

*Desenvolvimento de uma Estratégia Terapêutica para Libertação Vectorizada de Fármacos no cólon:
Optimização do processo de síntese de conjugados entre a β -Ciclodextrina e o Diclofenac de sódio*

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer à minha família, especialmente à minha mãe, que é um grande apoio para mim, pois sem ela eu não estaria aqui neste momento a terminar o meu curso. Sempre me ensinou a dar o meu melhor em tudo que faço, e com esforço e trabalho chegaremos ao destino.

Ao meu namorado, um agradecimento muito especial pelo apoio, força, coragem, paciência e sentido de humor que me tem dado ao longo destes 5 anos.

Aos meus colegas de curso, aqueles com quem criei uma verdadeira amizade, que me acompanharam nesta etapa difícil, onde partilhámos todas as vitórias e derrotas que nos fizeram crescer e fortalecer.

Aos Professores que estiveram sempre disponíveis para me ajudarem, esclareceram e ensinarem, e ainda por vezes serem um ombro amigo.

Queria agradecer ao Departamento de Química da Faculdade de Química da Universidade de Coimbra e ao Departamento de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, a todos que me receberam com agrado e me facultaram todos os meios para a integração e realização deste trabalho experimental.

Finalmente um agradecimento especial à minha orientadora, pela sua disponibilidade, atenção, ajuda, orientação, e amizade, pois sem ela a realização desta tese não teria sentido.

*Desenvolvimento de uma Estratégia Terapêutica para Libertação Vectorizada de Fármacos no cólon:
Optimização do processo de síntese de conjugados entre a β -Ciclodextrina e o Diclofenac de sódio*

Resumo

O tratamento específico de patologias do cólon pode ser conseguido pelo desenvolvimento de profármacos resultantes da conjugação de um fármaco com ciclodextrinas (CDs). A formação destes conjugados permite que os fármacos atinjam o cólon de forma intacta, local no qual sofrem degradação enzimática por acção da vasta microflora existente no cólon, nomeadamente Bacteróides. Estas bactérias quebram as ligações glicosídicas das CDs originando pequenos sacáridos, permitindo a sua absorção bem como a do fármaco.

A entrega direccionada de fármacos ao cólon permite o tratamento da doença no alvo terapêutico, e consequentemente, permite reduzir a dosagem administrada e os efeitos adversos associados.

Entre os vários tipos de anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), o diclofenac de sódio é um potencial candidato na terapêutica para libertação específica no cólon devido às suas propriedades anti-inflamatorias e quimiopreventivas do cancro do cólon. A conjugação do diclofenac com ciclodextrinas é um processo pouco explorado, tornando-se inovador com recurso ao microondas. Neste trabalho experimental, procedeu-se à variação da temperatura utilizada no microondas, entre os 100 e 200°C, variando-se também os solventes utilizados, PEG-200 e DMF, mantendo uma potência de 75W e um tempo de reacção de 40 minutos. O principal objectivo do trabalho foi otimizar a síntese do conjugado BCD-Diclofenac. Os melhores resultados foram obtidos para as temperaturas de 140°C e 160°C no solvente DMF. Para as mesmas temperaturas em PEG-200, os rendimentos obtidos foram significativamente inferiores. Estes resultados sugerem a necessidade de continuar a explorar as melhores condições de reacção de síntese do conjugado BCD-Diclofenac de forma a obter maior rendimento, recorrendo a solventes polares apróticos (que favorecem reacções SN₂), bem aquecidos pelo microondas e que apresentem baixa toxicidade.

Palavras-Chave

β -Ciclodextrina; Diclofenac de sódio; Conjugado; Cólon; Microondas.

*Desenvolvimento de uma Estratégia Terapêutica para Libertação Vectorizada de Fármacos no cólon:
Optimização do processo de síntese de conjugados entre a β -Ciclodextrina e o Diclofenac de sódio*

Abstract

The specific treatment of colon pathologies can be achieved by designing prodrugs in which a drug is covalently bound to cyclodextrins (CDs). The formation of these conjugates enables the drugs to reach the colon unmodified, where they undergo enzymatic degradation by the vast microflora present in the colon, mainly *Bacteroides*. These bacteria break the linkage between glucose units of the CDs forming small saccharides, allowing its absorption as well as the drugs'.

Targeted drug delivery to the colon ensures the direct treatment at the disease site and consequently lowers the dosage and reduces the adverse side effects.

Among the diverse nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), sodium diclofenac is a potential candidate for specific drug delivery to the colon due to its anti-inflammatory and quimiopreventive properties of colon cancer. The conjugation of diclofenac with CDs is a process which has been poorly explored, and is considered novel using microwave heating. In this experiment, the temperature of the microwave varied between 100 and 200°C, and the solvents used in the reaction also varied between PEG-200 and DMF. The microwave's power and time reaction were maintained at 75W and 40 minutes, respectively. The aim of this experiment was to optimize the synthesis of the BCD-Diclofenac conjugate. The best results were achieved at temperatures of 140°C and 160°C in the solvent DMF. For the same temperatures in PEG-200, the yield was significantly lower. These results suggest the need to continue exploring the best reaction conditions for the synthesis of the BCD-Diclofenac conjugate in order to increase the yield, using polar aprotic solvents (that favor SN2 reactions) with well heated properties by microwave, and that present low toxicity.

Keywords

β -Cyclodextrin; Sodium Diclofenac; Conjugate; Colon; Microwave.

*Desenvolvimento de uma Estratégia Terapêutica para Libertação Vectorizada de Fármacos no cólon:
Optimização do processo de síntese de conjugados entre a β -Ciclodextrina e o Diclofenac de sódio*

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	viii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Acrónimos	xvii
Introdução	1
1 - Ciclodextrinas - Estrutura e Propriedades	1
1.1 - Complexos de Inclusão	3
2 - Ciclodextrinas como transportadores naturais de fármacos para o colon	4
3 - Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)	5
3.1 - Diclofenac de sódio	5
4 - Conjugados de CD como uma estratégia terapêutica para a entrega de fármacos especificamente no cólon	6
Objectivos do trabalho	7
Objectivo geral	7
Objectivos específicos	7
Materiais e Métodos	8
Materiais	8
Métodos	8
Reacção em microondas	8
Cromatografia em camada fina (TLC)	8
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC)	9
Cromatografia de Adsorção	9
Liofilização	9
Procedimento Experimental	9
Síntese da BCD-6-monotosilada	9
Síntese do conjugado BCD-Diclofenac	10
Resultados e Discussão	10

1 - Síntese do conjugado BCD-Diclofenac	10
2 - Determinação da melhor temperatura para a formação do conjugado em N,N-dimetilformamida (DMF), variando o parâmetro da temperatura no microondas.....	12
3 - Determinação da melhor temperatura para a formação do conjugado em polietilenoglicol 200 (PEG-200), variando o parâmetro da temperatura no microondas	13
4 - Determinação do rendimento dos conjugados puros obtidos	14
4.1 - Massa de conjugado impuro (massa inicial) sujeita a purificação.....	14
4.2 - Massa de conjugado puro (massa final) após liofilização	14
4.3 - Cálculo do rendimento	15
Conclusão	18
Perspectivas futuras.....	19
Referências Bibliográficas	21

*Desenvolvimento de uma Estratégia Terapêutica para Libertação Vectorizada de Fármacos no cólon:
Optimização do processo de síntese de conjugados entre a β -Ciclodextrina e o Diclofenac de sódio*

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação da ligação α - 1,4 glicosídica das CDs.	1
Figura 2 - Representação tridimensional da forma tronco-cônica das CDs e identificação dos hidróxilos primário e secundários.	2
Figura 3 - Representação esquemática da α CD, β CD e γ CD.	2
Figura 4 - Estrutura molecular do diclofenac de sódio.	6
Figura 5 - Esquema da síntese do conjugado β CD-Diclofenac.	10
Figura 6 - Representação esquemática das estruturas moleculares do PEG-200 e do DMF.	16

*Desenvolvimento de uma Estratégia Terapêutica para Libertação Vectorizada de Fármacos no cólon:
Optimização do processo de síntese de conjugados entre a β -Ciclodextrina e o Diclofenac de sódio*

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das CDs naturais.....	3
Tabela 2 - Média das AUC obtidas por HPLC utilizando o solvente DMF	12
Tabela 3 - Média das AUC obtidas por HPLC utilizando o solvente PEG-200	13
Tabela 4 - Massas dos conjugados impuros pesadas para as temperaturas de 140 e 160°C, nos solventes DMF e PEG-200	14
Tabela 5 - Massas dos conjugados puros obtidas às temperaturas de 140 e 160°C, nos solventes DMF e PEG-200	15
Tabela 6 - Rendimentos calculados para os conjugados previamente seleccionados.....	15

*Desenvolvimento de uma Estratégia Terapêutica para Libertação Vectorizada de Fármacos no cólon:
Optimização do processo de síntese de conjugados entre a β -Ciclodextrina e o Diclofenac de sódio*

Lista de Acrónimos

α CD - alfa-ciclodextrina

γ CD - gama-ciclodextrina

β CD - beta-ciclodextrina

CD - ciclodextrina

CDs - ciclodextrinas

AINEs - anti-inflamatórios não esteróides

CGTase - ciclodextrina-glicosil-transferase

COX - ciclooxigenase

PG - prostaglandina

DMF - N,N-dimetilformamida

PEG-200 - polietilenoglicol 200

NaOH - hidróxido de sódio

TGI - tracto gastrointestinal

TsCl - cloreto de p-toluenosulfonilo

Dic - diclofenac de sódio

RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

TLC - Cromatografia em camada fina

β CD-Dic - conjugado beta ciclodextrina-diclofenac

mL - mililitro

mg - miligrama

mmol - milimol

min - minuto

mm - milímetro

m - metro

M - molar

W - watts

% - percentagem

g - grama

MHz - mega-hertz

GHz - giga-hertz

v/v - concentração volume/volume

°C - graus célsius

SN2 - substituição nucleofílica bimolecular

C - carbono

H - hidrogénio

O - oxigénio

MeCN - acetonitrilo

TFA - trifluoroacético

UV - ultravioleta

H(OCH₂CH₂)_nOH - Polietilenoglicol

C₃H₇NO - N,N-dimetilformamida

C₁₄H₁₁Cl₂NO₂ - diclofenac

C₁₄H₁₀Cl₂NNaO₂ - diclofenac de sódio

NH₄Cl - cloreto de amónio

NaOH - hidróxido de sódio

H₂O - água

*Desenvolvimento de uma Estratégia Terapêutica para Libertação Vectorizada de Fármacos no cólon:
Optimização do processo de síntese de conjugados entre a β -Ciclodextrina e o Diclofenac de sódio*