

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS**

Iza Mirela Rodini Garcia Princival

**Síntese de Derivados de Furano ligados em Dendrímero bis-MPA e sua  
atividade anticâncer.**

Recife,  
2015

Iza Mirela Rodini Garcia Princival

**Síntese de Derivado de Furano ligados em Dendrímero bis-MPA e sua  
atividade anticâncer.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Severino Alves Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Hallwass  
e Dra. Iane Vasconcelos.

Recife,  
2015



IZA MIRELA RODINI GARCIA PRINCIVAL

**SÍNTESE DOS DERIVADOS DE FURANO LIGADOS EM DENDRÍMER BIS-MPA  
E SUA ATIVIDADE ANTI-CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais Da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 31/07/2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Severino Alves Junior (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Denise Patricia Lins de Azevedo Tenório (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Manoel Adrião Gomes Filho (Examinador Externo)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Para Jefferson Luiz Prncival,*

*Que faz tudo ter importância.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais – UFPE pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho, sobretudo aos Professores Severino Alves Junior, Fernando Hallwass, Teresinha Gonçalves da Silva e Jeffrey Penny, por todo apoio, confiança e digníssimos ensinamentos.

Aos integrantes da Central Analítica, por sempre estarem prontos a contribuírem com as análises.

As novas amizades que este trabalho me trouxe, pois não só dividiram o dia a dia como contribuíram significativamente ao conteúdo deste trabalho. A Iane, que sempre me apoiou, ao Dartagnam que sempre contribuiu frente às dificuldades enfrentadas, a Denise e a Jaciana por sempre estarem prontas a colaborar e acrescentar, ao Pablo por passar todo seu conhecimento de técnicas laboratoriais.

Ao meu marido, que foi e é minha inspiração, admiração, apoio, luta e perseverança. Sem ele nada disso teria acontecido, eternamente grata.

A FACEPE pelo apoio financeiro e à bolsa concedida.

## Resumo

Descrevemos aqui, um estudo citotóxico comparativo utilizando uma biblioteca de compostos contendo a função furano, e o dendrímero Bis-MPA. Dos compostos furânicos testados, os que apresentaram melhor resultado citotóxico frente às células tumorais foram sintetizados em grande escala (5 g). Assim, estes compostos, puderam ser submetidos à estudos de incorporação física (por interações químicas) ou ligação química (via ligação covalente) ao dendrímero. No intuito de estudar os efeitos citotóxicos que ambos os sistemas poderiam apresentar, os testes foram realizados empregando as seguintes linhagens celulares HEP-2, HT-29, MCF-7, NCI-H292 e HL-60, correspondentes ao câncer de Carcinoma de laringe, Carcinoma de Cólon, Adenocarcinoma de Mama e Leucemia promielocítica aguda. Cada teste foi realizado em quadruplicata, utilizando os compostos com alto grau de pureza (>99%), e de um mesmo lote do material, para todos os testes de toxicidade. Os testes de citotoxicidade r com o dendrímero bis-MPA, foram realizados utilizando o composto comercial, porém com checagem de pureza via RMN antes de realizar os testes e as reações químicas. Todos os testes biológicos após serem realizados, foram analisados utilizando o método colorimétrico MTT. Em suma, este estudo levou ao preparo de compostos em escala de gramas, com alto grau de pureza, necessário para estudar a possibilidade de desenvolver novos ligantes bifuncionais, na tentativa de se construir dendrímeros polifuncionalizados, contendo moléculas que apresentaram atividade citotóxica em sua estrutura química. Esse estudo vem sendo explorado pelo grupo na tentativa de expandir essa linha de raciocínio, e tentar corroborar com estudos da literatura no que diz respeito ao mecanismo de ação, e como esses se comportam frente a células tumorais, em testes *in vitro*. Dentre os compostos que apresentaram boas respostas aos ensaios biológicos, dois deles merecem destaque por mostrarem-se substâncias extremamente eficazes em testes de inibição total das células. Estes compostos têm em comum um anel furano ligado diretamente a uma enona ou a um ácido acrílico (compostos **32** e **35** respectivamente).

Palavras Chave: Dendrimeros. Nanotecnologia. Biomateriais. Citotoxicidade

## Abstract

Here we describe a comparative cytotoxic study by using a library of compounds containing a furan moiety and the dendrimer Bis-MPA. Among furan tested compounds against tumor cancer cells, those that have shown better results were synthesized in a large scale reaction (5 g). Thus, these compounds, which have shown high biological activity, underwent physical incorporation studies (for chemical interactions) or chemically linked (via covalent bond) with the dendrimer. In order to study the cytotoxic effects that could exhibit by both systems, tests were conducted using the following tumor cancer cells: HEP-2, HT-29, MCF-7 e HL60. Each test was performed in quadruplicate using the compounds in their high purity (>99%) and used as a single batch of material for all toxicity tests. The dendrimer Bis-MPA cytotoxic tests were conducted subjecting the commercial reagent although with a pre checked in its purity by NMR before do the tests and chemical reactions. All biological tests after have been done were analyzed using the MTT colorimetric method. In summary, this study has led to preparation of compounds in multi gram scale in a high purity, necessary to realize the possibility of developing new bifunctional links, in an attempt to build polifuncionalized dendrimers containing active cytotoxic active molecules in their chemical structure. This study is being explored by the group in an attempt to expand this line of reasoning, and try to corroborate with literature data regarding the mechanism of action, and their behavior against the tumor cancer cells in an in vitro tests.

Among the compounds that showed good activity to biological assays, two of them are noteworthy due to their extremely effective activity in total inhibition tests of cells. These compounds have in common a furan ring attached to an enone or an acrylic acid (compounds **32** and **35** respectively).

Key Words: Dendrimers. Nanotecnology. Biomaterials. Citotoxicity

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática de um dendrímero de 4 <sup>a</sup> geração (G4).	<b>18</b>
<b>Figura 2</b>	Estrutura dos dendrímeros <b>1-6</b> : lisina-dendrímero ( <b>1</b> ), poli (propilenoimina) (PPI) ( <b>2</b> ), poli (amina amido) (PAMAM) ( <b>3,4</b> ), amina éter ( <b>5</b> ) e éster de dendrímeros de amina ( <b>6</b> ) .	<b>20</b>
<b>Figura 3</b>	Estrutura dos dendrímeros <b>7-12</b> : NTris [(2 – {(tris {[2- (terc-butoxicarbonil) etoxi] metil} –metil) amino] carbonil} etoxi) metil] metilamina ( <b>7</b> ), dendrímeros de polifenileno ( <b>8</b> ), de fósforo ( <b>9</b> ), s-triazina ( <b>10</b> ), poliglicerol ( <b>11</b> ) e de poliéster ( <b>12</b> ).	<b>21</b>
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática do crescimento dendrimérico através do método divergente.	<b>23</b>
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática do crescimento dendrimérico através do método convergente.	<b>24</b>
<b>Figura 6</b>	Diferentes aplicações dos dendrímeros para biomedicina.	<b>26</b>
<b>Figura 7</b>	Cloridrato de ranitidina ( <b>14</b> ) e carlina ( <b>15</b> ).	<b>28</b>
<b>Figura 8</b>	Estrutura geral de ácidos graxos furânicos ( <b>16</b> ).	<b>29</b>
<b>Figura 9</b>	Estruturas de ácidos graxos contendo furanos do mexilhão <i>Perna canaliculus</i> e semi-síntese de éster com propriedade anti-inflamatória.	<b>30</b>
<b>Figura 10</b>	Compostos furânicos citotóxicos.	<b>30</b>
<b>Figura 11</b>	Estrutura química do Citreofuran ( <b>21</b> ) e Pseudopterolida ( <b>22</b> ).	<b>31</b>
<b>Figura 12</b>	Compostos contendo furanos e thiophenos <b>23-32</b> .	<b>36</b>
<b>Figura 13</b>	Estrutura química do dendrímero <b>bis-MPA</b> .	<b>36</b>

<b>Figura 14</b>	Obtenção do composto <b>32</b> após destilação.	<b>37</b>
<b>Figura 15</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C e Massas do composto <b>32</b> .	<b>38</b>
<b>Figura 16</b>	Provável estrutura do cetál formado.	<b>41</b>
<b>Figura 17</b>	<i>Link</i> 33.	<b>43</b>
<b>Figura 18</b>	Representação esquemática do composto <b>33</b> como <i>link</i> .	<b>43</b>
<b>Figura 19</b>	Aspecto visual dos isômeros obtidos do composto <b>34</b> .	<b>44</b>
<b>Figura 20</b>	Provável estrutura do dendrímero que poderia ser gerado.	<b>45</b>
<b>Figura 21</b>	Reação entre a hidrazona <b>34</b> e bis-MPA.	<b>46</b>
<b>Figura 22</b>	Espectro de alta resolução da reação entre o composto <b>34</b> e bis-MPA.	<b>47</b>
<b>Figura 23</b>	Comparação estrutural entre os compostos <b>32</b> e <b>35</b> .	<b>48</b>
<b>Figura 24</b>	Cristais obtidos do composto <b>35</b> .	<b>49</b>
<b>Figura 25</b>	Provável estrutura do dendrímero <b>36</b> , modificado com o ácido <b>35</b> .	<b>50</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Avaliação da (%) de inibição dos derivados de furano frente às células Hep-2, NCI-H292 e HL60.	<b>35</b>
<b>Tabela 2</b>	Teste de solubilidade dos materiais em vários solventes	<b>39</b>
<b>Tabela 3</b>	Teste de cetalização entre a cetona <b>32</b> e bis-MPA.	<b>42</b>
<b>Tabela 4</b>	Atividade Citotóxica do composto <b>35</b> , dendrímero <b>36</b> e bis-MPA.	<b>52</b>
<b>Tabela 5</b>	Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.	<b>54</b>

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b>	Estrutura idealizada de um polímero bis-MPA de 3 <sup>a</sup> geração (G3).	<b>22</b>
<b>Esquema 2</b>	Preparo da cetona <b>32</b> .	<b>37</b>
<b>Esquema 3</b>	Representação das possíveis ligações de Hidrogênio entre o composto <b>32</b> e bis-MPA.	<b>40</b>
<b>Esquema 4</b>	Formação entre <b>32</b> e bis-MPA em meio ácido.	<b>41</b>
<b>Esquema 5</b>	Preparo do composto <b>34</b> .	<b>44</b>
<b>Esquema 6</b>	Preparo do composto <b>35</b> .	<b>48</b>
<b>Esquema 7</b>	Reação de formação do dendrímero de 5 <sup>a</sup> geração.	<b>49</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

RMN <sup>1</sup> H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	- Ressonância magnética nuclear de carbono
δ	- Deslocamento químico em ppm
Hz	- Hertz
s	- Simpleto
<i>d</i>	- Duplete
<i>dd</i>	- Duplo duplete
<i>t</i>	- Triplete
<i>qt</i>	- Quadruplete
<i>ddt</i>	- Duplo duplo triplete
<i>m</i>	- Multiplete
<i>J</i>	- Constante de acoplamento
sa	- sinal alargado
ppm	- Parte por milhão
THF	- Tetraidrofurano
CCD	- Cromatografia em camada delgada
bis-MPA	- Polímero hiper-ramificado baseado em ácido 2,2-bis(metilol) propiônico.
DCC	- Dicicloexil carbodiimida
APTS	- Acido p-toluenosulfônico
DCM	- Diclorometano
MTT	- Método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
3.1 Avaliação Citotóxica dos derivados de Furano	35
3.2 Furanos 2-Substituídos como substratos modelo	36
3.3 Síntese da cetona <b>32</b>	<b>37</b>
3.4 Complexo via interação química	38
3.5 Conjugação via ligação química	40
3.5.1 Formação de cetais	40
3.5.2 Formação da hidrazona <b>34</b>	<b>42</b>
3.5.3 Formação do ácido furil acrílico ( <b>35</b> )	<b>48</b>
3.6 Estudo Citotóxico	51
3.6.1 Método de Análise dos Resultados	51
3.6.2 Citotoxicidade induzida pelo conjugado bis-MPA	52
<b>4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>53</b>
<b>5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>54</b>
5.1 Método Colorimétrico MTT	54
5.2 Linhagens Celulares	54

5.3 Cultivo das células tumorais.	54
5.4 Ensaio da viabilidade celular.	55
5.5 Preparo da (E)-4-(2-furânil)-3-buten-2-ona, composto (32)	55
5.6 Preparo do hidrazona, composto (34)	56
5.7 Preparo do ácido (E)-3-(2-furânil)-2-propenóico, composto (35)	56
5.8 Preparo do conjugado hidrazona-Bis-MPA	56
5.9 Preparo do conjugado do ácido (E)-3-(2-furânil)-2-propenóico-Bis-MPA, composto (36)	57
<b>6 APÊNDICES</b>	<b>58</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A incidência de câncer tem aumentado progressivamente. A estimativa em 2014, que também é válida para 2015, aponta aproximadamente 576 mil novos casos de câncer. Devido a esse crescente aumento, seis milhões de pessoas morrem por ano diagnosticadas com câncer, representando 12% das causas de morte no mundo.<sup>1</sup> O tratamento dessa doença ainda é um desafio devido aos inúmeros efeitos colaterais que os tratamentos influenciam na qualidade de vida do paciente. É notório que este quadro global caracteriza-se como um verdadeiro desafio científico, tecnológico e de inovação farmacêutica na intensa busca de contornar esses problemas. Portanto, o direcionamento de fármacos às células tumorais sem atingir as células saudáveis, consiste em uma estratégia para contornar os efeitos indesejáveis do tratamento quimioterápico. Desde então, inúmeras estratégias vêm sendo desenvolvidas e utilizadas na terapia do câncer, como é o caso da nanotecnologia. A nanotecnologia é uma das áreas do conhecimento e inovação que permite a manipulação e preparo de materiais na escala manométrica, os quais apresentam propriedades físico-químicas distintas daqueles materiais base em escala macroscópica, o que permite novas possibilidades de aplicações, como nanomedicamentos e nanocarreadores para uso terapêutico, adjuvante terapêutico, diagnóstico ou em produtos voltados para a saúde<sup>2</sup>.

A nanotecnologia aplicada à medicina moderna, objetiva o desenvolvimento de novos sistemas, que possam realizar *drug delivery* de forma controlada e dirigida de fármacos ao tecido alvo. Nesse intuito tem sido intensificada a procura por carreadores dotados de propriedades que permitam a redução da dosagem do medicamento, seletividade ao alvo biológico e redução dos efeitos colaterais. Dentre os diversos nanomateriais, os dendrímeros têm-se apresentado como potenciais candidatos com interesse nesses sistemas de liberação de fármacos. Os dendrímeros são uma classe especial de polímeros que apresentam estrutura muito ramificada e regular, podendo apresentar vários tipos de grupos funcionais periféricos, como aminas, carboxilas ou hidroxilas, os quais aumentam com o número de geração (G0, G1, G2, etc.).<sup>3</sup>

Os dendrímeros de poliésteres hiper-ramificados contendo hidroxilas na periferia ou bis-MPA são comercialmente disponíveis a baixo custo, não sendo imunogênicos ou tóxicos, são biodegradáveis e apresentam características importantes para aplicações biológicas, como biocompatibilidade e arquitetura hidroliticamente degradável, além de poder ser covalentemente ligado a variados substituintes bioativos como, carboidratos, peptídeos e

---

<sup>1</sup> World Health Organization - <http://www.who.int/cancer/en/index.html>

<sup>2</sup> Falleiros, J. P. B.; Brandl, A. L.; Fonseca, A. R. A. *Nucleus*, **2011**, 8, 151-169.

<sup>3</sup> Vandamme T.F.; Brobeck L. J. *Control Release* **2015**, 102, 23-28.

fármacos, características que lhe dão vantagem quando comparado a outros dendrímeros utilizados na medicina.<sup>4</sup>

Desde sua descoberta vários grupos de pesquisadores já propuseram diferentes rotas sintéticas utilizando diferentes precursores e grupos protetores, a fim de melhorar e simplificar a rota de síntese desta classe de dendrímeros. Mesmo com maior número de etapas para formar esses compostos, bons rendimentos podem ser obtidos na formação de diferentes funcionalizações do núcleo ou da periferia<sup>5</sup>. A utilização de sistemas poliméricos biodegradáveis apresenta uma ampla perspectiva no avanço médico. Portanto, os dendrímeros biodegradáveis como o bis-MPA que são poliésteres alifáticos, são os polímeros que sofrem biodegradação em meio biológico e apresentam vantagens se comparados a os outros dendrímeros.

Utilizando-se de moléculas bioativas ligadas de forma múltipla covalente, esses compostos podem ser liberados do dendrímero para um alvo específico por um único passo de clivagem, já o dendrímero, que é degradável pode ser eliminado do corpo evitando a toxicidade provocada por acúmulo de materiais em células e tecidos<sup>6</sup>.

Existem vários relatos na literatura de substituintes bioativos que tiveram êxito quando complexados com estes dendrímeros. Como por exemplo, podem-se citar os complexos com carboidratos,<sup>7, 8,9</sup> peptídeos, doxorrubicina<sup>10,11,12</sup> e os antibióticos penicilina e amoxicilina.<sup>13</sup> Também é possível encontrar trabalhos onde os grupos hidroxilas são funcionalizados a fim de tornarem-se mais bioativos, como a síntese de bis- MPA de G5 com porfirinas, aplicados em diversas áreas, como a terapia fotodinâmica. Dendrímeros poliéster apresentando carbonatos cíclicos na sua periferia também foram relatados, esses grupos reagem com aminas, mesmo em água, gerando produtos bifuncionais. Por esses

---

<sup>4</sup> Gillies, E. R.; Dy, E.; Frechet, J. M. J.; Szoka, F. C. *Mol.Pharmaceutics* **2005**, *2*, 129-138.

<sup>5</sup> Ihre, H. R.; Jesus, O. L. p.; Szoka, F. C.; Frechet, J. M. J. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 443-452.

<sup>6</sup> Leiro, V.; Garcia, J. P.; Tomas, H.; Pego, A. P. *Bioconjugate Chem.* **2015**; DOI: 10.1021/bc5006224

<sup>7</sup> Newkome, G. R.; Shreiner, C. D. *Polymer* **2008**, *49*, 1-173.

<sup>8</sup> Cardona, C. M.; Gawley, R. E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1411-1413.

<sup>9</sup> Luo, D.; Haverstick, K.; Belcheva, N.; Han, E.; Saltzman, W. M. *Macromolecules* **2002**, *35*, 3456-3462.

<sup>10</sup> Liu, X.; Wu, J.; Yamine, M.; Zhou, J.; Posocco, P.; Viel, S.; Liu, C.; Ziarelli, F.; Fermeglia, M.; Pricl, S.; Victorero, G.; Nguyen, C.; Erbacher, P.; Behr, J. P.; Peng, L. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2461-2473.

<sup>11</sup> Reyes-Reveles, J.; Sedaghat-Herati, R.; Gilley, D. R., Schaeffer, A. M.; Ghosh, K. C.; Greene, T. D.; Gann, H. E.; Dowler, W. A.; Kramer, S.; Dean, J. M. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 4108-4115.

<sup>12</sup> Lee, J. H.; Lim, Y. B.; Choi, J. S.; Lee, Y.; Kim, T. I.; Kim, H. J.; Yoon, J. K.; Kim, K.; Park, J. S. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1214-1221.

<sup>13</sup> Lakshminarayanan, A.; Ravi, V. K.; Tatineni, R.; Rajesh, Y.; Maingi, V.; Vasu, K. S.; Madhusudhan, N.; Maiti, P. K.; Sood, A. K.; Das, S. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1612-1623.

compostos não utilizarem metais pesados, sua toxicidade é um dos menores problemas visando sua aplicação como carreadores.<sup>14</sup>

Mesmo assim, a concepção e síntese de estruturas dendríticas biodegradáveis solúveis em água com ramificação precisa, peso molecular, monodispersão, e com uma farmacodinâmica adequada continua a ser um desafio. Outros aspectos principais são os estudos para superar a indesejada degradação da estrutura observada durante a ligação de determinados grupos funcionais e ou bioativos, limitando a hidrólise prematura da estrutura e ou porções funcionais, a fim de garantir a sua aplicação eficiente.

Sendo assim, é possível destacar alguns trabalhos que vão desde as ciências dos Materiais,<sup>15</sup> Polímeros,<sup>16</sup> estudos toxicológicos<sup>17</sup> até Bioquímicos.<sup>18</sup> Por isso, destaca-se a importância do estudo destes compostos, e a necessidade de se desenvolver métodos para estudar esses compostos em sinergia com o carreador. Neste sentido, o emprego do ácido **23** e da cetona **19** no desenvolvimento de um novo material furano funcionalizado na periferia do dendrímero bis MPA é uma estratégia alternativa de torná-lo mais bioativo.

---

<sup>14</sup> (a) van der Poll, D. G.; Kieler-Ferguson, H. M.; Floyd, W. C.; Guillaudeu, S. J.; Jerger, K.; Szoka, F. C.; Frechet, J. M. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 764–773. (b) Szuromi, P. D. *Science* **2003**, *302*, 1863.

<sup>15</sup> González-Tejera, M. J.; Carrillo, I.; Sanches, E. B. *Synth. Met.* **2008**, *158*, 165.

<sup>16</sup> Anca, D. B.; Georgina, F.; Luminita, C.; Francese, E.; Luis, J.; Loan, C.; Carlos, A. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 2709.

<sup>17</sup> Ding, W.; Petibone, D. M.; Latendresse, J. R.; Pearce, M. G.; Muskhelishvili, L.; White, G. A.; Chang, C. W.; Mittelstaedt, R. A.; Shaddock, J. G.; McDaniel, L. P.; Doerge, D. R.; Morris, S. M.; Bishop, M. E.; Manjanatha, M. G.; Aidoo, A.; Heflich, R. H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *261*, 164.

<sup>18</sup> Lisa, A. P.; Meredith, E. C.; Choua, C. V.; Brock, A. M. *Drug. Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 1453.

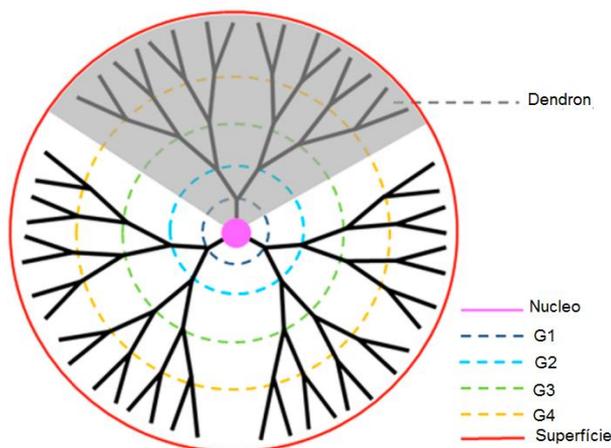
## 1.1 Revisão da Literatura

### 1.1.1 Dendrímeros

Os dendrímeros são polímeros globulares altamente ramificados, com cerca de 1-10 nm. Os primeiros estudos envolvendo dendrímero são relatados na década de 70.<sup>19</sup> A palavra dendrímero é de origem grega onde “dendron” significa árvore e “meros” significa ramos ou parte.

Enquanto os polímeros tradicionais apresentam uma massa molecular indefinida, os dendrímeros, apesar do seu tamanho molecular grande possuem uma arquitetura polimérica bem definida, e com baixa polidispersidade e possibilita elevada funcionalização.<sup>20, 21</sup>

Os dendrímeros são constituídos por diversas camadas, chamadas de gerações (G1, G2, G3, G4...) partindo do núcleo central onde os *dendron* estão ligados até a periferia (Figura 1).



**Figura 1:** Representação esquemática de um dendrímero de 4ª geração (G4).

Na Figura 1 é possível visualizar o crescimento das gerações, núcleo, superfície e *dendron* através das cores atribuídas, nomeadamente.

A encapsulação de substâncias no interior desses materiais (Núcleo do Dendrímero) pode possibilitar, por exemplo, a proteção destes compostos ao exterior, onde o mesmo é composto por unidades repetitivas. A ramificação linear destes compostos é responsável

<sup>19</sup> Vogtle, F. *Synthesis* **1978**, 155-158.

<sup>20</sup> Jang, W.; Kamruzzaman, S. K.; Lee, C.; Kang, *Progress in Polymer Science* **2009**, 34, 1-23.

<sup>21</sup> Duncan, R.; Izzo, L. *Advanced drug delivery reviews* **2005**, 57, 2215-37.

pela formação de lacunas entre as cadeias moleculares permitindo um espaço flexível, onde as moléculas podem ser incorporadas. As funcionalidades presentes na periferia dos dendrímeros são de fácil acesso, e podem ser modificadas, permitindo que essa região possa ser ajustada ao ambiente externo, e definindo propriedades físico-químicas e macroscópicas interessantes. Diferentemente de alguns polímeros convencionais, onde cadeias lineares são observadas, os dendrímeros podem apresentar propriedades únicas, devido às suas características provenientes de seu arranjo na estrutura tridimensional, podendo ser utilizados em vários tipos de aplicações.<sup>22</sup>

Uma das características dos dendrímeros é a sua capacidade em aumentar sua geração, ou seja, seu diâmetro de dentro para fora, pois quanto maior for o grau de substituição em sua periferia, maior será seu tamanho longitudinal. Dendrímero de G1-G3, apresentam particularidades que podem conferir diferentes características, como flexibilidade, abertura e assimetria, podendo assim acomodar moléculas exógenas em sua superfície. Os dendrímeros de G4-G6 podem utilizar as características de vacância interna entre suas cadeias, como carreadores de fármacos, utilizando esses espaços vazios. A maioria dos dados da literatura relata o dendrímero de poli(amidoamina) (PAMAM) como, um dos mais estudados como carreadores.

Atualmente, existe um grande número, de diferentes famílias de dendrímeros com um amplo campo de aplicações na área farmacêutica e biomédica, onde alguns exemplos são mostrados na Figura 2. O lisina-dendrímero (**1**) foi um dos primeiros dendrímeros sintetizado,<sup>23, 24</sup> mas os primeiros grupos de dendrímeros que se tornaram disponíveis comercialmente foram os dendrímeros poli (propilenoimina) (PPI) (**2**)<sup>25, 26</sup> e poli (amina amido) (PAMAM) (**3,4**).<sup>27</sup> A amina éter (**5**)<sup>28, 29</sup> e éster de dendrímeros de amina (**6**)<sup>30, 31</sup> são exemplos de dendrímeros catiônicos com um núcleo mais flexível desenvolvido para a compactação do ácido nucleico para células de mamíferos.

---

<sup>22</sup> Lee, C.C.; MacKay, J.A.; Fréchet, J.M.J.; Szoka, F.C. *Nature biotechnology* **2005**, *23*, 1517-26.

<sup>23</sup> Denkwalter, R. G.; Kolc, J.; Lukasavage, W. J. *United States Patent* 1991, 4, 289, 872 A19810915.

<sup>24</sup> Denkwalter, R. G.; Kolc, J.; Lukasavage, W. J. *United States Patent* 1991, 4, 289, 872 A19810915.

<sup>25</sup> Debrabandervandenberg, E. M. M.; Meijer, E. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1993**, *32*, 1308–1311.

<sup>26</sup> Wörner, C.; Mülhaupt, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1993**, *32*, 1306-1308.

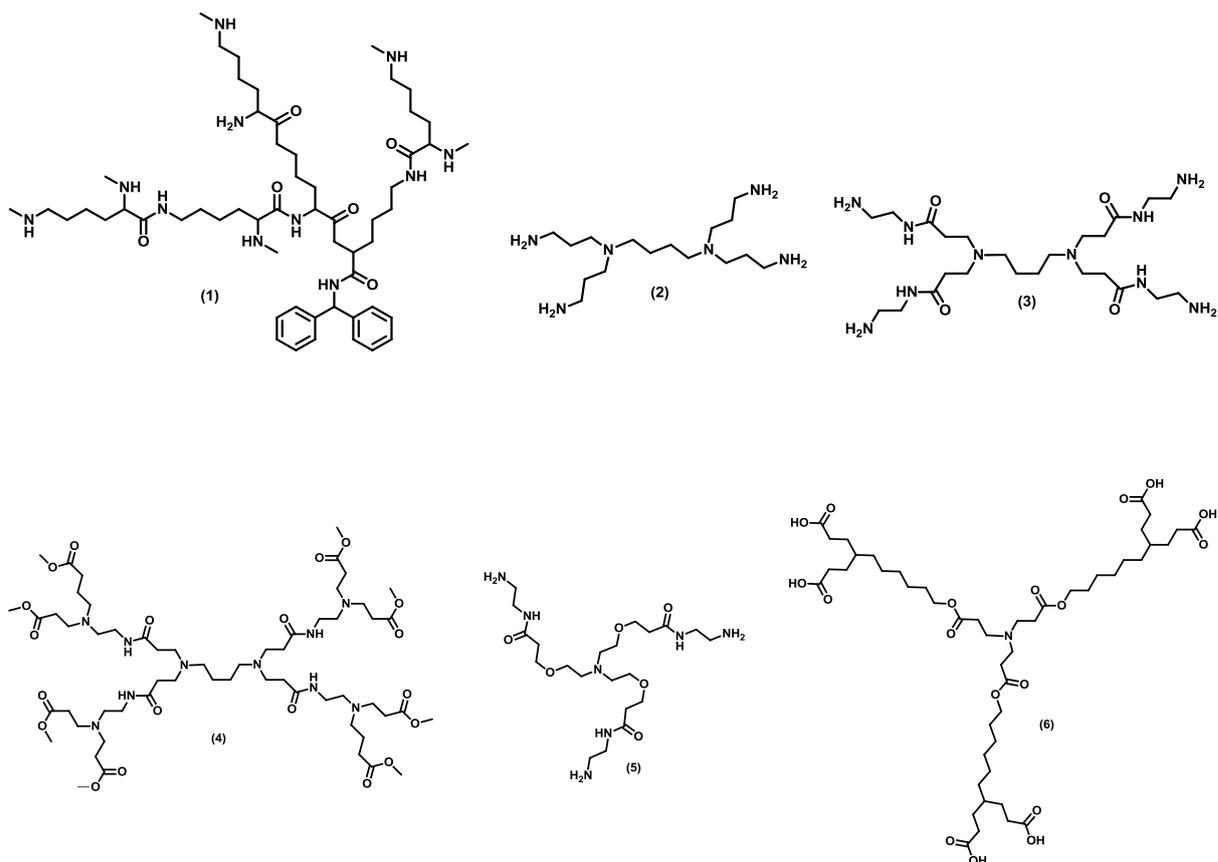
<sup>27</sup> Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117–132.

<sup>28</sup> Jayamurugan, G.; Jayaraman, N. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9582–9588.

<sup>29</sup> Lakshminarayanan, A.; Ravi, V. K.; Tatineni, R.; Rajesh, Y.; Maingi, V.; Vasu, K. S.; Madhusudhan, N.; Maiti, P. K.; Sood, A. K.; Das, S. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1612–1623.

<sup>30</sup> Wu, J. Y.; Zhou, J. H.; Qu, F. Q.; Bao, P. H.; Zhang, Y.; Peng, L. *Chem. Commun.* **2005**, *3*, 313–315.

<sup>31</sup> Liu, X. X.; Liu, C.; Laurini, E.; Posocco, P.; Pricl, S.; Qu, F. Q.; Rocchi, P.; Peng, L. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 470–481.



**Figura 2:** Estrutura dos dendrímeros **1-6**: lisina-dendrímero (**1**), poli (propilenoimina) (PPI) (**2**), poli (amina amido) (PAMAM) (**3,4**), amina éter (**5**) e éster de dendrímeros de amina (**6**).

Outras espécies interessantes em relação a aplicações biomédicas incluem derivados de arquiteturas NTris [(2 – {(tris {[2- (terc-butoxicarbonil) etoxi] metil} –metil) amino] carbonil} etoxi) metil] metilamina dendrímero (**7**),<sup>32</sup> bem como de fósforo (**9**),<sup>33 34</sup> s-triazina (**10**),<sup>35 36</sup> poliglicerol (**11**),<sup>37,38</sup> e de poliéster (**12**).<sup>39,40</sup>

Os dendrímeros de polifenileno (**8**)<sup>41</sup> são exemplos de macromoléculas não polares ramificados que têm também encontrado aplicações em muitas configurações biológicas. Entretanto os dendrímeros de poli (ésteres) (bis-MPA) têm atraído muito a ciência e a

<sup>32</sup> Cardona, C. M.; Gawley, R. E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1411–1413.

<sup>33</sup> Majoral, J. P.; Caminade, A. M. *Top. Curr. Chem.* **2003**, *223*, 111–159.

<sup>34</sup> Mignani, S.; El Kazzouli, S.; Bousmina, M. M.; Majoral, J. P. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1327–1342.

<sup>35</sup> Zhang, W.; Simanek, E. E. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 843–845.

<sup>36</sup> Lim, J.; Simanek, E. E. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 826–835.

<sup>37</sup> Haag, R.; Sunder, A.; Stumbe, J.-F. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2954–2955.

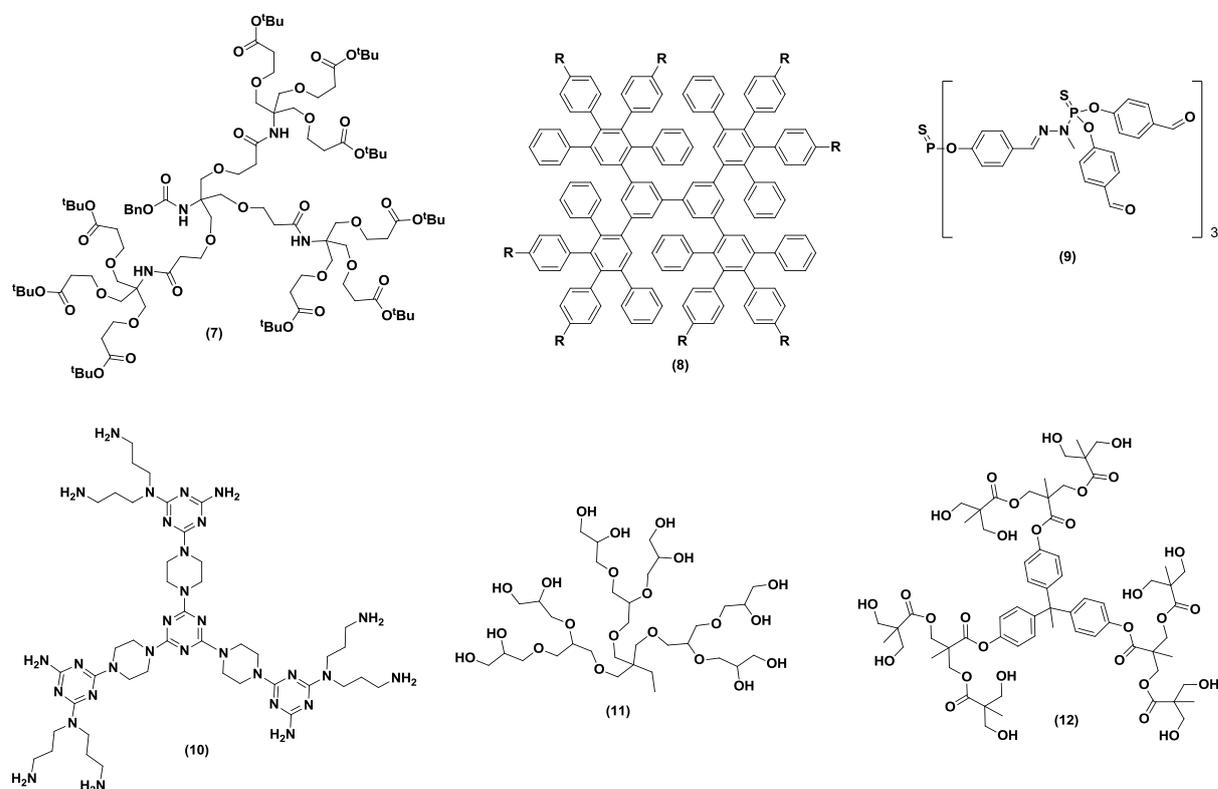
<sup>38</sup> Stiriba, S. E.; Frey, H.; Haag, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1329–1334.

<sup>39</sup> Claesson, H.; Malmstrom, E.; Johansson, M.; Hult, A. *Polymer* **2002**, *43*, 3511–3518.

<sup>40</sup> Feliu, N.; Walter, M. V.; Montanez, M. I.; Kunzmann, A.; Hult, A.; Nystrom, A.; Malkoch, M.; Fadeel, B. *Biomaterials*, **2012**, *33*, 1970–1981.

<sup>41</sup> Wiesler, U. M.; Weil, T.; Mullen, K. *Topics in Current Chemistry* **2001**, *212*.

tecnologia, pois é uma alternativa com baixo custo e sua síntese é muito mais simples quando comparados com outros dendrímeros.



**Figura 3:** Estrutura dos dendrímeros **7-12**: NTris [(2 – {[tris {[2- (terc-butoxicarbonil) etoxi] metil} –metil] amino] carbonil} etoxi) metil] metilamina (**7**), dendrímeros de polifenileno (**8**), de fósforo (**9**), s-triazina (**10**), poliglicerol (**11**) e de poliéster (**12**).

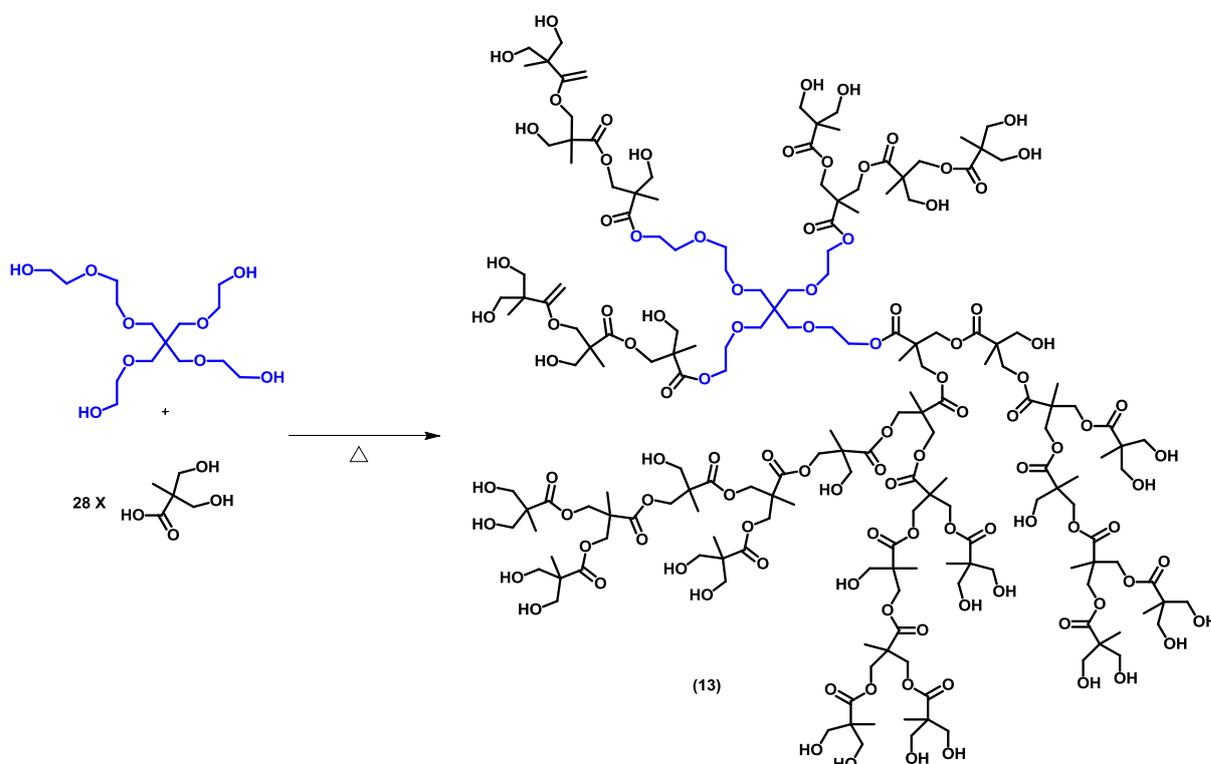
### 1.1.2 Dendrímeros poli (ésteres) bis-MPA

O primeiro relato científico da utilização de bis-MPA como um monômero para a construção de uma macromolécula dendríticas foi por Hult e seus colaboradores em 1993.<sup>42</sup>

Os polímeros hiper-ramificados (bis-MPA) (Esquema 1) são macromoléculas dendríticas polidispersos que possuem propriedades semelhantes aos demais dendrímeros. Possuem como característica comum uma elevada densidade e com alto potencial de ramificação em cada unidade de repetição. A facilidade com que esses compostos são preparados, em um único passo de polimerização, e suas propriedades intrínsecas tem

<sup>42</sup> Johansson, M.; Malmstrom, E.; Hult, A. *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **1993**, *31*, 619–624.

estimulado o interesse na literatura.<sup>43, 44</sup> Suas ramificações são imperfeitas, possuem alto número de grupos funcionais terminais.



**Esquema 1:** Estrutura idealizada de um polímero bis-MPA de terceira geração (G3).

Recentemente, têm sido realizados estudos sobre as estruturas altamente ramificadas em relação às suas propriedades, síntese e possíveis campos de aplicação. Com isso, resultados promissores vêm sendo demonstrados pelo grupo de Carlmark e colaboradores<sup>45</sup> como excelente síntese e solubilidade, em comparação com polímeros lineares, baixa viscosidade da solução e elevado nível de funcionalizações da periferia dendrítica.<sup>46</sup> Atualmente, todos os dendrímeros tradicionais bis-MPA são comumente sintetizados e caracterizados com precisão através do método divergente de crescimento. Além das aplicações “tradicionais” de polímeros, os dendrímeros hiper-ramificados abrem a oportunidade para novas aplicações nanotecnológicas, devido as suas unidades funcionais e formação de poros e cavidades, como por exemplo, o emprego como película fina em

<sup>43</sup> Voit, B.I. ; Lederer, A. *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 5924–5973.

<sup>44</sup> Gao, C.; Yan, D. *Prog. Polym. Sci.*, **2004**, 29, 183–275.

<sup>45</sup> Carlmark, A.; Hawker, C.; Hult, A.; Malkoch, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 352.

<sup>46</sup> (a) Voit, B. I. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2000**, 38, 2505. (b) Jikei, M.; Kakimoto, M. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, 42, 1293. (c) Froehling, P. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, 42, 3110 (d) Hult, A.; Johansson, M.; Malmstroem, E. *Adv. Polym. Sci.* 1999, 143, 1.

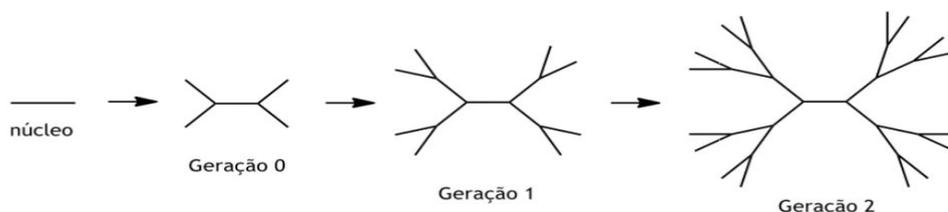
sensores de dispositivos e de diagnóstico, como aditivos para veículos especiais, como espécies catalíticas e terapêuticas.<sup>47, 48, 49</sup>

## 1.2 Síntese de Dendrímeros

Os dendrímeros são sintetizados através de etapas bem controladas. Entretanto, existem dois principais métodos para sintetizar as estruturas dendríticas: o método divergente e o método convergente.

### 1.2.1 Método Divergente

Neste método os dendrímeros se iniciam a partir do núcleo central, que através das rotas sintéticas repetidas aumentam as ramificações de geração em geração em direção à periferia. Portanto este método caracteriza-se como se o dendrímero estivesse sendo construído de dentro para fora, conforme a Figura 4. Uma das características do método divergente, e que pode ser considerado uma das vantagens deste método, é que há um rápido progresso do número de grupos terminais reativos, podendo assim ser produzido em grandes quantidades. Por outro lado quanto mais rápido a molécula crescer maior será a possibilidade de ocorrerem falhas e imperfeições.



**Figura 4:** Representação esquemática do crescimento dendrimérico através do método divergente.

### 1.2.2 Método Convergente

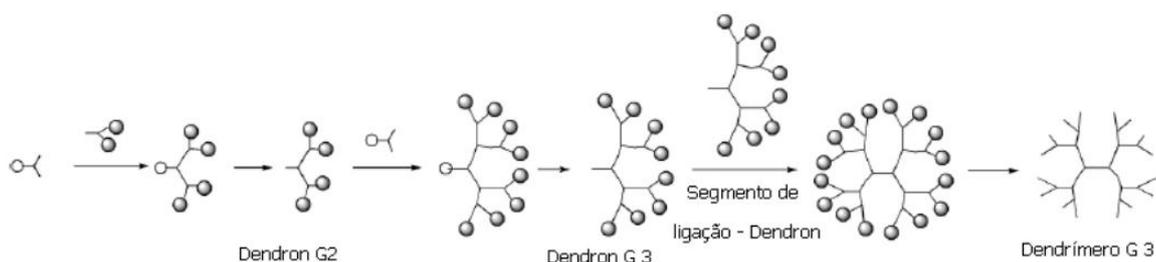
Para minimizar os defeitos do método divergente, um grupo de pesquisadores Hawker e Freché<sup>50</sup> foi pioneiro no desenvolvimento do método convergente. Com este

<sup>47</sup> Gao, C.; Yan, D. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 183.

<sup>48</sup> Yates, C. R.; Hayes, W. *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 1257.

<sup>49</sup> Voit, B. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1139.

método a construção dos dendrímeros se dá a partir da periferia para o núcleo. O princípio do método envolve a construção de diversas unidades de *dendron*, que unidos são acoplados até o núcleo central, conforme mostra a Figura 5. Este método permite um número maior de reações de acoplamento necessárias, para adicionar uma nova geração, diminuindo assim drasticamente os defeitos estruturais. No entanto a dificuldade está em gerar dendrímeros com alta ordem de gerações, pois a reação ao núcleo fica muito congestionada, e fazendo com que os rendimentos de síntese sejam consideravelmente menores.



**Figura 5:** Representação esquemática do crescimento dendrímérico através do método convergente.

### 1.3 Propriedades dos Dendrímeros

Devido às suas características funcionais, um aumento crescente de trabalhos envolvendo dendrímeros para fins terapêuticos e de diagnóstico tem sido relatado.<sup>51</sup>

À medida que estes compostos vão sendo estudados, um melhor conhecimento de sua estrutura, reatividade e estabilidade também vão sendo divulgados. Alguns parâmetros importantes são sua biocompatibilidade, eficácia terapêutica e especificidade funcional.<sup>52</sup>

Como esses compostos são geralmente preparados em etapas distintas, é possível introduzir diferentes funcionalidades dependendo da sequência da rota de síntese adotada. Isso pode conferir diferentes características hidrofóbicas devido à presença de diferentes funções químicas em sua estrutura.

<sup>50</sup> Hien, O.; Komber, H.; Voit, B.; Krasteva, N.; Yasuda, A.; Vossmeier, T. *J. Nanostructured Polym. Nanocomposites (JNPN)* **2006**, 2, 109.

<sup>51</sup> Lee, C.C.; MacKay, J.A.; Fréchet, J. M. J.; Szoka, F.C. *Nature biotechnology* **2005**, 23, 1517-26.

<sup>52</sup> Wolinsky, J.; Grinstaff, M. *Advanced drug delivery reviews* **2008**, 60, 1037-55.

### 1.3.1 Propriedades físico-químicas

Os dendrímeros apresentam propriedades físico-químicas diferenciadas e muito atrativas. De uma forma geral, apresentam homogeneidade química e estrutural, dependendo do seu tamanho e conformação. As propriedades farmacocinéticas e sua biodistribuição podem ser controladas, devido ao crescimento exponencial do número de grupos periféricos à medida que a geração aumenta, assim como a adição de diversos grupos funcionais usufruem uma multivalência e possibilidade de funcionalização seletiva.

### 1.3.2 Propriedades biológicas

Os dendrímeros oferecem diversos atributos adequados para o emprego na formulação de fármacos.<sup>53, 54, 55, 56</sup> Algumas dessas características são: a possibilidade de controlar o tamanho e a forma do dendrímero; a alta capacidade de incorporar substâncias em seu interior ou na superfície; capacidade de promover liberação controlada de fármacos; possibilidade de modificar as estruturas funcionais da superfície; baixa imunogenicidade; direcionamento do fármaco até a célula alvo,<sup>57</sup> Outra característica é sua solubilidade em água, com isso favorece aplicações para fins biológicos.<sup>58</sup>

Nos sistemas baseados em dendrímeros podemos encontrar na literatura diversas formas de sua arquitetura e interação com as moléculas hospedeiras, conforme a Figura 6. Como os dendrímeros apresentam uma arquitetura bem definida é possível encapsular fármacos em seu interior, ou os múltiplos grupos presentes na periferia do dendrímero podem ser modificados para incorporações em sua extremidade.<sup>59</sup> Essas interações podem ocorrer das seguintes maneiras, envolvendo interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio aprisionando o fármaco no interior do dendrímero. Um exemplo de aplicação neste caso é quando o fármaco é pouco solúvel em água, podendo ser solubilizados pela incorporação na cavidade hidrofóbica do dendrímero, melhorando sua biodisponibilidade dependendo da via de administração.<sup>60,61,62</sup> Outra possibilidade são

<sup>53</sup> Lee, C. C.; MacKay, J. A.; Frechet, J. M.; Szoka, F. C. *Nat. Biotechnol* **2005**, *23*, 1517–1526.

<sup>54</sup> Dufes, C.; Uchegbu, I. F.; Schatzlein, A. G. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2177–2202.

<sup>55</sup> Boas, U.; Heegaard, P. M. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43–63.

<sup>56</sup> Mintzer, M. A.; Grinstaff, M. W. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 173–190.

<sup>57</sup> Esfand, R.; Tomalia, D. A. *Research Focus Review* **2001**, *6*, 427–436.

<sup>58</sup> Aulenta, F.; Hayes, W.; Rannard, S. *European Polymer Journal* **2003**, *39*, 1741–1771.

<sup>59</sup> Florence, A.T. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*, 2104–2105.

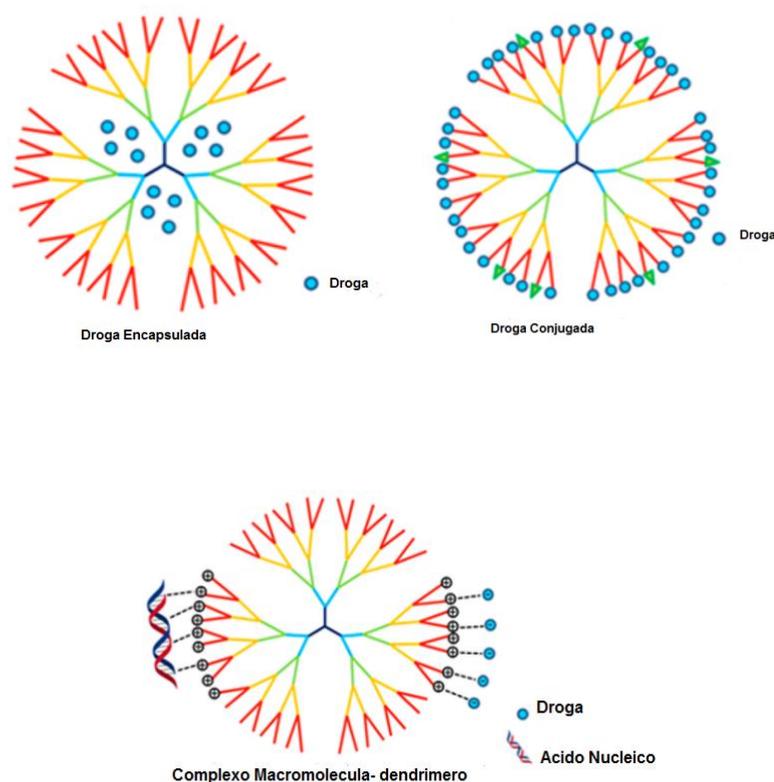
<sup>60</sup> Jain, N. K.; Gupta, U. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *8*, 1035–1052.

<sup>61</sup> D'Emanuele, A.; Attwood, D. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2147–2162.

<sup>62</sup> Yiyun, C.; Tongwen, X.; Rongqiang, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1390–1393.

interações eletrostáticas e covalentes, este atributo não só favorece controlar o tamanho e a forma do dendrímero como oferece uma capacidade de modular a solubilidade em meios polares e não polares.

É possível notar que dependendo da composição química e reatividade da superfície, essas podem atuar como “micelas inversas” formando complexos com outras macromoléculas, como exemplo o ácido nucleico. Grandes números de substituintes bioativos obtiveram êxito quando ligados covalentemente a superfície dendrítica (Figura 6).



**Figura 6:** Diferentes aplicações dos dendrímeros para biomedicina.<sup>63</sup>

O número de patentes e publicações relacionando dendrímeros vem crescendo exponencialmente nos últimos anos. A empresa Starpharma que visa comercializar produtos com a nanotecnologia, detém mais de 100 patentes com dendrímeros, que envolvem diversas classes deste tipo de molécula em diferentes aplicações. Como exemplo o VivaGel<sup>®</sup>, que é um agente antimicrobiano inovador, formulado em gel, testado em ensaios clínicos onde o dendrímero é utilizado como uma substância ativa.<sup>64</sup>

<sup>63</sup> WU, L. P.; Ficker, M.; Christensen, J. B.; Trohopoulos, P. N.; Moghimi, S. M. *Bioconjugate Chemistry* 2015, DOI:10.1021/acs.biocomjchem.5b00031.

<sup>64</sup> Bourne, N.; Stanberry, L.R.; Kern, E.R.; Holan, G.; Matthews, B.; Bernstein, D.I. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000, 44, 2471-2474.

Apesar de vários atributos que fazem dos dendrímeros um candidato adequado como pró-fármaco e para sistema de entrega controlada de fármaco, a natureza polimérica de dendrímeros e seus derivados, são ainda desafios para a produção farmacêutica.

Com isso, há necessidade de se procurar novas classes de substâncias que possam apresentar importantes propriedades biológicas, principalmente no combate às doenças graves, principalmente de pesquisadores que atuam tanto na área acadêmica quanto na área industrial. Dentre as várias classes de compostos que podem ser frequentemente encontradas na natureza podemos citar os derivados de furanos. Esses compostos aromáticos são bastante difundidos na natureza por desempenhar um papel importante em processos bioquímicos. No entanto, poucos estudos sobre a atividade *in vitro* envolvendo a citotoxicidade de furanos esta relatada na literatura. Além disso, nenhum estudo foi reportado até o momento, estudando o efeito da incorporação de substâncias contendo anéis furânicos nas estruturas de dendrímeros, como é o caso do bis-MPA. Por isso, e visando procurar alternativas que possam levar o tratamento de câncer, alguns derivados de compostos furânicos foram testados, como moléculas capazes de funcionalizar o dendrímero bis-MPA. A escolha dessas moléculas está diretamente ligada a um estudo de citotoxicidade realizado previamente com uma biblioteca de compostos sintetizadas pelo grupo.

Sendo assim, pode-se destacar a importância do estudo destes compostos, e a necessidade de se desenvolver métodos para estudar esses compostos em sinergia com carreadores, como os dendrímeros por exemplo.

## 1.4 Furanos

### 1.4.1 Furanos substituídos

Os Furanos são uma importante classe de compostos orgânicos pertencentes à família dos heterocíclicos aromáticos de cinco membros. Estes compostos, quando substituídos em algumas posições do anel são encontrados na natureza<sup>65</sup> e frequentemente utilizados como blocos de construção em ciência de materiais.<sup>66</sup>

Furanos também fazem parte de subunidades importantes de muitos produtos de interesse industrial. Um exemplo é sal hidrocloreídrico da ranitidina (**14**), comercializado por

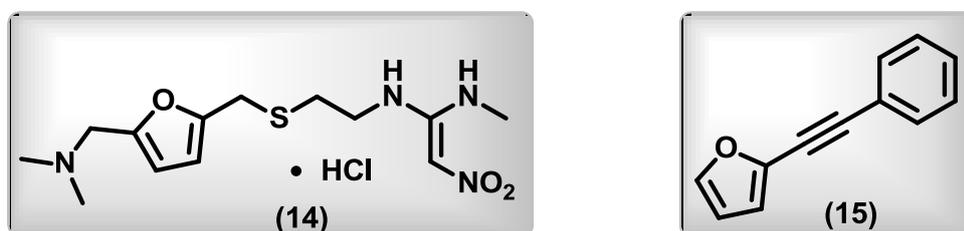
---

<sup>65</sup> (a) Hou, X. L.; Cheung, H. Y.; Hon, T. Y.; Kwan, P. L.; Lo, T. H.; Tong, S. Y.; Wong, H. N. C. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 1955. (b) Gilchrist, T. L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2849. (c) Marshall, J. A.; Wang, X.-J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3387. (d) Marshall, J. A.; Wallace, E. M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 796. (e) Mendez-Andino, J.; Paquette, L. A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4095.

<sup>66</sup> Lee, C. F.; Yang, L. M.; Hwu, T.-Y.; Feng, A.S.; Tseng, J.C.; Luh, T.Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4992.

vários laboratórios farmacêuticos, um dos remédios mais vendidos mundialmente usados no tratamento de pacientes com úlcera, esofagite e refluxo.<sup>67</sup> Esse composto é um antagonista do receptor H<sub>2</sub>, bloqueando a ação da histamina em células parietais produzidas pela acidez do estômago, reduzindo assim a produção de suco gástrico.

Estes compostos também são encontrados como produtos naturais com grande atividade contra patógenos e carcinomas. Um exemplo é o produto natural carlina (15), obtido das raízes da *Carlina acaulis*. Este composto foi utilizado por muito tempo como um medicamento antimicrobiano e antiparasitário, devido às suas propriedades relevantes contra *Staphylococcus aureus* e *Trypanossoma brucei*, um parasita responsável pela tripanossomíase africana<sup>68</sup> (Figura 7).



**Figura 7:** Cloridrato de ranitidina (14) e carlina (15).

Outros produtos naturais bioativos encontrados na natureza contendo estes heterociclos são os ácidos graxos furânicos (16),<sup>69</sup> que até hoje não tem seu papel biológico definido na natureza. No entanto, esses compostos são muito utilizados no combate a radicais livres produzidos pelo stress oxidativo, e como um poderoso agente contra a aterosclerose humana e doenças cardiovasculares.<sup>70</sup> Estes ácidos são amplamente encontrados na natureza, incluído mamíferos, crustáceos, anfíbios, répteis,<sup>71</sup> bactérias marinhas,<sup>72</sup> algas,<sup>73</sup> e fungos<sup>74</sup> (Figura 8).

<sup>67</sup> (a) Wright, R. J. *Health Care Mark* **1996**, *16*, 24. (b) Cholerton, T. J.; Hunt, J. H.; Klinkert, G.; Martinsmith, M. J. *Chem. Soc. Perkin Trans.* **1984**, *2*, 1761.

<sup>68</sup> Krauss, J.; Bracher, F.; Unterreitmeier, D. *Turk. J. Chem.* **2005**, *29*, 635.

<sup>69</sup> (a) Spiteller, G. *Lipids* **2005**, *40*, 755. (b) Hermann, F.; Hamoud, R.; Sporer, F.; Tahrani, A.; Wink, M. *Planta Med.* **2011**, *77*, 1905.

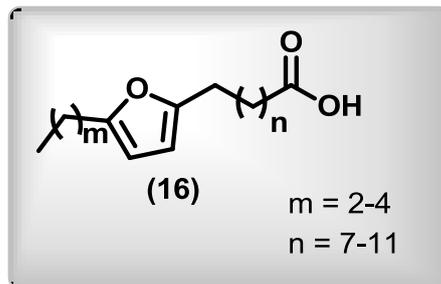
<sup>70</sup> Spiteller, G. *Lipids* **2005**, *40*, 755.

<sup>71</sup> Schödel, R.; Spiteller, G. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 459. (b) Okajima, H.; Ishii, K.; Watanabe, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3281. (c) Ishii, K.; Okajima, H.; Koyamatsu, T.; Okada, Y.; Watanabe, H. *Lipids* **1988**, *23*, 694. (d) Ishii, K.; Okajima, H.; Okada, Y.; Konishi, H.; Watanabe, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 1564.

<sup>72</sup> Shirasaka, N.; Nishi, K.; Shimuzu, S. *Biochem. Biophys. Acta* **1997**, *1346*, 253-260. (b) Carballeira, N. M.; Guzmán, A.; Nechev, J. T.; Lahtchev, K.; Ivanova, A.; Stefanov, K. *Lipids* **2000**, *35*, 1371.

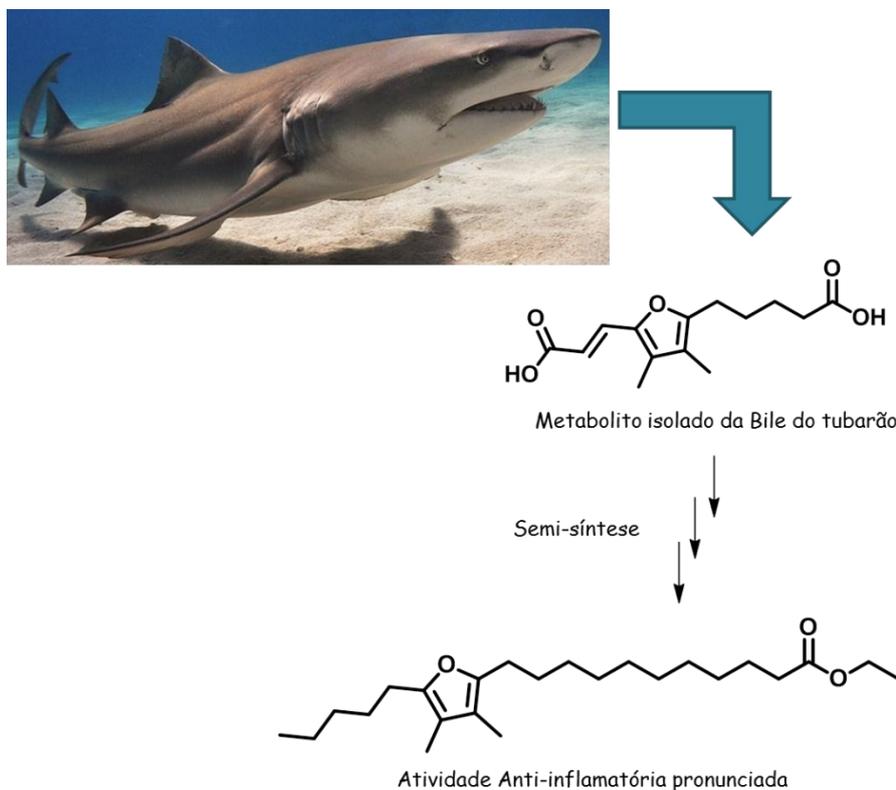
<sup>73</sup> Batna, A.; Scheinkönig, J.; Spiteller, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1166*, 171.

<sup>74</sup> Hannemann, K.; Puchta, V.; Simon, E.; Ziegler, H.; Ziegler, G.; Spiteller, G. *Lipids* **1989**, *24*, 296.



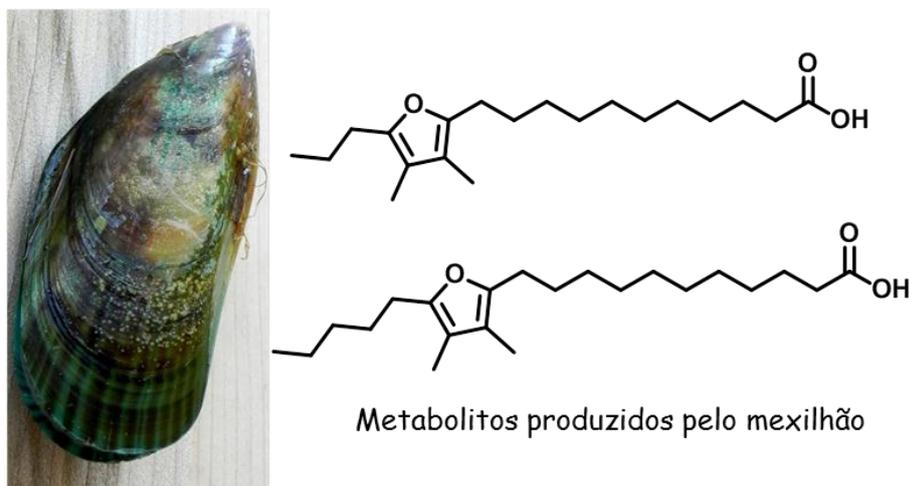
**Figura 8:** Estrutura geral de ácidos graxos furânicos

Alguns desses compostos receberam atenção especial, devido à observação de uma eficaz atividade anti-inflamatória presente em metabólitos produzidos pelo mexilhão de lábios-verdes (green-lipped mussel) *Perna canaliculus*. Esse efeito anti-inflamatório tem sido estudado devido à observação do baixo índice de incidência de artrite em populações Maoris, se comparada com a ocorrência desta doença na Europa.<sup>75</sup> Com essa característica interessante, vários estudos da composição deste mexilhão foram relatados chegando à conclusão de que a substância ativa era um ácido graxo contendo a função furano (Figura 9).<sup>76</sup>



<sup>75</sup> Gibson R.G.; Gibson S. L. M.; Conway V.; Chappell, D. *Practitioner* **1980**, 224, 955-960.

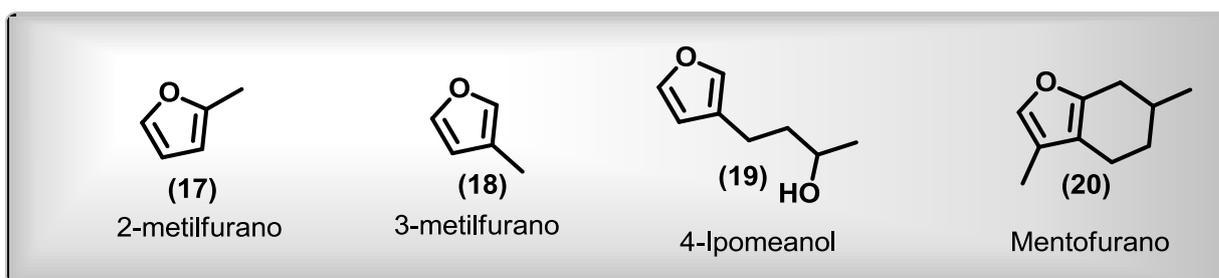
<sup>76</sup> (a) Murphy K. J.; Mooney B.D.; Mann N.J.; Nichols P.D.; Sinclair A.J. *Lipids*, 2002, 37, 587-595. (b) Wolyniak C.J.; Brenna J.T.; Murphy K.J.; Sinclair A.J. *Lipids* **2005**, 40, 355-360.



**Figura 9:** Estruturas de ácidos graxos contendo furanos do mexilhão *Perna canaliculus* e semi-síntese de éster com propriedade anti-inflamatória.<sup>77</sup>

Apesar de algumas substâncias contendo furano em sua estrutura apresentarem várias atividades biológicas e nutricionais benéficas ao homem, alguns destes compostos apresentam alta toxicidade, tendo sido estudados como moléculas bioativas capazes de apresentar variadas atividades citotóxicas.

Alguns compostos de origem natural e que apresentam citotoxicidade pronunciada são os compostos 2-metilfurano<sup>78</sup> (17), 3-metilfurano<sup>79</sup> (18), 4-ipomeanol<sup>80</sup> (19) e o mentofurano<sup>81</sup> (20), representados na Figura 10.



**Figura 10:** Compostos furânicos citotóxicos.

<sup>77</sup> Extraído da referência: Wakimotoa, T.; Kondob, H.; Niia, H.; Kimurab, K.; Egamia, Y.; Okab, Y.; Yoshidab, M.; Kidab, E.; Yeb, Y.; Akahoshib, S.; Asakawab, T.; Matsumurac, K.; Ishidab, H.; Nukayab, H.; Tsujib, K.; Kanb, T.; Abea, I. *PNAS* **2011**, *108*, 17533-17537.

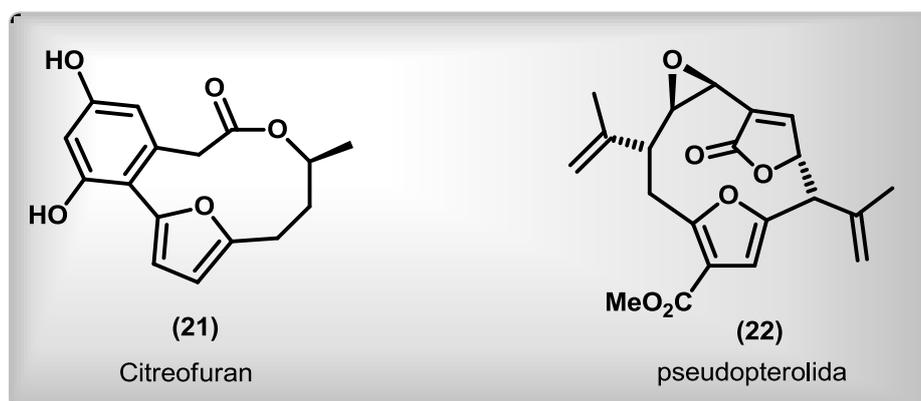
<sup>78</sup> Ravindranath, V.; McMenamin, M. G.; Dees, J. H.; Boyd, M. R. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1986**, *85*, 78-91.

<sup>79</sup> (a) Haschek, W. M.; Morse, C. C.; Boyd, M. R.; Hakkinen, P. J.; Witschi, H. P. *Exp. Mol. Pathol.* **1983**, *39*, 342-354. (b) Gammal, L. M.; Wiley, R. A.; Traiger, G.; Haschek, W. M.; Baraban, S. *Toxicology* **1984**, *30*, 177-184.

<sup>80</sup> (a) Rowinsky, E. K.; Noe, D. A.; Ettinger, D. S.; Christian, M. C.; Lubejko, B. G.; Fishman, E. K.; Sartorius, S. E.; Boyd, M. R.; Donehower, R. C. *Cancer Res.* **1983**, *53*, 1794-1801. (b) Kasturi, V. K.; Dearing, M. P.; Piscitelli, S. C.; Russell, E. K.; Sladek, G. G.; O'Neil, K.; Turner, G. A.; Morton, T. L.; Christian, M. C.; Johnson, B. E.; Kelley, M. J. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 2095-2102. (c) Lakhanpal, S.; Donehower, R. C.; Rowinsky, E. K. *Invest. New Drugs* **2001**, *19*, 69-76.

<sup>81</sup> Gordon, W. P.; Forte, A. J.; McMurtry, R. J.; Gal, J.; Nelson, S. D.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1982**, *65*, 413-424.

Além de derivados simples de furano, cuja molécula atua como unidade geradora de atividade biológica, suas subunidades também são encontradas em macromoléculas que apresentam variados tipos de atividade biológica como o citreofuran (21)<sup>82</sup> uma substância da família das curvalinas produzida pela cepa do *Penicillium citreo-viride*. E que é capaz de decompor a dupla fita da cadeia do DNA de forma irreversível<sup>83</sup> e a pseudopterolida (22), o principal metabólito isolado da planta marinha *P. acerosa*, que possui uma interessante e não usual propriedade de citotóxica, levando á inibição total de clivagem celular, mas que não inibem a divisão celular (Figura 11).<sup>84</sup>



**Figura 11:** Estrutura química do Citreofuran (21) e Pseudopterolida (22).

Com o exposto, é possível observar que vários tipos de moléculas contendo a unidade furano apresentam atividade biológica (citotóxica ou não), as quais dependem diretamente do tipo de estrutura da molécula. Com isso, é possível que um dos compostos apresente mais de uma função biológica se testado em diferentes tipos de células ou animais.

Considerando que os seres humanos podem estar expostos a estes compostos diariamente, por vários tipos de fontes, é de extrema importância avaliar o risco e o potencial citotóxico destes compostos. Por esta razão, tanto a síntese quanto estudos de atividade biológica de derivados de furanos substituídos continuam atraindo o interesse de muitos pesquisadores.

<sup>82</sup> Bracher, F.; Schulten, B. *Natural Product Research* **2003**, *17*, 293-299.

<sup>83</sup> Fürstner, A.; Castanet, A. S.; Radkowski, K.; Lehmann, C. W. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1521-1528.

<sup>84</sup> Bandurraga, M. M.; Fenical, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6463-6465.

### 1.4.2 Metabolitos reativos de moléculas contendo furano

Como citado anteriormente, a estrutura molecular de compostos contendo furano podem apresentar variadas atividades biológicas. Com isso, nos últimos anos vem surgido o interesse e a necessidade de se investigar os intermediários gerados pela biotransformação destes derivados, assim como de se estudar os principais metabolitos oriundos destas reações com biomoléculas. Sabe-se que furanos são compostos que apresentam hepatotoxicidade.<sup>85</sup> O principal mecanismo envolvido nessas transformações bioquímicas envolvendo os compostos furano e principalmente sua toxicidade está diretamente ligado à oxidação do anel furânico. Essas biotransformações ocorrem pelas enzimas P450 do citocromo das células levando à formação de um intermediário extremamente reativo chamado (Z)-2-butenedial, que reage rapidamente com nucleófilos biológicos levando a formação de uma variedade de adutos prejudiciais aos organismos vivos.<sup>86</sup> O real efeito genotóxico e as reações bioquímicas que levam a formação destes intermediários reativos via oxidação do anel furânico continua sendo uma área de grande interesse e que necessita ser melhor investigada.<sup>87</sup> Estudos recentes investigando a ligação irreversível de metabolitos de Furanos na estrutura do DNA via reticulação cruzada foram recentemente realizados, com isso pôde-se observar que o aduto (Z)-2-butenedial é um intermediário fundamental neste tipo de comportamento.<sup>88</sup>

Apesar do reparo das interações entre as fitas de bases nitrogenadas na cadeia de DNA serem de suma importância para a manutenção do nosso genoma, o material genômico é constantemente desafiado a uma média de 50.000 lesões de DNA por célula por dia. Com isso, uma compreensão detalhada dos mecanismos de defesa natural contra danos no DNA é uma área bastante desafiadora e pouco conhecida.<sup>89</sup> Na realidade, o dano no DNA induzido por reticulação das cadeias representa um desafio formidável para a sobrevivência celular. Estudos referentes a algumas doenças humanas, tais como a Anemia de Fanconi e a síndrome de Quebra de Nijmegen, que são caracterizadas por uma elevada

---

<sup>85</sup> (a) Moser, G. J.; Foley, J.; Burnett, M.; Goldsworthy, T. L.; Maronpot, R. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2009**, *61*, 101-111. (b) Sirica, A. E. *Toxicol. Pathol.* **1996**, *24*, 90-99. (c) Fransson-steen, R.; Goldsworthy, T. L.; Kedderis, G. L.; Maronpot, R. *Toxicology* **1997**, *118*, 195-204.

<sup>86</sup> (a) Lu, D.; Peterson, L. A. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 142-151. (b) Lu, D.; Sullivan, M. M.; Phillips, M. B.; Peterson, L. A. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 997-1007.

<sup>87</sup> Hickling, K. C.; Hitchcock, J. M.; Oreffo, V.; Mally, A.; Hammond, T. G.; Evans, J. G.; Chipman, J. K. *Toxicol. Pathol.* **2010**, *38*, 230-243.

<sup>88</sup> (a) Beeck, M. O.; Madder, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 796-807. (b) Stevens, K.; Madder, A. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1555-1565.

<sup>89</sup> Lange, S. S.; Reddy, M. C.; Vasquez, K. M. *DNA Repair* **2009**, *8*, 865-872.

sensibilidade de ligações cruzadas entre cadeias de DNA. Isso leva a uma predisposição do defeito básico na reparação das ligações entre as cadeias.<sup>90</sup>

Sabendo-se que os furanos apresentam atividade citotóxica pronunciada, e que metabólitos desses substratos apresentam a atividade de se ligar de forma irreversível ao DNA das células, consideramos importante expandir nossos estudos no preparo de materiais contendo Furanos e estudar separadamente alguns compostos contendo a função furano como estrutura química base em ensaios citotóxicos frente a algumas linhagens de células tumorais. Apesar de dados da literatura fornecerem alguns relatos importantes como base para nossos estudos, nenhum estudo de uma série de compostos análogos contendo furanos 2-substituídos foi relatado até o presente momento. Isso levou á possibilidade de estudar a citotoxicidade de uma biblioteca de compostos contendo a unidade furano em sua estrutura,<sup>91</sup> e estudar uma forma química de ligar essas substâncias em um dendrímero, um biomaterial com características intrínsecas discutidas anteriormente.

---

<sup>90</sup> Tsuchida, K.; Komatsu, K. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 2238-2243.

<sup>91</sup> Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno do grupo, Dartagnan de Sá Pires Ferreira, intitulada “*Derivados de Furano e Tiofeno 2- Substituídos: Síntese, resolução Cinética Enzimática e Aplicação na Preparação de Lactonas Bioativas*” (DQF-**2013**).

## 2 OBJETIVO

Carreadores de fármacos baseados em biomateriais têm se tornado uma alternativa interessante em materiais moleculares nanoestruturados. Conseqüentemente, eles são considerados materiais que podem ser empregados em testes biológicos devido às suas características como não toxicidade e biodegradabilidade. Outra característica importante é o estudo de propriedades bioquímicas que novos materiais baseados em suas estruturas podem apresentar.

Neste sentido este trabalho tem por objetivo geral:

- O preparo e o estudo toxicológico de novos compostos baseados em furanos, e um estudo de incorporação desses compostos no dendrímero bis-MPA.

Os objetivos específicos:

- *Screening* da atividade citotóxica dos composto furânicos e a escolha do composto mais bioativo.
- Síntese do composto mais bioativo em escala apropriada (multi-gramas), para que todos os testes possam ser realizados. Para isso, as sínteses dos furanos a serem utilizados devem convergir para funcionalidades orgânicas capazes de ligar essas moléculas na periferia do dendrímero.
- Funcionalização do dendrímero.
- Caracterização do sistema.
- Atividade citotóxica do sistema, o foco principal será o estudo da toxicidade dos materiais separadamente, para posterior teste em dois estágios: teste de atividade citotóxica das moléculas livres e ligadas ao dendrímero.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação citotóxica dos derivados de furano.

A parte inicial do trabalho foi realizada no intuito de se avaliar uma coleção de compostos em relação à atividade citotóxica frente às linhagens celulares Hep-2, NCI-H292 e HL-60, de forma a realizar um screening com os compostos 23 a 32.

Os primeiros resultados demonstraram que a maioria dos compostos apresentou reduzida atividade citotóxica frente às linhagens testadas, com valores menores que 50%. Dentre os compostos testados, os compostos 31 e 32 apresentaram os melhores resultados, com destaque para o composto 32, com resultados superiores a 90%. Com base na estrutura desses compostos, foi possível observar que algumas porções da molécula poderiam ser capazes de desempenhar papel importante nos testes de bioatividade. Dos compostos inicialmente testados, que serviram como base para os nossos estudos, alguns haviam sido recentemente preparados pelo grupo do Laboratório de Catalise Orgânica, em escala analítica.<sup>92</sup>

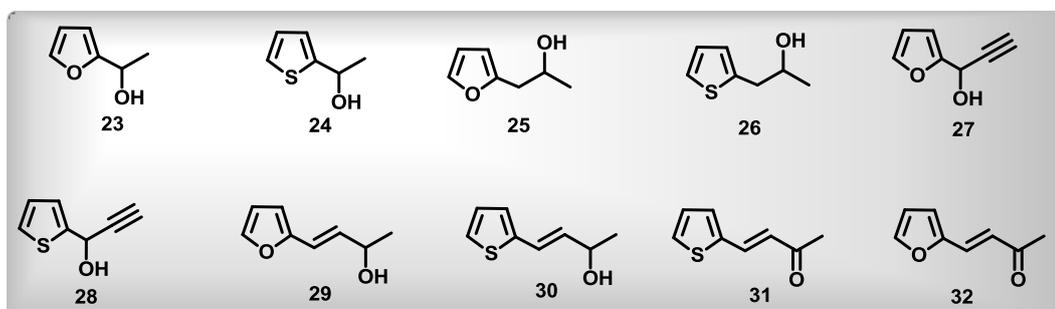
**Tabela 1:** Avaliação da (%) de inibição dos derivados de furano frente às células Hep-2, NCI-H292 e HL60.

Composto	Hep-2	NCI-H292	HL60
23	16,1 (0.4)	42,9 (9.2)	13,4 (4.4)
24	2,7 (0.8)	6,3 (0.8)	12,9 (0.5)
25	18,1 (2.1)	13,9 (2.1)	6,3 (1.3)
26	4,4 (0.8)	33,4 (4.1)	18,6 (0.6)
27	25,8 (2.7)	29,4 (0.6)	20,3 (0.0)
28	9,1 (0.9)	28,6 (1.8)	14,4 (3.2)
29	33,6 (2.0)	5,7 (2.3)	42,6 (3.0)
30	8,4 (0.0)	30,2 (1.7)	30,8 (3.6)
31	69,3 (3.9)	69,1 (1.8)	46,7 (4.0)
32	95,3 (1.6)	92,7 (3.4)	99,7 (0.5)

<sup>92</sup> Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno do grupo, Dartagnan de Sá Pires Ferreira, intitulada “*Derivados de Furano e Tiofeno 2- Substituídos: Síntese, resolução Cinética Enzimática e Aplicação na Preparação de Lactonas Bioativas*” (DQF-2013).

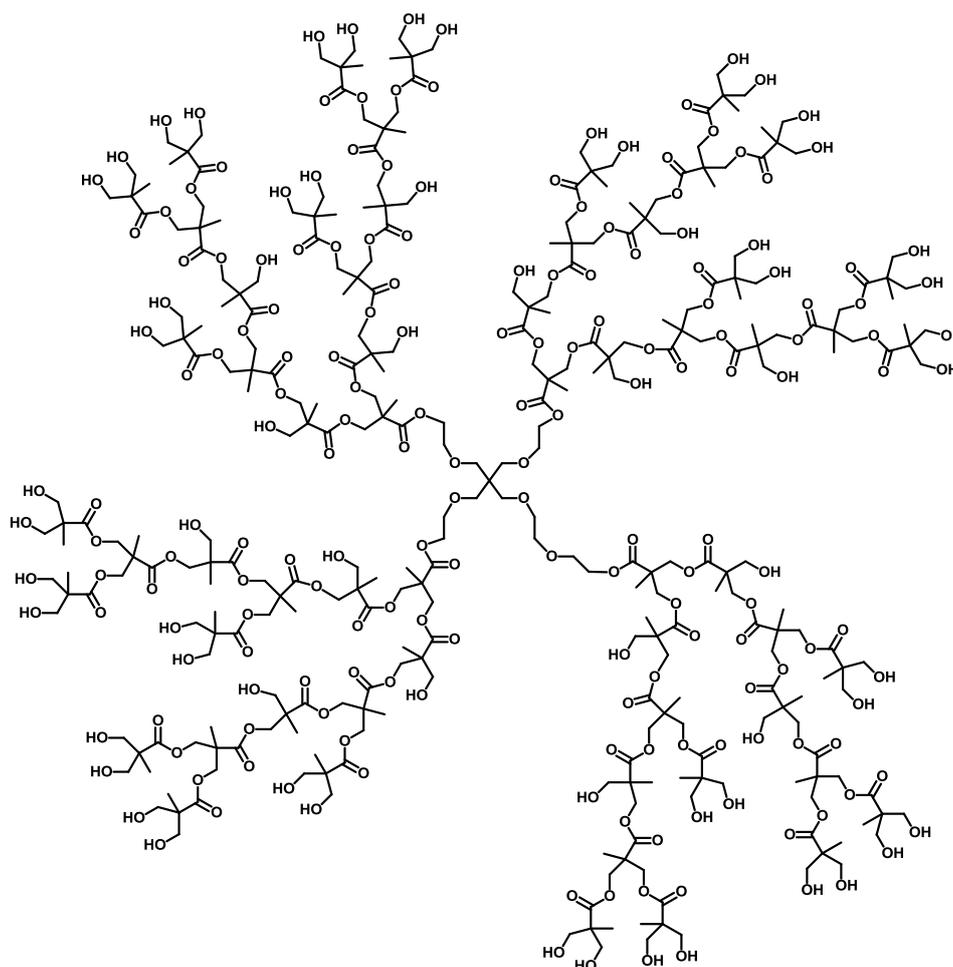
### 3.2 Furanos 2-Substituídos como substratos modelo

Os testes de atividade citotóxica foram realizados inicialmente utilizando uma série de álcoois e cetonas contendo a função furano e thiopheno em suas estruturas. Assim, os compostos **23-32** foram submetidos aos primeiros testes citotóxicos (Figura 12; Tabela 1).



**Figura 12:** Compostos contendo furanos e thiophenos **23-32**.

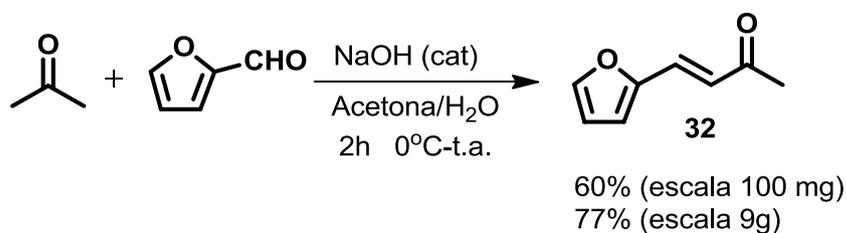
Como um dos objetivos do trabalho foi incorporar o composto, com melhor atividade biológica, ao dendrímero bis-MPA (Figura 13). O composto **32** foi escolhido.



**Figura 13:** Estrutura química do dendrímero bis-MPA.

### 3.3 Síntese da cetona **32**.

Em condições já bem estabelecidas pelo grupo do Laboratório de Catálise Orgânica, onde o composto **32** havia sido sintetizado em escala analítica, a escala da reação foi aumentada, a fim de se obter o composto **32** em maior quantidade, para ser utilizado nos testes de atividade com outras células tumorais e nos testes de incorporação dos materiais baseados nos dendrímeros. Com isso, preparou-se uma solução resfriada em banho de gelo de furaldeído em acetona, e adicionou-se uma solução 10% m/v de NaOH<sub>(aq)</sub>. Após realizar a reação, observou-se que o produto foi isolado em bom rendimento. A etapa de purificação desta reação foi realizada via destilação em um aparelho *Kugelrohr* utilizando uma bomba de vácuo acoplada, a uma temperatura de 130 °C. Após a destilação, observou-se a formação de cristais de cor amarelo-clara no interior do balão (Esquema 2; Figura 14).



#### Esquema 2: Preparo

da cetona **32**.

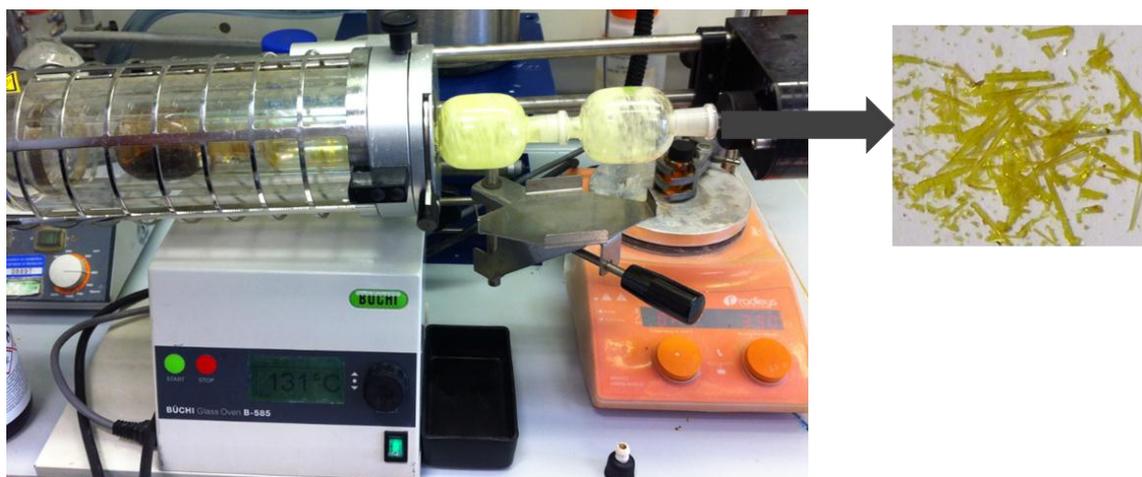
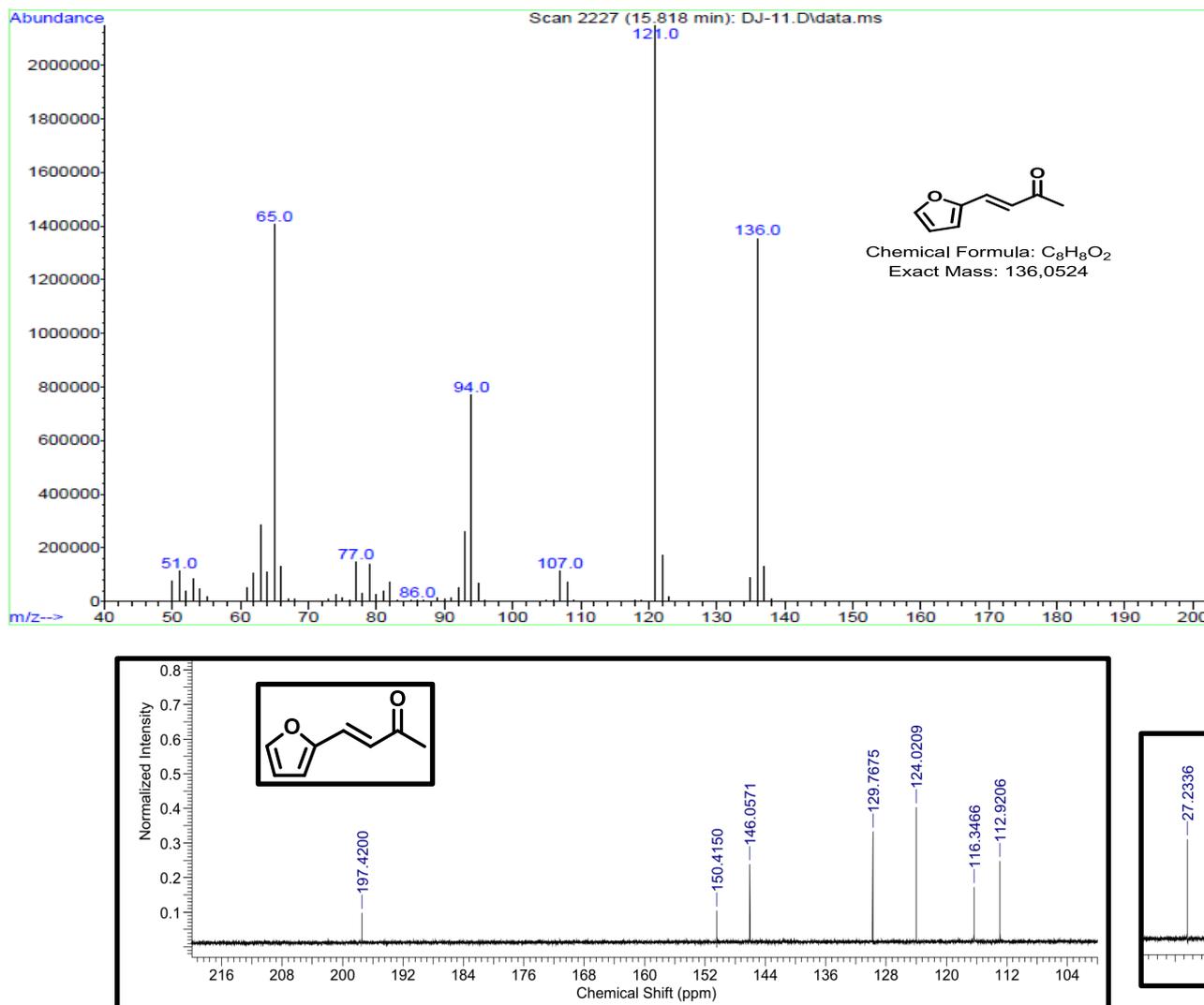


Figura 14: Obtenção do composto **32** após destilação.

Após o preparo em grande escala, o composto **32** foi isolado e caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Todas as informações estavam de acordo com o descrito na literatura.



**Figura 15:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e Massas do composto **32**.

Na Figura 15 está apresentado o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e de massas do composto **32**, que apresenta na região em cerca de 197,42 ppm o sinal referente ao carbono da carbonila da cetona no RMN de  $^{13}\text{C}$ , e massa molecular de 136 g/mol.

### 3.4 Complexo via interação química

O início dos estudos das reações envolvendo a incorporação da cetona **32** via método Horcajada, no Dendrímero bis-MPA, foi realizado utilizando métodos desenvolvidos pelo laboratório, onde se testou primeiramente a solubilidade dos materiais, dendrímero e a cetona **32**, para posteriores testes de incorporação.

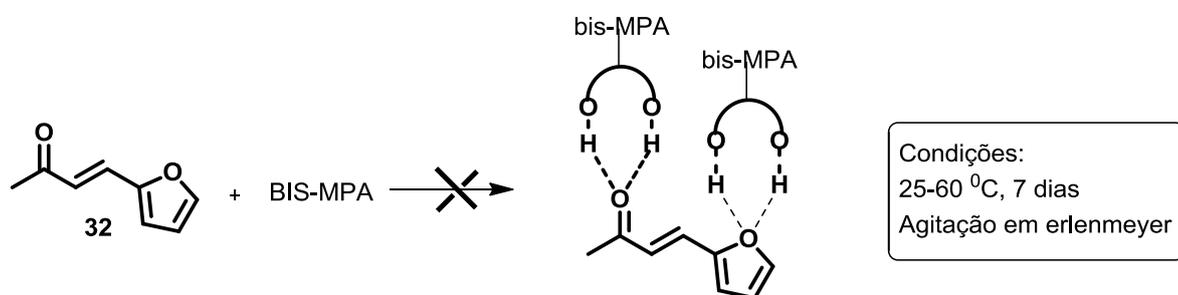
O dendrímero possui algumas funções químicas (éter, éster e hidroxilas) em sua estrutura, pensou-se na possibilidade de explorar a interações entre estas funções, para tentar incorporar o material no dendrímero. Essas espécies poderiam agir como compostos de interação física, levando a formação de um novo material, após precipitação do produto, ou remoção do solvente, caso o novo material fosse solúvel no solvente empregado. Com isso poderia ser preparado compostos contendo inclusive moléculas de solvente na estrutura total do material. Com isso os testes de solubilidade foram realizados a fim de solubilizar totalmente tanto o dendrímero quanto a cetona **32**. A tabela 2 mostra os solventes utilizados no teste de solubilidade dos materiais. Esses testes foram realizados na tentativa de solubilizar 1mg de cada composto em até 10 ml de solvente.

**Tabela 2:** Teste de solubilidade dos materiais em vários solventes.

<b>Reação</b>	<b>Composto</b>	<b>Solvente</b>	<b>Observação</b>	<b>Temperatura</b>
<b>1</b>	Bis-MPA	THF	Solúvel	40 °C
<b>2</b>	Bis-MPA	DMSO	Solúvel	25 °C
<b>3</b>	Bis-MPA	Hexano	Insolúvel	30-80 °C
<b>4</b>	Bis-MPA	Metanol	Solúvel	25 °C
<b>5</b>	Bis-MPA	Etanol	Solúvel	30 °C
<b>6</b>	Bis-MPA	Tolueno	Solúvel	25 °C
<b>7</b>	Bis-MPA	AcOEt	Solúvel	40 °C
<b>8</b>	Bis-MPA	DCM	Solúvel	25 °C
<b>9</b>	Cetona 19	THF	Solúvel	25 °C
<b>10</b>	Cetona 19	DMSO	Solúvel	25 °C
<b>11</b>	Cetona 19	Hexano	Solúvel	30 °C
<b>12</b>	Cetona 19	Metanol	Solúvel	25 °C
<b>13</b>	Cetona 19	Etanol	Solúvel	25 °C
<b>14</b>	Cetona 19	Tolueno	Solúvel	25 °C

Após a realização dos testes de solubilidade, os solventes escolhidos para as reações foram: etanol, DMSO, diclorometano e tolueno. Esses solventes foram escolhidos, devido ao fato de termos os mesmos solventes deuterados em nossa central analítica, assim pouca interferência poderia ser observada nos sinais via RMN.

Nas reações testadas entre o bis-MPA e o composto **32**, nenhum material precipitado foi observado, mesmo deixando-se o sistema em agitação por 7 dias. Neste intervalo de tempo, análises de RMN foram realizadas, para acompanhar as reações, no entanto, mesmo após o aumento da temperatura até 60<sup>o</sup> se observou que a cetona **32** continuava sem sofrer qualquer tipo de mudança em sua estrutura. O mesmo foi observado para material a ser modificado, o bis-MPA (Esquema 3).



**Esquema 3:** Representação das possíveis ligações de Hidrogênio entre o composto **32** e bis-MPA.

Como em nenhum dos casos foi possível obter o produto, uma estratégia alternativa foi idealizada. Para isso, a incorporação do composto **32** no dendrímero teria que ser feita via ligação química (ligação covalente).

## 3.5 Conjugação via ligação química

### 3.5.1 Formação de cetais

Baseados em dados da literatura, onde um estudo da reação de formação de uma serie de cetais contendo ciclos de cinco e seis membros, catalisada por ácido, foi reportada,<sup>93</sup> a cetona **32**, escolhida como substrato padrão para os estudos de atividade citotóxica, foi submetida à reação de cetalização, utilizando as condições descritas no artigo. Sendo assim uma solução da cetona em tolueno, contendo bis- MPA e quantidade catalítica de PTSA foi deixada sob refluxo por 12 horas, utilizando um *Dean stark* para remoção de água formada. A reação levaria à formação de um cetal com anel de seis membros. O método é bem geral e permite a preparação de cetais em bons rendimentos.

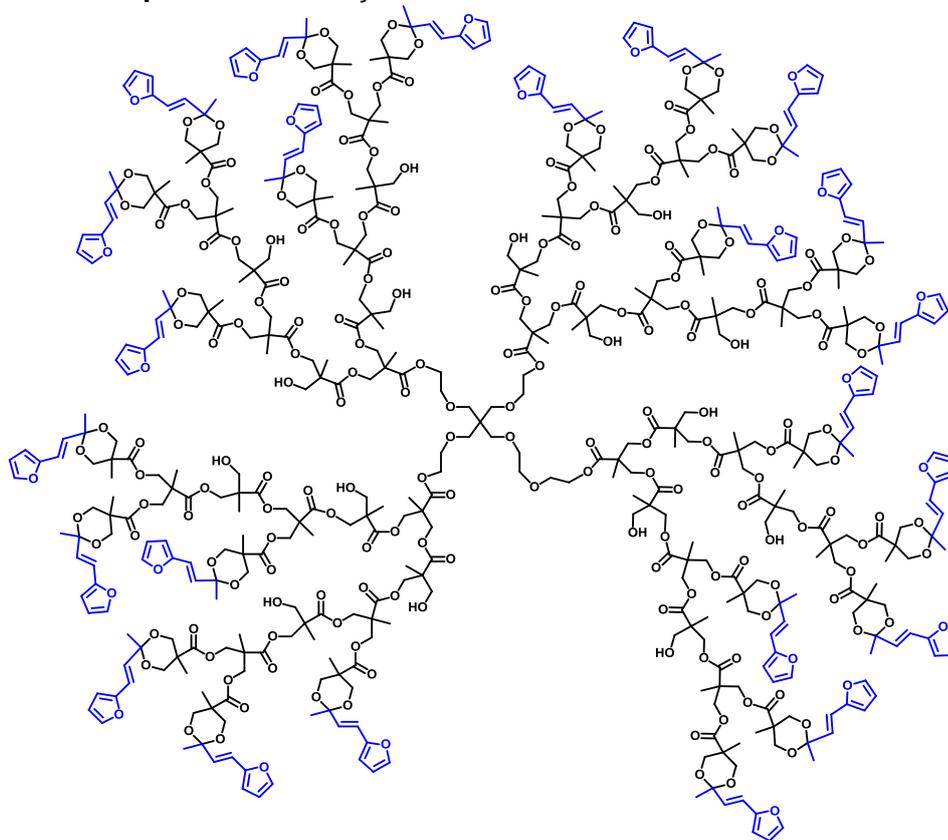
<sup>93</sup> Knowles, J. P.; Whiting, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 3365-3368.

Após acertar as condições, começamos os estudos de formação de múltiplos cetais, utilizando o dendrímero, que possui 64 hidroxilas livres, utilizando a metodologia descrita na literatura.<sup>93</sup> Como a proporção entre os reagentes de partida eram de 1:64, decidimos realizar as reações empregando um excesso da cetona **32**. Assim, poderíamos garantir a transformação de todas as hidroxilas disponíveis, para que os cetais fossem gerados. Olhando mais atentamente para a estrutura química do dendrímero, pôde-se observar que o mesmo possui 48 hidroxilas capazes de gerar um cetal (anel de seis membros neste caso). A provável estrutura do produto a ser formada esta representada na Figura 16, onde todos os possíveis cetais de serem formados estão representados.

Sendo assim, a reação foi testada conforme descrito no esquema 4, utilizando tolueno e diclorometano como solventes. Estes solventes são descritos na literatura como sendo os mais usuais para este tipo de reação. Sendo assim, várias condições experimentais, utilizando os solventes citados foram testadas.



**Esquema 4:** Formação entre **32** e bis-MPA em meio ácido.



**Figura 16** - Provável estrutura do cetal formado.

Mesmo testando várias condições experimentais foram observadas a decomposição da cetona **32**, ou a não formação de produtos conforme mostra a (Tabela 3).

**Tabela 3:** Teste de cetalização entre a cetona **32** e bis-MPA.

Reação	Temperatura	Catalisador	Solvente	Produto (%)
1	25 °C	APTS	Tolueno	0
2	50 °C	APTS	Tolueno	0
3	110 °C	APTS	Tolueno	Decomposição
4	25 °C	AlCl <sub>3</sub>	Tolueno	0
5	25 °C	APTS	Diclorometano	0
6	40 °C	APTS	Diclorometano	0
7	25 °C	BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O	Diclorometano	Decomposição

Como se pôde observar, nenhuma das reações de formação dos cetais testadas levou a formação do produto desejado. Com esses resultados, verificamos a possibilidade de utilizar um link entre o composto **32** e o bis-MPA, a fim de obter um material conjugado contendo um espaçador entre o dendrímero e a cetona utilizada como substrato.

### 3.5.2 Formação da hidrazona **34**

Apesar de certas limitações envolvendo estas reações, tratando um material polifuncionalizado como o dendrímero, que contém vários ésteres e álcoois em sua estrutura, seguindo o raciocínio, na tentativa de utilizar apenas a função periférica (a mais externa) como estratégia de preparação do nosso composto. Com isso, em pesquisa na literatura, encontramos que um bom link para a função álcool seria um ácido carboxílico.

Outra parte importante desta etapa foi a escolha da função a ser utilizada para fazer a ligação com a cetona do composto **32**. Verificou-se que para uma cetona, além de um link cetal, que já havia sido testado e não foi efetivo nas reações testadas, poderia ser utilizado hidrazinas, que reagem facilmente na presença de cetonas levando à formação de hidrazonas.

Sendo assim, era preciso de um composto que tivesse tanto a função ácido carboxílico para ser ligado a função álcool e levar à formação de um éster, quanto à função hidrazina, que se ligaria a função cetona do composto **32**, e poderia levar à formação de uma hidrazona. Através desta estratégia, poderíamos ter a ligação dos materiais, utilizando um espaçador bifuncional adequado.

Em busca na literatura, encontramos o composto **33** (Figura 17), substância disponível comercialmente, e que poderia ser testada nas reações entre o composto **32** e o dendrímero. Apesar de incluir uma nova função química, adotando esta estratégia, poderíamos observar uma eficiência diferente destes novos materiais a serem preparados, levando à formação de substâncias híbridas contendo mais de um grupo farmacofórico em um mesmo composto.

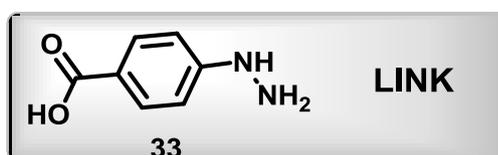


Figura 17 - Link 33.

Na figura 18, estão representadas as funções químicas dos materiais ligados (função álcool terminal do dendrímero e função cetona do composto **32** e o link que contém as funções ácidas e hidrazina, necessárias para a formação do novo material).

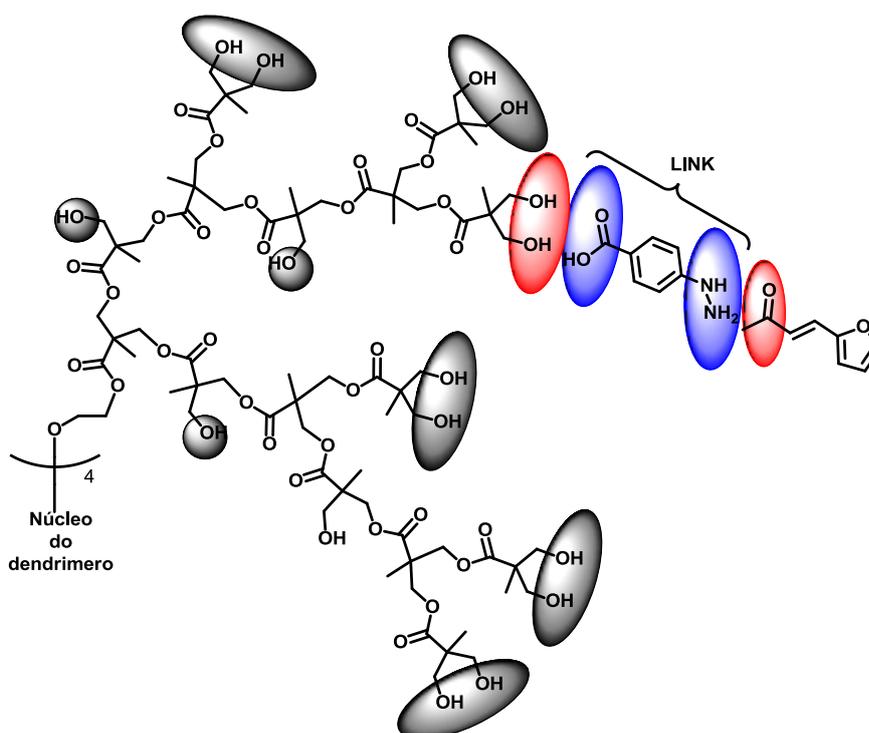
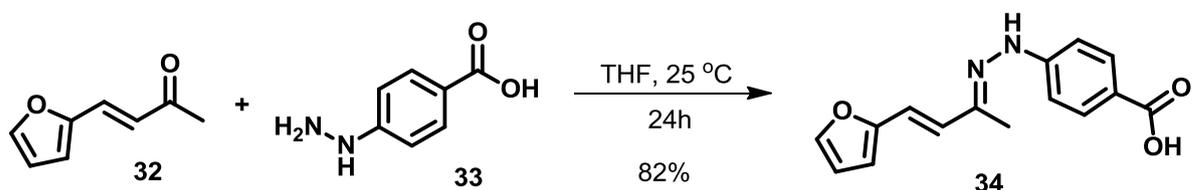


Figura 18 – Representação esquemática do composto **33** como Link.

O início dos estudos envolvendo a reação de formação da hidrazona foi realizado utilizando metodologia já descrita na literatura, e empregada na maioria dos casos em que se necessita formar uma hidrazona,<sup>94</sup> onde os reagentes são submetidos à reação utilizando um solvente polar (Esquema 5).



**Esquema 5-** Preparo do composto **34**.

Ao se adicionar a hidrazona à solução do composto **32** em THF, verificou-se a formação de uma suspensão. Esta suspensão foi então deixada sob agitação, até que todo o material de partida, composto **32**, fosse consumido (Reação acompanhada via CCD). Após 24 horas de reação, observou-se a formação de uma solução avermelhada, ausente de qualquer tipo de material sólido. Após o término da reação, foi observado a formação de dois compostos. Esses compostos foram isolados por cromatografia em sílica gel, e após análise verificou-se que se tratava da formação de isômeros. Esses compostos apresentaram uma grande diferença em sua coloração. A estrutura dos compostos com uma ilustração da respectiva coloração estão representados na Figura 19. Foi verificado também que o composto vermelho foi obtido em maior rendimento.

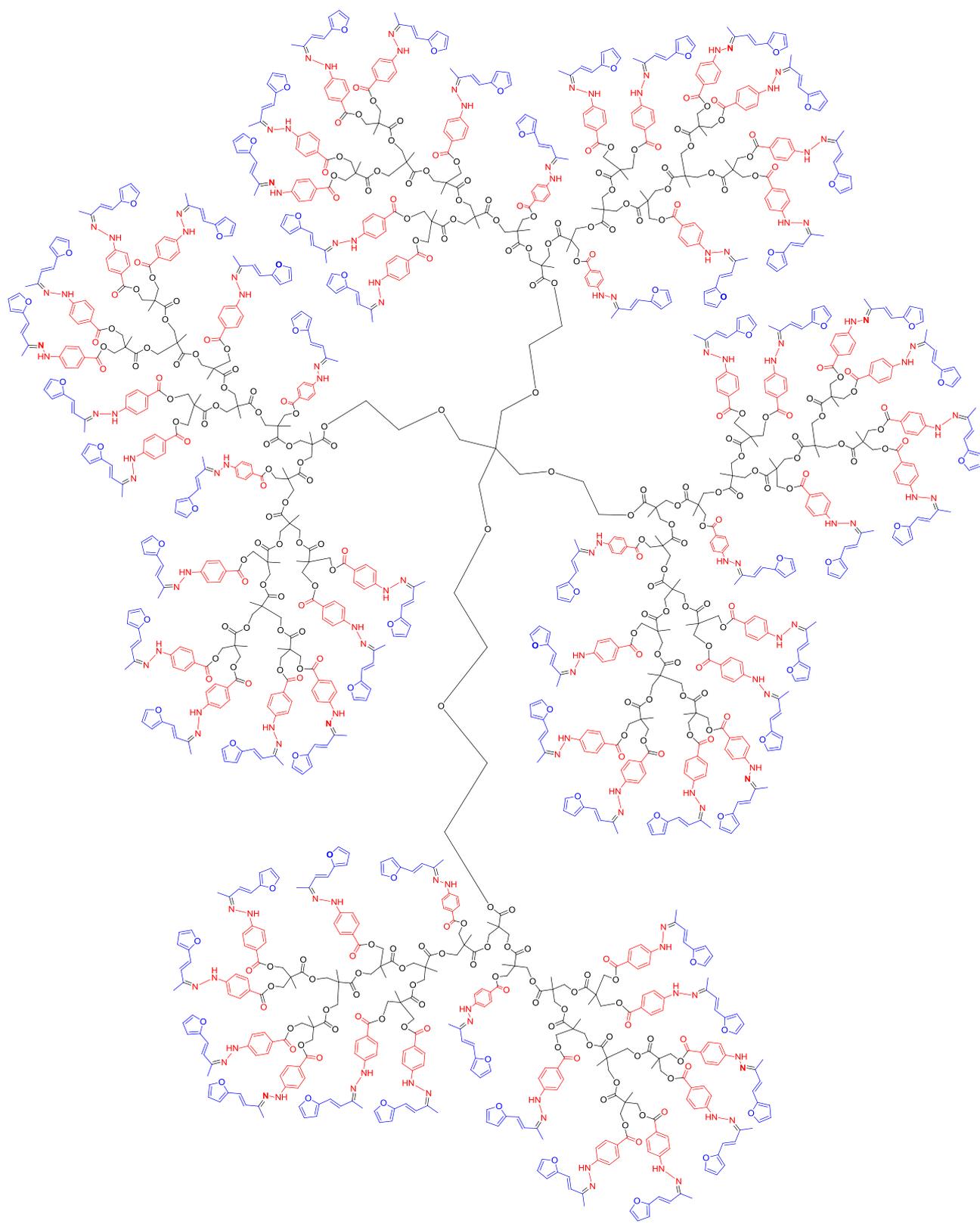


**Figura 19.** Aspecto visual dos isômeros obtidos para o composto **34**.

Em comparação com os métodos da literatura, onde não há relatos empregando um álcool proveniente de um dendrímero, neste caso o bis-MPA, o tratamento destas hidrazonas poderiam levar a formação de um material contendo este tipo de dendrímero

<sup>94</sup> Vogel, A. I. Text Book of Practical Organic Chemistry. New York: Longman Scientific & Technical, 1994:458, 1161.

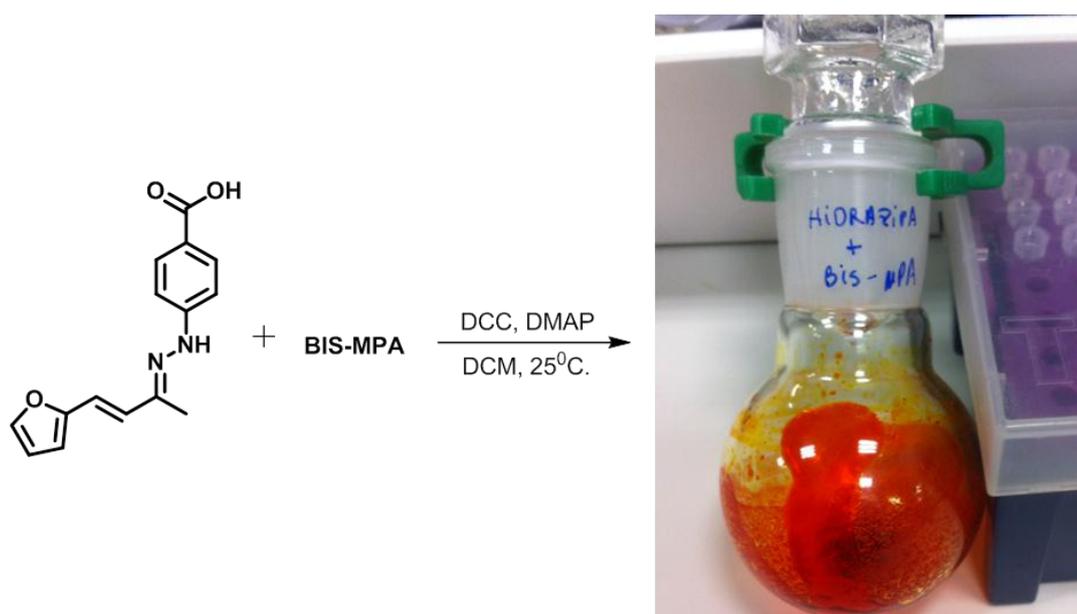
pela primeira vez, sendo assim um dendrímero de sexta geração poderia ser gerado (Figura 20).



**Figura 20** - Provável estrutura do dendrímero gerado.

O uso deste método levou o preparo deste tipo de reagente, com algumas vantagens se comparado com métodos descritos na literatura, onde normalmente é necessário o aquecimento do meio reacional,<sup>95</sup> o que poderia levar a formação de subprodutos, ou a formação de compostos indesejados.

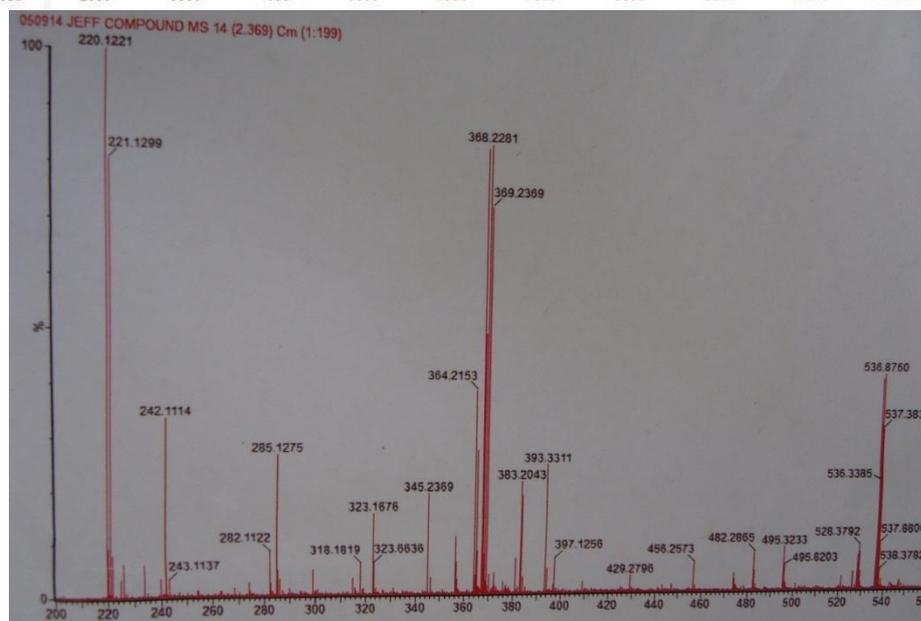
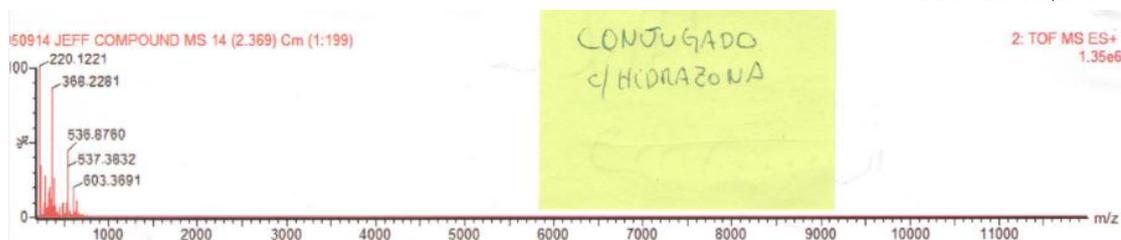
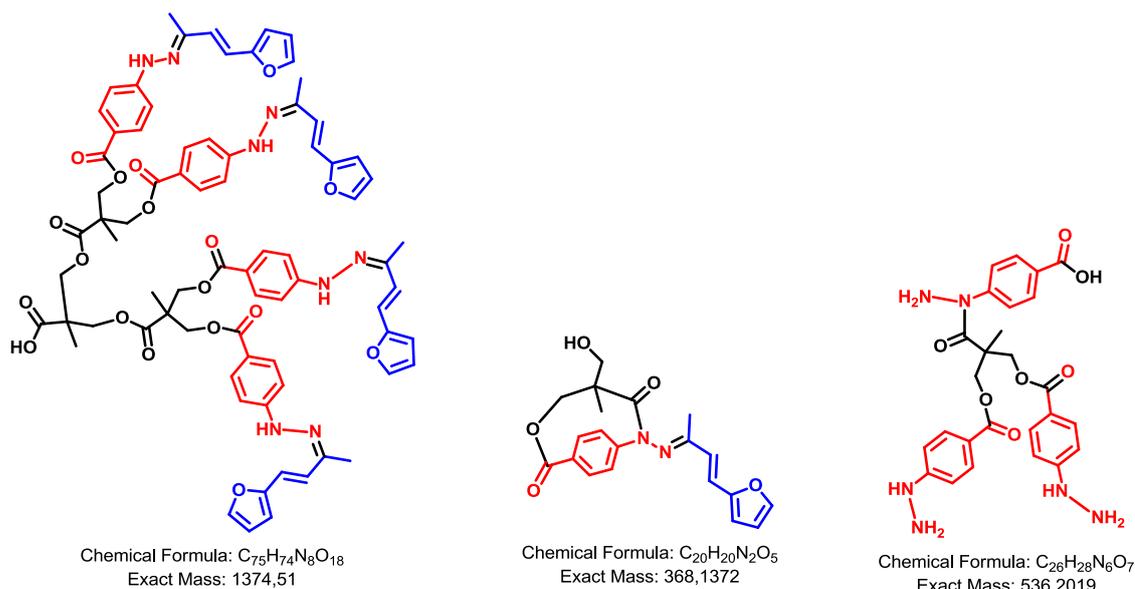
Seguindo a rota de proposta para o preparo dos materiais, a hidrazona **34**, foi solubilizada em diclorometano, solvente usualmente empregado neste tipo de reação, e ao meio reacional foram adicionados DCC e DMAP (catalítico), ambos à temperatura ambiente. Com o andamento da reação (acompanhada via CCD) foi possível constatar a formação de vários compostos, sendo que após 12 horas de reação, um produto majoritário foi observado. A reação se processou de forma lenta e limpa, sendo assim uma simples filtração do sistema reacional em coluna de sílica, seguida da concentração em rotoevaporador foram necessários à obtenção do material (Figura 21).



**Figura 21** – Reação entre a hidrazona **34** e bis-MPA.

Analisando o espectro de massas de alta resolução, foi observado que houve reação de incorporação das funções furano, no entanto levando a formação de um composto com massa molecular menor que o dendrímero e maior que o intermediário. Esses dados nos levaram a concluir que um dos nitrogênios da função hidrazona poderiam estar competindo com a reação entre a hidroxila dos álcoois (Figura 22).

<sup>95</sup> Bhandari, S. V.; Parikh, J. K.; Bothara, K. G.; Chitre, T. S.; Lokwani, D. K.; Devale, T. L.; Modhave, N. S.; Pawar, V. S.; Panda, S. J. *Enz. Inhib. Med. Chem.* **2010**, *25*, 520–530.



**Figura 22:** Espectro de Massa de alta resolução da reação entre o composto **34** e bis-MPA.

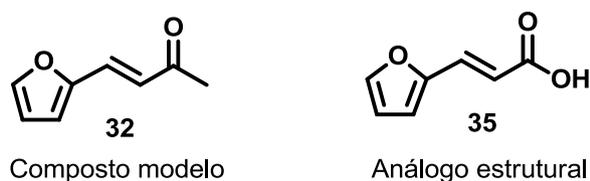
Com esses resultados, foi possível concluir que apesar do composto de furano ligado a hidrazona ser um intermediário reativo nas reações testadas, a tentativa de sua incorporação no dendrímero bis-MPA levou a formação de um material com massa molecular menor do que a esperada. Também foi possível demonstrar que houve uma

grande diferença entre reagir compostos orgânicos contendo uma única função química em sua molécula e compostos contendo poliésteres e polióis.

Deste modo, decidimos mudar a função química do nosso composto contendo a unidade furano, de modo que esse pudesse apresentar reatividade seletiva quando submetido à conjugação com o dendrímero. Como havíamos mapeado uma estrutura base do composto no *screening* inicial de testes de citotoxicidade, idealizamos modificar a função química do composto de modo que esse não alterasse muito a estrutura base do composto.

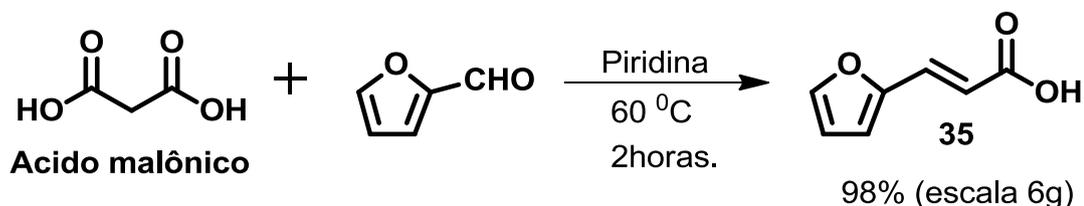
### 3.5.3 Formação do ácido furil acrílico (35)

A síntese do composto **35**, uma substância que contém a função ácido carboxílico ligado diretamente a substrato a ser testado, e que apresenta a mesma unidade furano conjugada a uma dupla ligação, presente no composto **32** (Figura 23), foi através da reação



**Figura 23:** Comparação estrutural entre os compostos **32** e **35**.

entre o ácido malônico, e o furaldeído. Essa reação foi realizada em um erlenmeyer, adicionando o ácido malônico na solução de furaldeído em piridina. A reação, após ser aquecida a 60 °C por duas horas, levou à formação de uma suspensão, contendo o produto desejado na parte sólida. Nestas condições, após filtragem do material sólido, o mesmo foi resuspendido uma solução de ácido clorídrico 10 %, e filtrado novamente em um funil de buchner. Após a secagem do material sólido em bomba de vácuo, o mesmo foi solubilizado em acetato de etila, e deixado concentrar lentamente para a obtenção de cristais (Esquema 6; Figura 24).



**Esquema 6:** Preparo do composto **35**.

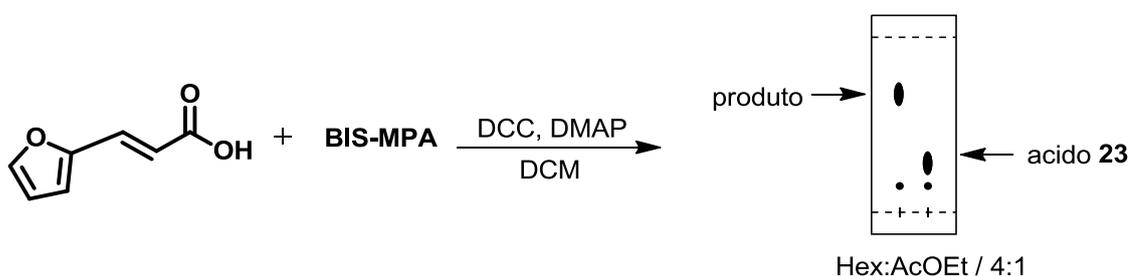


**Figura 24** – Cristais obtidos do composto **35**.

Nesta reação, nenhum subproduto foi gerado, e o composto cristalino foi obtido em alto rendimento, mostrando que as condições escolhidas para realizar a reação, foram adequadas.

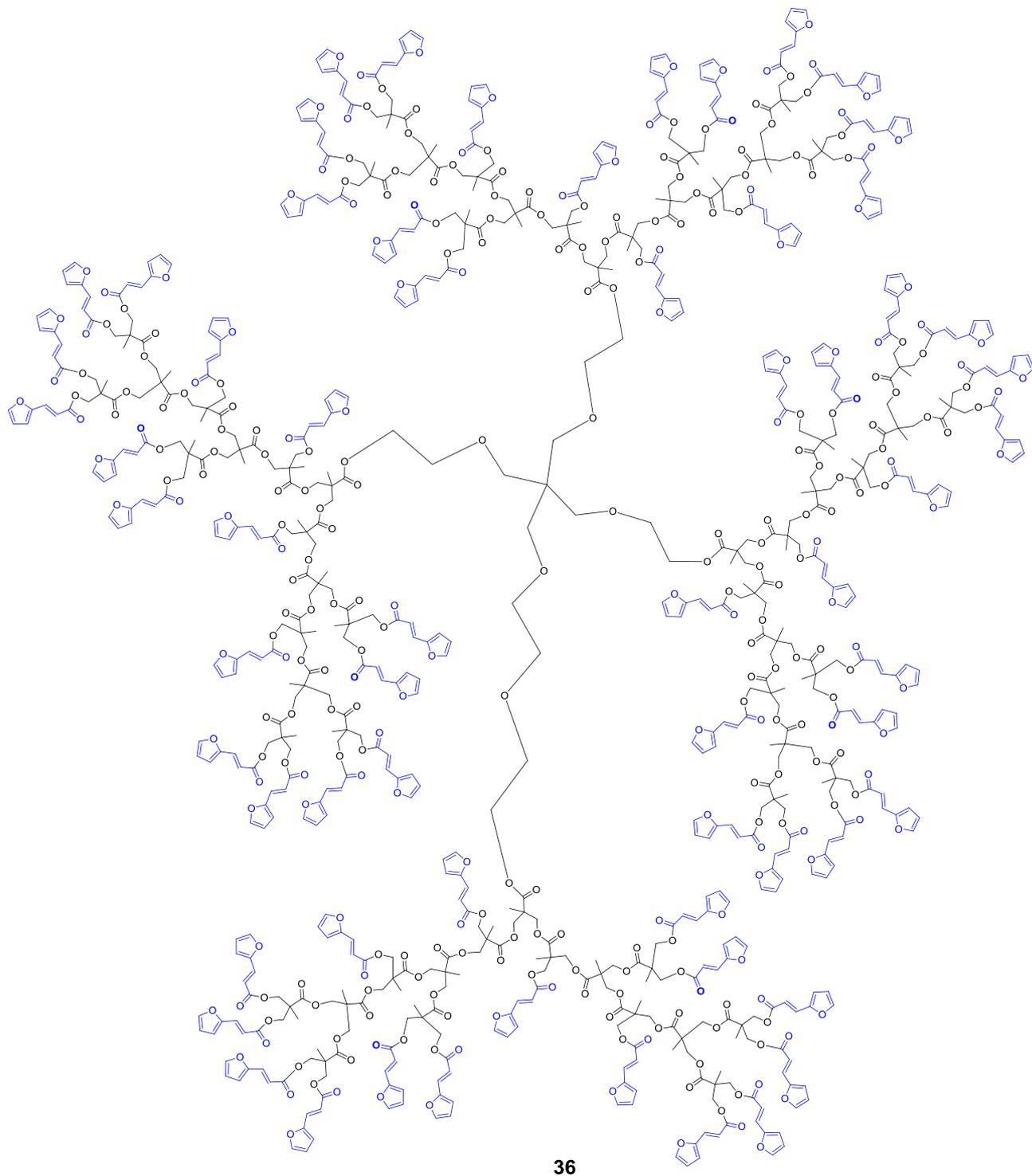
Após o preparo do composto **35** preparado, a etapa seguinte consistiu na tentativa de reagir à porção ácida da molécula, diretamente com o dendrímero, uma vez que a reação entre os dois levaria à formação de um éster. É importante salientar, que as mesmas condições da reação foram empregadas para se sintetizar o dendrímero bis-MPA na literatura. Esse dado foi de extrema importância, para minimizar qualquer condição que pudesse levar a formação de subprodutos, ou reações paralelas, o que foi observado quando o composto **32** foi submetido às reações de incorporação ao dendrímero.

Sendo assim, para verificarmos se o composto **35** gerado era reativo frente ao dendrímero, testou-se a reação utilizando as mesmas condições previamente reportadas para a construção do dendrímero em sua quarta geração. Com isso, 70 equivalentes do ácido **23** foram utilizados na reação de formação do éster (Esquema 7).



Após várias tentativas de conjugar um substrato contendo a função furano ao dendrímero bis-MPA, verificou-se que essa reação foi uma das mais limpas, levando à formação de um único produto (reação acompanhada via CCD). A observação destes

resultados, aliados à análise dos espectros de RMN, nos levaram a concluir que o composto desejado (**36**) (Figura 25) foi obtido com êxito, empregando as condições de reação descrita.



**Figura 25:** Provável estrutura do dendrímero **36**, modificado com o ácido **35**.

É importante salientar, que nenhum estudo reacional envolvendo este tipo de composto foi encontrado na literatura até o presente momento.

Com o material preparado, iniciamos a outra parte do projeto, que consistiu na avaliação da atividade citotóxica dos materiais frente às células tumorais. Esses resultados serão discutidos na sessão de testes de atividade citotóxica.

### 3.6 Estudo Citotóxico

Baseados nos resultados obtidos referentes ao preparo dos materiais a serem testados, realizamos os testes de atividade citotóxica, comparando o composto isolado com o dendrímero conjugado. Os testes foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Sendo assim, a viabilidade das células HEP-2, HT-29, MCF-7 e NCI-H292 foram avaliadas com o composto **35**, o dendrímero bis-MPA e o dendrímero modificado contendo as unidades furano, proveniente da reação do dendrímero com o ácido **35**.

Com isso, as atividades citotóxicas dos compostos foram determinadas pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltretazólio (MTT).

#### 3.6.1 Método de Análise dos Resultados

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com alta atividade de inibição se apresentam entre a escala de 95 a 100 %, com atividade moderada de inibição de crescimento celular se apresentam variando de 70 a 90% e sem atividade de inibição de crescimento se apresentam com escala menor que 50 %.<sup>96</sup> Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *Graph Prism 5.0*.

---

<sup>96</sup> Souza, M. V. N.; Goncalves, R. S. B.; Rodrigues, F. A. R.; Cavalcanti, B. C.; Bomfim, I. S.; Pessoa, C. O.; Wardell, J. L.; Wardell, S. M. S. V. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, 83, 126-131.

### 3.6.2 Citotoxicidade induzida pelo conjugado bis-MPA

Com base nos testes de citotoxicidade apresentados na Tabela 4, foi possível observar que o ácido **35**, apresentou citotoxicidade menor se comparada ao composto **32** (Tabela 1; entrada 10; página 35). No entanto, como se pode observar, o dendrímero conjugado com o composto **35**, apresentou atividade bem superior se comparada aos seus precursores isolados. Um dado importante, é que o dendrímero **36**, apresentou uma resposta superior se comparada à droga controle utilizada (doxorrubicina), quando células HEP-2, HT-29 foram utilizadas nos testes. Outro dado interessante é a baixa toxicidade apresentada pelo dendrímero bis-MPA. Esses dados são extremamente animadores, uma vez que o carreador exibe baixa toxicidade e seu análogo conjugado mostra-se muito mais bioativo. Resultados semelhantes foram apresentados na literatura, onde a doxorrubicina complexada no bis-MPA apresentou uma citotoxicidade maior quando comparada a doxorrubicina livre.<sup>97</sup>

Estes testes abrem a possibilidade de se investigar a conjugação parcial do dendrímero, utilizando em menor proporção o ácido **35**, construindo assim uma biblioteca de compostos conjugados, para que esses possam ser testados e comparados entre si.

**Tabela 4:** Atividade Citotóxica do composto **35**, dendrímero **36** e bis-MPA.

Produtos teste	% de inibição							
	NCI-H292	DP	HEP-2	DP	HT-29	DP	MCF-7	DP
<b>Composto 35</b>	12,2	0,1	70,0	2,9	9,9	1,1	28,6	0,0
<b>Dendrímero 36</b>	58,4	0,5	85,1	1,0	90,8	2,0	69,1	0,8
<b>bis-MPA</b>	0,0	0,0	55,7	1,8	0,0	0,0	19,0	0,0
<b>Doxorrubicina</b>	94,15	1,99	79,39	2,65	64,1	1,1	74,7	2,1

DP = desvio padrão

<sup>97</sup> Zeng, X.; Zhang, Y.; Wu, Z.; Lundberg, P.; Malkoch, M.; Nystrom, M.A. *Polymer Chemistry*.**2011**,*50*,280-288

## 4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os compostos propostos foram sintetizados em bons rendimentos, utilizando as metodologias propostas.

Os experimentos relacionados à incorporação física mostraram que o dendrímero bis-MPA não apresentou interações fortes o suficiente com os compostos **32** e **35**, a fim de se obter um complexo conjugado, com os compostos no interior do dendrímero.

A conjugação por ligação química foi possível, após modificação estrutural, utilizando o composto **35** ao invés do composto **32**, onde o grupo ácido se comportou como um bom link frente ao dendrímero bis-MPA.

Em relação aos testes de atividade citotóxica dos compostos, foi possível constatar que, o dendrímero de quinta geração preparado, apresenta uma atividade superior aos reagentes testados separadamente. Isso abre uma nova perspectiva, onde compostos que não apresentem citotoxicidade inicial em sua forma livre, possam ser incorporados ao dendrímero, e tenham sua atividade estudada.

Como perspectiva, novos experimentos deverão ser conduzidos, na tentativa de se otimizar os resultados de incorporação via química entre o composto **35** e o bis-MPA. Sendo assim, diversas estequiometrias entre dendrímero e ácido **35** devem ser testadas. Isso pode levar a formação de compostos diferentes, dependendo da razão entre os reagentes. Sendo assim, dendrímeros contendo de 1 a 64 unidades de furano, podem ser gerados e seus dados citotóxicos comparados, levando a uma biblioteca de informações.

## 5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 5.1 Método Colorimétrico MTT

A avaliação do potencial citotóxico dos compostos estudados frente às diferentes linhagens de células tumorais foi realizada através do método colorimétrico MTT.<sup>98</sup> Este método se baseia na capacidade de quantificar espectrofotometricamente o crescimento celular, a viabilidade e proliferação, sendo assim bastante importante no estudo de citotoxicidade de compostos anticâncer. É um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade de medir a atividade da redutase mitocondrial em células vivas, em converter o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazolio (MTT), que tem cor amarela em cristais de formazan, que são de cor azul/púrpura por células metabolicamente ativas.

### 5.2 Linhagens Celulares

As células utilizadas nos ensaios de Citotoxicidade estão listadas na Tabela 5, quanto ao tipo histológico e a origem.

**Tabela 5:** Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

<b>Linhagem</b>	<b>Tipo Histológico</b>	<b>Origem</b>
NCI-H292	Carcinoma de pulmão	Humana
HEp-2	Carcinoma de Laringe	Humana
HT-29	Carcinoma de Cólon	Humana
MCF-7	Adenocarcinoma de Mama	Humana
HL60	Leucemia promielocítica aguda	Humana

### 5.3 Cultivo das células tumorais

As células foram cultivadas em frascos de cultivo celular T25, em meio de cultura RPMI-1640 ou DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. E

<sup>98</sup> Mosmann, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, *16*, 55-63.

então estes frascos foram incubados em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, este período de incubação pode levar de 7 a 10 dias. O crescimento celular foi observado através de um microscópio de inversão a cada 24 horas, sendo necessário à manutenção das células a cada 2 dias utilizando uma solução de tripsina (0,25%) para desaderir as células da parede do frasco e trocando o meio de cultivo.

#### **5.4 Ensaio da viabilidade celular pelo método MTT**

As células HEp-2, HT-29, MCF-7, HL60 e NCI-H292 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Em seguida as amostras foram dissolvidas em DMSO (1%) ou PBS e foram adicionadas aos poços em concentração final de 25 µg/mL. Após 72 horas de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5mg/mL). E após 3 horas de incubação, o meio de cultura com MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560nm.

#### **5.5 Preparo da (E)-4-(2-furânil)-3-buten-2-ona, composto (32)**

Em um Erlenmeyer com capacidade para 100 mL foi preparada uma solução de 2-furaldeído (5,4 mL, 66 mmol) em acetona (30 mL, 412 mmol - 5,5 equivalentes). A mistura reacional foi resfriada em banho de gelo, onde então NaOH (5% m/m - 3,5 mL) foi adicionado em uma única porção. O meio reacional foi deixado sob agitação à temperatura ambiente até que todo o material de partida fosse consumido, cerca de 3 horas. Em seguida uma solução de HCl (5%) foi adicionada até que se atinge pH = 7. A mistura reacional foi então extraída com diclorometano (2 x 30 mL) e a fase orgânica tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para remoção de água residual. O material bruto foi filtrado em funil de buchner, concentrado em um equipamento rotoevaporador, e o resíduo obtido foi destilado a vácuo (b.p.:60 °C – 0.5 mmHg) em um aparelho *Kugelrohr*. Com isso, 9 g de um sólido cristalino foi obtido em rendimento de 77%. Número CAS 41438-24-8. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 2,29 (s, 3H); δ 6,47 (d, 16 Hz, 1H); δ 6,66 (dd, 3,1 Hz; 1,8 Hz, 1H); δ 6,98 (d, 3,1 Hz, 1H); δ 7,44 (d, 16 Hz, 1H); δ 7,87 (d, 1,8 Hz, 1H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 27,2; 112,9; 116,3; 124; 129,7; 146; 150,4; 197,4.

## 5.6 Preparo do hidrazona, composto (34)

Em um Balão de Fundo Redondo com capacidade para 100 mL, sob atmosfera de nitrogênio e utilizando THF seco (50 mL) como solvente, foram adicionados a enona **32** (2,72g, 20mmol) e o ácido 4-Hidrazinobenzóico (3g, 20 mmol). A suspensão gerada foi deixada em agitação por um período de 12 horas, onde se verificou a formação de uma solução após este tempo. O meio reacional foi então concentrado e o produto bruto purificado por cromatografia em sílica gel utilizando uma mistura hex/AcOEt em proporção de 4:1 como eluente. Um sólido amarelo e outro vermelho foram isolados, em rendimento de 82%. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 2,09 (s, 3H); δ 6,55 (dd, 12 Hz; 1 Hz, 2H); δ 6,77 (s, 2H); δ 7,23 (d, 9 Hz, 2H); δ 7,69 (s, 1H); δ 7,80 (d, 9 Hz, 2H); δ 9,77 (s, 1H); δ 12,3 (sa, 1H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 11,2; 109,4; 112; 112,1; 117,8; 120,6; 127,8; 130,9; 143,1; 144,6; 148,9; 152,6; 167,3.

## 5.7 Preparo do ácido (E)-3-(2-furanil)-2-propenóico, composto (35)

Em um Béquer com capacidade para 100 mL foram adicionados 2-furaldeído (4,0 mL, 50 mmol), piridina (70 mL) e ácido malônico (4,5 g, 45 mmol). A mistura reacional foi aquecida até a temperatura de 90 °C, onde se observou total solubilização dos reagentes, e deixada sob agitação nesta temperatura por um período de 2 horas. A solução resultante foi então resfriada a temperatura ambiente e transferida para um Béquer contendo uma solução resfriada de HCl (20 mL de uma solução aquosa 1 M). O precipitado foi então filtrado sob vácuo em um funil de Buchner, dissolvido em acetato de etila (20 mL) a solução resultante tratada novamente com HCl 1M (2 x 20 mL). A fase orgânica foi então separada em funil de separação e seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada lentamente deixando o solvente evaporar na capela para obtenção de 6g de cristais de cor marrom claro em um rendimento de 98%. Número CAS 15690-24-1. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 6,31 (d, 20 Hz, 1H); δ 6,49-6,51 (m, 1H); δ 6,66 (d, 4,4 Hz, 1H); δ 7,50 (s, 1H); δ 7,51 (d, 20 Hz, 1H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 112,4; 114,8; 115,8; 133; 145,3; 150,6; 172,6.

## 5.8 Preparo do conjugado hidrazona-bis-MPA

Em um balão com capacidade para 50 mL previamente seco em estufa e sob atmosfera inerte de Nitrogênio, foram adicionados sequencialmente: THF seco (5mL), hidrazona **34**, (0,27g, 1 mmol, 64 equivalentes), bis-MPA (0,110g, 0,015 mol), DCC (0,21g) e DMAP (3mg, cat). A mistura reacional foi deixada em agitação por um período de 12 horas a

temperatura ambiente até total consumo do material de partida acompanhada via CCD (baseado na hidrazona). Após esse período a solução foi filtrada e o solvente evaporado em rotoevaporador. O produto bruto reacional foi purificado em sílica gel utilizando uma mistura de hex/AcOEt em proporção de 4:1 como eluente.

### **5.9 Preparo do conjugado do ácido (E)-3-(2-furânil)-2-propenóico-Bis-MPA, composto (36)**

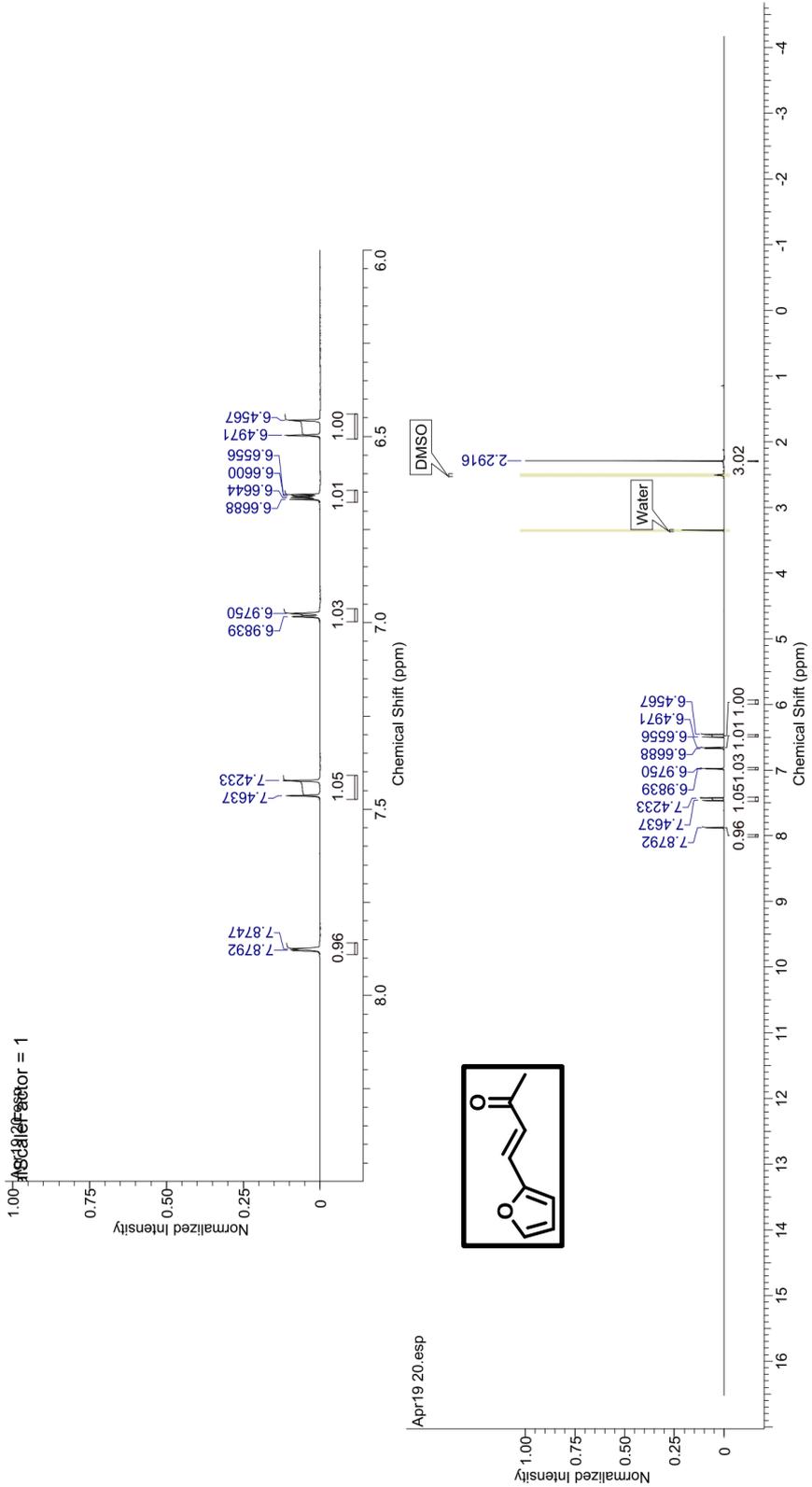
A um balão com capacidade para 50 mL, previamente seco em estufa e sob atmosfera inerte de Nitrogênio, foram adicionados sequencialmente: diclorometano seco (5mL), o ácido (E)-3-(2-furânil)-2-propenóico (**35**) (0,14g, 1 mmol, 64 equivalentes), bis-MPA (0,110g, 0,015 mmol), DCC (0,21g) e DMAP (3mg, cat). A mistura reacional foi deixada em agitação por um período de 12 horas a temperatura ambiente até total consumo do material de partida acompanhada via CCD (baseado na hidrazona). Após esse período a solução foi filtrada e o solvente evaporado em rotoevaporador. O produto bruto reacional foi purificado em sílica gel utilizando uma mistura de hex/AcOEt em proporção de 10:1 como eluente. Rendimento 52%. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 1-1,3 (m, 210H); δ 1,4-1,6 (m, 210H); δ 3,1-4,3 (m, 175H); δ 6,3-6,5 (m, 105H); δ 7,24-7,35 (m, 70H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 17,3; 24,3; 24,5; 24,9; 25; 25,1; 25,2; 25,8; 30,5; 32,2; 34,6; 46,3; 49,7; 55; 55,3; 64,7; 65,2; 111,8; 112; 113,9; 114,3; 114,5; 115; 116,6; 129,3; 131,4; 139,4; 144; 144,6; 150,3; 151; 153,6; 165,4; 165,7; 165,9; 171,5; 171,9.

## 6 APENDICES

# RMN 1H do composto 32

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)  
 DJ-11 - 125 mM 0.1 mmol em 800 microlitros de DMSO JLP

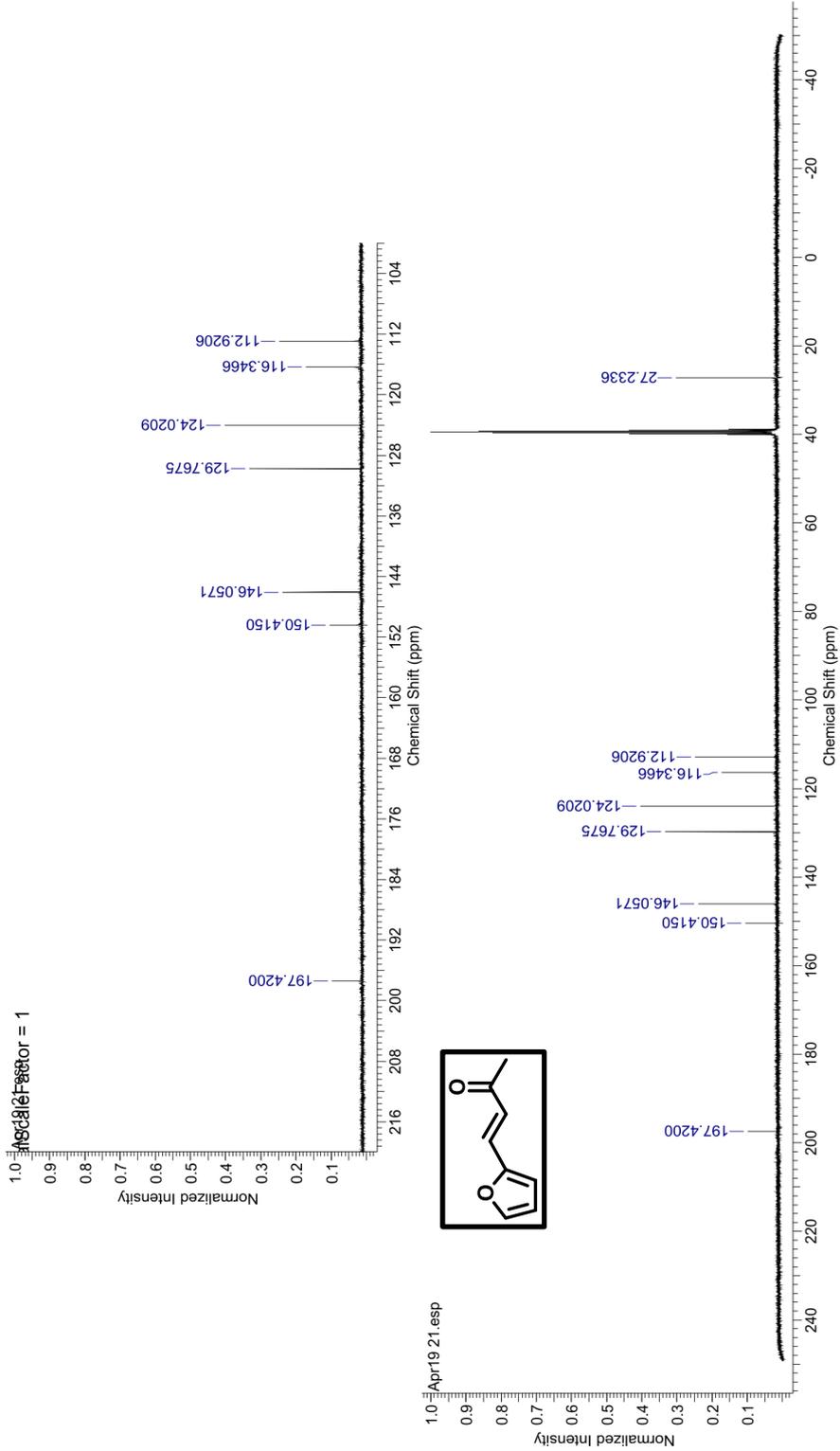
Acquisition Time (sec)	3.9584	Comment	DJ-11 - 125 mM 0.1 mmol em 800 microlitros de DMSO JLP	Date	19 Apr 2014 23:43:12
Date Stamp	19 Apr 2014 23:43:12				
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	File Name	C:\Users\Lab Catalise Org\Desktop\Apr19 20\1d
Original Points Count	32768	Owner	Administrator	Number of Transients	16
Receiver Gain	203.20	SW(cyclical) (Hz)	8278.15	Points Count	32768
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8277.89	Solvent	DMSO-d6
		Temperature (degree C)	27.000	Pulse Sequence	zg30
				Spectrum Offset (Hz)	2470.9668



# RMN 13C do composto 32

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)  
 DJ-11 - 125 mM 0.1 mmol em 800 microlitros de DMSO-JLP

Acquisition Time (sec)	1.0879	Comment	DJ-11 - 125 mM 0.1 mmol em 800 microlitros de DMSO-JLP	Date	20 Apr 2014 00:38:40
Date Stamp	20 Apr 2014 00:38:40	File Name	C:\Users\Lab Catalise Org\Desktop\Apr19 21\fid	Origin	spect
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	Pulse Sequence	zgpg30
Original Points Count	32768	Owner	Administrator	Spectrum Offset (Hz)	10010.4902
Receiver Gain	1149.40	SW (cyclical) (Hz)	30120.48	Solvent	DMSO-d6
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	30119.56	Temperature (degree C)	27.000

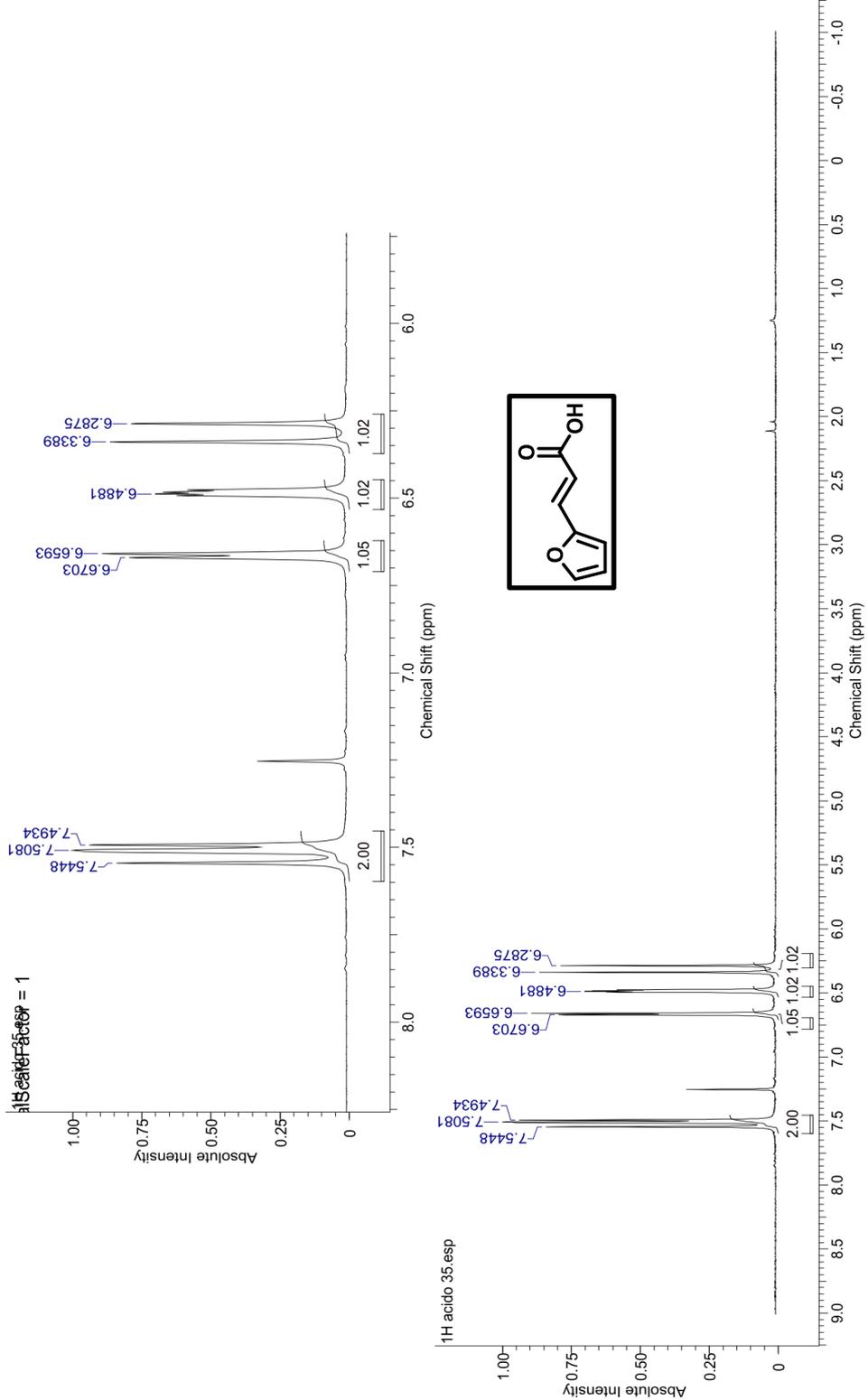


# RMN 1H do composto 35

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

Mirela JM 6.07.2015

Acquisition Time (sec)	2.7263	Comment	Mirela JM 6.07.2015	Date	Jul 6 2015
Date Stamp	Jul 6 2015	File Name	C:\Users\Mirela\Lab\Catalise Org\Desktop\dissertacao m\mrm\Fernando.Mirela.JB.1h.fid.tif		
Frequency (MHz)	299.95	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Points Count	8192	Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	46.00
Spectrum Offset (Hz)	1199.7386	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	3004.81
				Temperature (degree C)	26.000
				Solvent	CHLOROFORM-d
				Original Points Count	8192

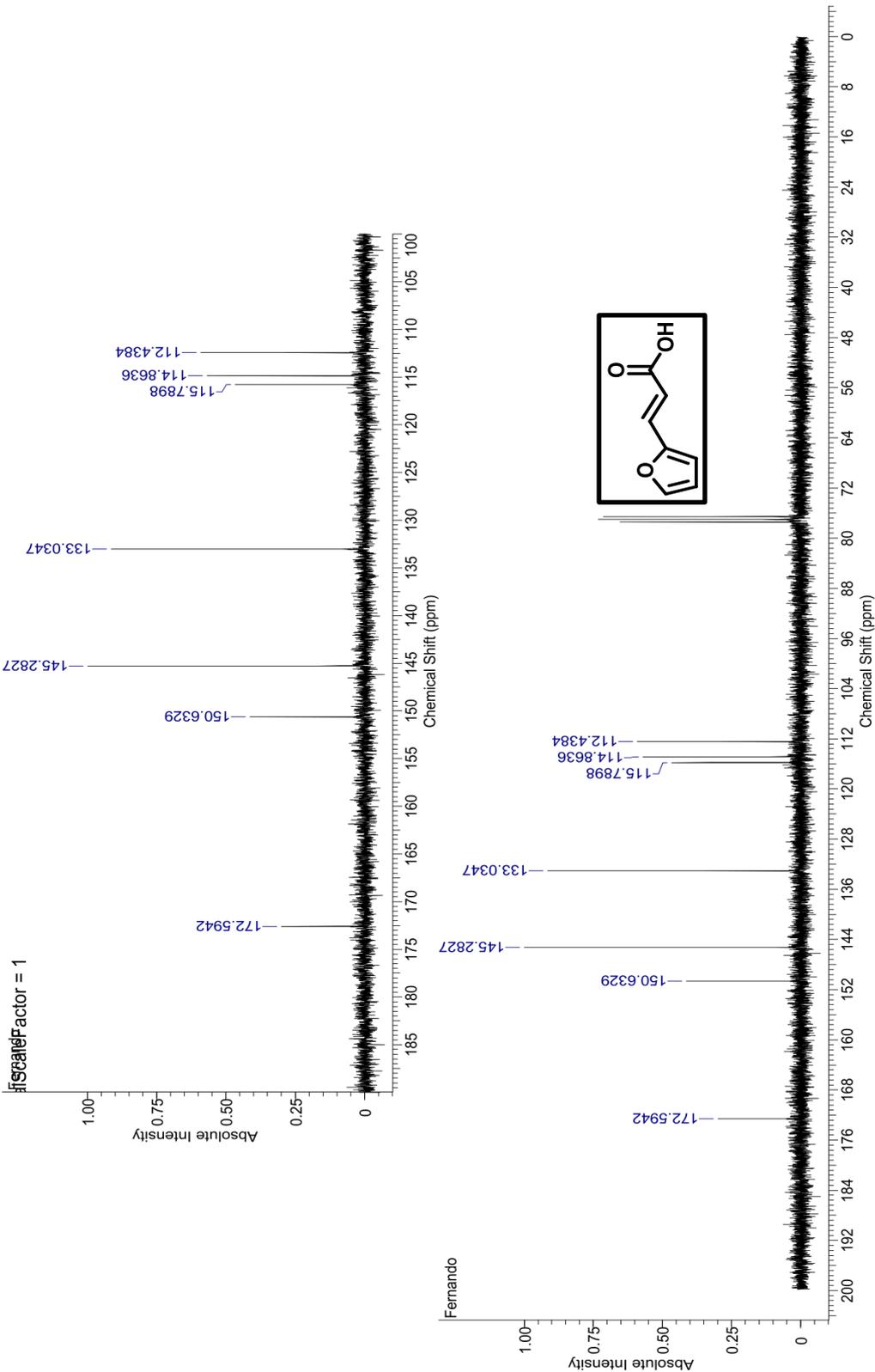


# RMN 13C do composto 35

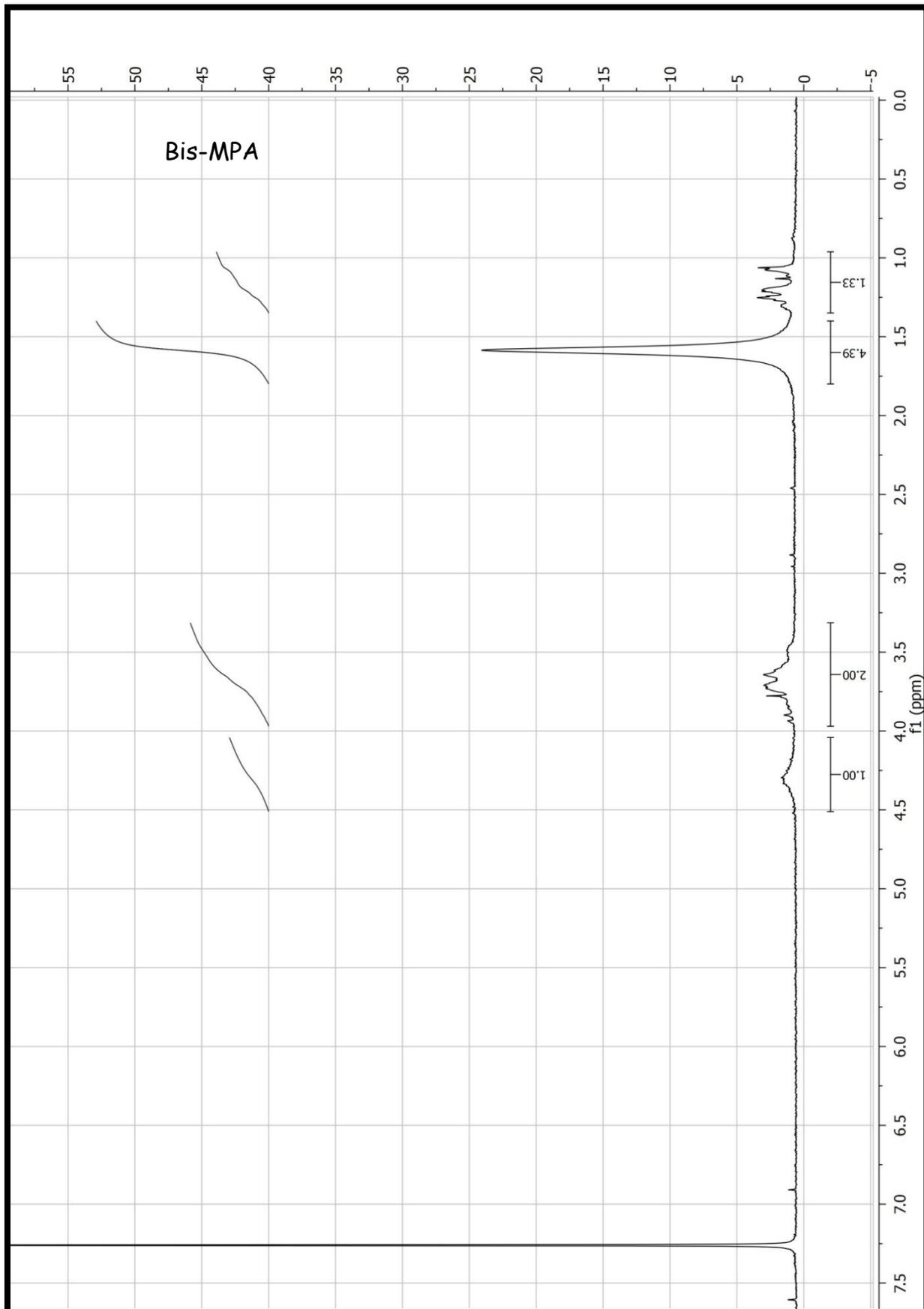
This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

Mirela JB

Acquisition Time (sec)	1.0879	Comment	Mirela JB	Date	Jul 6 2015	Date Stamp	Jul 6 2015
File Name	C:\Users\Lab Catalise Org\Deskop\dissertacao mlrmm\Fernando.Mirela.JB.13c.fid.tif					Frequency (MHz)	75.43
Nucleus	13C	Number of Transients	192	Original Points Count	16384	Points Count	16384
Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	30.00	Solvent	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	7538.3643	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	15060.24	Temperature (degree C)	26.000



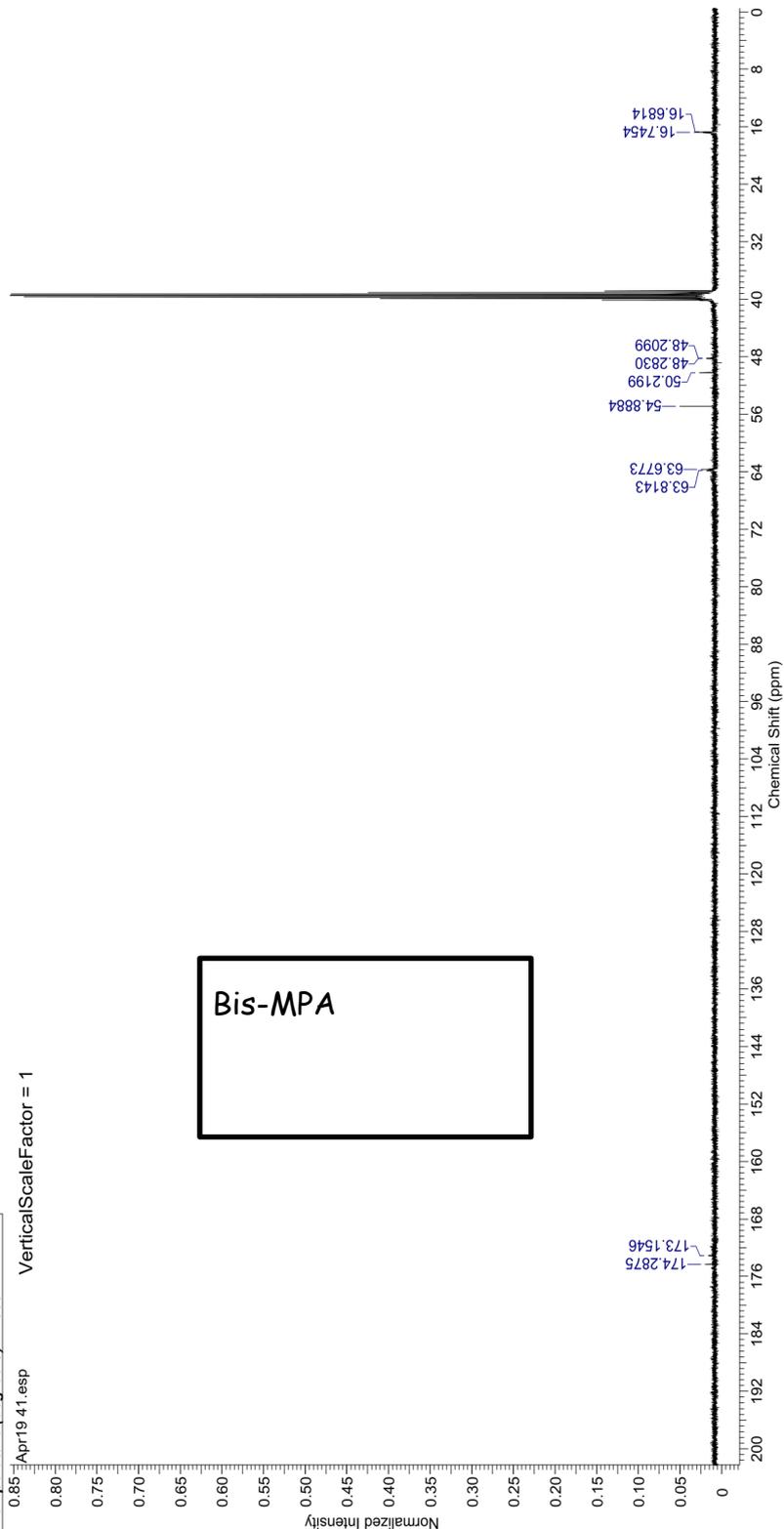
# RMN 1H do Dendrímero bis-MPA



# RMN 13C do Dendrímero bis-MPA

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)  
 Dendrímero - 1,95 mM 0,00156 mmol em 800 microlitros de DMSO-JLP

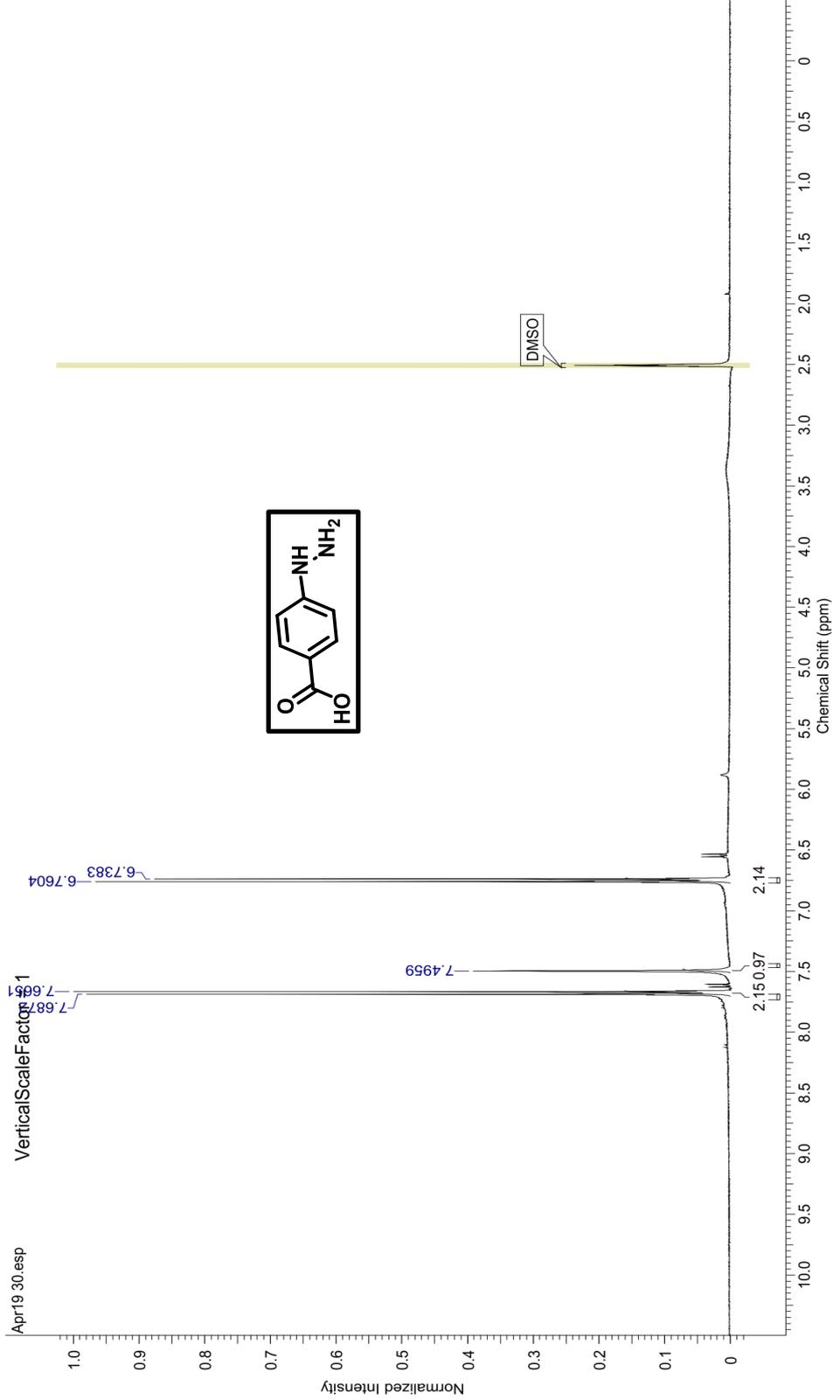
Acquisition Time (sec)	1.0879	Comment	Dendrímero - 1,95 mM 0,00156 mmol em 800 microlitros de DMSO-JLP
Date	20 Apr 2014 04:12:00	Date Stamp	20 Apr 2014 04:12:00
File Name	C:\Users\Lab Catalise\Orig\Desktop\Apr19_41.fid	Frequency (MHz)	100.61
Number of Transients	2048	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zpgq30
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	10010,4902
Temperature (degree C)	27,000	Spectrum Type	STANDARD
		Receiver Gain	1024,00
		SW(cyclical) (Hz)	30120,48
		Sweep Width (Hz)	30119,56
		Owner	Administrator
		Nucleus	13C



RMN 1H do link 33

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)  
 hidrazina-acid - 125 mM 0.1 mmol em 800 microlitros de DMSO JLP

Acquisition Time (sec)	3.9584	Comment	hidrazina-acid - 125 mM 0.1 mmol em 800 microlitros de DMSO JLP
Date	20 Apr 2014 01:00:00	Date Stamp	20 Apr 2014 01:00:00
File Name	C:\Users\Lab Catalise Org\Desktop\Apr19 30\fid	Frequency (MHz)	400.13
Number of Transients	16	Origin	spect
Points Count	32768	Pulse Sequence	zq30
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2470.9668
Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD
		Nucleus	1H
		Owner	Administrator
		SW(cyclical) (Hz)	8278.15
		Sweep Width (Hz)	8277.89

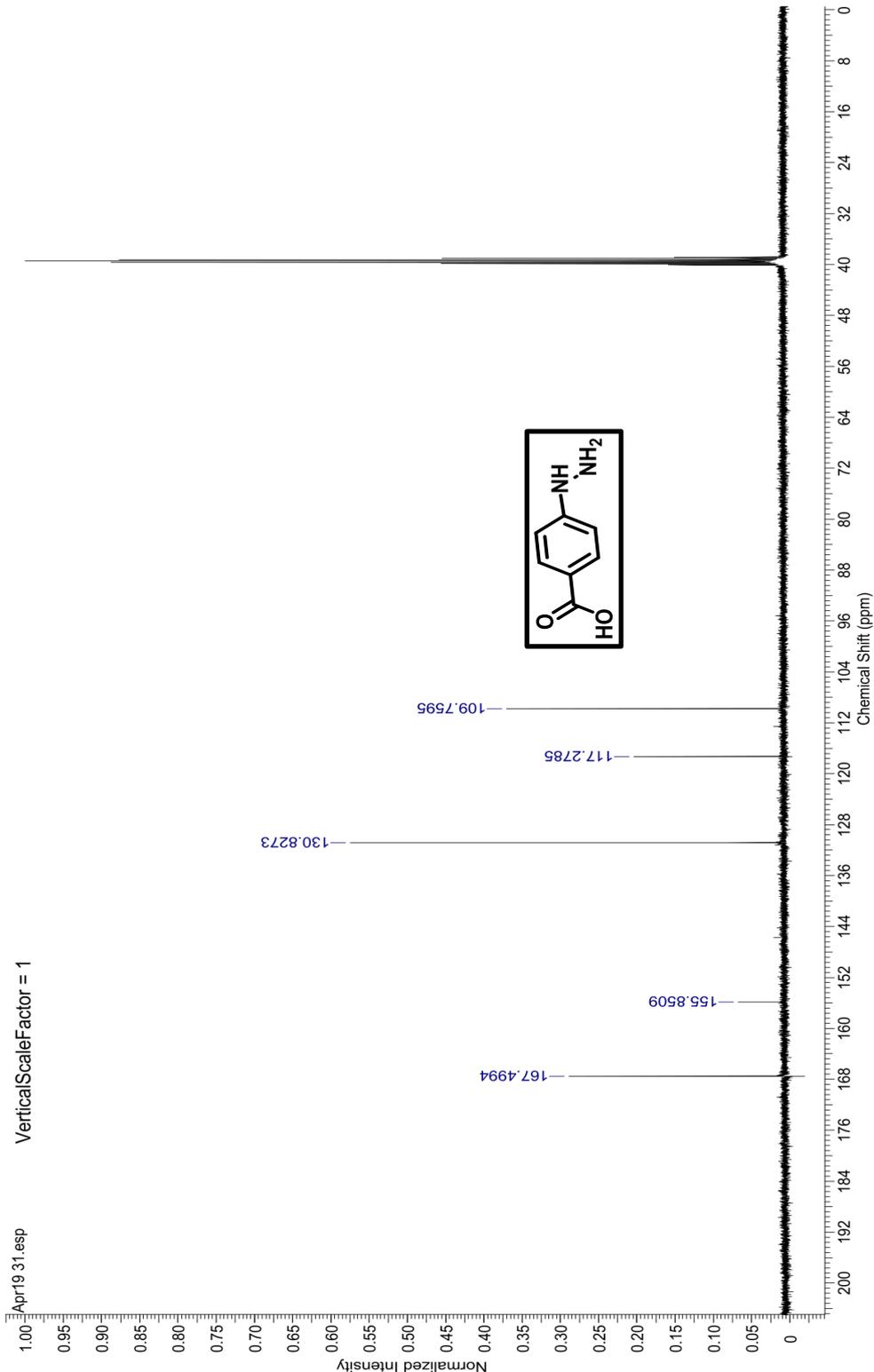


# RMN 13C do link 33

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

hidrazina-acid - 125 mM 0.1 mmol em 800 microlitros de DMSO JLP

Acquisition Time (sec)	1.0879	Comment	hidrazina-acid - 125 mM 0.1 mmol em 800 microlitros de DMSO JLP
Date	20 Apr 2014 01:53:20	Date Stamp	20 Apr 2014 01:53:20
File Name	C:\Users\Lab Catalise Org\Desktop\Apr19 31\fid	Frequency (MHz)	100.61
Number of Transients	1024	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Receiver Gain	1149.40
Solvent	DMSO-d6	Pulse Sequence	STANDARD
Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Offset (Hz)	10010.4902
		Sweep Width (Hz)	30119.56
		Owner	Administrator
		Nucleus	13C

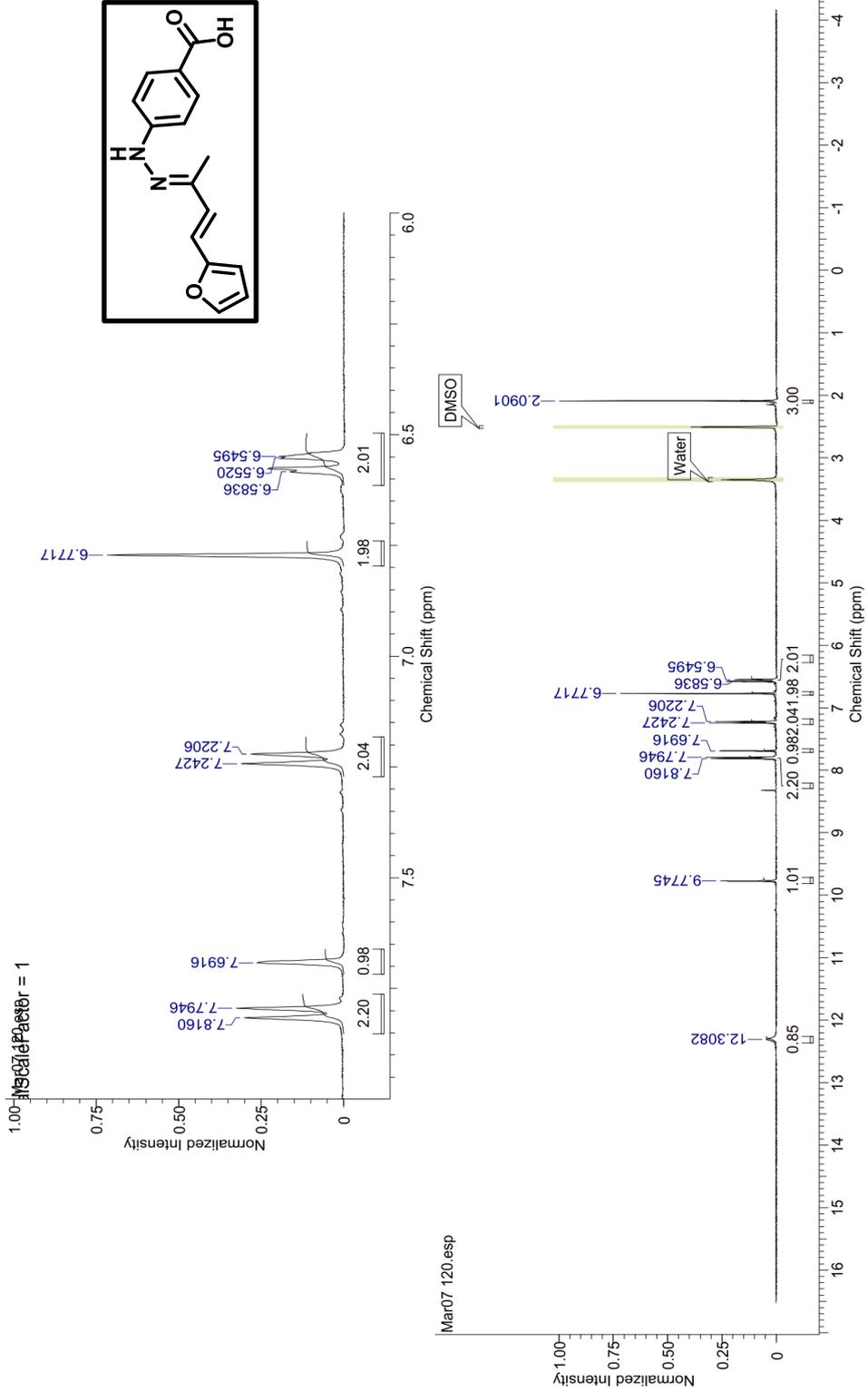


# RMN 1H do composto 34

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

DJ-11 4-acid-hidrazona MI

Acquisition Time (sec)	3.9584	Comment	DJ-11 4-acid-hidrazona MI	Date	08 Mar 2014 15:19:28
Date Stamp	08 Mar 2014 15:19:28	File Name	C:\Users\Lab Catalise Org\Desktop\Mar07 120\fid	Frequency (MHz)	400.13
Nucleus	<sup>1</sup> H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	8278.15
Spectrum Offset (Hz)	2470.9668	Spectrum Type	STANDARD	Temperature (degree C)	27.000
				Solvent	DMSO-d6
				Owner	Administrator

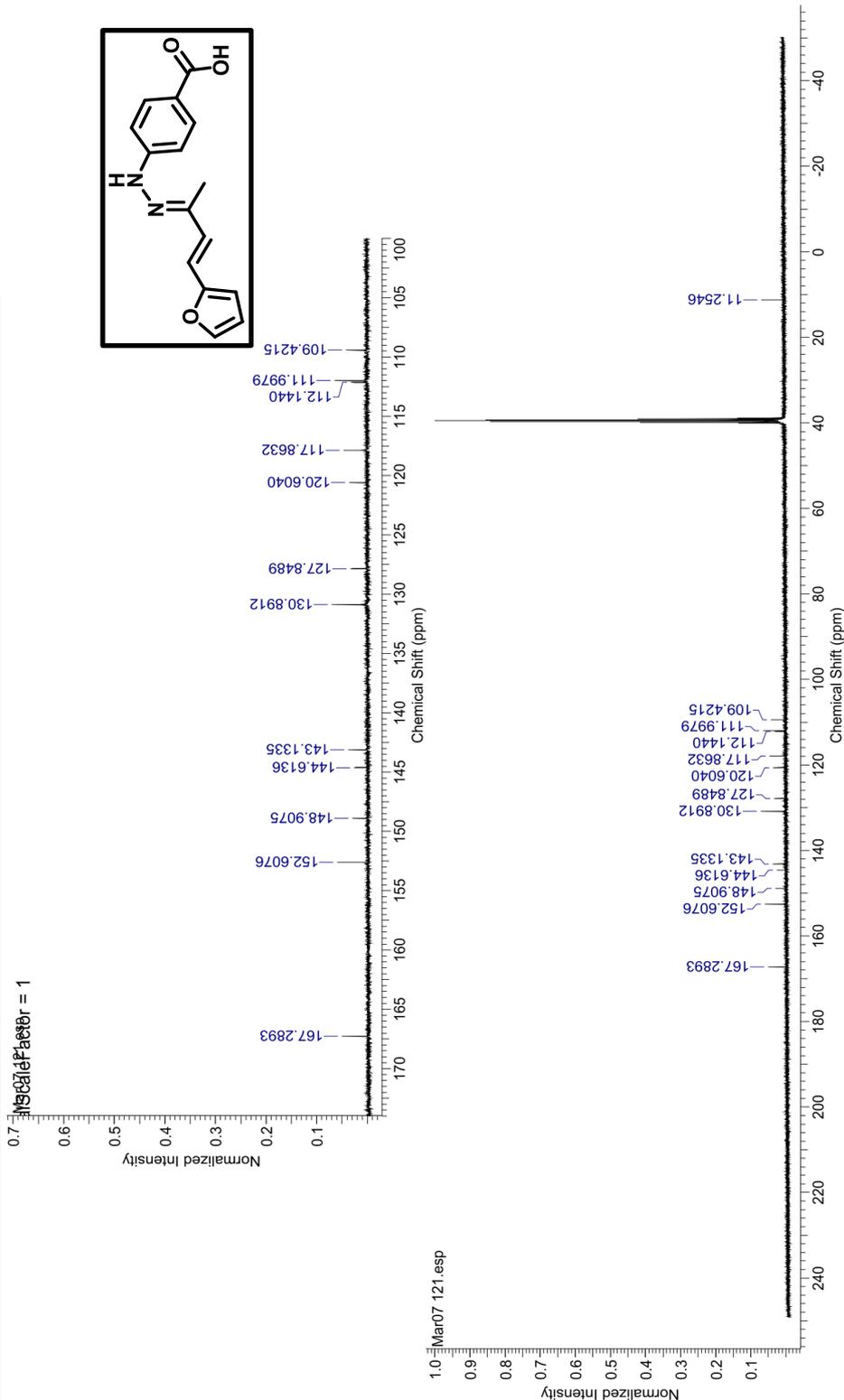


# RMN 13C do composto 34

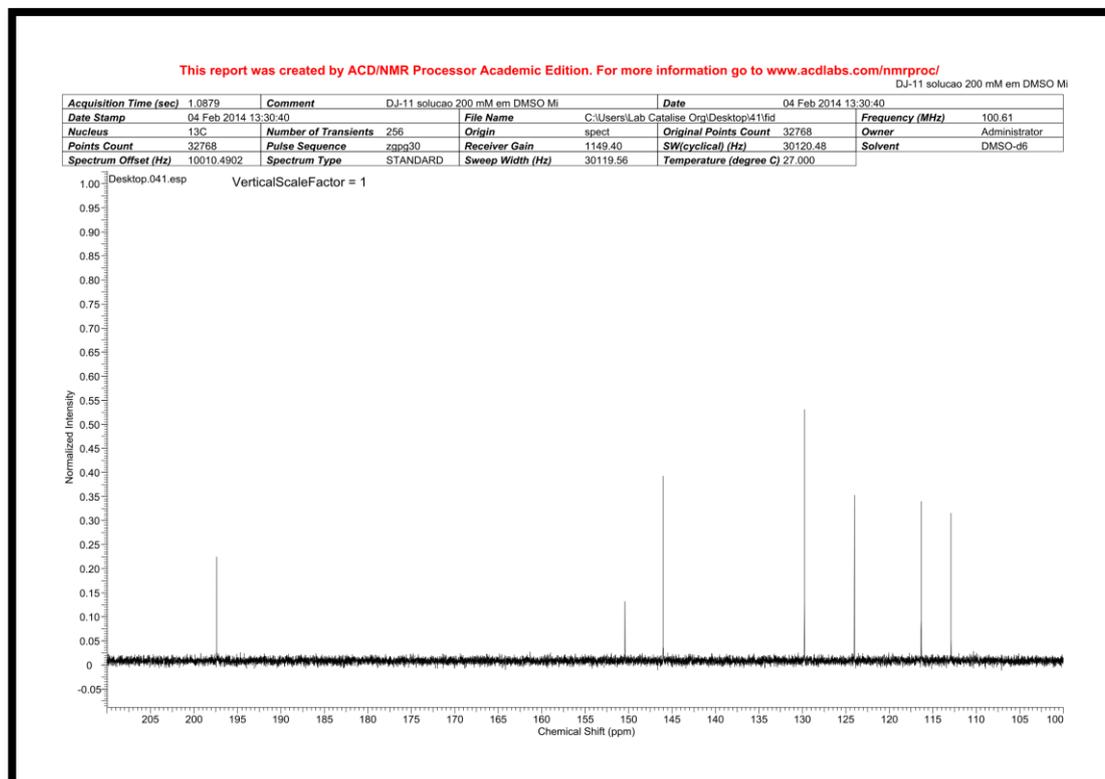
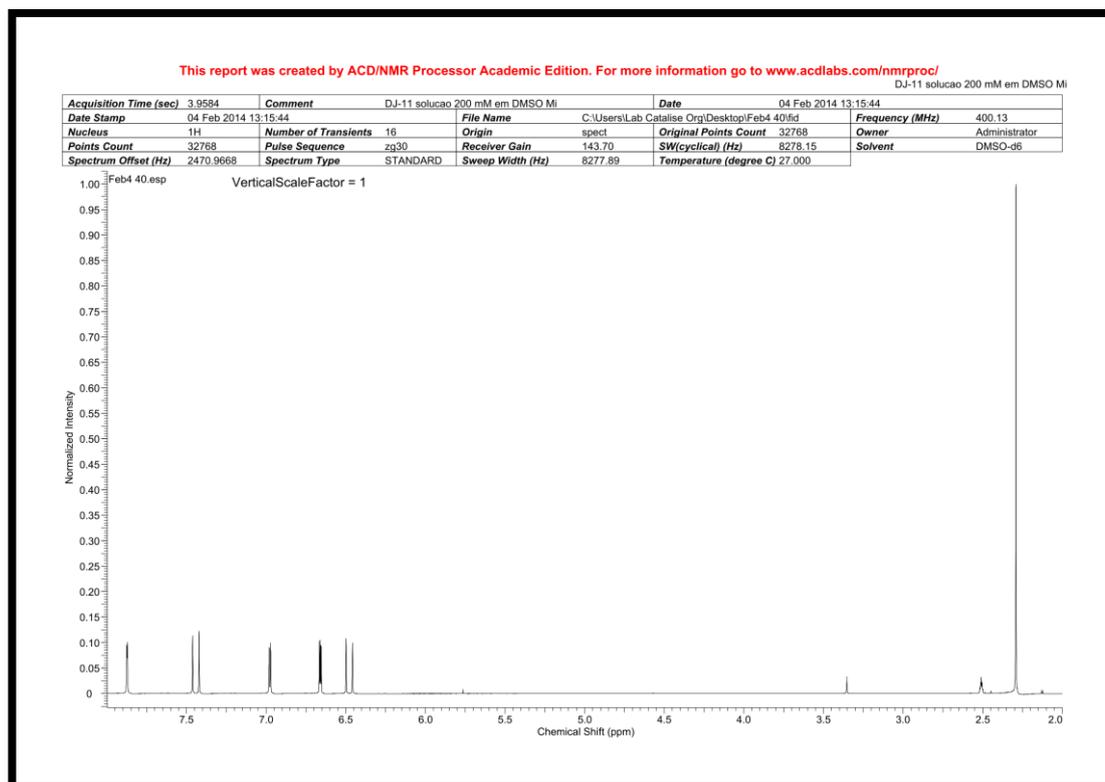
This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)

DJ-11 4-acid-hidrazona MI

Acquisition Time (sec)	1.0879	Comment	DJ-11 4-acid-hidrazona MI	Date	08 Mar 2014 16:17:04
Date Stamp	08 Mar 2014 16:17:04	File Name	C:\Users\Lab Catalise Org\Desktop\Mar07 121.fid	Frequency (MHz)	100.61
Nucleus	13C	Number of Transients	1024	Origin	Administrator
Points Count	32768	Pulse Sequence	zpgg30	Receiver Gain	30120.48
Spectrum Offset (Hz)	10010.4902	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	27.000
		Standard Factor	1	Temperature (degree C)	27.000

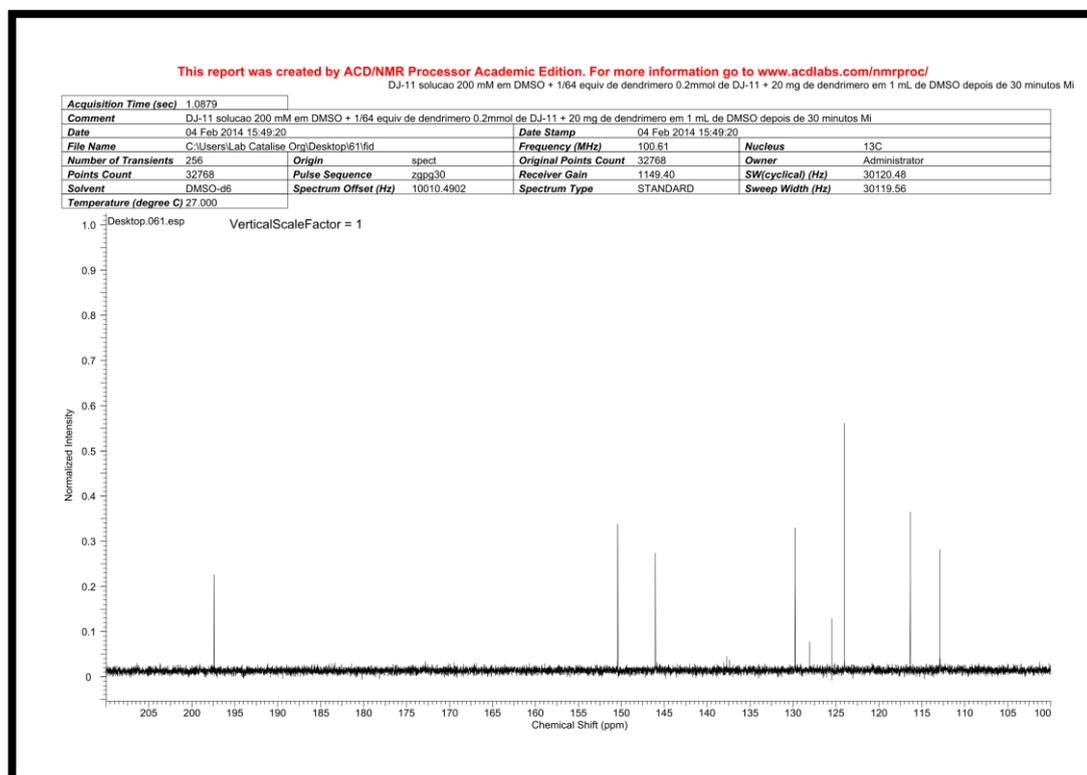
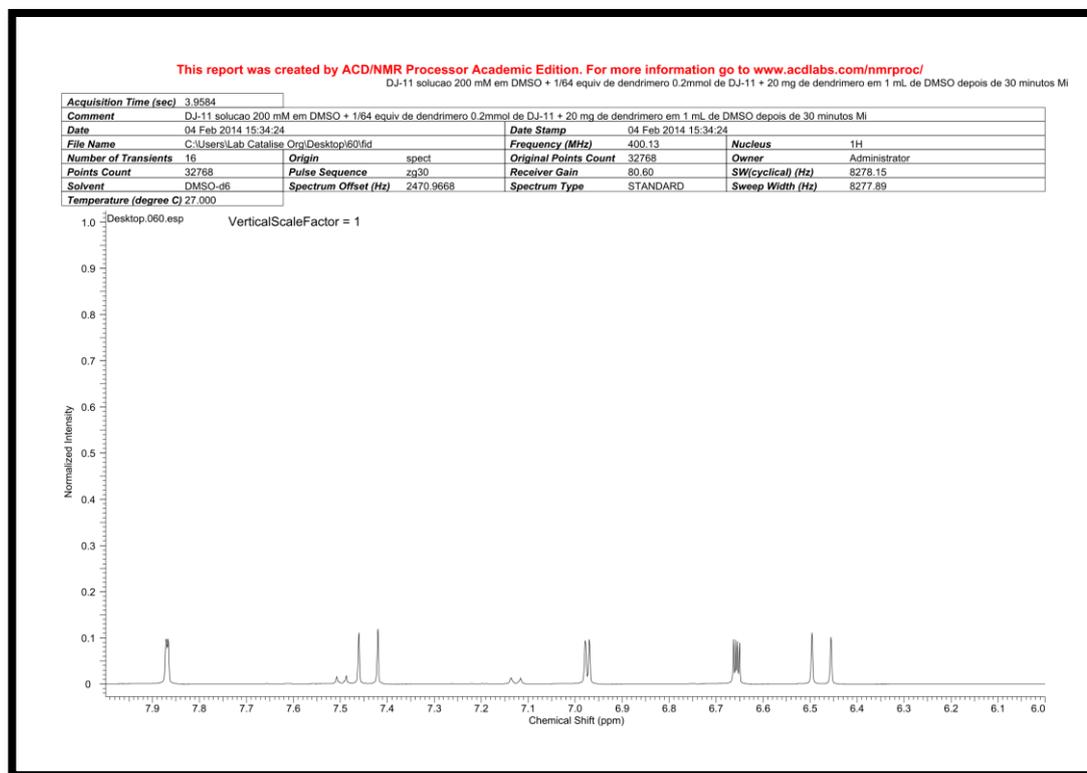


## Material de partida 32



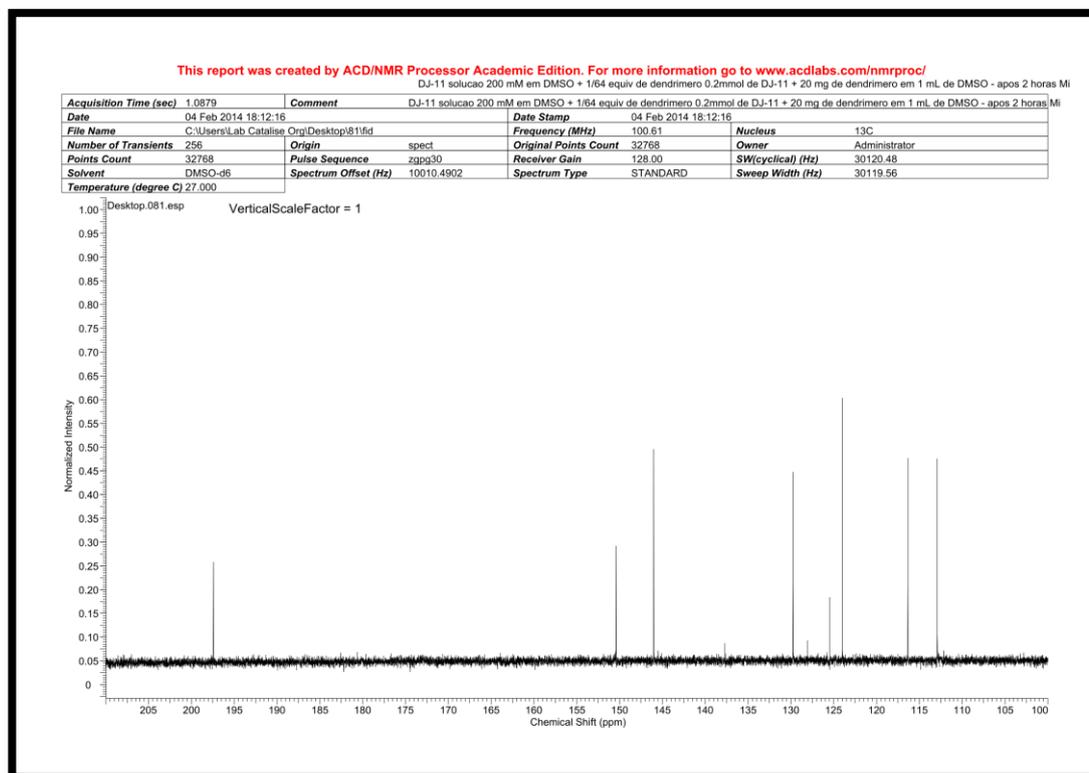
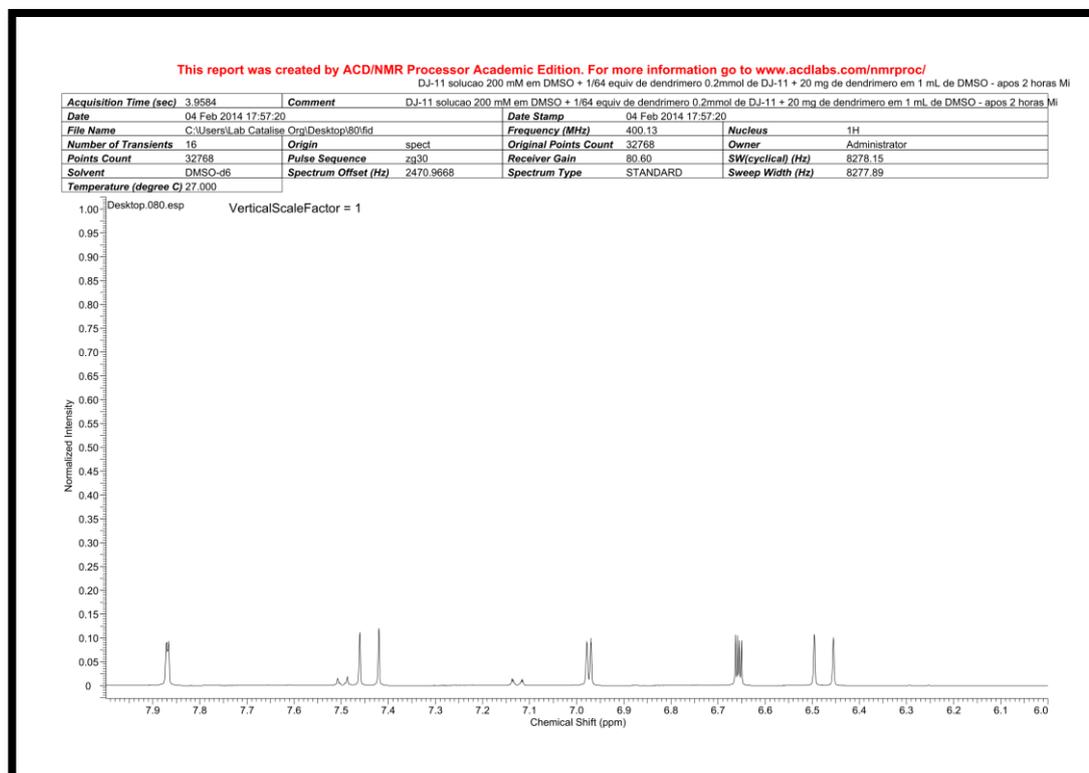
## Reação entre o material de partida 32 e o bis-MPA com APTS

Após 30 minutos de reação:



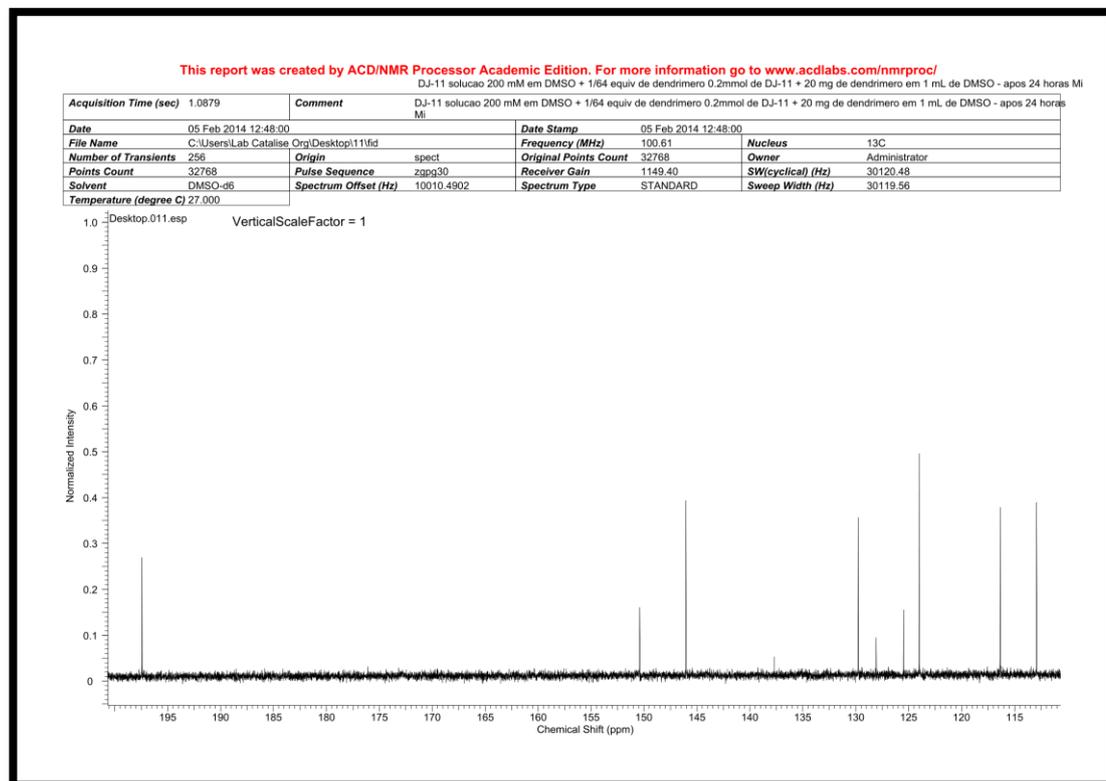
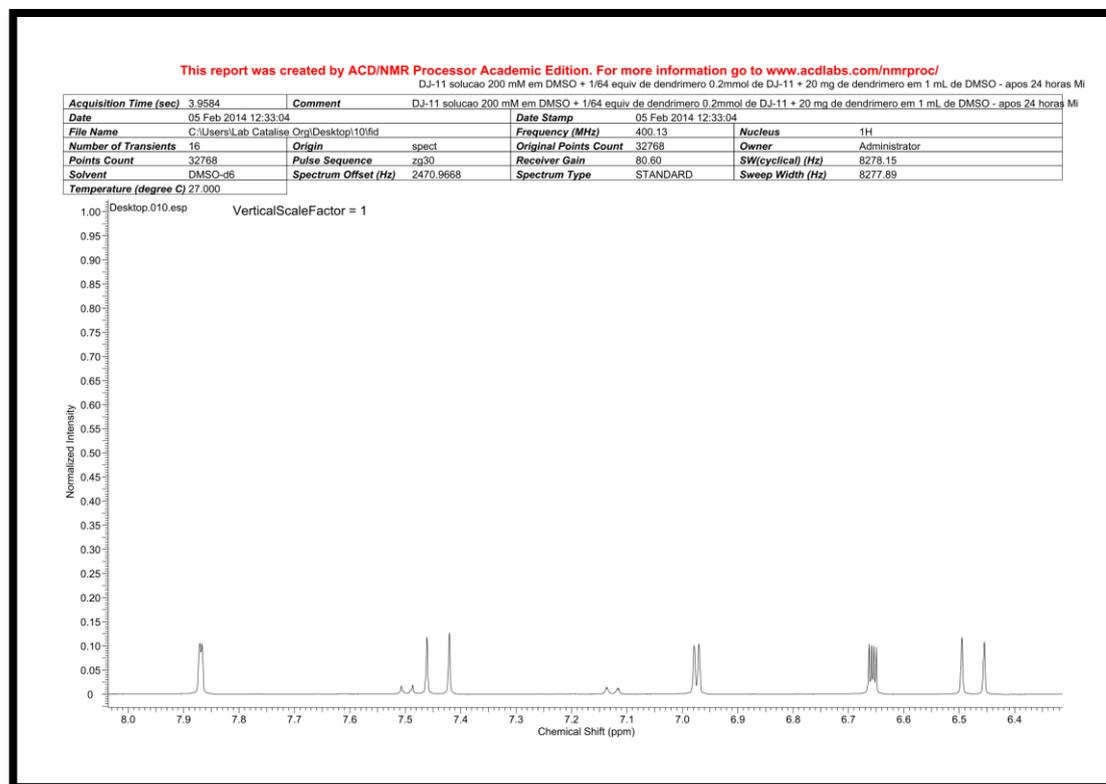
## Reação entre o material de partida 32 e o bis-MPA com APTS

Após 2 horas de reação:



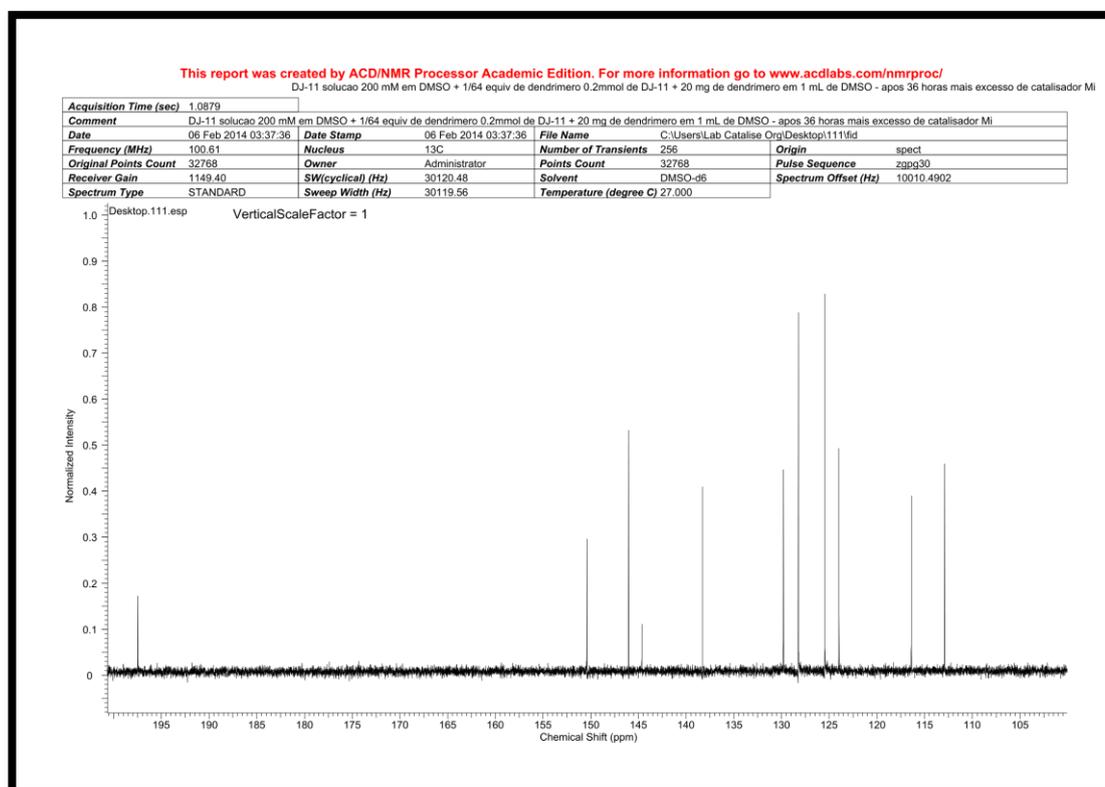
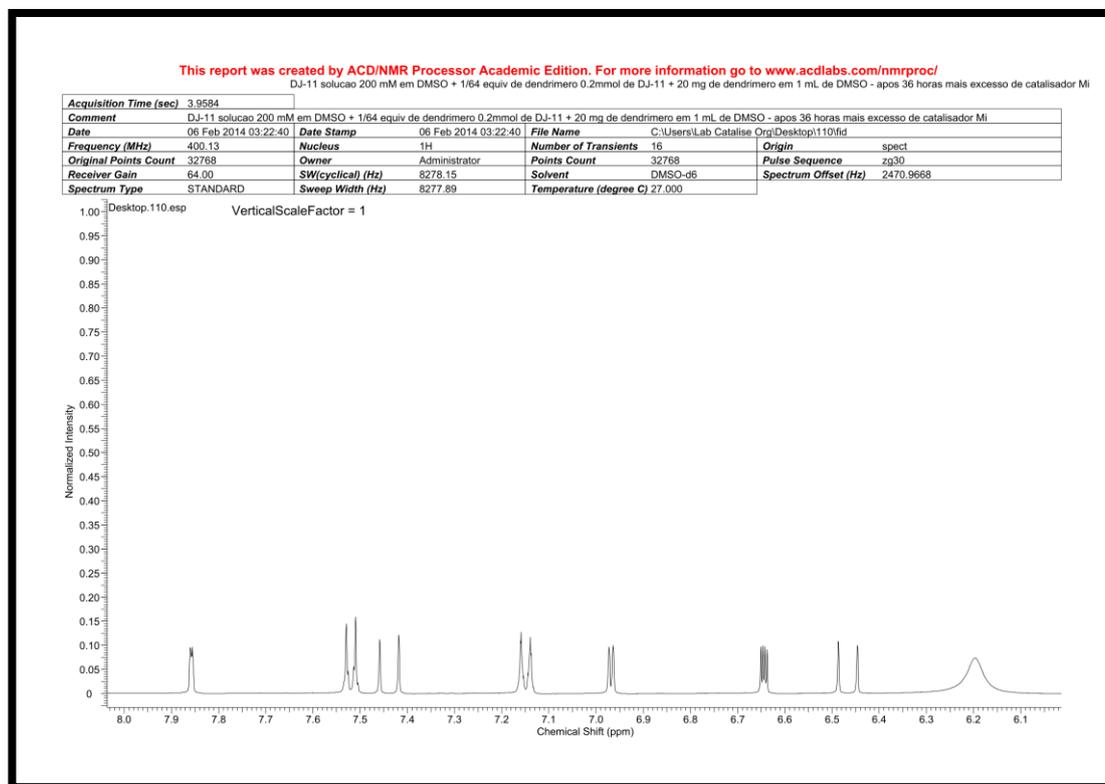
## Reação entre o material de partida 32 e o bis-MPA com APTS

Após 24 horas de reação:



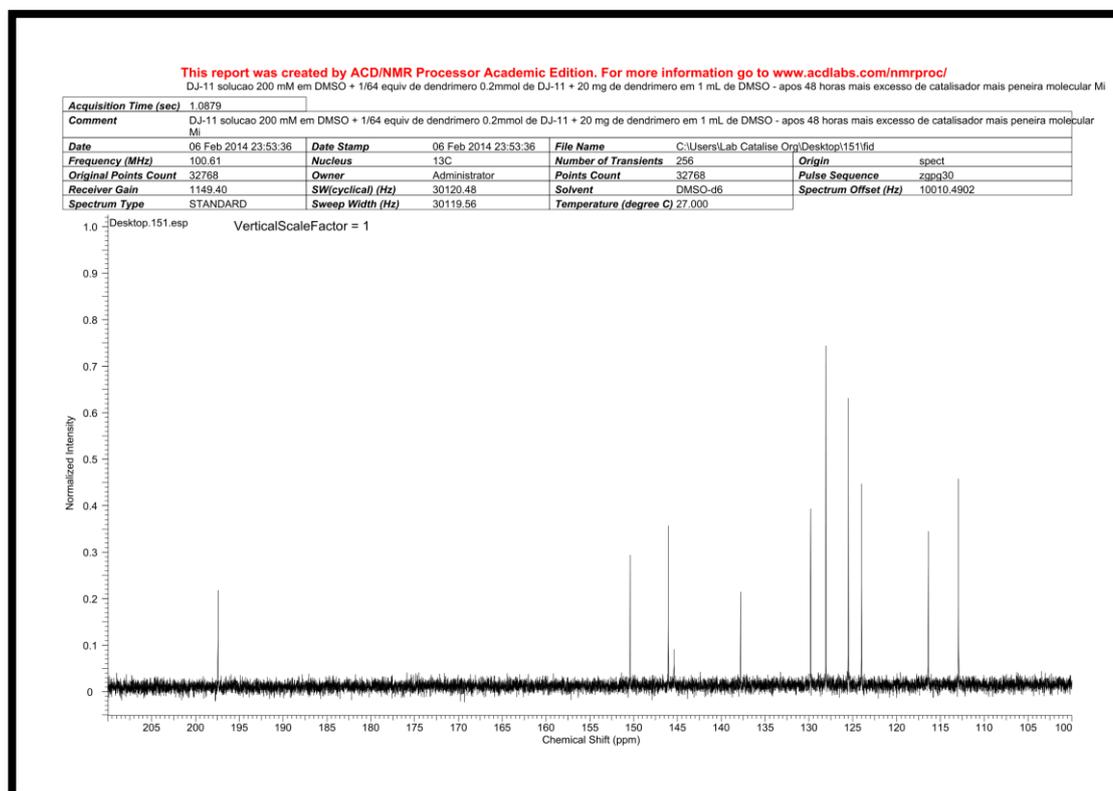
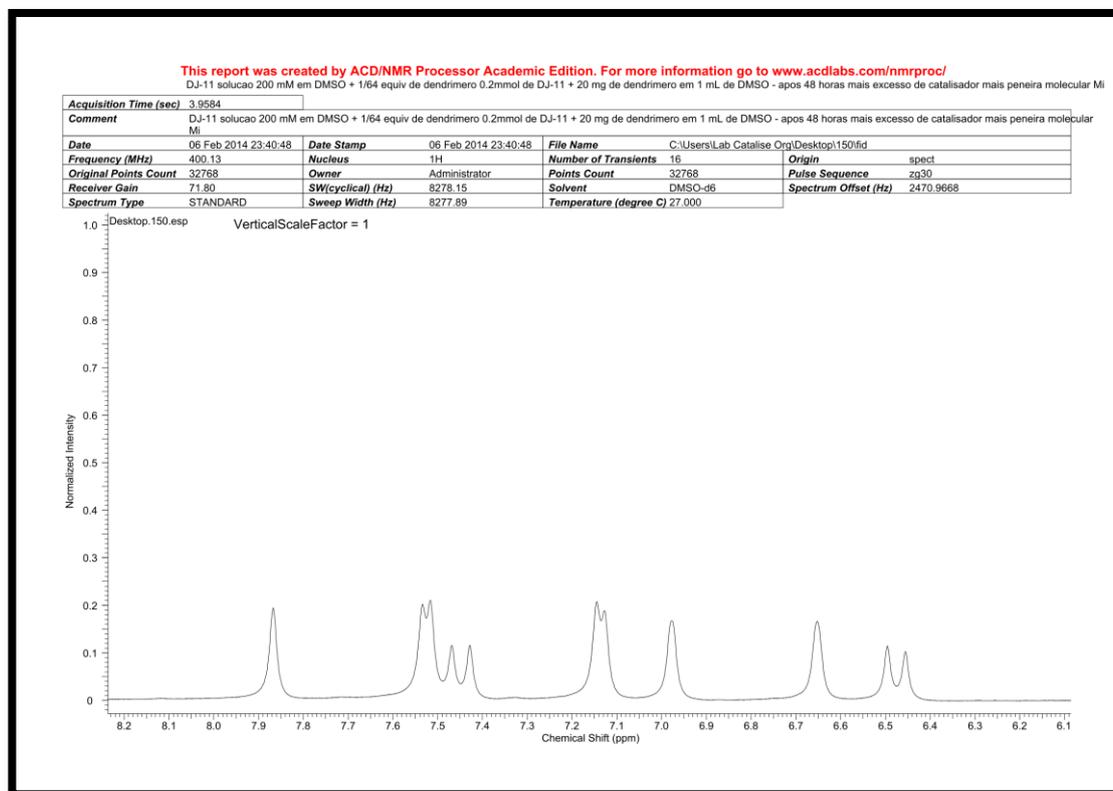
## Reação entre o material de partida 32 e o bis-MPA com APTS

Após 36 horas de reação:

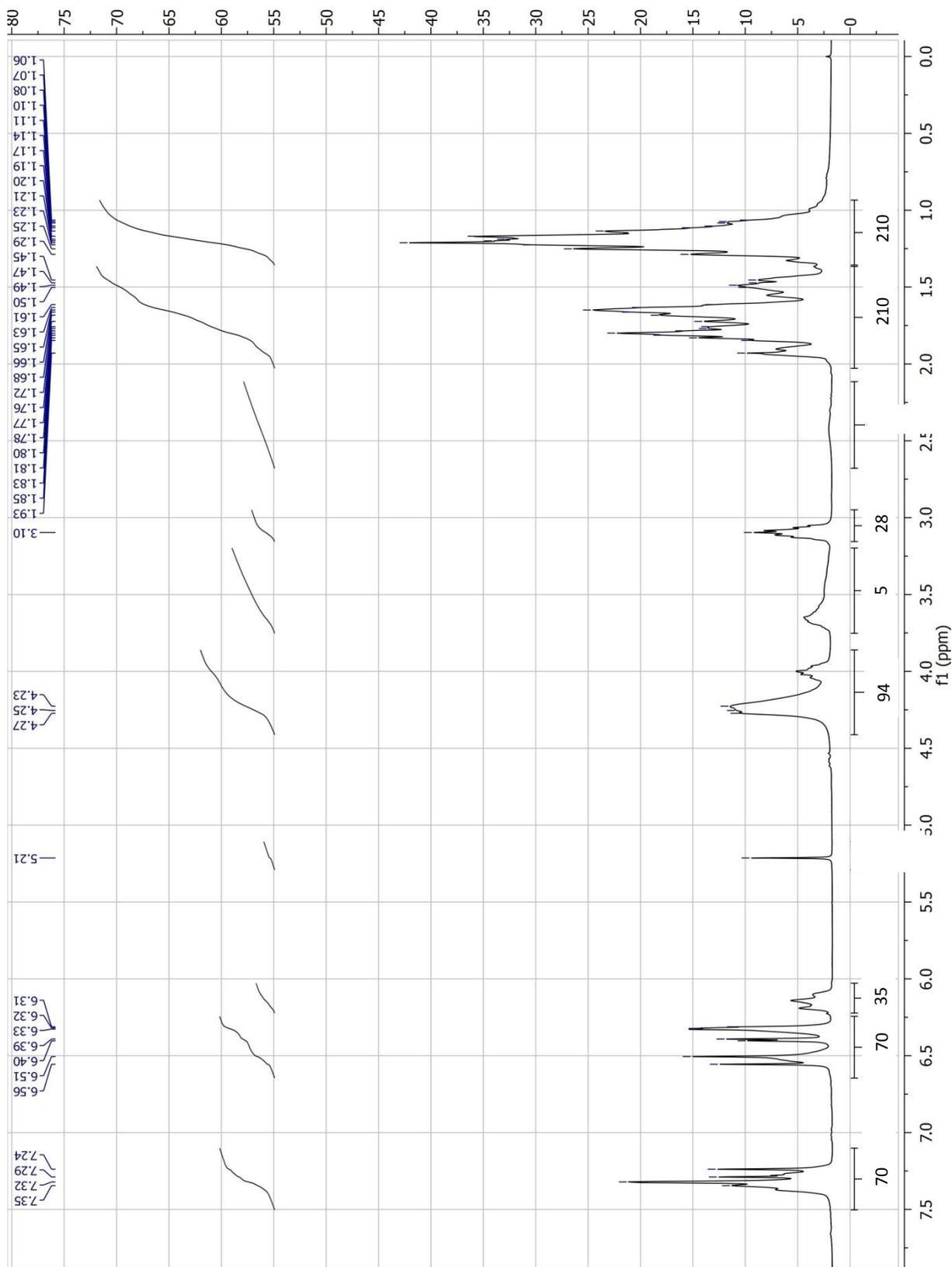


## Reação entre o material de partida 32 e o bis-MPA com APTS

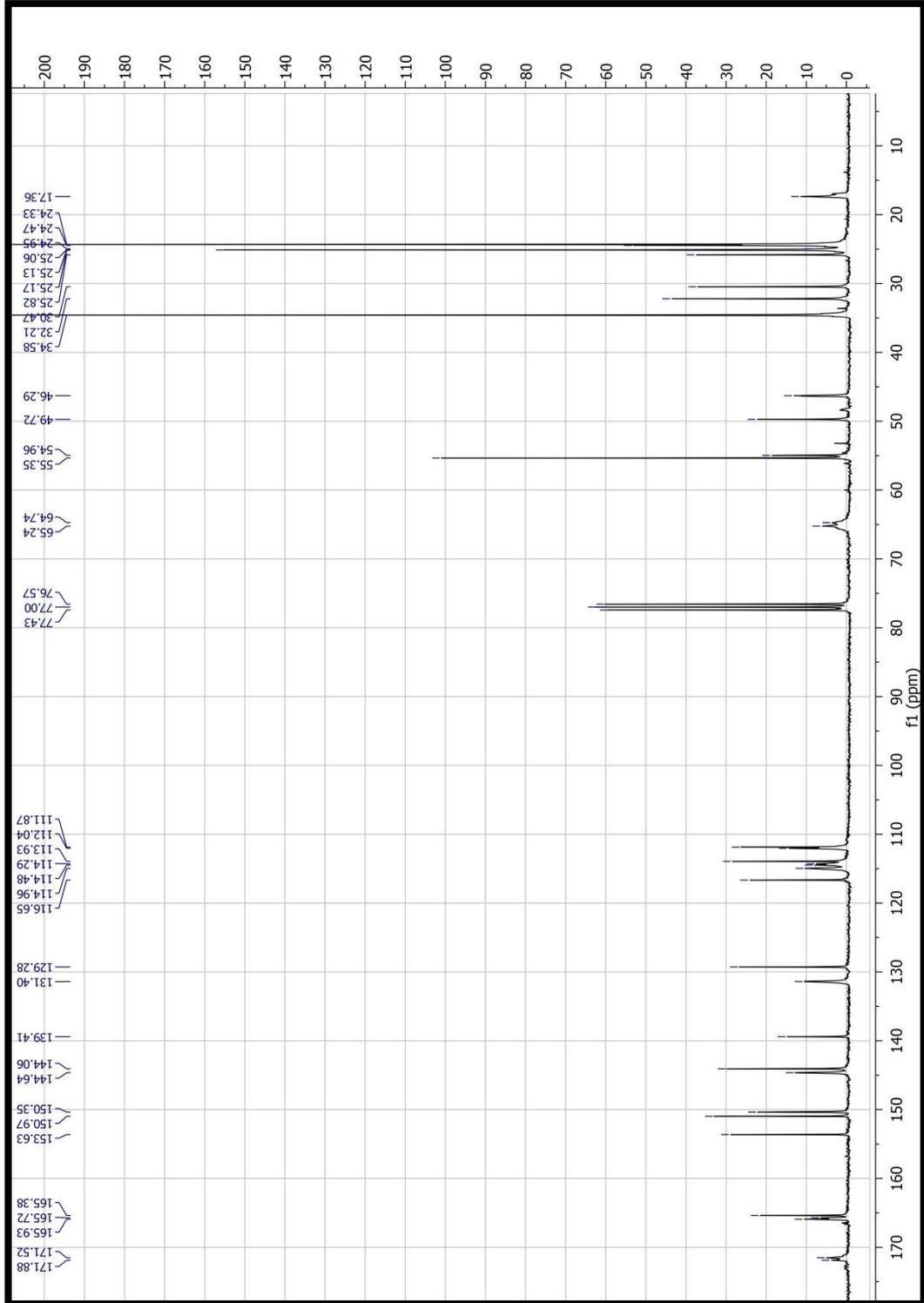
Após 48 horas de reação:



# RMN 1H do material conjugado (36)



# RMN 13C do material conjugado (36)



# Experimento HSQC do material conjugado (36)

