UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

RODRIGO DOS SANTOS HEYDER

**Poliésteres Dendríticos: Aplicações em Sistemas de
Drug Delivery e Magnificação de Efeito Catalítico**

Versão Corrigida da Tese
Conforme Resolução CoPGr 5890
A versão original se encontra disponível na
Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo
Data de depósito na SPG
14/12/2015

RODRIGO DOS SANTOS HEYDER

**Poliésteres Dendríticos: Aplicações em Sistemas de
Drug Delivery e Magnificação de Efeito Catalítico**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Química)

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Camino Bazito
Co-Orientador: Prof. Dr. Sandro R. P. da Rocha

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Heyder, Rodrigo dos Santos
H615p Poliésteres dendríticos: aplicações em sistemas de *drug delivery*
e magnificação de efeito catalítico / Rodrigo dos Santos Heyder. --
São Paulo, 2015.
267p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Bazito, Reinaldo Camino

Co-orientador: Rocha, Sandro Roberto Possatti da

1. Polímeros : Química orgânica 2. Fármacos : Melhoramento
3. Fármacos : Sistema respiratório I. T. II. Bazito, Reinaldo Camino,
orientador III. Rocha, Sandro Roberto Possatti da, co- orientador.

547.84 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Poliéteres dendríticos: aplicações em sistemas de *drug delivery* e magnificação de efeito catalítico”

RODRIGO DOS SANTOS HEYDER

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências no Programa Química.

Prof. Dr. Reinaldo Camino Bazito
(Orientador e Presidente)

Aprovado (a) por:

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri
IQ - USP

Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira
FCF - USP

Profa. Dra. Priscilla Carvalho Veggi
UNIFESP - Diadema

SÃO PAULO
28 de março de 2016

Para meus pais e minha avó Johanna (in memoriam)

Agradecimentos

Aos meus pais (Alfredo e Suely) e minha família, que ao longo de toda jornada estiveram ao meu lado e mesmo sem conhecimento sobre química, sempre escutaram pacientemente todas as minhas impressões sobre ciência.

Ao professor Dr. Reinaldo Camino Bazito, meu orientador, pela oportunidade de compor seu grupo de pesquisa e por ser um dos principais componentes do meu amadurecimento científico.

Ao professor Dr. Sandro R. P. da Rocha, meu co-orientador, pela oportunidade de conhecer uma outra realidade científica, pela sua hospitalidade e por toda a ajuda dispensada antes e durante minha estada no Michigan. Agradeço também a toda família da Rocha pela inestimável ajuda em minha instalação e pelos excelentes momentos vividos.

Aos colegas do grupo de Pesquisa em Química Verde e Ambiental (GPQVA). O corpo técnico, Beatriz do Nascimento e Geórgia Delmilio, por toda a ajuda ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Aos colegas de grupo Lígia Maia, Rafael Cassaro, Luíz Américo Vale pela troca de experiências ao longo dos anos. A Andressa Pilonetto, Larissa Ciccotti, Raquel Almeida, Carolina Torres e Daniela Batistela pelo excelente convívio. Ao Rodrigo Ho por toda sua ajuda durante seu projeto de IC. A Tatiana Araújo pelo companheirismo e pelas longas conversas em momentos críticos dessa jornada. Aos grandes amigos Thiago Hower e Rodrigo Pimenta por todas as conversas e bons momentos.

Aos grupos de pesquisa que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, sendo por meios materiais ou pela simples troca de conhecimento. Agradeço,

em especial, a todos do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Alcindo do Santos e do Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, sobretudo a Dra. Lydia Yamaguchi.

Aos amigos feitos na Wayne State University. Em especial Bingwen Wang, Ayad M. Nancy, Juliana Carneiro e Qian Zhong.

Aos amigos de graduação, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado ao longo de toda esta etapa. Em especial ao Jorge Shinohara e Elaine Macedo.

Aos professores e orientandos que possibilitaram frutíferas colaborações. Em especial, aos alunos: Marco A. S. Garcia e Luiz Fernando Lepre, pelo companheirismo e dedicação.

A todos os funcionários do IQ-USP por sua colaboração nas diversas situações criadas ao longo deste trabalho.

As agências de fomento: CNPq, CAPES, FAPESP, FINEP, INCT de Estudos do Meio Ambiente. Pelas bolsas de estudos e demais auxílios financeiros fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e familiares, que mesmo não notando, foram partes fundamentais na realização deste trabalho e em meu amadurecimento profissional e pessoal.

A todos, que direta ou indiretamente, tiveram a sua contribuição na execução ou planejamento deste trabalho.

*Não basta dar os passos que nos devem levar, um dia, ao objetivo,
cada passo deve ser ele próprio um objetivo,
ao mesmo tempo que nos leva para adiante*

Johann Wolfgang von Goethe

Resumo

Heyder, R. S. **Poliésteres Dendríticos: Aplicações em Sistemas de *Drug Delivery* e Magnificação de Efeito Catalítico**. 2015.(267p). Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Materiais altamente especializados (polifuncionais) continuam a ser candidatos chave para avanços na área tecnológica e biológica. Buscando aplicação em campos diversos, foram sintetizadas estruturas dendríticas (dendrímeros e polímeros hiperramificados) do tipo poliéster. Esses materiais foram utilizados para dois fins distintos, a aplicação em sistemas de *Drug Delivery* e em sistemas catalíticos. Em relação aos sistemas de *Drug Delivery*, foram estudados dois aspectos principais: **(i)** *Impregnação de fármacos na matriz dendrímica utilizando $scCO_2$ como solvente* - foi estudado o comportamento dos materiais frente ao solvente neotério em termos de estrutura (arquitetura da macromolécula), grupos modificadores (acetônida, hidroxila, acetila e cadeia lineares de polilactato) e densidade do solvente. Os materiais que apresentaram características adequadas foram utilizados no estudo da impregnação de fármacos modelo (Ibuprofeno e Fluconazol) na matriz dendrímica, utilizando-se $scCO_2$ como solvente. Ambos os fármacos foram eficientemente aprisionados no interior da matriz e apresentaram interações com sua estrutura (analisadas por espectroscopia Raman e 1H RMN). **(ii)** *Estudo do potencial para uso como nanocarreadores em *Drug Delivery* destinados as vias aéreas* - Estudou-se o emprego dos dendrímeros do tipo poliéster de diferentes gerações (G3 e G4) modificados com um marcador fluorescente (FITC), conjugados ou não a poli(etilenoglicol) (PEG), como potenciais nanocarreadores para sistemas de *Drug Delivery* destinados as vias aéreas. Foram realizados testes *in*

vitro para avaliar o transporte e a internalização desses materiais em um modelo de epitélio pulmonar (monocamada de células Calu-3). O transporte e internalização se mostraram dependentes do tamanho da espécie, sendo que dendrímeros conjugados com PEG apresentaram baixa internalização e mais eficiente transporte através da monocamada, situação oposta à ocorrida com os dendrímeros não conjugados. Estudou-se a degradabilidade desses materiais em condições de pH de relevância biológica, assim como a citotoxicidade dos dendrímeros íntegros e de seus fragmentos frente às células Calu-3, sendo que todas as espécies demonstraram baixa toxicidade na faixa de concentração estudada. O dendrímero modificado com PEG foi utilizado em uma formulação do tipo “*pressurized metered-dose inhaler*” (pMDI). A performance do aerossol obtido com o pMDI foi avaliada, *in vitro*, através de um impactador de cascata de Andersen (Andersen Cascade Impactor, ACI), mostrando excelentes resultados, com ao redor de 90% da formulação atingindo regiões profundas do pulmão (*eg.* alvéolos). Em relação à aplicação em sistemas catalíticos, poliésteres hiperramificados, similares aos dendrímeros empregados nos demais estudos, foram modificados de modo a se obter grupos -NH₂ terminais e utilizados para magnificação de performance de catalisadores baseados em ródio. Os poliésteres hiperramificados modificados foram imobilizados em nanopartículas ferromagnéticas, do tipo Fe₃O₄@SiO₂, a fim de se obter uma elevada densidade de grupos aminos terminais, os quais foram posteriormente modificados e serviram de ancoragem para um catalisador de Rh. Foi avaliado o incremento do conteúdo de metal na nanopartícula (de 0,2% para 1,0% m/m), assim como seu efeito catalítico em reações de hidroformilação.

Palavras-chave: Dendrímero, CO₂ supercrítico, *Drug delivery*, Nanocarreadores, Formulação pMDI, Catálise heterogênea

Abstract

Heyder, R. S. **Polyester Dendritic Materials: Applications in Drug Delivery Systems and Magnification of Catalytic Effect**. 2015.(267p). PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Highly specific materials (polyfunctional) continue to be key candidates to address the challenges of technological and biological fields. Aiming to reach different applications, polyester dendritic structures (dendrimers and hyperbranched polymers) were synthesized. These materials were used in two different ways, application in Drug Delivery systems and in catalytic systems. Regarding the usage in the Drug Delivery systems, two major aspects were studied: **(i) Impregnation of drugs in the dendrimeric matrix using $scCO_2$ as solvent** - It was studied the behavior of these materials in the neoteric solvent in terms of structure (architecture of the macromolecule), modifying groups (acetone, hydroxyl, acetyl and linear polylactide chains) and density of the solvent. The materials that showed appropriate characteristics were used for the impregnation of model drugs (Ibuprofen and Fluconazole) in the dendrimeric matrix, using $scCO_2$ as solvent. The two drugs were efficiently trapped in the matrix, and showed interactions with its structure (analyzed by Raman Spectroscopy and 1H NMR) **(ii) Study of potential usage as nanocarriers in Drug Delivery systems for the airways** - It was studied the application of polyester dendrimers of different generations (G3 and G4), labeled with FITC and conjugated or not with polyethylene glycol (PEG) as potential nanocarriers for Drug Delivery systems for the airways. *In vitro* tests were performed to analyze the transport and internalization of these materials in a model of lung epithelia (Calu-3 monolayer). Transport and internalization showed to be size

dependent, where the PEGylated dendrimers showed low internalization and more efficient transport through the monolayer, with the opposite situation for the non-conjugated dendrimers. The degradation of the materials was studied in biological relevant values of pH, as well the cytotoxicity on Calu-3 of the dendrimers and their building-blocks. All materials showed very low cytotoxicity in the range of concentrations used. The G4 PEGylated dendrimer was used to prepare a pMDI (pressurized metered-dose inhaler) formulation. The performance of the resulting aerosol was evaluated, *in vitro*, using an eight stage Andersen Cascade Impactor (ACI). The results showed excellent deep lung deposition, where almost 90% of the formulation reached deep compartments, as alveoli. In the catalytic system application, hyperbranched polyesters, similar to the employed dendrimers, were modified to incorporate peripheral -NH_2 groups and used to magnify the catalytic effect of Rhodium-based catalysts. The modified hyperbranched polyesters were immobilized on magnetic nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$), resulting in a high density of terminal amine groups. These groups were modified and used for the anchorage of a Rhodium catalyst. It was evaluated the increase in the metal load of the nanoparticles (from 0.2% to 1.0% w/w), as well the catalytic effect in hydroformylation reactions.

Keywords: Dendrimer, Supercritical CO_2 , Drug delivery, Nanocarrier, pMDI formulation, Heterogeneous catalysis

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AB	antibiótico (penicilina-estreptomicina)
ACI	<i>Andersen Cascade Impactor</i> - impactador em cascata de Andersen
AcOEt	acetato de etila
ALI	<i>air-liquid interface</i> - interface ar-líquido
ANOVA	<i>analysis of variance</i> - análise de variância
APTES	(3-aminopropil)triethylsilano
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> - ácido bicinconínico
Bis-MPA	ácido bis(metilol)propiónico
BOC	<i>tert</i> -butoxicarbonil
bTJ	junção celular dupla
CCD	<i>charge-coupled device</i> - dispositivo de carga acoplada
CFC	clorofluorcarbono
CG-MS	cromatografia gasosa - detecção por espectrometria de massas
CG-FID	cromatografia gasosa - detecção por ionização por chama
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> - doença pulmonar obstrutiva crônica
COV	composto orgânico volátil
DB	<i>degree of branching</i> - grau de ramificação
DBLT	dilaurato de di- <i>n</i> -butilestano
DCC	<i>N,N'</i> -dicioexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
DCU	<i>N,N'</i> -dicioexilurea
DDD	1,12-dodecanodiol

DHB	ácido 2,5-dihidroxi-benzóico
DLS	<i>dynamic light scattering</i> - espalhamento de luz dinâmico
DMAP	4-(dimetil)aminopiridina
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> - meio de Eagle modificado de Dulbecco
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DNC	<i>dendrimer nanocarrier</i> - nanocarreador dendrímérico
DPI	<i>dry powder inhaler</i> - inalador de pó seco
DPTS	<i>p</i> -toluenossulfonato de 4-(dimetilamino)piridínio
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i> - calorimetria exploratória diferencial
EDC	cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminiopropil)carbodiimida
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> - ácido etilenodiamino tetra-acético
EMAR-ESI	espectrometria de massas de alta resolução - <i>electrospray ionisation</i>
eqv.	equivalente(s)
EtNH ₂	etanoamina
EtOH	etanol
FAAS	espectrometria de absorção atômica por chama
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> - classificação celular ativada por fluorescência
FBS	<i>fetal bovine serum</i> - soro fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FPF	<i>fine particle fraction</i> - fração de partículas finas
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> - infravermelho com transformada de Fourier

GSD	<i>geometric standard deviation</i> - desvio padrão geométrico
HBPs	<i>hyperbranched polymers</i> - polímeros hiperramificados
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> - solução salina balanceada de Hank
HD	<i>hydrodynamic diameter</i> - diâmetro hidrodinâmico
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico
Hex	hexano (mistura de isômeros)
HFA	hidrofluoralcenos
HFA-134a	1,1,1,2-tetrafluoretano
HFA-227	1,1,1,2,3,3,3-heptafluorpropano
HPFP	1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-decafluorpentano
ICP-OES	espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
J	constante de acoplamento
LED	<i>light emitting diode</i> - diodo emissor de luz
LS	<i>light scattering</i> - espalhamento de luz
MALDI-TOF	<i>matrix assisted desorption/ionization - time-of-flight</i> - ionização/dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo
MeOH	metanol
MFI	<i>median fluorescence intensity</i> - intensidade mediana de fluorescência
MMAD	<i>mass median aerodynamic diameter</i> - diâmetro aerodinâmico por mediana da massa
m/m	massa / massa
m _p	<i>melting point</i> - ponto de fusão
mPEG	poli(etileno glicol) metil éter
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MW	<i>molecular weight</i> - massa molecular

MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> - corte de massa molecular
N	parâmetro de nucleofilicidade
NAD(P)H	(fosfato) de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NPs	nanopartículas
p	pressão
PAMAM	dendrímico poliamidoamina
P _{app}	permeabilidade aparente
PBS	<i>phosphate buffer saline</i> - tampão fosfato salino
p _c	pressão crítica
PEG	poli(etileno glicol)
PLA	polilactato
pMDI	<i>pressurized metered-dose inhaler</i> - inalador pressurizado dosimetrado
P _N	pressão de névoa
PPh ₂	difenilfosfina
ppm	partes por milhão
pTSA	ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
Py	piridina
RES	<i>reticuloendothelial system</i> - sistema reticulo endotelial
RESS	<i>rapid expansion supercritical solution</i> - expansão rápida de solução supercrítica
RF	<i>respirable fraction</i> - fração respirável
RMN	ressonância magnética nuclear
R.T.	<i>room temperature</i> - temperatura ambiente
SAS	<i>supercritical antisolvent</i> - antissolvente supercrítico
scCO ₂	dióxido de carbono supercrítico

SCF	<i>supercritical fluid</i> - fluido supercrítico
s.d.	<i>standard deviation</i> - desvio padrão
SD	<i>solvated diameter</i> - diâmetro de solvatação
T	temperatura
t	tempo
T _c	temperatura crítica
TEA	trietilamina
TEER	<i>transepithelial electrical resistance</i> - resistência elétrica transepitelial
TEOS	tetraetoxissilano
TFA	ácido trifluoracético
T _g	termogravimetria
T _g	transição vítrea
THF	tetraidrofurano
TJ	<i>tight junction</i> - junção oclusiva
TMP	trimetilolpropano
TOAB	brometo de tetraoctilamônio
tTJ	junção celular tripla
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV-Vis	ultravioleta-visível
δ	deslocamento químico
ζ	potencial zeta

Sumário

Agradecimentos	ix
Resumo	xiii
Abstract	xv
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xvii
Estruturação da Tese	35
Capítulo 1. Polímeros Dendríticos: Síntese e Caracterização	37
1.1. Introdução	37
1.1.1. A Ascensão de Materiais Poliméricos	37
1.1.3. Crescimento Divergente	43
1.1.4. Crescimento Convergente	44
1.1.5. Polímeros Hiperramificados	44
1.1.6. Nomenclatura de Dendrímeros	45
1.2. Objetivos	47
1.3. Procedimentos Experimentais	47
1.3.1. Preparação do Ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico (Bis-MPA-protégido) (1.1)	47
1.3.2. Preparação do Anidrido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico (1.2)	48
1.3.3. Preparação de p-toluenossulfonato de 4-(dimetilamino)piridínio (DPTS) (1.3)	48
1.3.4. Preparação da Primeira Geração do Dendrímero Protégido por Acetonida (TMP-[G#1]-Acetonida) (1.4)	49
1.3.5. Procedimento Geral para Desproteção do Grupo Acetonida: TMP-[G#1]-(OH) ₆ (1.5)	50
1.3.6. Procedimento Geral para Esterificação através de Acoplamento de Anidrido: TMP-[G#2]-Acetonida (1.6)	51
1.3.7. Preparação de TMP-[G#2]-(OH) ₁₂ (1.7)	52
1.3.8. Preparação de TMP-[G#3]-Acetonida (1.8)	53
1.3.9. Preparação de TMP-[G#3]-(OH) ₂₄ (1.9)	54
1.3.10. Preparação de TMP-[G#4]-Acetonida (1.10)	54
1.3.11. Preparação de TMP-[G#4]-(OH) ₄₈ (1.11)	55
1.3.12. Preparação de DDD-[G#1]-Acetonida (1.12)	56
1.3.13. Preparação de DDD-[G#1]-OH ₄ (1.13)	57
1.3.14. Preparação de DDD-[G#2]-Acetonida (1.14)	57
1.3.15. Preparação de DDD-[G#2]-(OH) ₈ (1.15)	58
1.3.16. Preparação de TMP-HYP-[G#2]-(OH) ₁₂ (1.16)	59
1.4. Resultados e Discussão	60
1.4.1. Síntese de Dendrímeros	60
1.4.2. Caracterização dos Materiais Dendriméricos	63
1.4.3. Síntese de Polímeros Hiperramificados	66
1.4.4. Caracterização do Material Hiperramificado	68
1.5. Conclusão	71
Capítulo 2. Processamento de Materiais Dendriméricos e Incorporação de Fármacos em CO₂ Supercrítico	73
2.1. Introdução	73
2.1.1. Dendrímeros para Encapsulamento e Incorporação de Fármacos: A Necessidade da Liberação Controlada	73
2.1.2. Polímeros em CO ₂	78
2.2. Objetivos	80

2.3. Procedimento Experimental.....	81
2.3.1. Modificações dos Materiais Dendriméricos.....	81
2.3.2. Comportamento dos Materiais em CO ₂ supercrítico	86
2.4. Resultados e Discussão.....	94
2.4.1. Expansão e Dissolução de Materiais Dendriméricos	94
2.4.2. Espectroscopia Raman em Alta Pressão.....	114
2.4.3. Uso de Dendrímeros Contendo Cadeias de Polilactato Linear (PLA) na Superfície para Impregnação de Fármacos.....	117
2.4.4. Análise Espectroscópica da Interação Fármaco-Dendrímero.....	137
2.5. Conclusão.....	143
Capítulo 3. Interação de Poliésteres Dendriméricos com Modelo de Epitélio Pulmonar e sua Formulação em Aerossol.....	145
3.1. Introdução.....	145
3.1.1. Administração de Fármacos pelas Vias Aéreas.....	145
3.1.2. Nanocarreadores Dendriméricos - DNC's	148
3.1.3. Conjugação de Poli(etileno glicol) - PEGlação	150
3.2. Objetivos.....	153
3.3. Procedimento Experimental.....	154
3.3.1. Modificações dos Materiais Dendriméricos.....	154
3.3.2. Ensaios de Degradação	159
3.3.3. Cultura de Células Calu-3	159
3.3.4. Citotoxicidade dos Materiais Dendriméricos, Conjugados e Fragmentos.....	160
3.3.5. Transporte in vitro de Dendrímeros através de Monocamadas de Calu-3.....	161
3.3.6. Internalização de Dendrímeros e Conjugados Analisados por Citometria de Fluxo (FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorting).....	164
3.3.7. Preparação de Formulação pMDI e Avaliação de sua Estabilidade Física	165
3.3.8. Caracterização do Aerossol das Formulações pMDI.....	166
3.3.9. Determinação de Tamanho de Partícula e Potencial ζ	167
3.3.10. Análise Estatística	168
3.4. Resultados e Discussão.....	169
3.4.1. Síntese dos Materiais Dendriméricos Conjugados com mPEG.....	169
3.4.2. Síntese dos Materiais Dendriméricos Conjugados com FITC.....	173
3.4.3. Síntese de Dendrímeros Conjugados com PEG e FITC	177
3.4.4. Tamanho e Carga Superficial dos Materiais Sintetizados.....	178
3.4.5. Degradação dos Materiais Dendriméricos	180
3.4.6. Cultura de Células Calu-3	186
3.4.7. Citotoxicidade dos Materiais Dendriméricos e Fragmentos	188
3.4.8. Formação de um Modelo de Epitélio Pulmonar e Medidas de TEER (Transepithelial Electrical Resistance).....	194
3.4.9. Transporte Transepithelial.....	197
3.4.10. Internalização e Balanço de Massas.....	206
3.4.11. Formulação em Aerossol (pMDI) e suas Propriedades.....	211
3.5 Conclusões.....	219
Capítulo 4. Uso de Materiais Dendríticos para Magnificação de Efeito Catalítico.....	221
4.1. Introdução.....	221
4.2. Objetivos.....	224
4.3. Procedimento Experimental.....	224
4.3.1. Preparação de Nanopartículas de Ródio (Rh NPs)	224

4.3.2. Preparação do Suporte - $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$	225
4.3.3. Preparação do Material Hiperramificado Modificado	226
4.3.4. Preparação de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2$	229
4.3.5. Reações Catalíticas - Hidroformilação	230
4.4. Resultados e Discussão	231
4.5. Conclusão	239
Materiais e Equipamentos	241
5.1. Solventes	241
5.2. Reagentes	242
5.3 Equipamentos	245
5.3.1. Liofilização	245
5.3.2. Valores de pH	245
5.3.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	245
5.3.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR)	246
5.3.5. Espectroscopia Raman (Raman Spectroscopy)	246
5.3.6. Análise Elementar - CHN	247
5.3.7. Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry - MS)	247
5.3.8. Análises Térmicas - Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry - DSC)/ Termogravimetria (Tg)	248
5.3.9. Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering - DLS) Potencial Zeta (ζ)	248
5.3.10. Cromatografia Gasosa (CG)	248
5.3.11. Determinação de Ródio	249
5.3.12. Ensaios em scCO_2	249
Bibliografia	251
Anexo I - Espectros Selecionados	269

Lista de Esquemas, Tabelas e Figuras

Capítulo 1	
Esquemas	
Esquema 1.1. Reação Pseudo-One Pot para síntese de polímero hiperramificado.....	45
Esquema 1.2. Síntese divergente de dendrímeros com núcleo de TMP (I) e DDD (II).....	61
Esquema 1.3. Síntese de anidrido de Bis-MPA utilizando-se DCC.....	62
Tabelas	
Tabela 1.1. Parâmetros calculados para o poliéster hiperramificado sintetizado.....	70
Figuras	
Figura 1.1. Diagrama esquemático de inovação e produção relacionada a ciência de polímeros ao longo dos últimos 150 anos.....	37
Figura 1.2. Representação esquemática de monômeros com estrutura AB _x	38
Figura 1.3. Comparação entre as arquiteturas poliméricas.....	39
Figura 1.4. Representação esquemática das subclasses de polímeros dendríticos.....	40
Figura 1.5. Evolução das estruturas poliméricas e estratégias sintéticas utilizando Bis-MPA.....	40
Figura 1.6. Desenho esquemático de um dendrímero e possíveis aplicações. A- Regiões de um dendrímero; B- Dendrímero utilizado para encapsulamento de fármaco, C- Dendrímero conjugado com outras moléculas.....	42
Figura 1.7. Representação esquemática das estratégias de crescimento de um dendrímero.....	43
Figura 1.8. Metodologia para nomenclatura dos materiais dendriméricos.....	46
Figura 1.9. Espectros de ¹ H RMN de (A) TMP-[G#4]-Acetonida e TMP-[G#4]-(OH) ₄₈ ; (B) DDD-[G#2]-Acetonida e DDD-[G#2]-(OH) ₈ *denota sinal residual do solvente e/ou de H ₂ O. Espectros em vermelho foram obtidos utilizando-se CDCl ₃ como solvente, enquanto espectros pretos foram obtidos utilizando DMSO- <i>d</i> ₆	63
Figura 1.10. Espectros de ¹³ C RMN de TMP-[G#1]-Acetonida e TMP-[G#1]-(OH) ₆ Em destaque a região característica do grupo acetonida em ~98 ppm.....	64
Figura 1.11. Espectros de ¹³ C RMN de TMP-[G#4]-Acetonida. Em destaque a região de grupos carbonila do espectro de cada geração (G1-G4).....	65
Figura 1.12. Representação esquemática do arranjo experimental para a síntese de polímeros hiperramificados. Esquema reacional para síntese de TMP-[G#2]-[HYP]-(OH) ₁₂	66
Figura 1.13. Espectros de EMAR-ESI para materiais sintetizados com diferentes velocidades de adição de monômero. Velocidade de adição I > II > III > IV. Linha tracejada vermelha denota a massa de Pseudo-[G#2].....	68
Figura 1.14. Diferentes espécies de carbono quaternário e seus respectivos deslocamentos químicos (em ppm).....	69
Figura 1.15. Magnificação de espectro de ¹³ C RMN do material hiperramificado de pseudo segunda geração. Deslocamentos demonstrados em ppm e valores de integrais (em vermelho) atribuídos segundo referência estabelecida em carbonos pertencentes ao núcleo.....	70

Capítulo 2

Esquemas

Esquema 2.1. Rota sintética para conjugação de polilactato na periferia do dendrímero e posterior acetilação da hidroxila terminal.....	118
--	-----

Tabelas

Tabela 2.1. Comparação de propriedades físicas típicas de gases, fluídos supercríticos (SFC) e líquidos (água).....	77
Tabela 2.2. Valores de Pressão de Névoa e solubilidade mínima dos dendrímeros solúveis em scCO ₂	112
Tabela 2.3. Resultados de testes de impregnação de ibuprofeno em scCO ₂	132
Tabela 2.4. Resultados de ensaios de impregnação de fluconazol em scCO ₂	133

Figuras

Figura 2.1. Diferentes sistemas de liberação controlada. (A) Sistema de liberação baseada na difusão e partição; (B) Liberação controlada ao longo de um período de tempo; (C) Liberação <i>On-site</i> - fármaco liberado em um tecido alvo.....	74
Figura 2.2. Mecanismos para controle temporal da liberação de fármacos em matrizes poliméricas.....	74
Figura 2.3. Plano T-p do diagrama de fases do dióxido de carbono (CO ₂). Na região destacada (SCF), as fases líquidas e gasosas são indistinguíveis.....	76
Figura 2.4. Gráficos de densidade em função de temperatura e pressão para o CO ₂ . (Cálculos realizados pela equação de estado proposta por Span e Wagner).....	77
Figura 2.5. Corte transversal (ilustrativo, sem escala) da cela de volume ajustável do monitor de fases.....	88
Figura 2.6. Fotos do equipamento utilizado (Waters, SPM20).....	89
Figura 2.7. Desenho esquemático (sem escala) da configuração do monitor de fases.....	89
Figura 2.8. Desenho esquemático (sem escala) do arranjo experimental para estudo de expansão e solubilidade dos diferentes materiais. Em detalhe, o comportamento de expansão e solubilização (fronteira do material em estudo), assim como fenômeno de pressão de névoa (P _N).....	95
Figura 2.9. Curva de calibração para análise de expansão e retração volumétrica.....	95
Figura 2.10. Valores densidade de scCO ₂ em diferentes temperaturas, a uma mesma pressão (250 bar).....	96
Figura 2.11. Expansão e retração de volume do dendrímero TMP-[G#2]-Acetonida em diferentes temperaturas, ao longo de 48h (p= 250 bar).....	98
Figura 2.12. Expansão e retração de volume do dendrímero TMP-[G#2]-(OH) ₁₂ em diferentes temperaturas, ao longo de 48h (p= 250 bar).....	99
Figura 2.13. Expansão do dendrímero TMP-[G#4]-Acetonida em diferentes temperaturas, ao longo de 48h (p= 250 bar).....	100
Figura 2.14. Expansão e retração de volume do dendrímero DDD-[G#2]-Acetonida em diferentes temperaturas, ao longo de 48 h (p= 250 bar).....	101
Figura 2.15. Retração de volume do dendrímero DDD-[G#2]-(OH) ₈ em diferentes temperaturas, ao longo de 48 h (p= 250 bar).....	102

Figura 2.16. Expansão e retração volumétrica do dendrímero TMP-[G#2]-Acetila em diferentes temperaturas, ao longo de 48 h (p= 250 bar).....	103
Figura 2.17. Expansão e retração volumétrica de TMP-[G#2]-Gluco em diferentes temperaturas, ao longo de 48 h (p= 250 bar).....	104
Figura 2.18. Comparação das alterações volumétricas de dendrímeros de diferentes gerações (TMP-[G#2]-Acetonida e TMP-[G#4]-Acetonida) ao longo de 48 h. Condições T= 35 °C; p= 250 bar.....	107
Figura 2.19. Comparação da variação volumétrica de dendrímeros com diferentes grupos periféricos (acetonida, -OH, acetila, ácido glucônico peracetilado). Condições: T= 35 °C, p= 250 bar.....	109
Figura 2.20. Diagramas de fase simplificado (p x T) de 4 tipos de dendrímeros.....	114
Figura 2.21. Espectro Raman de CO ₂ em diferentes condições experimentais (intensidade e comprimento de onda do laser) e espectro Raman do dendrímero em scCO ₂ frente ao espectro obtido da cela de medida (sem CO ₂).....	115
Figura 2.22. Espectros Raman de dendrímero em scCO ₂ . Janelas espectrais magnificadas para melhor observação dos deslocamentos. DEND: dendrímero TMP-[G#2]-Acetonida.....	116
Figura 2.23. Possíveis interações do tipo ácido-base de Lewis entre a molécula CO ₂ e os grupos carbonila internos e periféricos do dendrímero.....	117
Figura 2.24. Espectros de ¹ H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros conjugados com PLA. MALDI-TOF superior: TMP-[G#2]-PLA12-OH; inferior: TMP-[G#2]-PLA35-OH.....	119
Figura 2.25. Espectros de ¹ H RMN e MALDI-TOF de materiais modificados por grupo acetila terminal. MALDI-TOF superior: TMP-[G#2]-PLA12-Acetila; inferior: TMP-[G#2]-PLA35-Acetila.....	120
Figura 2.26. DSC dos dendrímeros modificados com cadeias lineares de polilactato.....	122
Figura 2.27. Expansão e retração volumétrica de TMP-[G#2]-PLA12-OH ao longo de 48 h. Condições p= 250 bar, T= 75 °C.....	124
Figura 2.28. Retração volumétrica de TMP-[G#2]-PLA35-OH ao longo de 48 h. Condições: p= 250 bar, T= 75 °C.....	125
Figura 2.29. Expansão e retração volumétrica de TMP-[G#2]-PLA12-Acetila ao longo de 48 h. Condições p= 250 bar, T= 75 °C.....	126
Figura 2.30. Comparação de expansão e retração volumétrica entre diferentes dendrímeros modificados com PLA. Condições: p= 250 bar, T= 75 °C.....	127
Figura 2.31. DSC de dendrímeros modificados com PLA antes e após ensaio em scCO ₂ . Condição: p= 250 bar, T= 75 °C, t= 48 h.....	124
Figura 2.32. Fármacos utilizados nos estudos de impregnação/encapsulamento em scCO ₂	130
Figura 2.33. ¹ H RMN de dendrímero-PLA, ibuprofeno e do material resultante do processo de impregnação em scCO ₂ . Em destaque, os picos utilizados para cálculo da razão molar após o ensaio.* denota sinais de solvente e/ou água.....	131
Figura 2.34. ¹ H RMN de dendrímero-PLA, fluconazol e material resultante de impregnação em scCO ₂ . Em destaque, picos utilizados para cálculo de razão molar. *denota sinais de solventes e/ou água.....	133
Figura 2.35. DSC do fármaco ibuprofeno antes e após exposição a scCO ₂ (processado).....	135

Figura 2.36. DSC da mistura física (5:1) Ibuprofeno/Dendrímero e do material resultante (3,6:1) após etapa de impregnação em scCO ₂	136
Figura 2.37. Espectros Raman de ensaios com ibuprofeno. Onde: MF: mistura física, IMP: impregnação, sendo apresentada a razão molar fármaco:dendrímero e o tempo do ensaio.*sat indica saturação do fluido supercrítico com o fármaco. A-Diferentes tipos de ensaio, B- Destaque dos ensaios de impregnação.....	138
Figura 2.38. Espectros Raman de ensaios com ibuprofeno. Onde: IMP: impregnação em scCO ₂ , IMP DCM: impregnação utilizando-se diclorometano, MELT- Fusão da mistura física de fármaco e dendrímero. São apresentados os valores da razão fármaco/dendrímero e o tempo do ensaio, quando pertinente. *sat denota ensaio realizado em condições de saturação do solvente com fármaco.....	140
Figura 2.39. Representação dos modos de vibração analisados por espectroscopia Raman.....	141
Figura 2.40. Espectros Raman de fluconazol em diferentes ensaios. Cores das bordas auxiliam na representação dos modos de vibrações contemplados pela janela espectral apresentada. C-OH (~1024 cm ⁻¹), C-C (~1116 cm ⁻¹), deformação angular do anel triazólico (~967,5 cm ⁻¹), respiração do anel triazólico (~1138 cm ⁻¹); C=C (~1617 cm ⁻¹).IMP: Impregnação em scCO ₂ , são discriminadas as razões fármaco/dendrímero e o tempo do ensaio.....	141
Figura 2.41. Espectro Raman de fluconazol em diferentes ensaios. Cores das bordas auxiliam na representação dos modos de vibração contemplados pela janela espectral apresentada. Respiração do anel 2,4-difluorobenzil (~736,4 cm ⁻¹), respiração do anel triazólico (~1138 cm ⁻¹).....	142

Capítulo 3

Esquemas

Esquema 3.1. Reação de esterificação de mPEG.....	169
Esquema 3.2. Rota sintética para etapa de conjugação de mPEG em materiais dendriméricos: TMP-[G#3]-(OH) ₂₄ e TMP-[G#4]-(OH) ₄₈	171
Esquema 3.3. Esquema reacional para conjugação de FITC.....	174

Tabelas

Tabela 3.1. Resultados de conjugação de mPEGCOOH.....	171
Tabela 3.2. Número de cadeias PEG conjugadas (n), massa molar (MW), tamanho (diâmetro hidrodinâmico, HD), potencial zeta (ζ) das macromoléculas sintetizadas determinados por ¹ H RMN, MALDI-TOF, e espalhamento de luz (LS). Medidas de LS conduzidas em água a temperatura ambiente.....	179
Tabela 3.3. Diâmetro de solvatação (SD) em HPFP, 1% v/v EtOH, de dendrímeros e conjugados determinados por espalhamento de luz (LS), em temperatura ambiente.....	213
Tabela 3.4. Performance da formulação pMDI preparada com TMP-[G#4]-FITC-19PEG _{1k} . Formulação pMDI contendo 1,5 mg de dendrímero por 1 mL de HFA-227, 1% v/v de etanol. Experimentos realizados a 298 K na pressão de saturação do propelente. Resultados expressos como média ± s.d, obtidos em 4 ensaios independentes.....	217

Figuras

Figura 3.1. Comparação entre o epitélio pulmonar em diferentes regiões.....	146
Figura 3.2. Inalador do tipo pMDI (<i>pressurized meter dose</i>).....	147

Figura 3.3. Características físicas de nanopartículas em termos de biocompatibilidade <i>in vivo</i>	149
Figura 3.4. Molécula de poli(etilenoglicol).....	151
Figura 3.5. Espectros de ^1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros de terceira geração conjugados com PEG.*denota sinal residual de solvente.....	172
Figura 3.6. Espectros de ^1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros de quarta geração conjugados com PEG.*denota sinal residual de solvente.....	172
Figura 3.7. Espectros de ^1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros de terceira geração conjugados com FITC.*denota sinal residual de solvente e/ou água.....	175
Figura 3.8. Espectros de ^1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros de quarta geração conjugados com FITC.* denota sinal residual de solvente e/ou água.....	175
Figura 3.9. Espectros de ^1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros de quarta geração conjugados com PEG e FITC.* denota sinal residual de solvente e/ou água.....	177
Figura 3.10. Espectros de MALDI-TOF resultantes do ensaio de degradação de TMP-[G#4]-(OH) ₄₈ ao longo de 30 dias. Condições: 37 °C, pH 4,5.....	181
Figura 3.11. Espectros de MALDI-TOF resultantes do ensaio de degradação de TMP-[G#4]-(OH) ₄₈ ao longo de 30 dias. Condições: 37 °C, pH 7,4.....	182
Figura 3.12. Espectros de MALDI-TOF resultantes do ensaio de degradação de TMP-[G#4]-19PEG _{1k} ao longo de 30 dias. Condições: 37 °C, pH 4,5.....	183
Figura 3.13. Espectros de MALDI-TOF resultantes do ensaio de degradação de TMP-[G#4]-19PEG ao longo de 30 dias. Condições: 37 °C, pH 7,4.....	184
Figura 3.14. Imagens de microscopia óptica do crescimento de Calu-3, utilizando-se DMEM como meio de cultura (20% FBS, 1% AB). Células incubadas a 37 °C, 5% CO ₂ . 10X e 20X representam a magnificação utilizada.....	187
Figura 3.15. Reação esquemática da transformação do reagente do ensaio MTT.....	189
Figura 3.16. Viabilidade de células Calu-3 determinada por ensaio MTT após incubação por 48 h com soluções contendo os compostos indicados. Células incubadas em meio de cultura sem FBS foram utilizadas como controle. Resultados denotam média $\pm$ s.d. (n=6).....	190
Figura 3.17. Viabilidade de células Calu-3 determinada por ensaio MTT após incubação por 48 h com soluções contendo os compostos indicados. Células incubadas em meio de cultura sem FBS foram utilizadas como controle. Resultados denotam média $\pm$ s.d. (n=6). * denota diferença estatística (p<0,05) em relação ao controle.....	191
Figura 3.18. Viabilidade de células Calu-3 determinada por ensaio MTT após incubação por 48 h com soluções contendo os compostos indicados. Células incubadas em meio de cultura sem FBS foram utilizadas como controle. Resultados denotam média $\pm$ s.d. (n=6). * denota diferença estatística (p<0,05) em relação ao controle.....	192
Figura 3.19. Viabilidade de células Calu-3 determinada por ensaio MTT após incubação por 48 h com soluções contendo os compostos indicados. Células incubadas em meio de cultura sem FBS foram utilizadas como controle. Resultados denotam média $\pm$ s.d. (n=6). * denota diferença estatística (p<0,05) em relação ao controle.....	193
Figura 3.20. Desenho esquemático de um epitélio pulmonar e dos tipos de transporte realizado através dessa barreira.....	195
Figura 3.21. Desenho esquemático de um <i>insert Transwell</i> ® contendo uma monocamada celular. Os eletrodos do tipo <i>chopstick</i> permitem a aquisição de dados referentes a TEER.....	196
Figura 3.22. Valores de TEER de cultura de Calu-3 ao longo de 25 dias. Desenho esquemático da formação da monocamada celular e seu reflexo no valor de TEER.....	197

- Figura 3.23.** Desenho esquemático do ensaio de transporte. Cada coluna da placa de 24 poços determina o tempo decorrido. Após a adição de solução contendo amostra o *insert* é movido a cada hora para uma nova posição. A cada alteração foram medidos os valores de TEER. O ensaio foi terminado após 5 h, sendo, então, efetuados ensaios de fluorescência nas soluções para a determinação da concentração de dendrímero em cada compartimento..... 198
- Figura 3.24. (a)** Transporte do compartimento apical para basolateral (A→B) de TMP-[G#3]-FITC, TMP-[G#4]-FITC, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k} através de monocamadas de células Calu-3 polarizadas em função do tempo (n=6). * denota diferença estatística (p<0,05) em relação ao controle, ♦ denota diferença estatística (p<0,05), ■ denota nenhuma diferença estatística (p<0,05). **(b)** Transporte do compartimento apical para basolateral (A→B) de TMP-[G#3]-FITC, TMP-[G#4]-FITC, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k} através de muco sintético em função do tempo (n=3). 50 nmol (equivalente de FITC) de dendrímeros foram utilizados para cada experimento..... 199
- Figura 3.25.** Permeabilidade aparente (P_{app}) de TMP-[G#3]-FITC, TMP-[G#4]-FITC, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k} através de monocamada de células Calu-3 polarizadas. P_{app} reportada após incubação por 5 h com soluções contendo as macromoléculas. Dados representam média ± s.d. (n=6). Soluções contendo 50 nmol (equivalente de FITC) em 1X HBSS foram adicionadas no compartimento apical. * denota diferença estatística (p<0,05) em relação ao controle..... 201
- Figura 3.26.** Variação da resistência elétrica transepitelial (TEER) da monocamada de células Calu-3 cultivada em *inserts* Transwell® (tamanho de poro – 0,4 µm) durante os ensaios de transporte (n=6) e após 72 horas depois de seu término, i.e. após a remoção das soluções contendo dendrímeros do compartimento apical. Foram utilizadas soluções contendo 50 nmol (equivalente de FITC) de dendrímeros. * denota diferença estatística (p<0,05) em relação ao controle, 202
- Figura 3.27.** Efeito da geração e PEGilação na porcentagem de macromolécula internalizada, determinada através de lisado celular de monocamadas de células Calu-3 (t= 5 h). Valores representam média ± s.d. (n=3). Não há diferença estatísticas entre os resultados..... 207
- Figura 3.28.** Internalização celular de TMP-[G#3]-FITC, TMP-[G#4]-FITC, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k} em células Calu-3 polarizadas em função do tempo, determinadas por citometria de fluxo. Resultados representam média ± s.d. (n=6)..... 209
- Figura 3.29.** Moléculas de HFA 227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluorpropano) e HPFP (1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-decafluorpentano)..... 212
- Figura 3.30.** Teste de estabilidade física de dendrímeros em HPFP, durante 4 horas. Materiais utilizados: TMP-[G#4]-(OH)₄₈, TMP-[G#4]-19PEG_{1k}, TMP-[G#4]-FITC, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k}..... 212
- Figura 3.31.** Representação esquemática do aparato *Andersen Cascade Impactor* (ACI) contando com 8 estágios mais filtro. Cada estágio permite a passagem de um tamanho de partícula e esta vinculado a um compartimento das vias aéreas..... 215
- Figura 3.32.** Propriedades do aerossol de formulação pMDI preparada com TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k}. Formulação contando com 1,5 mg de dendrímero por 1 mL de HFA-227 e 1%v/v de etanol, a 298 K, na pressão de saturação do propelente. AC, IP e F se referem a acionador, tubo de indução e filtro, respectivamente. Resultados demonstram média ± s.d. (n=4). No detalhe, estabilidade física da formulação pMDI durante 24 horas..... 216

Capítulo 4

Esquemas

Esquema 4.1. Estratégia sintética para obtenção de TMP-HYP-[G#2]-(OH) ₁₂ e posterior modificação para introdução de grupos -NH ₂ periféricos.....	232
--	-----

Tabelas

Tabela 4.1. Comparação entre resultados obtidos para diferentes nanopartículas impregnadas com Rh.....	238
---	-----

Figuras

Figura 4.1. Desenho esquemático de uma partícula metálica recoberta com sílica e contendo um dendron pendente. FG denota grupos funcionais.....	221
Figura 4.2. Espectros de ¹ H RMN dos materiais hiperramificados ao longo do procedimento de conjugação de glicina. São especificados os solventes deuterados utilizados em cada caso. Espectro de massas (ESI-TOF) do material final TMP-[G#2]-(Gly-NH ₂) _z	233
Figura 4.3. Reações de funcionalização da superfície de Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ , resultando no material recoberto com materiais hiperramificados, Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -HYP-(NH ₂) _z	234
Figura 4.4. Reação de fosfinação e posterior impregnação de nanopartículas de Rh-TOAB.....	235
Figura 4.5. FTIR das nanopartículas ao longo da modificação de seus grupos periféricos. FTIR obtidos pela impregnação do material sólido em pastilhas de KBr.....	235
Figura 4.6. Termogravimetria (Tg) das nanopartículas em diferentes etapas de derivatização. A esquerda, Tg de materiais derivatizados sem materiais hiperramificados, a direita, contando com esta derivatização. Valores destacados representam a porcentagem de massa perdida após a perda de água pelos materiais (perda de massa a partir de 250 °C).....	236
Figura 4.7. Reação de hidroformilação utilizando catalisador suportado.....	238

Estruturação da Tese

O presente trabalho foi planejado para buscar diversas aplicações de sistemas dendríticos em variados contextos. Dessa forma, ainda que as aplicações se distanciem devido a sua especificidade, todas apresentam como fundamento o uso de um polímero altamente especializado.

Buscando-se maior clareza, o presente texto foi dividido em 4 capítulos. Inicialmente é abordado o aspecto sintético deste tipo de material (Capítulo 1) sendo seguido de 3 outros capítulos em que são discutidas as modificações desses materiais-base e suas aplicações.

O Capítulo 2 aborda o trabalho realizado na tentativa de tornar estes novos materiais promissores para a sua aplicação na impregnação de fármacos utilizando scCO_2 como solvente. Para tanto, foram testadas algumas arquiteturas de macromoléculas, assim como diversos grupos periféricos. Tendo em vista o caráter apolar do scCO_2 e suas possíveis interações favoráveis com grupos carbonila, estes dois aspectos foram preponderantes nas alterações realizadas nos materiais. Esses ainda foram derivatizados com cadeias lineares de polilactato (PLA), gerando uma matriz insolúvel em meio aquoso, para obtenção de um dispositivo de liberação controlada de fármacos. Dessa forma, neste tópico foi objetivado a síntese de materiais CO_2 -fílicos, sendo por vezes insolúveis em meio aquoso. Esta etapa foi realizada em sua plenitude no laboratório do Prof. Dr. Reinaldo C. Bazito, orientador do projeto (GPQVA-IQ/USP).

O Capítulo 3 detalha a utilização de dendrímeros como candidatos a nanocarreadores para *Drug Delivery* endereçados para as vias aéreas. Dentro deste contexto, os materiais foram planejados para apresentar elevada solubilidade em água, para seu efetivo transporte e internalização em sistemas biológicos. Dessa forma, o uso

de cadeias de PEG visou à modulação das propriedades do material, assim como assegurar uma elevada solubilidade em água. Objetivou-se, ainda, materiais degradáveis e de baixa toxicidade frente as células utilizadas. Houve, também, modificações para possibilitar a utilização dessa classe de materiais em formulações do tipo aerossol (pMDI). Esta etapa foi realizada ao longo de 9 meses (durante Doutorado-Sanduiche) em Detroit-MI-USA, no laboratório pertencente ao Prof. Dr. Sandro R. P. da Rocha, co-orientador do projeto.

O Capítulo 4 se refere ao trabalho desenvolvido durante a colaboração entre os grupos de pesquisa do Prof. Dr. Reinaldo C. Bazito e da Prof. Dr. Liane M. Rossi (Laboratório de Nanomateriais e Catálise - IQ/USP). Neste projeto foi buscada a melhoria de performance de um catalisador de Rh em reações de hidroformilação. Dada a utilização do material, a perfeição estrutural não se mostrou necessária e assim foi utilizado um material hiperramificado, se valendo de sua síntese simplificada. O objetivo principal era a multiplicação de grupos amino terminais na nanopartícula, para possibilitar mais sítios de ligação para o catalisador. O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de ambos os professores do IQ-USP.

Capítulo 1. Polímeros Dendríticos: Síntese e Caracterização

1.1. Introdução

1.1.1. A Ascensão de Materiais Poliméricos

Polímeros sintéticos são macromoléculas tipicamente construídas pela interconexão de um elevado número de monômeros (unidades de construção). A introdução destes materiais na década de 1830 e seu desenvolvimento resultaram em diversas variações estruturais que acabaram por se tornar peças chave dos mais diversos produtos utilizados na sociedade contemporânea.

Na Figura 1.1 o diagrama esquemático mostra o desenvolvimento do campo de polímeros ao longo dos últimos 150 anos, iniciando a partir da origem de materiais plásticos e seguindo até novas perspectivas. A linha sólida representa a produção total de polímeros, enquanto a linha tracejada demonstra o aparecimento de novos polímeros no mercado global.(MASCIA; ACIERNO, 2012)

Figura 1.1. Diagrama esquemático de inovação e produção relacionada a ciência de polímeros ao longo dos últimos 150 anos (MASCIA; ACIERNO, 2012)

O marco, ao redor da década de 1920, inicia uma nova fronteira nas atividades de pesquisa, sendo que o termo “fundador da ciência de polímeros” recaiu sobre Staudinger(MÜLHAUPT, 2004) pela sua clarificação da natureza química de polímeros naturais e por estabelecer metodologias capazes de determinar o tamanho molecular. (MASCIA; ACIERNO, 2012; RINGSDORF, 2004)

Devido à elevada demanda de novos materiais, a ciência de polímeros, atualmente, se foca em buscar novas estratégias que possam resultar em polímeros funcionais com controle estrutural preciso.(WALTER; MALKOCH, 2012)

Historicamente, polímeros hiperramificados tiveram sua primeira menção por Flory em 1952,(FLORY, 1952) quando este descreveu teoricamente a condensação de monômeros AB_x (Figura 1.2) resultando em uma arquitetura altamente ramificada, estatisticamente polidispersa e contendo um elevado número de grupos periféricos.

Figura 1.2. Representação esquemática de monômeros com estrutura AB_x

Surpreendentemente, Flory assumiu que esta classe de polímeros não seria interessante, devido às suas propriedades limitadas como material estrutural. Contrariando a previsão de Flory e complementando a classe de polímeros lineares, polímeros com arquitetura ramificada e múltiplos grupos funcionais periféricos emergiram com potencial aplicação em diversos campos tecnológicos.(BAIG et al., 2015; FRÉCHET, 2003; NANJWADE et al., 2009)

Às três arquiteturas clássicas de macromoléculas, *i.e.* (I) Linear, (II) *Crosslinked*, e (III) Hiperramificada, se adicionou a nova classe: (IV) Dendrítica. (Figura 1.3)

Figura 1.3. Comparação entre as arquiteturas poliméricas

O termo dendrítico é derivado da palavra grega " $\delta\acute{\epsilon}\nu\delta\rho\omicron\nu$ ", a qual pode ser traduzida como "árvore". Por vezes, esta classe de materiais é designada como polímeros arbóreos.

Esta nova classe de materiais foi revisitada por Vögtle(BUHLEIER; WEHNER; VÖGTLE, 1978; VÖGTLE et al., 2009) em 1978, descrevendo a síntese de estruturas ramificadas de polipropileno-amina. A este estudo, se seguiram outros dois, em paralelo, em 1985: de Tomalia(TOMALIA et al., 1985) e de Newkome.(NEWKOME et al., 1985)

Atualmente, a família de polímeros dendríticos abrange diferentes tipos de arquitetura, incluindo tanto subclasses monodispersas (dendrons e dendrímeros), assim como polidispersas (polímeros hiperramificados e polímeros híbridos dendríticos-lineares). (Figura 1.4)

Figura 1.4. Representação esquemática das sub-classes de polímeros dendríticos (CARLMARK; MALMSTROM; MALKOCH, 2013)

Em meio ao elevado número de publicações sobre materiais dendriméricos (em pesquisa na plataforma *Scifinder*, (ACS, 2015) em 09/2015, o termo “*dendrimer*” aparece em mais de 22.000 publicações, se desconsiderando patentes), uma família de materiais de elevado destaque é aquela que se utiliza do ácido bis(metilol)propiónico (Bis-MPA) como unidade estrutural. (CARLMARK et al., 2013; ZHANG, 2011)

Figura 1.5. Evolução das estruturas poliméricas e estratégias sintéticas utilizando Bis-MPA (GARCÍA-GALLEGO; NYSTRÖM; MALKOCH, 2015)

Observa-se na Figura 1.5, partindo-se da esquerda para a direita: polímeros hiperramificados (*pseudo-one pot*), (JOHANSSON; MALMSTRÖM; HULT, 1993; MALMSTROEM; JOHANSSON; HULT, 1995) dendrímeros homofuncionais convergentes, (IHRE; HULT; SÖDERLIND, 1996) exponenciais duplos, (IHRE et al., 1998) divergentes, (IHRE; PADILLA DE JESÚS; FRÉCHET, 2001; MALKOCH; MALMSTRÖM; HULT, 2002) ortogonais, (ANTONI et al., 2007; ANTONI et al., 2010; MA, X. et al., 2013; MALKOCH et al., 2005; MONTAÑEZ et al., 2010; VIEYRES et al., 2010) híbridos dendrítico-lineares (macroiniciador, *graft-to* divergente e convergente, macromonômero); superfícies com dendrímeros suportados (fisissorção, *graft-to*, *graft-from*); di-dendrons heterofuncionais, (GILLIES; FRÉCHET, 2002; LEDIN et al., 2011; WALTER et al., 2011; WU, P. et al., 2005) dendrímeros heterofuncionais; (GOODWIN; LAM; FRÉCHET, 2007) polímeros alifáticos (VESTBERG et al., 2007) e policarbonatos alifáticos. (FENG; ZHUO; ZHANG, 2012).

1.1.2. Polímeros Dendriméricos

Dendrímeros são macromoléculas globulares, monodispersas, altamente ramificadas, tipicamente com tamanho entre 1 e 10 nm, que apresentam múltiplos grupos funcionais em sua periferia. Sua estrutura globular é resultado de sua arquitetura, na qual todas as ligações emergem radialmente a partir de um núcleo (ou ponto focal) e são dispostas de forma regular, camada a camada, em um padrão. (FRÉCHET, 2003) Cada uma dessas camadas é chamada de geração, enquanto que cada “braço” que converge de um ponto focal é tido como um dendron. (WU, L.-P. et al., 2015) (Figura 1.6)

Figura 1.6. Desenho esquemático de um dendrímero e possíveis aplicações. **A-** Regiões de um dendrímero; **B-** Dendrímero utilizado para encapsulamento de fármaco, **C-** Dendrímero conjugado com outras moléculas (WU, L.-P. et al., 2015)

Dendrímeros são, usualmente, sintetizados através de sucessivas etapas de crescimento e ativação dos seus grupos periféricos. Devido à sua natureza livre de falhas, tal processo sintético requer o uso de reações orgânicas robustas, que continuem efetivas ainda que atingido o nível macromolecular. As duas principais categorias de síntese são: Crescimento Divergente e Crescimento Convergente. (Figura 1.7)

Figura 1.7. Representação esquemática das estratégias de crescimento de um dendrímero (CARLMARK et al., 2013)

1.1.3. Crescimento Divergente

As primeiras publicações de síntese de dendrímeros empregaram a estratégia de crescimento divergente. (BUHLEIER et al., 1978; NEWKOME et al., 1985; TOMALIA et al., 1985) Nesta, o crescimento do dendrímero ocorre a partir de um núcleo multifuncional, N_m ($m \geq 2$), sendo o monômero utilizado do tipo AB_x ($x \geq 2$). Em um primeiro momento, a funcionalidade **B** se encontra protegida, permitindo, assim, o crescimento controlado. Dessa forma, a reação entre o núcleo e o monômero permite a formação de uma única camada ao redor do núcleo (G1). Esta nova molécula é então isolada, tendo a funcionalidade **B** desprotegida/ativada, deixando o material pronto para mais uma etapa de crescimento. Estes ciclos de crescimento e ativação são, então, repetidos até obtenção da geração desejada. Ao final, o material resultante conta com múltiplos grupos periférico que podem ser utilizados para pós-funcionalização. O contraponto desta estratégia sintética é a grande dificuldade de se separar materiais perfeitos daqueles que contam com algum grau de imperfeição. Isto se torna mais

pronunciado à medida que o material cresce e a reação se torna mais difícil, frente ao impedimento entre os grupos periféricos do material.

1.1.4. Crescimento Convergente

Na década de 1990, Hawker e Fréchet introduziram a síntese se valendo de uma abordagem convergente.(HAWKER, CRAIG J.; FRECHET, 1990) Neste método são sintetizados dendrons perfeitos que após atingirem o tamanho desejado são unidos pela molécula do núcleo, sendo o crescimento do dendron efetuado por qualquer uma das estratégias (convergente/divergente). Esta metodologia permite o melhor controle do crescimento do dendron, permitindo um material final virtualmente livre de falhas. No entanto, o elevado impedimento para reação no ponto focal, torna a reação com o núcleo um momento crítico da síntese, podendo resultar em uma baixa eficiência do método.

1.1.5. Polímeros Hiperramificados

Polímeros Hiperramificados (*Hyperbranched Polymers* - HBPs) ao longo dos anos ficaram conhecidos por serem uma alternativa mais fácil e barata, frente a outras arquiteturas de maior complexidade. Em contraste aos repetitivos e demorados protocolos sintéticos para obtenção de um material monodisperso, livre de falhas, a síntese de polímeros hiperramificados, por vezes, é baseada em reações do tipo *one-pot*, sem necessidade de purificação. As propriedades de polímeros hiperramificados, ainda que estes sejam polidispersos, são similares às de polímeros de arquitetura definida. O

elevado grau de ramificação não permite a aglomeração das cadeias, além de resultar em baixo ponto de fusão e baixa viscosidade.(CARLMARK et al., 2013)

Esquema 1.1. Reação *Pseudo-One Pot* para síntese de polímero hiperramificado (CARLMARK et al., 2013)

A reação é tida como *pseudo-one pot* (Esquema 1.1) por fazer uso da adição em etapas do monômero, porém sem alteração das demais condições reacionais. Uma vez que o material não se mostra perfeitamente estruturado, sua nomeação é dada por Pseudo-Gerações. Dessa forma, os materiais são sintetizados objetivando-se uma Pseudo-Geração, o que é estimado pela quantidade de monômero adicionado.

1.1.6. Nomenclatura de Dendrímeros

Ainda que a nomenclatura de polímeros, ao longo dos anos, tenha se aperfeiçoado para contemplar o maior número de arquiteturas,(HIORNS; BOUCHER; DUHLEV, 2012) materiais dendríticos ainda sofrem por carecer de uma maneira eficiente de serem nomeados. As publicações relacionadas ao tema, apesar de racionalizar o processo de nomeação, ainda apresentam um resultado muito distante de um sistema conveniente, ou mesmo de fácil compreensão.(FRIEDHOFEN; VOGTLE, 2006; NEWKOME et al., 1993)

Atualmente, ainda se faz necessária a definição sobre terminologias universais, uma vez que dendrímeros de maior expressão no cenário científico, como PAMAM, ainda são alvo de refinamento no tocante à sua nomenclatura.(KESHARWANI; TEKADE; JAIN, 2015)

Buscando maior clareza e simplicidade, neste trabalho optou-se pela adaptação da nomenclatura utilizada por Malkoch,(MALKOCH et al., 2002) sendo estruturada como mostrado na Figura 1.8.

Figura 1.8. Metodologia para nomenclatura dos materiais dendrímeros

No caso de materiais hiperramificados, foi adicionada a terminologia [HYP] para sua apropriada identificação. Se valendo do exemplo mostrado na Figura 1.8, o material hiperramificado de mesma "geração" seria nomeado: TMP-[HYP]-[G#3]-(OH)₂₄. Ainda que o material não seja perfeito, a quantidade de grupos -OH será discriminada baseada na quantidade esperada de uma geração perfeita.

1.2. Objetivos

Os objetivos desta etapa contemplaram a síntese e a caracterização de materiais dendríticos de diferentes gerações (G1 a G4) e arquiteturas (com núcleos de trimetilpropano - TMP e 1,12-Dodecanodiol - DDD).

1.3. Procedimentos Experimentais

1.3.1. Preparação do Ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico (Bis-MPA-protetido) (1.1)

Bis-MPA (10,0 g, 74,6 mmol); 13 mL (11,8 mmol) de 2,2-dimetoxipropano e 0,7 g (3,7 mmol) de ácido *p*-toluenossulfônico monoidratado foram dissolvidos em 50 mL de acetona (seca). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 2 h à temperatura ambiente. Após este período, o catalisador foi neutralizado com a adição de aproximadamente 1 mL de uma solução NH₃/EtOH (50:50 em volume), sendo o solvente, posteriormente, evaporado à temperatura ambiente sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em 250 mL de CH₂Cl₂ e a fase orgânica lavada com duas porções de 20 mL de água, secada com MgSO₄ e evaporada para resultar em **1.1**.

(1.1)

Rendimento: 82%
Sólido branco

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1,24 (s, 3H, -CH₃); 1,45 (s, 3H, -CH₃); 1,48 (s, 3H, -CH₃); 3,70 (d, 2H, -CH₂O, J_{gem.} = 12Hz); 4,23 (d, 2H, -CH₂O, J_{gem.} = 12Hz); 10,9 (s, 1H, -OH)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, ppm): δ 18,5; 22,0; 25,2; 41,8; 68,9; 98,4; 180,4

CG-MS *m/z* = 159

1.3.2. Preparação do Anidrido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico (**1.2**)

A uma suspensão do ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico (**1.1**) (10 g, 57 mmol, 2 eqv.) em 30 mL de CH_2Cl_2 adicionou-se uma solução de 1,3-dicicloexilcarbodiimida (DCC) (5,9 g, 29 mmol, 1 eqv.) em 10 mL de CH_2Cl_2 . A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 4 h. O subproduto dicicloexilureia (DCU) foi filtrado em funil de vidro sinterizado e lavado com pequena quantidade de CH_2Cl_2 . O solvente foi evaporado e o resíduo foi ressuspenso em AcOEt. A DCU residual foi, então, removida por filtração em funil de vidro sinterizado. O filtrado foi evaporado resultando em **1.2**.

(**1.2**)
Rendimento: 92%
Óleo viscoso

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,24 (s, 6H, $-\text{CH}_3$); 1,40 (s, 6H, $-\text{CH}_3$); 1,44 (s, 6H, $-\text{CH}_3$); 3,69 (d, 4H, $-\text{CH}_2\text{O}$, $J_{\text{gem.}} = 12\text{Hz}$); 4,22 (d, 4H, $-\text{CH}_2\text{O}$, $J_{\text{gem.}} = 12\text{Hz}$)

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 17,6; 21,6; 25,4; 43,6; 65,7; 98,4; 169,5

CG-MS m/z = 315

Análise Elementar: Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7$: C-58,17; H-7,93; N-0,00. Encontrado: C-57,84; H-8,08; N-0,68

1.3.3. Preparação de *p*-toluenossulfonato de 4-(dimetilamino)piridínio (DPTS) (**1.3**)

Ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TSA) (7,78 g, 40,92 mmol; 1 eqv.) foi secado por destilação azeotrópica de uma solução em benzeno utilizando-se um Dean-Stark. Uma solução equimolar de 4-(dimetil)aminopiridina (DMAP) (5,00 g, 40,92 mmol; 1 eqv.) em benzeno quente foi então adicionada lentamente à solução anidra de *p*-TSA. A suspensão

resultante foi, então, esfriada à temperatura ambiente e o sólido coletado por filtração a vácuo. O produto cru foi purificado por recristalização a partir de 1,2-dicloroetano seco, resultando em **1.3**.

(1.3)

Rendimento: 75%

Cristais Brancos

¹H NMR (200 MHz, D₂O, ppm): δ 2,29 (s, 3H, -CH₃); 3,09 (s, 6H, -CH₃); 6,73 (d, 2H, -CH₂, J_{gem}= 6Hz); 7,25 (d, 2H, -CH₂, J_{gem}= 8Hz); 7,58 (d, 2H, -CH₂, J_{gem}= 8Hz); 7,88 (d, 2H, -CH₂, J_{gem}= 8Hz)

¹³C NMR (50 MHz, D₂O, ppm): δ 19,8; 38,5; 105,8; 124,6; 128,5; 137,2; 139,3; 141,0; 156,2

Ponto de fusão: 172 °C

Análise Elementar: Calculado para C₁₄H₁₈N₂O₃S: C-57,12; H-6,16; N-9,52. Encontrado: C-56,92; H-6,13; N-9,54

1.3.4. Preparação da Primeira Geração do Dendrímero Protegido por Acetonida (TMP-[G#1]-Acetonida) (1.4)

Ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico **1.1** (3,26 g, 18,7 mmol, 3,1 eqv.), 2-etil-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (TMP) (0,8 g, 6 mmol, 1 eqv.) e DPTS **1.3** (1,05 g, 3,6 mmol, 1,7 equiv.) foram misturados em 20 mL de CH₂Cl₂ (seco). Uma solução de DCC (4,6 g, 22,3 mmol, 4 eqv.) em 10 mL de CH₂Cl₂ foi adicionada e a mistura reacional foi agitada a 25 °C por 15 h. Os produtos secundários, DCU e excesso de catalisador foram removidos por filtração. A evaporação do CH₂Cl₂ resultou no produto cru, que foi purificado em coluna cromatográfica utilizando-se sílica-gel, sendo a eluição efetuada

inicialmente com hexano e gradualmente aumentando-se a polaridade até 25:75 (em volume) de AcOEt/Hex, resultando em **1.4**.

(1.4)

Rendimento: 87%

Óleo Amarelado

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ 0,93 (t, 3H, -CH₃, J= 6 Hz); 1,15 (s, 6H, -CH₃); 1,36 (s, 6H, -CH₃); 1,43 (s, 6H, -CH₃); 1,62 (q, 2H, -CH₂, J= 8Hz); 3,65 (d, 6H, -CH₂, J_{gem}= 10Hz); 4,15 (s, 6H, -CH₂); 4,18 (d, 6H, -CH₂, J_{gem}= 14Hz)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, ppm): δ 7,2; 18,3; 21,5; 22,5; 25,4; 41,7; 42,0; 63,3; 65,9; 97,9; 173,6

EMAR-ESI: Calculado para [C₃₀H₅₀O₁₂ + Na]⁺ = 625,7006 Encontrado= 625,3224

1.3.5. Procedimento Geral para Desproteção do Grupo Acetonida: TMP-[G#1]-(OH)₆ (**1.5**)

Aproximadamente 2 g de resina DOWEX® 50WX2 foram adicionadas a uma solução de TMP-[G#1]-Acetonida **1.4** (2,00 g, 3,32 mmol) em 50 mL de metanol. A mistura foi agitada a 35 °C e a desproteção foi acompanhada por ¹³C NMR até o desaparecimento de picos característico do grupo acetonida (carbono quaternário em ~98 ppm, por exemplo). Uma vez que a reação foi completada, a resina foi filtrada e lavada com metanol. O filtrado foi evaporado resultando em **1.5**.

(1.5)

Rendimento: 97%

Sólido branco

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 0,83 (t, 3H, -CH₃, J= 8Hz); 1,03 (s, 9H, -CH₃); 1,45 (q, 2H, -CH₂, J= 8Hz); 3,45 (hept, 12H, -CH₂, J= 6Hz); 3,96 (s, 6H, -CH₂); 4,67 (t, 6H, -OH, J= 4Hz)

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 7,9; 17,3; 23,4; 41,4; 50,9; 63,8; 64,3; 174,8

EMAR-ESI: Calculado para [C₂₁H₃₈O₁₂ + H]⁺ = 483,5192 Encontrado= 483,2445

1.3.6. Procedimento Geral para Esterificação através de Acoplamento de Anidrido: TMP-[G#2]-Acetonida (**1.6**)

TMP-[G#1]-(OH)₆ **1.5** (2,71 g, 5,80 mmol, 34,08 mmol/grupo -OH; 1 eqv.) e DMAP (0,638 g, 5,22 mmol, 0,15 eqv./grupo-OH) foram dissolvidos em 14,0 mL (5 eqv./grupo-OH) de piridina a temperatura ambiente. Uma solução de anidrido 2,2,5-metil-1,3-dioxano-5-carboxílico **1.2** (14,96 g, 45,28 mmol, 1,3 eqv./grupo-OH) em 42 mL de CH₂Cl₂ foi adicionada à mistura reacional. A reação foi agitada durante 24 h à temperatura ambiente. O excesso de anidrido foi consumido pelo acréscimo de *ca.* de 3 mL de água sob forte agitação, durante 6 h. A mistura reacional foi diluída com 500 mL de CH₂Cl₂ e extraída com uma solução 10% m/m de NaHSO₄ (3 x 60 mL), 10% m/m de Na₂CO₃ (10 x 60 mL), e solução saturada de NaCl (1 x 60 mL). A fase orgânica foi secada (MgSO₄), filtrada, concentrada e purificada em coluna cromatográfica com sílica-gel. A eluição inicialmente foi efetuada com hexano e a polaridade do eluente aumentada gradualmente até a obtenção de 40:60 AcOEt:Hex (em volume), resultando em **1.6**.

(**1.6**)

Rendimento: 87%
Óleo Amarelado

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,91 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J = 8\text{Hz}$); 1,14 (s, 18H, $-\text{CH}_3$); 1,29 (s, 9H, $-\text{CH}_3$); 1,35 (s, 18H, $-\text{CH}_3$); 1,42 (s, 18H, $-\text{CH}_3$); 1,50 (q, 2H, $-\text{CH}_2$, $J = 4\text{Hz}$); 3,62 (d, 12H, $-\text{CH}_2$, $J_{\text{gem.}} = 12\text{Hz}$); 4,08 (slargo, 6H, $-\text{CH}_2$); 4,15 (d, 12H, $-\text{CH}_2$, $J_{\text{gem.}} = 12\text{Hz}$); 4,34 (s, 12H, $-\text{CH}_2$)

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7,5; 17,7; 18,5; 22,0; 25,2; 41,5; 42,1; 46,9; 63,9; 64,8; 65,9; 98,1; 171,9; 173,5

EMAR-ESI: Calculado para $[\text{C}_{69}\text{H}_{110}\text{O}_{30} + \text{Na}]^+ = 1442,5835$ Encontrado = 1441,7004

1.3.7. Preparação de $\text{TMP-[G\#2]-(OH)}_{12}$ (1.7)

TMP-[G#2]-Acetonida **1.6** (2,0 g, 1,41 mmol), *ca.* 2 g de resina DOWEX 50WX2 e 50 mL de MeOH foram colocados para reagir de acordo com o procedimento geral de desproteção, resultando em **1.7**.

(1.7)
Rendimento: 96%
Sólido branco

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 0,83 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J = 8\text{Hz}$); 1,01 (s, 18H, $-\text{CH}_3$); 1,18 (s, 9H, $-\text{CH}_3$); 1,42 (q, 2H, $-\text{CH}_2$); 3,41-3,45 (m, 24H, $-\text{CH}_2$); 4,04 (s, 6H, $-\text{CH}_2$); 4,14 (s, 12H, $-\text{CH}_2$); 4,66 (t, 12H, $-\text{OH}$, $J = 6\text{Hz}$)

^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 7,3; 16,8; 17,3; 22,4; 41,0; 46,4; 50,3; 63,7; 64,5; 172,0; 174,1

EMAR-ESI: Calculado para $[\text{C}_{51}\text{H}_{86}\text{O}_{30} + \text{Na}]^+ = 1202,2002$ Encontrado = 1201,5089

1.3.8. Preparação de TMP-[G#3]-Acetonida (1.8)

TMP-[G#2]-(OH)₁₂ **1.7** (2,0 g, 1,69 mmol), DMAP (0,373 g, 3,05 mmol), 8,2 mL de piridina, 25 mL de CH₂Cl₂ e anidrido 2,2,5-metil-1,3-dioxano-5-carboxílico **1.2** (8,74 g, 26,46 mmol) foram colocados para reagir de acordo com o procedimento geral de esterificação para gerar um resíduo que foi purificado em coluna cromatográfica com sílica-gel, utilizando inicialmente hexano como eluente e aumentando-se a polaridade até 50:50 AcOEt:Hex (em volume), resultando em **1.8**.

(1.8)

Rendimento: 85%

Óleo amarelado

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 0,95 (t, 3H, -CH₃); 1,14 (s, 36H, -CH₃); 1,28 (slargo, 27H, -CH₃); 1,35 (s, 36H, -CH₃); 1,41 (s, 36H, -CH₃); 3,62 (d, 24H, -CH₂, J_{gem}=12Hz); 4,16 (m, 30H, -CH₂); 4,32 (m, 36H, -CH₂)

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 7,4; 17,4; 17,6; 18,4; 21,9; 25,1; 41,4; 41,9; 46,7; 64,0; 64,7; 65,3; 65,8; 97,9; 171,5; 171,7; 173,4

EMAR-ESI: Calculado para [C₁₄₇H₂₃₀O₆₆ + Na]⁺ = 3074,4539 Encontrado = 3075,4566

1.3.9. Preparação de TMP-[G#3]-(OH)₂₄ (1.9)

TMP-[G#3]-Acetonida **1.8** (2,0 g, 0,66 mmol), *ca.* 2 g de resina DOWEX 50WX2 e 50 mL de MeOH foram colocados para reagir de acordo com o procedimento geral de desproteção, resultando em **1.9**.

(1.9)

Rendimento: 98%

Sólido branco

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 0,85 (t, 3H, -CH₃); 1,01 (s, 36H, -CH₃); 1,19 (slargo, 27H, -CH₃); 1,35 (s, 36H, -CH₃); 3,41-3,44 (m, 48H, -CH₂); 4,12-4,22 (m, 36H, -CH₂); 4,63 (t, 24H, -OH)

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 7,3; 16,7; 17,2; 20,7; 41,0; 46,3; 46,4; 50,3; 63,7; 64,4; 65,3; 171,6; 171,9; 174,1

EMAR-ESI: Calculado para [C₁₁₁H₁₈₂O₆₆ + Na]⁺ = 2594,0777 Encontrado = 2595,0841

1.3.10. Preparação de TMP-[G#4]-Acetonida (1.10)

TMP-[G#3]-(OH)₂₄ (2,00 g, 0,78 mmol), DMAP (0,34 g, 2,80 mmol), 7,52 mL (93,30 mmol) de piridina, 23 mL de CH₂Cl₂ e anidrido 2,2,5-metil-1,3-dioxano-5-carboxílico **1.2** (8,01 g, 26,26 mmol) foram colocados para reagir de acordo com o procedimento geral de esterificação para gerar um resíduo que foi purificado em coluna cromatográfica com sílica-gel, utilizando inicialmente hexano como eluente e

aumentando-se a polaridade até 80:20 AcOEt:Hex (em volume), resultando em um óleo viscoso incolor **1.10**.

(1.10)

Rendimento: 75%
Óleo Viscoso Incolor

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,88 (t, 3H, $-\text{CH}_3$); 1,16 (s, 36H, $-\text{CH}_3$); 1,26 (s, 36H, $-\text{CH}_3$); 1,29 (s, 18H, $-\text{CH}_3$); 1,32 (s, 9H, $-\text{CH}_3$); 1,36 (s, 72H, $-\text{CH}_3$); 1,43 (s, 72H, $-\text{CH}_3$); 3,65 (d, 48H, $-\text{CH}_2$, $J_{\text{gem.}} = 12\text{Hz}$); 4,14 (s, 64H, $-\text{CH}_2$); 4,19 (d, 48H, $-\text{CH}_2$); 4,33 (s, 12H, $-\text{CH}_2$)

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7,4; 14,1; 17,5; 17,6; 18,4; 20,9; 21,9; 25,1; 41,9; 46,5; 46,7; 64,6; 65,0; 65,8; 65,8; 97,9; 170,9; 171,31; 171,7; 173,3

EMAR-ESI: Calculado para $[\text{C}_{303}\text{H}_{470}\text{O}_{138} + \text{Na}]^+ = 6342,9751$ Encontrado = 6342,9755

1.3.11. Preparação de TMP-[G#4]-(OH)₄₈ (1.11)

Cerca de 2 g de resina DOWEX 50WX2 foram adicionadas em uma solução contendo TMP-[G#4]-Acetonida **1.10** (2,00 g, 0,32 mmol) em 50 mL de metanol. A mistura foi agitada a 35 °C por 24 horas. Uma vez terminada a reação, a resina foi filtrada e lavada com metanol. O filtrado foi evaporado para gerar **1.11**.

(1.11)

Rendimento: 90%

Sólido branco

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 0,82 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 0,98 (s, 72H, $-\text{CH}_3$); 1,14-1,20 (m, 63H, $-\text{CH}_3$); 3,38-3,45 (m, 96H, $-\text{CH}_2$); 4,06-4,18 (m, 84H, $-\text{CH}_2$); 4,58 (s, 48H, $-\text{OH}$)

^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 7,2; 16,7; 17,0; 17,3; 46,5; 46,1; 46,2; 46,3; 50,2; 63,7; 64,3; 65,0; 171,4; 171,5; 171,9; 174,0

MALDI-TOF: Calculado para $[\text{C}_{231}\text{H}_{374}\text{O}_{138} + \text{Na}]^+ = 5382,362$ Encontrado = 5387,018

1.3.12. Preparação de DDD-[G#I]-Acetonida (1.12)

1,12-dodecanodiol (DDD) (1,80 g, 18,7 mmol), DPTS **1.3** (1,05 g, 9,0 mmol) e ácido 2,2,5-trimetil-1,3-dioxano-5-carboxílico **1.1** foram adicionados a 120 mL de CH_2Cl_2 , sendo a mistura reacional agitada a 30 °C até a solubilização do diol. Foi, então, adicionada uma solução contendo DCC (4,6 g, 22,3 mmol) em 15 mL de CH_2Cl_2 , agitando-se a mistura obtida por 24 h. O subproduto formado, DCU, foi filtrado e a fase orgânica concentrada. O resíduo obtido foi purificado em coluna cromatográfica com sílica-gel eluindo-se com uma mistura 80:20 Hex:AcOEt (em volume), resultando em **1.12**.

(1.12)

Rendimento: 71%

Óleo amarelo

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ 1,20 (s, 6H, -CH₃); 1,26 (slargo, 16H, -CH₂); 1,39 (s, 6H, -CH₃); 1,43 (s, 6H, -CH₃); 1,65 (quint., 4H, -CH₂); 3,64 (d, 4H, -CH₂, J= 12Hz); 4,12 (d, 4H, -CH₂, J= 6Hz); 4,19 (d, 4H, -CH₂, J_{gem.}= 12Hz)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, ppm): δ 18,6; 22,9; 24,2; 25,7; 28,5; 29,1; 29,4; 41,7; 64,9; 65,9; 97,9; 174,2

EMAR-ESI: Calculado para [C₂₈H₅₀O₈ + Na]⁺ = 537,6816 Encontrado = 537,3397

1.3.13 Preparação de DDD-[G#1]-OH₄ (1.13)

DDD-[G#1]-Acetonida **1.12** (2,0 g, 3,89 mmol), *ca.* 2 g de resina DOWEX 50WX2 e 50 mL de MeOH foram colocados para reagir de acordo com o procedimento geral de desproteção, resultando em **1.13**.

(1.13)
Rendimento: 92%
Óleo amarelo

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 1,03 (s, 6H, -CH₃); 1,25 (slargo, 16H, -CH₂); 1,53 (quint., 4H, -CH₂, J= 6Hz); 3,44 (hept., 8H, -CH₂, J= 6Hz); 3,97 (t, 4H, -CH₂, J= 6Hz); 4,63 (t, 4H, -OH, J= 6Hz)

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 17,1; 25,7; 28,4; 29,1; 29,3; 49,1; 65,1; 67,4; 175,9

EMAR-ESI: Calculado para [C₂₂H₄₂O₈ + Na]⁺ = 457,2778 Encontrado = 457,2773

1.3.14. Preparação de DDD-[G#2]-Acetonida (1.14)

DDD-[G#1]-(OH)₄ **1.13** (2,54 g, 5,85 mmol), DMAP (0,43 g, 3,51 mmol), 9,42 mL de piridina, 28,3 mL de CH₂Cl₂ e anidrido 2,2,5-metil-1,3-dioxano-5-carboxílico **1.2** (10,06 g, 30,44 mmol) foram colocados para reagir de acordo com o procedimento geral de esterificação para gerar um resíduo que foi purificado em coluna cromatográfica com

sílica-gel, utilizando inicialmente hexano como eluente, aumentando-se a polaridade até 50:50 AcOEt:Hex (em volume). Resultando em um óleo viscoso incolor **1.14**.

(1.14)

Rendimento: 74%
Óleo viscoso incolor

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,16 (s, 12H, $-\text{CH}_3$); 1,26 (slargo, 12H, $-\text{CH}_2$); 1,29 (s, 6H); 1,36 (s, 12H, $-\text{CH}_2$); 1,42 (s, 12H, $-\text{CH}_2$); 1,64 (s, 8H, $-\text{CH}_2$); 3,63 (d, 8H, $J_{\text{gem.}} = 12\text{Hz}$); 4,09 (d, 4H, $-\text{CH}_2$, $J = 6\text{Hz}$); 4,15 (d, 8H, $-\text{CH}_2$, $J_{\text{gem.}} = 12\text{Hz}$); 4,32 (s, 8H, $-\text{CH}_2$)

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 17,7; 18,5; 22,3; 24,8; 25,8; 28,5; 29,2; 29,5; 41,9; 46,7; 65,3; 65,9; 98,1; 172,6; 173,5

EMAR-ESI: Calculado para $[\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{O}_{20} + \text{Na}]^+ = 1081,5924$ Encontrado = 1081,5921

1.3.15. Preparação de DDD-[G#2]-(OH)₈ (1.15)

Cerca de 2 gramas de resina DOWEX 50WX2 foram adicionadas a uma solução contendo DDD-[G#2]-Acetonida **1.14** (2,00 g, 1,89 mmol) em 70 mL de metanol. A mistura foi agitada a 35 °C por 24 horas. Uma vez terminada a reação, a resina foi filtrada e lavada com metanol. O solvente foi evaporado para gerar um sólido branco **1.15**.

(1.15)

Rendimento: 95%
Sólido branco

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 1,01 (s, 12H, -CH₃); 1,17 (s, 6H, -CH₃), 1,24 (slargo, 16H, -CH₂); 1,51-1,57 (m, 4H, -CH₂); 4,04 (t, 4H, -CH₂, J= 8Hz); 4,11 (s, 8H, -CH₂); 4,63 (t, 8H, -OH, J= 6Hz)

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 17,4; 18,4; 21,2; 29,8; 30,4; 30,7; 30,8; 47,9; 51,9; 65,9; 66,6; 174,7; 176,1

EMAR-ESI: Calculado para [C₄₂H₇₄O₂₀ + Na]⁺= 921,4672 Encontrado= 921,4668

1.3.16. Preparação de TMP-HYP-[G#2]-(OH)₁₂ (1.16)

TMP (0,75g, 5,55 mmol) e *p*-TSA (33,6 mg, 0,5 % m/m referente a Bis-MPA) foram misturados em um balão de quatro bocas equipado com uma válvula permitindo a entrada de N₂ seco no vaso reacional, um tubo secante, um agitador mecânico e um funil de adição de sólidos. O vaso reacional foi colocado em um banho de óleo previamente aquecido a 140 °C. A mistura foi mantida, então, sob um vigoroso fluxo de N₂. Com auxílio de um funil de adição de sólidos, Bis-MPA (6,71 g, 50 mmol - estequiometricamente referente a uma segunda geração perfeita) foi adicionado em porções à mistura. O fluxo de N₂ (para remoção de vapor de água formado) e agitação foram mantidos ao longo de toda reação. Após 2 horas de adição, o vaso reacional foi selado e conectado a uma linha de pressão reduzida (12 mmHg) *overnight*. Posteriormente, a pressão foi equalizada a ambiente resultando no material **1.16**.

(1.16)

Rendimento: 90%
Óleo viscoso

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 0,82 (t, 3H, -CH₃); 1,02 (s, 20H, -CH₃); 1,07 (s, 36H, -CH₃); 1,17 (s, 12H, -CH₃); 3,42-3,48 (m, 52H, -CH₂); 4,06-4,12 (m, 38H, -CH₂); 4,62 (s, 12H, -OH); 4,94 (s, 11H, -OH)

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 7,3; 16,8; 17,3; 22,4; 41,0; 46,4; 50,3; 63,7; 64,5; 172,0; 174,1

1.4. Resultados e Discussão

1.4.1. Síntese de Dendrímeros

A síntese de materiais dendriméricos utilizando o monômero Bis-MPA como bloco de construção demanda reações eficientes de esterificação. Embora haja diversas estratégias para tal reação e diversos reagentes de acoplamento, optou-se pelo uso combinado de um agente de acoplamento usual (DCC) e da elevada reatividade de anidridos.

A necessidade do controle exato da reação para a adição, camada a camada, de monômeros exige que estes tenham suas funcionalidades -OH protegidas durante as etapas de esterificação. Para tanto, foi utilizado o grupo acetonida, que demanda condições brandas de desproteção (meio ácido). Para tornar este processo de menor complexidade e agregar conveniência à síntese, optou-se pelo uso de uma resina de troca iônica na forma ácida (DOWEX® 50WX2 - *strong acid*), permitindo assim, um fácil isolamento do material ao final da etapa, sem requerer uma purificação adicional.

Objetivou-se a síntese de duas classes de materiais de arquiteturas bem distintas, uma partindo de um triol (TMP), buscando-se uma estruturação globular e outra usando um diol (DDD) com uma longa cadeia de grupos -CH₂, que apresentaria um formato dependente da flexibilidade desta cadeia do núcleo (Esquema 1.2).

Esquema 1.2. Síntese divergente de dendrímeros com núcleo de TMP (I) e DDD (II)

Dentre os agentes de acoplamento, o DCC se mostra um reagente com características favoráveis, pois após atuar na reação há a formação de uma ureia pouco solúvel em grande parte dos solventes orgânicos. A precipitação desta ureia favorece a reação, deslocando o equilíbrio, e permite sua fácil remoção do meio.

Ainda que se mostrasse possível o uso de um agente de acoplamento para a reação de crescimento do dendrímero, essa estratégia foi descartada, pois, à medida que o material aumenta de geração, passa a ser necessária uma grande quantidade de reagentes para a reação com a totalidade dos grupos terminais do dendrímero. O uso de DCC resultaria em uma grande quantidade de ureia ao final da reação, com a presença de uma grande quantidade de sólido no meio reacional, dificultando severamente tanto o processo da reação, como a etapa de purificação ao final do processo.

Contornando-se esta estratégia sintética, optou-se pela utilização do anidrido do monômero (Esquema 1.3). Ainda que haja a perda de considerável quantidade do material de partida (Bis-MPA acetônida), após a reação com o grupo -OH, o uso de anidrido resulta em subprodutos de mais fácil remoção. O ácido formado pode ser facilmente removido por extrações líquido-líquido e por cromatografia em coluna de sílica.

Esquema 1.3. Síntese de anidrido de Bis-MPA utilizando-se DCC

A presença de água no meio reacional pode ser um grande entrave à reação, uma vez que a nucleofilicidade de grupos -OH e da água são comparáveis e o meio reacional conta com uma espécie de elevada reatividade (carbono eletrofílico presente no anidrido). Isso torna necessário o tratamento preventivo de solventes e reagentes para eliminação de água.

A estequiometria dos reagentes na etapa de esterificação também se mostra fundamental para a obtenção de resultados satisfatórios. Adotou-se a seguinte estequiometria, seguindo-se metodologias previamente publicadas: (MALKOCH et al., 2002) 1 eqv. Grupos -OH ; 5 eqv. piridina; 0,15 eqv. DMAP; 1,3 eqv. anidrido; solvente CH_2Cl_2 (3 x volume de piridina). Usa-se excesso de anidrido para assegurar a reação da totalidade dos grupos -OH , mesmo no caso de haver água residual no meio reacional. A utilização de piridina, além do viés catalítico, também se faz necessária para alterar a polaridade do meio, de modo a dissolver o poliol reagente.

Uma vez estabelecido o protocolo sintético e se efetuando purificações criteriosas, os materiais foram sintetizados, resultando em dendrímeros de geração 2, 3 e 4 para o núcleo de TMP e geração 2 para o núcleo de DDD.

A caracterização dos materiais se deu pela análise de espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN e espectrometria de massas (EMAR-ESI/ MALDI-TOF).

1.4.2. Caracterização dos Materiais Dendríméricos

As propriedades de materiais dendríméricos estão estritamente ligadas à perfeição estrutural do material. A avaliação dos materiais se valeu da combinação da determinação da massa da macromolécula com a estrutura elucidada pela espectroscopia de RMN.

Figura 1.9. Espectros de ^1H RMN de (A) TMP-[G#4]-Acetonida e TMP-[G#4]-(OH)₄₈; (B) DDD-[G#2]-Acetonida e DDD-[G#2]-(OH)₈ *denota sinal residual do solvente e/ou de H₂O. Espectros em vermelho foram obtidos utilizando-se CDCl₃ como solvente, enquanto espectros pretos foram obtidos utilizando DMSO-*d*₆

Através dos espectros de ^1H RMN é possível quantificar a presença de novos grupos a cada camada de crescimento (geração), comparando-se a integração de grupos constituintes do núcleo, com a de grupos específicos do monômero adicionado, como os hidrogênios dos grupos **b** e **c** apresentados na Figura 1.9.

No tocante à proteção por grupos acetona, pode se observar a presença ou ausência de grupos **e** nos espectros, o que possibilita avaliar a efetividade da etapa de desproteção. Além disso, pode-se realizar a integração do sinal do hidrogênio presente nos grupos hidroxila, auxiliando na determinação do número de grupos periféricos.

Outra ferramenta para acompanhar o crescimento do material são as análises de ^{13}C RMN, que permitem verificar a presença ou ausência do grupo protetor acetona, dado o sinal característico do grupo em ~ 98 ppm. (Figura 1.10)

Figura 1.10. Espectros de ^{13}C RMN de (A) TMP-[G#1]-Acetona e (B) TMP-[G#1]-(OH)₆. Em destaque, a região característica do grupo acetona em ~ 98 ppm

Outro fator de destaque é o acompanhamento da evolução das gerações do material através dos grupos carbonílicos que podem ser identificados no espectro de ^{13}C RMN. (Figura 1.11) A cada camada adicionada tem-se o aparecimento do grupo carbonílico correspondente. (G1: c''' // G2: $\text{c}''' + \text{c}''$ // G3: $\text{c}''' + \text{c}'' + \text{c}'$ // G4: $\text{c}''' + \text{c}'' + \text{c}' + \text{c}$)

Figura 1.11. Espectros de ^{13}C RMN de TMP-[G#4]-Acetonida. Em destaque, a região de grupos carbonila do espectro de cada geração (G1-G4)

Raciocínio análogo foi utilizado para acompanhamento da síntese de materiais contando com núcleo de 1,12-dodecanodiol (DDD).

Os materiais foram, ainda, caracterizados por espectrometria de massas (EMAR-ESI) sendo os resultados demonstrados na seção experimental. (Seção 1.3)

1.4.3. Síntese de Polímeros Hiperramificados

O elevado número de etapas na síntese e purificação de dendrímeros torna o processo muito lento, além de muito oneroso. Visando a uma metodologia mais simples, a síntese de polímeros hiperramificados se mostra uma alternativa válida, visto que o material se aproxima das funcionalidades de um material dendrimérico, mas obtido através de uma síntese pseudo *one-pot*.

Figura 1.12. Representação esquemática do arranjo experimental para a síntese de polímeros hiperramificados. Esquema reacional para síntese de TMP-[G#2]-[HYP]-(OH)₁₂

A rota sintética se utiliza de uma esterificação catalisada por ácido (p -TSA), com remoção da água gerada pela reação por arraste através de um fluxo intenso de N_2 seco no vaso reacional.(Figura 1.12)

O sucesso da síntese do material hiperramificado depende do controle da extensão da reação de esterificação. Objetiva-se que os monômeros de Bis-MPA adicionados reajam com o material previamente sintetizado e não entre si, formando oligômeros.

Dentro dessa premissa, a adição do monômero tem de ser realizada de maneira lenta para que a concentração de Bis-MPA no meio reacional seja sempre a menor possível. Isso aumenta a probabilidade deste novo monômero reagir corretamente com

o material em crescimento, gerando um material hiperramificado. Esta necessidade apresenta um grau de dificuldade acentuado para a reação em questão, uma vez que o monômero se apresenta como um sólido de elevado ponto de fusão ($m_p = 189 - 191\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dessa forma, sua adição ao meio reacional é sob a forma de um sólido e somente entrando em contato com o núcleo ou polímero hiperramificado pré-formado é que este monômero sofre dissolução e se torna acessível para a reação. Tanto o núcleo, quanto o material pré-formado se apresentam fundidos na temperatura em que a reação é conduzida.

Como a reação é realizada na ausência de solvente, a homogeneização do meio reacional é um fator de elevada importância para seu sucesso. À medida que a esterificação vai progredindo, o material se torna cada vez mais viscoso, passando a demandar uma agitação mais vigorosa para a manutenção da homogeneidade do meio, assim como para possibilitar que o monômero adicionado seja dissolvido de forma uniforme. Para tal fim se optou pela utilização de um agitador mecânico.

Outro fator é a remoção do vapor de água, que é produto da reação de esterificação. Este deve ser removido do vaso reacional (por arraste, utilizando-se um gás inerte) para ser evitada a possível hidrólise do material, assim como para o deslocamento do equilíbrio da reação, favorecendo a esterificação.

Dessa forma, o arranjo experimental teve de sofrer diversos ajustes para compreender todas as especificações necessárias para a síntese. Tal arranjo é demonstrado, esquematicamente, na Figura 1.12.

As proporções entre os reagentes, assim como a temperatura da reação foram estabelecidas seguindo-se a metodologia previamente otimizada por Hult.(MALMSTROEM et al., 1995)

1.4.4. Caracterização do Material Hiperramificado

Os polímeros hiperramificados sintetizados foram caracterizados por espectrometria de massas (EMAR-ESI) e ^{13}C RMN. Espectros obtidos por ^1H RMN se mostraram inconclusivos, uma vez que as imperfeições do material não podem ser inferidas por tal análise.

Os resultados obtidos via EMAR-ESI demonstraram claramente que a adição do monômero é um fator determinante para obtenção de um material de elevada massa molar. (Figura 1.13)

Figura 1.13. Espectros de EMAR-ESI para materiais sintetizados com diferentes velocidades de adição de monômero. Velocidade de adição **I** > **II** > **III** > **IV**. Linha tracejada vermelha denota a massa de Pseudo-[G#2]

Ao longo da reação, a adição de monômero foi realizada em intervalos crescentes, permitindo um maior tempo de reação do monômero adicionado com o material polimérico. Deste modo, inicialmente o monômero era adicionado a cada 2 minutos. A partir do momento em que metade da quantidade total de monômero foi adicionada, este intervalo passou para 5 minutos e, quando restou apenas um terço do volume total de monômero, esse tempo foi estendido para 10 minutos.

Um parâmetro que se mostra importante em se tratando de um material hiperramificado é o grau de ramificação (DB). Este termo apresenta duas definições, uma atribuída a Fréchet (HAWKER, C. J.; LEE; FRECHET, 1991) e outra a Frey. (HÖLTER; BURGATH; FREY, 1997)

$$DB_{\text{Fréchet}} = \frac{D+T}{D+L+T} \quad (1)$$

$$DB_{\text{Frey}} = \frac{2D}{2D+L} \quad (2)$$

Tal análise leva em conta a quantificação dos sinais de ^{13}C RMN dos carbonos quaternários do polímero hiperramificado. Deste modo, as expressões englobam unidades dendríticas (**D**; $\delta_D = 46,7$ ppm), lineares (**L**; $\delta_L = 48,7$ ppm), e terminais (**T**; $\delta_T = 46,7$ ppm).

Figura 1.14. Diferentes espécies de carbono quaternário e seus respectivos deslocamentos químicos (em ppm)

Usando esta sistemática para avaliação, o poliéster de pseudo-segunda geração sintetizado apresentou as seguintes características.

Figura 1.15. Magnificação de espectro de ^{13}C RMN do material hiperramificado de pseudo-segunda geração. Deslocamentos demonstrados em ppm e valores de integrais (em vermelho) atribuídos segundo referência estabelecida em carbonos pertencentes ao núcleo

Tabela 1.1. Parâmetros calculados para o poliéster hiperramificado sintetizado

Parâmetro	TMP-[G#2]-HYP-(OH) ₁₂
D (%)	25
L (%)	39
T (%)	37
DB _{Fréchet}	0,64 (64%)
DB _{Frey}	0,56 (56%)

Os resultados obtidos se mostraram compatíveis com os encontrados na literatura (DB= 50-96%).(HAWKER, C. J. et al., 1991; KOMBER; ZIEMER; VOIT, 2002; MALMSTRÖM; JOHANSSON; HULT, 1995; ŽAGAR; ŽIGON, 2011) Assim, o arranjo experimental utilizado se mostrou competente para a síntese de um material contendo um elevado número de ramificações e arquitetura similar ao previamente estabelecido nos trabalhos supracitados. Adicionalmente, observando o espectro de ^{13}C RMN nota-se a presença de um sinal em 45,8 ppm, que é indicativo de oligômeros com Bis-MPA de iniciador, evidenciando a existência de reações secundárias. Porém, não se observa a presença de sinal em 49,5 ppm, que seria indicativo de Bis-MPA não reagido.

A literatura apresenta uma grande quantidade de mecanismos que podem elucidar a formação de subprodutos neste tipo de reação (KOMBER et al., 2002; ŽAGAR;

ŽIGON, 2011), no entanto, tal enfoque foge da premissa deste estudo, onde o poliéster hiperramificado foi sintetizado para substituir dendrímeros em algumas aplicações de menor complexidade. Este material pôde substituir com êxito o material dendrimérico em testes de reações químicas e em ensaios preliminares. Outra possibilidade explorada foi sua utilização onde não é exigido um controle rígido do número de grupos terminais, como no caso da utilização dos materiais para fins de suporte de catalisadores (Capítulo 4).

1.5. Conclusão

Os materiais dendriméricos de diferentes arquiteturas e gerações, assim como polímeros hiperramificados, foram sintetizados com sucesso. As caracterizações necessárias foram conduzidas e os resultados se mostraram compatíveis com aqueles disponíveis para estruturas semelhantes ou idênticas às apresentadas.

Capítulo 2. Processamento de Materiais Dendriméricos e Incorporação de Fármacos em CO_2 Supercrítico

2.1. Introdução

2.1.1. Dendrímeros para Encapsulamento e Incorporação de Fármacos: A Necessidade da Liberação Controlada

A tecnologia de liberação controlada de fármacos (*Drug Delivery*)(ALLEN; CULLIS, 2004; LANGER, 1998; UHRICH et al., 1999) representa hoje uma das áreas de maior crescimento dentro da ciência, onde químicos, farmacêuticos e engenheiros aliam seus conhecimentos para a melhoria dos tratamentos utilizados. Um sistema de liberação controlada apresenta diversas vantagens quando comparado com sistemas convencionais, incluindo melhoria na eficácia, redução de toxicidade, melhoria na adesão do paciente à terapia e na conveniência do processo.(TIWARI et al., 2012)

Todos os sistemas de liberação controlada visam a melhoria na efetividade da terapia com fármacos. Esta melhoria pode ser resultado do aumento da atividade terapêutica frente aos efeitos colaterais, redução no número de administrações necessárias ao longo do tratamento e eliminação de vias especializadas de administração (*e.g.* injeções periódicas). Dois tipos de liberação de fármacos podem ser objetivados: **(i)** controle temporal ou **(ii)** controle de distribuição.(KIM, S. et al., 2009)

No controle temporal, o sistema possibilita a liberação do fármaco ao longo de um período de tempo pré-determinado, ou mesmo durante o tempo total do tratamento. Isso possibilita a manutenção da concentração do fármaco no sistema biológico, melhorando sua eficácia.

Já no controle de distribuição, os sistemas visam a atingir especificamente o tecido alvo. Ambos os sistemas são mostrados esquematicamente na Figura 2.1.(KIM, S. et al., 2009; UHRICH et al., 1999)

Figura 2.1. Diferentes sistemas de liberação controlada. (A) Sistema de liberação baseada na difusão e partição; (B) Liberação controlada ao longo de um período de tempo; (C) Liberação *On-site* - fármaco liberado em um tecido alvo (KIM, S. et al., 2009)

A maior parte dos fármacos necessita ser dissolvido em meio aquoso (meios biológicos) para então difundir neste e agir nos receptores alvos. Os sistemas poliméricos para controle temporal protegem a molécula de fármaco deste ambiente por um período programado de tempo. Essa proteção envolve a postergação da dissolução da molécula de fármaco, inibindo a difusão do fármaco para fora do sistema polimérico, controlando, assim, seu fluxo.(UHRICH et al., 1999)

Figura 2.2. Mecanismos para controle temporal da liberação de fármacos em matrizes poliméricas (UHRICH et al., 1999)

Sistemas poliméricos usados para retardar a dissolução do fármaco podem se valer da erosão do material em meio aquoso (mais lenta que a difusão do fármaco), ou da difusão do fármaco através da matriz, caso esta não apresente uma dissolução significativa em meio aquoso. Esses dois mecanismos são ilustrados na Figura 2.2 (UHRICH et al., 1999)

Dentre as diversas classes de polímeros utilizados para formulação de sistemas de liberação de fármacos, macromoléculas com estrutura tridimensional têm conseguido considerável destaque. As “cavidades moleculares” (termo cunhado por Hof) (HOF et al., 2002) existentes em macromoléculas, como polímeros hiperramificados e dendrímeros, se referem ao volume livre existente no interior dessas estruturas que podem ser manipulados através de interações solvente-polímero. Como exemplo, a diferença de propriedades químicas do interior de um polímero hiperramificado do tipo poliéster possibilita a duplicação de seu volume em contato com diferentes solventes. Assim sendo, a conformação de polímeros dendríticos por interação com solventes permite um melhor acesso das moléculas hóspedes (*guest*) no interior da estrutura da macromolécula.(IRFAN; SEILER, 2010)

Não somente o material no qual será incorporado o fármaco se faz alvo de estudo, mas também o solvente utilizado para promover este fenômeno deve sofrer um estudo aprofundado para obtenção de um resultado satisfatório.

Diversos processos de incorporação de fármacos acabam por se tornar inviáveis, seja por utilizarem condições severas de temperatura, ou mesmo pela simples utilização de certos solventes (WITSCHI; DOELKER, 1997), visto os padrões restritivos estabelecidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e pela USP (*United States Pharmacopeia*). (USPHARMACOPEIA, 2007)

Uma das estratégias para contornar estas limitações é a utilização de um solvente neotério (BECKMAN, 2004; CLARK; TAVENER, 2007) capaz de operar em condições amenas e não deixar resíduos após sua atuação no processo, características apresentadas por alguns fluidos supercríticos (SCF).

Figura 2.3. Plano T-p do diagrama de fases do dióxido de carbono (CO_2). Na região destacada (SCF), as fases líquidas e gasosas são indistinguíveis.

Fenômenos supercríticos são conhecidos há mais de 150 anos, sendo o barão Charles de la Tour (BERCHE; HENKEL; KENNA, 2009) tido como seu descobridor. Atualmente, grande notoriedade tem acompanhado o desenvolvimento do uso do CO_2 supercrítico ($scCO_2$) (Figura 2.3). Este apresenta como principais características: **(i)** seu ponto crítico acessível ($p_c = 73$ bar, $T_c = 304$ K), **(ii)** elevada abundância, **(iii)** custo reduzido, **(iv)** é atóxico e inodoro, **(v)** não inflamável, **(vi)** facilmente removível do produto final e reciclável, **(vii)** não classificado como COV (composto orgânico volátil). (PEACH; EASTOE, 2014)

Aliam-se a este cenário, as propriedades únicas de fluidos supercríticos, como suas propriedades intermediárias entre gás e líquido, e a capacidade de modulação dessas propriedades variando-se temperatura e/ou pressão.

Tabela 2.1. Comparação de propriedades físicas típicas de gases, fluidos supercríticos (SCF) e líquidos (água)

Propriedade	Gás	SCF	Líquido
Densidade ($g \cdot mL^{-1}$)	10^{-3}	0,3	1,0
Viscosidade ($Pa \cdot s$)	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Difusividade ($cm^2 \cdot s^{-1}$)	10^{-1}	10^{-3}	5×10^{-6}

A modulação de propriedades é evidenciada na Figura 2.4, onde se observa a alteração de densidade devido a alterações na pressão e temperatura do sistema. Tem-se ainda que em regiões próximas ao ponto crítico, essas variações se mostram abruptas.

Figura 2.4. Gráficos de densidade em função de temperatura e pressão para o CO_2 . (Cálculos realizados pela equação de estado proposta por Span e Wagner)(SPAN; WAGNER, 1996)

Densidade e difusividade se mostram muito atrativas no tocante aos processos de encapsulamento/impregnação. Sendo que três passos podem ser descritos neste processo:(CHAMPEAU et al., 2015)

(i) *A dissolução do soluto em $scCO_2$* : $scCO_2$ é tido como um bom solvente para moléculas apolares e de pequena massa molecular, mas um solvente pouco eficiente para moléculas hidrofílicas e compostos de elevada massa molecular (*e.g.* polímeros, proteínas, ácidos graxos). No entanto, esta solubilidade pode ser alterada devido a

possibilidade de interações específicas entre o soluto e a molécula de CO₂. Além disso, a solubilidade em CO₂ é dependente da densidade do meio.

(ii) *O contato da solução [CO₂ + soluto] e polímero (Impregnação):* a molécula alvo dissolvida difunde para o interior da matriz polimérica resultando no preenchimento das cavidades existentes. A difusão é facilitada se o CO₂ promover o inchamento do polímero, o que é dependente da estrutura química deste e das condições operacionais (T e p).

(iii) *O estágio de despressurização:* durante a despressurização o CO₂ deixa o sistema sob a forma de gás, sendo parte do excesso do soluto (parcela não impregnada) carregada para fora do sistema ou precipitada no interior do reator. Ao final, o polímero impregnado é recuperado, livre de qualquer solvente. A velocidade e temperatura de despressurização devem ser controladas para que a formação de bolhas na matriz polimérica se dê de maneira controlada.

2.1.2. Polímeros em CO₂

O scCO₂ encontra expressiva aplicação na formação de partículas (micronização) de materiais poliméricos, sendo um novo campo explorado a formação de esqueletos (*scaffolds*) tridimensionais (formação de microbolhas no interior da matriz polimérica).

Os efeitos comuns do scCO₂ atingem as propriedades térmicas e reológicas do material polimérico. Redução da viscosidade e redução da temperatura de fusão/transição vítrea foram muito estudadas e refletem as interações em nível molecular entre a molécula de CO₂ e os grupos funcionais que compõem o polímero. (KAZARIAN, SERGEI G. et al., 1996)

Uma extensa variedade de polímeros já teve suas características estudadas em presença de $scCO_2$, (BRAY et al., 2010) sendo grande destaque dado para polímeros biodegradáveis/biocompatíveis, os quais são candidatos para utilização em liberação de fármacos.

Dentre esses polímeros, uma classe de destaque são os polilactatos (PLA). (MADHAVAN NAMPOOTHIRI; NAIR; JOHN, 2010). Tais polímeros têm grande apelo na utilização para fins biomédicos por terem seu monômero de origem natural, serem biocompatíveis e biodegradáveis.

PLA's foram amplamente estudados em CO_2 , no tocante à estruturação tridimensional (*scaffold*) e impregnação de compostos bioativos. (MAHMOOD; KESHTKAR; PARK, 2014)

2.2. Objetivos

Os objetivos desta etapa contemplaram:

- (i)** Síntese e caracterização de materiais dendriméricos modificados com grupos CO₂-fílicos e com cadeias lineares de polilactato (PLA)
- (ii)** Estudo dos materiais não-modificados e modificados em scCO₂
- (iii)** Estudo das interações Solvente(scCO₂)-Dendrímero
- (iv)** Impregnação auxiliada por scCO₂ e estudo de interação Fármaco-Dendrímero por análises espectroscópicas

2.3. Procedimento Experimental

2.3.1. Modificações dos Materiais Dendríméricos

2.3.1.1. Preparação de Dendrímero com Grupo Acetila Periférico: TMP-[G#2]-(Acetila)₁₂ (2.1)

TMP-[G#2]-(OH)₁₂ (1,5 g, 1,27 mmol; 15,2 mmol de grupo -OH; 1 eqv.), DMAP (0,279 g, 1,35 mmol; 0,1 eqv.), piridina (6,0 mL; 5 eqv.), CH₂Cl₂ (19 mL) e anidrido acético (1,87 mL; 19,78 mmol; 1,3 eqv.) foram colocados para reagir durante 24 horas. O excesso de anidrido foi consumido com adição de 1-2 mL de água sob vigorosa agitação (*overnight*). O produto da reação foi diluído com 500 mL de CH₂Cl₂ e extraído com soluções 10% m/m de NaHSO₄ (3 x 50 mL), 10% m/m de Na₂CO₃ (3 x 50 mL), e solução saturada de NaCl (1 x 50 mL) gerando um produto, que foi purificado em coluna cromatográfica com sílica-gel, utilizando inicialmente hexano como eluente, aumentando-se a polaridade até 70:30 AcOEt:Hex (em volume), resultando um óleo viscoso incolor **2.1**.

(2.1)

Rendimento: 62%
Óleo viscoso incolor

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ 0,96 (s, 3H, -CH₃); 1,24 (s, 18H, -CH₃); 1,28 (s, 9H, -CH₃); 2,06 (s, 36H, -CH₃); 4,10 (s, 6H, -CH₂); 4,19 (s, 24H, -CH₂); 4,29 (s, 12H, -CH₂)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, ppm): δ 7,5; 17,5; 17,7; 20,6; 41,3; 46,3; 46,7; 64,2; 65,2; 170,4; 171,6; 171,9

EMAR-ESI: Calculado para $[C_{75}H_{110}O_{42} + Na]^+ = 1705,6370$ Encontrado = 1705,6365

2.3.1.2. Preparação de Ácido Glucônico Peracetilado (Ácido 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-glucônico) (2.2)

Anidrido acético (15 mL) foi resfriado até 15 °C e sofreu a adição de uma solução 67% v/v de $HClO_4$ (2,0 g, 19,9 mmol), seguiu-se a adição de D-gluconato de sódio (2,5 g, 12,6 mmol). A temperatura da mistura foi mantida abaixo de 40 °C durante a adição. Após um breve aquecimento para obtenção de uma solução homogênea, a mistura foi derramada sobre gelo e extraída duas vezes com $CHCl_3$ (2 x 50 mL). A fase orgânica foi reunida e lavada com água gelada (≈ 0 °C). Água (50 mL) e trietilamina (2 mL) foram adicionadas ao $CHCl_3$, sendo o meio mantido sob forte agitação *overnight* para hidrólise de todo anidrido residual. A fase orgânica foi separada e lavada com solução 1 mol/L de HCl e secada com $MgSO_4$. O solvente foi evaporado e o produto foi obtido como um óleo viscoso **2.2**.

(2.2)

Rendimento: 80%
Óleo viscoso incolor

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 2,06 (s, 3H, $-CH_3$); 2,09 (s, 3H, $-CH_3$); 2,09 (s, 3H, $-CH_3$); 2,20 (s, 3H, $-CH_3$); 4,13 (dd, 1H, $J = 12$ Hz); 4,33 (dd, 1H, $J = 12$ Hz); 5,05 – 5,12 (m, 1H); 5,31 (d, 1H, $J = 4$ Hz); 5,51 (dt, 1H, $J = 6$ Hz); 5,64 (t, 1H, $J = 4$ Hz)

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 20,3; 20,5; 20,6; 20,7; 61,6; 68,5; 69,3; 70,1; 169,8; 169,9; 169,9; 170,4; 170,7

EMAR-ESI: Calculado para $[C_{16}H_{22}O_{12} + Na]^+ = 429,1010$ Encontrado = 429,1006

2.3.1.3. Preparação de TMP-[G#2]-Gluco (Ácido 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-D-glucônico) (2.3)

TMP-[G#2]-(OH)₁₂ (1,0 g, 1,3 mmol; 15,6 mmol de grupo -OH; 1 eqv.), ácido glucônico peracetilado **2.2** (8,03 g, 18,7 mmol; 1,2 eqv.), DCC (3,9 g, 18,7 mmol; 1,2 eqv.), DMAP (2,3 g, 18,2 mmol; 1,2 eqv.), CH₂Cl₂ (25 mL), piridina (5 mL) foram colocados para reagir durante 72 horas. Após este período, o meio reacional foi filtrado para eliminação de DCU, concentrado e o material resultante foi purificado em coluna cromatográfica de sílica utilizando-se como eluente uma mistura 8:2 AcOEt:Hex (em volume), resultando em **2.3**.

(2.3)

Rendimento: 32%
Óleo Viscoso Esbranquiçado

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ 2,05-2,09 (m, 171H, -CH₃); 2,20 (s, 36H, -CH₃); 4,07-4,18 (m, 36H, -CH₂); 4,28-4,37 (m, 12H, -CH₃); 5,10 (td, 12H -CH); 5,32 (d, 12H, J= 4Hz); 5,50-5,55 (m, 12H); 5,69 (dd, 12H)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, ppm): δ 20,4; 20,5; 20,6; 20,6; 20,7; 60,4; 61,5; 68,7; 68,9; 69,9; 70,9; 125,0; 139,8; 145,9; 169,7; 169,8; 169,9; 170,67; 170,6; 171,3

2.3.1.4. Preparação de TMP-[G#2]-PLA12-OH (2.4)

TMP-[G#2]-(OH)₁₂ (0,02 g, 0,02 mmol; 0,3 mmol de grupo -OH; 1 eqv.) foi dissolvido em tetraidrofurano (20 mL) e o solvente foi evaporado para eliminar possível contaminação com água. Em uma *glovebox* foram adicionados 5 g (36,0 mmol; 120 eqv.) de lactídeo. Aqueceu-se o meio reacional a 110 °C, até este ficar límpido, adicionou-se, então, Sn(Oct)₂ (0,022 mL; 7. 10⁻³ mmol; 0,3 eqv.) sendo a reação mantida por 24 h sob

aquecimento e agitação. Resfriou-se a mistura até temperatura ambiente. Adicionou-se tetraidrofurano e foi efetuado aquecimento a 110 °C para dissolução do sólido. Resfriou-se a temperatura ambiente e precipitou-se o polímero em excesso de metanol gelado em duas etapas, resultando em um sólido branco, **2.4**.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 1,27 (s, 18H, -CH₃); 1,29 (s, 9H, -CH₃); 1,46-1,47 (m, 421H, poli -CH₃); 5,18-5,22 (m, 129H, poli -CH-)

MALDI-TOF: 10.990 Da

2.3.1.5. Preparação de TMP-[G#2]-PLA35-OH (2.5)

TMP-[G#2]-(OH)₁₂ (0,02 g, 0,02 mmol; 0,3 mmol de grupo -OH; 1 eqv.) foi dissolvido em tetraidrofurano (20 mL) e o solvente foi evaporado para retirar possível contaminação com água. Em uma *glovebox* foram adicionados 20 g (144,0 mmol; 480 eqv.) de lactídeo. Aqueceu-se o meio reacional a 110 °C até o meio ficar límpido, adicionou-se, então, Sn(Oct)₂ (0,022 mL; 7. 10⁻³ mmol; 0,3 eqv.) sendo a reação mantida por 24 h sob aquecimento e agitação. Resfriou-se a mistura até temperatura ambiente. Adicionou-se tetraidrofurano e foi efetuado aquecimento a 110 °C para dissolução do sólido. Resfriou-se à temperatura ambiente e precipitou-se o polímero em excesso de metanol gelado em duas etapas, resultando em um sólido branco, **2.5**.

(2.5)

Rendimento: 95%

Sólido Branco

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 1,59 (slargo, 1253H, poli- CH_3); 5,18 (slargo, 355H, poli -CH-)

MALDI-TOF: 65.444 Da

2.3.1.6. Preparação de TMP-[G#2]-PLA12-Acetila (2.6)

TMP-[G#2]-PLA12-OH (500 mg, 0,54 mmol de grupo -OH; 1 eqv.), DMAP (86,7 mg, 0,71 mmol; 1,3 eqv.), piridina (3 mL), e anidrido acético (67 μL ; 0,71 mmol; 1,3 eqv.) foram colocados para reagir durante 24 horas em 10 mL de THF, em temperatura ambiente. O excesso de anidrido foi neutralizado com adição de 1-2 mL de água sob vigorosa agitação (*overnight*). O produto da reação foi precipitado em metanol gelado ($\sim 0^\circ\text{C}$), duas vezes e secado em pressão reduzida, resultando em um sólido amarelado

2.6.

(2.6)

Rendimento: 85%

Sólido Amarelado

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, ppm): δ 1,15-1,29 (m, 27H, - CH_3); 1,45-1,48 (m, 445H, poli - CH_3); 2,06 (s, 18H, - CH_3 Acetila); 5,17-5,24 (m, 126H, poli -CH-)

MALDI-TOF: 11.659 Da

2.3.1.7. Preparação de TMP-[G#2]-PLA35-Acetila (2.7)

TMP-[G#2]-PLA35-OH (2,9 g, 0,54 mmol de grupo -OH; 1 eqv.), DMAP (86,7 mg, 0,71 mmol; 1,3 eqv.), piridina (3 mL), e anidrido acético (67 μ L; 0,71 mmol; 1,3 eqv.) foram colocados para reagir durante 24 horas em 50 mL de THF, em temperatura ambiente. O excesso de anidrido foi neutralizado com adição de 1-2 mL de água sob vigorosa agitação (*overnight*). O produto da reação foi precipitado em metanol gelado ($\sim 0^\circ C$), duas vezes e secado em pressão reduzida, resultando em um sólido amarelado 2.7.

(2.7)

Rendimento: 67%
Sólido Amarelado

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$, ppm): δ 1,57-1,59 (m, 1100H, poli- CH_3); 2,13 (s, 24H, - CH_3 Acetila); 5,17 (quart., 354H, poli -CH-).

MALDI-TOF: 65.114 Da

2.3.2. Comportamento dos Materiais em CO_2 supercrítico

2.3.2.1 Equipamento de Alta Pressão

Para estudar o comportamento dos materiais dendriméricos em CO_2 puro, foram construídos diagramas de fase simplificados contendo as pressões dos pontos de névoa (pressão em que ocorre turvamento por separação de fases) em diferentes temperaturas. Adicionalmente, foi acompanhado o comportamento de inchamento e dissolução dos materiais ao longo do tempo.

Foi utilizado um monitor de fases (Waters, modelo SPM20), composto por uma

cela cilíndrica de volume variável com duas janelas de safira, através das quais o sistema é iluminado por lâmpada LED branca e visualizado com uma câmera CCD. A cela é rosqueável, possuindo duas tampas metálicas de rosca (uma delas ligada a um agitador) e um selo de Kalrez®, perfluorelastômero produzido pela DuPont.

O sistema é aquecido por quatro cartuchos de aquecimento inseridos no corpo de aço inox da cela. A temperatura e a pressão são controladas por um termopar duplo do tipo-J e por um transdutor de pressão, respectivamente. O sistema possui, ainda, um disco de ruptura (VICI), dispositivo de segurança, o qual impede que o sistema alcance pressões perigosas, acima de 6000 PSI (414 bar) ou 10000 PSI (689 bar), limites máximos para as duas configurações do sistema (com agitador acoplado ou com tampa metálica simples, respectivamente). Além disso, foram projetados e construídos escudos de policarbonato para a proteção dos usuários quando do trabalho com pressões elevadas.

Pressão, temperatura e imagem do interior da cela são simultaneamente monitoradas por uma central de controle, que envia as informações para um software de captura de vídeo (Pinnacle Studio vs 12.1) no computador. Logo, pode-se visualizar o interior da cela e conhecer pressão e temperatura internas, mostradas no monitor do computador. Esta última pode ser diretamente controlada, fixando-se um valor na central de controle, que mantém a temperatura do sistema constante fazendo uma leitura contínua do termopar e injetando a corrente elétrica necessária nos cartuchos de aquecimento. A Figura 2.5 mostra, em corte, como esses componentes de controle, visualização e segurança estão localizados no corpo do vaso de pressão.

Figura 2.5. Corte transversal (ilustrativo, sem escala) da cela de volume ajustável do monitor de fases

Além do controle automático da temperatura, por se tratar de uma cela de volume variável, a pressão do sistema também pode ser modulada, condição necessária para o estudo em fluidos compressíveis. O volume (e consequentemente a pressão) é variado manualmente por meio de uma bomba hidráulica que move um pistão no interior do cilindro de aço que contém a cela. A bomba é equipada com uma válvula-agulha (HiP) que, quando fechada, mantém o volume do sistema constante.

A sua lenta abertura promove uma lenta expansão, fundamental para uma determinação precisa dos pontos de névoa do sistema. O volume máximo da cela é de 15,0 mL. O volume mínimo, com máxima compressão do pistão para uma dada temperatura, é de 5,5 mL.

Foi utilizada uma linha de CO₂ líquido a 55 bar ligada a dois cilindros de CO₂ dotados de tubo pescador (Oxigás, 99,95 %). A tubulação, com diâmetro externo de 1/8", foi termicamente isolada por tubos de poli(estireno) expandido, mantendo o CO₂ no estado líquido no sistema. Antes de ser injetado na cela, o CO₂ é comprimido à pressão desejada por uma bomba de seringa automática (Teledyne ISCO 260D), mantida

a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um banho recirculador (Julabo ED), compensando a liberação de calor pelo processo de compressão do CO_2 .

O monitor de fases possui ainda um sistema de agitação mecânica. Ao invés de uma haste atravessando o corpo da cela, entretanto, o agitador é formado por um ímã de liga de samário, que gira na velocidade desejada e controla o movimento de uma pequena hélice no interior do reator, garantindo a segurança do sistema. A Figura 2.6 e 2.7 ilustram como o sistema está arranjado, desde o cilindro de CO_2 até a central de controle.

Figura 2.6. Fotos do equipamento utilizado (Waters, SPM20)

Figura 2.7. Desenho esquemático (sem escala) da configuração do monitor de fases.

2.3.2.2. Estudo de Expansão e Dissolução de Materiais Dendriméricos

Para o estudo do comportamento dos materiais dendriméricos em scCO₂, se fez uso do monitor de fases de volume variável, descrito na seção anterior. Dentro deste, as amostras foram dispostas em um pequeno recipiente de vidro, o qual tinha sua posição fixada por uma estrutura metálica.

As imagens do interior do monitor foram adquiridas, em períodos determinados, através do software Pinnacle Studio (versão 12.1), sendo posteriormente tratadas no software ImageJ (versão 1.45s).

O recipiente de vidro utilizado foi calibrado através de sua imagem. Alíquotas de volume conhecido de glicerol (material de viscosidade comparável aos materiais testados) foram depositadas no recipiente e inseridas no monitor para captação de sua imagem. Uma vez que a largura do recipiente apresenta um valor conhecido, o tratamento da imagem consistiu em determinar a distância entre o limite do material adicionado e o fundo do recipiente. Deste modo se estabeleceu a relação entre comprimento (distância em cm entre a fronteira do material e o fundo do recipiente) e volume. Foram utilizados os seguintes volumes de glicerol para construção de uma curva de calibração: 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µL, sendo o procedimento realizado em triplicata a temperatura ambiente.

No estudo dos materiais dendriméricos, as imagens iniciais foram coletadas na ausência de CO₂ após o sistema entrar em equilíbrio térmico. Seguido desta etapa (após o carregamento do monitor com CO₂), as imagens foram obtidas em intervalos regulares de 15 minutos durante a primeira hora e a cada meia hora após este período, durante 48 horas. O ensaio foi realizado nas seguintes temperaturas: 35, 45, 55 e 65 °C para os

materiais com grupos terminais acetona e acetila, 35 e 65 °C para os materiais com hidroxilas terminais e 75 °C para os materiais com cadeias de polilactato.

Os materiais que se apresentavam como óleos viscosos foram apenas transferidos para o recipiente, enquanto os materiais sólidos necessitaram ser fundidos. Em todos os ensaios foram utilizados 35 mg de material.

Durante o período do ensaio, o monitor de fases operou com seu menor volume, sendo a pressão fixada em 250 bar (maior densidade possível do solvente). O sistema foi mantido estático, não havendo qualquer tipo de perturbação.

Ao término do período estipulado, o monitor era despressurizado lentamente, sendo adaptado um *trap* de vidro próximo à válvula de saída do sistema para o recolhimento do material. Este material, em alguns casos, foi analisado por 1H RMN para avaliação de sua integridade.

2.3.2.3. Procedimento para Determinação da Pressão de Névoa

O valor de pressão de névoa (P_N) determina a pressão mínima necessária para a manutenção de um sistema monofásico, assim sendo, o experimento efetuado consistiu na lenta despressurização do sistema, o qual inicialmente se encontrava na pressão de 250 bar. Esta despressurização foi efetuada se valendo do aumento gradativo do volume do monitor através de seu sistema de pistão, se partindo da situação onde o monitor apresentava o menor volume possível. Durante todo o procedimento a temperatura foi mantida constante.

O ponto de névoa foi determinado visualmente. Acompanhando-se o sistema, foi determinada a pressão na qual houve separação de fases (turbamento). Esta

determinação foi efetuada dez vezes para cada sistema, realizando-se ciclos de compressão e descompressão através do pistão.

2.3.2.4. Procedimento para Estimativa de Solubilidade Mínima dos Polímeros

O material utilizado nos ensaios de expansão foi pesado antes de sua inserção no monitor de fases e após a realização do ensaio. Os dados acerca da massa de CO₂ presente no monitor foram obtidos através dos valores de pressão, temperatura e volume utilizando-se a equação de estado disponível no banco de dado do NIST (*National Institute of Standards and Technology*). (NIST, 2013)

2.3.2.5. Procedimento para Encapsulamento/Impregnação de Ibuprofeno/Fluconazol em scCO₂

O ensaio de encapsulamento/impregnação de ibuprofeno/fluconazol foi realizado no monitor de fases (Waters, SPM20), utilizando o dendrímero TMP-[G#2]-PLA12-OH. Este foi disposto em um tubo de vidro compatível com o volume total do monitor de fases, misturado com os fármacos em diversas razões molares. No caso de ensaios com o meio saturado, uma quantidade adicional de fármaco foi disposta em um tubo a parte, colocado conjuntamente com o tubo contendo a mistura dendrímero/fármaco no interior do monitor de fases.

O reator foi pressurizado a 250 bar e a temperatura fixada em 75 °C, não havendo agitação do sistema. O ensaio foi mantido nestas condições durante um período de tempo pré-determinado (4-24 h no caso do ibuprofeno e 24 h para o caso do fluconazol).

Ao término do ensaio, o reator foi lentamente despressurizado e um *trap* de vidro disposto próximo à válvula de saída recolhia a fração de material solúvel em CO₂.

O material ainda presente no tubo de vidro (que inicialmente contava com a mistura matriz/fármaco) era, então, analisado por FTIR, espectroscopia RAMAN e ¹H RMN.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Expansão e Dissolução de Materiais Dendriméricos

O processamento de materiais poliméricos em scCO₂, assim como em qualquer outro solvente, permite avaliar as potencialidades deste material para a finalidade objetivada. Dentro dos diferentes tipo de aplicações dentro do nicho do scCO₂(ESFANDIARI, 2015; GIOTRA; SINGH; NAGPAL, 2013), o material por si só deve contemplar certas características para o seu correto emprego dentro desta tecnologia.

Frente às limitações de solubilização apresentadas pelo CO₂ (ANDERSON; SIEPMANN, 2008; REICHARDT, 2007), os materiais estudados buscaram explorar tanto sua solubilidade em CO₂, como a solubilidade de CO₂ no material dendrimérico.(FLEMING; KAZARIAN, 2006; KNEZ et al., 2011; RU-TING; XING-YUAN, 2015) Neste sentido, estudou-se a incorporação do CO₂ nos diferentes materiais dendriméricos, através do inchamento destes.

O estudo de fenômenos em condições de alta pressão, em grande parte dos casos, faz uso de arranjos experimentais de grande complexidade, que, por vezes, exigem sucessivos ajustes frente ao desafio para obtenção do dado experimental almejado. Desse modo, para o ensaio de expansão volumétrica, se utilizou um aparato cilíndrico de vidro calibrado. Tal calibração foi realizada com glicerina, por esta apresentar características semelhantes as dos materiais estudados.

A Figura 2.8 contempla de forma resumida os fenômenos observados ao longo dos experimentos. Tem-se a alteração volumétrica do material dendrimérico durante o processo de expansão, seguido, em alguns casos, de sua retração devido à sua solubilização no scCO₂. Esquemáticamente, é mostrado como foi realizada a aquisição de dados, assim como a determinação do valor de pressão de névoa.

Figura 2.8. Desenho esquemático (sem escala) do arranjo experimental para estudo de expansão e solubilidade dos diferentes materiais. Em detalhe, o comportamento de expansão e solubilização (fronteira do material em estudo), assim como fenômeno de pressão de névoa (P_N)

Utilizando-se este arranjo experimental, as imagens obtidas em intervalos de tempo pré-estabelecidos foram analisadas através do software ImageJ, permitindo maior precisão na determinação da distância entre a fronteira do material e o fundo do recipiente. Todos os dados de distância foram então convertidos para volume, utilizando-se a curva de calibração já descrita (Figura 2.9)

Figura 2.9. Curva de calibração para análise de expansão e retração volumétrica

A estruturação tridimensional dos materiais dendriméricos teve por premissa a melhoria de certas propriedades para a sua aplicação em scCO₂, frente a um solvente pouco eficiente para macromoléculas. Não somente foi ponderada a arquitetura do material para melhor interação com o solvente (ATTHOFF et al., 1999; BRAY et al., 2010) como houve também a utilização de um material do tipo poliéster, a fim de se explorar as favoráveis interações deste grupo com as moléculas de CO₂.(ALTARSHA; INGROSSO; RUIZ-LOPEZ, 2012; MILLER et al., 2012)

2.4.1.1. Influência da Temperatura (Densidade do Solvente) no Comportamento dos Materiais

Inicialmente, o fator estudado foi o impacto da diferença de densidade do scCO₂ nas propriedades do material dendrimérico. Valores de densidade distintos foram obtidos pela manutenção da pressão imposta ao sistema (250 bar) havendo variação da temperatura (35-65 °C). Como se observa na Figura 2.10, com o incremento na temperatura (em uma mesma pressão) a densidade do meio decresce.

Figura 2.10. Valores* de densidade de scCO₂ em diferentes temperaturas, a uma mesma pressão (250 bar)

*Valores calculados segundo equação de estado de Span e Wagner(NIST, 2015; SPAN; WAGNER, 1996)

Não somente a densidade do solvente é alterada com o aumento de temperatura, como também as propriedades do material.(GAJJAR DHAVAL et al., 2015; SUNDER et al., 2000) Neste primeiro momento, foi avaliado o comportamento dos materiais frente às alterações ocorridas com as propriedades do solvente.

A variação do volume foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\frac{(\text{Volume Aferido} - \text{Volume Inicial})}{\text{Volume Inicial}} \times 100 \quad (3)$$

Os resultados dos materiais: TMP-[G#2]-Acetonida, TMP-[G#2]-(OH)₁₂, TMP-[G#4]-Acetonida, DDD-[G#2]-Acetonida, DDD-[G#2]-(OH)₈, TMP-[G#2]-Acetila, TMP-[G#2]-Glucos; submetidos a diferentes densidades de scCO₂ são mostrados a seguir.

Figura 2.11. Expansão e retração de volume do dendrímero TMP-[G#2]-Acetonida em diferentes temperaturas, ao longo de 48h ($p = 250$ bar)

Figura 2.12. Retração de volume do dendrímero TMP-[G#2]-(OH)₁₂ em diferentes temperaturas, ao longo de 48h ($p=250$ bar)

Figura 2.13. Expansão do dendrímero TMP-[G#4]-Acetonida em diferentes temperaturas, ao longo de 48h (p= 250 bar)

Figura 2.14. Expansão e retração de volume do dendrímero DDD-[G#2]-Acetonida em diferentes temperaturas, ao longo de 48 h ($p=250$ bar)

Figura 2.15. Retração de volume do dendrímero DDD-[G#2]-(OH)₈ em diferentes temperaturas, ao longo de 48 h (p= 250 bar)

Figura 2.17. Expansão e retração volumétrica de TMP-[G#2]-GlucO em diferentes temperaturas, ao longo de 48 h ($p = 250$ bar)

De uma maneira geral (Figura 2.11 - 2.17) o que se observa é a retração inicial do volume da fase dendrímica, seguida de seu inchamento (excetuando-se os materiais com grupos $-OH$ periféricos, discutidos na seção seguinte). Este comportamento ocorre porque inicialmente a pressurização do meio e a interação com $scCO_2$ faz com que o material seja comprimido e suas moléculas rearranjadas, promovendo sua compactação, assim como o colapso de possíveis cavidades contendo ar. Após esta compressão inicial, o material passa então a interagir de modo mais efetivo com o $scCO_2$, sendo que dependendo da composição do material (principalmente no tocante a grupos periféricos) essa interação apresentará uma certa intensidade. (MAHMOOD et al., 2014) Deste modo, quando há interações com o material dendrímérico, o CO_2 (CHEN et al., 2012) pode permear entre suas cadeias se dissolvendo nesta fase. Nesta situação ter-se-á o inchamento do material. Dependendo da extensão da interação dendrímero- CO_2 e dendrímero-dendrímérico, o material poderá ser dissolvido, o que é observado por uma retração no volume.

Como esperado, a diminuição da densidade do $scCO_2$ apresenta grande influência no comportamento do material. Tal fenômeno (Figura 2.10) acaba por restringir a capacidade de solubilização do $scCO_2$ e, deste modo, há mitigação na interação solvente-dendrímérico. O que se observa é que tanto a expansão como solubilização dos materiais são comprometidas por esta alteração.

2.4.1.2. Efeito da Geração no Comportamento dos Materiais

Materiais dendriméricos apresentam como destaque o elevado número de grupos terminais, característica que permite, potencialmente, magnificar o efeito destes. Deste modo, se mostra válido comparar dendrímeros de gerações distintas contendo o mesmo grupo terminal (acetonida no caso estudado) no intuito de se avaliar o balanço entre a influência da quantidade de grupos funcionais de caráter CO₂-fílico e a massa molar do dendrímero. O grupo acetonida por conter uma ligação do tipo éter, possibilitaria uma interação favorável deste átomo de oxigênio com a molécula de CO₂. Adicionalmente a rigidez de estrutura promovida pela existência do anel, também se mostra favorável à sua interação com solvente, já que compromete a interação dendrímero-dendrímero.

Figura 2.18. Comparação das alterações volumétricas de dendrímeros de diferentes gerações (TMP-[G#2]-Acetona e TMP-[G#4]-Acetona) ao longo de 48 h. Condições $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$; $p = 250\text{ bar}$

O resultado obtido (Figura 2.18) demonstra que ainda que o dendrímero de geração 4 apresente um maior número de grupos carbonila em seu interior e etéreos em sua periferia, o incremento na sua massa molar altera significativamente o seu comportamento quando comparado a um material de segunda geração. O dendrímero de geração mais alta (G4) não se mostra solúvel na condição de maior densidade do scCO₂, ocorrendo apenas o seu inchamento.

O inchamento observado é comparável ao que ocorre com o material de segunda geração, sendo ambos pronunciados.

2.4.1.3. Efeito dos Grupos Periféricos

Ainda que em seu interior todos os dendrímeros sejam compostos por ligações do tipo éster (grupos estes favoráveis a interações com CO₂), (ALTARSHA et al., 2012; KILIC et al., 2007) a influência do grupo periférico pode ser determinante para as interações efetuadas com o solvente. Os grupos periféricos podem restringir o acesso das moléculas de solvente ao interior do dendrímero e dessa forma configurar um entrave tanto ao inchamento do material, como a sua solubilização. Adicionalmente, os grupos periféricos podem permitir interações de elevada energia entre as moléculas do material (como ligações de hidrogênio), ou ainda favorecer seu arranjo intermolecular, permitindo por exemplo sua cristalização. (GAJJAR DHAVAL et al., 2015)

Os grupos periféricos abrangidos nesta etapa foram: acetônida, hidroxila, acetila e ácido glucônico peracetilado.

Figura 2.19. Comparação da variação volumétrica de dendrímeros com diferentes grupos periféricos (acetona, -OH, acetila, ácido glucônico peracetilado). Condições: $T = 35\ ^\circ C$, $p = 250\ bar$

A comparação efetuada (Figura 2.19) permite inferir sobre o efeito da periferia no comportamento do dendrímero. Os grupos acetona e acetila possibilitaram uma interação favorável com o CO₂ (KILIC et al., 2007; WICK; SIEPMANN; THEODOROU, 2005) dada a expansão e solubilização dos materiais. No entanto, não se pode deixar de ser considerada a influência que estes grupos periféricos trazem no tocante a interação dendrímero-dendrímero. Influência esta difícil de ser mensurada no presente ensaio.

O dendrímero contendo ácido glucônico peracetilado periférico demonstrou tímido inchamento e pequena dissolução, este efeito deve se correlacionar ao aumento de massa molar acarretado por este grupo. Ainda que este apresente muitos grupos carbonila, que poderiam interagir com CO₂, (MA, S.-L. et al., 2010; POTLURI et al., 2002; RAVEENDRAN; WALLEN, 2002b) por ser um grupo volumoso acaba por aumentar substancialmente a massa molar do material final, o que pode justificar o seu comportamento.

O grupo periférico hidroxila resultou apenas na contração do material após a compressão. A polaridade do grupo -OH acaba por ser um entrave a interação com CO₂, devido ao caráter fortemente apolar do solvente. (REICHARDT, 2007) Outro fator a ser ponderado é que a interação dendrímero-dendrímero é de maior expressão nesta classe, uma vez que há possibilidade de ligação de hidrogênio entre os grupos periféricos.

2.4.1.4. Solubilidade Mínima dos Dendrímeros e Diagrama de Fase Simplificado

Outro parâmetro avaliado foi a solubilidade mínima dos dendrímeros no fluido supercrítico. A solubilidade não foi estudada exaustivamente, se restringindo a sua determinação em 48 horas, devido a finalidade do material. Uma vez que se objetivou

testes de encapsulamento, se mostrou necessário *a priori* se conseguir uma estimativa da solubilidade para se planejar ensaios onde o dendrímero apenas apresentasse inchamento e outros onde houvesse dissolução total do material.

O inchamento se mostra mais interessante do ponto de vista do encapsulamento/impregnação de compostos ativos em uma matriz polimérica por ser de mais simples operação, permitindo a pronta obtenção do material final. Ensaios onde o polímero e o composto ativo estão ambos dissolvidos no meio envolvem outros parâmetros que acabam por extrapolar o escopo deste estudo.

A solubilidade foi aferida pela diferença de massa do material antes e após o ensaio de expansão e é demonstrada através do valor de concentração em massa. Junto a estes valores se encontram dados de pressão de névoa dos dendrímeros. Este valor se mostra relevante, pois determina os valores de pressão onde o sistema se apresenta como bifásico e assim serve de guia para o planejamento de ensaios de encapsulamento.

Tabela 2.2. Valores de Pressão de Névoa e solubilidade mínima dos dendrímeros solúveis em scCO₂

	Temperatura (°C)	Concentração de dendrímero (% m/m)	Pressão de névoa P _N (bar)
TMP-[G#2]-Acetonida	34,9 ± 0,1	0,26	96,8 ± 0,9
	45,0 ± 0,2	0,16	127 ± 2
	55,1 ± 0,2	0,15	155 ± 2
	65,1 ± 0,2	0,13	174 ± 2
TMP-[G#2]-Acetila	34,9 ± 0,2	0,23	90 ± 3
	45,2 ± 0,2	0,15	135 ± 1
	55,2 ± 0,2	0,11	151 ± 1
	65,1 ± 0,3	0,11	176 ± 2
TMP-[G#2]-Glucosilato	35,2 ± 0,3	NA	122 ± 4
	45,3 ± 0,2	NA	117 ± 6
	55,0 ± 0,4	NA	140 ± 3
	65,0 ± 0,2	NA	160 ± 2
DDD-[G#2]-Acetonida	35,1 ± 0,2	0,17	100 ± 1
	45,1 ± 0,2	0,17	123 ± 2
	54,9 ± 0,3	0,16	145 ± 2
	65,0 ± 0,2	0,11	164 ± 3

*NA- Não aferido por limitações experimentais

Os valores de pressão de névoa acompanham a tendência da variação da densidade do meio. Dessa forma, para a manutenção de um sistema monofásico, ao longo do aumento de temperatura, se faz necessário o incremento no valor da pressão.

A solubilidade dos materiais se mostra elevada tendo em vista a massa molar desses compostos.(GREGOROWICZ et al., 2013) Esta, ainda, se mostra dependente dos grupos periféricos, uma vez que dendrímeros com grupos hidroxilas terminais não apresentaram nenhum grau de solubilização. Os materiais com grupos do tipo ácido glucônico peracetilado não tiveram suas solubilidades estimadas devido a limitações experimentais. Tal material se mostrava extremamente viscoso e durante o processo de descompressão, o material deixava o recipiente original, o que acabou por impossibilitar a pesagem do sistema após esta etapa. No entanto, não foi observada qualquer retração da fase dendrímica ao longo do tempo do experimento, evidenciando uma solubilização muito pequena.

Pressões de névoa são parâmetros dependentes da concentração do material dissolvido no solvente supercrítico. Dessa forma, a comparação dos valores de P_N nas diferentes temperaturas acaba por não apresentar elevada exatidão, devido ao fato de não se utilizar a exata massa (solúvel) de composto em cada determinação destas pressões. Porém, devido ao escopo deste estudo, as flutuações decorrentes dessa variável não se mostram um empecilho. Buscou-se uma comparação rudimentar dos valores de pressão de névoa, apenas com a finalidade de se determinar regiões onde o polímero sofre nenhuma ou tímida solubilização.

Através da Tabela 2.2 e da Figura 2.20, observa-se que os materiais apresentam valores de P_N similares, demonstrando que a diferença dos grupos periféricos pouco contribui para a alteração deste parâmetro.

Figura 2.20. Diagramas de fase simplificado (p x T) de 4 tipos de dendrímeros

2.4.2. Espectroscopia Raman em Alta Pressão

O fenômeno de variação volumétrica evidenciou a interação do material dendrimérico com a molécula de CO_2 , sendo que a espectroscopia Raman teve por objetivo fundamentar os dados empíricos e tentar demonstrar a extensão dessas interações.

O arranjo experimental utilizado permitiu a aquisição de dados em alta pressão, o que significou o acompanhamento *in situ* da interação existente entre o dendrímero e a molécula de CO_2 . (RODRIGUEZ-MEIZOSO; LAZOR; TURNER, 2012)

Ainda que em termos de equipamento de alta pressão os ensaios não necessitaram de severas modificações, o ajuste da cela de medida acrescentou um grau de dificuldade a obtenção de dados. Devido a seu corpo metálico (passível de refrações) e suas espessas janelas de safira (não totalmente transparentes para o laser utilizado e

passíveis de reflexões internas) o cuidado para o posicionamento em relação à radiação incidente foi extremamente criterioso.(LOUVEL et al., 2015)

A intensidade da radiação incidente, assim como seu comprimento de onda, foi ajustada para superar todas as implicações que as tomadas de dados em alta pressão requereram.

Muitos estudos apresentam a interação material- CO_2 através do deslocamento das bandas de CO_2 , (BESNARD et al., 2007; KACHI et al., 2007) com a finalidade do entendimento de como o solvente interage com o soluto. No entanto, o enfoque do presente trabalho recai sobre o material dendrímérico, e deste modo, buscou-se acompanhar as bandas deste. Este tipo de análise se mostra de maior complexidade devido às intensas bandas da molécula de CO_2 , dada a elevada concentração molar deste frente a concentração de dendrímero.

Como material modelo foi utilizado o dendrímero TMP-[G#2]-Acetonida, dado a sua interação com o solvente demonstrada no ensaio de variação volumétrica. Assim doravante, neste tópico, o termo dendrímero se refere a esta única espécie.

Figura 2.21. Espectro Raman de CO_2 em diferentes condições experimentais (intensidade e comprimento de onda do laser) e espectro Raman do dendrímero em $scCO_2$ frente ao espectro obtido da cela de medida (sem CO_2)

O material dendrímérico teve duas regiões analisadas: os estiramentos das ligações C-H e o estiramento do grupo carbonílico C=O. Essas duas janelas espectrais são demonstradas na Figura 2.22.

Figura 2.22. Espectros Raman de dendrímero em scCO₂. Janelas espectrais magnificadas para melhor observação dos deslocamentos. DEND: dendrímero TMP-[G#2]-Acetonida

Os resultados obtidos demonstram que tanto a banda da carbonila ($\sim 1740\text{ cm}^{-1}$), como as bandas referentes a ligação C-H sofrem alterações na presença de scCO₂. A possível influência da cela de medida é descartada, apresentando-se os resultados para o aparato juntamente com os demais.

Em termos de interações específicas, seriam esperadas as do tipo ácido-base de Lewis, entre os grupos carbonila do dendrímero e a molécula de CO₂ (Figura 2.23). (KIM, K. H.; KIM, 2008; NELSON; BORKMAN, 1998; RAVEENDRAN; WALLEN, 2002a; WANG, J. et al., 2010) Tal raciocínio foi suportado pelo resultado obtido. Neste cenário, o grupo carbonila do dendrímero acabaria por doar densidade eletrônica (configurando uma base de Lewis) para o eletrofílico átomo de carbono do CO₂ (ácido de Lewis). (NELSON; BORKMAN, 1998) Deste modo, havendo esta interação, seria observado um deslocamento do valor da vibração da carbonila do dendrímero para regiões de maior energia, fenômeno este confirmado no deslocamento da banda de $1745\text{ para }1739\text{ cm}^{-1}$.

Figura 2.23. Possíveis interações do tipo ácido-base de Lewis entre a molécula CO_2 e os grupos carbonila internos e periféricos do dendrímero

2.4.3. *Uso de Dendrímicos Contendo Cadeias de Polilactato Linear (PLA) na Superfície para Impregnação de Fármacos*

Dendrímicos contendo polímeros lineares (polilactato - PLA) foram sintetizados e tiveram seu comportamento estudado em $scCO_2$, para testes posteriores de impregnação/encapsulamento. Para tanto, inicialmente foram sintetizados dendrímicos com tamanhos diversos da cadeia linear de polilactato, um contendo 12 unidades de repetição e outro 35, em média. Objetivou-se avaliar a influência acarretada pelo tamanho da cadeia no comportamento do material quando da sua utilização em $scCO_2$.

Outro fator avaliado foi a influência da alteração do grupo periférico, substituindo-se o grupo polar $-OH$ pelo grupo acetila, menos polar e de caráter CO_2 -fílico.(RAVEENDRAN; WALLEN, 2002b)

2.4.3.1. *Síntese dos Materiais*

As cadeias modificadoras de polilactato (PLA) foram introduzidas em dendrímicos de segunda geração contendo núcleo de TMP. Tais materiais foram rotulados como: TMP-[G#2]-PLAX, onde **X** denota o número de unidades de repetições.

Em termos sintéticos, os dendrímeros foram utilizados como macroiniciadores, onde cada grupo periférico -OH foi reagido com lactídeo, através de uma reação de abertura de anel, havendo formação de uma ligação do tipo éster. O controle sobre o tamanho da cadeia foi efetuado variando-se a razão monômero/macroiniciador (ATTHOFF et al., 1999).

As condições experimentais e o catalisador utilizado foram estabelecidos segundo diversas metodologias presentes na literatura (ATTHOFF et al., 1999; NAKAJIMA et al., 2011). A etapa de acetilação foi adaptada de metodologia prévia, utilizada na acetilação dos grupos -OH do dendrímero não modificado. (Esquema 2.1)

Esquema 2.1. Rota sintética para conjugação de polilactato na periferia do dendrímero e posterior acetilação da hidroxila terminal

Iniciar o processo de polimerização nas hidroxilas superficiais do material dendrímérico requereu alguns cuidados. A reação demandou condições experimentais que impedissem a presença de água no sistema. Moléculas de água poderiam iniciar processos de polimerização paralelos que poderiam comprometer a síntese por consumir monômeros e gerar cadeias lineares não conjugadas.

Com esta premissa, todos os reagentes sofreram alguma etapa preparativa para retirada de água e todas as reações foram conduzidas em atmosfera inerte (N₂). O

macroiniciador, por contar com um número elevado de hidroxilas, sofreu alguns ciclos de secagem promovido por tratamento e remoção de tolueno.

Após o tempo estipulado de reação, o material foi purificado para remoção do catalisador, monômeros não reagidos e oligômeros, através de precipitação seletiva em metanol frio. Deste modo, macromoléculas de elevado peso molecular foram precipitadas e a repetição dessa metodologia permitiu a remoção das demais espécies que continuavam dissolvidas.

Os materiais sintetizados foram, então, caracterizados por 1H RMN e por MALDI-TOF. (Figura 2.24)

Figura 2.24. Espectros de 1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros conjugados com PLA. MALDI-TOF superior: TMP-[G#2]-PLA12-OH; inferior: TMP-[G#2]-PLA35-OH

O número de monômeros presentes em cada material foi obtido e comparado entre as duas técnicas. No espectro de 1H RMN a integração dos sinais característicos da cadeia de polilactato (*e.g.* hidrogênios **a** na Figura 2.24) foi comparada com a integração

de picos do material dendrímérico (*e.g.* hidrogênios **c+c'**). Essa comparação permitiu a determinação do número de unidades de repetição e, por consequência, da massa do dendrímero modificado. Os sinais correspondentes a hidrogênios do núcleo do dendrímero apresentaram comprometimento de sua integração, tendo em vista a sua pequena magnitude no espectro.

Em consonância com os resultados obtidos, os espectros de massa apresentaram valores similares aos calculados e, deste modo, confirmou-se a massa dos dois materiais contendo cadeias de PLA.

A modificação dos grupos hidroxila terminais se valeu de uma etapa de acetilação e purificação através de precipitação seletiva. Um excesso de anidrido acético foi utilizado na tentativa de superar qualquer limitação trazida pela presença de água residual na reação.

Estes materiais foram submetidos aos mesmos tipos de análises e os resultados são demonstrados a seguir (Figura 2.25).

Figura 2.25. Espectros de ¹H RMN e MALDI-TOF de materiais modificados por grupo acetila terminal. MALDI-TOF superior: TMP-[G#2]-PLA12-Acetila; inferior: TMP-[G#2]-PLA35-Acetila

A acetilação do grupo $-OH$ terminal pôde ser confirmada pelo aparecimento de um novo pico no espectro de 1H RMN, em ~ 2.2 ppm, referente aos hidrogênios de $-CH_3$ do grupo acetila. A integração deste pico permitiu, então, a determinação do número de grupos acetilas reagidos com a macromolécula. Os espectros de 1H RMN revelaram um grau de acetilação de 50% para o material PLA12 e 66% para o material PLA35. Os espectros de massa não auxiliaram na determinação deste grau de acetilação visto o pequeno incremento promovido pelo grupo acetila ($\sim 43,0$ Da) na massa total da macromolécula.

2.4.3.2. Comportamento dos Dendrímeros em $scCO_2$

Polilactatos, por vezes, apresentam como característica marcante a sua elevada cristalinidade devido ao arranjo de suas cadeias (MAHMOOD et al., 2014). Esta característica acaba por acrescentar uma variável importante quando da sua interação com solventes.

De um ponto de vista molecular, cadeias de polilactato apresentam elevado potencial para a sua aplicação em CO_2 . O grande número de ligações do tipo éster, podem garantir interações favoráveis com a molécula de CO_2 . (ALTARSHA et al., 2012; MAHMOOD et al., 2014) No entanto, ainda que essas interações sejam possíveis e prováveis, a elevada cristalinidade acaba por ser uma barreira ao processo.

Na tentativa de se ter conhecimento das características dos materiais nesta questão, foi avaliado o ponto de fusão dos dois materiais sintetizados, contendo grupos $-OH$ terminais. (Figura 2.26)

Figura 2.26. DSC dos dendrímeros modificados com cadeias lineares de polilactato

A análise térmica demonstra um evento compartilhado pelas duas amostras em ~78 °C. Porém, os dendrímeros apresentam temperaturas de fusão (117 e 153 °C) marcadamente distintas, sendo o valor para o dendrímero com maior cadeia de PLA; PLA35; 1,3 vezes maior.

Em vista da aplicação do material em scCO₂, os primeiros ensaios visaram a otimização da temperatura de operação do sistema. O material modificado foi disposto no interior do equipamento de alta pressão e o sistema foi pressurizado e mantido a 250 bar. Buscou-se, então, obter a menor temperatura possível onde houvesse a fusão do material. A menor temperatura foi objetivada para se evitar condições severas de operação, o que poderia configurar um entrave para a utilização de um fármaco (uma molécula provavelmente mais sensível à temperatura).

Idealmente, esta avaliação apresentaria resultados mais exatos através de uma análise de DSC em alta pressão (MAHMOOD et al., 2014). No entanto, este equipamento, não trivial, não se mostrou disponível e, deste modo, o comportamento do material pressurizado em diferentes temperaturas foi efetuado visualmente.

O meio pressurizado tinha por objetivo o rebaixamento do ponto de fusão dos materiais estudados, propriedade esta muito explorada na indústria de polímeros.(HASHIM; YUSOH, 2015; NALAWADE; PICCHIONI; JANSSEN, 2006; SAUCEAU et al., 2011) A molécula de CO_2 se intercala nas cadeias poliméricas, permitindo que estas passem a ter uma mais facilitada movimentação, passando a requerer uma menor energia térmica para fusão.

Deste modo, sob um meio pressurizado, ambos os materiais apresentaram fusão a uma temperatura de $\sim 75^\circ C$. Este valor foi, então, fixado para todas as demais etapas avaliadas: variação volumétrica e incorporação de fármacos.

A variação volumétrica foi avaliada para os materiais: TMP-[G#2]-PLA12-OH, TMP-[G#2]-PLA35-OH e TMP-[G#2]-PLA12-Acetila, sendo os resultados demonstrados a seguir.

Figura 2.27. Expansão e retração volumétrica de TMP-[G#2]-PLA12-OH ao longo de 48 h. Condições p= 250 bar, T= 75 °C

Figura 2.28. Retração volumétrica de TMP-[G#2]-PLA35-OH ao longo de 48 h. Condições: p= 250 bar, T= 75 °C

Figura 2.30. Comparação de expansão e retração volumétrica entre diferentes dendrímeros modificados com PLA. Condições: $p = 250$ bar, $T = 75$ °C

Os resultados de expansão e contração volumétrica (Figuras 2.27–2.30) demonstram que o tamanho da cadeia linear é um importante fator no tocante a interação com o scCO₂. O material contendo a cadeia curta apresentou expressiva expansão, enquanto aquele modificado com uma cadeia maior apenas demonstrou retração. Esse comportamento reflete o balanço das interações: polímero-polímero e polímero-solvente. A cadeia de maior extensão apresenta uma maior interação de suas cadeias e dessa forma impede uma efetiva interação com o solvente.

Ainda neste sentido, a utilização de um material ramificado auxilia em diminuir esta interação entre as cadeias lineares,(ZHOU, M. et al., 2015) o que favorece sua interação com o solvente. Desse modo, o uso de dendrímeros não somente se mostra interessante devido a existência de vacâncias no interior do material, como também pela diminuição das interações entre as cadeias lineares.

O material após o estudo em scCO₂ foi analisado por DSC e evidenciou alterações nos eventos térmicos apresentados pela macromolécula. Assim, pode-se assumir que a impregnação e posterior remoção de CO₂ altera o arranjo das cadeias de polilactato.

Figura 2.31. DSC de dendrímeros modificados com PLA antes e após ensaio em scCO₂. Condição: p= 250 bar, T= 75 °C, t= 48 h

Uma vez que grupos -OH não apresentam boa afinidade com a molécula de CO_2 devido seu caráter polar, a acetilação do material se mostrou como uma interessante opção para modulação de suas propriedades. Ainda que somente metade dos grupos -OH tenham sido derivatizados, esta alteração já se mostrou suficiente para a macromolécula interagir de modo mais intenso com o CO_2 . Observa-se uma maior expansão deste material frente ao seu equivalente com -OH periféricos. (Figura 2.30)

O material TMP-[G#2]-PLA35-OH também sofreu a etapa de acetilação, porém o resultado em $scCO_2$ (não apresentado) não demonstrou qualquer modificação de comportamento, não havendo expansão em nenhuma extensão. Deste modo, estes dendrímeros não foram usados em ensaios subsequentes.

Ainda que a acetilação tenha resultado em um ganho de propriedade por parte do dendrímero modificado, optou-se por utilizar a espécie com grupos hidroxila terminais (TMP-[G#2]-PLA12-OH). Isso se deveu ao fato de permitir um estudo de maior efetividade frente a tecnologia já estudada para dispositivos desenvolvidos a partir de polilactato, visto que a maior parte destes apresentam como terminação o grupo -OH. (LASPRILLA et al., 2012; MADHAVAN NAMPOOTHIRI et al., 2010; RASAL; JANORKAR; HIRT, 2010) Adicionalmente, os estudo de degradabilidade e toxicidade já disponíveis estariam em maior consonância com o material sem modificações em suas terminações. (ATHANASIOU; NIEDERAUER; AGRAWAL, 1996; CHU; MONOSOV; AMIEL, 1995)

2.4.3.3. Estudo de Impregnação de Fármacos Auxiliada por $scCO_2$ - Avaliação da Quantidade de Fármaco Impregnada

Os ensaios de encapsulamento/impregnação, em um primeiro momento, foram efetuados a fim de se obter condições ótimas para que pudesse ser realizado o *scale-up* do ensaio. Em todos estes foi utilizado o dendrímero TMP-[G#2]-PLA12-OH.

Na tentativa de se elucidar o processo de impregnação na estrutura do material dendrímérico utilizando $scCO_2$, foram utilizados dois fármacos de características marcadamente diferentes: ibuprofeno ($\log P = 3,5$)(DRUGBANK) e fluconazol ($\log P = 0,58$)(DRUGBANK) (Figura 2.32), sendo a avaliação de impregnação realizada através de espectroscopia Raman.

Figura 2.32. Fármacos utilizados nos estudos de impregnação/encapsulamento em $scCO_2$

Inicialmente, foi verificada a estabilidade dos fármacos à temperatura de 75 °C nas condições experimentais de encapsulamento, em contato com o solvente supercrítico (250 bar, 48 h). O material inicial e final foi analisado por 1H RMN e foi constatado que os fármacos não sofreram qualquer processo de degradação no período de tempo estipulado. (resultados não mostrados)

A fim de se obter um estudo qualitativo do sistema, o primeiro ensaio consistiu em um encapsulamento de ibuprofeno por 24 horas se utilizando uma proporção molar de 10:1 fármaco/dendrímico. Através da análise de imagens, foi observado que a mistura das duas substâncias fundidas (a 250 bar) sofre expansão e a partir de 4 horas o

ibuprofeno passa a ser solubilizado pelo CO_2 , sendo retirado da matriz polimérica. Isso se tornou evidente pela contração do volume da fase estudada, tendo-se que o dendrímero, previamente, foi estabelecido como insolúvel no fluido supercrítico. Em consonância a este fenômeno, ao final do período, durante a depressurização, foi observada a formação de névoa no sistema, o que assegura a presença de ibuprofeno livre (não impregnado) no meio.

Deste modo, adotou-se 4 horas como o tempo do ensaio para ibuprofeno, na tentativa de se otimizar o processo de impregnação e evitar a migração deste para a solução. A proporção entre moléculas de ibuprofeno e dendrímero foram determinadas através de 1H RMN. O resultado obtido é mostrado na Figura 2.33.

Figura 2.33. 1H RMN de dendrímero-PLA, ibuprofeno e do material resultante do processo de impregnação em $scCO_2$. Em destaque, os picos utilizados para cálculo da razão molar após o ensaio.* denota sinais de solvente e/ou água

Tabela 2.3. Resultados de testes de impregnação em scCO₂

Razão Inicial Ibuprofeno/Dendrímero (mol)	Período de Impregnação (h)	Razão Final Ibuprofeno/Dendrímero (mol)
1 : 1	4	0,3 : 1
10 : 1	24	1,4 : 1
10 : 1	4	3,4 : 1
10 : 1*	4	3,6 : 1

*Denota saturação do solvente com ibuprofeno

Os resultados obtidos (Tabela 2.3) demonstraram que o ensaio limitado a 4 horas realmente se mostrou mais efetivo, confirmando o fenômeno avaliado visualmente. Neste caso, não se observou a formação de névoa quando o reator foi despressurizado.

O mesmo tipo de avaliação foi realizado para o fármaco fluconazol. Porém o sistema apresentou algumas adversidades e frente a seu objetivo (avaliação espectroscópica da impregnação), foi reduzido o número de condições testadas.

Neste sistema também se verificou que, após determinado tempo, o fármaco passa a migrar da matriz polimérica para o solvente, resultando em um baixo grau de incorporação na matriz polimérica. Contrariamente ao que foi realizado com a amostra de ibuprofeno, as amostras contendo fluconazol não permitiram avaliação visual e, deste modo, o período de impregnação foi mantido em 24 horas, havendo apenas variação da razão fármaco/polímero.

Figura 2.34. 1H RMN de dendrímero-PLA, fluconazol e material resultante de impregnação em $scCO_2$. Em destaque picos utilizados para cálculo de razão molar. *denota sinais de solventes e/ou água

Tabela 2.4. Resultados de ensaios de impregnação de fluconazol em $scCO_2$

Razão Inicial Fluconazol/Dendrímico (mol)	Período de impregnação (h)	Razão Final Fluconazol/Dendrímico (mol)
5 : 1	24	1 : 1
10 : 1*	24	10 : 1

*Denota saturação do solvente com fluconazol

Frente às dificuldades de modulação do tempo para obtenção de melhores resultados de impregnação, foi efetuada a saturação do solvente ($scCO_2$) a fim de se mitigar a migração do fármaco presente na matriz fundida do dendrímero. Isto foi alcançado adicionando-se o fármaco diretamente no vaso reacional, fora do aparato contendo a mistura dendrímero/fármaco.

Os resultados apresentados para ambos os casos (Tabela 2.3-2.4) mostram que a saturação do solvente se mostra uma estratégia válida para uma maior razão de fármaco/dendrímero no material final.

2.4.3.4. Análise Térmica dos Materiais após Processamento com Ibuprofeno em scCO₂

O processo de encapsulamento molecular, ou formação de um complexo de inclusão, pode ser evidenciado através de análises de DSC, uma vez que o desaparecimento do evento térmico da fusão da substância encapsulada é indicativo da efetiva separação de suas moléculas, havendo alojamento dentro de outra espécie.(GURARSLAN et al., 2015)

Ainda que complexos de inclusão (encapsulamento molecular) possam ocorrer em estruturas dendríticas, quando estas possuem grupos lineares em sua periferia se torna difícil a ocorrência, exclusiva, deste fenômeno. Isso porque o material dendrítico e as estruturas lineares podem sofrer um rearranjo quando em contato com o scCO₂ e neste cenário se torna possível tanto o aporte do fármaco nas cavidades do material, assim como em novos ambientes gerados pela conformação das cadeias lineares. Em ambos os casos, o fármaco se encontraria protegido do meio exterior o que acarretaria em sua liberação gradativa. No entanto, esta impregnação não significaria o isolamento entre as moléculas de fármacos, sendo esperada a presença de domínios de fármaco dentro da estrutura do material final.

Ancoradas nestes conceitos, as análises de DSC buscaram avaliar o impacto do fármaco (ibuprofeno) no material dendrimérico e verificar as alterações no rearranjo do material, evidenciado por alterações em seus eventos térmicos.

Primeiramente, foi analisado o fármaco processado em CO_2 para se verificar se o ensaio com fluido supercrítico poderia acarretar a amorfização do fármaco, fato este que também resultaria no desaparecimento de seu pico de fusão em uma análise térmica. Tal possibilidade não se confirmou e o ibuprofeno processado nas condições de encapsulamento/impregnação se apresentou com algum grau de cristalinidade, com um evidente pico de fusão. (Figura 2.35)

Figura 2.35. DSC do fármaco ibuprofeno antes e após exposição a $scCO_2$ (processado)

A análise térmica do material puro, apresentada na Figura 2.31, mostra que o material dendrimérico apresenta eventos térmicos característicos em temperaturas em torno de 110-120 °C, enquanto que o ibuprofeno apresenta um evento em 79-80 °C. Estes sinais configuraram os guias para avaliação do material final através de DSC.

Para melhor comparação do material processado em $scCO_2$, houve a mistura puramente física (mistura de sólidos) entre o material dendrimérico e o fármaco em

proporção idêntica às utilizadas na impregnação em scCO_2 . Este material também foi analisado por DSC, sendo os resultados demonstrados a seguir.

Figura 2.36. DSC da mistura física (5:1) Ibuprofeno/Dendrímtero e do material resultante (3,6:1) após etapa de impregnação em scCO_2

A análise da mistura física dos dois materiais (Figura 2.36 - linha tracejada vermelha) apresenta o evento térmico do dendrímtero em 110 °C, havendo um pequeno decréscimo da temperatura de fusão do ibuprofeno, passando esta para o valor de 73 °C. Para o caso do material impregnado em ensaio realizado em scCO_2 , tem-se a manutenção do evento do ibuprofeno, mas há alteração do evento térmico do dendrímtero.

O evento na região de 110-120 °C está relacionado à conformação das cadeias de polilactato na periferia do dendrímtero, sendo que o tratamento deste em CO_2 demonstrou, previamente (Figura 2.31), o rearranjo destas. No entanto, a alteração observada quando há a impregnação de fármaco se mostra marcadamente distinta deste rearranjo. Desta forma, ainda que o material não tenha permitido a separação molecular do ibuprofeno, a análise térmica permite inferir que o ibuprofeno deva estar inserido

entre as cadeias de polilactato, resultando em uma matriz polimérica impregnada com fármaco.

2.4.4. Análise Espectroscópica da Interação Fármaco-Dendrímero

As interações possíveis entre o material polimérico e o fármaco apresentam papel de destaque no fenômeno de encapsulamento/impregnação. Regiões/domínios de características marcadamente distintos (*e.g.* hidrofílico/hidrofóbico) podem garantir o aprisionamento efetivo do fármaco em uma certa região da estrutura tridimensional do material. Isto garantiria um processo de impregnação mais efetivo (direcionado) e uma liberação dependente da extensão deste fenômeno.

Com o objetivo de avaliar o tipo de interação entre os fármacos utilizados e os dendrímeros contendo cadeias lineares de PLA, foram efetuados alguns estudos utilizando a espectroscopia RAMAN para tal fim.

2.4.4.1. Análise Espectroscópica da Interação Fármaco-Dendrímero (Ibuprofeno)

Inicialmente o fármaco alvo (ibuprofeno) foi submetido à comparação de seu espectro antes e após processamento em $scCO_2$, visando garantir que as bandas observadas não sofreriam modificações após a precipitação do material dissolvido no fluido supercrítico. O resultado obtido evidenciou que o processamento não resultou em quaisquer alterações destas bandas.

Como regiões de interesse, estabeleceram-se as seguintes janelas espectrais: 1550-1620 cm^{-1} e 620-680 cm^{-1} .(ROSSI, B. et al., 2009) A primeira objetivava observar o comportamento do grupo carbonílico do fármaco.(ALTARSHA et al., 2012)

Os materiais submetidos ao ensaio foram: fármaco puro, sua mistura física com o dendrímero e o material resultante do ensaio de impregnação em $scCO_2$, sendo a proporção fármaco/dendrímero variada segunda a razão discriminada. O espectro do dendrímero foi utilizado como branco para as análises que contavam com sua presença.

Figura 2.37. Espectros Raman de ensaios com ibuprofeno. Onde: MF: mistura física, IMP: impregnação, sendo apresentada a razão molar fármaco:dendrímero e o tempo do ensaio. *sat indica saturação do fluido supercrítico com o fármaco. **A-** Diferentes tipos de ensaio, **B-** Destaque dos ensaios de impregnação

O sinal referente à carbonila (1608 - 1613 cm^{-1}) se mostrou mais evidente na maior parte das análises e dessa forma os resultados foram comparados avaliando-se o deslocamento deste.

O ibuprofeno puro apresentou esta banda no intervalo entre 1608-1609 cm^{-1} , (KAZARIAN, S. G.; MARTIROSYAN, 2002; ROSSI, B. et al., 2009) na quase totalidade dos

espectros, no entanto, experimentalmente não foi possível a observação desta banda no material fundido.

No caso dos ensaios de mistura física, onde o fármaco e o material dendrimérico (ambos sob a forma de pó) foram apenas misturados e analisados, o que se observa é a manutenção do valor para a carbonila do ibuprofeno, sugerindo que não há qualquer interação entre os materiais. A mistura física de razão 10:1 apresentou limitações experimentais e acabou por resultar na não observação de qualquer banda.

O material submetido à impregnação em $scCO_2$, por sua vez, apresentou um resultado distinto e vinculado ao período de impregnação. Os espectros Raman mostram que em períodos curtos (4 h) o ibuprofeno não se insere efetivamente na matriz composta pelo dendrímero. Porém, para períodos mais dilatados, como 24 h, há a alteração do pico para o valor de 1613 cm^{-1} . Este valor já estabelecido em outros estudos,(KAZARIAN, S. G.; MARTIROSYAN, 2002; ROSSI, B. et al., 2009) evidencia que a molécula de ibuprofeno está inserida em outro ambiente, no caso, no interior de outro material.

Esta alteração, mostrada em detalhe na Figura 2.37, é observada nas duas condições experimentais aplicadas ao material com razão molar 10:1, sendo evidente o papel do tempo neste fenômeno.

A fim de se comparar o fenômeno observado na impregnação auxiliada por $scCO_2$ com outras abordagens, foram efetuados ensaios utilizando-se outras condições. Foram avaliados o que o processo de fusão e tratamento em solvente orgânico (DCM) acarretariam em termos de impregnação e arranjo molecular.

Figura 2.38. Espectros Raman de ensaios com ibuprofeno. Onde: **IMP**: impregnação em scCO_2 , **IMP DCM**: impregnação utilizando-se diclorometano, **MELT**- Fusão da mistura física de fármaco e dendrímero. São apresentados os valores da razão fármaco/dendrímero e o tempo do ensaio, quando pertinente. *sat denota ensaio realizado em condições de saturação do solvente com fármaco.

Como observado na Figura 2.38 os resultados obtidos para as duas novas condições (fusão e uso de DCM) se mostraram semelhantes ao obtido no ensaio de impregnação com scCO_2 . Desta forma, ficou demonstrado que nestas abordagens existe a inserção do fármaco na estrutura polimérica, havendo interação entre a molécula de ibuprofeno e a estrutura do dendrímero.

2.4.4.2. Análise Espectroscópica da Interação Fármaco-Dendrímero (Fluconazol)

Em raciocínio análogo ao aplicado a incorporação de ibuprofeno, alguns ensaios foram realizados a fim de se observar as interações de fluconazol com o material

dendrímérico. Tal abordagem se mostra interessante frente ao caráter hidrofílico da molécula, característica esta diametralmente contrária à do ibuprofeno.

Por se tratar de uma molécula de maior complexidade, o fluconazol apresenta algumas bandas que podem ser exploradas através de espectroscopia Raman. As bandas analisadas estão esquematicamente discriminadas na Figura 2.39.

Figura 2.39. Representação dos modos de vibração analisados por espectroscopia Raman

Figura 2.40. Espectros Raman de fluconazol em diferentes ensaios. Cores das bordas auxiliam na representação dos modos de vibrações contemplados pela janela espectral apresentada. C-OH ($\sim 1024\text{ cm}^{-1}$), C-C ($\sim 1116\text{ cm}^{-1}$), deformação angular do anel triazólico ($\sim 967,5\text{ cm}^{-1}$), respiração do anel triazólico ($\sim 1138\text{ cm}^{-1}$); C=C ($\sim 1617\text{ cm}^{-1}$). IMP: Impregnação em $scCO_2$, são discriminadas as razões fármaco/dendrímico e o tempo do ensaio

Figura 2.41. Espectro Raman de fluconazol em diferentes ensaios. Cores das bordas auxiliam na representação dos modos de vibração contemplados pela janela espectral apresentada. Respiração do anel 2,4-difluorobenzil ($\sim 736,4\text{ cm}^{-1}$), respiração do anel triazólico ($\sim 1138\text{ cm}^{-1}$)

Contrariamente ao observado para o ibuprofeno, o fluconazol processado em $scCO_2$ apresenta distinção em suas bandas, (CHANDRASEKARAN; THILAK KUMAR, 2015) quando comparado ao composto puro. O material processado ainda apresenta uma dramática alteração de morfologia, sendo que ao final do experimento o pó inicialmente granulado se torna um material fiado.

No entanto, ainda que o fármaco apresente por si mesmo alterações de suas bandas, as observadas nos materiais impregnados são distintas, o que auxilia no entendimento de cada um dos fenômenos.

Os espectros Raman (Figura 2.40, Figura 2.41) demonstram que há deslocamento dos modos de vibração analisados, após etapa de impregnação. Isso acaba por denotar que a molécula de fármaco se encontra em um outro ambiente, no interior da matriz dendrímica, e que há interação de seus grupos funcionais com os grupos oriundos do dendrímero.

A intensidade deste deslocamento se mostrou dependente da razão fármaco/dendrímérico, o que pode estar vinculado a quantidade de moléculas impregnadas, o que acabaria por alterar a intensidade do sinal do fármaco.

2.5. Conclusão

O estudo sistemático de variação volumétrica de materiais dendríméricos em $scCO_2$ permitiu a racionalização sobre o impacto de certos parâmetros, como geração e grupos periféricos. Este conhecimento permitiu designar os materiais mais promissores para continuidade dos ensaios em $scCO_2$.

No tocante a grupos periféricos, materiais poliacetilados foram estudados devido a seu potencial caráter CO_2 -fílico. Estes materiais tiveram o resultado esperado e demonstraram a potencialidade deste tipo de grupo frente ao seu uso em $scCO_2$.

Polilactato (PLA) se mostrou uma escolha valiosa para modificação do dendrímérico. O material de excelentes propriedades biomédicas cumpriu com sucesso seu papel em impregnação de fármacos utilizando uma tecnologia alternativa (SCF). Mais uma vez, ficaram demonstrados os efeitos decorrentes de alterações no material, como tamanho de cadeia e grupos periféricos.

A espectroscopia Raman se mostrou uma excelente ferramenta de análise para a observação de interações entre materiais e fármacos, permitindo a junção desses resultados com os obtidos por DSC. Adicionalmente, a espectroscopia em alta pressão permitiu a fundamentação do processo de expansão observado para dendrímeros (não-modificados) em $scCO_2$.

Os resultados obtidos fundamentam uma tecnologia de encapsulamento/impregnação muito promissora, permitindo um mais efetivo planejamento no que tange o elevado número de variáveis de sistemas compressíveis.

Capítulo 3. Interação de Poliésteres Dendriméricos com Modelo de Epitélio Pulmonar e sua Formulação em Aerossol

3.1. Introdução

3.1.1. Administração de Fármacos pelas Vias Aéreas

Em 1925, Gänsölen pela primeira vez demonstrou a viabilidade da inalação de insulina (um peptídeo de 51 aminoácidos - 5,7 kDa), sendo estes resultados, posteriormente, confirmados.(GÄNSSLEN, 1925) Por um período de cerca de 80 anos, o uso desta via de ingresso para macromoléculas foi pouco explorado, até o seu ressurgimento com a fabricação de insulina inalável e o aparecimento de diversas companhias no seguimento.(PATTON, J.; BUKAR; ELDON, 2004)

O sistema respiratório, assim como a pele, se apresenta como região de contato direto com o ambiente e representa uma via de aporte de agentes terapêuticos no corpo.(MARIANECCI et al., 2011) O aumento da incidência de doenças pulmonares de elevada gravidade e mortalidade, como o câncer, tem atraído atenções para este campo. Dentre todos os tipos de tumores malignos, o câncer de pulmão tem grande destaque e ocupa o primeiro lugar em mortes causadas pela doença. Este tipo de câncer acarreta mais mortes que os três tipos mais comuns combinados (próstata, mama e cólon), sendo o número de mortes nos EUA: 160.340, em 2012,(SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2012) 159.480, em 2013.(SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013)

A administração de fármacos pelas vias aéreas emerge neste cenário como uma alternativa não invasiva para o tratamento de diversas desordens. Além do

direcionamento para os pulmões, tal via se mostra interessante para administração sistêmica de agentes terapêuticos. Potenciais vantagens do uso desta rota frente a outras, como intravenosa e oral, incluem:

- elevada área superficial - é estimado que existam 300 milhões de células alveolares no pulmão humano, o que resulta em uma área superficial de 80-90 m² para troca gasosa nos pulmões.(KUNDA et al., 2013) Os sacos alveolares consistem em apenas uma monocamada epitelial, assim permitindo, em situações adequadas, o rápido transporte de moléculas através dos pulmões para administração sistêmica (Figura 3.1).

Figura 3.1. Comparação entre o epitélio pulmonar em diferentes regiões (PATTON, J. S.; BYRON, 2007)

- reduzida degradação enzimática. Alguns fármacos (*eg.* imipramina,(GRAM; CHRISTIANSEN, 1975) propranolol(VOGELGESANG et al., 2004) e midazolam(PAINE et al., 1996)) podem ser inativados rapidamente na primeira interação com o metabolismo, no sistema digestivo e no fígado. A administração pelas vias aéreas evita o efeito de primeira passagem (*first-pass*).

- alta concentração local. Sistemas de *drug delivery* utilizando as vias aéreas são particularmente promissores em tratamentos de desordens pulmonares como: câncer de pulmão, doença de obstrução pulmonar crônica (COPD) e fibrose cística. A elevada concentração local, rápida ação terapêutica e minimização da absorção sistêmica

permitem a diminuição de efeitos colaterais.(CHOI et al., 2010; SEMMLER-BEHNKE et al., 2007)

Apesar das numerosas vantagens da utilização da administração através das vias aéreas, alguns fatores podem potencialmente limitar a implementação desta abordagem. Tais limitações incluem os desafios tecnológicos inerentes à inalação, à toxicidade de fármacos ao pulmão, à indução de novas doenças e aos desafios impostos pelo mecanismo de defesa dos pulmões.(KUZMOV; MINKO, 2015)

Moléculas pequenas e moderadamente hidrofóbicas apresentam absorção rápida pelos pulmões. No entanto, o aumento do caráter hidrofóbico acarreta a insolubilidade do composto na interface do tecido pulmonar, resultando em sua persistência no pulmão por horas, dias ou semanas. (PATTON, J. S.; BYRON, 2007) Dessa forma, a modulação do caráter hidrofóbico dos compostos utilizados, apresenta impacto direto na absorção do mesmo pelo tecido pulmonar.

Nebulizadores, inaladores pressurizados dosimetrados (*pressurized meter-dose inhaler* - pMDI) (Figura 3.2) e inaladores de pó seco (*dry powder inhalers* - DPIs) são as três principais categorias para administração de fármacos pelas vias aéreas.(TRAINI; YOUNG, 2013a;2013b) pMDI é uma tecnologia para aerossóis muito bem desenvolvida e largamente aceita por pacientes devido à sua portabilidade, robustez em seu uso e elevada deposição pulmonar do agente terapêutico, respondendo por 60% dos produtos de aerossol no mercado.(MYRDAL; SHETH; STEIN, 2014; STEIN et al., 2014)

Figura 3.2. Inalador do tipo pMDI (*pressurized meter dose*)

No entanto, grande parte dos fármacos não se mostra solúvel e/ou dispersível nos propelentes utilizados em dispositivos pMDI's sendo que tensoativos e/ou co-solventes são por vezes requeridos para sua dispersão. A dificuldade de desenvolvimento de tensoativos por vezes restringe a aplicação de pMDI's, assim como problemas no tocante ao meio ambiente.(CHENG, 2014; LU, D.; HICKEY, 2007)

3.1.2. Nanocarreadores Dendriméricos - DNC's

O uso biomédico de nanotecnologia se iniciou há mais de 50 anos, muito antes da comunidade científica cunhar o termo “nano”. Lipossomos foram descobertos em meados da década de 1960 e podem ser definidos como o primeiro dispositivo de nanomedicina.(FRIBERG; NYSTRÖM, 2015) Estes foram, então, usados como vetores para formulações farmacêuticas, sendo esta aplicação investigada e expandida no final da década de 1970, com o uso de macromoléculas anfifílicas (como polímeros para formação de micelas).

Dentro do contexto de nanotecnologia o termo nanocarreador (*nanocarrier*) tem sido utilizado para descrever sistemas multifuncionais híbridos com tamanho variando entre 1-200 nm, os quais promovem o transporte de agentes bioativos até o seu órgão/tecido/célula alvo, com aumento da atividade terapêutica, quando comparado ao agente bioativo livre.(KHANDARE et al., 2012)

Atualmente, grande parte das novas moléculas utilizadas para fins terapêuticos apresenta dificuldades de transporte, devido a problemas de solubilidade, tamanho, sensibilidade a degradação e instabilidade. Outras questões existentes no

desenvolvimento de novos compostos são os efeitos adversos e janelas terapêuticas.(RABANEL et al., 2012) Neste cenário, a utilização de um nanocarreador permite superar um ou mais destes entraves, como, por exemplo aumentar o tempo de residência ou proteger a molécula contra rápida degradação, entre outras possibilidades.

Figura 3.3. Características físicas de nanopartículas em termos de biocompatibilidade *in vivo* (NEL et al., 2009)

A classe de polímeros denominada polímeros terapêuticos engloba diferentes classes de sistemas, incluindo fármacos poliméricos, conjugados polímero-fármaco, micelas poliméricas ligadas covalentemente a fármacos, agregados poliméricos multicomponentes (incluindo ligações covalentes) e complexos pró-fármaco/proteína.

Materiais dendriméricos encontram lugar para a conjugação de fármacos em sua superfície. Tal abordagem apresenta diversos atributos benéficos para aplicações biomédicas, incluindo as seguintes:(LEE et al., 2005)

- Propriedades de biodistribuição e farmacocinética, que podem ser moduladas controlando-se o tamanho e conformação do dendrímero. Isto pode ser obtido com precisão, variando-se o número da geração ou criando híbridos dendrímero-polímero linear.
- Homogeneidade estrutural e química. As propriedades biológicas do dendrímero podem ser atribuídas a uma única entidade molecular e não a uma

distribuição estatística, existente no caso de polímeros lineares ou materiais auto-organizáveis. Este fato facilita a reprodutibilidade e obtenção de dados farmacocinéticos dentro de um mesmo lote, ou entre lotes diferentes.

- Possibilidade de ser funcionalizado com múltiplas cópias de um fármaco, cromóforo ou ligante, tanto em seu interior como em sua periferia. Dendrons podem também ser utilizados para aumentar a capacidade de internalização de fármaco ou de carreadores, como anticorpos e polímeros biocompatíveis.

- Alta densidade de sítios de ligação. Diferentemente de polímeros lineares, a medida que a geração do dendrímero aumenta, a densidade de sítios de ligação em sua superfície também sofre incremento, o que pode fortalecer a interação de um par ligante-receptor e aumentar o direcionamento promovido pelos componentes atrelados ao dendrímero.

- Degradação controlada. Isto pode ser alcançado por uma escolha apropriada da química do dendrímero, com modos de degradação acessíveis, possibilitando a degradação controlada do material.

3.1.3. Conjugação de Poli(etileno glicol) - PEGlação

O campo emergente da nanoterapia apresenta múltiplos casos de inovações bem-sucedidas relacionadas à conjugação de polímeros com fármacos e proteínas. Diversos polímeros têm sido aprovados para o uso em conjugação para sistemas de transporte de agentes bioativos. No entanto, poli(etilenoglicol) (PEG) (Figura 3.4) permanece como a escolha majoritária na síntese de pró-fármacos.(KHANDARE et al., 2012) O termo PEGlação define a modificação de uma proteína, peptídeo ou molécula pela ligação

covalente de uma ou mais cadeias de PEG. Este polímero é não-tóxico, não-imunogênico, não-antigênico, altamente solúvel em água e aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*). (PASUT; VERONESE, 2012)

Figura 3.4. Molécula de poli(etilenoglicol)

A PEG $\textit{gl}a\tilde{c}\tilde{a}\tilde{o}$ teve sua primeira aparição nos anos 1970, em que houve a inserção do polímero em catalase e albumina, sendo este evento um marco para a modificação de enzimas com manutenção de suas atividades.(ABUCHOWSKI et al., 1977) Desde então, uma infinidade de nanocarreadores (incluindo lipossomos, nanopartículas, nanotubos de carbono, microesferas, *quantum dots* e dendrímeros) têm sido modificados com PEG, com o objetivo de modulação de propriedades.(THAKUR et al., 2015)

Propriedades de superfície, incluindo carga, composição e hidrofobicidade são reconhecidamente fatores determinantes para o comportamento de nanocarreadores *in vivo*. O corpo humano é extremamente complexo e apresenta diversas barreiras extracelulares e intracelulares para este tipo de carreador. As barreiras extracelulares para administração sistêmica incluem principalmente a opsonização (absorção proteica) e a ativação e remoção pelo sistema reticuloendotelial (RES). (BELTING; SANDGREN; WITTRUP, 2005; KHALIL et al., 2006) Para superar estas barreiras o nanocarreador precisa ser hidrofílico e apresentar uma superfície neutra para reduzir a opsonização e a subsequente remoção efetuadas pelos macrófagos do RES. Por outro lado, a barreira intracelular de maior importância é a membrana celular, a qual é composta por uma bicamada lipídica negativamente carregada devido a proteoglicanas de sulfato de heparana. Membranas celulares são conhecidas por impedir o ingresso na célula de

macromoléculas hidrofílicas e negativamente carregadas. Fica claro que os requisitos para os nanocarreadores superarem as barreiras extracelular e intracelular são conflitantes.(ZOU; WANG; FENG, 2015)

A PEG*l*ação acaba por ser um grande aliado para superar as barreiras extracelulares. A técnica permite mitigar: absorção do carreador pelo RES, perda de fármaco ligado ao carreador, imunogenicidade, toxicidade hemolítica, citotoxicidade e hidrofobicidade, além de contribuir positivamente para o transporte transepitelial e direcionamento para tumores.(THAKUR et al., 2015)

Metoxi-PEG, $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$ é a base de diversos produtos PEG*l*ados aprovados, seja em sua forma linear ou ramificada. Duas propriedades-chave deste polímero são sua grande flexibilidade e o elevado grau de hidratação de sua cadeia. O volume hidrodinâmico de uma cadeia de PEG é maior que a de uma proteína globular de mesmo tamanho molecular, devido à coordenação de um grande número de moléculas de água, cerca de 6-7 por unidade monomérica.(PASUT; VERONESE, 2012)

Dessa forma, a junção do uso de PEG com as demais tecnologias disponíveis na nanomedicina se mostra de grande valia. A modulação de propriedades com um composto seguro e aprovado abre novos horizontes para extrapolação das mais diversas limitações quando da utilização de nanocarreadores.

3.2. Objetivos

Os objetivos desta etapa contemplaram:

- (i)** Síntese de materiais dendriméricos de diferentes gerações conjugados com FITC e mPEG
- (ii)** Avaliação do perfil de degradação dos materiais em valores de pH biologicamente pertinentes
- (iii)** Estudo da toxicidade dos materiais sintetizados e fragmentos, frente a células do modelo de epitélio pulmonar
- (iv)** Estudo da modulação de transporte, impacto na monocamada celular, e internalização de dendrímeros e conjugados, em modelo de epitélio pulmonar
- (v)** Uso dos nanocarreadores dendriméricos em formulação pMDI e estudo das propriedades do aerossol resultante

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Modificações dos Materiais Dendriméricos

3.3.1.1. Procedimento para Síntese de TMP-[G#3]-FITC (3.1)

Em um balão de fundo redondo, foram dissolvidos 15 mg ($5,8 \cdot 10^{-3}$ mmol - 0,140 mmol de OH - 1 eqv.) de dendrímero TMP-[G#3]-(OH)₂₄; 54,5 mg (0,14 mmol - 1 eqv.) de isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 19,5 µL (0,14 mmol - 1 eqv.) de trietilamina em 5 mL de DMF. Esta mistura foi aquecida a 95 °C e sofreu a adição de 82,94 µL (0,14 mmol - 1 eqv.) de laurato de di-isobutil-estanho (DBTL). A reação foi mantida por 4 h sob aquecimento, resfriada à temperatura ambiente e deixada para reagir por 24 h adicionais. A mistura reacional foi então dialisada (MWCO= 1 kDa) contra DMF por 24 h (com trocas periódicas do solvente) e 24 h contra água deionizada. O conteúdo do saco de diálise foi então congelado e liofilizado, resultando em um pó alaranjado. Todas as etapas foram efetuadas sob proteção da luz.

(3.1)
Sólido Laranja
Rendimento: 72%

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 0,84 (t, 3H, -CH₃); 1,00-1,23 (m, 63H, -CH₃); 3,43-4,23 (m, 84H, -CH₂); 6,57-8,32 (m, 22H, -CH); 10,12 (s, 5H, -CH)

3.3.1.2. Procedimento para Síntese de TMP-[G#4]-FITC (3.2)

Em um balão de fundo redondo, foram dissolvidos 15 mg ($2,8 \cdot 10^{-3}$ mmol - 0,134 mmol de OH - 1 eqv.) de dendrímero TMP-[G#4]-(OH)₄₈; 52,3 mg (0,134 mmol - 1 eqv.) de isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 18,7 µL (0,134 mmol - 1 eqv.) de trietilamina em 5 mL de DMF. Esta mistura foi aquecida a 95 °C e sofreu a adição de 80 µL (0,13 mmol - 1 eqv.) de laurato de di-isobutil-estanho (DBTL). A reação foi mantida por 4 h sob aquecimento, resfriada à temperatura ambiente e deixada reagir por 24 h adicionais. A mistura reacional foi então dialisada (MWCO= 1 kDa) contra DMF por 24 h (com trocas periódicas do solvente) e 24 h contra água deionizada. O conteúdo do saco de diálise foi então congelado e liofilizado resultando em um pó alaranjado. Todas as etapas foram efetuadas sob proteção da luz.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 0,84 (t, 3H, -CH₃); 1,00-1,16 (m, 135H, -CH₃); 3,43-4,23 (m, 180H, -CH₂); 6,65-8,01 (m, 20H, -CH); 10,17 (s, 5H, -CH)

3.3.1.3. Procedimento para Síntese de mPEG-COOH (3.3)

mPEG-OH MW=1000 Da (10,0 g, 0,01 mol) em 40 mL de diclorometano anidro foi reagido com 10 mL de uma solução de anidrido succínico (2,20 g, 22 mmol) em 10 mL de DMF, na presença de DMAP (2,69 g, 22 mmol) e trietilamina (3,35 mL; 24 mmol). A reação permaneceu sob agitação por 15 min a 0 °C, e então foi aquecida à temperatura

ambiente, permanecendo sob esta condição por 48 h. A solução foi concentrada para 10 mL sob pressão reduzida. O produto foi, então, precipitado em 100 mL de dietil éter gelado. O precipitado resultante foi secado sob fluxo de ar e posteriormente redissolvido em 40 mL de água deionizada. A solução aquosa foi acidificada até pH 3,5 e extraída com diclorometano (3 x 50 mL). As fases orgânicas combinadas foram secadas com MgSO₄. O solvente foi, então, evaporado sob pressão reduzida, resultando em um material ceroso branco.

(3.3)
Sólido Branco
Rendimento: 87%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 2,61-2,67 (m, 4H, -CH₂); 3,38 (s, 3H, -CH₃); 3,54-3,68 (m, 90H, -CH₂); 4,25-4,27 (m, 2H, -CH₂)

3.3.1.4. Procedimento para Síntese de TMP-[G#3]-mPEG (3.4)

Em um balão de fundo redondo, foram dissolvidos 20 mg de dendrímero TMP-[G#3]-(OH)₂₄ (7,8 · 10⁻³ mmol - 0,19 mmol de OH - 1 eqv.); 560 mg de mPEG-COOH (0,56 mmol - 3 eqv.) e 82 mg (0,67 mmol - 3,6 eqv.) de DMAP em 10 mL de DMF. Esta solução foi mantida sob agitação a 0 °C por 5 min. A esta solução foi, então, adicionada, gota a gota, uma solução de 129 mg (0,672 mmol - 3,6 eqv.) de EDC (cloreto de *N*-(3-dimetilaminiopropil)-*N'*-etilcarbodiimida) em 2 mL de DMF. A reação foi, então, aquecida à temperatura ambiente e mantida sob esta condição por 5 dias. Posteriormente, o solvente foi evaporado à pressão reduzida, sendo o resíduo restante redissolvido em água deionizada e dialisado (MWCO - 8 kDa) contra água durante 48 h. O conteúdo do saco de diálise foi submetido a ultracentrifugação em filtro Amicon

(Millipore - MWCO = 10 kDa). A solução aquosa resultante foi congelada e liofilizada durante 24 h, resultando em um pó branco.

(3.4)
Sólido Branco
Rendimento: 83%

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 0,84 (t, 3H, -CH₃); 1,04-1,17 (m, 63H, -CH₃); 2,54 (s, 16H, -CH₂); 3,24 (s, 48H, -CH₃); 3,42-3,58 (m, 1.440H, -CH₂); 4,10 (m, 84H, -CH₂)

3.3.1.5. Procedimento para Síntese de TMP-[G#4]-mPEG (3.5)

Em um balão de fundo redondo, foram dissolvidos 15 mg de dendrímero TMP-[G#4]-(OH)₄₈ (2,8 · 10⁻³ mmol - 0,13 mmol de OH - 1 eqv.); 402 mg de mPEG-COOH (0,40 mmol - 3 eqv.) e 60 mg (0,48 mmol - 3,6 eqv.) de DMAP em 5 mL de DMF. Esta solução foi mantida sob agitação a 0 °C por 5 min. A esta solução foi então adicionada, gota a gota, uma solução de 75 mg (0,48 mmol - 3,6 eqv.) de EDC (cloreto de *N*-(3-dimetilaminiopropil)-*N'*-etilcarbodiimida) em 2 mL de DMF. A reação foi, então, aquecida à temperatura ambiente e mantida sob esta condição por 5 dias. Posteriormente, o solvente foi evaporado à pressão reduzida, sendo o resíduo restante redissolvido em água deionizada e dialisado (MWCO - 8 kDa) contra água durante 48 h. O conteúdo do saco de diálise foi submetido a ultracentrifugação em filtro Amicon (Millipore - MWCO = 10 kDa). A solução aquosa resultante foi congelada e liofilizada durante 24 h, resultando em um pó branco.

(3.5)
Sólido Branco
Rendimento: 86%

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 0,81 (t, 3H, -CH₃); 0,97-1,14 (m, 135H, -CH₃); 2,52 (s, 96H, -CH₂); 3,22 (s, 72H, -CH₃); 3,39-3,56 (m, 2.160H, -CH₂); 3,53-3,56 (m, 90H, -CH₂); 4,08 (m, 90H, -CH₂); 4,48 (s, 12H, -OH); 4,83 (s, 12H, -OH)

3.3.1.6. Procedimento para Síntese de TMP-[G#4]-FITC-mPEG (3.6)

Em um balão de fundo redondo, foram dissolvidos 5 mg de dendrímero TMP-[G#4]-FITC ($8,15 \cdot 10^{-4}$ mmol - 0,039 mmol de OH - 1 eqv.); 117,4 mg de mPEG-COOH (0,12 mmol - 3 eqv.) e 17,2 mg (0,14 mmol - 3,6 eqv.) de DMAP em 2 mL de DMF. Esta solução foi mantida sob agitação a 0 °C por 5 min. A esta solução foi então adicionada, gota a gota, uma solução de 27 mg (0,14 mmol - 3,6 eqv.) de EDC (cloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida) em 1 mL de DMF. A reação foi, então, aquecida à temperatura ambiente e mantida sob esta condição por 5 dias. Posteriormente, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, sendo o resíduo restante redissolvido em água deionizada e dialisado (MWCO - 8 kDa) contra água durante 48 h, com trocas periódicas do solvente. O conteúdo do saco de diálise foi submetido a ultracentrifugação em filtro Amicon (Millipore - MWCO = 10 kDa). A solução aquosa resultante foi congelada e liofilizada durante 24 h, resultando em um pó alaranjado. Todas as etapas foram efetuadas sob proteção da luz.

(3.1)

Sólido Laranja
Rendimento: 59%

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): δ 0,84 (t, 3H, -CH₃); 0,99-1,23 (m, 135H, -CH₃); 2,54 (s, 76H, -CH₂); 3,24 (s, 57H, -CH₃); 3,41-3,58 (m, 1,806, -CH₂); 4,10 (s, 90H, -CH₂); 4,51 (s, 12H, -OH); 4,86 (s, 12H, -OH); 6,54-6,66 (m, 13,2H, -CH); 7,17-8,09 (m, 6,6H, -CH); 10,08 (s, 4,4H, -CH)

3.3.2. Ensaios de Degradação

Experimentos de degradação foram conduzidos seguindo protocolo previamente estabelecido.(FELIU et al., 2012) Em resumo, TMP-[G#4]-(OH)₄₈ e TMP-[G#4]-21PEG_{1k} (5,0 mg) foram dissolvidos em 10 mL de soluções tampão fosfato ou citrato de força iônica constante (I= 0,15M), em valores de pH de relevância biológica (pH 7,4 e 4,5). A força iônica foi ajustada com adição de KCl. As soluções de dendrímeros foram mantidas sob suave agitação a 37 °C, sendo alíquotas retiradas em intervalos específicos para análise em MALDI-TOF MS.

3.3.3. Cultura de Células Calu-3

Células Calu-3, derivadas do epitélio dos brônquios das vias aéreas humanas, foram utilizadas como modelo para estudos de transporte e internalização dos conjugados dendriméricos. Tais células foram cultivadas em frascos de cultura celular de 75 cm² com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

suplementado com 10% FBS e 1% de solução de antibiótico (AB, penicilina-estreptomicina) em incubadora mantida a 37 °C e atmosfera contendo com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Células foram divididas na razão de 2:3 quando atingiram confluência de *ca.* 90%.

3.3.4. Citotoxicidade dos Materiais Dendriméricos, Conjugados e Fragmentos

A viabilidade celular das culturas de células de Calu-3 na presença dos materiais dendriméricos foi determinada utilizando o ensaio MTT (Promega) como descrito na literatura.(PROMEGACORP, 2010) A solução reagente foi preparada segundo o protocolo do fabricante e estocada a -20 °C antes de sua utilização. Células foram cultivadas em uma densidade de 15.000 células por poço, em uma placa de 96 poços, com DMEM suplementado com 10% FBS e 1% AB. As células permaneceram incubadas durante 24 h para sua adesão e crescimento e, após este período, os poços foram lavados 3 vezes com 1X PBS (*phosphate buffer solution*), sendo o meio substituído por diferentes concentrações de materiais dendriméricos em DMEM fresco. O material foi, então, incubado durante 48 h. Após este período, os poços foram lavados duas vezes com 1X PBS e receberam a adição de 10 µL de solução do ensaio MTT (em HBSS) e 100 µL de HBSS. As placas foram, então, incubadas por 4 h a 37 °C, 5% CO₂, passado este tempo removeu-se 75 µL do meio de cada poço, sendo adicionados 50 µL de DMSO. Após 15 minutos (para dissolução dos cristais de formazan) as placas foram submetidas a análise de UV-Vis no comprimento de onda 570 nm, utilizando um leitor de placas (Molecular Devices, CA) para verificar a viabilidade celular. Células não submetidas ao tratamento com moléculas de dendrímeros foram utilizadas como controle e o total de morte celular foi determinado pela comparação de absorbância do ensaio com células tratadas frente

sua contraparte não tratada. Os resultados são expressos como a média de 6 poços para cada concentração.

3.3.5. Transporte *in vitro* de Dendrímeros através de Monocamadas de Calu-3

3.3.5.1. Crescimento Celular em Inserts Transwell®

Uma média de $5 \cdot 10^4$ células Calu-3 em 0,2 mL de DMEM contendo 20% FBS e 1% de AB foram semeadas no compartimento apical de cada *insert* Transwell® (membrana de poliéster, tamanho de poro 0,4 μm ; 0,33 cm^2) sendo estes dispostos em placas de 24 poços. Os compartimentos basolaterais foram preenchidos com 0,6 mL de DMEM com 20% FBS e 1% AB. O crescimento celular deu-se ao longo de 48 h (em incubadora, 37 °C, 5% CO_2), sendo o meio de cultura retirado do compartimento apical após este período. As células tiveram seu crescimento em condições de interface atmosfera-líquido (*atmosphere-liquid interface* - ALI). O meio de cultura do compartimento basolateral foi trocado todos os dias. As células foram selecionadas para o ensaio de transporte quando atingiram confluência, parâmetro este monitorado pelas medidas de resistência elétrica transepitelial (*transepithelial electrical resistance* - TEER). As medições de TEER foram efetuadas com eletrodos do tipo *chopstick* (STX-2) e voltâmetro EVOM (World Precision Instruments) como descrito a seguir: o meio no compartimento basolateral era trocado por DMEM fresco e então 0,2 mL de DMEM era colocado no compartimento apical do *insert* e incubado por 30 min para equilíbrio do sistema. Simultaneamente, os eletrodos eram equilibrados por 30 min em DMEM fresco. Após esta etapa, os eletrodos eram mergulhados tanto na solução do compartimento apical, quanto basolateral, sendo a resistência entre os dois compartimentos medida pelo voltâmetro EVOM.

3.3.5.2. Transporte *in vitro*

Ensaio de transporte *in vitro* foram conduzidos quando os valores de TEER da monocamada nivelaram em seu valor máximo *ca.* 1.000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (*ca.* 11 dias). HBSS (1X, pH 7,3) foi, então, adicionado aos compartimentos apical (0,2 mL) e basolateral (0,6 mL) do *insert* e o valor de TEER foi medido antes da adição das soluções contendo material dendrimérico (definido como valor inicial). O meio do compartimento apical foi trocado por soluções contendo 50 nmol (equivalente de FITC) de conjugados dendriméricos ($n=6$ para cada amostra) em 0,2 mL de HBSS (1X, pH 7,3) e novamente o valor de TEER foi medido. Este valor foi definido como $t=0$, e o *insert* foi movido para o próximo compartimento basolateral. Todos os compartimentos basolaterais foram previamente preenchidos com HBSS e, então, após a medição de TEER, o *insert* era movido para o próximo poço, permanecendo na nova posição por 1 hora. Durante todo o experimento a placa de 24 poços foi mantida em incubadora (37 °C, 5% CO_2), sendo apenas retirada para as medidas de TEER e alterações na posição do *insert*. Os *inserts* foram movidos para um novo poço a cada hora, ao longo de 5 horas. Após o término do ensaio 0,1 mL da solução de cada compartimento basolateral (6 para cada período de tempo) e compartimento apical (6 no total) foram coletados e analisados em fluorímetro (Biotek Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader). O transporte do compartimento apical para o basolateral ($A \rightarrow B$) foi expresso pela permeabilidade aparente ($P_{app} A \rightarrow B$), a qual pode ser calculada pela equação:

$$P_{app} = \frac{F}{A \times C_0} \quad (3)$$

Onde **F** é o fluxo, ou razão da massa cumulativa transportada, **A** é a área do *insert* e **C₀** é a concentração inicial de dendrímero ou conjugado. Após o ensaio, 3 *inserts* de

cada amostra (n=3) foram utilizados para monitoramento da recuperação da monocamada celular através de TEER. A camada celular foi lavada duas vezes com HBSS fresco e 0,2 mL de DMEM (20% FBS e 1% AB) foi adicionado ao compartimento apical e subsequentemente as placas foram mantidas em incubadora (37 °C, 5% CO₂). Os valores de TEER foram então medidos 24, 48 e 72 horas após o término do experimento de transporte.

3.3.5.3. Internalização durante Transporte *in vitro*

Os 3 *inserts* restantes foram utilizados para a avaliação da internalização de dendrímeros e conjugados por células Calu-3 durante o experimento de transporte. Resumidamente, as soluções contendo dendrímeros e conjugados foram removidas e a monocamada celular foi lavada duas vezes com HBSS a 4 °C, para cessar a internalização celular. A monocamada foi destacada com 0,2 mL de uma solução 0,25% tripsina-EDTA e sofreu lise *overnight* utilizando-se 0,5 mL de uma solução aquosa de Triton-X100 (0,5 % m/m). O lisado celular foi centrifugado para concentração dos fragmentos celulares, sendo o sobrenadante usado para análise de fluorescência de FITC. A internalização de dendrímeros e conjugados foi normalizada através do conteúdo proteico celular, utilizando-se o ensaio BCA. Para o balanço de massa, a quantidade internalizada pelas células, transportada para o compartimento basolateral e retida no compartimento apical foram somadas e comparadas à massa inicial.

3.3.5.4. Transporte de Dendrímeros e Conjugados através de Camada de Muco Sintético

O transporte de dendrímeros e conjugados através de uma camada de muco pulmonar sintético também foi estudada. O muco sintético é composto por mucina (23 mg/mL) e solução tampão (85 mM NaCl; 20 mM HEPES; pH 7,3). Este foi agitado a 4 °C *overnight*. 30 µL de uma mistura de dendrímero ou conjugado (50 nmol de equivalente de FITC) e muco sintético (resultando em uma camada de *ca.* 900 µm) foi adicionada no compartimento apical de um *insert* Transwell® (sobre a membrana), o qual foi colocado em uma placa de 24 poços (n=3 para cada amostra). Os compartimentos basolaterais foram preenchidos com 0,6 mL de HBSS-HEPES fresco (1X; pH 7,3; HEPES 0,1 mmol/L). Os *inserts* foram movidos a cada 1 hora para um novo poço contendo HBSS-HEPES fresco e o experimento foi finalizado após 5 horas. Durante todo o experimento a placa de 24 poços foi mantida em incubadora (37 °C, 5% CO₂), sendo apenas removida para alterações nas posições dos *inserts*. Após o término, a solução de HBSS-HEPES alocada no compartimento basolateral (n=3 para cada amostra) foi analisada através da fluorescência de FITC para quantificar a extensão do transporte das espécies.

3.3.6. Internalização de Dendrímeros e Conjugados Analisados por Citometria de Fluxo (FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorting)

Células Calu-3 foram cultivadas a uma densidade de 300.000 células por poço em uma placa de 24 poços em meio DMEM suplementado com 10% FBS e 1% AB, sendo incubadas a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. As células tiveram seu crescimento até confluência por um período de 11-12 dias (resultando em células polarizadas). No dia final, as células foram pré-incubadas em 1X HBSS por 30 min antes

da incubação com soluções (50 nmol equivalente de FITC) de dendrímeros e conjugados em 1X HBSS, pela adição de 500 µL de solução em cada poço em diversos períodos de tempo (0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 e 5 horas). Durante todo o experimento a placa de 24 poços foi mantida na incubadora (37 °C, 5% CO₂), sendo apenas removida para adição de amostras. As células foram, então, lavadas com 1X HBSS (pH 7,2; 4 °C) e foi adicionado 0,2 mL de uma solução 0,1% m/v de Trypan Blue em cada poço para cessar qualquer fluorescência resultante de conjugados retidos na superfície das células. As células foram, então, lavadas novamente com 1X HBSS e destacadas de cada poço, sendo centrifugadas à temperatura ambiente a 1500 rpm por 5 min para formação de um *pellet*. Este foi ressuspenso em tampão 1X HBSS para ser analisado via FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) usando-se um citômetro de fluxo Invitrogen Attune NxT, com excitação utilizando um laser Coherent Sapphire (488 nm) e detectado através de um filtro *bandpass* 530/30 (FITC). Os dados foram analisados pelo software Attune NxT. A intensidade média de fluorescência (*median fluorescence intensity* - MFI) de FITC foi utilizada para comparação da internalização dos conjugados pelas células, demonstrando a dependência de tal fenômeno com a geração do material e funcionalização da superfície.

3.3.7. Preparação de Formulação pMDI e Avaliação de sua Estabilidade Física

Uma massa conhecida de dendrímero foi pesada em um frasco de vidro para altas pressões (8412-B, West Pharmaceutical Services), sendo o frasco aquecido até a fusão do composto (< 60 °C). Após este fenômeno, o frasco recebeu a adição de 1% em volume, referente a quantidade de propelente demandada, de etanol seco, sendo prontamente selado (CroPharm, Inc.) com uma válvula de 63 µL (EPDM, 3M Drug Delivery Systems).

Um volume conhecido de propelente HFA-227 foi adicionado com auxílio de uma bomba tipo seringa (HiP, 50-6-15) e um carregador a alta pressão produzido para tal fim. O volume de propelente adicionado foi suficiente para obtenção de uma concentração de 1,5 mg/mL. O material foi disperso/dissolvido no propelente utilizando-se um banho de ultrassom (VWR, P250D, ajustado para 180W, 15-20 °C). A estabilidade física foi investigada, observando-se a sedimentação do material no propelente, visualmente, ao longo do tempo.

3.3.8. Caracterização do Aerossol das Formulações pMDI

Um aparato de oito estágios do tipo Impactador em Cascata de Andersen (Andersen Cascade Impactor, ACI, Copley Scientific), contando com um duto de indução USP e operando com um fluxo de 28,3 L/min a 25 °C e 75% de umidade relativa, foi utilizado para se avaliar as propriedades de aerossol das formulações pMDI descritas anteriormente. Antes de cada teste ACI, a formulação foi dispersa/dissolvida no propelente com ajuda de um banho de ultrassom por 10-15 min a 15-20 °C. Em seguida, 3 acionamentos da válvula dosadora foram efetuados e rejeitados. Após esta etapa preparativa, 10 acionamentos da válvula dosadora foram disparados no ACI, com um intervalo de 10 s entre cada ativação. Ao término do teste, o ACI era desmontado e tinha seu acionador (AC), duto de indução (IP), e todos os seus estágios lavados criteriosamente com 10 mL de água deionizada e mantidos imersos (no escuro) durante 20 min para a completa dissolução do material depositado. As soluções oriundas de cada componente foram então congeladas a -20 °C e liofilizadas por 48 h. O material foi, então, redissolvido em 2 mL de água e analisado por fluorescência de FITC, frente a uma curva de calibração previamente construída. A medida foi efetuada em quatro ensaios

independentes. As características de aerossol calculadas foram: fração respirável (RF, Eq. 4), fração de partícula fina (FPF, Eq. 5), diâmetro aerodinâmico médio mássico (MMAD) e desvio padrão geométrico (GSD). O valor de RF é definido como a razão entre a massa de composto coletada entre os estágios 0 e Filtro e a massa total de composto utilizada no ensaio de ACI. A FPF é definida pela razão entre a massa de composto coletada entre o estágio 3 e o filtro e a massa de composto coletada entre o estágio 0 e o Filtro. O valor de MMAD representa a média da distribuição de partículas aéreas levando-se em consideração o diâmetro aerodinâmico. Valores de MMAD, usualmente, são apresentados juntamente com valores de GSD, o qual demonstra a variabilidade na distribuição do tamanho da partícula. GSD também é definido como a raiz quadrada da razão entre 84,13% e 15,87% da distribuição de partículas. Os detalhes do cálculo de MMAD e GSD são descritos no trabalho de Wu.(WU, L.; AL-HAYDARI; DA ROCHA, 2008)

$$RF = \frac{\text{Estágio 0 até Filtro}}{\text{Atuador} + \text{Duto de indução} + \text{Estágio 0 até Filtro}} \quad (4)$$

$$FPF = \frac{\text{Estágio 3 até Filtro}}{\text{Estágio 0 até Filtro}} \quad (5)$$

3.3.9. Determinação de Tamanho de Partícula e Potencial ζ

Equipamento de DLS, Malvern Zetasizer, foi utilizado para ensaios de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e determinação de potencial ζ . O valor de diâmetro hidrodinâmico (HD) e de potencial ζ foram obtidos através da análise de uma solução 1 mg/mL de dendrímero ou conjugado. Adicionalmente, foi determinado o diâmetro de

solvatação (SD) para os dendrímeros dissolvidos em 2*H*,3*H*-perfluoropentano (HPFP), sendo este solvente modelo para propelentes. A concentração utilizada na formulação do dispositivo pMDI foi mantida (1,5 mg/mL), sendo o material dissolvido em uma solução contendo 1% v/v de etanol seco em HPFP. Antes das análises, a solução foi mergulhada em banho de ultrassom a 0-5 °C por 30 min. Ao menos 3 amostras independentes foram analisadas para determinação do tamanho médio de partícula e seu desvio correspondente.

3.3.10. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas apresentadas representam média $\pm$ desvio padrão. Os valores médios foram calculados a partir de no mínimo três medidas independentes ($n \geq 3$). Análises *one-way* de variância (ANOVA) seguidas de testes de comparação múltipla de Tukey foram realizadas através do software Origin (v9.1, OriginLab). Valores médios foram considerados estatisticamente diferentes se $p < 0,05$.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Síntese dos Materiais Dendriméricos Conjugados com mPEG

Dada a modulação de propriedades apresentada pela conjugação com o polímero linear PEG, essa derivatização se mostra promissora em vista do enfoque da aplicação dos materiais dendriméricos. Os dendrímeros utilizados nesta etapa foram: TMP-[G#3]-(OH)₂₄ e TMP-[G#4]-(OH)₄₈. Deste modo, doravante neste tópico, o termo dendrímero passa a se referir somente a estas duas espécies.

A fim de se introduzir tais cadeias nos materiais dendriméricos, foi utilizada a molécula de PEG contando com uma de suas extremidades derivatizada com um grupo metoxila (mPEG). Tal escolha visou à diminuição da complexidade reacional, uma vez que seriam utilizadas reações de esterificação que poderiam resultar em interconexão das cadeias de PEG, em detrimento de sua inserção no material dendrimérico, além de permitir o alinhamento com diversos casos reportados na literatura.(HAN et al., 2010; PASUT; VERONESE, 2012; THAKUR et al., 2015)

Dentro dessa premissa, o mPEG teve seu grupo -OH modificado para ácido carboxílico, utilizando-se para isso uma reação de abertura de anel, no caso anidrido succínico, como demonstrado no Esquema 3.1.

Esquema 3.1. Reação de esterificação de mPEG

Ainda que a literatura apresente uma grande variedade de compostos que se valem da conjugação do PEG para melhoria de suas propriedades,(BHARATWAJ et al., 2015; THAKUR et al., 2015), em sua grande maioria o grupo periférico modificado se

trata de um grupo amina ($-\text{NH}_2$). Tal grupo apresenta como vantagem sintética uma maior nucleofilicidade do que grupos $-\text{OH}$. Para efeito comparativo, o composto etilamina (EtNH_2) apresenta o valor de 12,87 (BROTZEL; CHU; MAYR, 2007) para o parâmetro de nucleofilicidade (N), já o álcool análogo etanol (EtOH) apresenta o valor de N igual a 7,03; (MINEGISHI; KOBAYASHI; MAYR, 2004) tendo a água um valor de N aproximadamente igual a 5. (MINEGISHI et al., 2004) Isto refletido no planejamento sintético, recai tanto na escolhas dos reagentes, assim como nas proporções destes.

A escolha do agente de acoplamento necessitou de diversos testes, variando-se tanto a razão molar catalisador/substrato, como o catalisador em si. Foram testados alguns catalisadores contendo o grupo carbodiimida $\text{RN}=\text{C}=\text{NR}$. (SHEIKH et al., 2010) Ainda que todos tenham funcionamento semelhante do ponto de vista mecanístico, a sensibilidade à água e o subproduto (ureia) formado após a reação apresentam marcante variação. Deste modo, os melhores resultados foram obtidos com EDC na presença de DMAP e esta combinação foi utilizada em todas as reações de *PEG*lação.

Outro fator vital para a obtenção de bons resultados nesta etapa, foi a criteriosa purificação do mPEGCOOH . Este, após sua síntese, poderia se encontrar na forma de carboxilato, com DMAP protonado como contra-íon, diminuindo assim sua reatividade. Para eliminar este problema, o material sofreu algumas etapas adicionais de purificação.

Esquema 3.2. Rota sintética para etapa de conjugação de mPEG em materiais dendriméricos: TMP-[G#3]-(OH)₂₄ e TMP-[G#4]-(OH)₄₈

Outro fator avaliado foi a razão molar mPEGCOOH/grupo -OH, uma vez que esta relação não apresentou linearidade com as densidades de PEG obtidas nos materiais finais. Contudo, utilizando-se 3 equivalentes/grupo -OH de mPEGCOOH, atingiu-se o limite de esterificação para as condições propostas.

Os resultados obtidos são discriminados a seguir.(Tabela 3.1) Para ensaios comparativos optou-se pela utilização de G#4 com 58% de -OH esterificados e G#3 com 54%.

Tabela 3.1. Resultados de conjugação de mPEGCOOH

Dendrímero	Razão Molar mPEGCOOH/OH	Massa Molar (g/mol) ¹ H RMN	Massa Molar (g/mol) MALDI-TOF	-OH Esterificados (%)
TMP-[G#3]-(OH) ₂₄	3	17.572	20.866	75
	1,5	NA	15.110	54
TMP-[G#4]-(OH) ₄₈	3	33.356	33.140	58
	1,5	NA	26.601	44

*NA- Não avaliado

Os materiais obtidos foram analisados por ¹H RMN e MALDI-TOF. (Figura 3.5, Figura 3.6)

Figura 3.5. Espectros de ^1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros de terceira geração conjugados com PEG.
* denota sinal residual de solvente

Figura 3.6. Espectros de ^1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros de quarta geração conjugados com PEG.
* denota sinal residual de solvente

Os resultados observados através dos espectros de ^1H RMN permitem definir o número de cadeias de mPEG conjugadas ao dendrímero através da comparação da integração de sinais referentes ao dendrímero (hidrogênios **a**) com a integração de sinais oriundos da molécula de mPEG (hidrogênios **c**, **d** e **m**). Por motivos de melhor definição do sinal, os hidrogênios **m** foram selecionados para a mais exata comparação com os sinais do dendrímero.

A densidade de PEG obtida na superfície dos dendrímeros, ainda que não muito maior que 50%, foi suficiente para a alteração das propriedades do material, dado o incremento no tamanho e alteração na solubilidade.

Os materiais PEGlados obtidos foram avaliados quanto à sua toxicidade, sendo o dendrímero de quarta geração submetido ao experimento de degradação. As condições experimentais otimizadas foram utilizadas nas demais etapas de PEGlção.

3.4.2. Síntese dos Materiais Dendriméricos Conjugados com FITC

A natureza dos ensaios de transporte transepitelial e formulação acabam por requerer a presença de um fluoróforo na macromolécula estudada, visto que estes se baseiam em quantidades diminutas que necessitam de uma detecção efetiva para a correta observação dos fenômenos.

Para tal finalidade, o composto isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi utilizado, dado seu extenso uso para marcação de espécies bioquímicas (GEORGE; GEETHA; APPUKUTTAN, 2015) e outras macromoléculas (eg. dextrana). (DE BELDER; GRANATH, 1973; HUBBARD; GHANDEHARI; BRAYDEN, 2014; MEI et al., 2015)

Novamente, o alvo sintético da grande maioria dos trabalhos foca na reação de amins terminais com o grupo tiocianato da molécula de FITC, se valendo da nucleofilicidade do átomo de nitrogênio. A fim de se contornar essa limitação, foi utilizado para esta etapa um catalisador muito comum para a síntese de materiais com ligações uretânicas, dilaurato de di-isobutil-estanho. Houve ainda a utilização de uma amina terciária (TEA), a qual interage com o catalisador, melhorando seu desempenho. A reação utilizada é demonstrada no Esquema 3.3.

Esquema 3.3. Esquema reacional para conjugação de FITC

Os materiais conjugados com FITC foram analisados por ^1H RMN e MALDI-TOF.

(Figura 3.7, Figura 3.8)

Figura 3.7. Espectros de ^1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros de terceira geração conjugados com FITC. *denota sinal residual de solvente e/ou água

Figura 3.8. Espectros de ^1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros de quarta geração conjugados com FITC. * denota sinal residual de solvente e/ou água

Nos espectros de ^1H RMN, os sinais provenientes da molécula de FITC não se apresentam muito bem definidos, visto que sua intensidade é muito baixa comparada a intensidade dos picos provenientes do dendrímero. No entanto, uma vez que os sinais dos hidrogênios do fluoróforo se encontram em uma região distante dos sinais oriundos do dendrímero, se torna possível a integração criteriosa da região. O valor obtido pode ser, então, comparado com a integração dos sinais do dendrímero, permitindo a determinação do número de moléculas de FITC conjugadas.

A proporção entre os reagentes objetivou a conjugação de uma molécula de dendrímero com duas moléculas de FITC, buscando-se garantir uma efetiva marcação da macromolécula. Tendo em vista a natureza da reação, o resultado, evidenciado pela espectrometria de massas demonstra uma distribuição de diferentes quantidades de FITC conjugadas a molécula de dendrímero. Dessa forma, o número de moléculas de FITC foi determinado via ^1H RMN, o que se mostrou em consonância ao estabelecido na literatura.(BHARATWAJ et al., 2015)

As duas gerações marcadas com FITC, TMP-[G#3]-FITC e TMP-[G#4]-FITC, foram submetidas aos ensaios de citotoxicidade e transporte, sendo o dendrímero de quarta geração utilizado para subsequente etapa de PEGlação.

3.4.3. Síntese de Dendrímeros Conjugados com PEG e FITC

Buscando-se o estudo da modulação de propriedades promovida por cadeias de PEG, o material de quarta geração marcado com FITC foi submetido a uma etapa de PEGilação. As condições previamente otimizadas foram utilizadas, resultando na efetiva conjugação com a molécula de PEG.

Os materiais obtidos foram caracterizados por ^1H RMN e MALDI-TOF. (Figura 3.9)

Figura 3.9. Espectros de ^1H RMN e MALDI-TOF de dendrímeros de quarta geração conjugados com PEG e FITC. *denota sinal residual de solvente e/ou água

A interpretação do espectro de ^1H RMN recaiu sobre a identificação dos sinais pertencentes a cada unidade da estrutura da macromolécula. Dessa forma, foram selecionados sinais pertencentes à estrutura do dendrímero e a integração destes serviu como base para as demais integrações. Realizando este procedimento, se mostrou possível a determinação do número de moléculas de FITC e PEG conjugadas ao material dendrímérico. Mais uma vez, os sinais de FITC se encontram afastados dos demais,

auxiliando na sua integração, enquanto o pico do grupo $\text{CH}_3\text{-O-}$ oriundo do mPEG permitiu a determinação do número de cadeias do polímero linear conjugadas.

A espectrometria de massas se mostrou coerente com o valor de massa calculado através dos dados retirados dos espectros de RMN.

Este material, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k}, foi utilizado para ensaios de citotoxicidade, transporte transepitelial, internalização e formulação pMDI.

3.4.4. Tamanho e Carga Superficial dos Materiais Sintetizados

Ainda que a ciência de nanomateriais muito tenha se desenvolvido nos últimos anos, alguns aspectos acabam por carecer de melhor entendimento. Dentro deste contexto se encontram os mecanismos de toxicidade de nanomateriais.

Características relacionadas a superfície e carga ainda são os alvos principais de estudos toxicológicos. No entanto, a utilização de uma macromolécula deve ser planejada criteriosamente e, além dos parâmetros citados, seu ciclo de vida deve ser estudado quando da sua aplicação em um sistema biológico.(KIM, S. T. et al., 2013; WANG, Y. et al., 2015)

Frente aos numerosos estudos realizados com dendrímeros da família do PAMAM,(BHARATWAJ et al., 2015; HUBBARD; BOND; GHANDEHARI, 2015; TAGHAVI POURIANAZAR; MUTLU; GUNDUZ, 2014) dendrímeros que apresentam toxicidade em extensa faixa de concentração em diversos tipos de células e não se apresentam biodegradáveis, a utilização de um dendrímero contendo ligações do tipo éster e com uma superfície neutra se mostra de grande apelo dentro do contexto da nanomedicina.

Dado o decisivo impacto de tamanho e carga superficial, os materiais sofreram a determinação destas propriedades, sendo os resultados sumarizados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Número de cadeias PEG conjugadas (n), massa molar (MW), tamanho (diâmetro hidrodinâmico, HD), potencial zeta (ζ) das macromoléculas sintetizadas determinados por ^1H RMN, MALDI-TOF, e espalhamento de luz (LS). Medidas de LS conduzidas em água a temperatura ambiente

Composto	NMR		MALDI		HD $\pm$ s.d.# (nm)	$\zeta \pm$ s.d.# (mV)	n _{FITC} x
	n _{PEG} @	MW@	n _{PEG} *	MW*			
TMP-[G#3]-(OH) ₂₄	0	2.572	0	2.571	0,9 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,2	0
TMP-[G#4]-(OH) ₄₈	0	5.359	0	5.359	1,2 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,2	0
TMP-[G#3]-FITC	0	3.507	0	3.351	0,8 $\pm$ 0,3	-2,8 $\pm$ 1,3	2,4
TMP-[G#4]-FITC	0	6.216	0	6.134	1,3 $\pm$ 0,4	-1,3 $\pm$ 1,4	2,2
TMP-[G#4]-FITC-19PEG _{1k}	19	25.964	18	24.257	4,2 $\pm$ 0,7	0,0 $\pm$ 0,4	2,2

n_{PEG}- número médio de moléculas de PEG conjugadas por dendrímero, estimado por (a) @= espectro de ^1H RMN e (b) *= MALDI-TOF MS. #= média e desvio padrão de 4 repetições. x= determinado por ^1H RMN

Como observado, os materiais sem cadeias de PEG apresentam diâmetros inferiores a 2 nm, sendo o impacto da inserção das moléculas de FITC praticamente negligenciável no que tange as dimensões da molécula.

A conjugação das moléculas de PEG no dendrímero de quarta geração promoveu o aumento de 323% em seu diâmetro hidrodinâmico. Este aumento se mostra coerente com dados teóricos existentes para PEG_{gl} de outras classes de dendrímeros.(YANG, L.; CABRAL; DA ROCHA) Uma vez que a superfície de grupos -OH do dendrímero tem caráter neutro, evidenciado pelo valor de potencial zeta, as cadeias de PEG tendem a

apresentar uma conformação hidratada, havendo mínima interação dos grupos periféricos com a cadeia de polímero linear.(YANG, LIN; DA ROCHA, 2014)

O valor de potencial zeta dos materiais, ainda que minimamente alterado pela conjugação de FITC, pode ser definido como neutro.

Estabelecendo-se tamanho e carga superficial, os materiais já se distanciam, em propriedade, de outras classes de dendrímeros, as quais reconhecidamente travam uma batalha para a mitigação de sua carga superficial (*eg.* PAMAM). O efeito de cargas positivas superficiais é reconhecidamente como prejudicial para as células, uma vez que acarretam efeitos deletérios na membrana celular.(CIEPLUCH et al., 2015)

3.4.5. Degradação dos Materiais Dendriméricos

Consonante com a questão de toxicidade promovida pela superfície e estrutura de nanopartículas, se encontra a sua via de eliminação do sistema biológico. Ainda que as dimensões de dendrímeros possibilitem a sua excreção, por vezes, através da filtração promovida pelos rins, a falta de conhecimento dos efeitos acarretados pela sua acumulação, ainda que temporária, estimula a busca por materiais biodegradáveis.

Dendrímeros baseados em ligações hidrolisáveis, como do tipo éster, apresentam-se como uma alternativa aos compostos de estruturas de difícil degradação, *eg.* poliamina, poliamida.

A fim de se verificar a estabilidade dos materiais dendriméricos em valores de pH de interesse biológico; 7,4 e 4,5; efetuaram-se ensaios de degradação dos materiais: TMP-[G#4]-(OH)₄₈ e TMP-[G#4]-19PEG_{1k}.(FELIU et al., 2012) Os resultados são mostrados a seguir. (Figuras 3.10-3.13)

Figura 3.10. Espectros de MALDI-TOF resultantes do ensaio de degradação de TMP-[G#4]-(OH)₄₈ ao longo de 30 dias. Condições: 37 °C, pH 4,5

Figura 3.11. Espectros de MALDI-TOF resultantes do ensaio de degradação de TMP-[G#4]-(OH)₄₈ ao longo de 30 dias. Condições: 37 °C, pH 7,4

Figura 3.12. Espectros de MALDI-TOF resultantes do ensaio de degradação de TMP-[G#4]-19PEG_{1k} ao longo de 30 dias. Condições: 37 °C, pH 4,5

Figura 3.13. Espectros de MALDI-TOF resultantes do ensaio de degradação de TMP-[G#4]-19PEG_{1k} ao longo de 30 dias. Condições: 37 °C, pH 7,4

Os resultados obtidos pela espectrometria de massas (Figura 3.10-3.13) demonstram que os materiais testados apresentam elevada estabilidade em meios ácidos, apresentando degradação apenas quando o pH apresenta o valor de 7,4.

Algo a ser notado é que em nenhuma faixa de pH houve degradação no intervalo de 5 horas. Isso se mostra de extrema valia frente ao tempo demandado para os ensaios de transporte e internalização. Assim, se assegurou que as espécies químicas mantiveram a sua estrutura durante todos os ensaios.

Os perfis de degradação dos materiais não conjugados com PEG se mostraram coerentes com resultados previamente disponíveis na literatura.(FELIU et al., 2012) Tem-se que em meios básicos e neutros a hidrólise das ligações éster é mais efetiva, e o material sofre um processo de despolimerização. Ao longo do tempo, unidades monoméricas são removidas da estrutura, no caso Bis-MPA.

Ao ser efetuada a comparação do resultado obtido para os materiais conjugados com PEG com os dendrímeros não modificados, fica evidente que a presença de cadeias de PEG periféricas alteram o processo de hidrólise da macromolécula. Durante um período de 4 dias a degradação da macromolécula com PEG é mínima e não há alteração evidente no perfil do espectro de massas. No mesmo intervalo, o dendrímero sem modificações apresenta um marcante processo de degradação atuando na molécula, visto a evidente alteração do perfil de massas.

Deste modo, a PEG~~l~~ação passa a atuar atenuando o processo de degradação, permitindo um maior tempo de vida para o dendrímero sem, no entanto, impedir a ocorrência do fenômeno, ainda permitindo que a macromolécula seja hidrolisável.

3.4.6. Cultura de Células Calu-3

Células do tipo Calu-3 são uma linhagem muito bem diferenciada e bem característica, derivada das glândulas submucal dos brônquios humanos. Além de formar *tight junctions* (TJ - junção celular), estas células apresentam características marcantes do epitélio bronquial, como líquidos de superfície das vias aéreas, cílios, a produção de mucinas e outras substâncias com atividade imunológica. Essas características tornam essa linhagem uma excelente candidata para elucidar a permeabilidade traqueobrônquica e absorção *in vitro*. (FORBES; EHRHARDT, 2005; KREFT et al., 2015; MEHRA HAGHI, 2010)

Ainda que a padronização para a cultura deste tipo de célula ainda não tenha sido estabelecida, a estruturação da cultura celular, assim como a expressão proteica são, reconhecidamente, influenciadas pelas condições de cultura. (KREFT et al., 2015)

Figura 3.14. Imagens de microscopia óptica do crescimento de Calu-3, utilizando-se DMEM como meio de cultura (20% FBS, 1% AB). Células incubadas a 37 °C, 5% CO₂. 10X e 20X representam a magnificação utilizada

A Figura 3.14 apresenta o crescimento de células Calu-3 ao longo de 5 dias. Observa-se que as células aderidas ao fundo da garrafa de cultura apresentam crescimento em domínios, dessa forma requerendo uma elevada densidade inicial para o correto crescimento. Ao longo dos dias, estes domínios se expandem e acabam por constituir uma estrutura maior, situação a qual perdura até o recobrimento total, havendo a formação de uma camada celular.

Quando estas células atingiam 90% de confluência eram removidas e destinadas para um dos seguintes fins: congelamento, ensaio (crescimento em placa de 96/24 poços ou *inserts*), novo ciclo de crescimento em garrafas de cultura.

3.4.7. Citotoxicidade dos Materiais Dendriméricos e Fragmentos

A avaliação da citotoxicidade de novos carreadores se mostra como a etapa inicial para a racionalização, tanto do potencial do material para a sua finalidade, como para o planejamento dos demais ensaios biológicos. A determinação de faixas seguras de concentração acaba por determinar as possíveis limitações existentes em diversos tipos de estudo.

Células Calu-3 foram utilizadas em ensaios de citotoxicidade frente aos seguintes fragmentos dos materiais dendriméricos: Bis-MPA, TMP, mPEG_{1k}COOH. Assim como os dendrímeros: TMP-[G#3]-(OH)₂₄, TMP-[G#4]-(OH)₄₈, TMP-[G#3]-PEG_{1k}, TMP-[G#4]-PEG_{1k}, DDD-[G#3]-(OH)₁₆, DDD-[G#4]-(OH)₃₂. No tocante a concentrações, foram utilizados os seguintes valores: 1000; 500; 100; 50; 10; 1; 0,1; 0,01 µmol/L.

O ensaio escolhido se tratou de MTT (Promega),(PROMEGACORP, 2010) o qual permite avaliar a viabilidade celular analisando a transformação do composto brometo

de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) no composto 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazana (Formazan). Esta transformação é dependente de oxirredutases-NAD(P)H-dependentes, enzimas estas largamente encontradas no citosol celular .

A Figura 3.15 mostra a transformação química do composto, sendo a concentração deste determinada por espectroscopia UV-Vis (em 570 nm).

Figura 3.15. Reação esquemática da transformação do reagente do ensaio MTT

Frente aos resultados obtidos no ensaio de degradação, onde se observou que a hidrólise do material promove a despolimerização deste, inicialmente se determinou a toxicidade dos blocos constituintes das macromoléculas. O resultado é mostrado a seguir.(Figura 3.16)

Figura 3.16. Viabilidade de células Calu-3 determinada por ensaio MTT após incubação por 48 h com soluções contendo os compostos indicados. Células incubadas em meio de cultura sem FBS foram utilizadas como controle. Resultados denotam média $\pm$ s.d. (n=6)

As unidades constituintes das macromoléculas se mostraram não-tóxicas dentro da faixa de concentração estudada. Tal resultado mostra que o processo de hidrólise não deve promover o surgimento de espécies prejudiciais ao metabolismo celular.

Os efeitos acarretados pela diferença de geração, assim como pela diferença de núcleos são, comparativamente, apresentados na Figura 3.17.

Figura 3.17. Viabilidade de células Calu-3 determinada por ensaio MTT após incubação por 48 h com soluções contendo os compostos indicados. Células incubadas em meio de cultura sem FBS foram utilizadas como controle. Resultados denotam média $\pm$ s.d. (n=6). * denota diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle

Os materiais contendo o núcleo TMP se apresentaram atóxicos dentro da faixa de concentrações estudada. Os dendrímeros contendo o núcleo de DDD, no entanto, apresentaram significativa toxicidade em elevadas concentrações. Essa diferença possivelmente emerge da hidrofiliicidade dos compostos, uma vez que os dendrímeros com núcleo TMP apresentam maior número de grupos -OH em sua superfície, garantindo uma melhor solubilidade em água quando comparado com dendrímeros com núcleo DDD. Estes, por sua vez, apresentam menor quantidade de grupos -OH e possuem um extenso núcleo de caráter hidrofóbico (12 grupos -CH₂), dessa forma, este tipo de dendrímero acaba por apresentar um caráter de solubilidade em água distinto, sendo o seu núcleo hidrofóbico, possivelmente, não contrabalanceado por seus grupos de

superfície. Ainda assim, ambos os materiais apresentam baixa toxicidade, já que os efeitos deletérios, quando existentes, só se apresentam em elevadas concentrações.

Uma vez avaliada a toxicidade dos dendrímeros contendo grupos -OH periféricos, avaliou-se o efeito acarretado pela conjugação com cadeias de PEG. (Figura 3.18)

Figura 3.18. Viabilidade de células Calu-3 determinada por ensaio MTT após incubação por 48 h com soluções contendo os compostos indicados. Células incubadas em meio de cultura sem FBS foram utilizadas como controle. Resultados denotam média $\pm$ s.d. (n=6). *denota diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle

Dentro do contexto estudado, a etapa de PEGilação não resultou na diminuição da toxicidade do material. Esta característica muito explorada em dendrímeros da família do PAMAM,(BHARATWAJ et al., 2015) se mostra dispensável quando aplicada aos dendrímeros do tipo poliéster, que já apresentam baixa toxicidade frente a diversos tipos celulares.(FELIU et al., 2012)

A inserção de cadeias PEG pouco efeito acarretou nos dendrímeros até a concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$, sendo o resultado obtido, comparável ao observado para o caso de dendrímeros não conjugados. Para concentrações elevadas as macromoléculas PEGladas passaram a apresentar certo grau de toxicidade, que possivelmente está relacionado ao estresse osmótico proporcionado pela alta concentração dos compostos.(DMITRIEVA et al., 2001) A elevada quantidade dos materiais, em termos de massa, acaba por alterar a osmolalidade do meio, o que acarreta no desequilíbrio do correto funcionamento das células, sendo possível que este desequilíbrio culmine na morte celular.(FINAN; GUILAK, 2010)

A análise ainda foi estendida para os materiais conjugados com FITC e o dendrímero posteriormente PEGlado.

Figura 3.19. Viabilidade de células Calu-3 determinada por ensaio MTT após incubação por 48 h com soluções contendo os compostos indicados. Células incubadas em meio de cultura sem FBS foram utilizadas como controle. Resultados denotam média $\pm$ s.d. (n=6). * denota diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle

A conjugação de FITC aos dendrímeros não apresentou qualquer efeito em termos de toxicidade. Este resultado se mostra coerente com a diminuta alteração acarretada pelo marcador fluorescente no tocante à carga superficial e tamanho da macromolécula. A posterior PEGilação do dendrímero de quarta geração acarretou em resultado semelhante às demais espécies contando com a mesma modificação. Por uma vez mais, os efeitos deletérios surgem em elevadas concentrações e se devem, provavelmente, ao estresse osmótico das condições impostas.

3.4.8. Formação de um Modelo de Epitélio Pulmonar e Medidas de TEER (Transepithelial Electrical Resistance)

Células epiteliais formam uma camada protetora entre o ambiente externo e interno de cavidades do corpo humano. Estas células são conectadas por junções intercelulares (*tight junctions*), as quais regulam a difusão e permitem a esta camada celular integrar uma barreira permeável, que separa as regiões apical (*luminal*) e basolateral (*abluminal*) do corpo, controlando o processo de transporte para a manutenção da homeostase.(SRINIVASAN et al., 2015) A integridade da barreira é vital para diversas atividades fisiológicas dos tecidos, sendo que para o tratamento de certas moléstias se faz necessário o desenvolvimento de métodos capazes de permitir o transporte de fármacos ou carreadores através desta barreira. O transporte pode se dar por duas vias principais: o transporte transcelular ou o paracelular, estes ilustrados esquematicamente na Figura 3.20.(EL-SAYED et al., 2002; HUBBARD et al., 2014)

Figura 3.20. Desenho esquemático de um epitélio pulmonar e dos tipos de transporte realizado através dessa barreira

Numerosos sistemas contando com barreiras celulares para a predição de permeabilidade de fármacos, tipicamente incluem cultura de células sobre membranas permeáveis. A configuração destes sistemas é desenhada para permitir o acesso tanto da região apical, como da basolateral.(SRINIVASAN et al., 2015)

A resistência elétrica transepitelial é a medida da resistência elétrica através da monocamada celular, configurando um método muito sensível e confiável para avaliação da integridade e permeabilidade da monocamada.(SRINIVASAN et al., 2015)

Figura 3.21. Desenho esquemático de um *insert Transwell*[®] contendo uma monocamada celular. Os eletrodos do tipo *chopstick* permitem a aquisição de dados referentes a TEER

A tomada de medidas de TEER é influenciada por uma miríade de fatores, como: temperatura, número da passagem celular, meio de cultura utilizado, período do cultivo celular.(SRINIVASAN et al., 2015) Dessa forma, buscando uma correta comparação de fenômenos, todos os ensaios foram realizados de maneira a contemplar a equidade de todos os fatores citados.

Os epitélios bronquiais e traqueais obtidos de pacientes saudáveis, cultivados em interfaces ar-líquido (ALI), apresentam valores entre 700-1.200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ e se aproximam ao perfil transcripcional do epitélio *in vivo*(PEZZULO et al., 2011), o que indica a importância do cultivo em condições ALI. Há significativas alterações decorrentes da metodologia de cultivo, ar-líquido e líquido-líquido, principalmente no tocante às características do epitélio e valores de TEER.(KREFT et al., 2015; SRINIVASAN et al., 2015)

A cultura utilizada foi cultivada em condições ALI após sua fixação na membrana do *insert*. Os valores de TEER foram medidos ao longo de 25 dias, sendo o valor máximo atingido no dia 11, a partir do qual, o valor se apresentou nivelado.(Figura 3.22)

Figura 3.22. Valores de TEER de cultura de Calu-3 ao longo de 25 dias. Desenho esquemático da formação da monocamada celular e seu reflexo no valor de TEER

Para o caso específico de epitélios formados por células Calu-3, uma extensa faixa de valores de TEER já foi demonstrada na literatura, sendo observados desde valores baixos como $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$, até valores elevados como $2.500 \Omega \cdot \text{cm}^2$. (KREFT et al., 2015; MEHRA HAGHI, 2010) Estes são resultado de diferentes técnicas de medidas, assim como de diferenças nas condições de crescimento celular, visto que pequenas alterações na metodologia acarretam alterações no que tange à diferenciação celular, morfologia e formação de *tight junctions*. (SRINIVASAN et al., 2015)

No presente trabalho, foi adotado o valor de TEER próximo a $950 \Omega \cdot \text{cm}^2$ como indicativo da formação de uma monocamada celular e, deste modo, uma vez atingido este valor, foram iniciados os demais ensaios, como o de transporte.

3.4.9. Transporte Transepitelial

Determinar o impacto dos materiais na integridade da monocamada celular, assim como sua permeabilidade, permite inferir sobre o sucesso de sua aplicação como nanocarreador. A modulação de tamanho, hidrofobicidade e carga superficial mais uma

vez tem destaque, influenciando o destino do material quando da sua interação com as células epiteliais.

Algumas classes de dendrímeros já demonstraram ser transportadas tanto pela via paracelular como transcelular, sendo ambas as vias impactadas pela natureza química do material e de sua carga superficial.(BHARATWAJ et al., 2015; PERUMAL et al., 2008)

Os ensaios de transporte foram realizados a fim de se verificar dois aspectos do material dendrímérico: o impacto da geração do material (tamanho e número de grupos periféricos) e o impacto da inserção de cadeias de PEG em sua superfície. Para tal fim, foram utilizados os dendrímeros TMP-[G#3]-FITC, TMP-[G#4]-FITC e TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k}.

As monocamadas celulares polarizadas formadas nos *inserts* (confirmadas por TEER), sofreram adição de soluções contendo amostra, sendo o tempo do experimento fixado em 5 horas. (Figura 3.23)

Figura 3.23. Desenho esquemático do ensaio de transporte. Cada coluna da placa de 24 poços determina o tempo decorrido. Após a adição de solução contendo amostra, o *insert* é movido a cada hora para uma nova posição. A cada alteração foram medidos os valores de TEER. O ensaio foi terminado após 5 h, sendo então efetuados ensaios de fluorescência nas soluções para a determinação da concentração de dendrímero em cada compartimento.

O transporte das espécies pode ser acompanhado observando-se o incremento no valor de massa acumulada no compartimento basolateral. Uma vez que o estudo contemplou células do epitélio pulmonar, foi realizado paralelamente o ensaio de transporte das espécies através de muco sintético, a fim de se conhecer seu efeito e extensão no transporte das macromoléculas.

Figura 3.24. (a) Transporte do compartimento apical para basolateral (A→B) de TMP-[G#3]-FITC, TMP-[G#4]-FITC, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k} através de monocamadas de células Calu-3 polarizadas em função do tempo (n=6). *denota diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle, ◆denota diferença estatística ($p < 0,05$), ■denota nenhuma diferença estatística ($p < 0,05$). (b) Transporte do compartimento apical para basolateral (A→B) de TMP-[G#3]-FITC, TMP-[G#4]-FITC, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k} através de muco sintético em função do tempo (n=3). 50 nmol (equivalente de FITC) de dendrímeros foram utilizados para cada experimento

A camada de muco possui um importante papel no aprisionamento e remoção de partículas, sendo que, para tanto, forma interações polivalentes com estas espécies. Para a penetração no muco, as espécies precisam contornar a adesão nas fibras de mucina e serem pequenas o suficiente para transpor a barreira criada pela elevada densidade destas fibras.(MITRAGOTRI; LAHANN, 2012)

O muco é um fluido de elevada complexidade contendo glicoproteínas sob a forma de hidrogéis (mucina). Na parte superior e central dos pulmões, sobre o epitélio ciliado, se encontra uma barreira de muco de alguns micrômetros de espessura (10-30 μm na traqueia, 2-5 μm nos brônquios) sendo provável esta camada estar coberta por outra de tensoativo, fenômeno observado nas camadas profundas dos pulmões.(KIRCH et al., 2012)

Os resultados apresentados para o transporte através da camada de muco acabam por ser uma simplificação do comportamento esperado *in vivo*, já que o sistema de eliminação de partícula mucociliado não é emulado pelas condições experimentais. Dessa forma, o arranjo experimental não contempla a interação da partícula com uma camada de gel em movimento, dada a propulsão imposta pela movimentação ciliar.(KIRCH et al., 2012)

O tamanho de “poro” estimado para camadas de muco contempla o intervalo entre 10-200 nm, sendo que, no entanto, algumas classes de materiais, ainda que maiores que estes valores estabelecidos, se mostram capazes de atravessar a barreira. Os materiais estudados apresentam duas características que embasam o seu transporte através da camada de muco: sua carga superficial praticamente nula e seu tamanho inferior a 5 nm (Tabela 3.2). Dessa forma, todas as macromoléculas analisadas mostraram transporte semelhante através da camada de muco sintético.

Ainda que a etapa de PEGlação possa ser um fator relevante para a interação com a camada de muco, possivelmente devido às dimensões dos materiais em questão, esta diferenciação não foi observada.(BHARATWAJ et al., 2015; LAI et al., 2007)

No que se refere ao transporte através do epitélio formado por células Calu-3 polarizadas (Figura 3.24-a) foi observado que as três macromoléculas apresentam comportamento semelhante durante as 4 primeiras horas do experimento, sendo uma grande diferença notada no período final do ensaio para o caso da espécie PEGlada. Em termos de geração não há diferença efetiva entre os fenômenos.

A diferenciação de comportamento é confirmada pela permeabilidade aparente (P_{app}) dos materiais. (Figura 3.25)

Figura 3.25. Permeabilidade aparente (P_{app}) de TMP-[G#3]-FITC, TMP-[G#4]-FITC, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k} através de monocamada de células Calu-3 polarizadas. P_{app} reportada após incubação por 5 h com soluções contendo as macromoléculas. Dados representam média $\pm$ s.d. (n=6). Soluções contendo 50 nmol (equivalente de FITC) em 1X HBSS foram adicionadas no compartimento apical. * denota diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle

É notado que a permeabilidade aparente do material contado com cadeias PEG se mostra maior, quando comparada a de seu material de base, o dendrímero de quarta geração. Observa-se ainda uma diferença existente no tocante à geração, sendo o dendrímero de quarta geração mais permeável à camada. Os valores obtidos se mostram em concordância com outros experimentos, ainda que estes tenham sido realizados em outra linhagem celular.(SADEKAR; GHANDEHARI, 2012)

De uma forma abrangente, o transporte das espécies acaba por refletir a somatória dos efeitos tanto da interação das espécies com a barreira celular (transporte paracelular), assim como da internalização (transporte transcelular).

O transporte paracelular se mostra intimamente ligado à interação entre as macromoléculas e as junções celulares (*tight junctions*), sendo que o resultado obtido no tocante à integridade da monocamada celular corrobora com o perfil observado no ensaio de transporte.

Figura 3.26. Variação da resistência elétrica transepitelial (TEER) da monocamada de células Calu-3 cultivada em *inserts* Transwell® (tamanho de poro 0,4 µm) durante os ensaios de transporte (n=6) e após 72 horas depois de seu término, *i.e.* após a remoção das soluções contendo dendrímeros do compartimento apical. Foram utilizadas soluções contendo 50 nmol (equivalente de FITC) de dendrímeros. *denota diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao controle, ♦denota diferença estatística ($p<0,05$)

Os valores de TEER observados (Figura 3.26) ao longo do ensaio de transporte demonstram um efeito pronunciado do material PEGlado na integridade da monocamada celular, efeito este notado a partir da quarta hora do ensaio. Há também um efeito pouco pronunciado do dendrímero de quarta geração quando comparado ao dendrímero de terceira geração. As alterações observadas nos valores de TEER se mostram alinhadas aos resultados de transporte, a desestabilização da monocamada se relaciona com a permeabilidade do epitélio a macromoléculas. Dessa forma, a partir do momento em que houve abertura das *tight junctions*, houve uma passagem pronunciada dos compostos, o que evidencia o favorecimento da via paracelular para o transporte dos materiais, sobretudo para aquele contando com cadeias de PEG.

Tight junctions (TJs) são complexos seladores encontrados na posição apical da membrana lateral na interface de células adjacentes. Diversos estudos revelaram que as TJs são compostas por três famílias de proteínas: claudinas, proteínas MARVEL associadas a TJ [(TAMPs), ocludinas, tricelulinas e MarvelD3], e molécula de adesão de junção (JAM). Devido a múltiplas interações dessas proteínas, as TJs são mantidas em um equilíbrio dinâmico por diversos fatores reguladores. Durante a formação ou ruptura das TJs, fosforilação e desfosforilação de proteínas como ocludinas e claudinas são de extrema relevância.(LU, R.-Y.; YANG; HU, 2014)

A formação e ruptura das TJs é um processo contínuo e cíclico em células epiteliais, onde as TJs são passíveis de remodelagem, sofrendo endocitose, migração e reciclagem de seus componentes. A dinâmica deste processo é regulada tanto por eventos intracelulares como extracelulares. Em sua maioria, eventos extracelulares contemplam a interação com outras proteínas ou agentes externos, estímulo endócrino, estresse oxidativo, e desequilíbrio nos níveis de cálcio.(LU, R.-Y. et al., 2014)

Diferentes rotas paracelulares foram postuladas para pequenos íons e para macromoléculas. Pequenos íons predominantemente atravessam canais oriundos de claudinas de junções celulares duplas (bTJ). Essa rota foi classificada como de alta capacidade, seletiva para carga e tamanho, “rota porosa”. Uma pequena quantidade de pequenos íons atravessam por junções tricelulares (tTJ). (KRUG; SCHULZKE; FROMM, 2014)

Moléculas de dimensões elevadas, como macromoléculas, atravessam através de descontinuações de bTJ. Esta rota é classificada como de baixa capacidade, não seletiva para carga ou tamanho, “rota de vazamento”. Outra rota para macromoléculas seria provida por tTJ, no entanto, até o momento, ainda não é definido a exata rota utilizada por macromoléculas. (KRUG et al., 2014)

A tTJ é formada pela junção de três células o que formaria um tubo central com diâmetro aproximado de 10 nm, sendo este um ponto fraco da barreira paracelular.

Alguns estudos demonstram que ocludinas apresentam papel de destaque na permeabilidade de macromolécula. O *knockdown* desta proteína em células Caco-2 (células epiteliais de intestino) aumentou a permeabilidade do epitélio para moléculas com até 70 kDa (~3,6 nm de diâmetro), sendo o valor estimado do canal de 0,7 nm. (KRUG et al., 2014)

Alguns trabalhos desenvolvidos em células epiteliais demonstram que a interação das macromoléculas acarreta alteração na composição das junções celulares, (CASETTARI et al., 2010; DITTMANN et al., 2014; LIU; CHIU, 2013; VLLASALIU et al., 2010; WATSON; ROWLAND; WARHURST, 2001; YAMAKI et al., 2013) havendo mitigação de certos grupos proteicos, em detrimento da intensificação da presença de outras classes. No entanto, o assunto ainda carece de um mecanismo que seja extensivo para os diversos tipos de macromoléculas.

O assunto ainda necessita do perfeito entendimento de como estas alterações são desencadeadas. Ainda que as *tight junctions* tenham regulação extracelular, ainda não há um perfeito entendimento de como a presença de macromoléculas age na expressão proteica e sua realocização.

No caso apresentado, tem-se que a macromolécula contando com cadeias PEG apresentou maior efeito de ruptura das junções celulares. O polímero linear PEG e a PEGlização de outros materiais foi largamente utilizado em diversos experimentos que resultaram na interferência e perda de integridade da monocamada celular.(Casettari et al., 2010; Watson et al., 2001) Dessa forma o resultado obtido se mostra coerente a este fenômeno.

Uma vez ocorrida a abertura das *tight junctions*, se observa uma intensificação do fenômeno de transporte da macromolécula. Comparativamente, os materiais sem cadeias de PEG apresentaram efeito menos pronunciado na abertura das TJs, o que possibilita a interpretação de que a rota paracelular acaba por não ser tão efetiva para estes materiais, ainda que existente, em alguma extensão, para o composto de quarta geração.

Deste modo, da maneira como foi proposto o experimento, fica evidenciado que a PEGlização dentro do escopo desta comparação permitiu a intensificação do transporte paracelular, o que se mostrou válido para o intervalo de tempo estabelecido. Assim, objetivando-se acelerar o transporte do dendrímero estudado, a PEGlização se apresenta como uma ferramenta útil para tal fim.

Ainda deve ser observado que, após a remoção da solução contendo dendrímeros, os efeitos deletérios na monocamada celular são interrompidos e após 24 horas há completa reestruturação da mesma. Isso evidencia que o fenômeno

desencadeado pelas macromoléculas é reversível, o que se mostra de suma importância para a garantia de manutenção da barreira celular após o transporte do carreador.

Adicionalmente, uma vez que o transporte é composto por duas principais vias, a geração do material e PEGlação também afetam o transporte transcelular, onde há desfavorecimento da internalização à medida que há aumento de tamanho das moléculas. Este fato intensificaria a travessia da monocamada celular, por moléculas maiores, através de suas junções. A internalização será discutida no tópico a seguir.

3.4.10. Internalização e Balanço de Massas

Uma vez estabelecido que o transporte de dendrímeros é efetuado tanto por vias paracelulares como transcelulares, o processo de ingresso do material na célula se mostra vital para a completa definição do destino destas macromoléculas. Dada a dimensão destas e suas propriedades, a endocitose foi estabelecida como principal via de ingresso.

Ainda que este processo tenha sido clarificado, a influência da carga superficial no mecanismo de internalização e o transporte intracelular está vinculado à classe celular estudada.(PERUMAL et al., 2008)

Uma grande parcela da literatura apresenta dados referentes ao processo de transporte e internalização de dendrímeros da classe PAMAM,(BHARATWAJ et al., 2015; PERUMAL et al., 2008), visto a sua disponibilidade comercial. Desse modo, esses dados contemplam uma macromolécula de superfície carregada positivamente, que apresenta toxicidade em extensa faixa de concentração. Uma vez que o material utilizado no

presente estudo se apresenta neutro e de baixa toxicidade, seu comportamento pode se desviar do previamente estabelecido para esta outra classe de materiais.

Em trabalho realizado em células A549 (PERUMAL et al., 2008), o aporte e internalização de dendrímeros da família do PAMAM, acabou por seguir a ordem: catiônico>neutro>aniônico. Assim, a extensão do processo de internalização do material em estudo era esperadamente pequena.

O ensaio de internalização do lisado celular, este oriundo da monocamada celular utilizada no experimento de transporte, apresentou um valor diminuto para a fração de macromolécula internalizada durante o ensaio.

O experimento realizado mediu a fluorescência da solução do lisado celular e houve posterior normalização dos valores obtidos através da quantidade proteica de cada monocamada celular. A quantidade proteica estaria então relacionada ao número de células. Este valor foi obtido pelo ensaio BCA. Tais resultados fundamentaram o cálculo da fração internalizada dos dendrímeros.

Figura 3.27. Efeito da geração e PEGilação na porcentagem de macromolécula internalizada, determinada através de lisado celular de monocamadas de células Calu-3 ($t = 5$ h). Valores representam média $\pm$ s.d. ($n=3$). Não há diferença estatísticas entre os resultados

A quantidade de macromolécula internalizada durante o ensaio de transporte é mostrada na Figura 3.27. Não há diferença estatística entre os resultados, porém observa-se que para todos os materiais há pequena internalização <0,6%. Este valor evidencia dois aspectos: a não pronunciada internalização dos materiais, e a limitação de sensibilidade imposta pelo ensaio.

Ainda que o resultado de internalização através do lisado celular não se mostre muito conclusivo, os valores obtidos permitiram o cálculo do balanço de massas dos materiais estudados. Uma vez conhecidas as quantidades: transportadas, internalizadas e restantes no compartimento apical; em média, a soma destas quantidades apresentou o valor de 82% do total utilizado nos experimentos. Este valor se mostra próximo a ensaios de mesma natureza,(BHARATWAJ et al., 2015) sendo que os 18% perdidos podem estar relacionados a diversos fatores como: presença de dendrímeros aderidos nos resíduos celulares depois da lise, e absorção dos materiais nas superfícies dos *inserts* e poços.

A fim de se observar o fenômeno com uma técnica mais sensível, as macromoléculas foram submetidas ao experimento de citometria de fluxo. Para tanto, foi acompanhada a internalização ao longo de 5 horas (mesmo período de tempo do ensaio de transporte).

Para emular o correto arranjo celular e realizar o experimento em células polarizadas, após a inserção de células (300.000 células/poço) estas foram cultivadas durante 11 dias para, então, sofrerem a adição de soluções contendo dendrímeros em diversos intervalos de tempo. Os períodos estabelecidos para contato com as soluções foram: 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 e 5 horas.

O uso de células polarizadas apresenta grande impacto no comportamento de internalização dos materiais, sendo as propriedades de um epitélio celular melhor representado após esta diferenciação celular.(BHARATWAJ et al., 2015)

Os resultados obtidos por citometria de fluxo são apresentados a seguir. (Figura 3.28)

Figura 3.28. Internalização celular de TMP-[G#3]-FITC, TMP-[G#4]-FITC, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k} em células Calu-3 polarizadas em função do tempo, determinadas por citometria de fluxo. Resultados representam média $\pm$ s.d. (n=6)

De modo geral, é observado que todos os materiais são internalizados gradativamente e não há cessão do fenômeno, *i.e.* não se observa o nivelamento dos valores de absorção ao longo do tempo. Este fenômeno também foi observado para materiais semelhantes (contando com -OH periféricos) em outras classes celulares.(PERUMAL et al., 2008)

Comparativamente, o que se observa é a influência do tamanho do dendrímero em sua internalização, uma vez que o material de terceira geração apresenta uma internalização mais pronunciada que o de quarta, e ambos sofrem maior internalização que o composto PEG_{lado}. Uma vez que estes materiais apresentam carga superficial

negligenciável e de valor semelhante, as diferenças observadas recaem no tocante a tamanho.

Por conter grupos periférico hidroxila e/ou cadeias de PEG os dendrímeros estudados não apresentam carga superficial em pH fisiológico, o que possivelmente acarreta em endocitose guiada por interações não específicas, como interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Estes materiais podem sofrer endocitose por uma mecanismo não mediado por *clathrin* ou *caveolae*, resultando em uma endocitose não específica pela fase-fluídica.(PERUMAL et al., 2008)

A carga superficial pode também desempenhar outro papel na movimentação intracelular do dendrímero. Em estudo realizado em células A549,(PERUMAL et al., 2008) macromoléculas catiônicas, por vezes, não se co-localizam em lisossomos, sendo encontradas na periferia de vesículas, enquanto espécies aniônicas e neutras se co-localizam, em grande extensão, nos lisossomos. Esta característica se apresenta de elevada importância no que se refere a sistemas dendrímero-fármaco que dependem da ação de enzimas lisossomais para a ação do fármaco. Estas características, no entanto, estão intimamente ligadas ao tipo de célula.

Os resultados obtidos de internalização celular, aliados aos obtidos no que se refere a transporte, permitem a racionalização de como a classe de macromoléculas estudadas é transportada por um modelo de epitélio pulmonar. A questão predominante do tamanho acaba por alterar a extensão em que as espécies são internalizadas, e deste modo, dendrímeros de maior dimensão apresentam menor internalização e são transportados, preferencialmente, por vias paracelulares. Neste sentido, a via paracelular se mostra como uma via mais rápida dentro do período de tempo do experimento.

A modulação do transporte através de um epitélio é um conceito que vai ao encontro do desenvolvimento de novos carreadores de fármacos. A busca de materiais mais seguros e de efeitos mais pronunciados guia esta ciência. Assim, a utilização de um material biodegradável, de baixa toxicidade e de propriedades moduláveis se insere competentemente nesta busca, sendo evidenciada a possibilidade do uso desta plataforma para sistemas de *drug-delivery* endereçadas as vias aéreas.

3.4.11. Formulação em Aerossol (pMDI) e suas Propriedades

A tecnologia pMDI tem sido aliada de pacientes e profissionais de medicina para o tratamento de asma e COPD desde a sua introdução no mercado em 1956.(ZHOU, Q. et al., 2014) pMDI's são dispositivos: portáteis, convenientes, de múltiplas doses, que se valem do uso de um propelente pressurizado para geração de uma dose sob a forma de um aerossol, através de atomização por uma válvula.(DOLOVICH; DHAND, 2010)

Embora seu design básico tenha pouco se alterado, diversas melhorias em seus subcomponentes têm sido observadas nas últimas duas décadas, principalmente devido à transição dos propelentes baseados nos clorofluorcarbonos (CFC's) para os baseados em hidrofluoralcenos (HFA's), devido questões ambientais.(ZHOU, Q. et al., 2014) Neste cenário emergiram dois candidatos 1,1,1,2-tetrafluoreto (HFA-134a) e 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA-227), sendo ambos termodinamicamente similares.(MYRDAL et al., 2014)

Essa alteração de paradigma trouxe desafios adicionais para a tecnologia, já que diversas classes de materiais, incluindo fármacos, apresentam problemas de solubilidade e interação com esta classe de solventes.(PAUL et al., 2005) No presente

trabalho foi utilizado como propelente o hidrofluoralcano HFA-227, composto que apresenta: $\log P = 1,1$ e momento de dipolo 2,06 debye.(MYRDAL et al., 2014)

Figura 3.29. Moléculas de HFA-227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) e HPFP (1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-decafluoropentano)

Esta classe de inaladores pode ser formulada com a total dissolução do fármaco (solução), ou com o fármaco insolúvel no meio (suspensão).

Em um primeiro momento, foi avaliada a interação dos materiais dendriméricos com o solvente HPFP(ROGUEDA, 2003) (Figura 3.29), o qual serve de modelo para HFA-227, tendo como vantagem operacional se apresentar sob a forma líquida em condições ambiente.

Inicialmente, foi avaliada a estabilidade e dispersão/solubilização das macromoléculas ao longo de 4 horas, se utilizando a concentração de 1,5 mg/mL, havendo a adição de 1% v/v de etanol seco.

Figura 3.30. Teste de estabilidade física de dendrímeros em HPFP, durante 4 horas. Materiais utilizados: TMP-[G#4]-(OH)₄₈, TMP-[G#4]-19PEG_{1k}, TMP-[G#4]-FITC, TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k}

O uso de etanol, primeiro co-solvente utilizado em formulações pMDI, visa a melhoria de solubilidade de diversos compostos,(MYRDAL et al., 2014) sendo este co-solvente utilizado em diversas concentrações em formulações comerciais (0-15% v/v).(CONTI et al., 2012) A melhoria do processo de solubilização se mostra mais proeminente para grupos éter e éster,(CONTI et al., 2012) o que se mostra válido, frente aos materiais testados. (Figura 3.30)

Os sistemas também foram analisados por DLS, sendo os resultados sumarizados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Diâmetro de solvatação (SD) em HPFP, 1% v/v EtOH, de dendrímeros e conjugados determinados por espalhamento de luz (LS), em temperatura ambiente

Composto	SD $\pm$ s.d.# (nm)	FITC
TMP-[G#3]-(OH) ₂₄	Não há dispersão	0
TMP-[G#4]-(OH) ₄₈	35 $\pm$ 6	0
TMP-[G#4]-FITC	Não há dispersão	2.2
TMP-[G#4]-FITC-19PEG _{1k}	4.5 $\pm$ 0.8	2.2

= média e desvio padrão de 4 repetições

O acompanhamento da estabilidade (Figura 3.30) foi iniciado após os materiais serem expostos a um banho de ultrassom, sendo observado que o dendrímero sem qualquer modificação (G#4), *i.e.* apenas com grupos -OH periféricos, não se mostra solúvel no solvente fluorado, havendo, porém, a dispersão do material. Os resultados obtidos por LS demonstram a presença de aglomerados de 35 nm. Essas observações refletem a limitação do solvente no que se refere a compostos polares, ainda que o

dendrímero contenha diversos grupos ésteres (estabelecidos como HPFP-*filicos*). (PEGUIN; WU; DA ROCHA, 2007)

A inserção de cadeias de PEG (derivatizando-se ~50% dos grupos -OH) acarreta melhoria na interação da macromolécula com o solvente, havendo completa dissolução. Possivelmente, as cadeias de PEG diminuem a polaridade do dendrímero e desta forma este é competentemente solvatado por HPFP. Cadeias de PEG são conhecidamente solúveis em certos solventes fluorados e dessa forma auxiliam na interação dendrímero-HPFP. (MYRDAL et al., 2014; PAUL et al., 2005)

Ainda que haja a dispersão do dendrímero não modificado em HPFP, após a inserção de ~2 moléculas de FITC, o material resultante acaba por demonstrar um comportamento totalmente distinto. A tímida dispersão da macromolécula, logo após a sonificação, é totalmente eliminada ao longo do tempo, havendo total separação de fases. Foi observado que a inserção de moléculas de FITC, ainda que apenas derivatize ~4 % dos grupos periféricos, se mostra suficiente para alterar as propriedades de solubilização da molécula e resulta na diminuição de sua interação com HPFP.

Frente a esta limitação, a inserção de PEG se mostrou capaz de tornar o dendrímero marcado com FITC solúvel, modulando as propriedades do material e mitigando o efeito da inclusão do fluoróforo na molécula. Os resultados de LS apresentam um diâmetro solvatado condizente com o diâmetro de uma única molécula de dendrímero (~4,5 nm), o que confirma a solubilização da macromolécula.

A estabilidade das formulações contando com dendrímeros *PEGlados* se mostrou muito mais elevadas que o período apresentado (4 h), sendo estáveis ao longo de dias. (resultados não apresentados)

Uma vez estabelecido o potencial de se realizar uma formulação contendo o dendrímero *PEGlado*, foi selecionado o composto TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k}. Dentro do

contexto proposto, a molécula de FITC teria a função de possibilitar a detecção da macromolécula durante o ensaio de ACI, além de servir como fármaco modelo.

Utilizando-se a concentração de 1,5 mg/mL, HFA-227 como propelente contando com 1% v/v de etanol, foi realizada a preparação de uma formulação pMDI. Esta foi, então, avaliada quanto à sua estabilidade ao longo de 24 horas e teve sua performance avaliada em ensaio de AIC de oito estágios (Figura 3.31).

Figura 3.31. Representação esquemática do aparato *Andersen Cascade Impactor* (ACI) contando com 8 estágios mais filtro. Cada estágio permite a passagem de um tamanho de partícula e está vinculado a um compartimento das vias aéreas

O equipamento *Andersen Cascade Impactor* (ACI) é largamente utilizado para simular, *in vitro*, a deposição de partículas nos pulmões. Tal equipamento costumeiramente conta com oito estágios com tamanho decrescentes de orifícios, simulando os diversos compartimentos do sistema respiratório humano. Aplicando-se pressão reduzida ao aparato e mantendo-se o fluxo de ar que o adentra constante, há deposição de partículas nos diferentes estágios.(WU, L.; BHARATWAJ; et al., 2008) A quantidade de material depositado em cada estágio pode ser determinada por

diferentes técnicas, sendo no presente estudo, realizada através da fluorescência oriunda do grupo FITC.

O tamanho ideal de aerossóis para a deposição nas regiões profundas do pulmão se encontra no intervalo: 0,5-5 μm , (PATTON, J. S.; BYRON, 2007) partículas com diâmetro aerodinâmico $<0,5 \mu\text{m}$ podem ser exaladas, enquanto aquelas maiores que 5 μm tendem a se depositar na boca e garganta, sendo direcionadas para o sistema digestório. Além disso, macrófagos alveolares são seletivos para partículas entre 1-3 μm , sendo menos eficiente para partículas maiores ($\geq 6 \mu\text{m}$) e menores ($\leq 260 \text{ nm}$) (CONTI et al., 2014; MERKEL et al., 2012)

Figura 3.32. Propriedades do aerossol de formulação pMDI preparada com TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k}. Formulação contando com 1,5 mg de dendrímero por 1 mL de HFA-227 e 1% de etanol, a 298 K, na pressão de saturação do propelente. AC, IP e F se referem ao acionador, tubo de indução e filtro, respectivamente. Resultados demonstram média $\pm$ s.d. (n=4). No detalhe, estabilidade física da formulação pMDI durante 24 horas

A estabilidade da formulação (Figura 3.32 - detalhe) comprovou os resultados prévios obtidos com HPFP, se mostrando inalterada ao longo de 24 horas.

Os resultados obtidos (Figura 3.32) demonstram uma competente deposição em estágios referentes a compartimentos profundos das vias aéreas. Tem-se que aproximadamente 80% da dose atinge regiões que se encontram além do tubo traqueal,

havendo mais pronunciada deposição no estágio 5, que se refere aos brônquios terminais. Ainda fica demonstrado que a formulação é capaz de atingir as regiões terminais das vias aéreas, como duto alveolar e alvéolo (estágios 6 e 7), fator este importante para a eficácia do carreador nanométrico.

Os resultados quantitativos da performance do aerossol são sumarizados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Performance da formulação pMDI preparada com TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k}. Formulação pMDI contendo 1,5 mg de dendrímero por 1 mL de HFA-227, 1% v/v de etanol. Experimentos realizados a 298 K na pressão de saturação do propelente. Resultados expressos como média $\pm$ s.d., obtidos em 4 ensaios independentes

Estágio	Massa de Dendrímero (μg)
Acionador (AC)	78.0 $\pm$ 5.3
Tubo de Indução (IP)	65.5 $\pm$ 16.0
Estágio 0 (9.0 - 10.0 μm)	1.7 $\pm$ 1.4
Estágio 1 (5.8 - 9.0 μm)	0.8 $\pm$ 0.2
Estágio 2 (4.7 - 5.8 μm)	1.1 $\pm$ 0.4
Estágio 3 (3.3 - 4.7 μm)	18.3 $\pm$ 6.9
Estágio 4 (2.1 - 3.3 μm)	125.1 $\pm$ 9.7
Estágio 5 (1.1 - 2.1 μm)	245.1 $\pm$ 68.6
Estágio 6 (0.7 - 1.1 μm)	96.9 $\pm$ 34.7
Estágio 7 (0.7 - 0.4 μm)	34.4 $\pm$ 13.5
Filtro (0.0 - 0.4 μm)	1.4 $\pm$ 1.6
FPF (%)	88.5 $\pm$ 4.0
RF (%)	75.7 $\pm$ 4.3
Recuperação (%)	72.1 $\pm$ 15.0
Single Puff Dose (μg)	89.6 $\pm$ 30.1
MMAD (μm)	1.6 $\pm$ 0.1
GSD	1.7 $\pm$ 0.1

O parâmetro FPF (*fine particle fraction*) de um aerossol determina a fração que potencialmente atinge as regiões mais profundas do trato respiratório. O resultado obtido (~88%) se mostra excelente quando comparado com a performance de algumas formulações pMDI de pequenas moléculas terapêuticas (em média 30-55%).(MCCABE et al., 2011; WU, L.; BHARATWAJ; et al., 2008)

Os parâmetros MMAD (*mass median aerodynamic diameter*) e GSD (*geometric standard deviation*) auxiliam na caracterização de partículas em aerossóis.(LEBELLE et al., 1996) MMAD representa o diâmetro aerodinâmico (AD) em relação a massa, e GSD é a medida de como varia o tamanho da partícula em relação a seu valor médio. O valor obtido de MMAD; 1,6 μm ; demonstra que o aerossol testado apresenta um diâmetro aerodinâmico que se insere no intervalo ótimo para deposição em regiões profundas dos pulmões (0,5- 5 μm). Adicionalmente, o aerossol apresenta pequena dispersão do tamanho de suas partículas, dado seu valor de GSD = 1,7. Valores inferiores ou iguais a 1,25 são tidos como sistemas monodispersos.(TSI-INCORPORATED, 2012)

3.5 Conclusões

Os materiais dendriméricos baseados em ligações do tipo éster se mostraram adequados para as modificações necessárias, tanto para o seu estudo e aplicação em modelos *in vitro*, como para preparação de uma formulação pMDI.

As macromoléculas apresentaram reduzida toxicidade, dispensando qualquer tipo de derivatização endereçada a esta questão.

A degradabilidade dos dendrímeros surge como uma alternativa aos diversos nanocarreadores que não apresentam esta propriedade. Dentro de um contexto biológico, esta degradação apresenta um papel de destaque.

O transporte através de células polarizadas de uma monocamada de Calu-3 evidenciou a importância da via paracelular para o transporte das macromoléculas estudadas. O transporte apenas foi efetivo quando houve a ruptura das *tight junctions* da barreira celular.

Uma vez que tanto o transporte paracelular, como transcelular foram impactados pela presença de cadeias de PEG, pode-se inferir que o processo é intimamente ligado ao tamanho das espécies. Desta forma, materiais de menor dimensão (TMP-[G#3]-FITC e TMP-[G#4]-FITC) acabam por ter uma internalização mais proeminente e resultam em baixo impacto nas TJ. TMP-[G#4]-FITC-19PEG_{1k}, por outro lado, apresentou internalização mais modesta, porém afetando mais intensamente as TJs, e assim favorecendo o transporte paracelular.

A interação do dendrímero PEG_{lado} com os solventes fluorados (HPFP e HFA-227) permitiu a preparação de uma formulação contendo o carreador solúvel no propelente. Este fato aliado as excelentes propriedades do aerossol resultante,

demonstraram uma promissora aplicação do dendrímero como nanocarreador destinado as vias aéreas.

Capítulo 4. Uso de Materiais Dendríticos para Magnificação de Efeito Catalítico

4.1. Introdução

O desenvolvimento de estratégias de imobilização de espécies metálicas ativas e complexos em suportes inorgânicos, *e.g.* materiais magnéticos, para a produção de catalisadores de fácil reciclagem se mostra um tópico atual que se endereça a diversos processos químicos.(JACINTO et al., 2008; JACINTO et al., 2009; OLIVEIRA; KIYOHARA; ROSSI, 2010) As propriedades do material usado como suporte, como sílica, podem ser moduladas pela funcionalização de sua superfície em etapa anterior a imobilização do metal/complexo, o que permite uma melhor interação na etapa de inserção da espécie contendo o metal. Tal modulação visa à mitigação da lixiviação do metal, além de possibilitar controle de reatividade. (COSTA; ROSSI, 2012)

Figura 4.1. Desenho esquemático de uma partícula metálica recoberta com sílica e contendo um dendron pendente. FG denota grupos funcionais(KAINZ; REISER, 2014)

As superfícies contendo grupos silanóis são de fácil funcionalização pela reação entre a matriz de sílica e reagentes organoalcossilanos, no entanto, o número de grupos

silanóis na superfície da sílica acaba por limitar a quantidade de grupos funcionais periféricos obtidos.

O aumento do número de grupos periféricos significaria uma maior impregnação da espécie metálica ativa, e resultaria em um maior número de sítios ativos para o processo catalítico. Um meio de realizar este incremento é a conjugação de polímeros dendríticos na superfície da sílica.(KAINZ; REISER, 2014)

Dendrímeros e polímeros hiperramificados tem sido utilizados como plataformas para a preparação de catalisadores para diversos tipos de reações. Por exemplo, Stephenson *et al* utilizaram um complexo de níquel coordenado a um polímero hiperramificado microestruturado para catalisar a polimerização de olefinas.(STEPHENSON et al., 2014) Nabae *et al.* descreveu o uso de ácido sulfônico conjugado a um polímero poli(éter sulfona) hiperramificado como catalisador para esterificação de 1-butanol com ácido acético.(NABAE et al., 2014) Compostos dendríticos ainda tem sido utilizados no design de sistemas catalíticos para reações de hidroformilação. Algumas destas aplicações são baseadas na possibilidade de preparação de catalisadores solúveis em água para a utilização em sistema bifásico ou para melhoria de solubilidade em meio orgânico.(GONG et al., 2000; HAGER; MAKHUBELA; SMITH, 2012; TUCHBREITER; MECKING, 2007) Algumas aplicações de complexos de ródio ligados a dendrímeros também foram efetuadas. Lu e Alper(LU, S.-M.; ALPER, 2003) atribuíram a melhoria de reatividade e seletividade ao comportamento cooperativo de múltiplos sítios de coordenação no interior e exterior de dendrímeros com grupos funcionais contendo ródio.

Helms e Fréchet(HELMS; FRÉCHET, 2006) apontaram como possível explicação da melhoria de atividade catalítica o confinamento do substrato e do catalisador na interface dendrímero-solvente, o que resultaria em aumento da concentração local de

grupos reativos dentro de um volume de definida estrutura nanoscópica. Alguns complexos dendrímero-Ródio tem sido utilizados em catálise em meio orgânico (TUCHBREITER; MECKING, 2007), em catálises bifásicas (HAGER et al., 2012) e após imobilização em suportes sólidos (LI; KAWI, 2008; LU, S.-M.; ALPER, 2003)

Recentemente, nanopartículas magnéticas têm sido intensivamente estudadas para suporte de catalisadores devido suas propriedades magnéticas, incluindo catalisadores para hidroformilações. O complexo $[\text{Rh}(\text{cod})(\eta^6\text{-ácido benzóico})]\text{BF}_4$ foi diretamente imobilizado na superfície de nanopartículas de ferrita (YOON; KIM; LEE, 2003) através de interações com o grupo ácido carboxílico. O catalisador suportado demonstrou excelente atividade catalítica e regiosseletividade em reações de hidroformilação, apresentando resultados compatíveis frente aos obtidos com a sua contraparte homogênea. (YOON et al., 2003)

Abu-Reziq *et al.* utilizou nanopartículas magnéticas recobertas com sílica e conjugadas ao dendrímero PAMAM para posterior derivatização com grupo difenilfosfina para a imobilização de $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$. Sendo o material, então, utilizado em reações de hidroformilação. (ABU-REZIQ et al., 2006)

4.2. Objetivos

Incremento das propriedades catalíticas de nanopartículas de núcleo magnético em reações de hidroformilação através da conjugação de materiais dendríticos na superfície da partícula.

4.3. Procedimento Experimental

4.3.1. Preparação de Nanopartículas de Ródio (Rh NPs)

Nanopartículas de Ródio foram sintetizadas pela metodologia empregada por Brust *et al.* (BRUST *et al.*, 1995), com algumas modificação. (GARCIA *et al.*, 2015) Cloreto de Ródio(III) hidratado (30 mg, 0,11 mmol de Rh) e brometo de tetraoctilamônio (TOAB; 130 mg, 0,23 mmol) foram dissolvidos em 30 mL de água deionizada e 30 mL de tolueno, respectivamente, a temperatura ambiente. A fase aquosa teve seu pH ajustado para 6 pela adição de solução de NaOH (1 mol/L). A solução de TOAB foi adicionada, gota a gota, à solução contendo RhCl_3 e a mistura foi agitada por 30 minutos. Uma solução de borohidreto de sódio em água (5 mL, 1,36 mmol) foi preparada e adicionada, gota a gota. A fase orgânica passou a apresentar coloração negra e o sistema foi agitado por 3 horas. A fase orgânica contendo as nanopartículas de Ródio foi separada e lavada com água.

4.3.2. Preparação do Suporte - $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$

4.3.2.1. Preparação de Fe_3O_4

Nanopartículas de Fe_3O_4 foram preparadas pelo método de co-precipitação: 10 mL de uma solução aquosa de $FeCl_3$ (1 mol/L) foi misturada com 2,5 mL de uma solução de $FeCl_2$ (2 mol/L) em HCl (2 mol/L). Ambas soluções foram preparadas com água desoxigenada e utilizadas prontamente. Após a mistura, em atmosfera inerte (N_2), a solução contendo os cloretos de ferro foi adicionada em 125 mL de uma solução de hidróxido de amônio (0,7 mol/L, água desoxigenada) sob vigorosa agitação, utilizando-se agitação mecânica (10.000 rpm, Ultra-Turrax T18 Homogeneizer, IKA Works) em atmosfera de nitrogênio. Após 30 min, o precipitado negro formado foi separado magneticamente e redisperso em uma nova porção de água (3 x 250 mL). Ácido oleico (5 mmol) dissolvido em 5 mL de acetona foi adicionado, gota a gota. A solução foi aquecida a 80 °C por 30 min sob agitação. O precipitado resultante foi separado magneticamente, lavado com acetona e redissolvido em 50 mL de tolueno. A solução foi, então, centrifugada a 2000 rpm por 1 hora para separação de qualquer precipitado, sendo o sobrenadante coletado. A concentração de sólido na solução resultante foi 25 g/L. (ROSSI, L. M. et al., 2007)

4.3.2.2. Recobrimento da Nanopartícula - $Fe_3O_4@SiO_2$

Uma suspensão contendo 1 g de nanopartículas de magnetita recobertas com ácido oleico foi adicionada a 2 L de 2-propanol contendo 50 mL de amônia concentrada (28% v/v). A solução foi dividida em 3 porções, sendo cada uma submetida a um banho de ultrassom por 1 hora. Após a combinação das frações, 5 mL (22,4 mmol) de

tetraetoxissilano (TEOS) em 100 mL de 2-propanol foram adicionados, gota a gota, durante um período de 3 horas, na solução contendo magnetita sob agitação mecânica. A agitação permaneceu por 3 horas adicionais, e então as nanopartículas recobertas com sílica foram separadas magneticamente e lavadas 3 vezes com água deionizada. O produto final (2 g) foi obtido após secagem a temperatura ambiente, sob pressão reduzida (0,2 mmHg, 24 horas).(ABU-REZIQ et al., 2006; LU, Y. et al., 2002)

4.3.2.3 Aaminação - $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$

Dez gramas de nanopartículas secas de magnetita recoberta com sílica foram suspensas em 200 mL de tolueno seco. Após sonificação por 35 minutos, uma solução de 2,5 mL (10,68 mmol) de (3-aminopropil)triethylsilano foi adicionada sob agitação mecânica. A solução foi aquecida a 105 °C por 20 horas. As partículas foram separadas magneticamente após o resfriamento a temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com metanol, e secadas sob pressão reduzida por 24 h.(ABU-REZIQ et al., 2006)

4.3.3. *Preparação do Material Hiperramificado Modificado*

4.3.3.1 *Preparação do Intermediário Glicina-BOC: Gly-BOC*

Glicina (5,0 g, 66,6 mmol) foi suspensa em uma mistura de 40 mL de dioxano e 40 mL de uma solução 1 mol/L de NaOH em um banho de gelo. BOC (16,0 g, 17 mL, 73,3 mmol) foi adicionado, gota a gota, a solução. Após a adição, a solução foi agitada a temperatura ambiente por 8 horas. O solvente orgânico foi removido a pressão reduzida e a fase aquosa teve o valor de pH ajustado para 4, com a adição de uma solução 1 mol/L

de HCl. A fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 100 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada e evaporada a pressão reduzida, resultando em um pó branco.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1,46 (s, 6H); 1,53 (s, 3H); 3,97 (d, 2H)

4.3.3.2. Preparação de TMP-HYP-[G#2]-(Gly-BOC)_y

TMP-HYP-[G#2]-(OH)₁₂ (2,5 g, 2,1 mmol, 25,4 mmol de grupos -OH, 1,0 eqv.), Gly-BOC (5,8 g, 33,1 mmol, 1,3 eqv.), DMAP (4,1 g, 33,1 mmol, 1,3 eqv.) e piridina (10,3 mL, 127,2 mmol, 5,0 eqv.) foram dissolvidos em 50 mL de CH₂Cl₂ seco, em um banho de gelo. Uma solução de DCC (6,8 g, 33,1 mmol, 1,3 eqv.) em 25 mL de CH₂Cl₂ foi então adicionada, gota a gota. A mistura reacional foi aquecida a temperatura ambiente e mantida sob agitação durante 72 h. A ureia formada e o catalisador não reagido foram removidos por filtração. O filtrado foi diluído em 1 L de CH₂Cl₂ e a fase orgânica lavada com uma solução 10% m/m de NaHSO₄ (3 x 120 mL) e *brine* (1 x 120 mL). A fração orgânica foi secada com MgSO₄, concentrada e evaporada em pressão reduzida. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, sendo eluído com uma mistura 60:40 AcOEt:Hex resultando em óleo amarelado.

TMP-HYP-[G#2]-(Gly-BOC)_y

Sólido Branco

Rendimento: 94%

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (t, 3H); 1,26 (m, 27H); 1,44 (s, 81H); 3,89 (d, 20H); 4,10 (s, 6H); 4,27 (s, 36H); 5,38 (s, 9H)

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ 17,2; 17,3; 17,6; 50,6; 50,7; 63,6; 64,1; 64,2; 64,4; 65,3; 68,5; 68,8; 70,19; 70,3; 172,9; 174,5; 174,7; 175,1

EMAR-ESI: Calculado para C₁₁₄H₁₈₅N₉O₅₇ [M+Na⁺] 2612,16 Encontrado 2616,10

4.3.3.3. Preparação de TMP-HYP-[G#2]-(NH₂)_z

TMP-HYP-[G#2]-(Gly-BOC)_y (2,0 g, 0,65 mmol) foi dissolvido em 5 mL de CH₂Cl₂ em um banho de gelo, sofrendo posterior adição, gota a gota, de 5 mL de uma solução de TFA em CH₂Cl₂ (1:1). A mistura foi aquecida a temperatura ambiente e agitada por 15 minutos. O solvente e ácido residual foram removidos sob pressão reduzida. O resíduo, TMP-HYP-[G#2]-(NH₂)_z, foi dissolvido em metanol seco (10 mL) e agitado na presença de 2 g de resina de troca iônica (Amberlyst®, *hydroxide form*) por 15 minutos.

TMP-HYP-[G#2]-(NH₂)_z

Sólido Branco

Rendimento: 94%

¹H NMR (200 MHz, MeOD-*d*₄): δ 0,99 (t, 3H); 1,21 (s, 9H); 1,33 (m, 18 H); 1,60 (q, 2H); 3,92 (d, 7H); 4,16 (s, 6H); 4,31-4,43 (m, 36H)

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ 16,9; 17,5; 39,9; 46,7; 50,6; 50,8; 52,6; 64,1; 64,8; 66,7; 168,4; 173,3; 174,6

EMAR-ESI: Calculado para C₇₃H₁₁₉N₁₁O₄₁ [M+Na⁺] 1827,42 Encontrado 1834,84

4.3.4. Preparação de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2$

4.3.4.1. Funcionalização de Nanopartículas com Glutaraldeído

Em um balão de fundo redondo, 200 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-NH}_2$ (9,4 μmol de NH_2) foram suspensos em 40 mL de tampão fosfato salino (PBS) (pH= 7,2, 0,1 mol/L) sob agitação mecânica. Posteriormente, houve a adição de 1,6 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído (50% m/m). A mistura foi vigorosamente agitada a temperatura ambiente por 1,5 horas. As partículas funcionalizadas com aldeído foram isoladas por centrifugação e lavadas diversas vezes com PBS e água deionizada. O material foi mantido disperso em água.

4.3.4.2. Imobilização do Polímero Hiperramificado na Nanopartícula - $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP}-(\text{NH}_2)_z$

Em um balão de fundo redondo de 3 bocas, 4,59 g de $\text{TMP-HYP-[G\#2]}-(\text{NH}_2)_z$ (2,8 mmol, 3,0 eqv.) foram dissolvidos em 200 mL de PBS (pH= 7,2, 0,1 mol/L) sofrendo a lenta adição de 2,0 g de nanopartículas funcionalizadas com aldeído (0,94 mmol de aldeído terminal, 1,0 eqv.) suspensas em 200 mL de PBS. A mistura reacional foi mantida sob agitação *overnight*, a temperatura ambiente. As nanopartículas modificadas foram isoladas por centrifugação e lavadas diversas vezes com PBS e água. Finalmente, o sólido resultante, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP}-(\text{NH}_2)_z$, foi lavado com metanol e mantido neste meio orgânico.

4.3.4.3. Fosfinometilação - Preparação de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2$

Em etapa posterior, os grupos amino de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-(NH}_2)_z$ foram submetidos a fosfinometilação. Sob atmosfera inerte, uma mistura de paraformaldeído (1,8 mmol) e difenilfosfina (2,0 mmol) em metanol (5 mL) foi aquecida a 60 °C por 1 h. Posteriormente, foi efetuada a adição de uma suspensão contendo as nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-(NH}_2)_z$ (1,0 g, 0,5 mmol de grupos -NH_2) em uma mistura de 20 mL de tolueno e 10 mL de metanol, a mistura foi, então, agitada a temperatura ambiente, *overnight*. O sólido resultante $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2$ foi lavado 5 vezes com tolueno e seco sob pressão reduzida.

4.3.4.4. Preparação do Catalisador de Ródio: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2\text{Rh}$

O material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2$ foi, então, utilizado para a imobilização de nanopartículas de ródio. Uma solução contendo nanopartículas Rh-TOAB (ca. 30 mL; 0,11 mmol de Rh) sofreu adição de 500 mg de suporte. A mistura foi agitada *overnight* e o sólido separado magneticamente. Após a separação, o catalisador, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2$, foi lavado diversas vezes com tolueno e seco sob pressão reduzida.

4.3.5. Reações Catalíticas - Hidroformilação

Experimentos de catálise foram conduzidos em reatores de aço inox fabricados (*homemade*), de 100 mL de volume, havendo agitação mecânica. As reações foram seguidas por cromatografia gasosa (CG) pela amostragem da fase líquida através de uma válvula. Em um experimento típico, a mistura de tolueno (20 mL), catalisador contendo Ródio (1 μmol de Rh), substrato (2,0 mmol) e dodecano (padrão interno, 1 mmol) foram

transferidos para o reator, havendo posterior pressurização a 40-60 atm de uma mistura de CO/H₂. A temperatura (80-100 °C) foi mantida utilizando-se um banho de óleo sobre uma chapa aquecedora conectada a um controlador de temperatura digital. As reações foram conduzidas sob agitação (700 rpm). Após o termino da reação, o reator era resfriado a temperatura ambiente, a pressão liberada e o catalisador recuperado magneticamente utilizando-se um ímã na parte externa do reator.

4.4. Resultados e Discussão

A funcionalização da superfície de nanopartículas de magnetita recobertas com sílica com grupos difenilfosfina demonstraram grande ganho de propriedade, tanto no que tange reciclagem do catalisador, como sua performance em reações de hidroformilação.(GARCIA et al., 2015) Uma vez que a reatividade é modulada pelas entidades químicas que estabilizam a nanopartícula,(ROSSI, L. et al., 2013) se torna crítica a escolha dos grupos periféricos a serem inseridos em um suporte.

Uma estratégia que demonstrou resultados significativos, demonstrado por Garcia *et al.*,(GARCIA et al., 2015) foi a derivatização de grupos aminos da superfície de NPs com grupos bis(metileno-difenilfosfina), para posterior impregnação de nanopartículas de Ródio. Porém, ainda que esta metodologia tenha possibilitado melhorias na mitigação da lixiviação do metal, a quantidade impregnada se apresentou relativamente baixa (0,2% m/m).

O valor para impregnação recai sobre dois aspectos: a baixa densidade de grupos contendo fosfina (0,4 mmol de -CH₂PPh₂ por grama, rendimento desta etapa: 42%), e o

baixo rendimento na etapa de impregnação de metal (rendimento= 4,4%).(GARCIA et al., 2015)

Dessa forma, o aumento do número de grupos fosfinas terminais se mostra uma estratégia válida na tentativa de aumento da quantidade de metal impregnado, se aumentando, assim, o potencial catalítico. Este conceito foi explorado com a adição de um polímero hiperramificado na superfície do material, magnificando o número de grupos passíveis de metilfosfinação.

Os materiais hiperramificados de segunda geração, TMP-HYP-[G#2]-(OH)₁₂, foram sintetizados e discutidos no Capítulo 1 do presente trabalho. Em etapa posterior, a conjugação do aminoácido glicina permitiu ao material contar com grupos -NH₂ em sua periferia. A síntese é esquematicamente representada a seguir. (Esquema 4.1)

Esquema 4.1. Estratgia sinttica para obteno de TMP-HYP-[G#2]-(OH)₁₂ e posterior modificao para introduo de grupos -NH₂ perifricos

O nmero de grupos aminos perifricos foram obtidos atravs de espectros de ¹H RMN, e confirmados por espectrometria de massas (ESI-TOF). A reao entre o material hiperramificado com glicina-BOC resultou no aparecimento de picos referentes ao grupo protetor BOC (**p**), ao grupo amino (**n**) e grupos -CH₂ (**m**). (Figura 4.2)

Figura 4.2. Espectros de ^1H RMN dos materiais hiperramificados ao longo do procedimento de conjugação de glicina. São especificados os solventes deuterados utilizados em cada caso. Espectro de massas (ESI-TOF) do material final TMP-[G#2]-(Gly-NH₂)_z

A etapa de desproteção foi acompanhada pelo desaparecimento do pico referente ao grupo BOC (**p**). A integração de sinais provenientes do núcleo (**a**), comparados a integração do sinal referente ao grupo $-\text{CH}_2$ (**m**) da molécula de glicina, revelaram o número de grupos $-\text{NH}_2$ periféricos; 7,6-NH₂/molécula de polímero hiperramificado.

As nanopartículas sintetizadas, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e Rh-TOAB, foram caracterizadas quanto a seu tamanho e estrutura em outro trabalho, realizado por Garcia *et al.*, (GARCIA et al., 2015) sendo, no presente trabalho, discutida somente a modificação destas com materiais hiperramificados.

Nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, primeiramente, foram submetidas a reação com TEOS para a obtenção de grupos amino em sua superfície. Este material, então, foi submetido a uma reação com o agente de *cross-linking* glutaraldeído, resultando em partículas contendo grupos aldeídos pendentos.(CHAUHAN et al., 2013; ROSSI, L.; QUACH; ROSENZWEIG, 2004)Estas sofreram a adição de TMP-HYP-[G#2]-(NH_2)_z, o qual foi ligado a superfície por ligações do tipo imina.(Figura 4.3) (HUANG et al., 2011)

Figura 4.3. Reações de funcionalização da superfície de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, resultando no material recoberto com materiais hiperramificados, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-(NH}_2)_z$

O material obtido, contendo o número de grupos amino magnificado pela inserção do material hiperramificado, sofreu, então, a adição de grupos fosfina, através de reação com paraformaldeído e difenilfosfina.(GARCIA et al., 2015)(Figura 4.4)

Figura 4.4. Reação de fosfinação e posterior impregnação de nanopartículas de Rh-TOAB

Em etapa posterior, nanopartículas de Ródio estabilizadas por TOAB foram imobilizadas no suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2$ (Figura 4.4). As NPs de Ródio ($2,5 \pm 0,3 \text{ nm}$) foram sintetizadas por metodologia adaptada de Brust *et al.* (ROSSI, L. *et al.*, 2013)

As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas por análises de FTIR (Figura 4.5) e Tg. (Figura 4.6)

Figura 4.5. FTIR das nanopartículas ao longo da modificação de seus grupos periféricos. FTIR obtidos pela impregnação do material sólido em pastilhas de KBr

O espectro de FTIR (Figura 4.5) de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ apresenta bandas características de sílica: estiramento antissimétrico da ligação Si-O-Si em 1106 cm^{-1} ; estiramento antissimétrico da ligação Si-OH em 935 cm^{-1} e estiramento simétrico da ligação Si-O-Si em 794 cm^{-1} . O espectro da espécie $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ apresenta uma nova banda vibracional em $2700\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ característica de CH_2 oriundos dos grupos aminopropil. Após reação com glutaraldeído, o incremento (proporcional) de intensidade desta banda sugere a presença de um maior número de grupos CH_2 . (VAZ et al., 2014) Bandas oriundas do estiramento das ligações iminas (N=CH- $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$) se mostram sobrepostas as bandas provenientes da sílica, não permitindo sua correta atribuição. (PIOVEZAN et al., 2012)

A banda de vibração mais intensa do grupo fosfina (C-C grupo fenil) se apresenta no intervalo $1600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$, porém acaba por ser de difícil visualização devido a sua sobreposição com bandas da matriz de sílica. Os sinais da vibração C-H ($750\text{-}690$) também não se mostram claros, porém, esta região apresenta uma certa alteração quando comparada aos demais espectros que não contam com o grupo fosfina.

Figura 4.6. Termogravimetria (Tg) das nanopartículas em diferentes etapas de derivatização. A esquerda Tg de materiais derivatizados sem polímeros hiperramificados, a direita derivatização com materiais hiperramificados. Valores destacados representam a porcentagem de massa perdida após a perda de água pelos materiais (perda de massa a partir de $250\text{ }^\circ\text{C}$)

Análises termogravimétricas (Figura 4.6) proveram evidências adicionais acerca das modificações efetuadas nas nanopartículas. A perda de massa em temperaturas abaixo de 100 °C em todas as amostras denota a perda de água adsorvida na superfície dos materiais. Sendo que, acima desta temperatura, as curvas demonstram caráter marcadamente distinto. As nanopartículas de magnetita recoberta com sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) e após sua derivatização com APTES ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$) apresentam modesta perda de massa acima de 100 °C. No entanto, a perda mássica das demais amostras é significativa e se evidencia os diferentes perfis apresentados pelo materiais derivatizados com polímeros hiperramificados, frente aos derivatizados sem este componente. O material $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYP-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2$ apresenta uma perda de massa (contabilizada após a perda de água) de 25,7%, valor este 1,9 vezes maior que o obtido no ensaio com $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2$ (perda mássica de 13,6%). O resultado obtido sugere a efetiva ligação covalente dos materiais hiperramificados na superfície da cobertura de sílica.

O material impregnado com Ródio, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYPN}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2\text{Rh}$, foi analisado por FAAS e apresentou o valor de 1% m/m de Rh. Este valor se mostrou 5 vezes maior que o obtido no material análogo, sem a presença do polímero ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2$ - 0,2% m/m). (GARCIA et al., 2015) O presente resultado indica que o aumento na quantidade de grupos fosfinas pendentes na superfície da nanopartícula favorecem a impregnação do metal no suporte.

Tabela 4.1. Comparação entre resultados obtidos para diferentes nanopartículas impregnadas com Rh

	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{Rh}$	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2\text{Rh}$	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYPN}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2\text{Rh}$
Massa de Fração Orgânica na Superfície (%)	4,4	13,6	25,7
Rendimento de Impregnação (%)	8,2 [§]	4,4	9
Concentração (m/m) de Rh (%) [*]	0,2-0,6	0,2	1,0

[§] Calculado pelo valor médio de impregnação de Rh

^{*}Determinado por FAAS/ICP-OES

Como pode ser observado na Tabela 4.1, o rendimento obtido com os materiais utilizando o polímero hiperramificado é significativamente maior, quando comparado ao outro material contendo apenas fosfina, o mesmo é observado para a concentração de Rh. Ainda que comparativamente o material sem fosfina ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{Rh}$) apresente valores similares de rendimento e impregnação, a sua performance catalítica e de reciclagem são distintas dos demais, demonstrando a necessidade de fosfinação.(GARCIA et al., 2015)

O material, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-HYPN}(\text{CH}_2\text{PPh}_2)_2\text{Rh}$, foi, então, utilizado em reações de hidroformilação com diversos substratos contendo duplas ligações.

Figura 4.7. Reação de hidroformilação utilizando catalisador suportado

A eficiência, seletividade e demais propriedades catalíticas, no entanto, extrapolam o escopo deste trabalho. Ainda que o material tenha apresentado resultados interessantes frente aos substratos utilizados, os ensaios, assim como seus resultados, foram estudados e discutidos por outro grupo de pesquisa que colaborou conosco neste trabalho. Tais resultados se encontram disponíveis na tese de doutorado de Marco Aurélio Garcia Suller, 2016, sob orientação da Prof. Dra Liane Rossi (IQ-USP).

4.5. Conclusão

O aumento no valor de impregnação de metal no suporte catalítico foi realizado com sucesso utilizando-se a conjugação de um material hiperramificado contendo diversos grupos periféricos. A síntese de polímeros hiperramificados utilizada se mostrou de baixa complexidade quando comparada a sua contraparte dendrímica.

O catalisador obtido apresentou características de destaque, como baixa lixiviação, elevada reciclabilidade e reatividade. Possibilitando, assim, sua aplicação para diversos substratos e condições experimentais para reações de hidroformilação. Processo catalítico, este, muito importante para obtenção de aldeídos de elevado valor agregado.

Materiais e Equipamentos

Os solventes e reagentes utilizados foram tratados ou preparados conforme descrito a seguir: (PERRIN; ARMAREGO, 1996)

5.1. Solventes

N,N'-dimetilformamida (DMF) (Aldrich, 99%; Carlo Erba, PA) foi refluxada sobre CaH_2 (Riedel-de Haën, 99%), destilada a 10 mbar e armazenada sobre peneira molecular 4 Å ativada (Aldrich).

Éter etílico (Merck, PA; Vetec, PA) foi refluxado sobre sódio metálico (Vetec, PA) na presença de benzofenona (Aldrich, 99%), até coloração azul escura persistente, destilado a pressão ambiente e armazenado sobre fios de sódio.

Metanol (Merck, grau espectroscópico; Baker, PA) anidro foi obtido via tratamento com peneira molecular 3 Å ativada, seguido de destilação a pressão ambiente.

Piridina (Carlo Erba, PA) foi refluxada sobre CaH_2 (Riedel-de Haën, 99%), destilada a pressão ambiente e armazenada sobre pérolas de KOH (Carlo Erba, PA).

Tolueno (Merck, PA; Vetec, grau espectroscópico) foi refluxado sobre sódio metálico (Vetec, PA) e destilado a pressão ambiente.

Acetona (Baker, PA; Vetec, PA), acetato de etila (AcOEt) (Carlo Erba, PA), clorofórmio (Merck, PA), diclorometano (Baker, PA; Merck, grau HPLC), dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, grau espectroscópico), 1,4-dioxano (Acros Organics, PA), etanol anidro (Carlo Erba, PA; Merck, PA; Vetec, grau espectroscópico), éter de petróleo (Vetec, grau

espectroscópico) e *n*-hexano (Merck, PA) foram usados como recebidos;

Os solventes deuterados: CDCl₃ (0,05% TMS, Cambridge Isotope Laboratories), DMSO-*d*₆ (0,05% TMS, Cambridge Isotope Laboratories), D₂O (99,9% D, Cambridge Isotope Laboratories), MeOD (0,05% TMS, Cambridge Isotope Laboratories) foram utilizados como recebidos nas análises por RMN.

Água utilizada nos experimentos foi duplamente purificada - por osmose reversa e eletrodeionização (Elix 10, Millipore) e, em seguida, por um sistema de ultrapurificação Milli-Q Gradient (Millipore) apresentando resistividade de 18,2 MΩ.cm².

5.2. Reagentes

Ácido bis(metilol)propionico (Bis-MPA), trimetilolpropano (TMP), 2,2-dimetoxipropano, 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), ácido *p*-toluenossulfônico (*p*-TSA), 4-(dimetil)aminopiridina (DMAP), 1,12-dodecanodiol (DDD), cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), ácido 2,5-dihidróxi-benzóico (DHB), Poli(etileno glicol) metil éter (mPEG - MW= 1000 Da) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados como recebidos. Resina DOWEX 50WX2 (Sigma-Aldrich) foi tratada com uma solução 1 mol/L de HCl antes de sua utilização.

Anidrido acético (Merck, PA; Vetec, grau espectroscópico) e trietilamina (TEA) (Aldrich, 99%) foram destilados fracionadamente a 10 mbar.

Cloreto de tionila (Merck, PA) foi destilado a pressão ambiente;

Acetato de sódio (Aldrich, 99%), ácido acético glacial (Merck, PA), ácido clorídrico (Merck, 37%), ácido nítrico (Merck, 65%), ácido sulfúrico (Merck, 95 - 97%), cloreto de cálcio anidro granulado (Carlo Erba, PA), cloreto de sódio (Merck, PA), D-

gluconato de sódio (Aldrich, 97%), hidróxido de potássio em pérolas (Carlo Erba, PA), hidróxido de sódio em pérolas (Carlo Erba, PA), pentacloreto de fósforo (Aldrich, 99%), pentóxido de difósforo (Aldrich, PA), sílica-gel (Aldrich, 70-230 mesh, 60 Å), sílica-gel azul (Synth) e sulfato de magnésio anidro (Aldrich, PA; Vetec, PA) foram utilizados como recebidos;

Lactídeo (3,6-Dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona) foi doado pela NatureWorks LLC (Blair, NE – USA).

Dilaurato de di-n-butilestanho (DBTL) foi obtido da Alfa Aesar (Ward Hill, MA – USA). Isotiocianato de fluoresceína (FITC), tampão salino fosfato (PBS, 10 X) e ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanossulfônico (HEPES) foram obtidos da Thermo-Scientific (Rockford, IL).

Membranas de diálise de celulose regenerada (MWCO: 3000, 8000, 12000) foram obtidas da Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA - USA). Amicon Ultra-15 (Dispositivos para ultra-filtração) MWCO 10.000 Da foram adquiridos da EMD Millipore (Billerica, MA - USA)

Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin* - BSA), Tripsina suplementada com 0,25% EDTA, Triton-X-100 foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, 1X) foi preparada seguindo procedimento previamente reportado por Irvine Scientific (Santa Anna, CA - USA).

Células do epitélio bronquial humano da linhagem Calu-3 (HTB-55) foram obtidas da ATCC (Manassas, VA - USA). Frascos de cultura celular (Greiner BioOne, 75 cm²), Placas de 24 (Corning Costar) e 96 poços (Greiner BioOne) foram obtidos da VWR International. *Transwell® Inserts* (membrana de poliéster, Corning, 0,33 cm², tamanho de poro 0,4 µm) foram obtidas da VWR International.

Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) e tripsina (TRYple express) foram obtidos da Invitrogen. Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum* – FBS, non-heat inactivated) foi obtido da Atlanta Biologicals (Flowery Branch, GA – USA). Penicilina-Estreptomicina (AB) Gibco foi obtida da Invitrogen Life Technologies (Rockford, IL).

O ensaio MTT (Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il-2,5-Difeniltetrazólio) foi obtido da Life Technologies (Grand Island, NY - USA) e utilizado segundo o protocolo detalhado fornecido pelo fabricante.

O ensaio BCA foi adquirido da Pierce (Evanston, IL – USA)

O propelente HFA-277 (Dymel 227ea/P) foi doado pela DuPont (Wilmington, DE, USA). 2*H*,3*H*-perfluoropentano (HPFP, DuPont Vertrel XF) foi obtido da TMC Industries Inc. (Waconia, MN, USA).

As peneiras moleculares 3 e 4 Å (Aldrich, beads, 8–12 mesh) foram ativadas a 300 °C em mufla por 3 h e resfriadas em dessecador a pressão reduzida;

Todas as soluções foram filtradas através de membranas Durapore (PTFE, diâmetro do poro: 0,22 µm), da Millipore;

Cromatografia em coluna utilizou-se de sílica-gel 70-230 mesh, 60 Å (Aldrich), como fase estacionária;

Cromatografias de camada delgada (TLC) utilizaram cromato-folhas de alumínio (3,0 x 9,0 cm) recobertas com sílica-gel 60 F254 (Merck). Para revelação foram preparadas e utilizadas as seguintes soluções: ácido fosfomolibídico (100 mg/mL em etanol absoluto), aspersão de solução de H₂SO₄ 25% v/v. Sendo ambos reveladores aquecidos com auxílio de um soprador térmico, para a efetiva revelação.

5.3 Equipamentos

5.3.1. Liofilização

As soluções aquosas congeladas foram liofilizadas em equipamentos Labconco FreeZone (Kansas City, MO).

5.3.2. Valores de pH

O controle de pH foi feito em um pHmetro Qualxtrom 8010, com eletrodo de vidro.

5.3.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ^1H RMN foram registrados em espectrômetros Varian Gemini 200, operando a 200 MHz para ^1H e Varian Gemini 300, operando a 300 MHz para ^1H ; pertencentes à Central Analítica do IQUSP. Foram utilizadas, sempre que possível, para análises de ^1H , concentrações da ordem de 10 mg de analito para 0,7 mL de solvente deuterado. Para análises de ^{13}C foram utilizadas soluções concentradas de amostra (na ordem de 100 mg em 0,7 mL, quando possível). Foram utilizados os tubos Wilmad 735PP, de 5,0 mm de diâmetro, para todas as amostras. As atribuições dos espectros foram feitas com o software ACD/NMR Processor Academic Edition (ACD/Labs), versão 12.01, e são baseadas em valores de δ e J tabelados (FURNISS, 1989; SANDERS e HUNTER, 1993; GOTTLIEB et al., 1997; BREITMAIER, 2002) e/ou disponíveis na literatura para compostos semelhantes. Utilizou-se o sinal de TMS, ou sinal residual do solvente como referência. Nos espectros de RMN de ^{13}C , o pico referente ao sinal do CDCl_3 foi ajustado para 77,0 ppm; 39,5 ppm para o $\text{DMSO}-d_6$; 49,0 ppm para $\text{MeOD}-d_4$. Os

deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades foram representadas utilizando-se as seguintes abreviaturas: s (singleto), d (dubleto), t (triplete), q (quarteto), quint (quinteto), sext (sexteto), hept (hepteto), oct (octeto), m (multiplete), slargo (singleto largo).

5.3.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (*Fourier Transfom Infrared Spectroscopy - FTIR*)

Os espectros na região do infravermelho (FTIR) foram obtidos com filmes líquidos utilizando-se janelas de KBr, ou com pastilhas de KBr contendo a amostra dispersa. Foi utilizado um espectrômetro (Shimadzu, modelo IRPrestige - 21), operando em transformada de Fourier, com resolução de 4 cm^{-1} . Para os espectros de FTIR obtidos, foram reportadas as principais absorções, sempre em cm^{-1} . As atribuições foram baseadas na literatura (NEELY, 1957; RADELL e HARRAH, 1962; CABASSI et al., 1978; SOCRATES, 2001)

5.3.5. Espectroscopia Raman (*Raman Spectroscopy*)

Os espectros Raman (em alta pressão) foram obtidos numa geometria de 180° (ou *backscattering*) em um espectrômetro triplo monocromador da Horiba, Jobin-Yvon T64000, equipado com detector CCD resfriado por N_2 líquido. Um laser misto Ar/Kr da Coherent foi utilizado como fonte de radiação incidente em 488 nm. Os espectros foram coletados durante 20 ou 50 segundos e acumulados por 100 vezes para melhorar a relação sinal-ruído. As amostras foram alocadas numa cela de alta pressão com janela de

safira, cujos valores de temperatura e pressão foram controlados por um controlador PID e uma bomba seringa (Teledyne Isco 500D), respectivamente.

Os espectros Raman (em condições normais de pressão) foram obtidos em um espectrômetro interferométrico FT-Raman Bruker FRS-100/S, com laser de excitação Nd³⁺/YAG no infravermelho próximo ($\lambda_0 = 1064$ nm) com resolução espectral de 4 cm⁻¹.

5.3.6. *Análise Elementar - CHN*

Análises elementares foram obtidas através de um equipamento Perkin-Elmer CHN 2400 pertencente ao laboratório da Central Analítica do Instituto de Química da USP, São Paulo.

5.3.7. *Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry - MS)*

Espectros de massa de alta resolução por ionização *electrospray* (EMAR-ESI) foram obtidos por infusão direta em um equipamento MicroTOF QII Bruker, com gás de nebulização 0,4 bar, *dry gas* 4 L/min, temperatura 180 °C, voltagem do capilar 4500V, energia de colisão 8 eV, modo positivo, fluxo 180 µL/h.

Espectros de massa obtidos por ionização/dessorção por laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF) foram obtidos em equipamento Ultraflex, Bruker. As amostras foram preparadas misturando-se volumes iguais de uma solução 20 mg/mL de matriz (ácido 2,5-dihidróxi-benzóico) com uma solução 5 mg/mL de composto de interesse em água. Desta mistura foram aliqotados 2 µL, depositados e secos em uma placa de aço inoxidável (MALDI target Plate – MTP 384, Bruker Daltonics). O espectro de massas foi gerado no modo linear utilizando-se laser de nitrogênio a 20 kV. A massa do composto foi determinada comparando-se o espectro obtido com um compendio de

padrões de calibração de peptídeos utilizando-se o software FlexAnalysis (Bruker Daltonics).

5.3.8. Análises Térmicas - Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry - DSC)/ Termogravimetria (Tg)

As análises térmicas foram efetuadas em um equipamento Shimadzu DSC-60 (Calorimetria Diferencial de Varredura) e DTG-60 (Termogravimetria). A rampa de aquecimento utilizada foi de 10 °C/min, sendo a atmosfera mantida com fluxo de 50 mL/min de N₂, sendo utilizados cadinhos de alumínio para DSC e platina pra Tg. Como referência utilizou-se um cadinho vazio.

5.3.9. Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering - DLS) Potencial Zeta (ζ)

Análises de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta foram conduzidas em um equipamento Malvern Zetasizer. As amostras para os ensaios foram obtidas dissolvendo-se 1,5 mg do composto de interesse em 1,5 mL de água deionizada ou solvente. O tamanho reportado é a média de 5 medições, sendo que cada uma contou com 10 tomadas de dados.

5.3.10. Cromatografia Gasosa (CG)

Análises cromatográficas foram efetuadas em equipamento Shimadzu QP2010, equipado com coluna capilar Rtx-5MS e detecção FID (detector por ionização de chama).

5.3.11. Determinação de Ródio

A concentração de Ródio nas nanopartículas foram obtidas através de espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS) através de equipamento Shimadzu AA-6300. A lixiviação de Ródio foi obtida pela análise das soluções sobrenadantes através de espectroscopia ICP-OES com equipamento SPECTRO ARCOS.

5.3.12. Ensaios em $scCO_2$

Os ensaios realizados para estudo de comportamento e encapsulamento em $scCO_2$ foram efetuados em um monitor de fases de volume variável (Waters, modelo SPM20). O monitor de fases é formado por uma cela de alta pressão de volume variável (5-15,5 mL; volume do vaso) com agitação mecânica magneticamente acoplada, controlador de pressão e cartuchos de aquecimento. A cela é monitorada por câmera CCD através de uma janela de safira e alimentada com CO_2 pressurizado por uma bomba do tipo seringa (Teledyne Isco 260D).

O gás carbônico utilizado (Premier) apresentava pureza de 99,995%.

Bibliografia

ABU-REZIQ, R. et al. Metal Supported on Dendronized Magnetic Nanoparticles: Highly Selective Hydroformylation Catalysts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 15, p. 5279-5282, 2006/04/01 2006.

ABUCHOWSKI, A. et al. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 11, p. 3582-6, June 10, 1977 1977.

ACS. 2015. Disponível em: < scifinder.cas.org >. Acesso em: 09/2015.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, March 19, 2004 2004.

ALTARSHA, M.; INGROSSO, F.; RUIZ-LOPEZ, M. F. A New Glimpse into the CO₂-Philicity of Carbonyl Compounds. **ChemPhysChem**, v. 13, n. 14, p. 3397-3403, 2012.

ANDERSON, K. E.; SIEPMANN, J. I. Solubility in Supercritical Carbon Dioxide: Importance of the Poynting Correction and Entrainer Effects. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 36, p. 11374-11380, 2008/09/11 2008.

ANTONI, P. et al. A chemoselective approach for the accelerated synthesis of well-defined dendritic architectures. **Chemical Communications**, n. 22, p. 2249-2251, 2007.

ANTONI, P. et al. Pushing the Limits for Thiol-Ene and CuAAC Reactions: Synthesis of a 6th Generation Dendrimer in a Single Day. **Macromolecules**, v. 43, n. 16, p. 6625-6631, 2010/08/24 2010.

ATHANASIOU, K. A.; NIEDERAUER, G. G.; AGRAWAL, C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 93-102, 1996.

ATTHOFF, B. et al. Poly(lactides) with controlled molecular architecture initiated from hydroxyl functional dendrimers and the effect on the hydrodynamic volume. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 200, n. 6, p. 1333-1339, 1999.

BAIG, T. et al. A Review about Dendrimers: Synthesis, Types, Characterization and Applications. **International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 44-59, 2015.

BECKMAN, E. J. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 28, n. 2-3, p. 121-191, 3// 2004.

BELTING, M.; SANDGREN, S.; WITTRUP, A. Nuclear delivery of macromolecules: barriers and carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 4, p. 505-527, 2/28/ 2005.

BERCHE, B.; HENKEL, M.; KENNA, R. Fenômenos críticos: 150 anos desde Cagniard de la Tour. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 31, p. 2602.1-2602.4, 2009.

BESNARD, M. et al. Raman Investigation of the CO₂ Complex Formation in CO₂-Acetone Mixtures. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, n. 51, p. 13371-13379, 2007/12/01 2007.

BHARATWAJ, B. et al. Dendrimer Nanocarriers for Transport Modulation Across Models of the Pulmonary Epithelium. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 826-838, 2015/03/02 2015.

BRAY, C. L. et al. Polymer CO₂ Solubility. Structure/Property Relationships in Polyester Libraries. **Macromolecules**, v. 43, n. 22, p. 9426-9433, 2010/11/23 2010.

BROTZEL, F.; CHU, Y. C.; MAYR, H. Nucleophilicities of Primary and Secondary Amines in Water. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 10, p. 3679-3688, 2007/05/01 2007.

BRUST, M. et al. Novel gold-dithiol nano-networks with non-metallic electronic properties. **Advanced Materials**, v. 7, n. 9, p. 795-797, 1995.

BUHLEIER, E.; WEHNER, W.; VÖGTLE, F. "Cascade"- and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies. **Synthesis**, v. 1978, n. 02, p. 155-158, // 12.09.2002 1978.

CARLMARK, A.; MALMSTROM, E.; MALKOCH, M. Dendritic architectures based on bis-MPA: functional polymeric scaffolds for application-driven research. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 13, p. 5858-5879, 2013.

CASETTARI, L. et al. Effect of PEGylation on the Toxicity and Permeability Enhancement of Chitosan. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 2854-2865, 2010/11/08 2010.

CHAMPEAU, M. et al. Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 248-259, 7/10/ 2015.

CHANDRASEKARAN, K.; THILAK KUMAR, R. Structural, spectral, thermodynamical, NLO, HOMO, LUMO and NBO analysis of fluconazole. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 974-991, 11/5/ 2015.

CHAUHAN, N. et al. Immobilization of lysine oxidase on a gold-platinum nanoparticles modified Au electrode for detection of lysine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4-5, p. 265-271, 4/10/ 2013.

CHEN, J.-G. et al. Intermolecular-Interaction-Dominated Solvation Behaviors of Liquid Monomers and Polymers in Gaseous and Supercritical Carbon Dioxide. **Macromolecules**, v. 45, n. 11, p. 4907-4919, 2012/06/12 2012.

CHENG, Y. Mechanisms of Pharmaceutical Aerosol Deposition in the Respiratory Tract. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 3, p. 630-640, 2014/06/01 2014.

CHOI, H. S. et al. Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. **Nat Biotech**, v. 28, n. 12, p. 1300-1303, 2010.

CHU, C. R.; MONOSOV, A. Z.; AMIEL, D. In situ assessment of cell viability within biodegradable polylactic acid polymer matrices. **Biomaterials**, v. 16, n. 18, p. 1381-1384, 12// 1995.

CIEPLUCH, K. et al. Effect of dendritic polymers on a simple model biological membrane. **Journal of Polymer Research**, v. 22, n. 9, p. 1-10, 2015/08/30 2015.

CLARK, J. H.; TAVENER, S. J. Alternative Solvents: Shades of Green. **Organic Process Research & Development**, v. 11, n. 1, p. 149-155, 2007/01/01 2007.

CONTI, D. S. et al. Poly(amidoamine) Dendrimer Nanocarriers and Their Aerosol Formulations for siRNA Delivery to the Lung Epithelium. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 6, p. 1808-1822, 2014/06/02 2014.

CONTI, D. S. et al. Solvation in hydrofluoroalkanes: how can ethanol help? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 9, p. 1236-1244, 2012.

COSTA, N. J. S.; ROSSI, L. M. Synthesis of supported metal nanoparticle catalysts using ligand assisted methods. **Nanoscale**, v. 4, n. 19, p. 5826-5834, 2012.

DE BELDER, A. N.; GRANATH, K. Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 30, n. 2, p. 375-378, 10// 1973.

DITTMANN, I. et al. Laurate Permeates the Paracellular Pathway for Small Molecules in the Intestinal Epithelial Cell Model HT-29/B6 via Opening the Tight Junctions by Reversible Relocation of Claudin-5. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 9, p. 2539-2548, 2014/09/01 2014.

DMITRIEVA, N. I. et al. Cell cycle delay and apoptosis in response to osmotic stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 130, n. 3, p. 411-420, 10// 2001.

DOLOVICH, M. B.; DHAND, R. Aerosol drug delivery: developments in device design and clinical use. **The Lancet**, v. 377, n. 9770, p. 1032-1045, 11/1/2010 2010.

DRUGBANK. Disponível em: < <http://www.drugbank.ca/> >.

EL-SAYED, M. et al. Transepithelial transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. **Journal of Controlled Release**, v. 81, n. 3, p. 355-365, 6/17/ 2002.

ESFANDIARI, N. Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 129-141, 5// 2015.

- FELIU, N. et al. Stability and biocompatibility of a library of polyester dendrimers in comparison to polyamidoamine dendrimers. **Biomaterials**, v. 33, n. 7, p. 1970-1981, 3// 2012.
- FENG, J.; ZHUO, R.-X.; ZHANG, X.-Z. Construction of functional aliphatic polycarbonates for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 2, p. 211-236, 2// 2012.
- FINAN, J. D.; GUILAK, F. The effects of osmotic stress on the structure and function of the cell nucleus. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 109, n. 3, p. 460-467, 2010.
- FLEMING, O. S.; KAZARIAN, S. G. **Polymer Processing with Supercritical Fluids**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. 205-238 ISBN 9783527606726.
- FLORY, P. J. Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers. VI. Branched Polymers Containing A—R—Bf-1 Type Units. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 11, p. 2718-2723, 1952/06/01 1952.
- FORBES, B.; EHRHARDT, C. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 2, p. 193-205, 7// 2005.
- FRÉCHET, J. M. J. Dendrimers and other dendritic macromolecules: From building blocks to functional assemblies in nanoscience and nanotechnology. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 41, n. 23, p. 3713-3725, 2003.
- FRIBERG, S.; NYSTRÖM, A. M. Nanotechnology in the war against cancer: new arms against an old enemy – a clinical view. **Future Oncology**, v. 11, n. 13, p. 1961-1975, 2015/07/01 2015.
- FRIEDHOFEN, J. H.; VOGTLE, F. Detailed nomenclature for dendritic molecules. **New Journal of Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 32-43, 2006.
- GAJJAR DHAVAL, G. et al. **Designing, characterization, and thermal behavior of triazine-based dendrimers**. *Journal of Polymer Engineering*. 35: 41 p. 2015.
- GÄNSSLEN, M. Über Inhalation von Insulin. **Klinische Wochenschrift**, v. 4, n. 2, p. 71-71, 1925/01/01 1925.
- GARCIA, M. A. S. et al. Rhodium Nanoparticles as Precursors for the Preparation of an Efficient and Recyclable Hydroformylation Catalyst. **ChemCatChem**, v. 7, n. 10, p. 1566-1572, 2015.
- GARCÍA-GALLEGÓ, S.; NYSTRÖM, A. M.; MALKOCH, M. Chemistry of multifunctional polymers based on bis-MPA and their cutting-edge applications. **Progress in Polymer Science**, v. 48, p. 85-110, 9// 2015.

GEORGE, G.; GEETHA, M.; APPUKUTTAN, P. Antigen-Induced Activation of Antibody Measured by Fluorescence Enhancement of FITC Label at Fc. **Journal of Fluorescence**, p. 1-7, 2015/08/11 2015.

GILLIES, E. R.; FRÉCHET, J. M. J. Designing Macromolecules for Therapeutic Applications: Polyester DendrimerPoly(ethylene oxide) "Bow-Tie" Hybrids with Tunable Molecular Weight and Architecture. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 47, p. 14137-14146, 2002/11/01 2002.

GIROTRA, P.; SINGH, S. K.; NAGPAL, K. Supercritical fluid technology: a promising approach in pharmaceutical research. **Pharmaceutical Development And Technology**, v. 18, n. 1, p. 22-38, 2013.

GONG, A. et al. Two-phase hydroformylation reaction catalysed by rhodium-complexed water-soluble dendrimers. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 159, n. 2, p. 225-232, 10/2/ 2000.

GOODWIN, A. P.; LAM, S. S.; FRÉCHET, J. M. J. Rapid, Efficient Synthesis of Heterobifunctional Biodegradable Dendrimers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 22, p. 6994-6995, 2007/06/01 2007.

GRAM, L. F.; CHRISTIANSEN, J. First-pass metabolism of imipramine in man. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 17, n. 5, p. 555-563, 1975/05// 1975.

GREGOROWICZ, J. et al. Synthesis, Characterization, and Solubility in Supercritical Carbon Dioxide of Hyperbranched Copolyesters. **Macromolecules**, v. 46, n. 18, p. 7180-7195, 2013/09/24 2013.

GURARSLAN, A. et al. Pyriproxyfen cyclodextrin inclusion compounds. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 82, n. 3-4, p. 489-496, 2015/08/01 2015.

HAGER, E. B.; MAKHUBELA, B. C. E.; SMITH, G. S. Aqueous-phase hydroformylation of 1-octene using hydrophilic sulfonate salicylaldehyde dendrimers. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 45, p. 13927-13935, 2012.

HAN, L. et al. Peptide-Conjugated PAMAM for Targeted Doxorubicin Delivery to Transferrin Receptor Overexpressed Tumors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 2156-2165, 2010/12/06 2010.

HASHIM, N.; YUSOH, K. Supercritical carbon dioxide-assisted process in synthesis of polymer/clay melt. **Macromolecular Research**, v. 23, n. 5, p. 403-417, 2015/05/01 2015.

HAWKER, C. J.; FRECHET, J. M. J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 21, p. 7638-7647, 1990/10/01 1990.

HAWKER, C. J.; LEE, R.; FRECHET, J. M. J. One-step synthesis of hyperbranched dendritic polyesters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 12, p. 4583-4588, 1991/06/01 1991.

HELMS, B.; FRÉCHET, J. M. J. The Dendrimer Effect in Homogeneous Catalysis. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 10-11, p. 1125-1148, 2006.

HIORNS, R. C.; BOUCHER, R. J.; DUHLEV, R. E. A. A brief guide to polymer nomenclature (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 10, p. 2167-2169, 2012.

HOF, F. et al. Molecular Encapsulation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 9, p. 1488-1508, 2002.

HÖLTER, D.; BURGATH, A.; FREY, H. Degree of branching in hyperbranched polymers. **Acta Polymerica**, v. 48, n. 1-2, p. 30-35, 1997.

HUANG, J. et al. A new immobilized glucose oxidase using SiO₂ nanoparticles as carrier. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 7, p. 1374-1378, 10/10/ 2011.

HUBBARD, D.; BOND, T.; GHANDEHARI, H. Regional Morphology and Transport of PAMAM Dendrimers Across Isolated Rat Intestinal Tissue. **Macromolecular Bioscience**, p. n/a-n/a, 2015.

HUBBARD, D.; GHANDEHARI, H.; BRAYDEN, D. J. Transepithelial Transport of PAMAM Dendrimers across Isolated Rat Jejunal Mucosae in Ussing Chambers. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 8, p. 2889-2895, 2014/08/11 2014.

IHRE, H. et al. Double-Stage Convergent Approach for the Synthesis of Functionalized Dendritic Aliphatic Polyesters Based on 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionic Acid. **Macromolecules**, v. 31, n. 13, p. 4061-4068, 1998/06/01 1998.

IHRE, H.; HULT, A.; SÖDERLIND, E. Synthesis, Characterization, and ¹H NMR Self-Diffusion Studies of Dendritic Aliphatic Polyesters Based on 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionic Acid and 1,1,1-Tris(hydroxyphenyl)ethane. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 27, p. 6388-6395, 1996/01/01 1996.

IHRE, H.; PADILLA DE JESÚS, O. L.; FRÉCHET, J. M. J. Fast and Convenient Divergent Synthesis of Aliphatic Ester Dendrimers by Anhydride Coupling. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 25, p. 5908-5917, 2001/06/01 2001.

IRFAN, M.; SEILER, M. Encapsulation Using Hyperbranched Polymers: From Research and Technologies to Emerging Applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 3, p. 1169-1196, 2010/02/03 2010.

JACINTO, M. J. et al. Recoverable rhodium nanoparticles: Synthesis, characterization and catalytic performance in hydrogenation reactions. **Applied Catalysis A: General**, v. 338, n. 1-2, p. 52-57, 4/1/ 2008.

JACINTO, M. J. et al. Preparation of recoverable Ru catalysts for liquid-phase oxidation and hydrogenation reactions. **Applied Catalysis A: General**, v. 360, n. 2, p. 177-182, 6/1/ 2009.

JOHANSSON, M.; MALMSTRÖM, E.; HULT, A. Synthesis, characterization, and curing of hyperbranched allyl ether-maleate functional ester resins. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 619-624, 1993.

KACHI, Y. et al. Raman spectral shifts of CO₂ as measure of CO₂-philicity of solutes in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, n. 1, p. 20-26, 2// 2007.

KAINZ, Q. M.; REISER, O. Polymer- and Dendrimer-Coated Magnetic Nanoparticles as Versatile Supports for Catalysts, Scavengers, and Reagents. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 2, p. 667-677, 2014/02/18 2014.

KAZARIAN, S. G.; MARTIROSYAN, G. G. Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR-IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 232, n. 1-2, p. 81-90, 1/31/ 2002.

KAZARIAN, S. G. et al. Specific Intermolecular Interaction of Carbon Dioxide with Polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, p. 1729-1736, 1996.

KESHARWANI, P.; TEKADE, R. K.; JAIN, N. K. Dendrimer generational nomenclature: the need to harmonize. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 497-499, 5// 2015.

KHALIL, I. A. et al. Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 1, p. 32-45, March 1, 2006 2006.

KHANDARE, J. et al. Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2824-2848, 2012.

KILIC, S. et al. Phase Behavior of Oxygen-Containing Polymers in CO₂. **Macromolecules**, v. 40, n. 4, p. 1332-1341, 2007/02/01 2007.

KIM, K. H.; KIM, Y. Theoretical Studies for Lewis Acid-Base Interactions and C-H...O Weak Hydrogen Bonding in Various CO₂ Complexes. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 7, p. 1596-1603, 2008/02/01 2008.

KIM, S. et al. Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 420-430, 3// 2009.

KIM, S. T. et al. The Role of Surface Functionality in Determining Nanoparticle Cytotoxicity. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 681-691, 2013/03/19 2013.

KIRCH, J. et al. Mucociliary clearance of micro- and nanoparticles is independent of size, shape and charge—an ex vivo and in silico approach. **Journal of Controlled Release**, v. 159, n. 1, p. 128-134, 4/10/ 2012.

KNEZ, Ž. et al. Processing Polymeric Biomaterials using Supercritical CO₂. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 83, n. 9, p. 1371-1380, 2011.

KOMBER, H.; ZIEMER, A.; VOIT, B. Etherification as Side reaction on the Hyperbranched Polycondensation of 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionic Acid. **Macromolecules**, v. 35, p. 3514-3519, 2002.

KREFT, M. E. et al. The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized in vitro model to investigate bronchial epithelial function. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, p. 1-9, 3/10/ 2015.

KRUG, S. M.; SCHULZKE, J. D.; FROMM, M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 36, p. 166-176, 12// 2014.

KUNDA, N. et al. Nanocarriers Targeting Dendritic Cells for Pulmonary Vaccine Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 2, p. 325-341, 2013/02/01 2013.

KUZMOV, A.; MINKO, T. Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases. **Journal of Controlled Release**, v. xxx, n. xxx, p. xxx-xxx, 2015.

LAI, S. K. et al. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 5, p. 1482-1487, January 30, 2007 2007.

LANGER, R. Drug delivery and targeting. **Nature**, v. 392, n. 6679, p. 5, 1998.

LASPRILLA, A. J. R. et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 321-328, 1// 2012.

LEBELLE, M. et al. Metered-dose inhalers I: drug content and particle size distribution of beclomethasone dipropionate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 7, p. 793-800, 5// 1996.

LEDIN, P. A. et al. Convergent Assembly and Surface Modification of Multifunctional Dendrimers by Three Consecutive Click Reactions. **Chemistry – A European Journal**, v. 17, n. 3, p. 839-846, 2011.

LEE, C. C. et al. Designing dendrimers for biological applications. **Nat Biotech**, v. 23, n. 12, p. 1517-1526, 12//print 2005.

LI, P.; KAWI, S. SBA-15-based polyamidoamine dendrimer tethered Wilkinson's rhodium complex for hydroformylation of styrene. **Journal of Catalysis**, v. 257, n. 1, p. 23-31, 7/1/ 2008.

LIU, Y.; CHIU, G. N. C. Dual-Functionalized PAMAM Dendrimers with Improved P-Glycoprotein Inhibition and Tight Junction Modulating Effect. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 12, p. 4226-4235, 2013/12/09 2013.

LOUVEL, M. et al. A high-pressure high-temperature setup for in situ Raman spectroscopy of supercritical fluids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 205, p. 54-60, 5// 2015.

LU, D.; HICKEY, A. J. Pulmonary vaccine delivery. **Expert Review of Vaccines**, v. 6, n. 2, p. 213-226, 2007/04/01 2007.

LU, R.-Y.; YANG, W.-X.; HU, Y.-J. The role of epithelial tight junctions involved in pathogen infections. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 10, p. 6591-6610, 2014/10/01 2014.

LU, S.-M.; ALPER, H. Hydroformylation Reactions with Recyclable Rhodium-Complexed Dendrimers on a Resin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 43, p. 13126-13131, 2003/10/01 2003.

LU, Y. et al. Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol-Gel Approach. **Nano Letters**, v. 2, n. 3, p. 183-186, 2002/03/01 2002.

MA, S.-L. et al. Sugar Acetates as CO₂-philes: Molecular Interactions and Structure Aspects from Absorption Measurement Using Quartz Crystal Microbalance. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 11, p. 3809-3817, 2010/03/25 2010.

MA, X. et al. Facile Synthesis of Polyester Dendrimers as Drug Delivery Carriers. **Macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 37-42, 2013/01/08 2013.

MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K.; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8493-8501, 11// 2010.

MAHMOOD, S. H.; KESHTKAR, M.; PARK, C. B. Determination of carbon dioxide solubility in polylactide acid with accurate PVT properties. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 70, p. 13-23, 3// 2014.

MALKOCH, M.; MALMSTRÖM, E.; HULT, A. Rapid and Efficient Synthesis of Aliphatic Ester Dendrons and Dendrimers. **Macromolecules**, v. 35, n. 22, p. 8307-8314, 2002/10/01 2002.

MALKOCH, M. et al. Structurally Diverse Dendritic Libraries: A Highly Efficient Functionalization Approach Using Click Chemistry. **Macromolecules**, v. 38, n. 9, p. 3663-3678, 2005/05/01 2005.

MALMSTROEM, E.; JOHANSSON, M.; HULT, A. Hyperbranched Aliphatic Polyesters. **Macromolecules**, v. 28, n. 5, p. 1698-1703, 1995/02/01 1995.

MALMSTRÖM, E.; JOHANSSON, M.; HULT, A. Hyperbranched Aliphatic Polyesters. **Macromolecules**, v. 28, p. 1698-1703, 1995.

MARIANECCI, C. et al. Pulmonary Delivery: Innovative Approaches and Perspective. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5A, p. 567-575, 2011.

MASCIA, L.; ACIERNO, D. Polymers in industry: From guncotton to CO₂ glass. **Advances in Polymer Technology**, v. 31, n. 3, p. 179-192, 2012.

MCCABE, J. C. et al. ProAir® HFA Delivers Warmer, Lower-Impact, Longer-Duration Plumes Containing Higher Fine Particle Dose Than Ventolin® HFA. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 25, n. 2, p. 104-109, 2012/04/01 2011.

MEHRA HAGHI, P. M. Y., DANIELA TRAINI, . Time- and passage-dependent characteristics of a Calu-3 respiratory epithelial cell model. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, n. 36, p. 1207-1214, 2010.

MEI, M. et al. Claudin-3 is required for modulation of paracellular permeability by TNF- α through ERK1/2/slug signaling axis in submandibular gland. **Cellular Signalling**, v. 27, n. 10, p. 1915-1927, 10// 2015.

MERKEL, O. M. et al. Pulmonary Gene Delivery Using Polymeric Nonviral Vectors. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2012/01/18 2012.

MILLER, M. B. et al. Solid CO₂-philes as potential phase-change physical solvents for CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 212-220, 1// 2012.

MINEGISHI, S.; KOBAYASHI, S.; MAYR, H. Solvent Nucleophilicity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 16, p. 5174-5181, 2004/04/01 2004.

MITRAGOTRI, S.; LAHANN, J. Materials for Drug Delivery: Innovative Solutions to Address Complex Biological Hurdles. **Advanced Materials**, v. 24, n. 28, p. 3717-3723, 2012.

MONTAÑEZ, M. I. et al. Accelerated Growth of Dendrimers via Thiol-Ene and Esterification Reactions. **Macromolecules**, v. 43, n. 14, p. 6004-6013, 2010/07/27 2010.

MÜLHAUPT, R. Hermann Staudinger and the Origin of Macromolecular Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 9, p. 1054-1063, 2004.

MYRDAL, P.; SHETH, P.; STEIN, S. Advances in Metered Dose Inhaler Technology: Formulation Development. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 2, p. 434-455, 2014/04/01 2014.

NABAE, Y. et al. Sulfonic acid functionalized hyperbranched poly(ether sulfone) as a solid acid catalyst. **Green Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 3596-3602, 2014.

NAKAJIMA, H. et al. Synthesis of Silyl-Terminated Polylactides for Controlled Surface Immobilization of Polylactide Macromolecular Chains. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 4036-4043, 2011/11/14 2011.

NALAWADE, S. P.; PICCHIONI, F.; JANSSEN, L. P. B. M. Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: Processing aspects and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 1, p. 19-43, 1// 2006.

NANJWADE, B. K. et al. Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 185-196, 10/8/ 2009.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nat Mater**, v. 8, n. 7, p. 543-557, 07//print 2009.

NELSON, M. R.; BORKMAN, R. F. Ab Initio Calculations on CO₂ Binding to Carbonyl Groups. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 102, n. 40, p. 7860-7863, 1998/10/01 1998.

NEWKOME, G. R. et al. A systematic nomenclature for cascade polymers. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 641-651, 1993.

NEWKOME, G. R. et al. Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2003-2004, 1985/05/01 1985.

NIST. 2013. Disponível em: < <http://webbook.nist.gov/chemistry/> >. Acesso em: 25/03/2013.

_____. 2015. Disponível em: < <http://webbook.nist.gov/> >. Acesso em: 15/10/2015.

OLIVEIRA, R. L.; KIYOHARA, P. K.; ROSSI, L. M. High performance magnetic separation of gold nanoparticles for catalytic oxidation of alcohols. **Green Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 144-149, 2010.

PAINE, M. F. et al. First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 60, n. 1, p. 14-24, 1996.

PASUT, G.; VERONESE, F. M. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 461-472, 7/20/ 2012.

PATTON, J.; BUKAR, J.; ELDON, M. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Inhaled Insulin. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 43, n. 12, p. 781-801, 2004/10/01 2004.

PATTON, J. S.; BYRON, P. R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 1, p. 67-74, 01//print 2007.

PAUL, A. et al. Explaining the phase behaviour of the pharmaceutically relevant polymers poly(ethylene glycol) and poly(vinyl pyrrolidone) in semi-fluorinated liquids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 8, p. 973-980, 2005.

PEACH, J.; EASTOE, J. Supercritical carbon dioxide: a solvent like no other. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 1878-1895, 2014.

PEGUIN, R. P. S.; WU, L.; DA ROCHA, S. R. P. The Ester Group: How Hydrofluoroalkane-philic Is It? **Langmuir**, v. 23, n. 16, p. 8291-8294, 2007/07/01 2007.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**. Butterworth-Heinemann, 1996.

PERUMAL, O. P. et al. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. **Biomaterials**, v. 29, n. 24-25, p. 3469-3476, 8// 2008.

PEZZULO, A. A. et al. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 300, n. 1, p. L25-L31, 10/22 07/29/received 10/21/accepted 2011.

PIOVEZAN, C. et al. Design of a Dinuclear Nickel(II) Bioinspired Hydrolase to Bind Covalently to Silica Surfaces: Synthesis, Magnetism, and Reactivity Studies. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 6104-6115, 2012/06/04 2012.

POTLURI, V. K. et al. Peracetylated Sugar Derivatives Show High Solubility in Liquid and Supercritical Carbon Dioxide. **Organic Letters**, v. 4, n. 14, p. 2333-2335, 2002/07/01 2002.

PROMEGACORP. **CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay**. Madison, WI 2010.

RABANEL, J. M. et al. Drug-Loaded Nanocarriers: Passive Targeting and Crossing of Biological Barriers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 19, p. 3070-3102, 2012.

RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly(lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 3, p. 338-356, 3// 2010.

RAVEENDRAN, P.; WALLEN, S. L. Cooperative C-H...O Hydrogen Bonding in CO₂-Lewis Base Complexes: Implications for Solvation in Supercritical CO₂. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 42, p. 12590-12599, 2002/10/01 2002a.

_____. Sugar Acetates as Novel, Renewable CO₂-philic. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 25, p. 7274-7275, 2002/06/01 2002b.

REICHARDT, C. Solvents and Solvent Effects: An Introduction. **Organic Process Research & Development**, v. 11, n. 1, p. 105-113, 2007/01/01 2007.

RINGS DORF, H. Hermann Staudinger and the Future of Polymer Research Jubilees—Beloved Occasions for Cultural Piety. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 9, p. 1064-1076, 2004.

RODRIGUEZ-MEIZOSO, I.; LAZOR, P.; TURNER, C. In situ Raman spectroscopy for the evaluation of solubility in supercritical carbon dioxide mixtures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 65, p. 87-92, 5// 2012.

ROGUEDA, P. G. A. HPFP, a Model Propellant for pMDIs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 39-49, 2003/01/01 2003.

ROSSI, B. et al. Vibrational properties of ibuprofen-cyclodextrin inclusion complexes investigated by Raman scattering and numerical simulation. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 40, n. 4, p. 453-458, 2009.

ROSSI, L.; QUACH, A.; ROSENZWEIG, Z. Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, n. 4, p. 606-613, 2004/10/01 2004.

ROSSI, L. et al. Screening of Soluble Rhodium Nanoparticles as Precursor for Highly Active Hydrogenation Catalysts: The Effect of the Stabilizing Agents. **Topics in Catalysis**, v. 56, n. 13-14, p. 1228-1238, 2013/09/01 2013.

ROSSI, L. M. et al. A magnetically recoverable scavenger for palladium based on thiol-modified magnetite nanoparticles. **Applied Catalysis A: General**, v. 330, p. 139-144, 10/10/ 2007.

RU-TING, X.; XING-YUAN, H. Predictive calculation of carbon dioxide solubility in polymers. **RSC Advances**, v. 5, n. 94, p. 76979-76986, 2015.

SADEKAR, S.; GHANDEHARI, H. Transepithelial transport and toxicity of PAMAM dendrimers: Implications for oral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 571-588, 5/1/ 2012.

SAUCEAU, M. et al. New challenges in polymer foaming: A review of extrusion processes assisted by supercritical carbon dioxide. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 6, p. 749-766, 6// 2011.

SEMMLER-BEHNKE, M. et al. Efficient Elimination of Inhaled Nanoparticles from the Alveolar Region: Evidence for Interstitial Uptake and Subsequent Reentrainment onto Airways Epithelium. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 5, p. 728-733, 02/06
09/06/received
02/06/accepted 2007.

SHEIKH, M. C. et al. Mechanistic studies of DCC/HOBt-mediated reaction of 3-phenylpropionic acid with benzyl alcohol and studies on the reactivities of 'active ester'

and the related derivatives with nucleophiles. **Tetrahedron**, v. 66, n. 36, p. 7272-7278, 9/4/ 2010.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal For Clinicians**, v. 62, n. 1, p. 10-29, 2012.

_____. Cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal For Clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.

SPAN, R.; WAGNER, W. A New Equation of State for Carbon Dioxide Covering the Fluid Region from the Triple - Point Temperature to 1100 K at Pressures up to 800 MPa. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 25, n. 6, p. 1509-1596, 1996.

SRINIVASAN, B. et al. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, n. 2, p. 107-126, April 1, 2015 2015.

STEIN, S. et al. Advances in Metered Dose Inhaler Technology: Hardware Development. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 2, p. 326-338, 2014/04/01 2014.

STEPHENSON, C. J. et al. Ni(II) Phenoxyiminato Olefin Polymerization Catalysis: Striking Coordinative Modulation of Hyperbranched Polymer Microstructure and Stability by a Proximate Sulfonyl Group. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 3, p. 999-1003, 2014/03/07 2014.

SUNDER, A. et al. Synthesis and Thermal Behavior of Esterified Aliphatic Hyperbranched Polyether Polyols. **Macromolecules**, v. 33, n. 4, p. 1330-1337, 2000/02/01 2000.

TAGHAVI POURIANAZAR, N.; MUTLU, P.; GUNDUZ, U. Bioapplications of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers in nanomedicine. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 4, p. 1-38, 2014/03/13 2014.

THAKUR, S. et al. Impact of pegylation on biopharmaceutical properties of dendrimers. **Polymer**, v. 59, p. 67-92, 2/24/ 2015.

TIWARI, G. et al. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 2-11, Jan-Mar 2012.

TOMALIA, D. A. et al. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. **Polym J**, v. 17, n. 1, p. 117-132, 01//print 1985.

TRAINI, D.; YOUNG, P. M. Formulation of Inhalation Medicines. In: (Ed.). **Inhalation Drug Delivery**: John Wiley & Sons, Ltd, 2013a. p.31-45. ISBN 9781118397145.

_____. Inhalation and Nasal Products. In: (Ed.). **Inhalation Drug Delivery**: John Wiley & Sons, Ltd, 2013b. p.15-30. ISBN 9781118397145.

TSI-INCORPORATED. **Aerosol Statistics Lognormal Distributions and dN/dlogDp**. TSI. USA: 6 p. 2012.

TUCHBREITER, L.; MECKING, S. Hydroformylation with Dendritic-Polymer-Stabilized Rhodium Colloids as Catalyst Precursors. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 208, n. 15, p. 1688-1693, 2007.

UHRICH, K. E. et al. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181-3198, 1999/11/01 1999.

USPHARMACOPEIA. **USP30-Section 467 - Residual Solvents**. Rockville. MD: 2007.

VAZ, A. M. et al. Synthesis and characterization of biocatalytic γ -Fe₂O₃@SiO₂ particles as recoverable bioreactors. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 11-19, 2/1/ 2014.

VESTBERG, R. et al. Role of architecture and molecular weight in the formation of tailor-made ultrathin multilayers using dendritic macromolecules and click chemistry. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 45, n. 14, p. 2835-2846, 2007.

VIEYRES, A. et al. Combined CuI-catalysed alkyne-azide cycloaddition and furan-maleimide Diels-Alder "click" chemistry approach to thermoresponsive dendrimers. **Chemical Communications**, v. 46, n. 11, p. 1875-1877, 2010.

VLLASALIU, D. et al. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1-2, p. 183-193, 11/15/ 2010.

VOGELGESANG, B. et al. Stereoselective first-pass metabolism of highly cleared drugs: studies of the bioavailability of L- and D-verapamil examined with a stable isotope technique. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. 7, p. S796-S803, 2004.

VÖGTLE, F. et al. **Dendrimer Chemistry: Concepts, Syntheses, Properties, Applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.

WALTER, M. V. et al. Novel macrothiols for the synthesis of a structurally comprehensive dendritic library using thiol-ene click chemistry. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 2990-2995, 2011.

WALTER, M. V.; MALKOCH, M. Simplifying the synthesis of dendrimers: accelerated approaches. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 13, p. 4593-4609, 2012.

WANG, J. et al. Theoretical study on interaction between CO₂ and carbonyl compounds: Influence of CO₂ on infrared spectroscopy and activity of CO. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 9-15, 7// 2010.

WANG, Y. et al. An overview of nanotoxicity and nanomedicine research: principles, progress and implications for cancer therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 36, p. 7153-7172, 2015.

WATSON, C. J.; ROWLAND, M.; WARHURST, G. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 281, n. 2, p. C388-C397, 2001.

WICK, C. D.; SIEPMANN, J. I.; THEODOROU, D. N. Microscopic Origins for the Favorable Solvation of Carbonate Ether Copolymers in CO₂. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 35, p. 12338-12342, 2005/09/01 2005.

WITSCHI, C.; DOELKER, E. Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 43, n. 3, p. 215-242, 6// 1997.

WU, L.; AL-HAYDARI, M.; DA ROCHA, S. R. P. Novel propellant-driven inhalation formulations: Engineering polar drug particles with surface-trapped hydrofluoroalkane-philic. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 2, p. 146-158, 2/5/ 2008.

WU, L. et al. Core-shell Particles for the Dispersion of Small Polar Drugs and Biomolecules in Hydrofluoroalkane Propellants. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 2, p. 289-301, 2008/02/01 2008.

WU, L.-P. et al. Dendrimers in Medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1198-1211, 2015/07/15 2015.

WU, P. et al. Multivalent, bifunctional dendrimers prepared by click chemistry. **Chemical Communications**, n. 46, p. 5775-5777, 2005.

YAMAKI, T. et al. Poly-L-arginine-Induced Internalization of Tight Junction Proteins Increases the Paracellular Permeability of the Caco-2 Cell Monolayer to Hydrophilic Macromolecules. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 3, p. 432-441, 2013.

YANG, L.; CABRAL, V.; DA ROCHA, S. R. P. **Effect of the Chemistry of the Terminal Surface Groups of PAMAM Dendrimers on The Microstructure of the Grafted PEG Layer.**

YANG, L.; DA ROCHA, S. R. P. PEGylated, NH₂-Terminated PAMAM Dendrimers: A Microscopic View from Atomistic Computer Simulations. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, p. 1459-1470, 2014/05/05 2014.

YOON, T.-J.; KIM, J. I.; LEE, J.-K. Rh-based olefin hydroformylation catalysts and the change of their catalytic activity depending on the size of immobilizing supporters. **Inorganica Chimica Acta**, v. 345, p. 228-234, 3/10/ 2003.

ŽAGAR, E.; ŽIGON, M. Aliphatic hyperbranched polyesters based on 2,2-bis(methylol)propionic acid—Determination of structure, solution and bulk properties. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 1, p. 53-88, 2011.

ZHANG, X. Modifications and applications of hyperbranched aliphatic polyesters based on dimethylolpropionic acid. **Polymer International**, v. 60, n. 2, p. 153-166, 2011.

ZHOU, M. et al. Crystallization, rheology and foam morphology of branched PLA prepared by novel type of chain extender. **Macromolecular Research**, v. 23, n. 3, p. 231-236, 2015/03/01 2015.

ZHOU, Q. et al. Emerging inhalation aerosol devices and strategies: Where are we headed? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 75, p. 3-17, 8/30/ 2014.

ZOU, H.; WANG, Z.; FENG, M. Nanocarriers with tunable surface properties to unblock bottlenecks in systemic drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 214, p. 121-133, 9/28/ 2015.

Anexo I
Espectros Seleccionados

1. TMP-[G#1]-Acetonida (1.4)

Figura A1. Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#1]-Acetonida (1.4) Figura A2. Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz) do composto TMP-[G#1]-Acetonida (1.4)

Figura A3. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto TMP-[G#1]-Acetonida (1.4)

2. TMP-[G#1]-(OH)₆ (1.5) Figura A4. Espectro de ¹H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#1]-(OH)₆ (1.5) Figura A5. Espectro de ¹³C RMN (50 MHz) do composto TMP-[G#1]-(OH)₆ (1.5) Figura A6. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto TMP-[G#1]-(OH)₆ (1.5)

3. TMP-[G#2]-Acetonida (1.6)

Figura A7. Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#2]-Acetonida (1.6) Figura A8. Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz) do composto TMP-[G#2]-Acetonida (1.6)

Figura A9. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto TMP-[G#2]-Acetonida (1.6)

4. TMP-[G#2]-(OH)₁₂ (1.7)This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 11:44:32 AM

Figura A10. Espectro de ¹H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#2]-(OH)₁₂ (1.7)This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 11:45:49 AM

Figura A11. Espectro de ¹³C RMN (50 MHz) do composto TMP-[G#2]-(OH)₁₂ (1.7) Figura A12. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto TMP-[G#2]-(OH)₁₂ (1.7)

5. TMP-[G#3]-Acetonida (1.8)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 11:51:59 AM

Acquisition Time (sec)	3.8405	Comment	STANDARD 1H OBSERVE	Date	Mar 14 2012
Date Stamp	Mar 14 2012	File Name	C:\Documents and Settings\PG Bazito\Desktop\rodrigoh156.fid.fid	Frequency (MHz)	199.97
Frequency (MHz)	199.97	Nucleus	1H	Number of Transients	256
Points Count	16384	Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	13.00
Spectrum Offset (Hz)	1446.4706	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	3199.56
				Solvent	CHLOROFORM-d
				Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE

Figura A13. Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#3]-Acetonida (1.8)This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 11:54:06 AM

Acquisition Time (sec)	0.6400	Comment	13C OBSERVE	Date	Mar 15 2012
Date Stamp	Mar 15 2012	File Name	C:\Documents and Settings\PG Bazito\Desktop\rodrigoh157.fid.fid	Frequency (MHz)	50.29
Frequency (MHz)	50.29	Nucleus	13C	Number of Transients	3068
Points Count	8192	Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	37.00
Spectrum Offset (Hz)	4881.6650	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	12500.00
				Solvent	CHLOROFORM-d
				Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE

Figura A14. Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz) do composto TMP-[G#3]-Acetonida (1.8)

Figura A15. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto TMP-[G#3]-Acetonida (1.8)

6. TMP-[G#3]-(OH)₂₄ (1.9)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 12:55:23 PM

Figura A16. Espectro de ¹H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#3]-(OH)₂₄ (1.9)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 12:56:27 PM

Figura A17. Espectro de ¹³C RMN (50 MHz) do composto TMP-[G#3]-(OH)₂₄ (1.9)

Figura A18. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto TMP-[G#3]-(OH)₂₄ (1.9)

7. TMP-[G#4]-Acetonida (1.10)

Figura A19. Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#4]-Acetonida (1.10) Figura A20. Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz) do composto TMP-[G#4]-Acetonida (1.10)

Figura A21. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto TMP-[G#4]-Acetonida (1.10)

8. $\text{TMP-[G\#4]-(OH)}_{48}$ (1.11) Figura A22. Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do composto $\text{TMP-[G\#4]-(OH)}_{48}$ (1.11)

9. DDD-[G#1]-Acetonida (1.12)

Figura A25. Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do composto DDD-[G#1]-Acetonida (1.12) Figura A26. Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz) do composto DDD-[G#1]-Acetonida (1.12)

Figura A27. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto DDD-[G#1]-Acetonida (1.12)

10. DDD-[G#1]-(OH)₄ (1.13)This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 1:38:32 PM

Figura A28. Espectro de ¹H RMN (200 MHz) do composto DDD-[G#1]-(OH)₄ (1.13)This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 1:39:38 PM

Figura A29. Espectro de ¹³C RMN (200 MHz) do composto DDD-[G#1]-(OH)₄ (1.13) Figura A30. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto DDD-[G#1]-(OH)₄ (1.13)

11. DDD-[G#2]-Acetonida (1.14)

Figura A31. Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do composto DDD-[G#2]-Acetonida (1.14) Figura A32. Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz) do composto DDD-[G#2]-Acetonida (1.14)

Figura A33. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto DDD-[G#2]-Acetonida (1.14)

12. DDD-[G#2]-(OH)₈ (1.15) Figura A34. Espectro de ¹H RMN (200 MHz) do composto DDD-[G#2]-(OH)₈ (1.15) Figura A35. Espectro de ¹³C RMN (50 MHz) do composto DDD-[G#2]-(OH)₈ (1.15) Figura A36. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto DDD-[G#2]-(OH)₈ (1.15)

13. TMP-HYP-[G#2]-(OH)₁₂ (1.16)This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/ Figura A37. Espectro de ¹H RMN (200 MHz) do composto TMP-HYP-[G#2]-(OH)₁₂ (1.16)This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/ Figura A38. Espectro de ¹³C RMN (50 MHz) do composto TMP-HYP-[G#2]-(OH)₁₂ (1.16) Figura A39. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto TMP-HYP-[G#2]-(OH)₁₂ (1.16)

14. TMP-[G#2]-Acetila (2.1)

Figura A40. Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#2]-Acetila (2.1) Figura A41. Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz) do composto TMP-[G#2]-Acetila (2.1)

Figura A42. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto TMP-[G#2]-Acetila (2.1)

15. Ácido Glucônico Peracetilado (2.2)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 3:16:52 PM

Acquisition Time (sec)	3.8405	Comment	STANDARD 1H OBSERVE	Date	Feb 15 2013
Date Stamp	Feb 15 2013	File Name	C:\Documents and Settings\PG Bazito\Desktop\rodrigosh12.fid		
Frequency (MHz)	199.97	Nucleus	1H	Number of Transients	128
Points Count	16384	Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	19.00
Spectrum Offset (Hz)	1443.5411	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	3199.56
				Solvent	CHLOROFORM-d
				Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE

Figura A43. Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do composto ácido glucônico peracetilado (2.2)This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 3:19:29 PM

Acquisition Time (sec)	0.8400	Comment	13C OBSERVE	Date	Feb 21 2013
File Name	C:\Documents and Settings\PG Bazito\Desktop\rodrigosh20.fid			Date Stamp	Feb 21 2013
Nucleus	13C	Number of Transients	1776	Frequency (MHz)	50.29
Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	40.00	Points Count	8192
Spectrum Offset (Hz)	4883.1914	Spectrum Type	STANDARD	Solvent	CHLOROFORM-d
				Sweep Width (Hz)	12500.00
				Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE

Figura A44. Espectro de ^{13}C RMN (50 MHz) do composto ácido glucônico peracetilado (2.2)

Figura A45. Espectro de massas (EMAR-ESI) do composto ácido glucônico peracetilado (2.2)

16. TMP-[G#2]-Gluco (2.3)

Figura A46. Espectro de ¹H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#2]-Gluco (2.3) Figura A47. Espectro de ¹³C RMN (50 MHz) do composto TMP-[G#2]-Gluco (2.3)

17. TMP-[G#2]-PLA12-OH (2.4)

Figura A48. Espectro de ¹H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#2]-PLA12-OH (2.4)

Figura A49. Espectro de massas (MALDI-TOF) do composto TMP-[G#2]-PLA12-OH (2.4)

18. TMP-[G#2]-PLA35-OH (2.5)

Figura A50. Espectro de ¹H RMN (300 MHz) do composto TMP-[G#2]-PLA35-OH (2.5)

Figura A51. Espectro de massas (MALDI-TOF) do composto TMP-[G#2]-PLA35-OH (2.5)

19. TMP-[G#2]-PLA12-Acetila (2.6)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 4:18:26 PM

Figura A52. Espectro de ^1H RMN (200 MHz) do composto TMP-[G#2]-PLA12-Acetila (2.6)

Figura A53. Espectro de massas (MALDI-TOF) do composto TMP-[G#2]-PLA12-Acetila (2.6)

20. TMP-[G#2]-PLA35-Acetila (2.7)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

10/23/2015 5:00:42 PM

Figura A54. Espectro de ¹H RMN (300 MHz) do composto TMP-[G#2]-PLA35-Acetila (2.7)

Figura A55. Espectro de massas (MALDI-TOF) do composto TMP-[G#2]-PLA35-Acetila (2.7)

21. TMP-[G#3]-FITC (3.1)

Figura A56. Espectro de ¹H RMN (400 MHz) do composto TMP-[G#3]-FITC (3.1)

Figura A57. Espectro de massas (MALDI-TOF) do composto TMP-[G#3]-FITC (3.1)

22. TMP-[G#4]-FITC (3.2)

Figura A58. Espectro de ¹H RMN (400 MHz) do composto TMP-[G#4]-FITC (3.2)

Figura A59. Espectro de massas (MALDI-TOF) do composto TMP-[G#4]-FITC (3.2)

23. TMP-[G#3]-mPEG (3.3)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Figura A60. Espectro de ¹H RMN (400 MHz) do composto TMP-[G#3]-PEG (3.3)

Figura A61. Espectro de massas (MALDI-TOF) do composto TMP-[G#3]-PEG (3.3)

24. TMP-[G#4]-mPEG (3.4)

Figura A62. Espectro de ^1H RMN (400 MHz) do composto TMP-[G#4]-PEG (3.4)

Figura A63. Espectro de massas (MALDI-TOF) do composto TMP-[G#4]-PEG (3.4)

25. TMP-[G#4]-FITC-PEG (3.5)

Figura A64. Espectro de ¹H RMN (400 MHz) do composto TMP-[G#4]-FITC-PEG (3.5)

Figura A65. Espectro de massas (MALDI-TOF) do composto TMP-[G#4]-FITC-PEG (3.5)