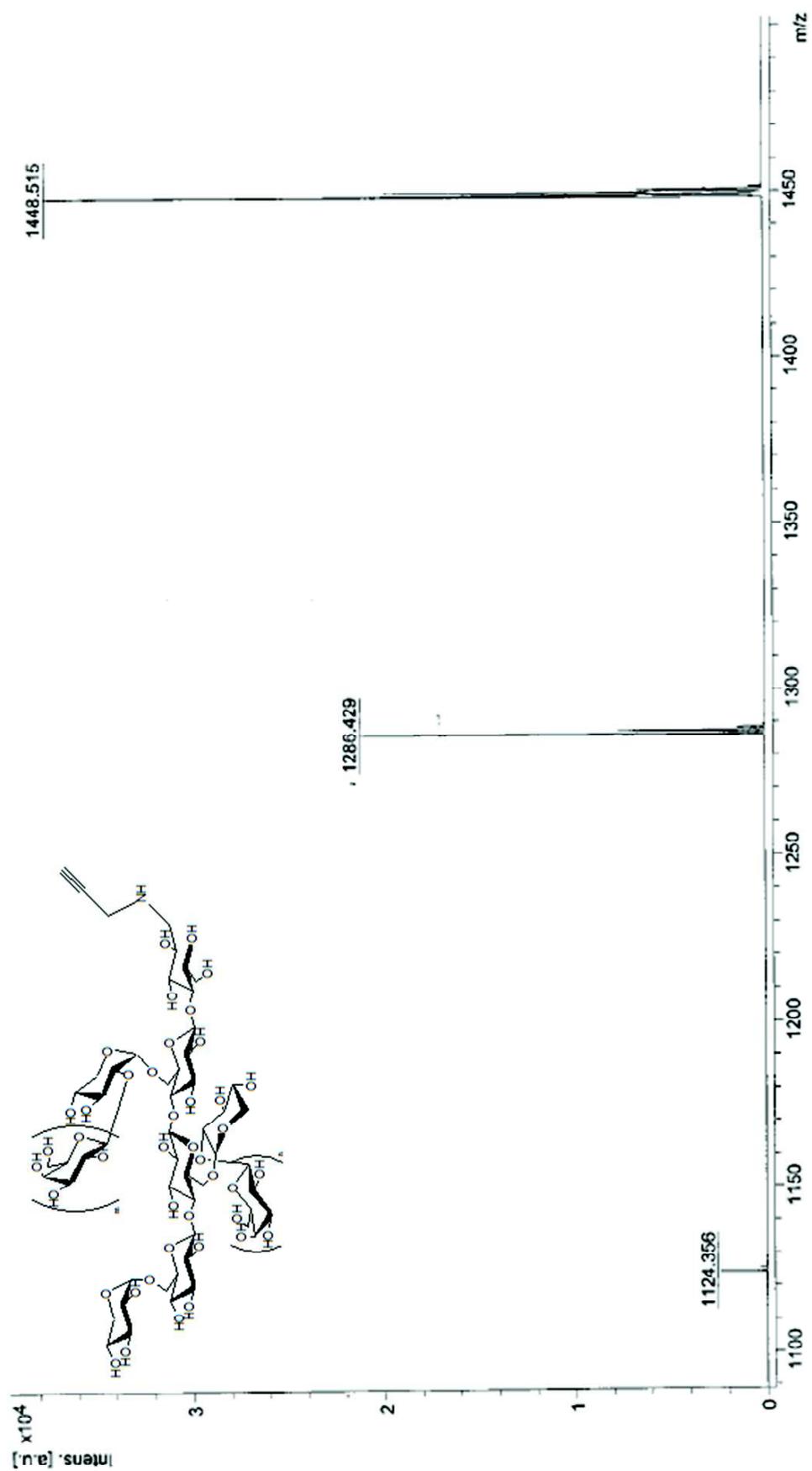
Espectro de massa MALDI-TOF dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo azida (**3**).



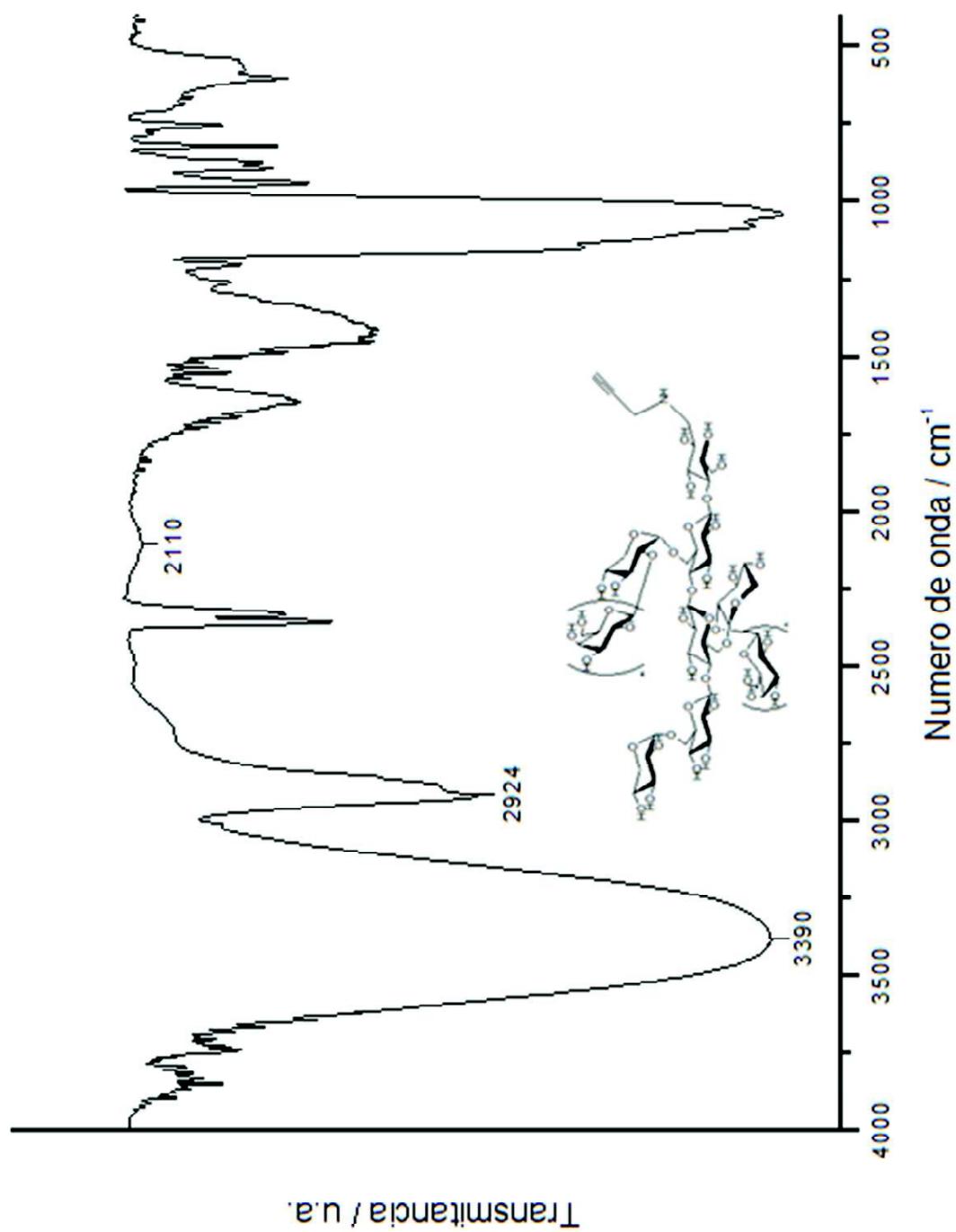
Espectro de Infravermelho (KBr) dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo azida (**3**).



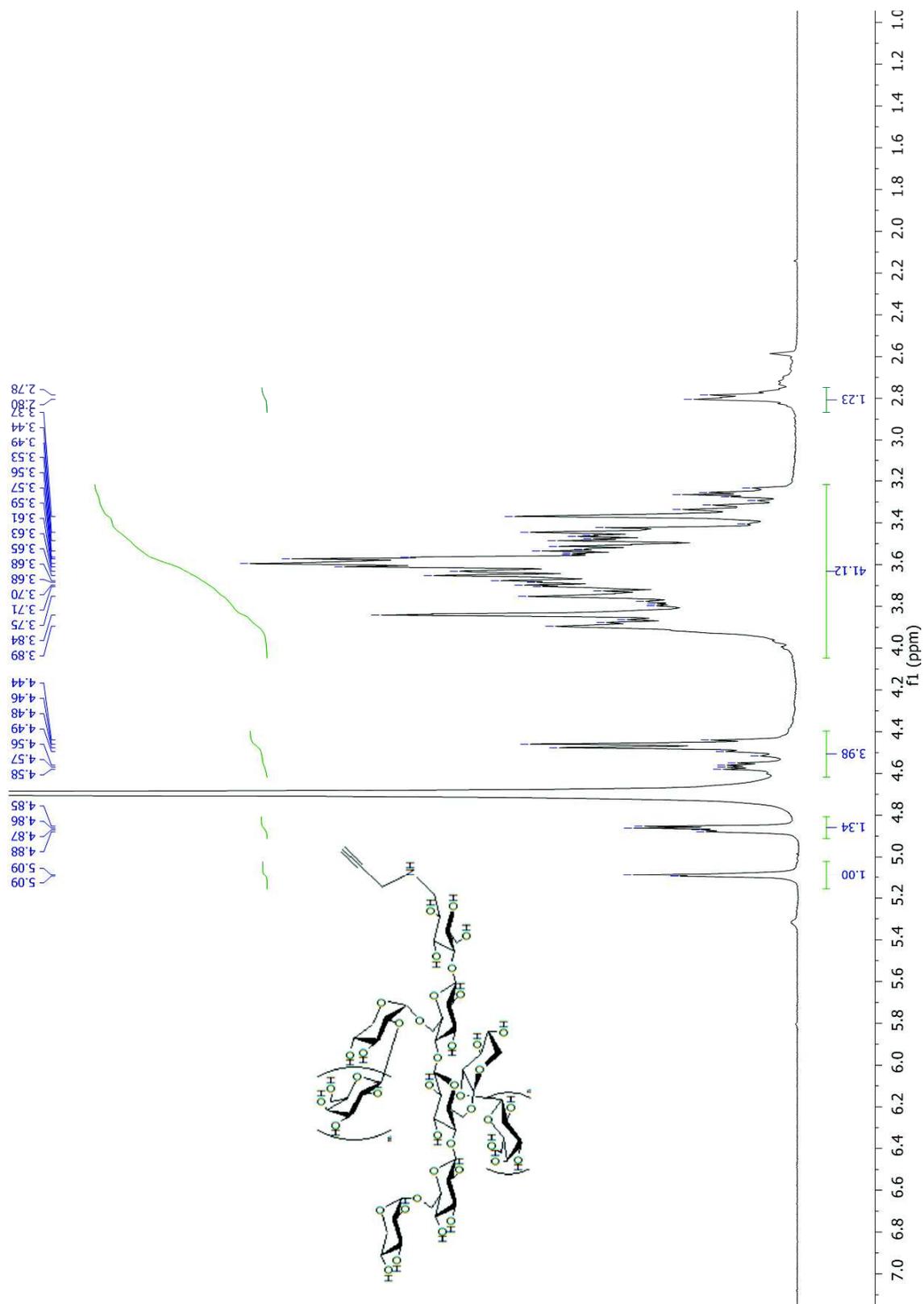
Espectro de ^1H RMN dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo azida (3).



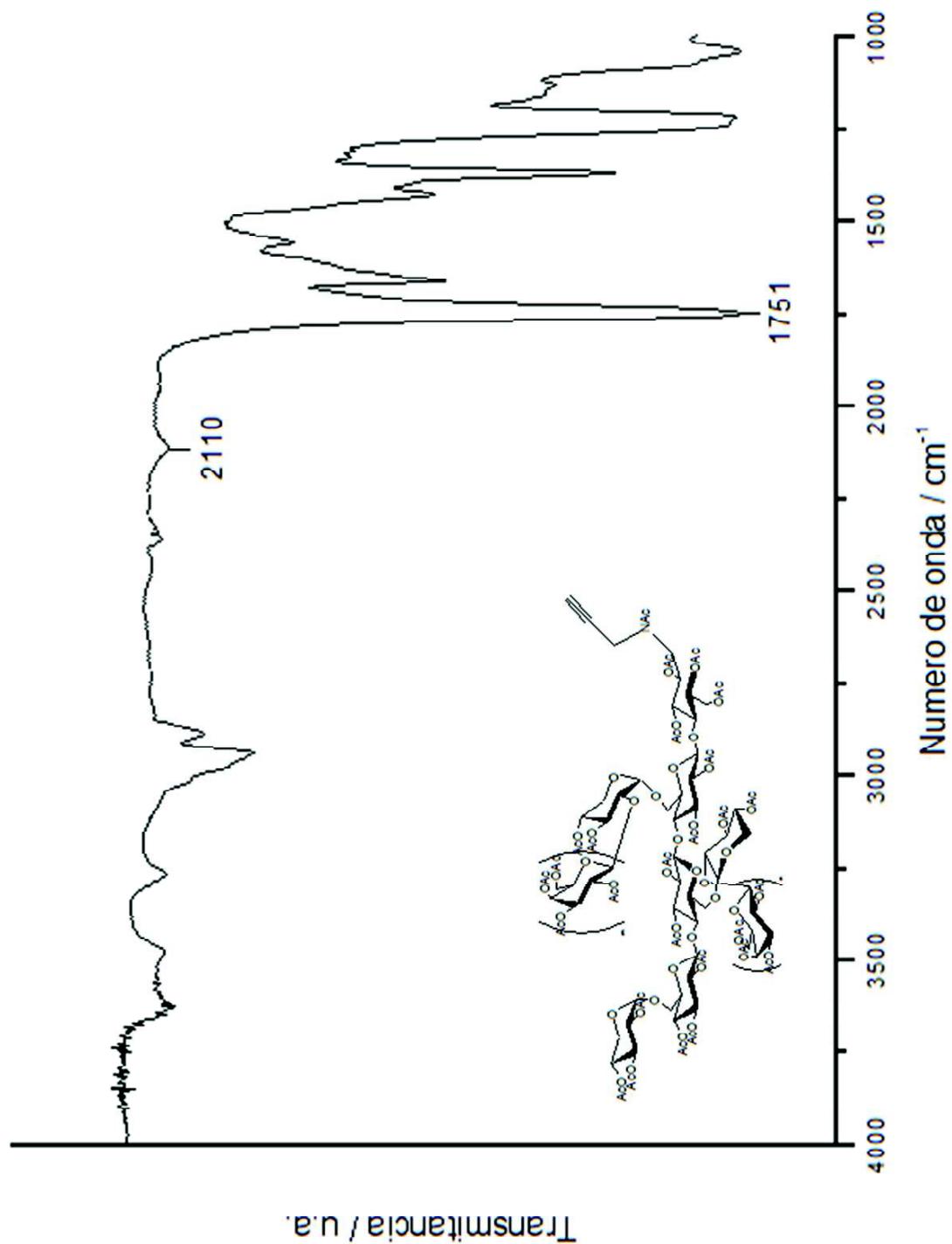
Espectro de massa MALDI-TOF dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo propargila (**4**).



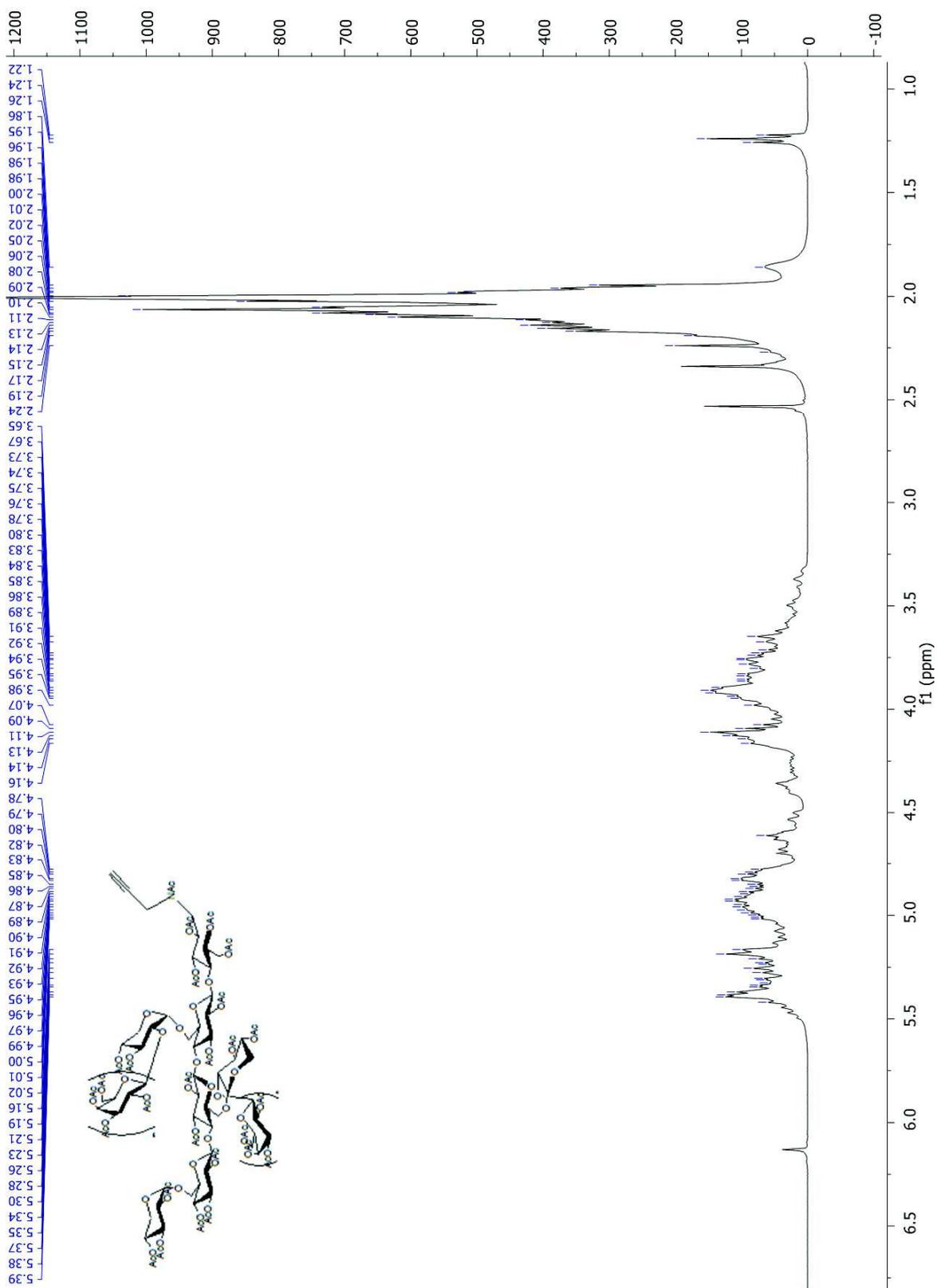
Espectro de Infravermelho dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo propargila (4).



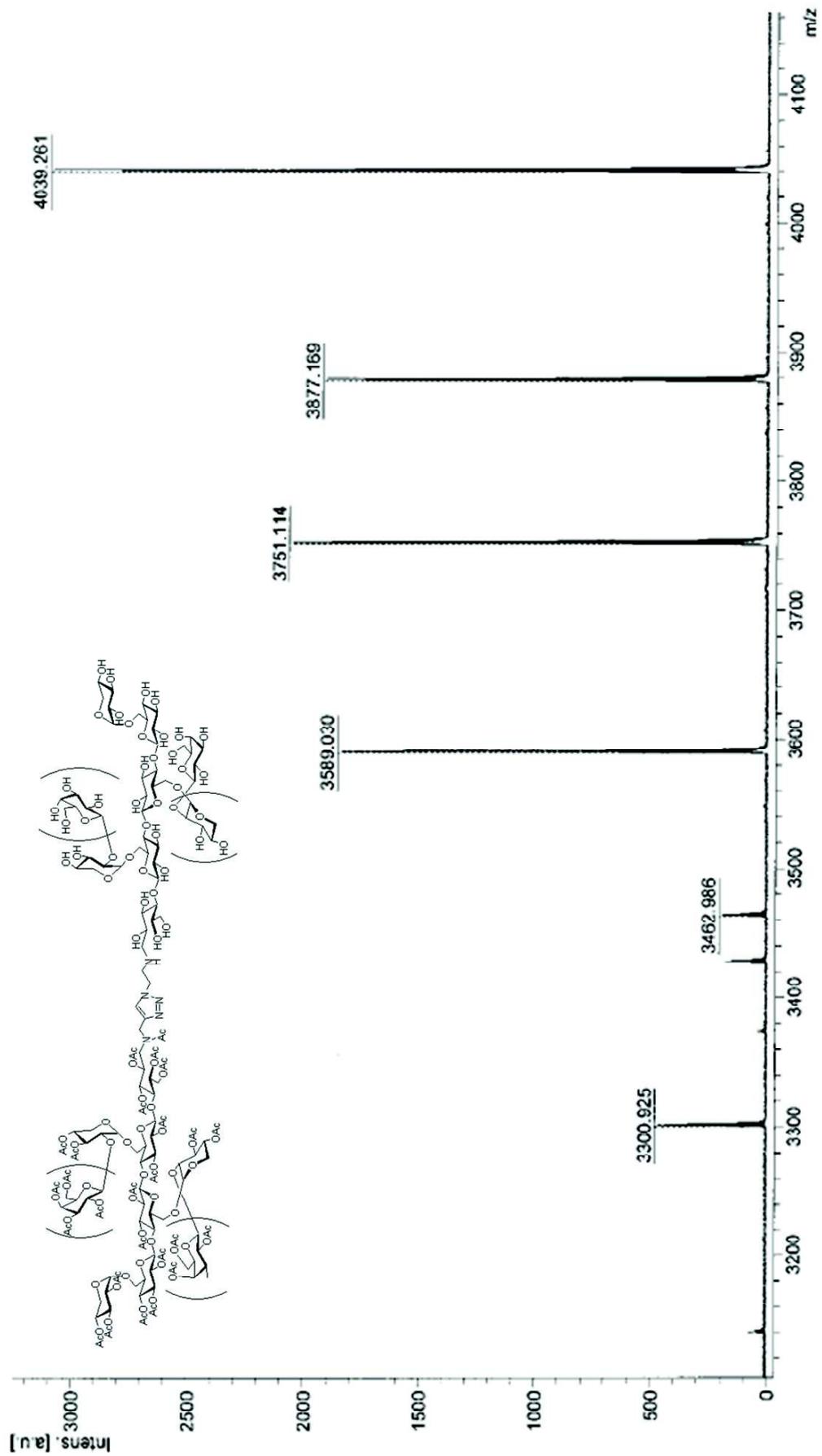
Espectro de ^1H RMN dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo propargila (4).



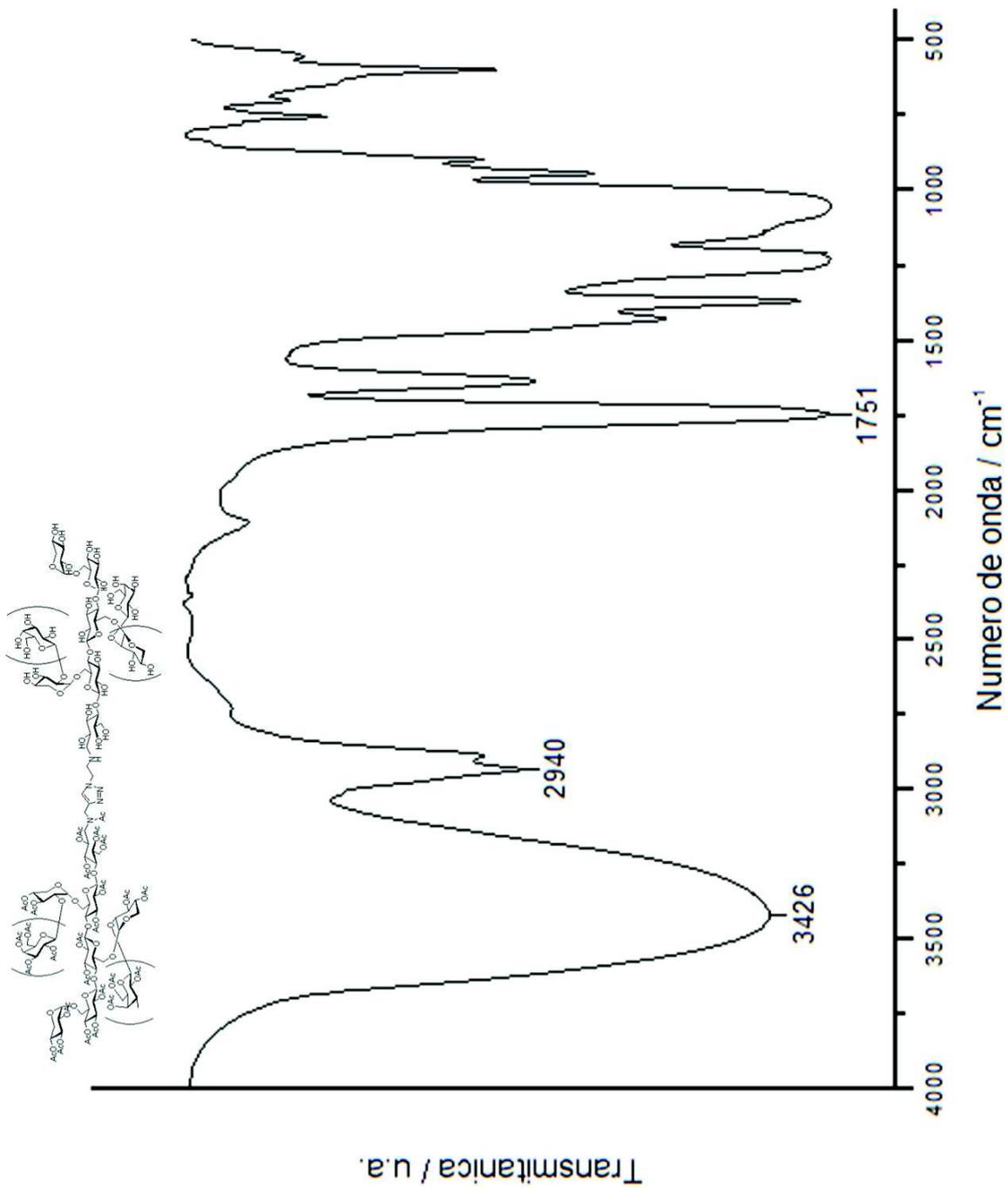
Espectro de Infravermelho dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo propargila submetidos à reação de acetilação (5).



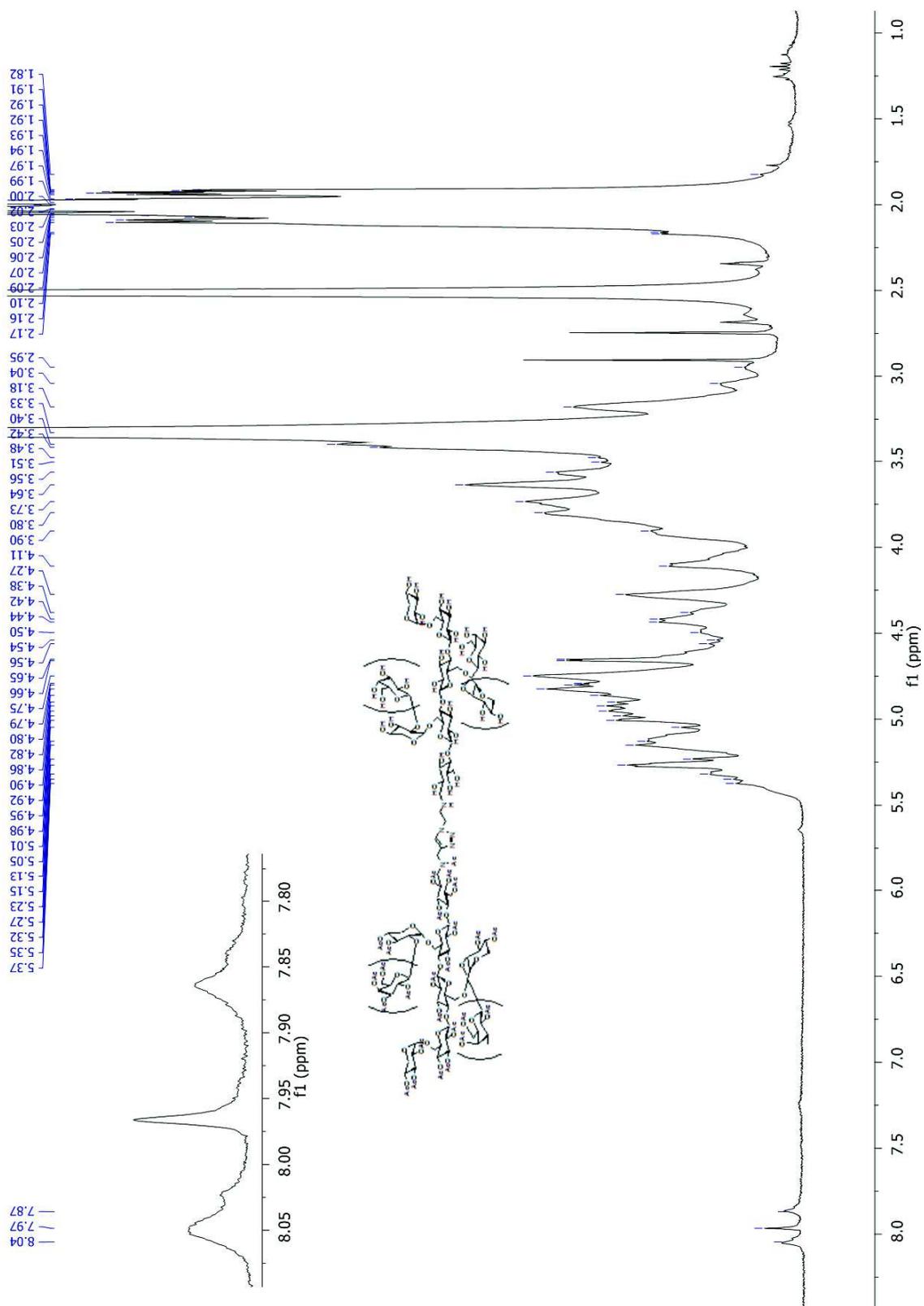
Espectro de ¹H RMN dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo propargila submetidos à reação de acetilação (5).



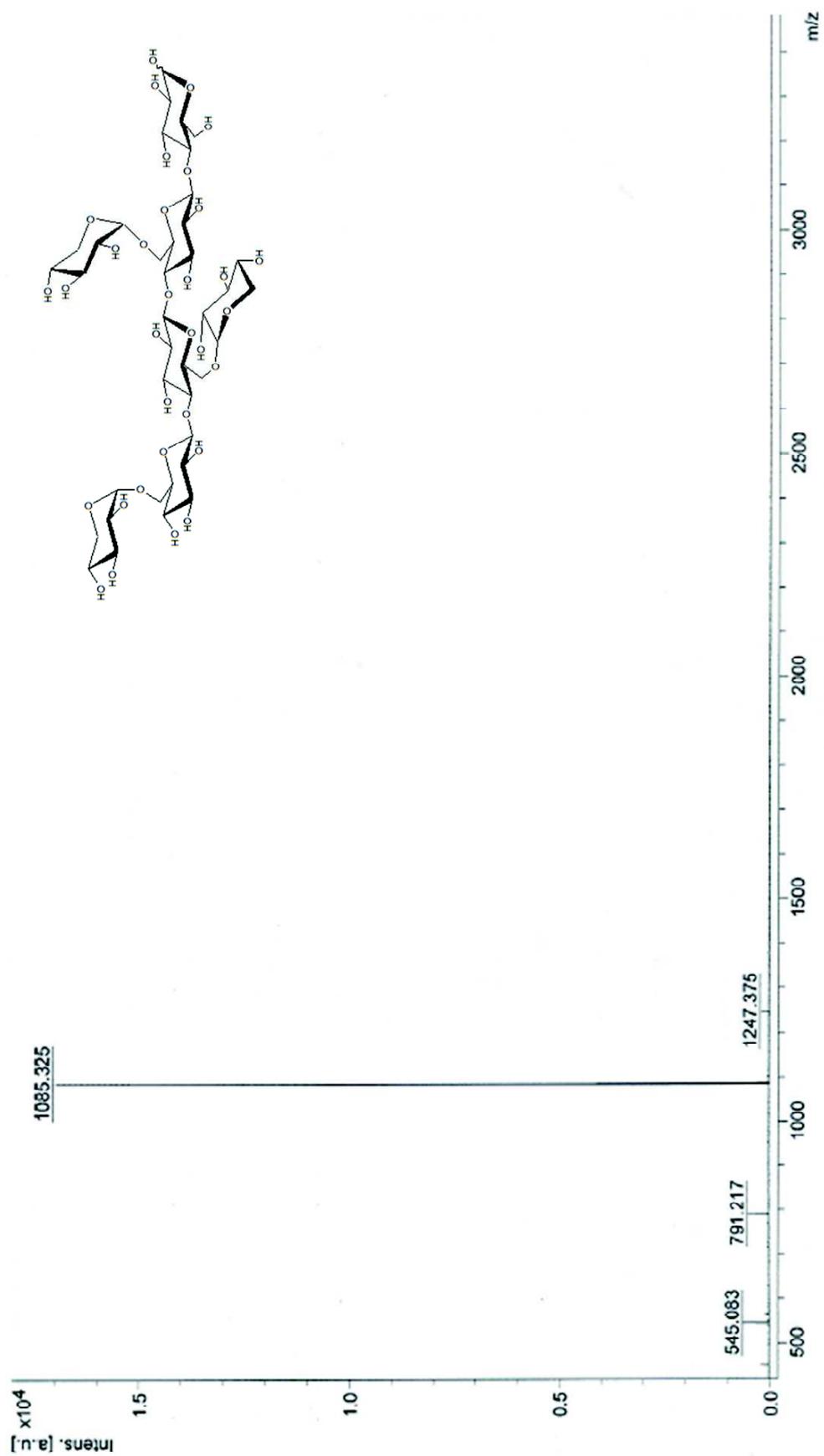
Espectro de massa MALDI-TOF do co-oligômero XGO-*b*-XGOAc (6).



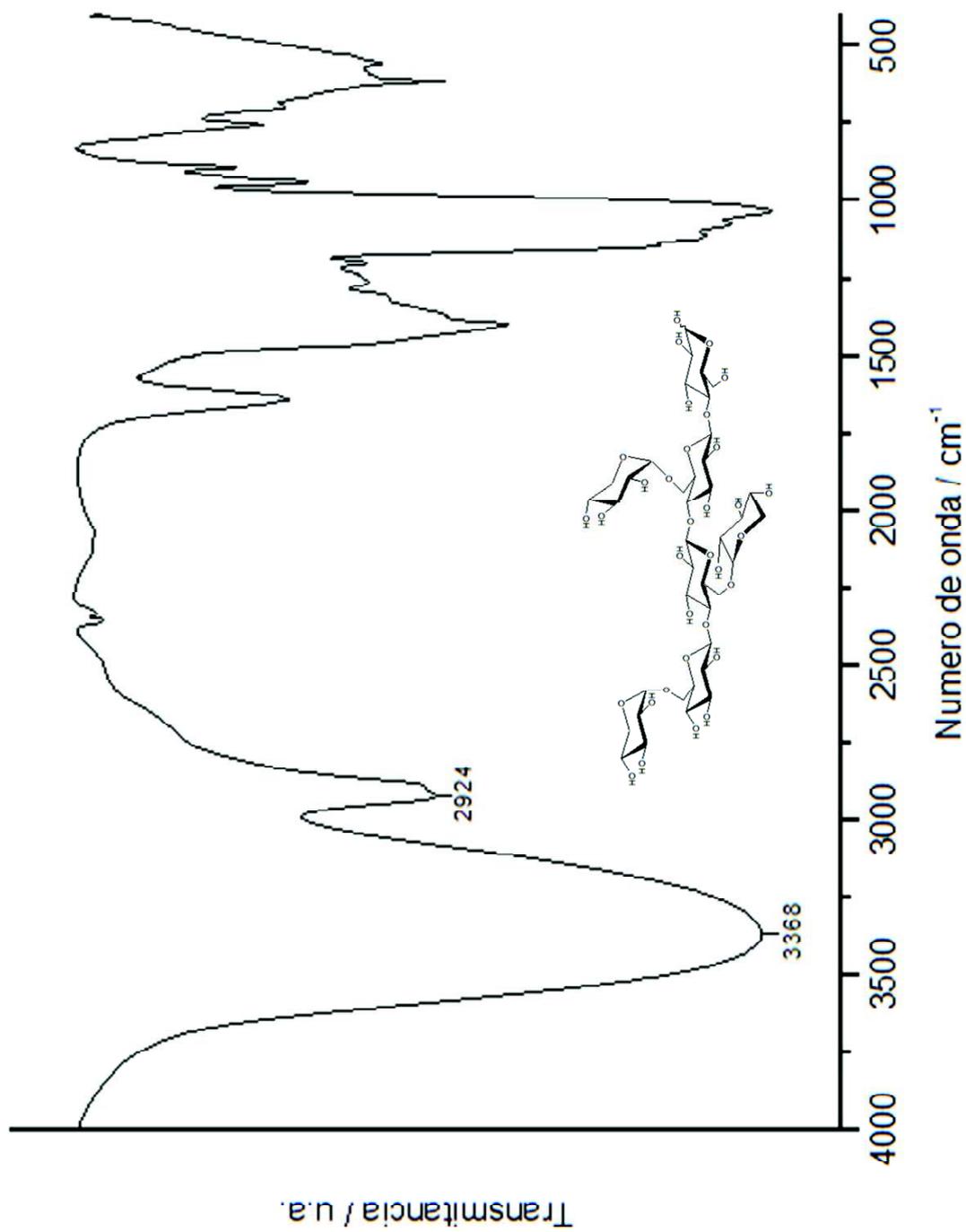
Espectro de Infravermelho do co-oligômero XGO-*b*-XGOAc (6).



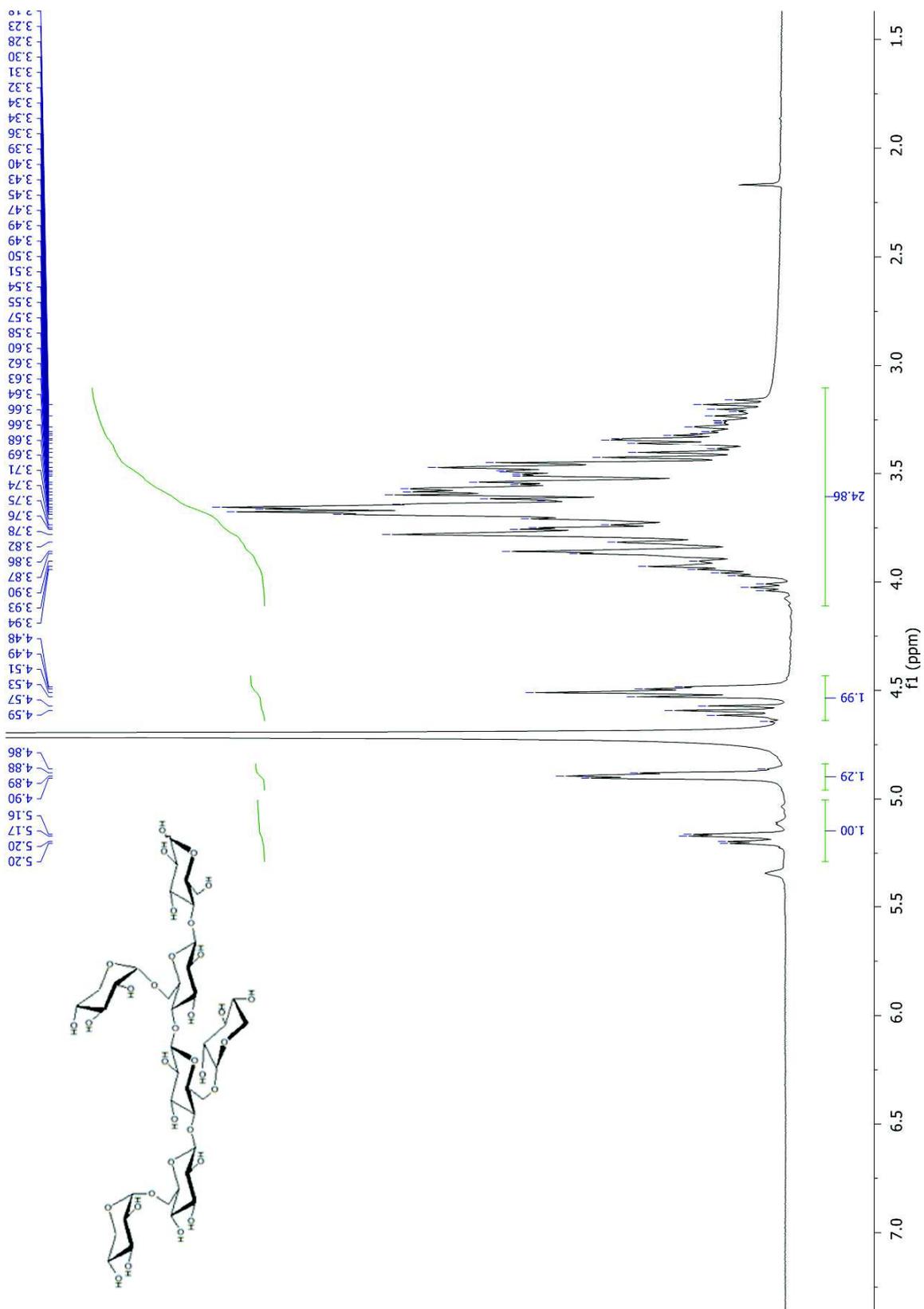
Espectro de ^1H RMN do co-oligômero XGO-*b*-XGOAc (6).



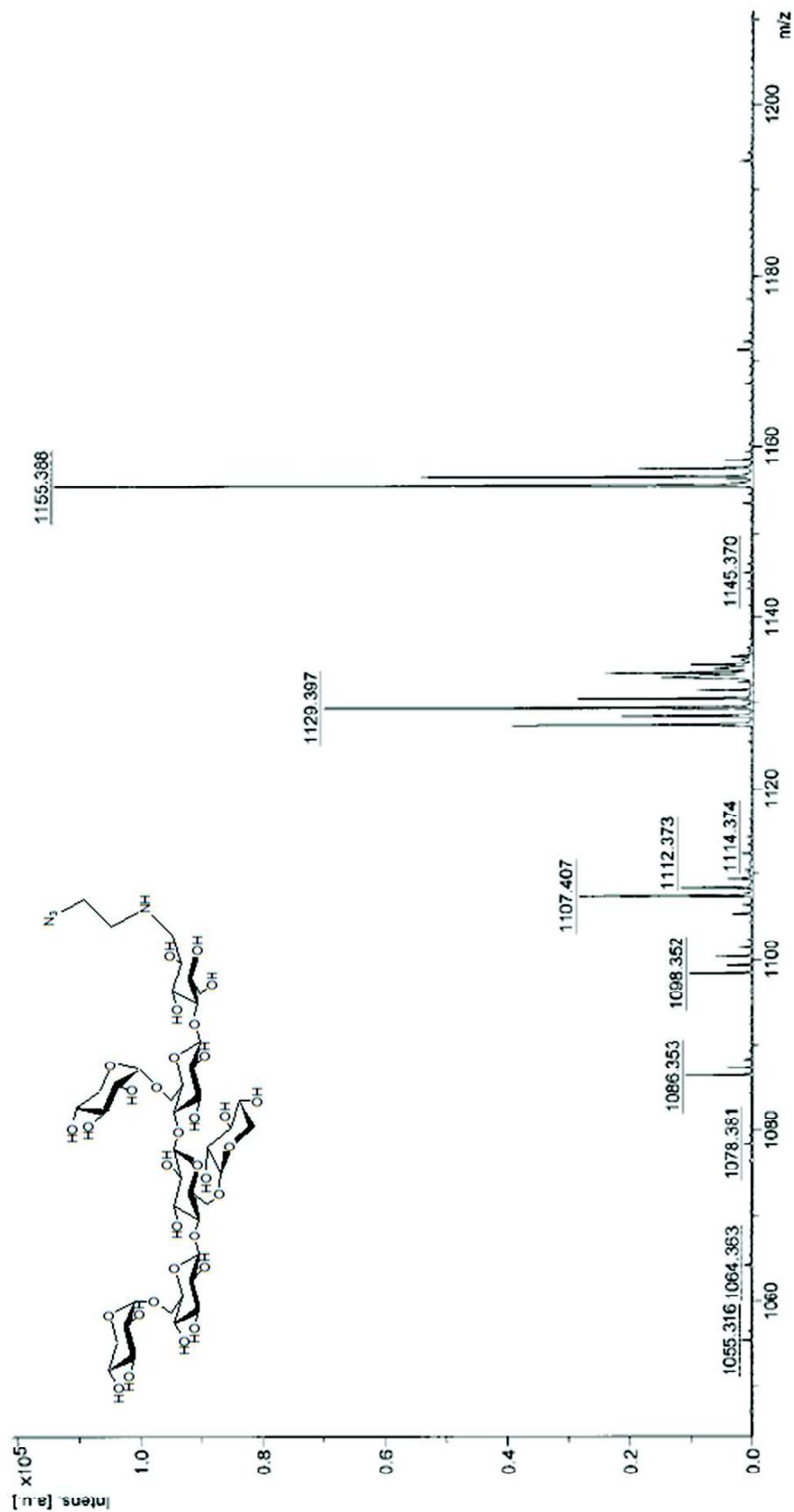
Espectro de massa MALDI-TOF da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana (7).



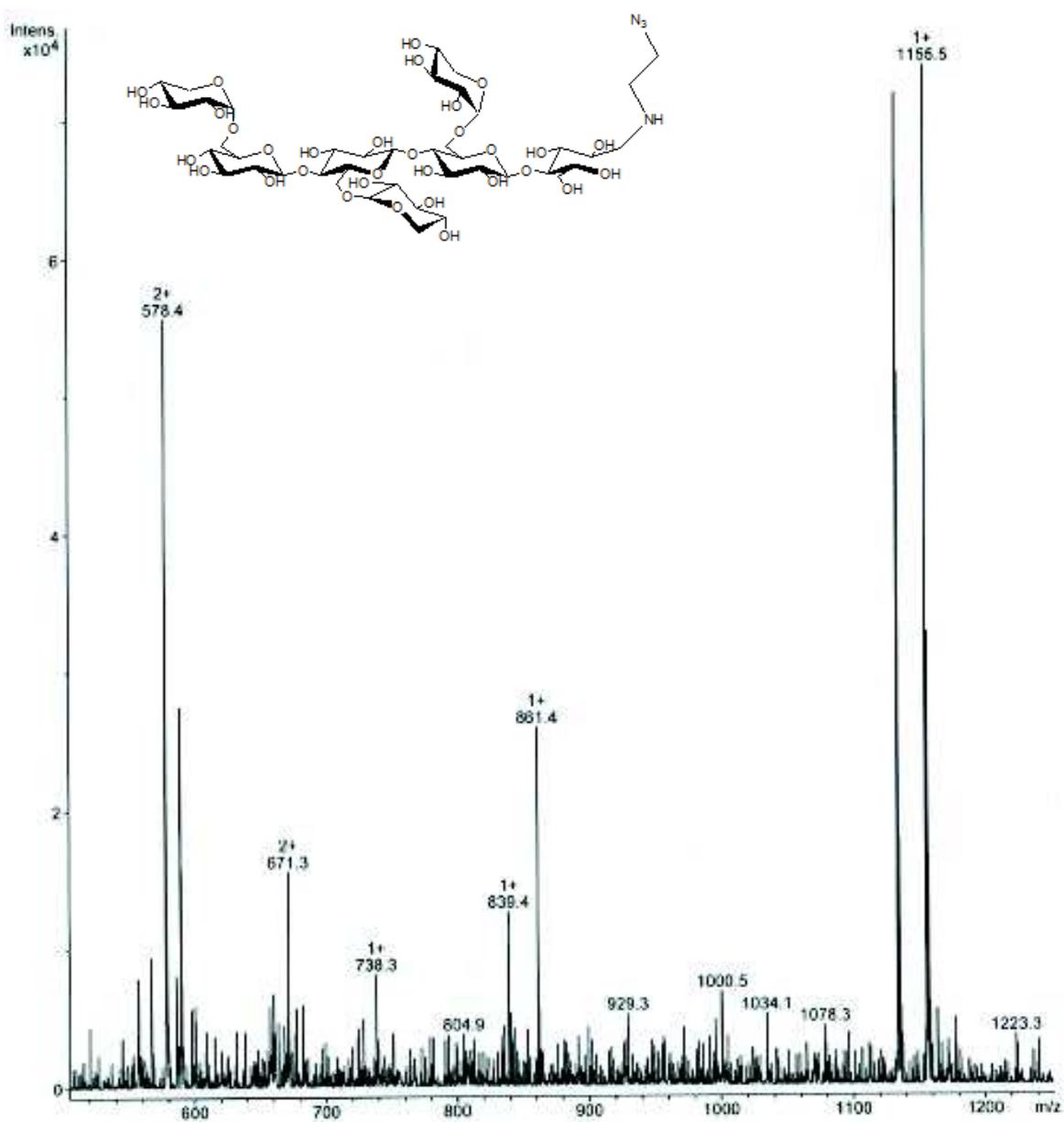
Espectro de infravermelho da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana (7).



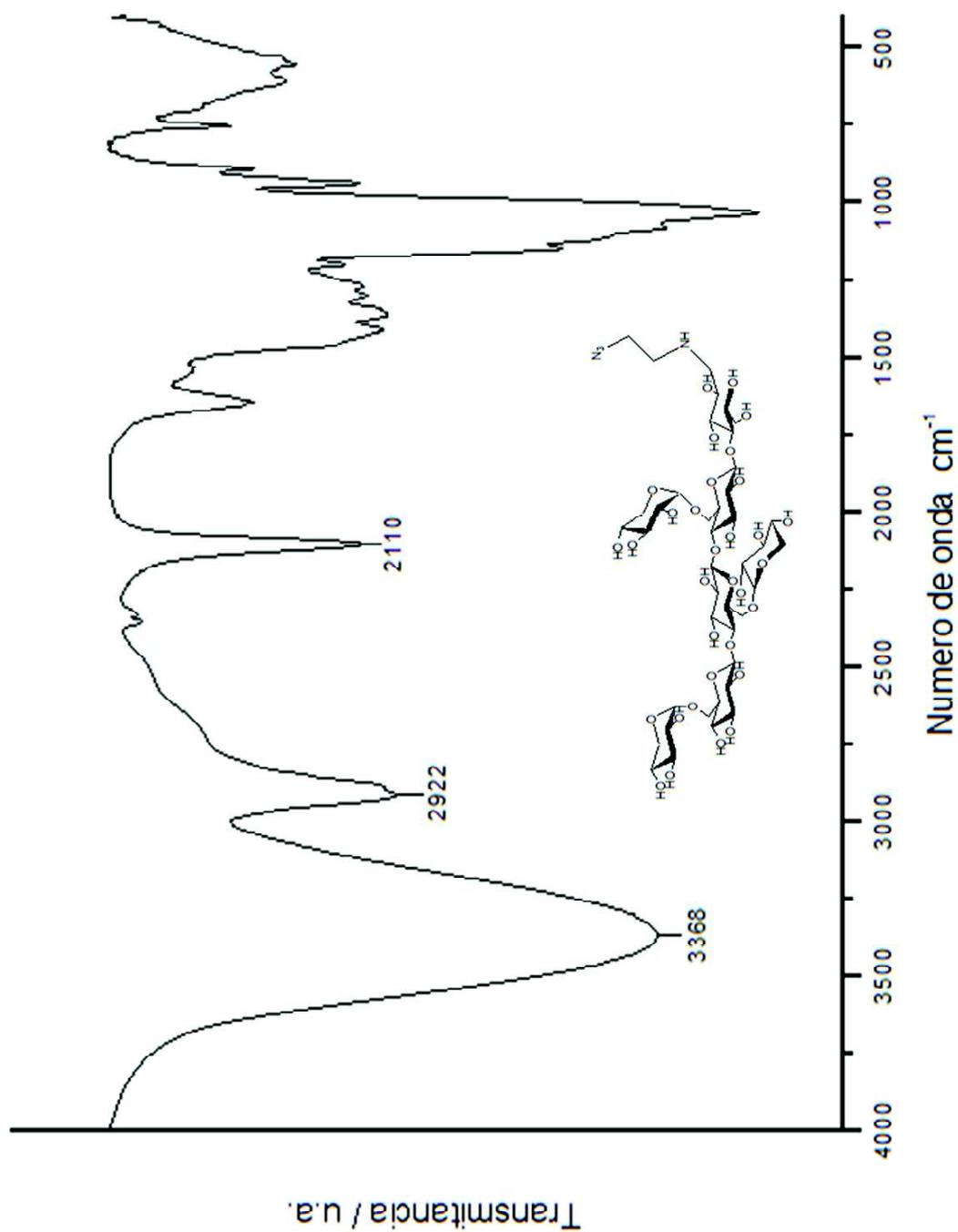
Espectro de ¹H RMN da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana (7).



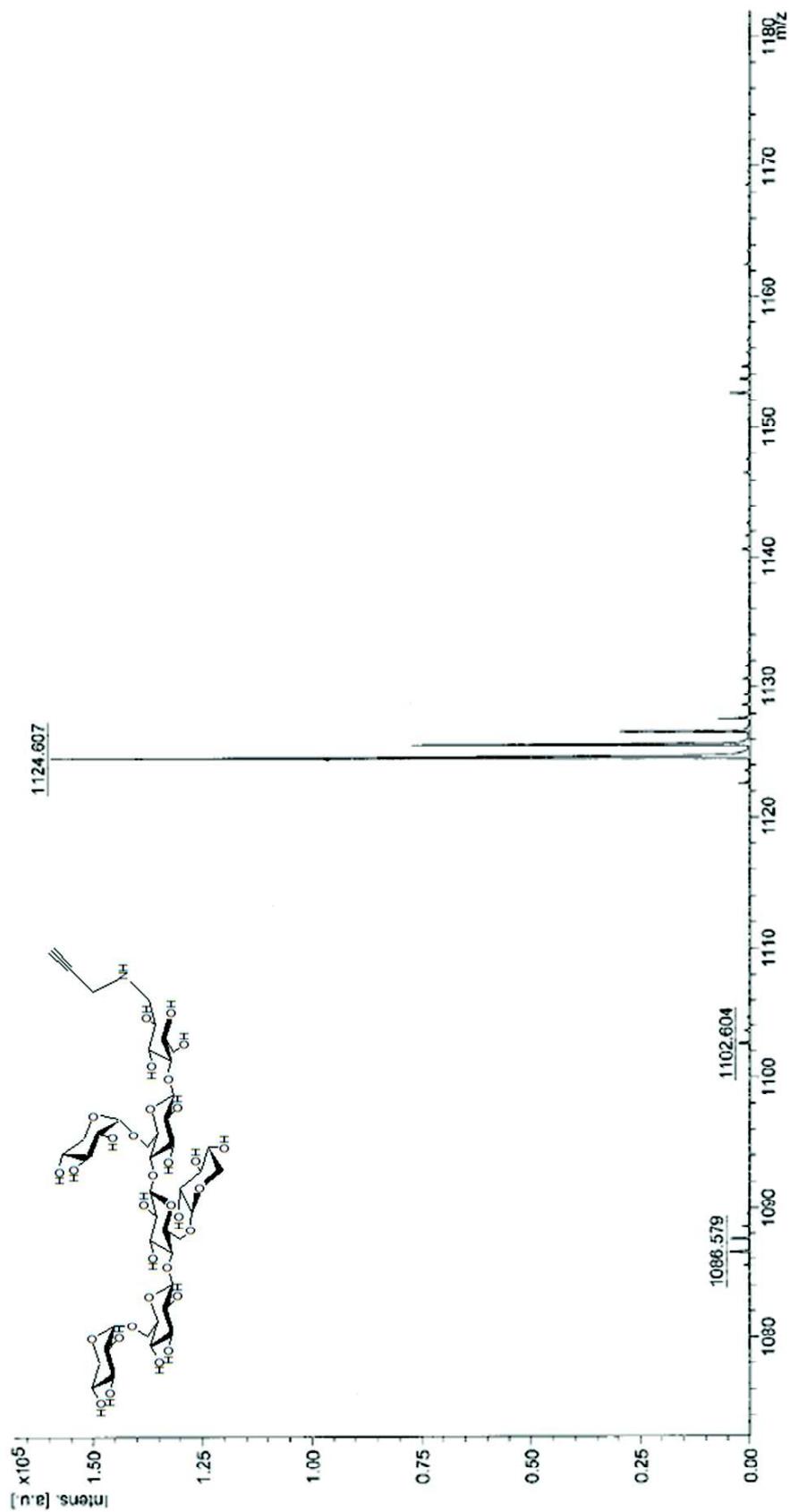
Espectro de massa MALDI-TOF da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo azida (**8**).



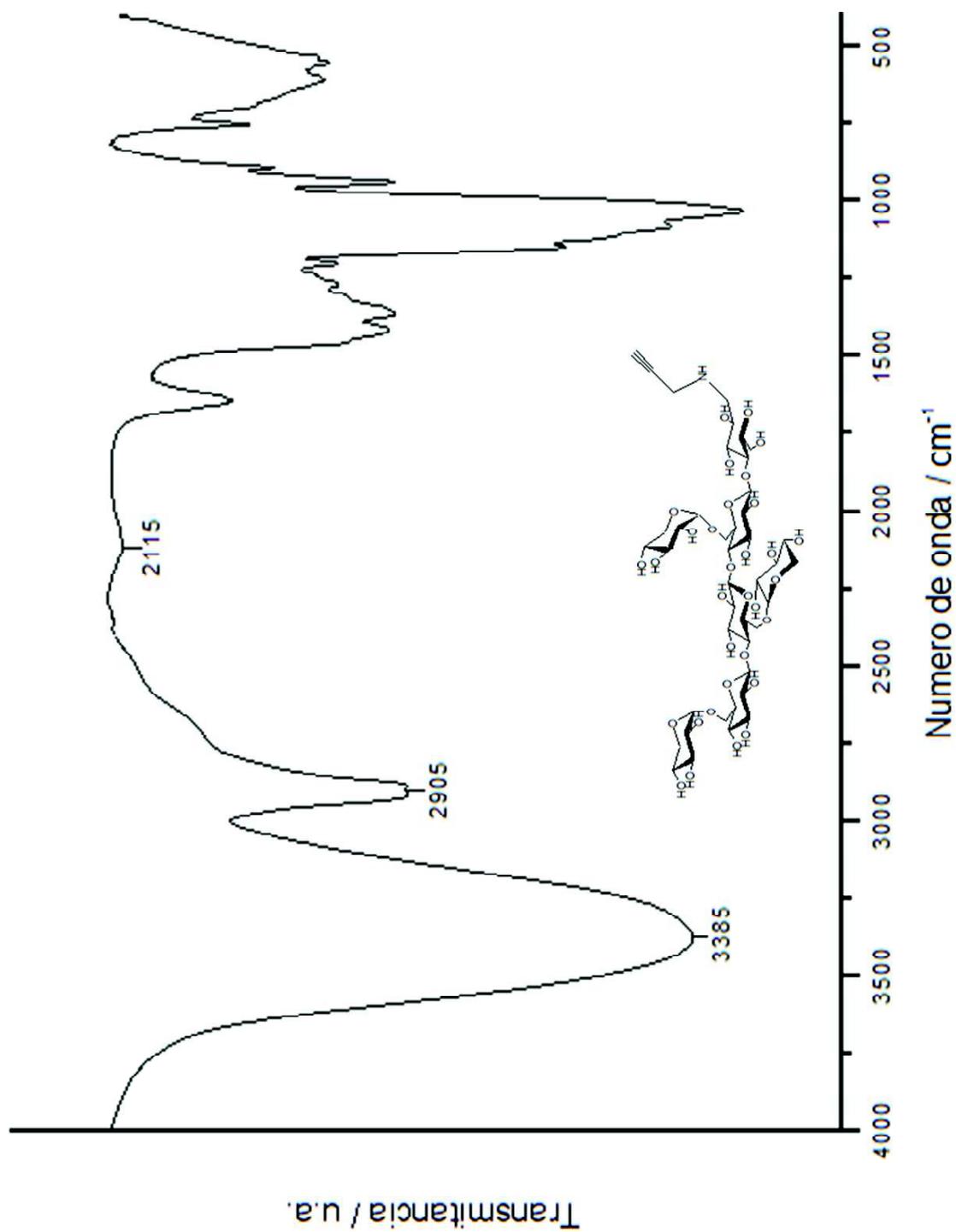
Espectro de massa ESI da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo azida (**8**).



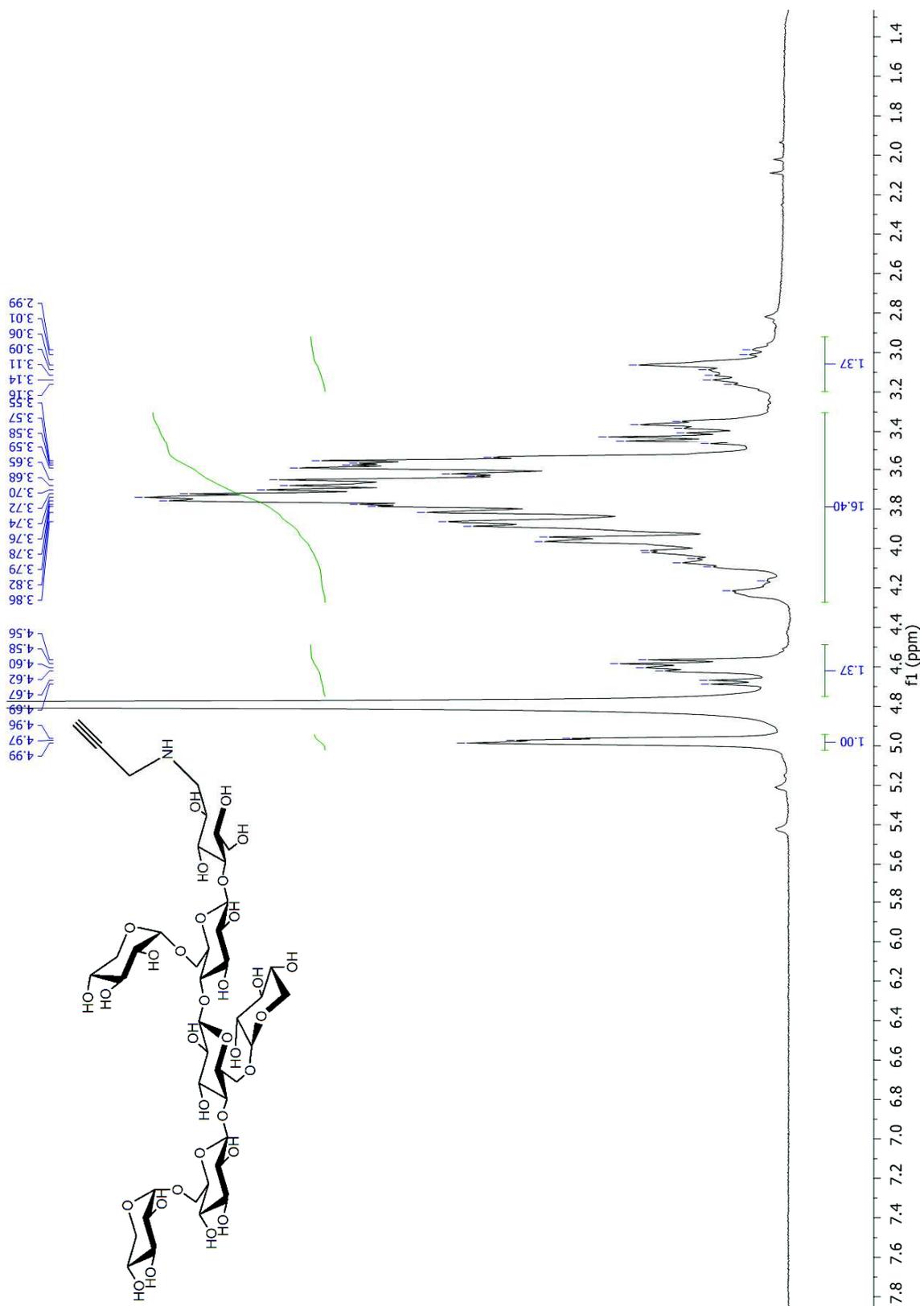
Espectro de infravermelho da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo azida (**8**).



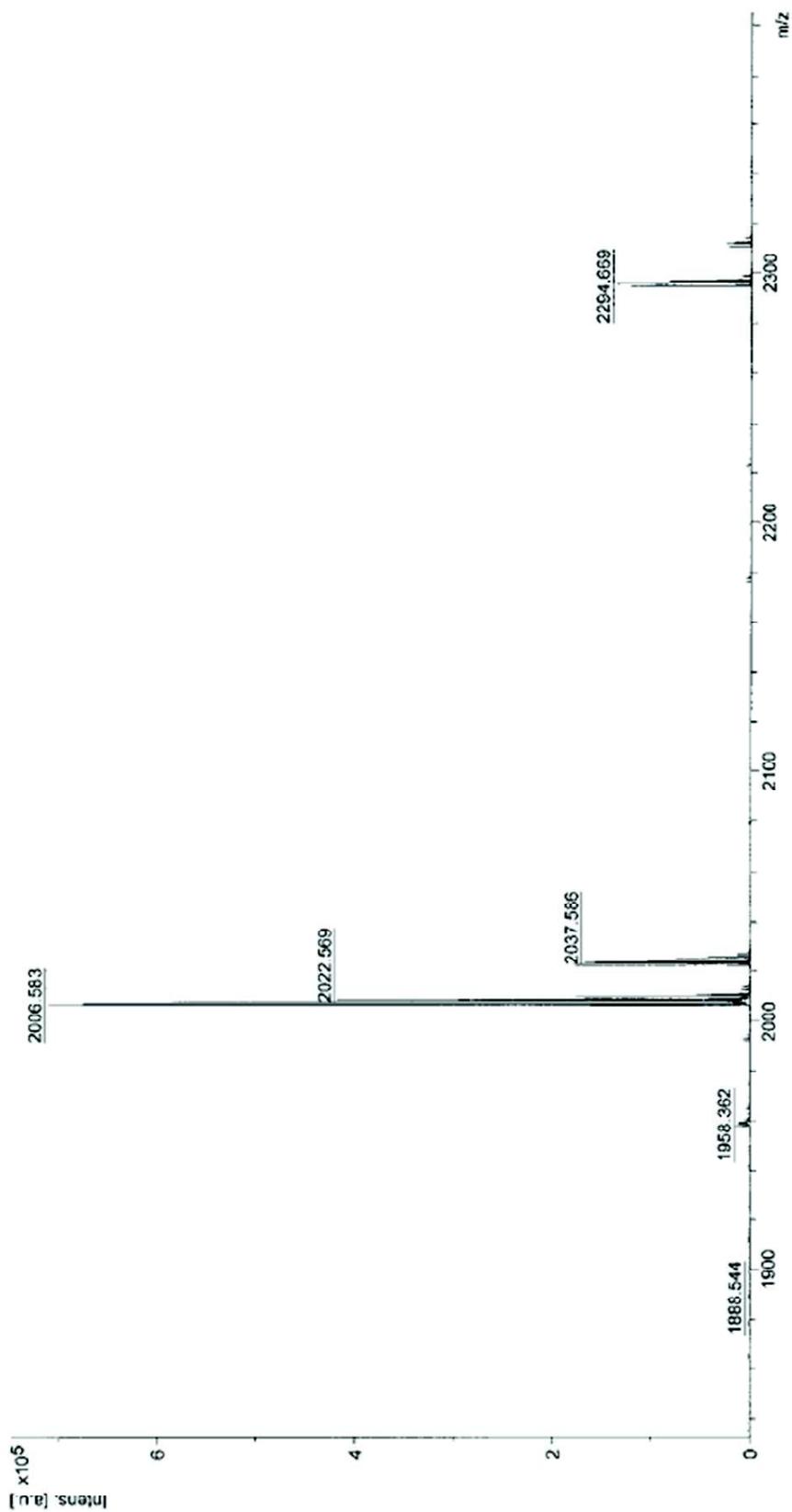
Espectro de massa MALDI-TOF da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo propargila (**9**).



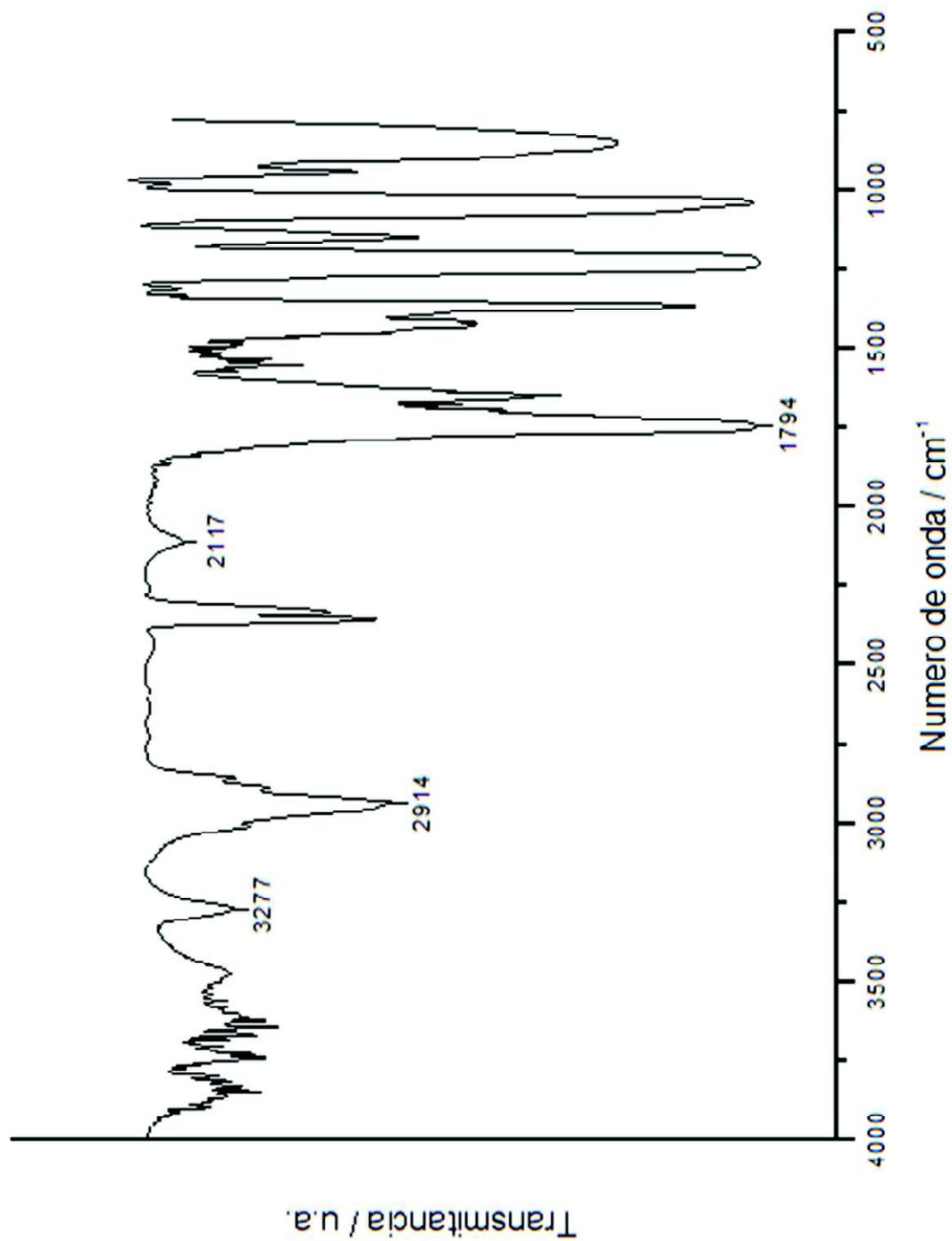
Espectro de infravermelho da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo propargila (9).



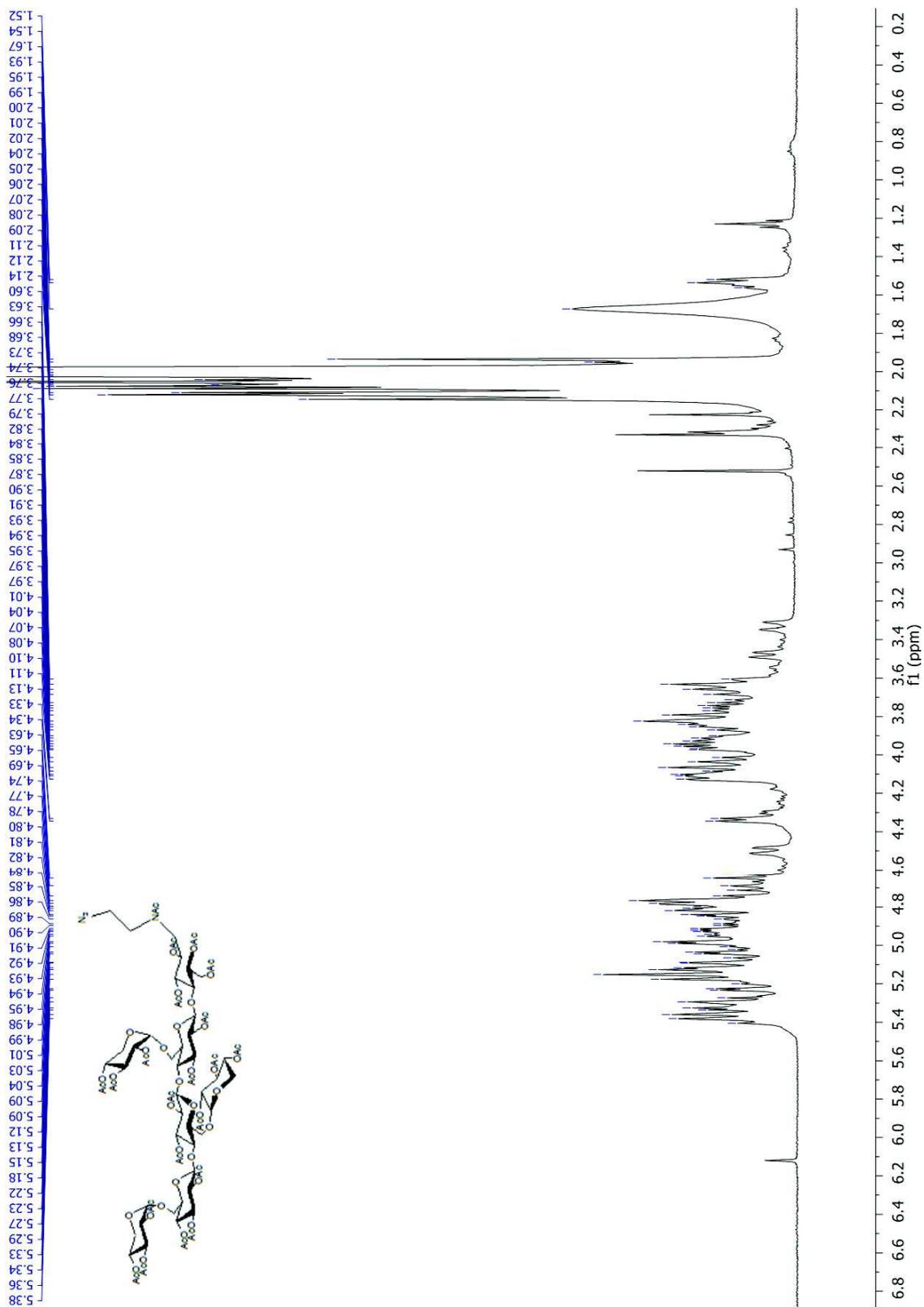
Espectro de ^1H RMN da fração DP7 dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo propargila (**9**).



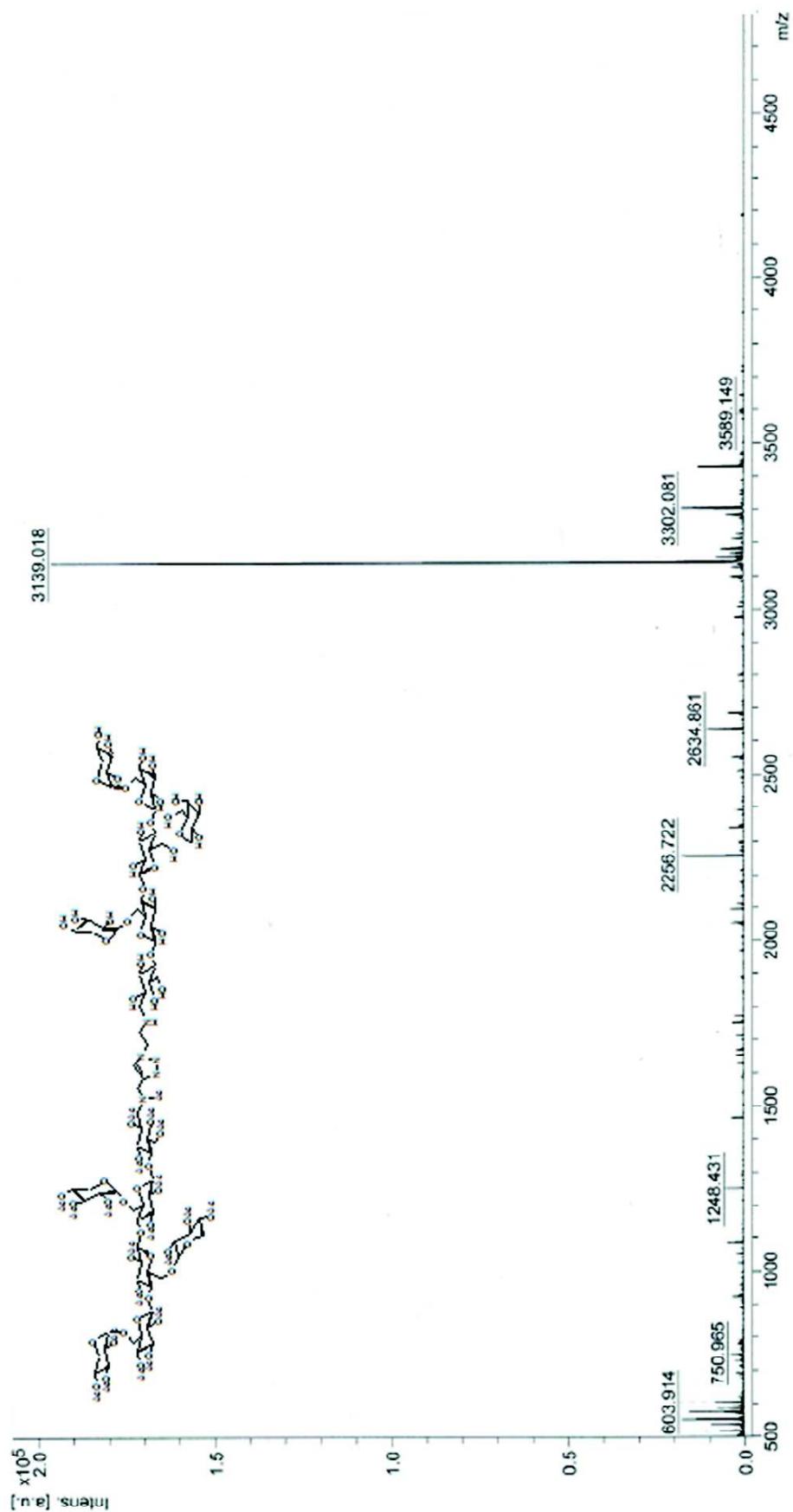
Espectro de massa MALDI-TOF da fração DP7 acetilada dos oligossacarídeos de xilogucana funcionalizados com grupo propargila (10).



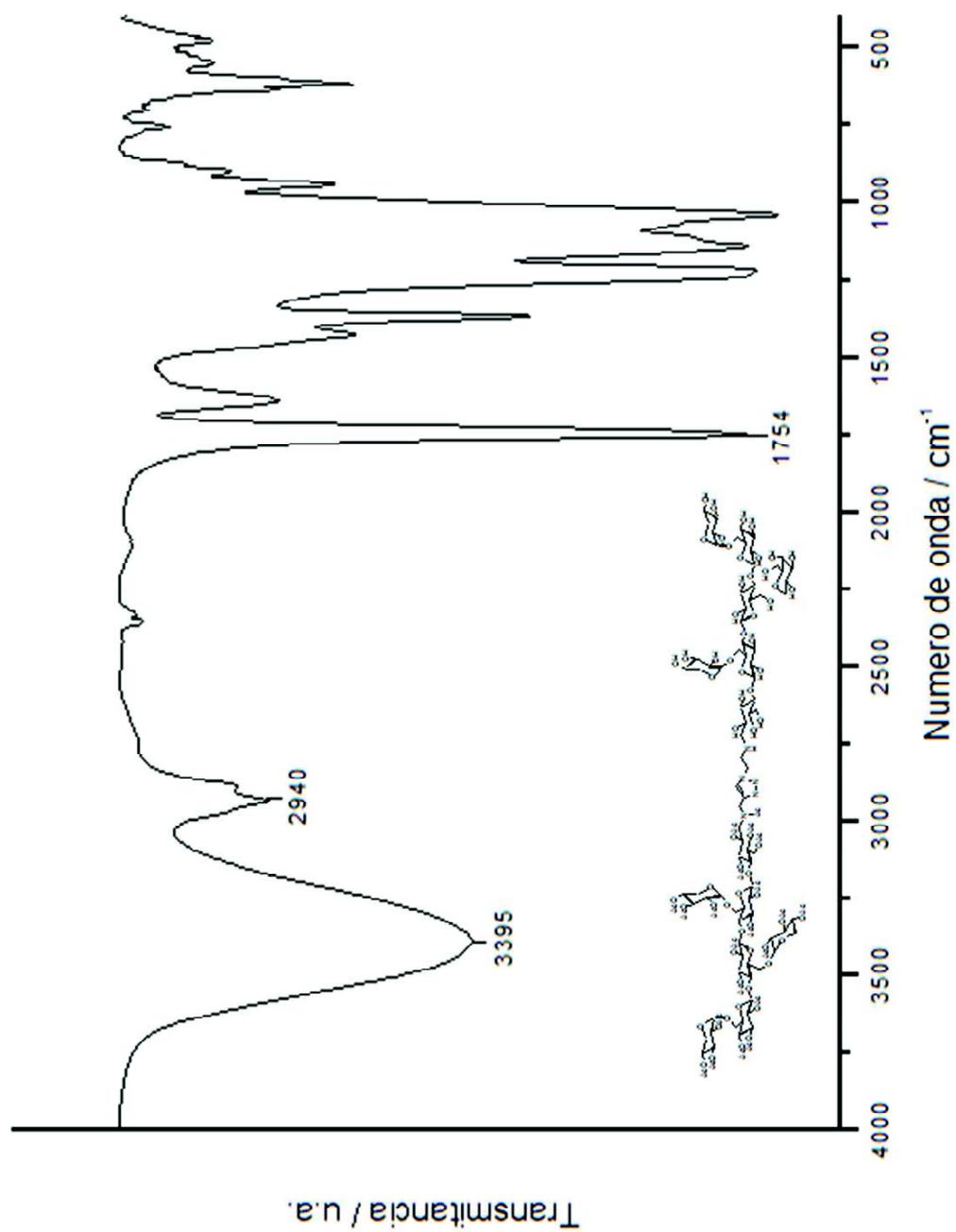
Espectro de infravermelho da fração DP7 acetilada dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo propargila (**10**).



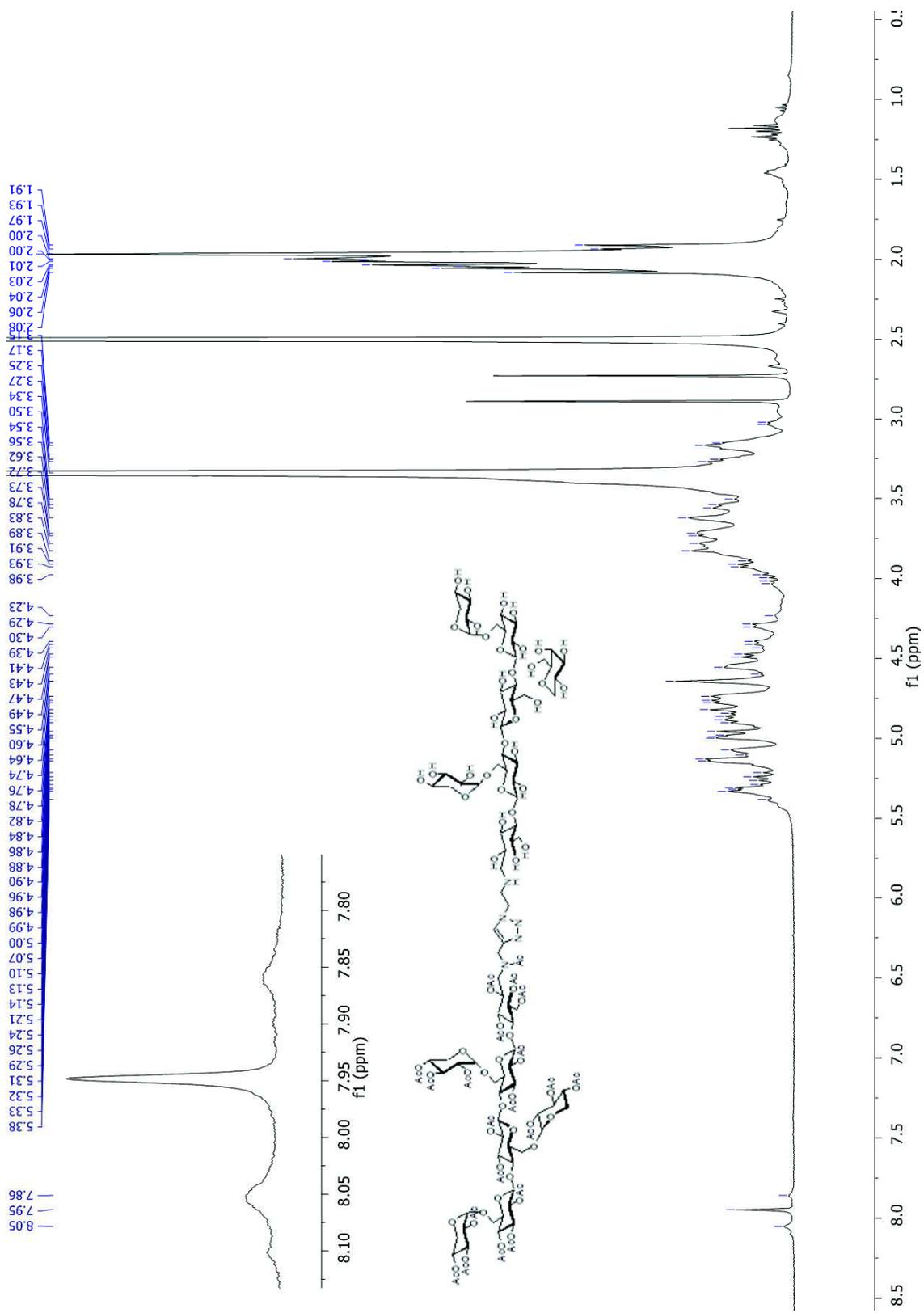
Espectro de ^1H RMN da fração DP7 acetilada dos oligossacarídeos de xiloglucana funcionalizados com grupo propargila (**10**).



Espectro de massa MALDI-TOF do co-oligômero DP7-*b*-DP7Ac (11).



Espectro de infravermelho do co-oligômero DP7-*b*-DP7Ac (11).



Espectro de ^1H RMN do co-oligômero DP7-*b*-DP7Ac (11).

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Résumé

Synthèse et études de l'auto-assemblage en solution de diblocs amphiphiles à base de xyloglucane et application pour la stabilisation de protéines

Ce travail décrit une nouvelle route synthétique qui a pour objectif l'obtention de diblocs amphiphiles constitués uniquement d'oligosaccharides issus de xyloglucanes des graines de Tamarin. Les xylogluco-oligosaccharides (XGOs, DP7, 8, 9) de tailles parfaitement définies ont été obtenus par une digestion enzymatique contrôlée (cellulase) de xyloglucanes. Dans la perspective de lier les deux blocs par cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par le Cuivre I, dite aussi chimie « click », les XGOs ont subi une réaction d'amination réductrice assistée par micro-ondes. L'action de la propargylamine a permis d'intégrer en position réductrice du XGO la fonction alcyne et une peracétylation des fonctions hydroxyles du sucre ont rendu ce bloc hydrophobe. D'un autre côté, l'azidoethylamine a permis d'insérer la fonction azoture et constitue le bloc hydrophile. Cette stratégie de synthèse a également été transposée à un oligosaccharide monodisperse (XGO, DP7) provenant de la dégalactosylation enzymatique du xyloglucane par l'action supplémentaire de la galactosidase d'*Aspergillus Niger*. Finalement, les diblocs amphiphiles ont été synthétisés aussi bien à partir des XGOs de DP7, 8, 9 (XGO-*b*-XGO,Ac), que du XGO DP7 (DP7-*b*-DP7,Ac). Leurs propriétés d'auto-assemblages dans l'eau ont été réalisées ainsi que leur caractérisation physico-chimique. Suite à des mesures de concentration micellaire critique (CMC) obtenus par spectroscopie de fluorescence du pyrène, nous avons observé que l'élimination des unités de galactose provoque une augmentation de la CMC. La détermination du diamètre des micelles en solution aqueuse a été réalisée grâce à la technique de diffusion de la lumière (DLS) et a été confirmée par microscopie électronique à transmission (MET). Des micelles sphériques d'une taille moyenne de 25 nm (XGO-*b*-XGO,Ac) et de 6 nm (DP7-*b*-DP7,Ac) ont été observées au MET. La digestion enzymatique partielle des micelles formés à partir du dibloc XGO-*b*-XGO,Ac dans l'eau, conduisant à la formation des micelles DP7-*b*-XGO,Ac a conduit à un système moins polydisperse et à une diminution de la taille moyenne du diamètre micellaire de l'ordre de 50% (déterminée par DLS). Des nanoparticules de gliadine et de zéine ont été préparées par désolvatation en utilisant le

dibloc XGO-*b*-XGO,Ac comme surfactant en comparaison au surfactant commercial non-ionique, le Pluronic F68. Les résultats suggèrent la capacité du dibloc à stabiliser la protéine de zéine sous forme de nanoparticules sphériques et de façon relativement monodisperses. Les particules formées et stabilisées grâce à l'association de protéines d'origine végétale et d'un surfactant « biopolymérique » synthétisé uniquement par des oligosaccharides, apparaissent comme des systèmes idéaux, associant biocompatibilité, biodégradabilité et des origines naturelles et renouvelables. Ces systèmes peuvent tout à fait être valorisés pour la libération contrôlée de substances actives.

Mots-clés: dibloc amphiphile, xyloglucane, nanoparticules, stabilisant, protéines.

Introduction et contexte

Les copolymères amphiphiles à bloc sont des macromolécules composées de deux ou plusieurs blocs chimiquement différents et non miscibles, liés de façon covalente en arrangement linéaire ou ramifié. La structure complexe de ces molécules leur confère une grande diversité de propriétés que l'on utilise dans l'industrie, notamment pour élaborer des élastomères thermoplastiques, des mousses et des adhésifs. Actuellement, ils sont utilisés dans le domaine des technologies de pointe. En effet, les copolymères amphiphiles à bloc en solution présentent un grand intérêt dû à leurs micelles que l'on emploie pour contrôler la libération des substances actives des médicaments dans l'organisme. De plus, ils ont la capacité de s'auto assembler sous différentes formes (micelles sphériques, micelles cylindriques, vésicules) et se comportent comme agents de surface (tensioactif), utiles dans la stabilisation des colloïdes.

Différentes techniques de synthèse de copolymères sont apparues ces dernières années, parmi lesquelles, les méthodes de polymérisation ionique et de polymérisation radicalaire contrôlée. Ces techniques permettent la préparation de copolymères à bloc avec une composition bien définie et des structures aux architectures moléculaires variées. Aujourd'hui, deux techniques de formation de copolymères à bloc sont privilégiées : La méthode du « grating onto » et du « grafting from ». La méthode du « grafting from » consiste à faire croître un polymère à partir du 1^{er} polymère ou squelette (macro-initiateur). Tandis que la

méthode du « grafting onto » consiste à coupler entre eux les blocs de polymères préalablement synthétisés. Cette dernière technique est particulièrement intéressante car elle permet un meilleur contrôle de la taille et de la polymolécularité des blocs. Toutefois, son défaut réside dans l'efficacité du coulage qui peut être contrebalancée par la présence de fonctions terminales très réactives et hautement chimio-sélectives. Dans ce contexte, l'intérêt des chercheurs s'est porté sur la réaction de cyclo-addition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par le Cuivre (I) dite de « *chimie click* ». Cette stratégie présente des avantages par rapport aux autres techniques de polymérisation, en permettant d'éviter les problèmes d'incompatibilité liés à la faible réaction de couplage entre les blocs et sera privilégiée dans notre étude.

Parmi les divers systèmes de libération des substances actives à échelle nanométrique, les systèmes élaborés à partir de protéines sont prometteurs en raison de leur biodégradabilité et biocompatibilité, alliés à une faible ou totale absence de toxicité ainsi qu'en termes d'antigénicité. Les protéines font partie d'une classe de molécules naturelles, ayant des fonctions spécifiques permettant leur application aussi bien dans le domaine de l'élaboration de matériaux que dans le secteur biomédical. Grâce à leur structure primaire bien définie et à la présence d'acides aminés chargés positivement et négativement, les nanoparticules de base protéinée permettent d'envisager la modification de la surface par adsorption électrostatique de molécules chargées, sans avoir besoin d'autres composés. De nombreuses études démontrent l'intérêt d'utiliser leur capacité à se lier aux molécules hydrophobes et à interagir avec d'autres biopolymères en vue d'élaborer des nanoparticules transporteuses de composés nutraceutiques, d'antioxydants, de médicaments pour la chimiothérapie, d'huiles, et de *flavors*, entre autres.

Les nanoparticules à base de protéines peuvent être facilement préparées dans des conditions douces, par coacervation par exemple. Cependant, la majorité des protéines et des peptides sont instables et ont tendance à s'agréger de manière désordonnée. La méthode la plus simple et la plus répandue pour dépasser ces contraintes, est de changer le milieu par modification du pH ou par addition d'agents stabilisants. Les surfactants non-ioniques peuvent être utilisés pour protéger et stabiliser les protéines contre l'agrégation, ce qui réduit l'adsorption entre les chaînes de protéines et, par conséquent, diminue les altérations de conformations et le processus d'agrégation. Parmi les surfactants non-ioniques, les copolymères amphiphiles à bloc font partie d'une

classe de surfactants très utilisés dans l'industrie pharmaceutique mais leur lente dégradabilité menace leur utilisation industrielle.

Le souci de l'industrie pharmaceutique de synthétiser des produits non-toxiques, biocompatibles et biodégradables, a motivé leurs recherches dans le sens de l'utilisation de biopolymères comme les sucres. Les sucres possèdent une large diversité de structure et jouissent de propriétés biologiques importantes telles que l'augmentation de la perméabilité, de la biocompatibilité et de la bioadhésion. Dans ce travail, nous présentons un surfactant récemment mis au point, totalement synthétisé à partir d'oligosaccharides de xyloglucane. Le dibloc amphiphile synthétisé, constitué exclusivement de blocs d'oligosaccharides biocompatibles et biodégradables, peut être utile comme surfactant polymérique de faible poids moléculaire, en stabilisant les protéines et en inhibant l'agrégation des nanoparticules à la base des protéines élaborées à partir de la gliadine et de la zéine.

Objectifs

Objectif Général

Ce travail a eu comme objectif général la synthèse de copolymères obtenus exclusivement à partir d'oligosaccharides de xyloglucane (XGO-*b*-XGO,Ac et DP7-*b*-DP7,Ac), aussi bien qu'étudier l'auto-assemblage de ces co-oligomères dans l'eau. Puis dans un 2nd temps, une évaluation de la capacité du copolymère XGO-*b*-XGO,Ac à stabiliser des nanoparticules de gliadine et zéine dans solutions aqueuses a été menée.

Stratégies Elaborées

- ✓ Digestion enzymatique de la xyloglucane de graines de tamarin (XGOs = DP9 (50%), DP8 (35%), DP7 (15%)) ;
- ✓ Fonctionnalisation des XGOs par l'addition d'un groupe propargyle ou azide via la réaction d'amination réductrice assisté par micro-ondes ;
- ✓ Peracétylation des XGOs fonctionnalisés par le groupe propargyle pour donner XGO,Ac ;
- ✓ Synthèse du dibloc XGO-*b*-XGO,Ac via la réaction de cyclo-addition 1,3 dipolaire de Huisgen ou '*chimie click*' ;
- ✓ Obtention de la fraction DP7 isolée à partir de la dégalactosylation enzymatique des XGOs ;
- ✓ Fonctionnalisation du DP7 par l'addition d'un groupe propargyle ou azide via la réaction d'amination réductrice assisté par micro-ondes ;
- ✓ Peracétylation du DP7 fonctionnalisé par le groupe propargyle pour donner DP7,Ac ;
- ✓ Synthèse du dibloc DP7-*b*-DP7,Ac via la réaction de cyclo-addition 1,3 dipolaire de Huisgen ou '*chimie click*' ;
- ✓ Caractérisation structurale des diblocs synthétisés, aussi bien que des produits intermédiaire de la synthèse, par spectrométrie de masse MALDI-TOF, spectroscopie infrarouge et ¹H RMN ;
- ✓ Détermination de la concentration micellaire critique des diblocs XGO-*b*-XGO,Ac et DP7-*b*-DP7,Ac par spectroscopie de fluorescence du pyrène ;

- ✓ Evaluation de l'auto-assemblage des diblocs XGO-*b*-XGO,Ac et DP7-*b*-DP7,Ac dans l'eau par diffusion de la lumière (DLS) et par microscopie électronique en transmission (MET) ;
- ✓ Suivi de la digestion enzymatique partielle des XGOs à la surface des nanoparticules de XGO-*b*-XGO,Ac par DLS et imagerie par MET ;
- ✓ Etude comparative de la stabilisation des nanoparticules de gliadine et zéine en utilisant le dibloc XGO-*b*-XGO,Ac par rapport au surfactant non-ionique commercial Pluronic F68.

Molecular weight influence of xyloglucan oligosaccharides on the self-assembly of fully oligosaccharide-based diblocks

Block copolymers with hydrophilic and hydrophobic segments can self-assemble in solution into micelles of various morphologies. In an aqueous environment, the hydrophobic blocks of the copolymer form the core of the micelles providing a loading space to encapsulate water-insoluble drugs, whereas the hydrophilic blocks form the corona or the outer shell, composed of compact chains stabilizing the micelle structure. One of the most interesting solution properties of block copolymers is their well-known ability to self-assemble into diverse organized structures (micelles, vesicles and bilayers) with great importance in nanotechnology applications (BORSALI, et al., 2003; GIACOMELLI, SCHMIDT, AISSOU, & BORSALI, 2010).

In recent years, the interest in self-assembly of ‘hybrid’ block copolymers nanoparticles, formed from a natural and biodegradable block and a synthetic polymer block have been increased due their applications in the biomedical field, as controlled drug delivery. Polysaccharide block copolymers exhibit physicochemical properties similar to synthetic block copolymers and, in addition, bring interesting characteristics as biodegradability, biocompatibility or bioactivity in some cases (SCHATZ & LECOMMANDOUX, 2010). Carbohydrates are one of the most abundant raw materials and show biodegradability, biocompatibility, and biorecognition abilities (BERTOZZI & KIESSLING, 2001; OTSUKA, et al., 2010; NAGAHORI, UCHIDA, KINJO, & YAMASHITA, 2012), being useful molecules in the block copolymer design and synthesis, and also as a component in delivery systems decreasing nonspecific interactions with proteins and cells. Carbohydrate chains on the nanoparticle surfaces probably prevented the particle aggregation due to the so-called “exclusion effect” and/or “polymer brush effect” (MARUYAMA, ISHIHARA, KIM, KIM, & AKAIKE, 1997).

The critical micelle concentration (CMC) of a copolymer is determined by many factors like nature and length of the core forming block (ALLEN, MAYSINGER, & EISENBERG, 1999). The CMC and the size of the self-assembled micelles could be modulated, for example, by changing the hydrophobic volume fraction as PCL content in a maltoheptaose-*b*-PCL copolymer (LI & ZHANG, 2008), whereas an

increase in the length of the hydrophilic block has a lesser extent on the CMC variation (ALLEN, MAYSINGER, & EISENBERG, 1999). On the other hand, an alteration of structural architecture of the oligosaccharide block could impart significant influence in the micelles morphology (OTSUKA, et al., 2010; OTSUKA, et al., 2012). While a linear oligosaccharide, like maltoheptaose is the hydrophilic block of a thermoresponsive copolymer (maltoheptaose-*b*-PNIPAM), allowed the formation of vesicles by self-assembly in aqueous solution above the LCST (OTSUKA, et al., 2010), copolymers synthesized with branched oligosaccharides, like cyclodextrin or xyloglucan (cyclodextrin-*b*-PNIPAM and xyloglucan-*b*-PNIPAM), showed solid and spherical nanoparticles after self-assembly in water (OTSUKA, et al., 2012).

In the biomedical materials field, polymeric micelles must possess several specific properties as biocompatibility, biodegradability, target specificity and stability in the body. In this work we synthesized two different copolymers obtained exclusively from xyloglucan oligosaccharides to evaluate the influence of the branched structure in some properties like CMC, size and morphology of the micelles. We propose a copolymer synthesized exclusively from tamarind seeds xyloglucan oligosaccharides (XGOs). In fact, XGOs are easily obtained from controlled enzymatic depolymerization of commercially available tamarind seeds xyloglucan using commercially available cellulases (endo- β -1,4-glucanase) (GREFFE, BESSUEILE, BULONE, & BRUMER, 2005; properties, 2009). Structurally, tamarind seeds xyloglucans are based on a linear β (1 \rightarrow 4)-glucan backbone (called G), regularly branched with α (1 \rightarrow 6)-xylosyl units (called X), that in turn can be further substituted with β (1 \rightarrow 2)-galactosyl units (called L). The cellulase-mediated enzymatic digestion yields hepta-, octa-, and nona-saccharides (XGOs) named usually using a letter code: XXXG (DP7), XXLG or XLXG (DP8), and XLLG (DP9), in the ratio 15:35:50 (Figure 1). A two-step, one-pot enzymatic digestion of xyloglucanes from tamarind seeds was performed too by using cellulase and a β -galactosidase from *Aspergillus Niger* in order to obtain the monodisperse heptasaccharide, named fraction DP7 in this report. Thereafter XGO-*b*-XGO,Ac and DP7-*b*-DP7,Ac diblocks were synthesized according to a strategy involving the regioselective functionalization on the reducing-end of blocks through a microwave-assisted reductive amination and then, one of blocks was made hydrophobic through ester protecting groups of hydroxyl groups. Finally, the blocks were linked by Cu(I)-catalyzed azide-alkyne

cycloaddition or “click chemistry” (CuAAC) (ROSTOVTSEV, GREEN, FOKIN, & SHARPLESS, 2002; TORNOE, CHRISTENSEN, & MELDAL, 2002).

In addition, to the self-assembly study of these oligosaccharide-based diblocks, we tried to reduce the volume fraction of hydrophilic block of XGO-*b*-XGO,Ac by the partial enzymatic digestion and removal of galactose units, resulting in another diblock, DP7-*b*-XGO,Ac. Discher and Eisenberg (1999) proposed a general empirical law which stipulates that flexible block copolymers harboring a hydrophilic weight fraction of $35 \pm 10\%$ are predicted to form polymeric vesicles also referred to as polymersomes. The elimination of the galactose units of the hydrophilic block lead to a weight fraction of this block around 32% and suggest the possibility of the self-assembly in a different morphology resulted from a controlled enzymatic degradation.

Experimental Section

Materials. Tamarind seed xyloglucan (XG, purity $\geq 95\%$) was kindly supplied from Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd (Osaka, Japan). Sodium cyanoborohydride, dry dimethylformamide and propargyl bromide were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Methanol, ethanol, acetic acid, acetic anhydride, ethyl acetate, hydrochloric acid, pyridine and acetonitrile were purchased from SDS with analytical grade quality (Carlo Erba). Propargylamine 99% was purchased from ACROS Organics and 4-dimethylaminopyridine from Lancaster Synthesis Inc. Galactosidase from *Aspergillus niger* and cellulose 3042A were gifts, respectively, from Megazyme (Bray, Ireland) and Genencor (USA). They were all used as received. Water was purified by a Milli-Q water purification system (Billerica, MA, U.S.A.). 2-Azidoethylamine and CuI.P(OEt)_3 were prepared according to the literature (EFTHYMIOU, HUYNH, OENTORO, PEEL, & DESAULNIERS, 2012; ZIEGLER, FOWLER, RODGERS, & WESTER, 1987), respectively.

Instrumentation. Reactions were followed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel 60F₂₅₄ (E. Merck) by charring with sulfuric acid solution ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 3:45:45). Flash-column chromatography was performed on silica gel 60 (40 – 63 μm , E. Merck) or C18 (Grace Reveleris[®] Silica Flash Cartridges, 12g). The ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded at 298 K using a 400 MHz Bruker

Avance DRX400. The solvent residual peaks of D₂O, (CD₃)₂SO and CDCl₃ were used as internal standards, at 4.79 ppm, 2.50 ppm and 7.26 ppm, respectively. Infrared (IR) spectra were recorded using a Perkin-Elmer Spectrum RXI FTIR Spectrometer. MALDI-TOF measurements were performed on a Bruker Daltonics Autoflex apparatus. Fluorescence spectra were recorded on a HITACHI F4500 spectrofluorimeter equipped with a thermostated cell holder set at 25.0 °C. The elastic and dynamic light scattering experiments were carried out using an ALV setup. Transmission electron microscopy (TEM) experiments were carried out using a CM220 Philips microscope.

Synthesis.

Xyloglucan oligosaccharides (XGO) (1). XGO from tamarind seeds (13 g) were dissolved in water (1 L), overnight. After complete solubilization, the commercial endoglucanase was added (2.7 mL) and the solution was kept at 37 °C for 5 hours or until complete digestion of XGO into xyloglucan oligosaccharides (DP7, DP8, DP9). The enzymatic reaction was monitored by thin layer chromatography, using acetonitrile/water (70/30) as eluent. Enzymatic inactivation was carried out when all starting material was consumed, by sudden warming in mineral oil bath at 150 °C. This solution was filtered through a filter paper Whatman, followed by evaporation with rotary evaporator to reduction of water volume and lyophilization to provide **(1)** as white solid (13 g). MALDI-TOF: M + Na⁺ *m/z*: 1085.3 (hepta-); 1247.3 (octa-); 1409.4 (nona-saccharide). ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 5.25-5.20 (m, H-1 Xyl^{IV}); 4.97-4.96 (m, H-1 Xyl^{II,III}); 4.55-4.70 (m, H-1 Glc, Gal); 3.35-4.01 (m, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl, Gal) ppm.

***XGO*_{N3} (2).** To a suspension of XGOs **(1)** (1.0 g, 0.78 mmol) (made up of a mixture of hepta-, octa-, and nona-saccharides in the ratio 0.15:0.35:0.50, respectively) in water/methanol (8 mL; 1:1, v/v) acidified with acetic acid (until pH 5.0) were added NaBH₃CN (98.0 mg; 1.56 mmol) and 2-azidoethylamine (98.0 mg; 1.56 mmol). The reaction mixture was heated to a microwave system at 80 °C for 2 hours. Precipitation in ethanol (80 mL) was carried out and the suspension was centrifuged (8000 rpm for 10 min at 4 °C). The supernatant was removed and this procedure was repeated once. The residue was dissolved in water, lyophilized and purified by flash chromatography (H₂O:MeOH) to provide **(2)** as white solid, 0.703 g (66% yield). IR

(KBr): $\nu = 3300$ (O-H, sugars), 2894 (C-H, sugars), 2100 (N_3 , azide) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 5.2$ (m, H-1 Xyl^{IV}), 4.97-4.96 (m, H-1 Xyl^{II,III}), 4.62-4.50 (m, H-1 Glc, Gal), 4.04-2.88 (m, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl, Gal and NCH_2), 1.93 ppm (s, CH_2N_3); MALDI-TOF: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z : 1155.34 (hepta-), 1317.39 (octa-) 1479.44 (nona-saccharide).

XGO_Propargyl (3). To a suspension of XGOs (1.0 g, 0.79 mmol) (**1**) (made up of a mixture of hepta-, octa-, and nona-saccharides in the ratio 0.15:0.35:0.50, respectively) in water/methanol (8 mL; 1:1, v/v) acidified with acetic acid (until pH 5.0) were added NaBH_3CN (98.0 mg; 1.56 mmol) and propargylamine (86.3 mg; 1.56 mmol). The reaction mixture was heated to a microwave system, at 80 °C for 2 hours. Precipitation in ethanol (80 mL) was carried out and the suspension was centrifuged (8000 rpm for 10 min at 4 °C). The supernatant was removed and this procedure was repeated once. The residue was dissolved in water, lyophilized and purified by flash chromatography ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$) to provide (**3**) as white solid, 0.497 g (58% yield). IR (KBr): $\nu = 3398$ -3368 (O-H, sugars), 2925 (C-H, sugars), 2115 (C-C, alkyne) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 5.18$ -5.19 (m, H-1 Xyl^{IV}), 4.95-4.97 (m, H-1 Xyl^{II,III}), 4.53-5.59 (m, H-1 Glc, Gal), 3.36-3.99 (m, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl, Gal and NCH_2), 2.68 and 2.81-2.92 ppm (m, $\text{C}\equiv\text{CH}$); MALDI-TOF: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z : 1124.40 (hepta-), 1286.46 (octa-), 1448.52 (nona-saccharide).

XGO, Ac_Propargyl (4). A solution of XGO-propargyl (0.5 g, 0.35 mmol) (**3**) in pyridine (50 mL), Ac_2O (20 mL) and DMAP was stirred at room temperature up to the complete disappearance of the starting material, followed by TLC (eluent: 7:3, acetonitrile-water). Methanol was added and then the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in ethyl acetate (200 mL) and successively washed with HCl 1 mol L^{-1} (200 mL) and water (200 mL). The organic layer was dried on Na_2SO_4 and concentrated to dryness *in vacuo* with rotary evaporator. Purification by column chromatography (SiO_2 , Ethyl acetate) afforded (**4**) as a yellowish powder, 0.725 g (81% yield). IR: $\nu = 2115$ (C-C, alkyne), 1751 (C=O, ester) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.39$ -3.65 (m, H-1 Xyl^{IV}, H-1 Xyl^{II,III}, H-1 Glc, Gal, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl, Gal and NCH_2), 2.53, 2.32-2.34 and 2.24 (m, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.95-2.19 (m, CH_3 , OAc); MALDI-TOF: $\text{M} + \text{Na}^+$ m/z : 2294.61 (octa-), 2582.63 (nona-saccharide).

XGO-*b*-XGO,Ac (5). To a solution of XGO, Ac_propargyl (0.1 g, 0.039 mmol) (**4**) and 1 Eq. XGO_N₃ (53.2 mg; 0.039 mmol) (**2**) in dry dimethylformamide (1 mL) was added CuI.P(OEt)₃ (6.9 mg; 0.0195 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 68 °C for 3 hours until TLC showed no change of the starting material consumption. Methanol was added and the reaction mixture was evaporated under reduced pressure in the presence of silica. The crude solid was purified by flash column chromatography on silica gel (eluent: 8:2, acetonitrile-water and 7:3, acetonitrile-water) to yield the XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) as a white solid, 0.169 g (95% yield). IR (KBr): $\nu = 3455\text{-}3395$ (OH, sugars), 2939-2894 (C-H, sugars), 1751 (C=O, ester) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 8.02, 7.94$ and 7.83 (3x s, H-5 triazole), 5.34-2.48 (m, H-1 Xyl^{IV}, H-1 Xyl^{II,III}, H-1 Glc, Gal, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl, Gal and NCH₂), 2.14-1.88 ppm (m, CH₃ (OAc)); MALDI-TOF: M + Na⁺ *m/z*: 4039.26 (NonAcDP9-*b*-DP9Ac), 3877.17 (NonAcDP8-*b*-DP9Ac), 3751.11 (NonAcDP9-*b*-DP8Ac), 3589.03 (NonAcDP8-*b*-DP8Ac), 3462.98 (NonAcDP9-*b*-DP7Ac), 3300.92 (NonAcDP8-*b*-DP7Ac).

Fraction DP7 of xyloglucan oligosaccharides (DP7) (6). XGO from tamarind seeds (5 g) were dissolved in water (385 mL), overnight. After complete solubilization, the commercial endoglucanase (1 mL) and β -galactosidase (0.6 mL) were added and the solution was kept at 37 °C for 5 hours or until complete digestion of XGO into xyloglucan oligosaccharides (DP7). The enzymatic reaction was monitored by thin layer chromatography, using acetonitrile/water (70/30) as eluent. Enzymatic inactivation was carried out when all starting material was consumed, by sudden warming in mineral oil bath at 150 °C. This solution was filtered through a filter paper Whatman, followed by evaporation with rotary evaporator to reduction of water volume and lyophilization to provide (**6**) as white solid (5 g). ¹H NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 5.16\text{-}5.20$ (m, H-1 Xyl^{IV}); 4.86-4.90 (m, H-1 Xyl^{II,III}); 4.48-4.59 (m, H-1 Glc); 3.23-3.94 (m, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl) ppm; MALDI-TOF: M + Na⁺ *m/z*: 1085.3.

DP7_N₃ (7). To a suspension of DP7 fraction of xyloglucan oligosaccharides (**6**) (1.0 g, 0.94 mmol) in water/methanol (8 mL; 1:1, v/v) acidified with acetic acid (until pH 5.0) were added NaBH₃CN (118.7 mg; 1.98 mmol) and 2-azidoethylamine (135.6 mg; 1.98 mmol). The reaction mixture was heated to a microwave system at 80 °C for 2

hours. Precipitation in ethanol (80 mL) was carried out and the suspension was centrifuged (8000 rpm for 10 min at 4 °C). The supernatant was removed and this procedure was repeated once. The residue was dissolved in water, lyophilized and purified by flash chromatography (H₂O:MeOH) to provide (**7**) as white solid, 0.40 g (40% yield). IR (KBr): ν = 3368 (O-H, sugars), 2922 (C-H, sugars), 2110 (N₃, azide) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 4.96-4.98 (m, H-1 Xyl^{IV}); 4.56-4.69 (m, H-1 Glc); 4.36-3.09 (m, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl and NCH₂); 2.83-2.89 (CH₂N₃) ppm; ESI: [M + H]⁺ *m/z*: 1156.5.

DP7_Propargyl (8). To a suspension of DP7 fraction of xyloglucan oligosaccharides (**6**) in water/methanol (8 mL; 1:1, v/v) acidified with acetic acid (until pH 5.0) were added NaBH₃CN (124.86 mg; 1.98 mmol) and propargylamine (108.9 mg; 1.98 mmol). The reaction mixture was heated to a microwave system, at 80 °C for 2 hours. Precipitation in ethanol (80 mL) was carried out and the suspension was centrifuged (8000 rpm for 10 min at 4 °C). The supernatant was removed and this procedure was repeated once. The residue was dissolved in water, lyophilized and purified by flash chromatography (H₂O:MeOH) to provide (**8**) as white solid, 0.52 g (48% yield). IR (KBr): ν = 3385 (O-H, sugars), 2905 (C-H, sugars) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 4.96-4.99 (m, H-1 Xyl^{IV}); 4.56-4.69 (m, H-1 Glc); 3.35-4.21 (m, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl, and NCH₂C); 2.99-3.36 (m, C \equiv CH) ppm; MALDI-TOF: M + Na⁺ *m/z*: 1124.6.

DP7, Ac_Propargyl (9). A solution of DP7-propargyl (407 mg, 0.37 mmol) (**8**) in pyridine (50 mL), Ac₂O (20 mL) and DMAP was stirred at room temperature up to the complete disappearance of the starting material, followed by TLC (eluent: 7:3, acetonitrile-water). Methanol was added and then the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in ethyl acetate (200 mL) and successively washed with HCl 1 mol L⁻¹ (200 mL) and water (200 mL). The organic layer was dried on Na₂SO₄ and concentrated to dryness *in vacuo* with rotary evaporator. Purification by column chromatography (SiO₂, Ethyl acetate) afforded (**10**) as a yellowish powder, 0.29 g (40% yield). IR: ν = 2117 (C-C, alkyne), 1749 (C=O, ester) cm⁻¹; ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ = 3.63-5.38 (m, H-1 Xyl^{IV}, Xyl^{II,III}, Glc; H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl e NCH₂C); 1.93-2.14 (m, OCH₃); 1.52-1.67 (m, C \equiv CH) ppm; MALDI-TOF: M + Na⁺ *m/z*: 2006.5.

DP7-*b*-DP7,Ac (10). To a solution of DP7, Ac_propargyl (154 mg, 0.077 mmol) (**9**) and DP7_N₃ (87.9 mg; 0,077 mmol) (**7**) in dry dimethylformamide (1 mL) was added CuI.P(OEt)₃ (13.8 mg; 0.039 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 68 °C for 3 hours until TLC showed no change of the starting material consumption. Methanol was added and the reaction mixture was evaporated under reduced pressure in the presence of silica. The crude solid was purified by flash column chromatography on silica gel (eluent: 8:2, acetonitrile-water and 7:3, acetonitrile-water) to yield the DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) as a white solid, 100 mg (41% yield). IR (KBr): $\nu = 3395$ (O-H, sugars), 2940 (C-H, sugars), 1754 (ester) cm⁻¹; ¹H RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): $\delta = 8.06, 7.95$ and 7.86 (3x s, H-5 triazole); 5.38-3.15 (m, H-1 Xyl^{IV}, Xyl^{II,III}, Glc; H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl); 2.08-1.91 (m, OCH₃) ppm; MALDI-TOF: M + Na⁺ m/z : 3139.02.

Sample preparation and experimental setup

Dynamic Light Scattering Measurements.

The aqueous solutions of XGO-*b*-XGOAc (**5**) and DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) in different concentrations were stirred overnight at 40 °C, then filtered through 0.45 μm MILLIPORE Millex LCR filter. Scattering measurements were performed using an ALV-CGS 8F S/N 069 laser goniometer, which consists of a 22 mW HeNe linear polarized laser operating at a wavelength of 632.8 nm, an ALV-5004 multiple τ digital correlator with 125 ns initial sampling time. The samples were kept at a constant temperature of 25.0 ± 0.1 °C during all the experiments. The measurements were recorded at 90°. The aqueous solutions were put in 10 mm diameter glass cells. The minimum sample volume required for the experiment was 1 mL. Data were collected using digital ALV Correlator Control software, and the counting time for each sample was of 300 s.

Fluorescence Measurements.

The critical micelle concentration (CMC) for XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) and DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) was determined by fluorescence spectroscopic analysis, using pyrene as a hydrophobic fluorescent probe. The steady-state fluorescence emission spectra of pyrene were recorded on a Hitachi F4500 spectrofluorimeter equipped with a thermostated cell holder at 25.0 ± 0.1 °C, and the samples were continuously stirred in a quartz cell

of 10 mm path length. The concentration of the probe was fixed at $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and the sample concentration range of $3.0 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ to 1.2 mg mL^{-1} . The probe was excited at 336 nm, and the emission spectrum was collected in the range 360 – 450 nm. Both slit width settings of excitation and emission monochromators were adjusted to 2.5 nm. The intensity of the first (I_{m1}) vibronic band over the third (I_{m3}), I_{m1}/I_{m3} ratio located at 372.8 and 384 nm in the emission spectrum of monomeric pyrene provides an estimation of the polarity in a pyrene environment.

Transmission Electron Microscopy (TEM) Measurements.

Transmission electron microscopy (TEM) images were recorded on a JEM-1011 microscope operating at 80 kV. The samples were analyzed using the same concentrations that were determined by light scattering. Solutions (4 μL) were dropped on a copper-coated grid, which was made hydrophilic by glow discharge treatment, and then dried at room temperature.

Partial enzymatic degradation of XGO-*b*-XGO,Ac.

A solution of XGO-*b*-XGO,Ac was submitted to a partial enzymatic digestion by β -galactosidase and removal of diblock's galactose units. These micelles (DP7-*b*-XGO,Ac) (**11**) were obtained in order to observe the influence of the decrease in hydrophilic block volume in micellar size and morphology. A total of 3.0 mg mL^{-1} of XGO-*b*-XGO,Ac was stirred (300 rpm) in water overnight at 40 °C, followed by cooling to room temperature, and then, filtered through 0.45 μm MILLIPORE Millex LCR filter. The enzyme β -galactosidase (1 U mL^{-1}) was added to this solution and for the follow in DLS, the enzymatic reaction was conducted at 37 °C for 5 hours inside the cuvette to measure in situ the micelle diameter and light scattering intensity with time.

Results and Discussion

Synthesis and characterization of XGO-*b*-XGO,Ac and DP7-*b*-DP7,Ac diblocks

Xyloglucan oligosaccharides, denoted by XGOs, were obtained by enzymatic digestion of tamarind seed xyloglucan powder by commercially available cellulase, while the fraction DP7 was obtained by an enzymatic degalactosylation using β -galactosidase from *A. niger*.

In order to build XGO-*b*-XGO,Ac and DP7-*b*-DP7,Ac diblocks by means of click chemistry, we chose to introduce the azide function to free XGOs and fraction DP7, and the alkyne function to the hydrophobic oligosaccharides (Figure 1).

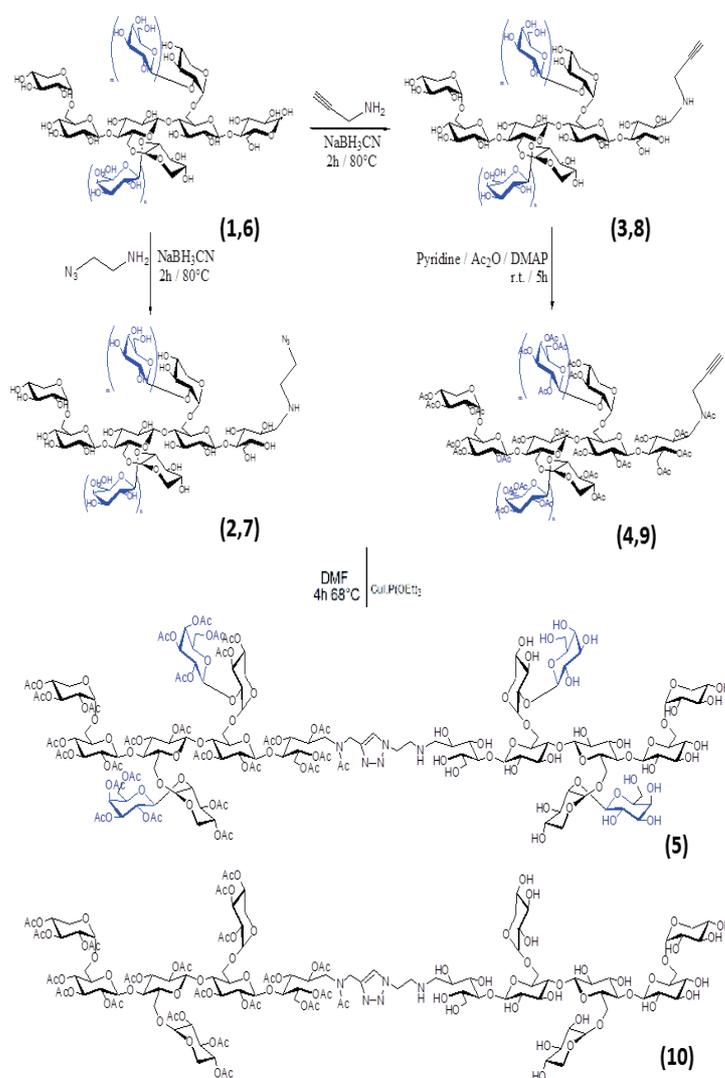


Figure 1. Synthetic path of XGO-*b*-XGO,Ac and DP7-*b*-DP7,Ac (in blue are pointed out the galactose units, representing DP8 and DP9 fractions).

Firstly, oligosaccharides (of XGO-*b*-XGO,Ac and DP7-*b*-DP7,Ac) were chemoselectively functionalized with 2-azidoethylamine linker by microwave-assisted reductive amination at 80°C for 2 hours. The reaction involves condensation of the ring-opened (carbonyl) form of the reducing-end of oligosaccharides with the amine counterpart. The resulting Schiff base intermediate is relatively unstable (DALPATHADO, JIANG, KATER, & DESAIRE, 2005) and is quickly

reduced to the corresponding secondary amine by action of the reducing agent, NaBH₃CN. The chemical structure of **2** and **7** were confirmed by ¹H-NMR and FT-IR. Functionalization of oligosaccharides had led to the appearance of a band in infrared spectra in the region of 2100 cm⁻¹, due to vibrations of axial deformation of the conjugated double bonds of N₃ group. The confirmation of the molecular weight of these intermediates was performed by mass spectrometry MALDI-TOF which clearly showed a mixture of hepta-, octa- and nona-functionalized saccharides (**2**) ([M(DP9) + Na⁺] = 1479.4; [M(DP8) + Na⁺] = 1317.3; [M(DP7) + Na⁺] = 1155.3) and the molar mass of the azide-containing hepta-saccharide (**7**) ([M(DP7) + Na⁺] = 1155.3) (Figure 2). XGO_N₃ (**2**) and DP7_N₃ (**7**) were obtained from the reaction mixture by simple precipitation in ethanol with 66% and 40% of yield, respectively.

Secondly, following the same procedure, the XGOs were functionalized with a propargylamine linker to afford XGO_propargyl (**3**) and DP7_propargyl (**8**) with 58% and 48% of yield, respectively. As previously, the chemical structures were confirmed by ¹H-NMR, FT-IR and mass spectrometry. The functionalization of compounds was demonstrated by the presence of a band at 2115 cm⁻¹ in the infrared spectra, resulting from the stretching of the alkyne triple bond, and the molar mass of the alkyne-functionalized oligosaccharides (**3**) ([M(DP9) + Na⁺] = 1448.5; [M(DP8) + Na⁺] = 1286.4; [M(DP7) + Na⁺] = 1124.3) and (**8**) ([M(DP7) + Na⁺] = 1124.6) were confirmed by mass spectrometry.

Peracetylation of XGO_propargyl and DP7_propargyl with acetic anhydride and DMAP in pyridine provided the hydrophobic block, XGO,Ac_propargyl (**4**) and DP7,Ac_propargyl (**9**), respectively. The synthesis of the hydrophobic block via hydroxyl peracetylation of the xyloglucan oligosaccharides functionalized with propargylamine was confirmed by the disappearance of the hydroxyl band in the infrared spectra and the presence of the band related to the carbonyl stretching of acetate group at 1751 cm⁻¹ for (**4**) and at 1794 cm⁻¹ for (**9**). Besides in the ¹H NMR spectra the peaks related to the chemical shifts of the hydrogen of the acetate groups were perfectly identified in region of 2.24 to 1.86 ppm. The peracetylation was confirmed too by mass spectrometry MALDI-TOF.

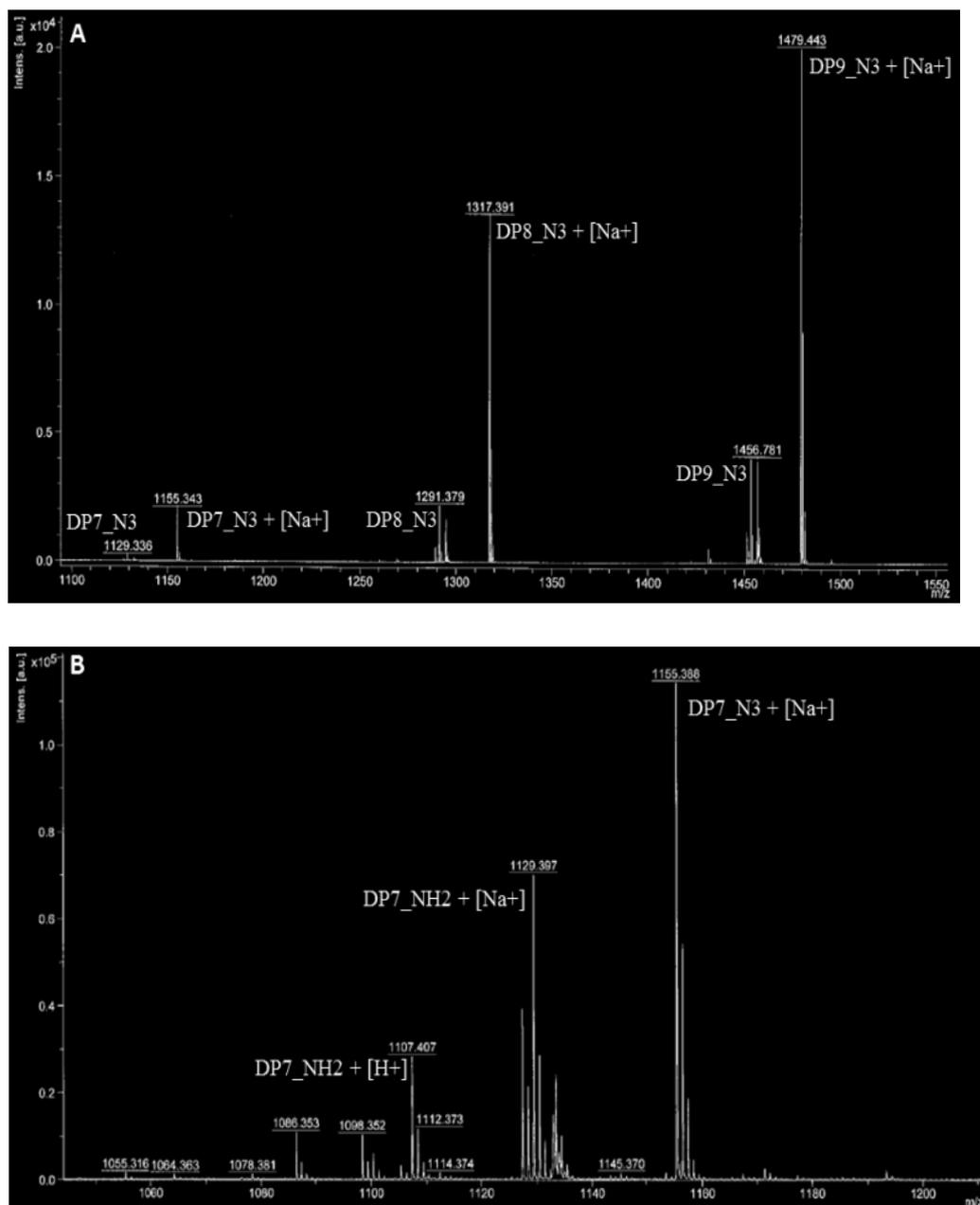


Figure 2. MALDI-TOF spectra of XGO_N₃ (**2**) and DP7_N₃ (**7**).

Then, we performed “click” reaction in dry DMF between XGO_N₃ (**2**) / XGO,Ac_propargyl (**4**) and DP7_N₃ (**7**) / DP7,Ac_propargyl (**9**) using CuI.P(OEt)₃ as catalyst under argon atmosphere at 68 °C for 4 hours then for 48 hours at room temperature (Figure 1). The reaction was monitored by TLC, until no changes of the starting material consumption were observed, and the product was isolated by flash chromatography on silica gel, using acetonitrile/water as eluent. FT-IR analysis of purified products showed the complete disappearance of transmittance due to the azido groups (2100 cm⁻¹) (Figure 3), indicating

that there was no unreacted azide group in XGO-*b*-XGOAc and DP7-*b*-DP7,Ac diblocks. Moreover, the ^1H NMR spectra showed resonances at the range of 7.85 – 8.0 ppm, corresponding to the olefinic proton associated with the 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole isomer moiety in accordance with assigned structures (Figure 4). In addition, the characteristic signals due to the protons of the non-acetylated xyloglucan, and the protons of the acetylated xyloglucan were also observed.

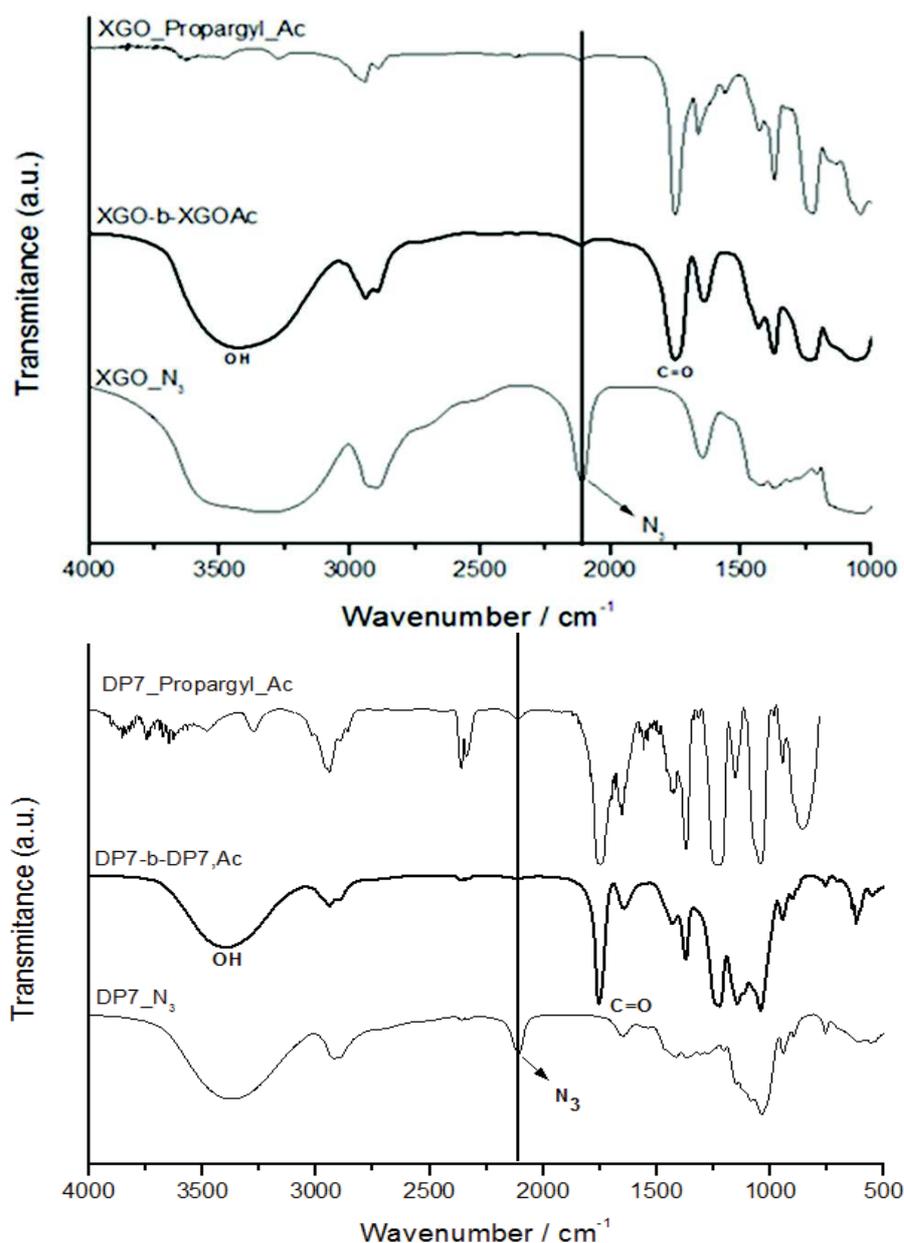


Figure 3. FTIR spectra of XGO_N₃ (2); XGO,Ac_Propargyl (4); XGO-*b*-XGO,Ac (5); DP7_N₃ (7); DP7, Ac_Propargyl (9) and DP7-*b*-DP7,Ac (10).

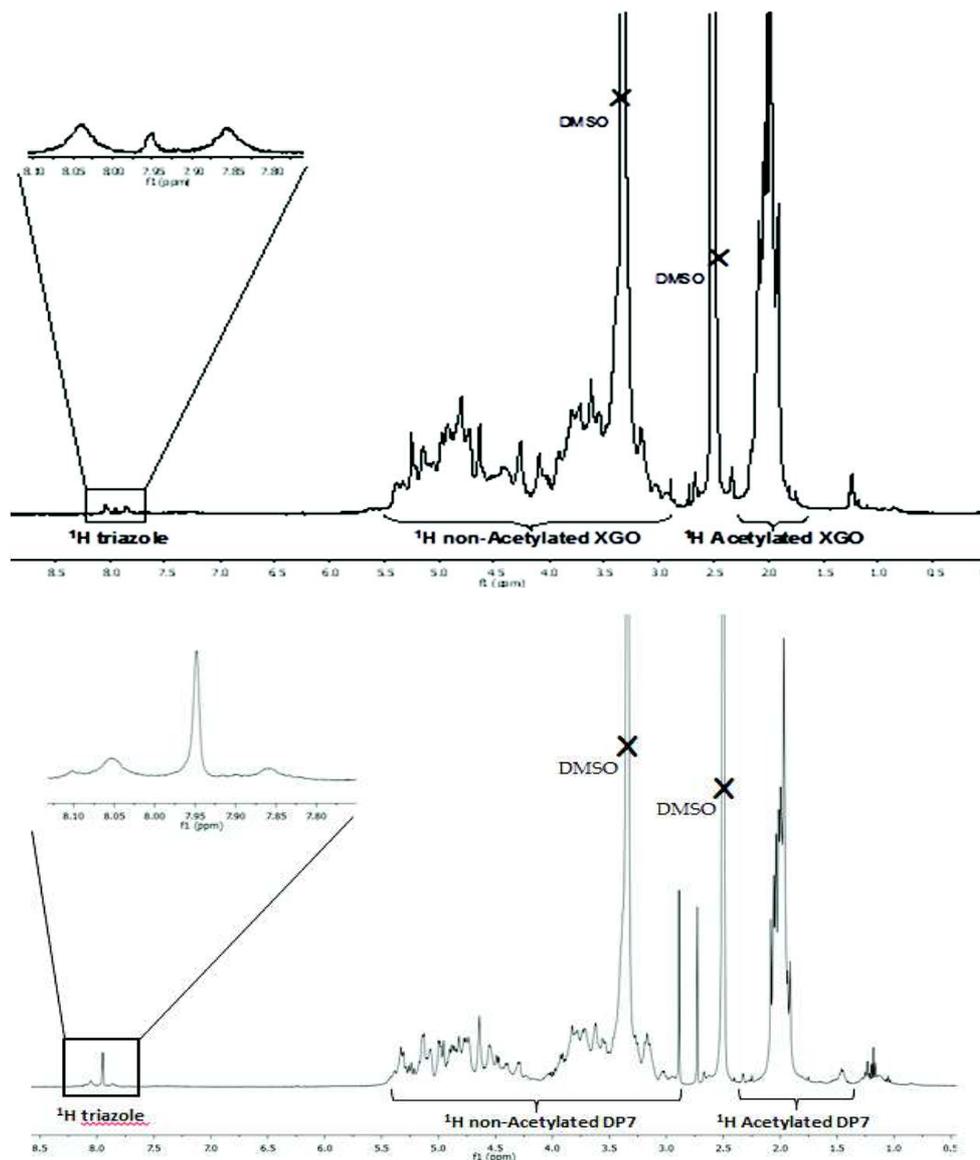


Figure 4. ^1H RMN spectra of XGO-*b*-XGO,Ac and DP7-*b*-DP7,Ac.

Self-assembly of XGO-*b*-XGO,Ac and DP7-*b*-DP7,Ac diblocks in water

The CMC of a copolymer is affected by many factors, some of which are the nature and length of the core forming block, length of the hydrophilic block and the presence of hydrophobic compounds. The nature and length of the core-forming block have the most profound effect on the CMC (ALLEN, MAYSINGER, & EISENBERG, 1999). Studies demonstrate that the use of a copolymer system with a low CMC value may increase *in vivo* stability of the micelles, being a relevant subject to be evaluated to medical applications. The CMC values of

XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) and DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) were determined by a fluorescence technique with pyrene as a probe, which has been extensively used to monitor the CMC of a variety of aggregation processes.

As a reminder, XGOs, obtained from xyloglucan tamarind seeds, are composed of a cellotetraose backbone chain that is fully substituted by α -(1,6)-linked xylose units except for the glucose unit at the reducing end, and some of the xylose residues are β -D-galactosylated (FRY, et al., 1993). The synthesis of the diblocks in this study was based on the preparation of a XGO-*b*-XGO,Ac diblock (**5**) – composed by the combination of a mixture of XGO (DP7, DP8, DP9) – and another diblock – DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) – composed by an unique fraction of degalactosylated XGO (DP7). Both systems will give precious information on the influence of the blocks polydispersity in micelles formation. The oligosaccharide-based diblocks showed a CMC value of 0.04 mg mL^{-1} for XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) and 0.22 mg mL^{-1} for DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) (Figure 5), which are the range reported for low molecular weight nonionic surfactant (ZHANG, ZHANG, & SOMASUNDARAN, 2004).

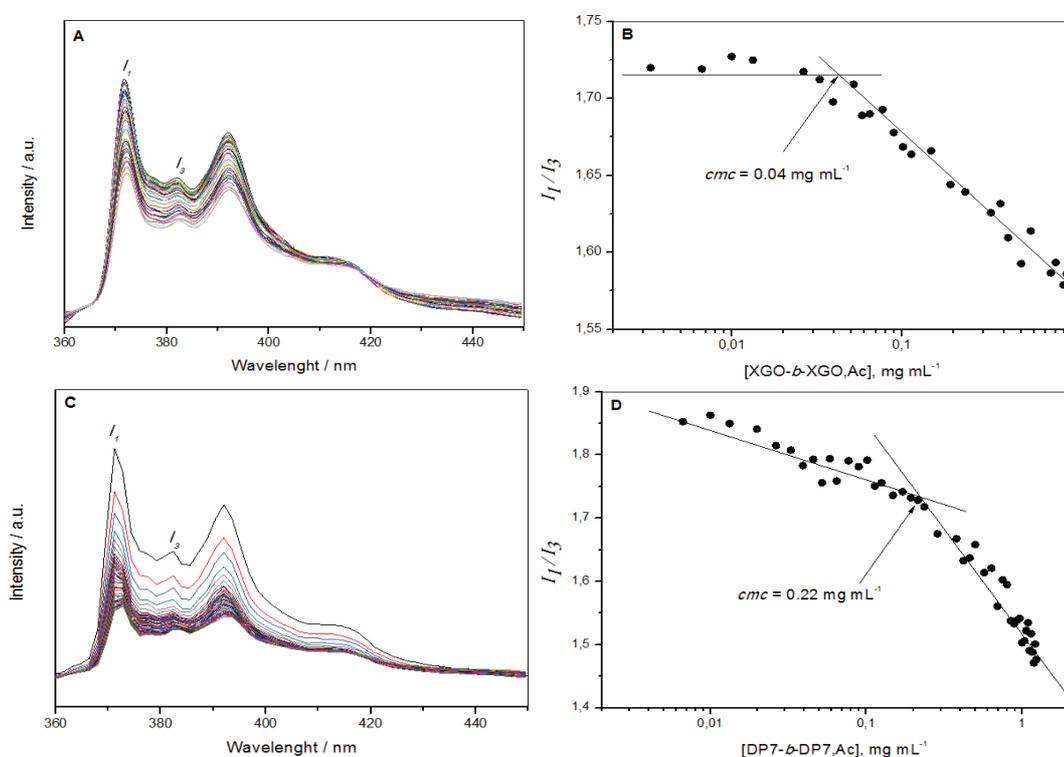


Figure 5. Pyrene fluorescence emission spectra and the corresponding variation in the I_1/I_3 ratio as a function of XGO-*b*-XGOAc (**5**) (A,B) and DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) (C,D) concentration ($[\text{pyrene}] = 6.10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$).

For amphiphilic block copolymers, the CMC value is closely dependent of the architecture, the chemical nature and length of the blocks. The hydrophobic block has an important role in micellization since an increase of the hydrophobic block length increase the polymer hydrophobicity in the aqueous solvent, leading to a lower cmc value (LIU, ZHOU, WU, NACE, & CHU, 1997). In this work, an increase by five times was observed to the CMC value of DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) compared to the XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) diblock. Some studies show that for a series of copolymers, if the hydrophilic block is held constant, an increase of hydrophobic block length will reduce the CMC value, while changing the hydrophilic block length does not have a significant effect in the micellization concentration (ALLEN, MAYSINGER, & EISENBERG, 1999).

The architecture of the block copolymers has a strong influence on the micelle formation and on the size of the micelles (BONNÉ, LÜDTKE, JORDAN, & PAPADAKIS, 2007), since the CMC is the competition consequence of entropic and enthalpic effects (CHENG & CAO, 2009). DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) in water showed a CMC value of 0.22 mg mL⁻¹, greater than the CMC value obtained for maltoheptaose-based diblocks, Mal₇-“click”-AcMal₇, a linear oligosaccharide with seven □(1-4)-glucosyl units (MODOLON, OTSUKA, FORT, MINATTI, BORSALI, & HALILA, 2012), that was 0.1 mg mL⁻¹. As previously mentioned, the xyloglucan oligosaccharides are branched (FRY, et al., 1993), and increasing the branching degree of the chains leads to an increase of the diblock CMC value. Branched tails have lower configurational entropy and configurational entropy decreases in the aggregation process (VOROV, LIVESAY, & JACOBS, 2008). While linear tails exist in broad space around the connecting point and have a large interface exposing to other tails, these copolymers could aggregate into the micelle at lower concentration, and the CMC value increases in copolymers with branched tails (CHENG & CAO, 2009).

Self-assembly in solution of amphiphilic diblocks was evaluated through light scattering measurements by direct dilution of XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) and DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) in deionized water. Amphiphilic diblocks solutions prepared at different concentrations were detected at 90° detection angle by DLS. The results in number distribution showed that the diblock XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) self-organizes in water to form, predominantly, micelles with a hydrodynamic diameter of about 20 nm, independently of the diblock concentration in the solution (Figure 6). Because large particles scatter much more light than small particles, the

intensity distribution (Figure 6E) showed bigger aggregates whose size were 150 nm in diameter. To confirm the size and to check micelles morphology, we performed TEM measurements by comparing the results obtained by light scattering experiments. The TEM image of XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) in water at 3.0 mg mL⁻¹ (Figure 7) indicated that the formed micelles have spherical morphology and average diameter about 25 nm, supporting the DLS results.

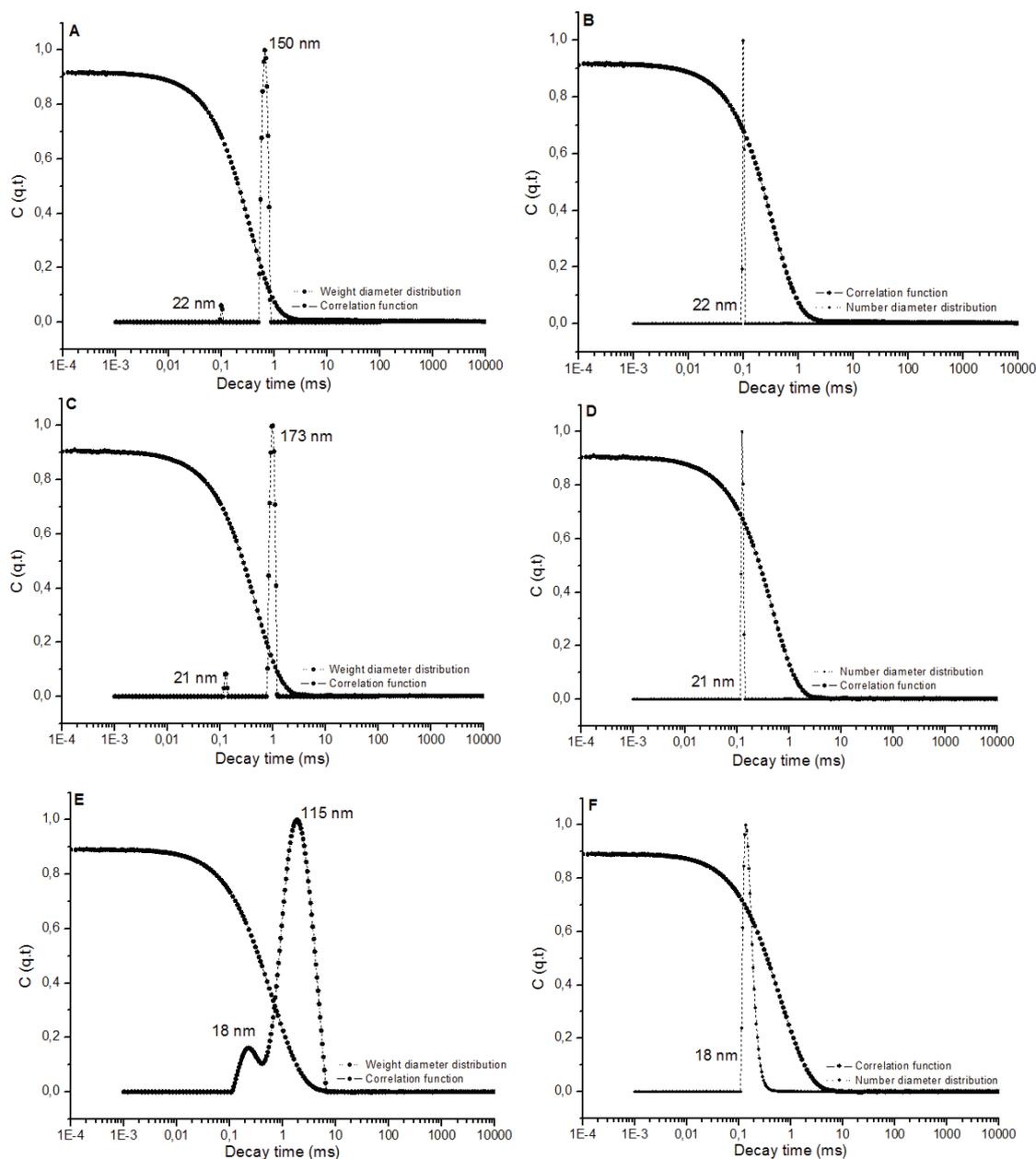


Figure 6. Dynamic light scattering autocorrelation function and diameter distribution of XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) in water by DLS (**A,B**: 1.0 mg mL⁻¹; **C,D**: 3.0 mg mL⁻¹; **E,F**: 5.0 mg mL⁻¹, scattering angle = 90°, temperature = 25 °C).

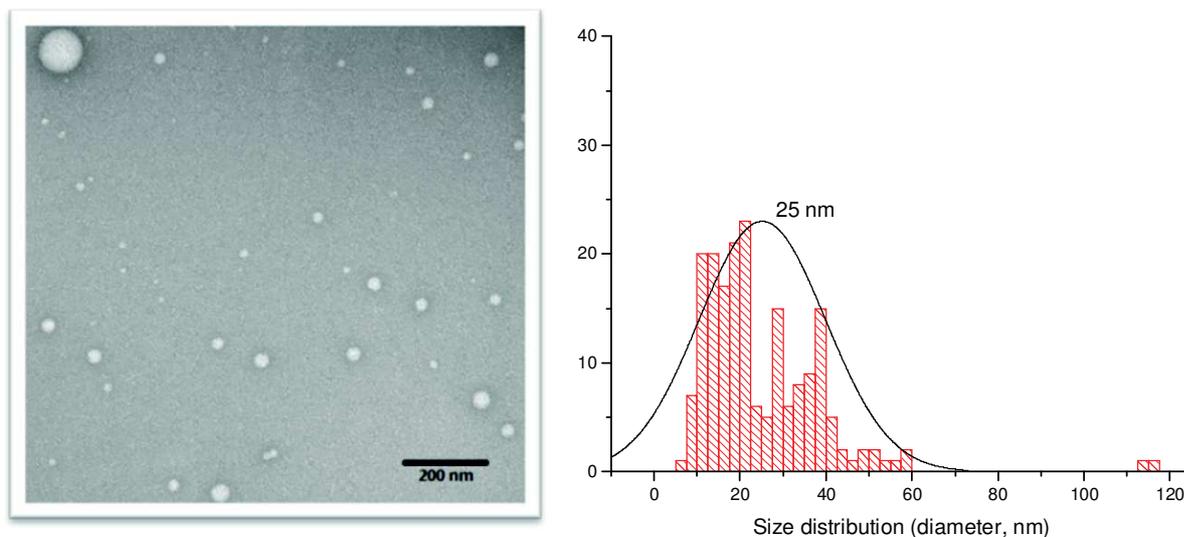


Figure 7. Transmission electron micrograph with size distribution of XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) micelles (3 mg mL^{-1}).

Micelles with mean size distribution about 6 nm were observed by DLS to DP7-*b*-DP7,Ac diblock (**10**) in water (Figure 8). The elimination of galactose units on both blocks (hydrophilic and hydrophobic) has led to a significant decrease in the average diameter of micelles (about 4x). It was observed that the reduction of only 10% in the XGO-*b*-XGO,Ac diblock (**5**) molar mass, compared to DP7-*b*-DP7,Ac diblock (**10**), decreases the average micellar size in 70%. Besides the influence in the CMC value, the size and architecture of the copolymers influence the micelle's size formed by self-association in aqueous solutions because the steric situation of the blocks may encounter to optimize the hydrophobic interaction and entropic contributions due to the blocks (BONNÉ, LÜDTKE, JORDAN, & PAPADAKIS, 2007).

The organization of the hydrophobic blocks chains is favored by decreasing the branching degree of the structure (DP7-*b*-DP7,Ac (**10**)), and the chains packing in the core is increased and consequently the micelle core size is reduced. On the other hand, water molecules create a random network of hydrogen bonds between the xyloglucan hydroxyls of the hydrophilic block. The removal of the galactose units (DP7-*b*-DP7,Ac (**10**)) have an important effect on the solubility and the association degree between xyloglucan oligosaccharides, decreasing the micellar hydration layer (EMEMURA & YUGUCHI, 2009). A combination of factors such as diblock molar mass reduction, hydrophobic interaction increasing and hydration degree decreasing of

the hydrophilic shell may explain the significant decrease in the micelles mean size.

The self-assembly of DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) in water led to the formation of spherical micelles with average diameter of 5 nm observed in TEM images (Figure 9), which supported the DLS results.

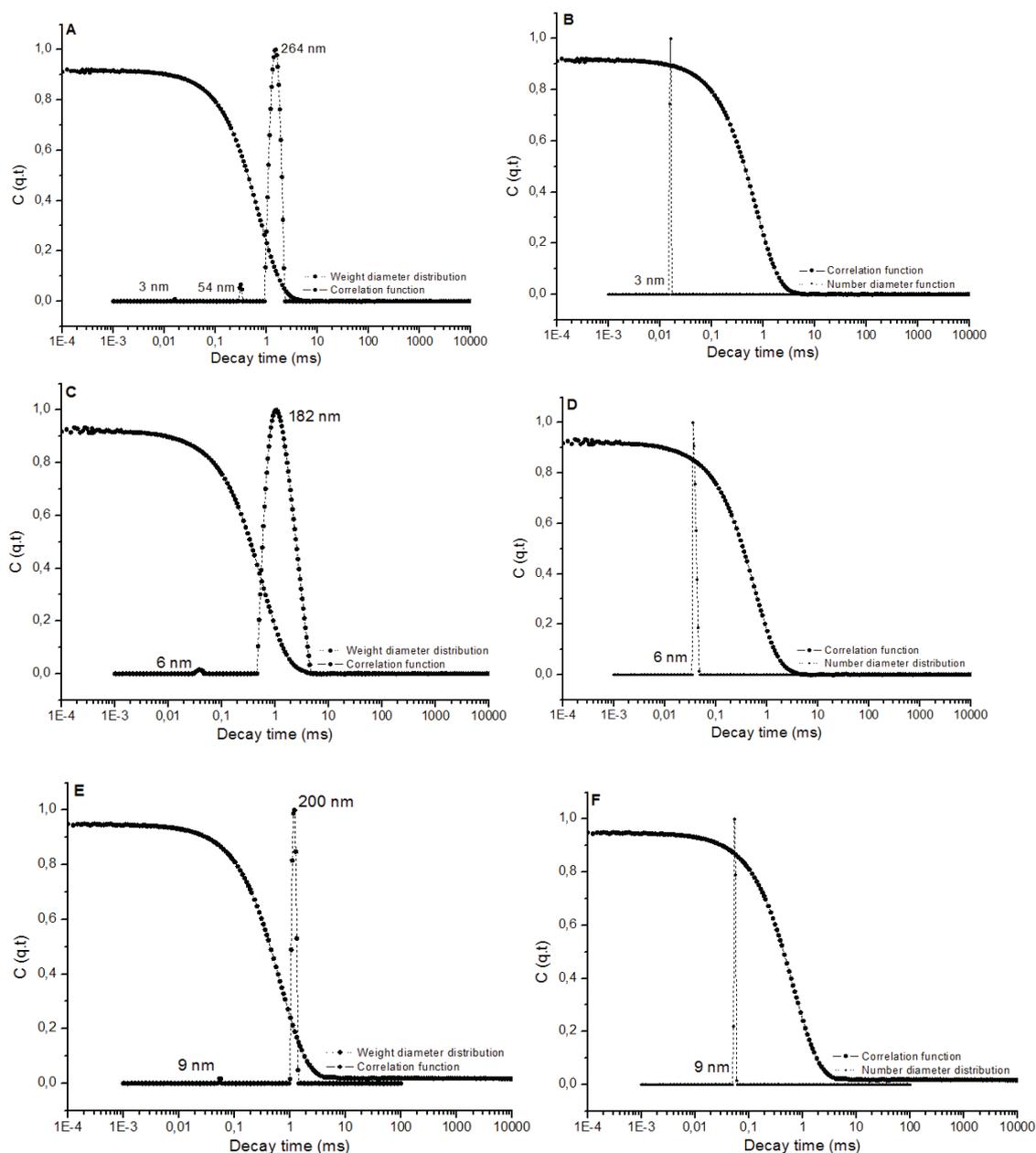


Figure 8. Dynamic light scattering autocorrelation function and diameter distribution of DP7-*b*-DP7,Ac (**10**) in water by DLS (A,B: 1 mg mL⁻¹; C,D: 3 mg mL⁻¹; E,F: 5 mg mL⁻¹, scattering angle = 90°, temperature = 25 °C).

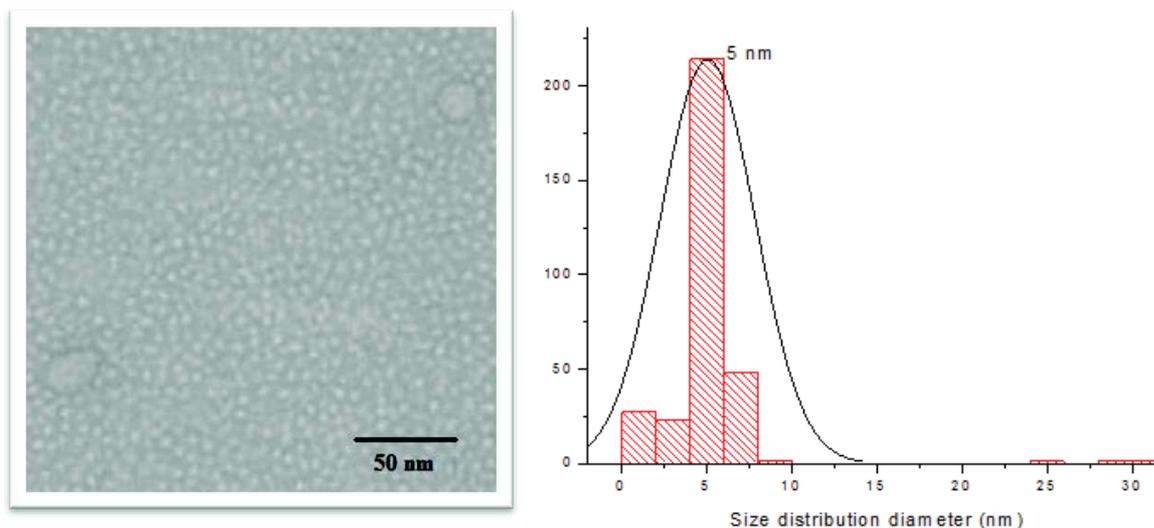


Figure 9. Transmission electron micrograph with size distribution of DP7-b-DP7,Ac (**10**) micelles (3 mg mL^{-1} in water).

Partial enzymatic degradation of XGO-*b*-XGO,Ac

The effect on the mean diameter, by the volume fraction decreasing in the hydrophilic block of XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) micelles, was achieved by removal of the galactose units from partial enzymatic digestion with β -galactosidase from *A. niger* (NICHTL, BUCHNER, JAENICKE, RUDOLPH, & SCHEIBEL, 1998) (Figure 10). The XGO-shell in (**5**) was gradually degalactosylated by action of galactosidase to lead certainly to homogeneous DP7-shell (**11**).

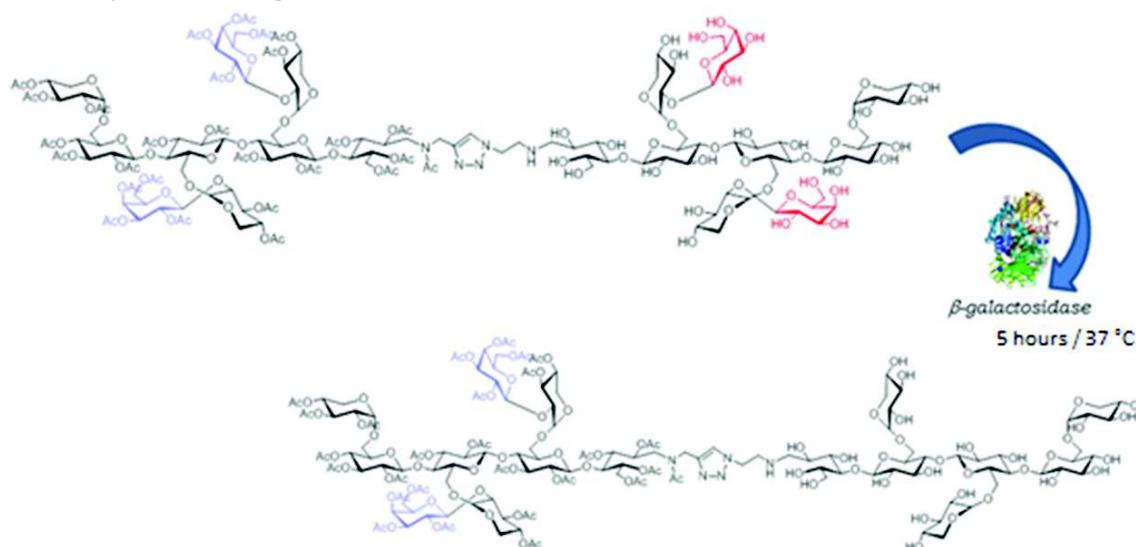


Figure 10. Partial enzymatic digestion of XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) diblock by β -galactosidase from *A. niger* (1 U mL^{-1} , 5 hours, 37°C).

Partial enzymatic degradation of XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) micelles was evaluated by the diameter size variation and the light scattering intensity recorded by DLS every 5 minutes, during 5 hours at 37 °C. In the first hour of the reaction, the light scattering decreased strongly and became constant over the remainder of the reaction time period (Figure 11).

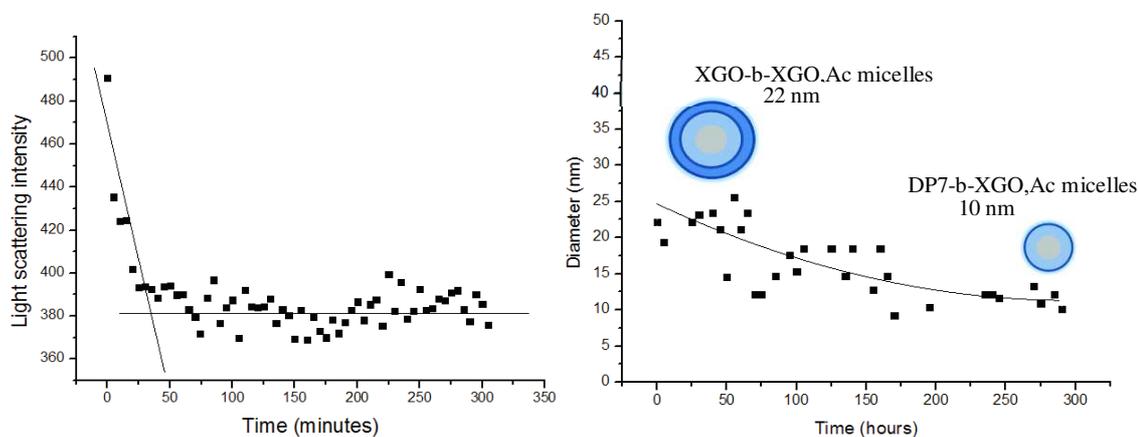


Figure 11. Light scattering intensity and diameter size variations of XGO-*b*-XGO,Ac micelles (**5**, 3 mg mL⁻¹) over enzymatic digestion by β -galactosidase from *A. niger* (1U mL⁻¹, 5 hours, 37 °C).

The decrease in the light scattered intensity occurs due the gradual reduction of the micelles diameter (Figure 11) as a function of the enzymatic activity on the XGO-*b*-XGO,Ac diblocks, leading likely to formation of DP7-*b*-XGO,Ac. The elimination of the galactose residues in hydrophilic block decrease the micelles diameter from 22 nm (XGO-*b*-XGO,Ac (**5**)) to 10 nm (DP7-*b*-XGO,Ac).

The purpose of galactose units elimination in the diblock XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) led to a more homogeneous shell, confirming the influence of the molar mass and branching degree of the hydrophilic block (XGO (DP7,8,9) to DP7) in the micellar size and morphology. A TEM image of the solution of DP7-*b*-XGO,Ac was obtained shortly after the end of the enzymatic digestion and revealed the presence of spherical micelles with a mean diameter of 17 nm (Figure 12). Reducing the volume fraction of hydrophilic block led to a micelle diameter reduction around 50% compared to micelles formed by XGO-*b*-XGO,Ac due to lower hydration of the hydrophilic shell composed of xyloglucan oligosaccharides, besides the contribution in with the size polydispersity decreasing (Figure 12).

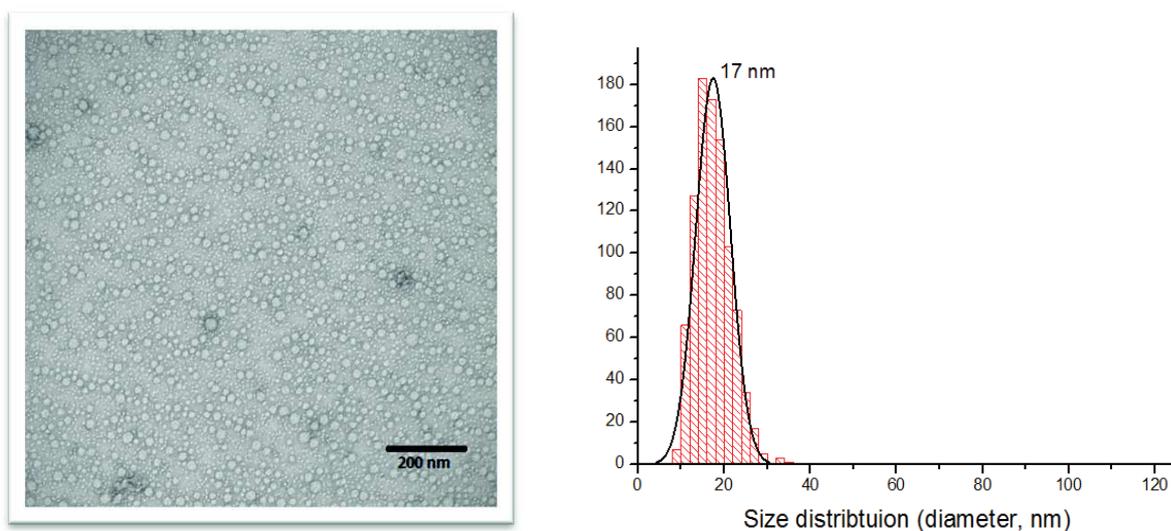


Figure 12. Transmission electron micrograph with size distribution of DP7-*b*-XGO,Ac micelles (3 mg mL^{-1} in water).

After the end of enzymatic reaction, the solution containing the DP7-*b*-XGO,Ac diblock was lyophilized. The recovered material was then redissolved in water (3.0 mg mL^{-1}) to check the behavior of DP7-*b*-XGO,Ac self-association. A TEM image revealed the formation of spherical nanoparticles (Figure 13), with high similarity with the image obtained directly after partial enzymatic digestion (Figure 13), and with average diameter about 18 nm. The results confirm the direct influence of the hydrophilic block homogeneity in the formation of micelles with uniform size distribution.

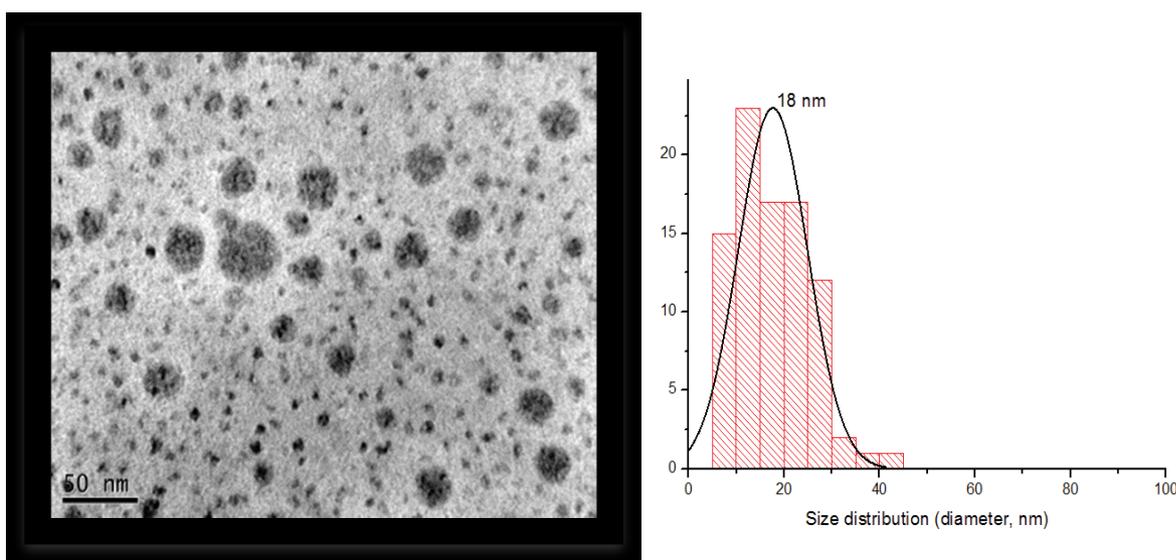


Figure 13. Transmission electron micrograph with size distribution of DP7-*b*-XGO,Ac micelles (3 mg mL^{-1} in water).

Conclusion

The synthesis of fully amphiphilic oligosaccharide-based diblocks obtained from xyloglucan oligosaccharides was shown in this work. The self-assembly of these copolymers in water led to the formation of spherical micelles with an average diameter of 22 and 6 nm for XGO-*b*-XGO,Ac and DP7-*b*-DP7,Ac, respectively. From these results we could observe the important influence of the oligosaccharide branched structure in the self-assembly process of the diblocks, since a slight reduction on the molar mass increased the CMC value around five times and decreased around 70% the micelles diameter average. The effect of the β -galactosidase, eliminating the galactose residues of hydrophilic block, highlights the role of shell hydration. The elimination of the galactose units led to the formation of spherical micelles 50% smaller and less polydisperse, indicating the strong influence of the oligosaccharides-shell hydration and structural organization on micelles formation.

References

- ALLEN, C., MAYSINGER, D., & EISENBERG, A. (1999). Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 16, pp. 3-27.
- BERTOZZI, C., & KIESSLING, L. (2001). Chemical Glycobiology. *Science*, 291, pp. 2357-2364.
- BONNÉ, T., LÜDTKE, K., JORDAN, R., & PAPADAKIS, C. (2007). Effect of polymer architecture of amphiphilic poly(2-oxazoline) copolymers on the aggregation and aggregate structure. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 208, pp. 1402-1408.
- BORSALI, R., MINATTI, E., PUTAUX, J.-L., SCHAPPACHER, M., DEFFIEUX, A., VIVILLE, P., et al. (2003). From “sunflower-like” assemblies toward giant wormlike micelles. *Langmuir*, 19, pp. 6-9.
- CHENG, L., & CAO, D. (2009). Effect of tail architecture on self-assembly of amphiphiles for polymeric micelles. *Langmuir*, 25, pp. 2749-2756.
- DALPATHADO, D., JIANG, H., KATER, M., & DESAIRE, H. (2005). Reductive amination of carbohydrates using NaBH(OAc)₃. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, pp. 1130–1137.

- DISCHER, B., WON, Y.-Y., EGE, D., LEE, J.-M., BATES, F., DISCHER, D., et al. (1999). Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers. *Science*, 284, pp. 1143-1146.
- EFTHYMIOU, T., HUYNH, V., OENTORO, J., PEEL, B., & DESAULNIERS, J. (2012). Efficient synthesis and cell-based silencing activity of siRNAs that contain triazole backbone linkages. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22, pp. 1722-1726.
- EMEMURA, M., & YUGUCHI, Y. (2009). Solvation of xyloglucan in water/alcohol systems by molecular dynamics simulation. *Cellulose*, 16, pp. 361-371.
- FRY, S., YORK, W., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A., HAYASHI, T., JOSELEAU, J., et al. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derivat oligosaccharides. *Journal of Plant Physiology*, 89, pp. 1-3.
- GIACOMELLI, C., SCHMIDT, V., AISSOU, K., & BORSALI, R. (2010). Block copolymer systems: from single chain to self-assembled nanostructures. *Langmuir*, 26, pp. 15734-15744.
- GREFFE, L., BESSUEILE, L., BULONE, V., & BRUMER, H. (2005). Synthesis, preliminary characterization, and application of novel surfactants from highly branched xyloglucan oligosaccharides. *Glycobiology*, 15, pp. 437-445.
- LI, B.-G., & ZHANG, L.-M. (2008). Synthesis and characterization of novel amphiphilic block copolymers based on maltoheptaose and poly(ϵ -caprolactone). *Carbohydrate Polymers*, 74, pp. 390-395.
- LIU, T., ZHOU, Z., WU, C., NACE, V., & CHU, B. (1997). Effects of block lengths on the association numbers and micellar sizes of BnEmBn type triblock copolymer micelles in aqueous solution. *Macromolecules*, 30, pp. 7624-7626.
- MARUYAMA, A., ISHIHARA, T., KIM, J.-S., KIM, S., & AKAIKE, T. (1997). Nanoparticle DNA carrier with poly(L-lysine) grafted polysaccharide copolymer and poly(D,L-lactic acid). *Bioconjugate Chemistry*, 8, pp. 735-742.
- MODOLON, S., OTSUKA, I., FORT, S., MINATTI, E., BORSALI, R., & HALILA, S. (2012). Sweet block copolymer nanoparticles: preparation and self-assembly of fully oligosaccharide-based amphiphile. *Biomacromolecules*, 13, pp. 1129-1135.
- NAGAHORI, N., UCHIDA, M., KINJO, M., & YAMASHITA, T. (2012). use of carbohydrate-conjugated nanoparticles for an

- integrated approach to functional imaging of glycans and understanding of their molecular mechanisms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*, pp. 2612-2616.
- NICHTL, A., BUCHNER, J., JAENICKE, R., RUDOLPH, R., & SCHEIBEL, T. (1998). Folding and association of beta-galactosidase. *Journal of Molecular Biology*, *282*, pp. 1083-1091.
- OTSUKA, I., FUCHISE, K., HALILA, S., FORT, S., AISSOU, K., PIGNOT-PAINTRAND, I., et al. (2010). Thermoresponsive vesicular morphologies obtained by self-assemblies of hybrid oligosaccharide-block-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer systems. *Langmuir*, *26*, pp. 2325-2332.
- OTSUKA, I., TRAVELET, C., HALILA, S., FORT, S., PIGNOT-PAINTRAND, I., NARUMI, A., et al. (2012). Thermoresponsive self-assemblies of cyclic and branched oligosaccharide-block-poly(N-isopropylacrylamide) diblock copolymers into nanoparticles. *Biomacromolecules*, *13*, pp. 1458-1465.
- properties, S. o.-d.-p. (2009). HALILA, S.; MANGUIAN, M.; FORT, S.; COTTAZ, S.; HAMAIDE, T.; FLEURY, E.; DRIGUEZ, H. *Macromolecular Chemistry and Physics*, *209*, pp. 1282-1290.
- ROSTOVTSSEV, V., GREEN, L., FOKIN, V., & SHARPLESS, K. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, *41*, pp. 2596-2599.
- SCHATZ, C., & LECOMMANDOUX, S. (2010). Polysaccharide-Containing Block Copolymers: Synthesis, Properties and Applications of an Emerging Family of Glycoconjugates. *Macromolecular Rapid Communications*, *31*, pp. 1664-1684.
- TORNOE, C., CHRISTENSEN, C., & MELDAL, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of Organic Chemistry*, *67*, pp. 3057-3064.
- VOROV, O., LIVESAY, D., & JACOBS, D. (2008). Conformational entropy of an ideal cross-linking polymer chain. *Entropy*, *10*, pp. 285-308.
- ZHANG, R., ZHANG, L., & SOMASUNDARAN, P. (2004). Study of mixtures of n-dodecyl-beta-D-maltoside with anionic, cationic,

and nonionic surfactant in aqueous solutions using surface tension and fluorescence techniques. *Journal of Colloid and Interface Science*, 278, pp. 453-460.

ZIEGLER, F., FOWLER, K., RODGERS, W., & WESTER, R. (1987). Ambient-temperature Ullman reaction 4,5,4',5'-tetramethoxy-1,1'-biphenyl-2,2'-dicarboxaldehyde. *Organic Syntheses*, 65, p. 108.

Self-assembly of amphiphilic xyloglucan-based block copolymer and protein stabilization

Article submitted to publication at the Journal of Colloid and Interface Science

Colloidal drug carrier systems have gained increasing interest for the possibility of drug targeting by modifying body distribution as well as the improvement of the cellular uptake of various active substances [1]. In this respect, the search for nanoparticulate systems aiming the loading of poorly water soluble active agents with pronounced toxic side effects has been the focus of intensive research for some years [2-4]. Among various nanoscale delivery vehicles, nanoparticle protein engineering therapy offers advantageous potential solutions, being able to increase potentially the drug intratumor concentration [5], and to display high specificity and low immunological responses. Additionally, therapeutic proteins have been widely used to treat diabetes, hepatitis, inflammation and other diseases [6]. Colloidal systems made from gliadin and zein are promising nanocarriers extracted from gluten of wheat and maize, respectively, and usually labeled as “vegetable protein” [7]. Gliadin, thanks to its versatile biodegradability, biocompatibility and natural origin [8] is considered to be a suitable biopolymer for the preparation of nanoparticles, with interesting adsorption affinity with intestinal mucosal [9-11]. On the other hand, zein, a proline-rich, water insoluble corn storage protein, has been studied as potential biomaterial for the development of colloidal delivery systems [12-16]. Classified as “Generally Recognized as Safe (GRAS)” by the US Food and Drug Administration, zein shows a good biodegradability [17] and *in-vivo* cell compatibility [12, 18, 19].

However, most of the peptides and proteins are quite unstable, prone to denaturation and aggregation [20]. The simplest and most common method to overcome these limitations is to change the nature of the environment surrounding the protein by adjusting solution conditions such as pH, or by adding stabilizers. For the last issue, nonionic surfactants can be used to protect and stabilize proteins against surface-induced aggregation, either by binding to the proteins and preventing protein-protein associations, or by saturating the interface and thus minimizing adsorption and subsequent conformational changes [21]. Among them, nonionic block copolymer surfactants are a family class widely used, among others, in pharmaceutical applications [22].

Comparatively to classical surfactants, amphiphilic block copolymers have the advantage that their ordering properties can be nearly continuously tuned by adjusting solvent composition, molecular weight, or copolymer architecture. Moreover usually, their self-organization in solution leads to various structural features, even with low concentrations. Considering the wide range of pharmaceutical applications of nonionic block copolymer surfactants, their toxicity concerning chronic uptake must be regarded. For example, results obtained by Magnusson et al. (1986) [23] showed that Pluronic F-68, belonging to poloxamers' family, is able to induce phospholipidosis in rats, as well as pulmonary foam cells at the dose levels above 500 mg kg⁻¹ and slight focal degenerative changes in the proximal tubules of the kidneys above 100 mg kg⁻¹. Moreover, slow degradability in the environment of the major type of water-soluble block copolymers, e.g., pluronic-based compounds, has become a major obstacle for industrial development.

Thus, motivated by industrial requirements for nontoxic, biocompatible and biodegradable stabilizers, the use of carbohydrates as polar head groups in amphiphilic block copolymer surfactants has been studied [24-27]. Carbohydrates represent a huge amount of biopolymers produced annually by a broad variety of plants and micro-organisms. Because they possess various structural and superstructural diversity, carbohydrates display important biological properties as in cellular interaction and communication. Referenced works have demonstrated that polysaccharide-decorated materials for biomedical applications usually exhibit enhanced absorption, permeability and bioadhesion properties, also favoring biocompatibility and molecular recognition processes [28].

Recently, we have successfully developed a fully oligosaccharide-based amphiphilic block copolymer in which the hydrophilic block consisted in a free maltoheptaosyl derivative clicked to a hydrophobic block composed of a peracetylated maltoheptaosyl derivative, referred as Mal₇-*b*-AcMal₇ [29]. Maltoheptaose used in this work was a linear α -(1,4) glucan of seven glucosyl units obtained from the ring-opening of β -cyclodextrin by acid hydrolysis. Mal₇-*b*-AcMal₇ self-assembled in spherical nanoparticles in water with an average diameter of 56 nm. This type of fully oligosaccharide-based amphiphilic block copolymer could find an interest as low-molecular weight block copolymer surfactant stabilizing proteins and removing aggregation.

To improve the later system and for practical and economic reasons, we propose a new copolymer synthesized exclusively from tamarind seeds xyloglucan oligosaccharides (XGOs). In fact, XGOs are easily obtained from controlled enzymatic depolymerization of commercially available tamarind seeds xyloglucan – the most abundant hemicellulose found in plant primary cell wall [30] – using commercial cellulases (endo- β -1,4-glucanase) [25,26]. Structurally, tamarind seeds xyloglucans are based on a linear β (1 \rightarrow 4)-glucan backbone, regularly branched with α (1 \rightarrow 6)-xylosyl units, that in turn can be further substituted with β (1 \rightarrow 2)-galactosyl units (Figure 1).

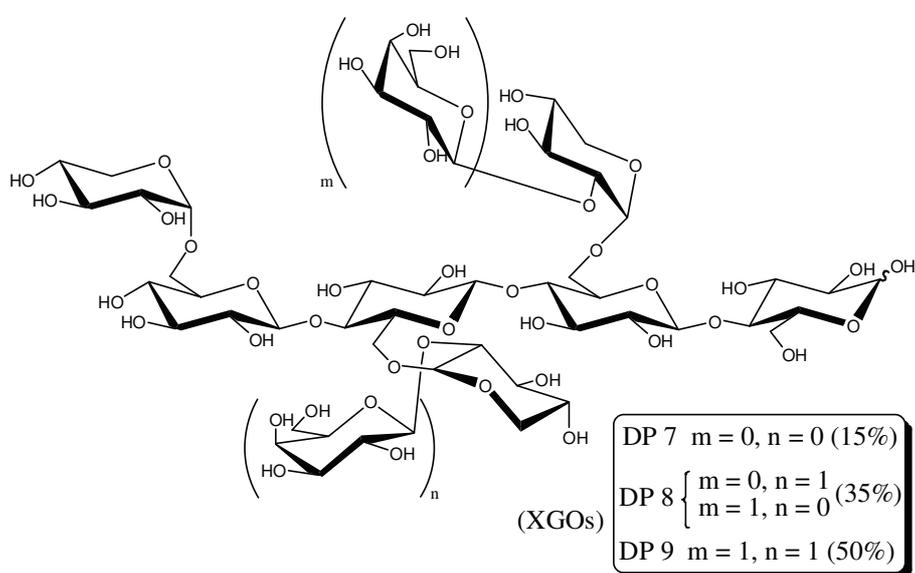


Figure 1. General structure of xyloglucan oligosaccharides.

The goal of this work was to design a new class of XGO-based linear amphiphilic block cooligomer (BCO) and to evaluate its stabilizing properties of gliadin and zein. To reach these objectives we have functionalized each reducing-end of blocks by regioselective modification using a microwave-assisted reductive amination and then, one of blocks was made hydrophobic through ester protecting groups of hydroxyl groups. Finally, the blocks were linked by Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition “click chemistry” (CuAAC) [31,32]. The present approach opens up new amphiphilic block copolymer surfactants concept based on vegetal raw materials to provide sterical stabilization, preventing the gliadin and zein nanoparticles aggregation in aqueous solution.

Experimental Section

Materials. Tamarind seed xyloglucan (XG, purity $\geq 95\%$) was kindly supplied from Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd (Osaka, Japan). Sodium cyanoborohydride, dry dimethylformamide, propargyl bromide, gliadin and zein were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Methanol, ethanol, acetic acid, acetic anhydride, ethyl acetate, hydrochloric acid, pyridine and acetonitrile were purchased from SDS with analytical grade quality (Carlo Erba). Propargylamine 99% was purchased from ACROS Organics and 4-dimethylaminopyridine from Lancaster Synthesis Inc. They were all used as received. Water was purified by a Milli-Q water purification system (Billerica, MA, U.S.A.). 2-Azidoethylamine and CuI.P(OEt)_3 were prepared according to the literature [33,34].

Instrumentation. Reactions were followed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel 60F₂₅₄ (E. Merck) by charring with sulfuric acid solution ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 3:45:45). Flash-column chromatography was performed on silica gel 60 (40 – 63 μm , E. Merck) or C18 (Grace Reveleris[®] Silica Flash Cartridges, 12g). The ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded at 298 K using a 400 MHz Bruker Avance DRX400. The solvent residual peaks of D_2O , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ and CDCl_3 were used as internal standards, at 4.79 ppm, 2.50 ppm and 7.26 ppm, respectively. Infrared (IR) spectra were recorded using a Perkin-Elmer Spectrum RXI FTIR Spectrometer. MALDI-TOF measurements were performed on a Bruker Daltonics Autoflex apparatus. Fluorescence spectra were recorded on a HITACHI F4500 spectrofluorimeter equipped with a thermostated cell holder set at 25.0 °C. The elastic and dynamic light scattering experiments were carried out using an ALV setup. Transmission electron microscopy (TEM) experiments were carried out using a CM220 Philips microscope.

Synthesis.

XGO_{N3} (2). To a suspension of XGOs (1) (1.0 g, 0.78 mmol) (made up of a mixture of hepta-, octa-, and nona-saccharides in the ratio 0.15:0.35:0.50, respectively) in water/methanol (8 mL; 1:1, v/v) acidified with acetic acid (until pH 5.0) were added NaBH_3CN (98.0 mg; 1.56 mmol) and 2-azidoethylamine (98.0 mg; 1.56 mmol). The reaction mixture was heated to a microwave system at 80 °C for 2 hours.

Precipitation in ethanol (80 mL) was carried out and the suspension was centrifuged (8000 rpm for 10 min at 4 °C). The supernatant was removed and this procedure was repeated once. The residue was dissolved in water, lyophilized and purified by automated flash chromatography on C18 reversed phase column (H₂O:MeOH, 0 to 80% in MeOH) to provide (**2**) as white solid, 0.703 g (66% yield). IR (KBr): $\nu = 3300$ (O-H, sugars), 2894 (C-H, sugars), 2100 (N₃, azide) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 5.2$ (m, H-1 Xyl^{II, III}), 4.97-4.96 (m, H-1 Xyl^{IV}), 4.62-4.50 (m, H-1 Glc^{II-IV}, Gal^{II, III}), 4.04-2.88 (m, H-2 to H-6 Glc^{II-IV} and Gal^{II-III}, H-2 to H-5 Xyl^{II-IV} H-1 Glc^I-itol, NCH₂), 1.93 ppm (s, CH₂N₃); MALDI-TOF: [M + Na]⁺ *m/z*: 1155.34 (hepta-), 1317.39 (octa-) 1479.44 (nona-saccharide).

XGO_Propargyl (3). To a suspension of XGOs (1.0 g, 0.79 mmol) (**1**) (made up of a mixture of hepta-, octa-, and nona-saccharides in the ratio 0.15:0.35:0.50, respectively) in water/methanol (8 mL; 1:1, v/v) acidified with acetic acid (until pH 5.0) were added NaBH₃CN (98.0 mg; 1.56 mmol) and propargylamine (86.3 mg; 1.56 mmol). The reaction mixture was heated to a microwave system, at 80 °C for 2 hours. Precipitation in ethanol (80 mL) was carried out and the suspension was centrifuged (8000 rpm for 10 min at 4 °C). The supernatant was removed and this procedure was repeated once. The residue was dissolved in water, lyophilized and purified by automated flash chromatography on C18 reversed phase column (H₂O:MeOH, 0 to 80% in MeOH) to provide (**3**) as white solid, 0.497 g (58% yield). IR (KBr): $\nu = 3398$ -3368 (O-H, sugars), 2925 (C-H, sugars), 2115 (C-C, alkyne) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 5.18$ -5.19 (m, H-1 Xyl^{II, III}), 4.95-4.97 (m, H-1 Xyl^{IV}), 4.53-5.59 m, H-2 to H-6 Glc^{II-IV} and Gal^{II-III}, H-2 to H-5 Xyl^{II-IV} H-1 Glc^I-itol, NCH₂), 2.68 and 2.81-2.92 ppm (m, C≡CH); MALDI-TOF: [M + Na]⁺ *m/z*: 1124.40 (hepta-), 1286.46 (octa-), 1448.52 (nona-saccharide).

XGO, Ac_Propargyl (4). A solution of XGO-propargyl (0.5 g, 0.35 mmol) (**3**) in pyridine (50 mL), Ac₂O (20 mL) and DMAP was stirred at room temperature up to the complete disappearance of the starting material, followed by TLC (eluent: 7:3, acetonitrile-water). Methanol was added and then the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in ethyl acetate (200 mL) and successively washed with HCl 1 mol L⁻¹ (200 mL) and water (200 mL). The organic layer was dried on Na₂SO₄ and concentrated to dryness *in vacuo* with

rotary evaporator. Purification by column chromatography (SiO₂, Ethyl acetate) afforded (**4**) as a yellowish powder, 0.725 g (81% yield). IR: ν = 2115 (C-C, alkyne), 1751 (C=O, ester) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.39-3.65 (m, H-1 Xyl^{IV}, H-1 Xyl^{II,III}, H-1 Glc, Gal, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl, Gal and NCH₂), 2.53, 2.32-2.34 and 2.24 (m, C \equiv CH), 1.95-2.19 (m, CH₃, OAc); MALDI-TOF: M + Na⁺ m/z : 2294.61 (octa-), 2582.63 (nona-saccharide).

XGO-*b*-XGO,Ac (5). To a solution of XGO, Ac_propargyl (0.1 g, 0.039 mmol) (**4**) and XGO_N₃ (53.2 mg; 0.039 mmol) (**2**) in dry dimethylformamide (1 mL) was added CuI.P(OEt)₃ (6.9 mg; 0.0195 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 68 °C for 3 hours until TLC showed no change of the starting material consumption. Methanol was added and the reaction mixture was evaporated under reduced pressure in the presence of silica. The crude solid was purified by flash column chromatography on silica gel (eluent: 8:2, acetonitrile-water and 7:3, acetonitrile-water) to yield the XGO-*b*-XGO,Ac (**5**) as a white solid, 0.169 g (95% yield). IR (KBr): ν = 3455-3395 (OH, sugars), 2939-2894 (C-H, sugars), 1751 (C=O, ester) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 8.02, 7.94 and 7.83 (3x s, H-5 triazole), 5.34-2.48 (m, H-1 Xyl^{IV}, H-1 Xyl^{II,III}, H-1 Glc, Gal, H-2,3,4,5,6 Glc/Glc, Xyl/Xyl, Gal and NCH₂), 2.14-1.88 ppm (m, CH₃ (OAc)); MALDI-TOF: M + Na⁺ m/z : 4039.26 (NonAcDP9-*b*-DP9Ac), 3877.17 (NonAcDP8-*b*-DP9Ac), 3751.11 (NonAcDP9-*b*-DP8Ac), 3589.03 (NonAcDP8-*b*-DP8Ac), 3462.98 (NonAcDP9-*b*-DP7Ac), 3300.92 (NonAcDP8-*b*-DP7Ac).

Sample preparation and experimental setup

Static and Dynamic Light Scattering Measurements.

The aqueous solutions of XGO-*b*-XGOAc **5** (1.0; 3.0; 5.0 mg mL⁻¹) were stirred overnight at 40 °C, then filtered through 0.45 μ m MILLIPORE Millex LCR filter. Scattering measurements were performed using an ALV-CGS 8F S/N 069 laser goniometer, which consists of a 22 mW HeNe linear polarized laser operating at a wavelength of 632.8 nm, an ALV-5004 multiple τ digital correlator with 125 ns initial sampling time. The samples were kept at a constant temperature of 25.0 \pm 0.1 °C during all the experiments. The measurements were recorded at 90°. The aqueous solutions were put in

10 mm diameter glass cells. The minimum sample volume required for the experiment was 1 mL. Data were collected using digital ALV Correlator Control software, and the counting time for each sample was of 300 s.

The aqueous solutions of XGO-*b*-XGO,Ac **5** (3.0 mg mL⁻¹) (micelles) were also analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) using a digital microscope LM10 System (NanoSight, Salisbury, UK). Video images of particles movement under Brownian motion were analyzed by the NTA analytical software version 2.1. The measurements were made at room temperature and the video clip was captured over 60 s. NTA video obtained for XGO-*b*-XGO,Ac micelles is available as supplementary data.

Fluorescence Measurements.

The critical micelle concentration (CMC) for XGO-*b*-XGO,Ac **5** was determined by fluorescence spectroscopic analysis, using pyrene as a hydrophobic fluorescent probe. The steady-state fluorescence emission spectra of pyrene were recorded on a Hitachi F4500 spectrofluorimeter equipped with a thermostated cell holder at 25.0 ± 0.1 °C, and the samples were continuously stirred in a quartz cell of 10 mm path length. The concentration of the probe was fixed at 1.0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ and the sample concentration range of 3.0 x 10⁻³ mg mL⁻¹ to 1.2 mg mL⁻¹. The probe was excited at 336 nm, and the emission spectrum was collected in the range 360 – 450 nm. Both slit width settings of excitation and emission monochromators were adjusted to 2.5 nm. The intensity of the first (I_{m1}) vibronic band over the third (I_{m3}), I_{m1}/I_{m3} ratio located at 372.8 and 384 nm in the emission spectrum of monomeric pyrene provides an estimation of the polarity in a pyrene environment.

Transmission Electron Microscopy (TEM) Measurements.

Transmission electron microscopy (TEM) images were recorded on a JEM-1011 microscope operating at 80 kV. The samples were analyzed using the same concentrations that were determined by light scattering. Solutions (4 µL) were dropped on a copper-coated grid, which was made hydrophilic by glow discharge treatment, and then dried at room temperature.

Protein nanoparticles.

To evaluate the surfactant ability of the new amphiphilic block copolymer synthesized in this work, we have prepared gliadin and zein nanoparticles in aqueous solutions. Protein nanoparticles were prepared by a liquid-liquid dispersion method as suggested by Zhong and Jin (2009) [35] with slight modifications. Firstly, protein solutions were prepared by dissolving gliadin in ethanol 62% [36] or zein in ethanol 85% [35] (5 g L^{-1}). This solution was filtered through $0.45 \mu\text{m}$ MILLIPORE Milles LCR filter and then poured into a magnetically stirred (1000 rpm) solution containing Pluronic F-68 or the amphiphilic XGO-*b*-XGOAc **5**, as stabilizers, at different concentrations.

Scattering measurements (DLS/SLS) were performed using an ALV laser goniometer for the determination of the nanoparticles size, and for better understanding these results, TEM measurements were performed to analyze the nanoparticles morphological shape.

Results and Discussion

Synthesis and Structural Characterization of XGO-*b*-XGOAc

Xyloglucan oligosaccharides denoted by XGOs was the saccharidic block of our synthetic pathway. It was obtained by enzymatic digestion of tamarind seed xyloglucan powder by commercial cellulase. In order to build XGO-*b*-XGO,Ac diblock by means of click chemistry, we chose to introduce the azide function to free XGOs, and the alkyne function to the hydrophobic XGOs.

Firstly, free oligosaccharides were chemoselectively functionalized with 2-azidoethylamine linker by microwave-assisted reductive amination at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 hours. The reaction involves condensation of the ring-opened (carbonyl) form of the reducing-end of oligosaccharides with the amine counterpart. The resulting Schiff base intermediate is relatively unstable [37] and is quickly reduced to the corresponding secondary amine by action of the reducing agent, NaBH_3CN . XGO- N_3 **2** was obtained by simple precipitation in ethanol with 66% yield. The chemical structure of **2** was confirmed by $^1\text{H-NMR}$, FT-IR and mass spectrometry. The presence of the terminal azido group was confirmed by FT-IR analysis with the stretching frequency around 2100 cm^{-1} .

Secondly, following the same procedure, the XGOs were functionalized with a propargylamine linker to afford XGO-propargyl **3**

with 58% yield. Peracetylation of XGO_propargyl with acetic anhydride and DMAP in pyridine provided the hydrophobic block, XGO,Ac_propargyl **4**. As previously, the chemical structure of **4** was confirmed by $^1\text{H-NMR}$, FT-IR and mass spectrometry.

In spite of moderate yield, around 60%, the microwave-assisted reductive amination enables formation of both blocks in less than 1 day and accordingly to the purification process, could be transposed in a large scale.

We then performed “click” reaction in dry DMF between XGO_N₃ **2** and XGO,Ac_propargyl **4** using CuI.P(OEt)₃ as catalyst under argon atmosphere at 60 °C for 4 hours then for 48 hours at room temperature. The reaction was monitored by TLC and the product was isolated by flash chromatography on silica gel, using acetonitrile/water as eluent, providing the diblock XGO-*b*-XGO,Ac **5** with 95% yield. FT-IR analysis of purified product showed the complete disappearance of transmittance due to the azido group (2100 cm⁻¹), indicating that there is no unreacted azide group in XGO-*b*-XGOAc. Moreover, the $^1\text{H NMR}$ spectra showed resonances at the range of 7.85 – 8.00 ppm, corresponding to the olefinic proton associated with the 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole isomer moiety in accordance with assigned structures. In addition, the characteristic signals due to the protons of the free xyloglucan, and the protons of the acetylated xyloglucan were also observed.

Self-assembly of amphiphilic XGO-*b*-XGOAc **5 in water**

The CMC is one of the basic parameters for characterizing the micellization with a closed-association mechanism, being a measure describing the physical properties of the micelle, referring to the micellar thermodynamic stability [38]. It is defined as the amphiphile concentration, above which the formation of micelles occurs. The CMC of XGO-*b*-XGOAc **5** was determined by a fluorescence technique with pyrene as a probe, which has been extensively used to monitor the CMC of a variety of aggregation processes.

The XGO-based diblocks showed a CMC value of 0.04 mg mL⁻¹ (Figure 2), lower than the value obtained for Mal₇-“click”-AcMal₇ [29], which was of 0.1 mg mL⁻¹, but being within the range reported for low molecular weight nonionic surfactant [39]. The CMC difference can be explained due to the molecular shape and lower solubility in water of branched peracetylated xyloglucan oligosaccharides, compared to the

linear structure of maltoheptaose. If the hydrophilic block is kept constant, an increase of molecular weight of hydrophobic block will decrease CMC value, while lesser effect is observed when it is changed the molecular weight of corona-forming block [40]. An interesting point is that accordingly to the work of L. Greffe *et al.*[25] related to the preparation of *N*-alkyl XGO aminoalditols (XGO-*C_n*) surfactants, our CMC value is roughly equivalent to a XGO-C16 (C16 means 16 carbon atoms constituting the fatty acid main chain).

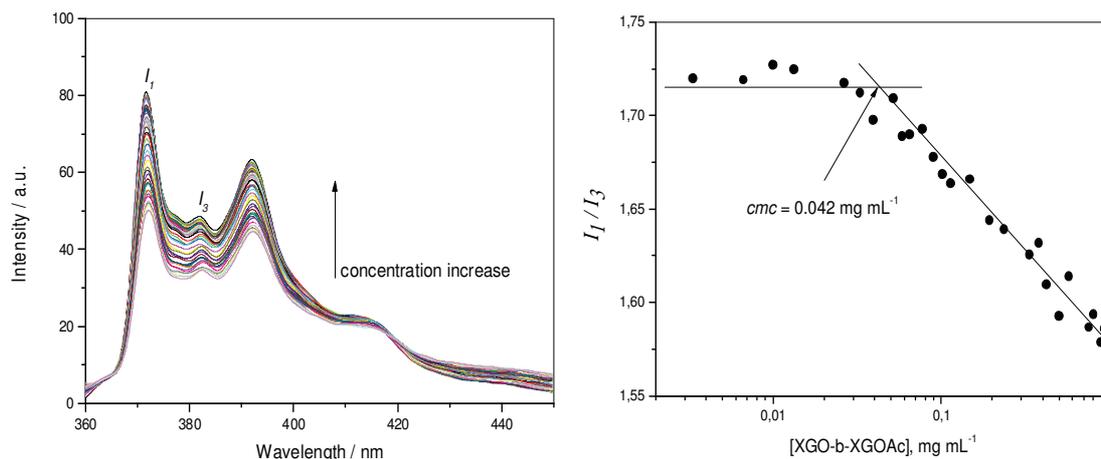


Figure 2. Pyrene fluorescence emission spectra and the corresponding variation in the I_1/I_3 ratio as a function of XGO-*b*-XGO,Ac concentration ($[\text{pyrene}] = 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$).

Self-assembly in solution of amphiphilic XGO-*b*-XGO,Ac **5** was evaluated through light scattering measurements by direct dilution in deionized water. XGO-*b*-XGO,Ac solutions prepared at a concentration of 3.0 mg mL^{-1} were detected at 90° detection angle by DLS. The results in number distribution (figure 3B) showed that the diblock self-organizes in water to form, predominantly, micelles with a hydrodynamic diameter about 22 nm. Because large particles scatter much more light than small particles, the intensity distribution (Figure 3A) showed bigger aggregates whose size were 150 nm in diameter.

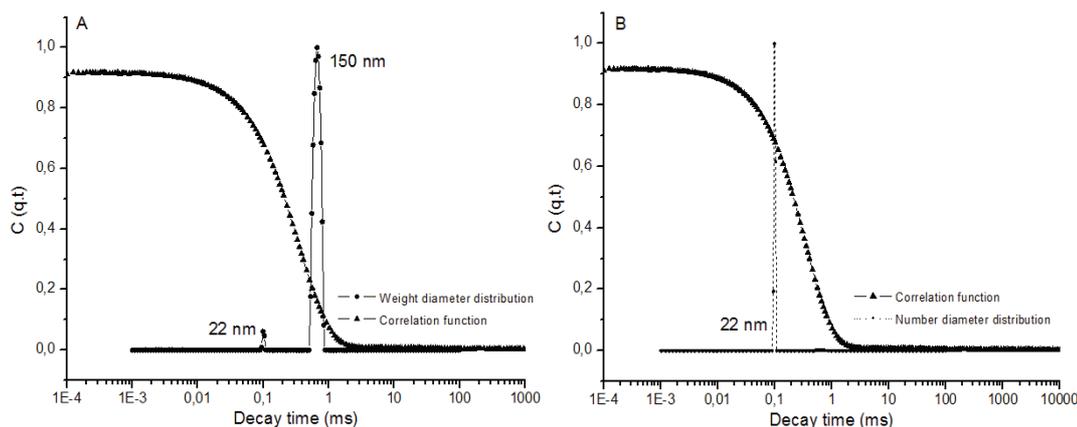


Figure 3. Dynamic light scattering autocorrelation function, weight radius distribution (6A) and number radius distribution (6B) of XGO-*b*-XGO,Ac in water ($[XGO\text{-}b\text{-}XGO,Ac] = 3 \text{ mg mL}^{-1}$, scattering angle = 90° , temperature = 25°C).

To confirm the size and to check micelles morphology, we performed TEM measurements by comparing the results obtained by light scattering experiments. The TEM image of XGO-*b*-XGO,Ac **5** in water at 3.0 mg mL^{-1} (Figure 4) indicated that the formed micelles have spherical morphology and average size of about 25 nm, supporting the DLS results. Generally the size obtained using TEM is smaller than the one measured using DLS, due to dehydration. One notes however that, in the present studied system, the size obtained for TEM (25 nm) is slighter higher than that observed by DLS (22 nm). This difference could be attributed to the flatness (soft nanoparticles), polydispersity and the smaller (~ 30 particles) counted statistical average number of nanoparticles using TEM.

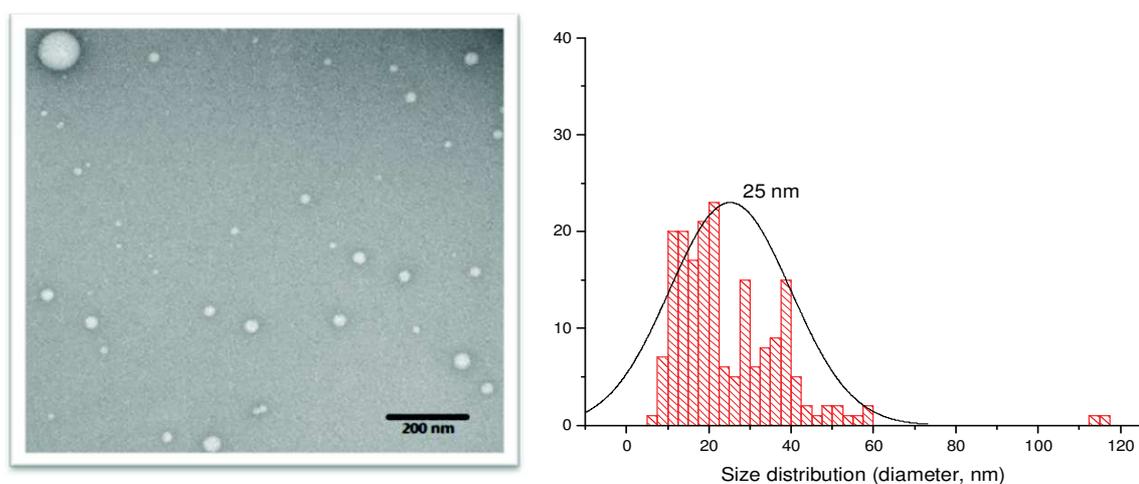


Figure 4. Transmission electron micrograph with size distribution of XGO-*b*-XGO,Ac micelles (3 mg mL^{-1}).

Following the structural characterization and physico-chemical studies of XGO-*b*-XGO,Ac **5** micelles, we aimed to investigate its protein-stabilizing properties.

Protein nanoparticles

In this work, we compared stabilizing properties of XGO-*b*-XGO,Ac **5** with F68-pluronic on gliadin and zein nanoparticles. These stabilizers (surfactant and/or polymer) should act as an energy barrier around the nanoparticles, thus preventing aggregation phenomena [41]. The method used to prepare protein nanoparticles consisted on a two-step desolvation by adding a good solvent phase (ethanol:water) to a non-solvent phase (water) [7,35] and stabilization by surfactants.

The DLS results (Table 1) showed that gliadin nanoparticles diameters were not significantly ($p > 0.05$) influenced neither by the utilization of both surfactants ($p = 0.549$) or by concentration ($p = 0.438$) changes. The same behavior was observed for the polydispersity index (PDI) of gliadin nanoparticles, where the nature of surfactants ($p = 0.187$) and the concentration used ($p = 0.147$) didn't show differences between values at a significance level of 5 % (ANOVA).

Table 1. Effect of different surfactants and concentrations on the size and polydispersity index of gliadin nanoparticles.

Protein	Surfactant Concentration	Nanoparticle size \pm SD	PDI \pm SD
Gliadin	without surfactant	436.8 \pm 85.5 ^a	0.68 \pm 0.04 ^a
	Pluronic F68 (0.01%)	398.4 \pm 30.2 ^a	0.48 \pm 0.05 ^a
	Pluronic F68 (0.05%)	382.9 \pm 3.8 ^a	0.52 \pm 0.05 ^a
	Pluronic F68 (0.1%)	401.4 \pm 17.5 ^a	0.76 \pm 0.05 ^a
	XGO- <i>b</i> -XGO,Ac (0.01%)	410.4 \pm 15.7 ^a	0.55 \pm 0.19 ^a
	XGO- <i>b</i> -XGO,Ac (0.05%)	371.2 \pm 39.9 ^a	0.51 \pm 0.03 ^a
	XGO- <i>b</i> -XGO,Ac (0.1%)	306.0 \pm 22.8 ^a	0.47 \pm 0.01 ^a

* The values correspond to the mean obtained in triplicate. Different letters in the same column represent statistically significant differences between values at a significance level at 5% according to the Tukey test.

We can observe in Figure 5 that the gliadin nanoparticles prepared with Pluronic or XGO-*b*-XGO,Ac **5** exhibited the same morphology, like solid spheres. It was observed that without stabilizer, the

nanoparticles were irregular, with the formation of large aggregates. While with the addition of XGO-*b*-XGO,Ac **5** or pluronic F68, the hydrophobic protein was well surrounded and stabilized. In Figure 5c, we observe various XGO-*b*-XGO,Ac **5** micelles meaning that there is an excess of stabilizer. This observation suggests that stabilization could be achieved in a smaller XGO-*b*-XGO,Ac **5** concentration.

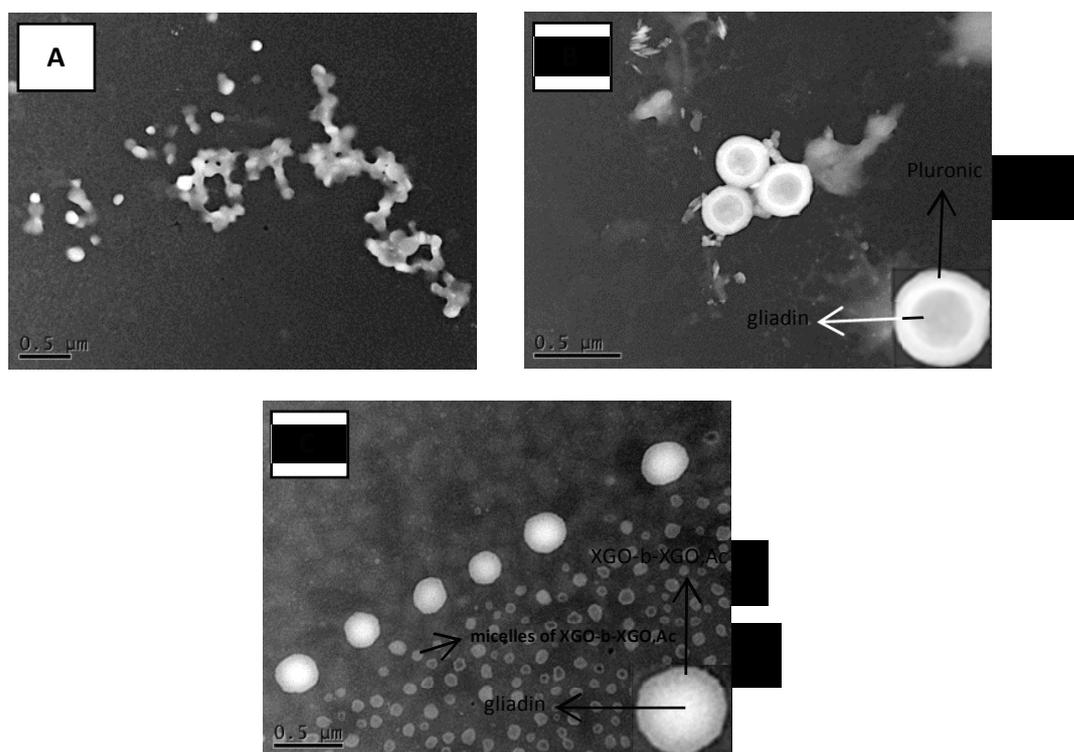


Figure 5. Transmission electron micrograph of gliadin nanoparticles (A) stabilized by Pluronic (B) and XGO-*b*-XGO,Ac (C).

In the zein nanoparticles case, a significant ($p < 0.05$) influence was observed when the nanoparticles were prepared with different surfactants ($p = 0.000$) and by concentration variation ($p = 0.000$). The use of XGO-*b*-XGO,Ac induced the formation of zein nanoparticles with higher sizes comparing with those stabilized by Pluronic (Table 2). Figure 6A shows zein nanoparticles without any stabilizer, same behavior compared to the gliadin nanoparticles made in the same conditions was observed, where irregular nanoparticles were obtained. Zein nanoparticles with spherical and solid morphology were observed independently of the surfactant (Figure 6B and C). However, a significant effect was observed in the PDI of samples ($p = 0.000$) (Table 2), where XGO-*b*-XGO,Ac **5** conferred lower PDI than the Pluronic to the zein nanoparticles, as observed at Figure 6 and Table 2.

Table 2. Effect of different surfactants and concentrations on the size and polydispersity index of zein nanoparticles.

Proteína	Surfactant Concentration	Nanoparticle size \pm SD	PDI \pm SD
Zein	without surfactant	164.5 \pm 2.1 ^c	0.12 \pm 0.02 ^a
	Pluronic F68 (0.01%)	128.9 \pm 1.3 ^a	0.12 \pm 0.01 ^a
	Pluronic F68 (0.05%)	140.9 \pm 2.6 ^b	0.19 \pm 0.02 ^b
	Pluronic F68 (0.1%)	125.2 \pm 0.6 ^a	0.28 \pm 0.03 ^c
	XGO- <i>b</i> -XGO,Ac (0.01%)	200.3 \pm 1.2 ^d	0.08 \pm 0.01 ^a
	XGO- <i>b</i> -XGO,Ac (0.05%)	269.5 \pm 4.6 ^f	0.10 \pm 0.01 ^a
	XGO- <i>b</i> -XGO,Ac (0.1%)	220.6 \pm 7.5 ^e	0.14 \pm 0.04 ^{a,b}

* The values correspond to the mean obtained in triplicate. Different letters in the same column represent statistically significant differences between values at a significance level at 5% according to the Tukey test.

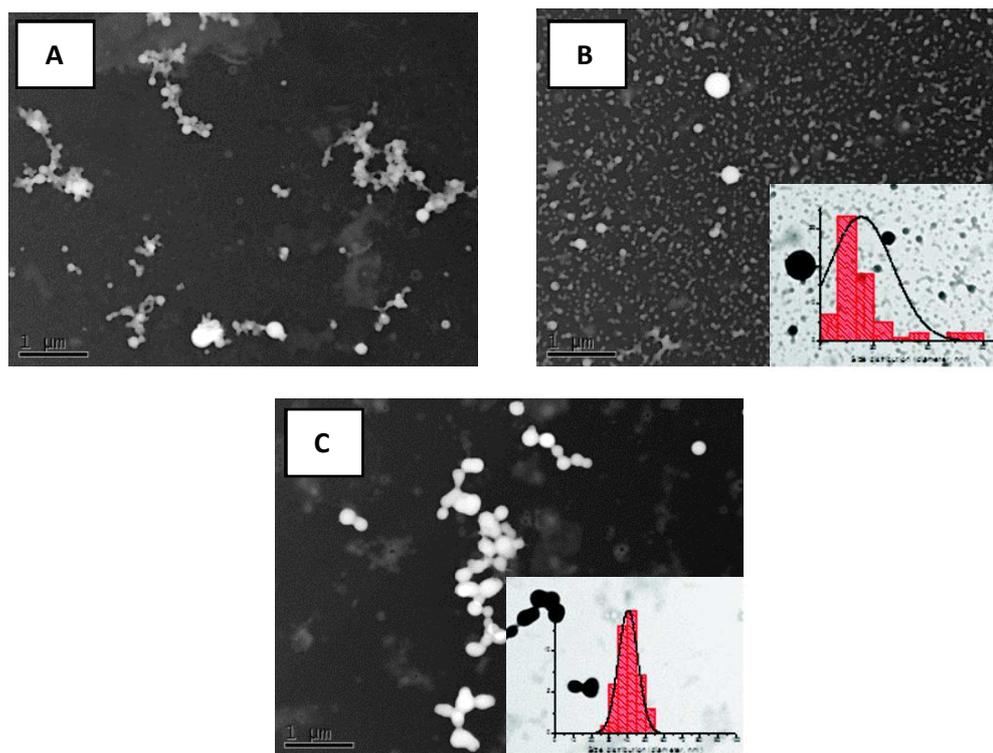


Figure 6. Transmission electron micrograph with size distribution of zein nanoparticles (A) stabilized by Pluronic (B) and XGO-*b*-XGO,Ac (C).

Nanoparticles with a bimodal distribution were observed using Pluronic as stabilizer (Figure 6B), while a very narrow distribution was observed in zein nanoparticles with XGO-*b*-XGO,Ac **5** (Figure 6C).

Zein nanoparticles with XGO-*b*-XGO,Ac **5** have shown larger sizes, showing the ability of this carbohydrate-based amphiphilic copolymer to encapsulate more protein inside the nanoparticle core.

The results of this work have shown a better performance of XGO-*b*-XGO,Ac **5** compared to pluronic F-68 to form size-homogeneous zein nanoparticles. With respect to gliadin nanoparticles, this influence was not observed; showing the same behavior with pluronic F-68. These differences between the two types of protein nanoparticles can be due to the molecular size of native proteins. While zein is a mixture of proteins with molecular size varying at 17 – 27 kDa [42], gliadin shows a molecular size range at 30 – 74 kDa [43]. Gliadin nanoparticles formation has a precipitation behavior in water more difficult to control, due to the broad molecular size range, requiring probably another type of stabilizing agent.

Conclusion

This work reported the synthesis of new amphiphilic block copolymer systems exclusively constituted of oligosaccharidic blocks, obtained from tamarind seeds xyloglucan. In water, the self-assembly of this xyloglucan-based block copolymer led to the formation of spherical micelles with an average diameter of 22 nm. Such system also showed the ability to decorate proteins (such as gliadin & zein) into stable nanoparticles as compared to a commercial stabilizer (Pluronic® F-68). The results obtained from light scattering and imaging techniques are in good agreement and support the existence of well-defined spherical micelles in water. As for the case of protein/block copolymer complex, a very clearly core/shell nanoparticle was observed where the block copolymer constitutes the shell protecting of the inner core made from proteins. Such core/shell systems made exclusively from fully natural amphiphilic xyloglucan-based block copolymer could constitute a biocompatible and biodegradable system with interesting perspectives in drug delivery applications.

Acknowledgments

We acknowledge the financial support from CNRS, CNPq and CAPES-COFECUB (project 620/08). We would also like to thank the Central Laboratory of Electron Microscopy (LCME) at UFSC and to Ismael Casagrande Bellettini to the support of fluorescence analysis.

The authors thank ICMG mass spectrometry platform for analyses and I. Jeacomine for the technical assistance in NMR spectrometry.

References

- [1] V. Schafer, H. Briesen, R. Andreesen, A.M. Steffan, C. Royer, S. Troster, J. Kreuter, H. Rubsamen-Waigman. *Pharm. Res.* 9 (1992) 541.
- [2] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, Y. *Adv. Drug Delivery Rev.* 47 (2001) 113.
- [3] A.V. Ambade, E.N. Savariar, S. Thayumanavan. *Mol. Pharmaceutics* 2 (2005) 264.
- [4] J.H. Adair, M.P. Parette, E.I. Atinoglu, M. Kester. Nanoparticulate alternatives for drug delivery . *ACS Nano* 4 (2010) 4967.
- [5] M.J. Hawkins, P. Soon-Shiong, N. Desai, N. *Adv. Drug Delivery Rev.* 60 (2008) 876.
- [6] B. Leader, Q.J. Baca, D.E. Golan. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews: Drug Discovery* 7 (2008) 21.
- [7] I. Ezpeleta, J.M. Irache, S. Stainmesse, C. Chabenat, J. Gueguen, Y. Popineau, A.-M. Orecchioni. *International Journal of Pharmaceutics* 131 (1996) 191.
- [8] M. Jahanshahi, Z. Babaei. *Afr. J. Biotechnol.* 7 (2008) 4926.
- [9] I. Ezpeleta, M.A. Arangoa, J.M. Irache, S. Stainmesse, C. Chabenat, Y. Popineau, A.-M. Orecchioni, *International Journal of Pharmaceutics* 191 (1999) 25.
- [10] M.A. Arangoa, G. Ponchel, A.M. Orecchioni, M.J. Renedo, D. Duchêne, J.M. Irache. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (2000) 333.
- [11] M.A. Arangoa, M.A. Campanero, J.M. Irache. *Rev. Col. Cienc, Quím. Farm.* 33 (2004) 38.
- [12] X. Liu, Q. Sun, H. Wang, L. Zhang, J. Wang. *Biomaterials* 26 (2005) 109.
- [13] M. Mastromatteo, G. Barbuzzi, A. Conte, M.A. Del Nobile. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10 (2009) 222.
- [14] N. Parris, P.H. Cooke, K.B. Hicks. *J. Agr. Food Chem.* 53 (2005) 4788.
- [15] S. Torres-Giner, E. Gimenez, J.M. Lagaron, J. M. *Food Hydrocolloids* 22 (2008) 601.
- [16] Q. Zhong, M. Jin. *J. Agr. Food Chem.* 57 (2009) 3886.
- [17] H.J. Wang, S.J. Gong, Z.X. Lin, J.X. Fu, S.T. Xue, J.C. Huang, J.Y. Wang. *Biomaterials* 20 (2007) 3952.

- [18] J. Dong, Q.Sh. Sun, J.Y. Wang. *Biomaterials* 25 (2004) 4691.
- [19] H.J. Wang, Z.X. Lin, X.M. Liu, S.Y. Sheng, J.Y. Wang. *J. Controlled Release* 105 (2005) 120.
- [20] S.C. Yadav, A. Kumari, R. Yadav. *Peptides* 32 (2011) 173.
- [21] H.J. Lee, A. McAuley, K.F. Schilke, J. McGuire. *Adv. Drug Delivery Rev.* 63 (2011) 1160.
- [22] Schmolka, I. R. In *Polymers for Controlled Drug Delivery*; Tarcha, P. J., Ed.; CRC Press: Boston, 1991; Chapter 10.
- [23] G. Magnusson, T. Olsson, J.-A. Nyberg. *Toxicol. Lett.* 30 (1986) 203.
- [24] T. Kida, K. Kajihara, K. Isogawa, W. Zhang, Y. Nakatsuji, I. Ikeda, M. Akashi. *Langmuir* 20 (2004) 8504.
- [25] L. Greffe, L. Bessueille, V. Bulone, H. Brumer. *Glycobiology* 15 (2005) 437.
- [26] S. Halila, M. Manguian, S. Fort, S. Cottaz, T. Hamaide, E. Fleury, H. Driguez. *Macromol. Chem. Phys.* 209 (2008) 1282.
- [27] J. Nowicki, A. Sokolowski, D. Reksa. *J. Surfactants Deterg.* 14 (2011) 179.
- [28] H. Barsett, A. Ebringerová, S.E. Harding, T. Heinze, Z. Hromádková, C. Muzzarelli, R.A.A. Muzzarelli, B.S. Paulsen, O.A. ElSeoud, T.A. Teinze, *Polysaccharides I: Structure, Characterisation and Use.* 2005.
- [29] S.M. Modolon, I. Otsuka, S. Fort, E. Minatti, R. Borsali, S. Halila. *Biomacromolecules* 13 (2012) 1129.
- [30] N.C. Carpita, D.M. Gibeaut. *Plant J.* 3 (1993) 1.
- [31] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 2596.
- [32] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal. *J. Org. Chem.* 67 (2002) 3057.
- [33] T.C. Efthymiou, V. Huynh, J. Oentoro, B. Peel, J.-P. Desaulniers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 1722.
- [34] F.E. Ziegler, K.W. Fowler, W.B. Rodgers, R.T. Wester. *Org. Synth.* 65 (1987) 108.
- [35] Q. Zhong, M. Jin. *Food Hydrocolloids* 23 (2009) 2380.
- [36] C. Duclairoir, E. Nakache, H. Marchais, A.-M. Orecchioni. *Colloid Polym. Sci.* 276 (1998) 321.
- [37] D.S. Dalpathado, H. Jiang, M.A. Kater, H. Desaire. *Anal. Bional. Chem.* 381 (2005) 1130.
- [38] G.S. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoja, K. Langmuir 9 (1993) 945.

- [39] R. Zhang, L. Zhang, P.J. Somasundaran. *Colloid Interface Science* 278 (2004) 453.
- [40] C. Allen, D. Maysinger, A. Eisenberg. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 16 (1999) 3.
- [41] T.F. Tadros. *Applied Surfactants: principles and applications*. Wokingham: Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.
- [42] C.D. Mejia, L.J. Mauer, B.R. Hamaker. *Journal of Cereal Science* 45 (2007) 353.
- [43] S. Guilbert, N. Gontard, M.H. Morel, P. Chalier, V. Micard, A. Redl. Formation and properties of wheat gluten films and coatings. In: *Protein-based films and coatings*. Edited by Aristippos Gennadios. CRC Press, LLC, 2000 N. W. Corporate Blvd, Boca Raton, Florida. 2002.