UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Síntese e desenvolvimento de métodos analíticos para o estudo de pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos em doenças negligenciadas

Lorena Cristine Paes

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Síntese e desenvolvimento de métodos analíticos para o estudo de pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos em doenças negligenciadas

Lorena Cristine Paes

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo

2016

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

Paes, Lorena Cristine
P126s Síntese e desenvolvimento de métodos analíticos para o estudo de pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos em doenças negligenciadas / Lorena Cristine Paes. -- São Paulo, 2016.
137p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia
Orientador : Ferreira, Elizabeth Igne

1. Química farmacêutica 2. Fármacos : Síntese química I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

Lorena Cristine Paes

Síntese e desenvolvimento de métodos analíticos para o estudo de pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos em doenças negligenciadas

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

arientadora/presidente

_____

1°. examinador

_____

2°. examinador

_____

3°. examinador

_____

4°. examinador

São Paulo, _____de_____.

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e Maria Ivonilda, ao meu companheiro André e aos meus irmãos Diogo e Henrique.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e por viabilizar a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido.

À minha orientadora Elizabeth Igne Ferreira, por todos os ensinamentos e apoio.

Aos amigos e colegas de laboratório, pelo auxilio na realização do trabalho, amizade e companheirismo.

Aos alunos de iniciação científica Giulia e Leonardo, pela importante colaboração.

Á Professora Carolina Borsoi de Moraes, pela realização do ensaio de atividade biológica.

Aos meu pais e familiares, pelo apoio incondicional.

PAES, L.C. **Síntese e desenvolvimento de métodos analíticos para o estudo de pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos em doenças negligenciadas.** 2016. 137p. Tese – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016.

RESUMO

Doenças infecciosas parasitárias consideradas negligenciadas representam um grande problema de saúde pública em muitos países e regiões. Os fármacos disponíveis na terapêutica são, em geral, tóxicos e de eficácia discutível. Portanto, a descoberta e o planejamento de novos quimioterápicos são extremamente necessários. Neste contexto, os pró-fármacos dendriméricos podem ser úteis. Porém, é necessário esforço adicional para viabilizar os custos, simplificar as estratégias de síntese e investigar os comportamentos de liberação. Ademais, é importante a melhoria dos métodos analíticos, dos métodos de purificação e identificação dos produtos de síntese, para a determinação das propriedades físico-químicas e atividade biológica, visando à efetiva aplicação desta tecnologia. Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar a identidade, pureza e liberação de dois potenciais pró-fármacos dendriméricos, baseados em 3-hidroxiflavona, planejados para serem ativos em doença de Chagas e leishmaniose. O primeiro, estruturalmente, contendo inositol como núcleo e ramos constituídos por éster da 3-hidroxiflavona com ácido málico e o segundo, estruturalmente contendo o dendrímero PAMAM-G0 (poliamidoamina de geração inicial) como transportador e ácido succínico como espaçante. Desenvolveram-se métodos adequados à determinação da 3-hidroxiflavona por HPLC-UV (Cromatografia líquida de alto desempenho, com detecção no ultravioleta) e MEKC (Cromatografia eletrocinética micelar). Comparando-se esses métodos, o método por HPLC foi mais sensível, preciso e exato na quantificação da 3-hidroflavona, enquanto o método por eletroforese capilar foi mais rápido e de menor custo. O éster da 3-hidroxiflavona com o ácido málico mostrou-se instável em soluções orgânicas, aquosas em diferentes pH e nas condições reacionais de diversas estratégias de síntese avaliadas, o que impediu a obtenção do dendrímero baseado em inositol como núcleo conforme proposto. Já o dendrímero PAMAM-G0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona foi sintetizado, purificado e caracterizado com sucesso. Não se observou liberação da 3-hidroxiflavona a partir desse dendrímero em solução gástrica simulada (pH 1,2) e a mesma foi lenta em soluções tampão com pH entre 5,0 e 8,5, a 37,0 ^{o}C.

Ensaios de atividade biológica do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepas Y(Curitiba) e Y(SS), comparativamente ao benznidazol e ao nifurtimox, mostraram atividade moderada e baixa seletividade.

Palavras chave: Doenças Negligenciadas, Latenciação, Dendrímero, 3-hidroxiflavona, poliamidoamina (PAMAM), Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), Eletroforese Capilar (CE)

PAES, L.C. **Synthesis and analytical methods development to study dendrimeric prodrugs potentially actives in neglected diseases.** 2016. 137p. Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2016.

ABSTRACT

Infectious parasitoses considered neglected diseases represent a great health problem for many countries and areas. Drugs available in the therapeutics are, generally, toxics and do not have good efficacy. So, the discovery and design of new chemotherapeutic agents are extremely needed. In this context, dendrimeric prodrugs may be useful. However, additional effort is required to make the costs accessible, to simplify the synthetic strategies and to investigate the behavior of cleavage. The improvement of analytical methods, purification methods and identification of synthetic products, in order to determine the physicochemical properties and bioactivity aiming to effectively implement this technology, is also required. Based on foregoing considerations, the objective of this work was to study the identity, purity and drug release of two potential dendrimeric prodrugs, based on 3-hydroxyflavone, designed to be active in leishmaniasis and Chagas disease. The first structurally contains myo-inositol as the core and branches consisting of esters from 3-hydroxyflavone with malic acid. The second structurally contains PAMAM-G0 dendrimer (initial generation polyamidoamine) as carrier and succinic acid as spacer. Suitable analytical methods for determining 3-hydroxyflavone by HPLC-UV (High Performance Liquid Chromatography) and MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography) have been developed. Comparing these methods, HPLC method showed more sensitivity, precision and accuracy in the quantification of 3-hydroxyflavone, while the capillary electrophoresis method was faster and less expensive. The ester of 3-hydroxyflavone with malic acid showed to be unstable in organic and aqueous solutions, at different pH and at reaction conditions of synthetic strategies evaluated, which prevented the obtaining of dendrimer based on mio-isositol as core. Notwithstanding, PAMAM-G0 dendrimer funcionalized with 3-hydroxyflavone was synthesized, purified and characterized successfully. There were no 3-hydroxyflavone releases from this dendrimer in simulated gastric fluid (pH 1.2) and a slow release was observed in buffer solutions with pH between 5.0 and 8.5, at 37.0 ^{o}C. Submitted to biological assays in amastigotes of two strains of *T. cruzi*, Y(Curitiba) and Y(SS), compared to

benznidazole e nifurtimox, PAMAM-G0-SUCC-3-OH-FLAV showed moderated activity and low selectivity index.

Keywords: Neglected diseases, Prodrugs, Dendrimers, 3-hydroxyflavone, Poly(amidoamine) (PAMAM), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Capillary Electrophoresis (CE).

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	Eletroforese capilar por afinidade
AMP	Ácido málico protegido
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Reflectância total atenuada
C^{13}-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
C18	Octadecilsilano
CAPS	Ácido 3-cicloexilamino-1-propanossulfônico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE	Eletroforese capilar
CEKC	Cromatografia eletrocinética capilar
CGE	Eletroforese capilar em gel
CIEF	Focalização isoelétrica capilar
CITP	Isotacoforese capilar
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia de Materiais
CZE	Eletroforese capilar de zona
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Iniciativa para o desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas
CE-DAD	Eletroforese capilar com detecção em arranjo de diodos
EDA	Etilenodiamina
EDC.HCl	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
ESI-MS	Ionização por *eletrospray* acoplada à espectrometria de massas
FAB-MS	Bombardeamento de átomos acoplado à espectrometria de massas
FT-IR	Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier
GEMMA	Eletroforese em fase-gasosa
GPC	Cromatografia de permeação em gel
GPC-RI	Cromatografia de permeação em gel com detecção por índice de refração
HETCOR	Espectroscopia de correlação heteronuclear
HMQC	Coerência quântica múltipla heteronuclear
HSQC	Coerência quântica individual heteronuclear
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alto desempenho com detecção no ultravioleta
H^{1}-RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
IACE	Eletroforese capilar por imunoafinidade
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
MALDI-TOF	Ionização da matriz assistida por Laser com detecção por tempo de voo
MALDI-TOF-MS	Ionização da matriz assistida por Laser com detecção por tempo de voo acoplado à espectrometria de massas

MALDI-TOF/TOF	Espectrometria de massas com ionização da matriz assistida por Laser com dupla detecção por tempo de voo
MEEKC	Cromatografia eletrocinética de microemulsão
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar
MFCE	Eletroforese capilar microfluídica
MHz	Megahertz
MM	Massa Molar
NACE	Eletroforese capilar não aquosa
NCE	Nanoeletroforese capilar
NFOH	Hidroximetilnitrofural
3-OH-AM	3-hidroxiflavona esterificada com ácido málico
3-OH-AMP	3-hidroxiflavona esterificada com ácido málico protegido
PAGE	Eletroforese em gel de poliacriloamida
PAMAM	Dendrímero de poliamidoamina
PAMAM-Gn	Dendrímero de poliamidoamina de geração n
PAMAM-G0-SUC	Dendrímero de poliamidoamina de geração 0 succinoilado
PAMAM-G0-SUC-3-OH-flav	Dendrímero de poliamidoamina de geração 0, succinoilado, esterificado com 3-hidroxiflavona
PAMAM-SAH	Dendrímero de poliamidoamina funcionalizado com ácido succínico
PAMAM.COOH	Dendrímero de poliamidoamina com grupos carboxílicos na superfície
PAMAM.NH2	Dendrímero de poliamidoamina com grupos amina na superfície
pCEC	Eletrocromatografia capilar pressurizada
pH	Potencial hidrogeniônico
POPAM	Dendrímero de poliamidoamina com núcleo de polipropilenoimina
PPI	Polipropilenoimina
PVA	Poli-álcool vinílico
R	Resolução
R^2	Coeficiente de correlação linear
RMN-MS	Ressonância Magnética Nuclear acoplada a espectrometria de massas
SANS	Espalhamento de nêutrons de baixo ângulo
SAXS	Espalhamento de raios X de baixo ângulo
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
SEC-UV-LS	Cromatografia de exclusão por tamanho com detecção no ultravioleta acoplada a espalhamento de luz
SFC	Cromatografia de fluido supercrítico
t_m	Tempo de migração
UPLC	Cromatografia líquida de ultra desempenho
UPLC-UV	Cromatografia líquida de ultra desempenho com detecção no ultravioleta
U2OS	Linhagem de células humanas de osteossarcoma ósseo
UV-Vis	Espectrofotometria no ultravioleta e visível
NACE	Eletroforese capilar não aquosa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais classes de estruturas poliméricas macromoleculares em função da complexidade e do controle estrutural. I. polímero linear. II. polímero reticulado clássico. III. polímero ramificado. IV. dendrímeros: (a) aleatoriamente ramificados, (b) *dendrigrafts*, (c) clássicos. V. Megâmeros ou tecto(dendrímeros) (TOMALIA, 2001). **15**

Figura 2: Representação esquemática ilustrativa de um pró-fármaco dendrimérico dirigido (IHRE *et al.,* 2002). **28**

Figura 3: Potenciais pró-fármacos dendriméricos planejados para leishmaniose e doença de Chagas. Sendo: A – dendrímero baseado em inositol como núcleo; B – dendrímero PAMAM-G0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona. **30**

Figura 4: Estrutura química dos precursores da síntese do dendrímero baseado em inositol como núcleo: 3-hidroxiflavona (A), 3-OH-AM (B) e 3-OH-AMP (C). **33**

Figura 5: Esquema geral das diferentes etapas de síntese envolvidas na obtenção do dendrímero PAMAM-G0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona (PAMAM-G0-SUC-3-OH-flav). **41**

Figura 6: Reações de obtenção do 3-OH-AMP (A) e 3-OH-AM (B). **45**

Figura 7: Espectros no ultravioleta (em metanol) dos compostos: 3-hidroxiflavona (A), 3-OH-AMP (B) e 3-OH-AM (C). **47**

Figura 8: Absorbância média das soluções de 3-hidroxiflavona em metanol (A) e em acetonitrila (B), ao longo do tempo. **48**

Figura 9: Resultados do estudo de estabilidade da solução de 3-OH-AMP em metanol (A) e acetonitrila (B)... ..... **49**

Figura 10: Resultados do estudo de estabilidade da solução de 3-OH-AM em metanol (A) e acetonitrila (B)... ..... **50**

Figura 11: Curvas de formação de 3-hidroxiflavona devido à hidrólise do 3-OH-AM em soluções com diferentes valores de pH. **52**

Figura 12: Curvas analíticas da 3-hidroxiflavona por HPLC-UV **56**

Figura 13: Cromatograma típico do teste de pureza cromatográfica do 3-OH-AM, com absorbância em mAu e tempo em minutos. Os picos correspondentes aos compostos conhecidos estão de acordo com as siglas dos compostos dos quais derivam. **61**

Figura 14: Eletroferogramas da 3-hidroxiflavona em eletrólitos com diferentes valores de pH, empregando-se o modo CZE. Os traços em azul escuro, azul claro, rosa, preto e verde referem-se aos pH 8,5, 9,0, 9,5,10,0 e 10,5, respectivamente. **65**

Figura 15: Espectros no UV do 3-OH-AM em duplicata (em verde e em vermelho), da 3-hidroxiflavona (em azul escuro) e do branco (em azul claro) em suco gástrico simulado. **73**

Figura 16: Liberação da 3-hidroxiflavona em tampão bórax pH 8,5 nos primeiros 100 minutos. As soluções de 3-OH-AM, em triplicata, são apresentadas em verde, azul escuro e vermelho, a 3-hidroxiflavona em ciano e o branco, em laranja. **74**

Figura 17: Liberação da 3-hidroxiflavona em tampão fosfato pH 7,4 nos primeiros 100 minutos. As soluções de 3-OH-AM, em triplicata, são apresentadas em verde, azul escuro e vermelho, a 3-hidroxiflavona em ciano e o branco, em laranja. **74**

Figura 18: Liberação da 3-hidroxiflavona em tampão pH 5,0, nos primeiros 100 minutos. As soluções de 3-OH-AM, em triplicata, são apresentadas em verde, azul escuro e vermelho, a 3-hidroxiflavona em ciano e o branco, em laranja. **75**

Figura 19: Liberação da 3-hidroxiflavona em solução de secreção gástrica simulada não-enzimática (HCl pH 1,2), por 24 h. As soluções de 3-OH-AM, em duplicata, são apresentadas em verde e vermelho, a 3-hidroxiflavona em azul escuro e o branco, em ciano. **75**

Figura 20: Espectro no infravermelho do PAMAM-G-0,5 em NaCl. **78**

Figura 21: Espectro de H^1-RMN (300 MHz) do PAMAM-G-0,5 em $CDCl_3$. **80**

Figura 22: Espectro de C^{13}-RMN (75 MHz) do PAMAM-G-0,5 em $CDCl_3$ **81**

Figura 23: Espectro no infravermelho do PAMAM-G0 em NaCl. **83**

Figura 24: Eletroferograma do PAMAM-G0, obtido por CZE, conforme método descrito por Peterson e colaboradores, 2001. **84**

Figura 25: Espectro de H^1-RMN(300 MHz) do PAMAM-G0 em DMSO-d_6. **85**

Figura 26: Espectro de H^1-RMN (300 MHz) do PAMAM-G0 em DMSO-d6, com ampliação na região entre 2 e 4 ppm. **86**

Figura 27: Espectro de C^{13}-RMN(75 MHz) do PAMAM-G0 em DMSO-d6. **87**

Figura 28: Espectro de massas (ESI^+-MS) do PAMAM-G0 (massa molar = 516,68 g/mol) em metanol. **89**

Figura 29: Espectro no infravermelho do PAMAM-G0-SUC em fonte de ATR. **92**

Figura 30: Espectro de H^1-RMN (300 MHz) do PAMAM-G0-SUC em DMSO-d_6. **96**

Figura 31: Espectro de H^1-RMN (300 MHz), expandido (região 2,0 a 3,2 ppm), do PAMAM-G0-SUC em DMSO-d_6. **95**

Figura 32: Espectro de C^13-RMN (75 MHz) do PAMAM-G0-SUC em DMSO-d_6. **96**

Figura 33: Valores de deslocamento químico, em ppm, previstos com auxílio do software ChemDraw(R) para o espectro de C^{13}-RMN (75 MHz) do PAMAM-G0-SUC (em DMSO-d_6). **97**

Figura 34: A – Cromatograma do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (relativo à fração da mancha de RF 0,21); B – Cromatograma do PAMAM-G0-SUC trissubstituído (relativo à fração da mancha de RF 0,15); C – Cromatograma da 3-hidroxiflavona (material de partida). **100**

Figura 35: Imagem do sólido obtido na síntese do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV. **101**

Figura 36: Conformação de menor energia, em vácuo, do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, após minimização realizada no software HyperChem(R), com carbonos apresentados em ciano, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho e nitrogênio em azul. **101**

Figura 37: Espectro no UV-vis da 3-hidroxiflavona (A) e do produto de sua esterificação PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (B), em acetonitrila. **102**

Figura 38: Espectro no infravermelho do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em fonte de ATR. **104**

Figura 39: Comparação dos espectro no infravermelho dos materiais de partida, PAMAM-G0-SUC (A) e 3-hidroxiflavona (B), e do produto final PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (B), em fonte de ATR. **105**

Figura 40: Estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV com os valores de deslocamento químico, em ppm, do espectro de C^{13}-RMN previstos no software ChemDraw(R). **106**

Figura 41: Estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV com os carbonos nomeados (A) e espectro de C^{13}-RMN (75 MHz) do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em DMSO d_6 (B). **107**

Figura 42: Espectro de H^1-RMN (300 MHz)do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, purificado por CCD preparativa em sílica-gel. **109**

Figura 43: Estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV com os hidrogênios nomeados (A) e espectro de H^1-RMN (300 MHz) desse composto, purificado por CCD preparativa em sílica-gel, na região entre 0 e 3,9 ppm, em DMSO-d_6. .....**110**

Figura 44: Estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV com os valores de deslocamento químico, em ppm, do espectro de H^1-RMN previstos com o software ChemDraw$^{(R)}$. **111**

Figura 45: Espectro de H^1-RMN (300 MHz) do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, purificado em colunas de Sephadex-LH20 e sílica-gel, em DMSO-d_6. .....**113**

Figura 46: Estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV com os hidrogênios nomeados (A) e espectro de H^1-RMN (300 MHz) do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, purificado em colunas de Sephadex-LH20 e sílica-gel, ampliado na região em 0 e 3,7 ppm, em DMSO-d_6 (B). **114**

Figura 47: Concentração de PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em solução gástrica simulada sem enzima (pH 1,2) em função do tempo. **116**

Figura 48: Liberação da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em tampão citrato (pH 5,0), sendo: A – concentração do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em função do tempo e B – área do pico da 3-hidroxiflavona em função do tempo. **117**

Figura 49: Liberação da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em tampão fosfato (pH 7,4), sendo: A – concentração do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em função do tempo e B – área do pico da 3-hidroxiflavona em função do tempo. **117**

Figura 50: Liberação da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em tampão borato (pH 8,5), sendo: A – concentração do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em função do tempo e B – área do pico da 3-hidroxiflavona em função do tempo. **118**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Soluções aquosas utilizadas no preparo das amostras **34**

Tabela 2: Gradiente de fase móvel **35**

Tabela 3: Gradiente da fase móvel do método de pureza cromatográfica **37**

Tabela 4: Gradiente da fase móvel do método adaptado para os ensaios de liberação química **40**

Tabela 5: Comprimentos de onda selecionados para o monitoramento de cada analito **46**

Tabela 6: Equações de velocidade de formação da 3-hidroxiflavona em soluções com diferentes pH **51**

Tabela 7: Desvio da linha de base em cromatogramas obtidos com o uso de diferentes ácidos na fase móvel **54**

Tabela 8: Desvio da linha base, resolução e fator de cauda para cada composto de interesse com diferentes concentrações de ácido trifluoracético **54**

Tabela 9: Curvas analíticas para a 3-hidroxiflavona **55**

Tabela 10: Desvio padrão relativo das análises intra- e inter-dia, de quantificação da 3-hidroxiflavona por HPLC **56**

Tabela 11: Recuperação do método na quantificação da 3-hidroxiflavona por HPLC **57**

Tabela 12: Curvas analíticas em baixas concentrações. Sendo y a resposta em área e x a concentração em ng/mL **58**

Tabela 13: Parâmetros de avaliação dos picos calculados para o método de pureza cromatográfica **60**

Tabela 14: Condições experimentais e resultados dos testes de recristalização do 62

3-OH-AM **62**

Tabela 15: Avaliação do pH do eletrólito e da tensão aplicada na quantificação de 3-hidroxiflavona por MEKC **67**

Tabela 16: Avaliação da composição do eletrólito na quantificação de 3-hidroxiflavona por MEKC **67**

Tabela 17: Equações das curvas analíticas da 3-hidroxiflavona por MEKC **69**

Tabela 18: Desvio padrão relativo das análises intra- e inter-dia de quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC **69**

Tabela 19: Resultados de recuperação na quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC **70**

Tabela 20: Precisão e recuperação na quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC com 8-hidroxiquinolina como padrão interno **70**

Tabela 21: Atribuição dos sinais de FT-IR do PAMAM-G-0,5 (Figura 20) **79**

Tabela 22: Atribuição dos sinais de H^1-RMN do PAMAM-G-0,5 (Figura 21) **80**

Tabela 23: Atribuição dos sinais de C^{13}-RMN do PAMAM-G-0,5 (Figura 22) **81**

Tabela 24: Atribuição dos sinais de FT-IR do PAMAM-G0 (Figura 23). **83**

Tabela 25: Atribuição dos sinais de H^1-RMN do PAMAM-G0 (Figuras 25 e 26) **86**

Tabela 26: Atribuição, proposta para os sinais de C^{13}-RMN do PAMAM-G0 (Figura 27) **87**

Tabela 27: Atribuição dos sinais de FT-IR do PAMAM-G0-SUC (Figura 29). **93**

Tabela 28: Atribuição proposta para os sinais de H^1-RMN do PAMAM-G0-SUC (Figuras 30 e 31). **95**

Tabela 29: Atribuição proposta para os sinais de C^{13}-RMN do PAMAM-G0-SUC (Figura 32) **97**

Tabela 30: Atribuição proposta para os sinais de FT-IR do PAMAM-G0-SUC-3OH-FLAV (Figura 38).....**103**

Tabela 31: Atribuição proposta para os sinais de C^{13}-RMN do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (Figura 41).....**108**

Tabela 32: Atribuição proposta para os sinais de H^1-RMN do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV purificado por CCD preparativa em sílica gel (Figuras 42 e 43).....**111**

Tabela 33: Atribuição proposta para os sinais de H^1-RMN do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, purificado em colunas de Sephadex-LH20 e sílica gel, (Figuras 45 e 46).....**115**

Tabela 34: Resultados da atividade em amastigotas de *T. cruzi*, cepas Y (Curitiba) e Y (SS) em comparação com referências.....**120**

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 14
1.1. DENDRÍMEROS E PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS..... 14
1.2. PRÓ-FÁRMACOS E DOENÇAS NEGLIGENCIADAS 17
1.3. CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DE PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS 18
1.3.1. Caracterização de dendrímeros por eletroforeses capilar..... 21
1.4. ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS 27
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS 30
3. PARTE EXPERIMENTAL 31
3.1. REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAL EM GERAL 31
3.2. EQUIPAMENTOS..... 32
3.3. MÉTODOS..... 33
3.3.1. Estudo prévio da estabilidade em solução dos intermediários do dendrímero baseado em inositol como núcleo..... 33
3.3.2 Método de quantificação da 3-hidroxiflavona por HPLC-UV 34
3.3.2.1 Otimização dos parâmetros cromatográficos 34
3.3.2.2 Verificação do desempenho do método 35
3.3.2.3 Adaptação do método de determinação da 3-hidroxiflavona por HPLC-UV para avaliação da pureza cromatográfica dos compostos de interesse 36
3.3.3 Método de determinação da 3-hidroxiflavona por eletroforese capilar 37
3.3.3.1 Eletroforese Capilar de Zona (CZE) 37
3.3.4 Ensaios de liberação química da 3-hidroxiflavona a partir do intermediário 3-OH-AM. 39
3.3.5 Síntese e caracterização do dendrímero PAMAM-G0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona..... 40
3.3.6 Liberação química da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV 44
3.3.6 Ensaio de atividade do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em amastigota de T. cruzi 44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
4.1 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS INTERMEDIÁRIOS DO DENDRÍMERO DE 3-HIDROXIFLAVONA BASEADO EM INOSITOL COMO NÚCLEO..... 45

4.2 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA 3-HIDROXIFLAVONA POR HPLC-UV 53
4.2.1 Otimização dos parâmetros cromatográficos 53
4.3 DETERMINAÇÃO DA PUREZA CROMATOGRÁFICA DE 3-HIDROXIFLAVONA, 3-OH-AMP E 3-OH-AM 59
4.4 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA 3-HIDROXIFLAVONA POR ELETROFORESE CAPILAR 63
4.5 COMPARAÇÃO DOS METODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA 3-HIDROXIFLAVONA POR MEKC E HPLC 70
4.6 LIBERAÇÃO QUÍMICA DA 3-HIDROXIFLAVONA A PARTIR DO INTERMEDIÁRIO 3-OH-AM 72
4.7 SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DO DENDRÍMERO PAMAM-G0 FUNCIONALIZADO COM 3-HIDROXIFLAVONA 77
4.7.1 Síntese do dendrímero PAMAM-G-0,5 77
4.6.2 Síntese do dendrímero PAMAM-G0 82
4.6.3. Síntese do dendrímero PAMAM-G0 succinoilado (PAMAM-G0-SUC) 90
4.6.4. Síntese do dendrímero PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV 98
4.6.5. Liberação química da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV .. 116
4.8 ATIVIDADE DO PAMAM-G0-SUC-3OH-FLAV EM AMASTIGOTAS DE *T. CRUZI* 119

5. CONCLUSÕES 121

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 122

1. INTRODUÇÃO

1.1. DENDRÍMEROS E PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS

Os dendrímeros constituem-se em classe de macromoléculas poliméricas com nanoestrutura bem definida, que possuem estreita dispersividade de massa ou tamanho e arquitetura semelhante à das árvores, exceto pelo número exponencial de ramos dendríticos, que irradiam para o exterior a partir de um núcleo comum. A adição sucessiva de novos dendrons (ramos, células ramificadas) pode conferir à estrutura forma esférica, com a formação de camadas (gerações), devido à saturação estérica, ou congestão da superfície (MENJOGE *et al.,* 2010).

Tais polímeros dendríticos podem ser divididos em três subclasses, de acordo com o nível de controle estrutural alcançado durante sua síntese (TOMALIA, 2001): (1) Altamente ramificados de forma aleatória (estrutura não controlada); (2) *Dendrigrafts* (estrutura semicontrolada) e (3) Dendrímeros clássicos (estrutura controlada). Os dendrímeros ainda podem ser usados como monômeros para produção de estruturas maiores conhecidas como megâmeros ou *core-shell tecto*(dendrímeros) (Figura 1).

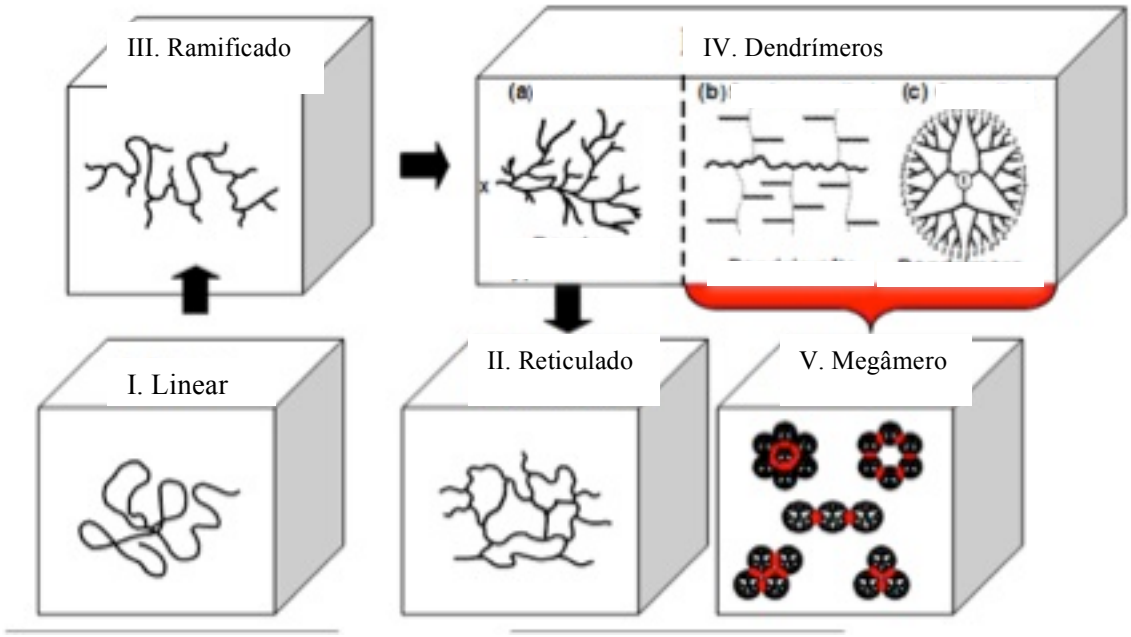


Figura 1: Principais classes de estruturas poliméricas macromoleculares em função da complexidade e do controle estrutural. I. polímero linear. II. polímero reticulado clássico. III. polímero ramificado. IV. dendrímeros: (a) aleatoriamente ramificados, (b) *dendrigrafts*, (c) clássicos. V. Megâmeros ou tecto(dendrímeros) (TOMALIA, 2001).

Os dendrímeros diferem dos polímeros clássicos (como os polímeros lineares, ramificados ou reticulados) por possuírem estrutura bem definida, com alto grau de uniformidade molecular, monodispersividade e superfície altamente funcionalizada. Em geral, dendrímeros com baixo número de gerações tendem a apresentar estrutura aberta, que se torna mais globular e densa à medida que o número de gerações aumenta (D'EMANUELE, ATTOWOOD, 2005; TOMALIA, 2001).

Estas arquiteturas moleculares têm sido reconhecidas como nanodispositivos únicos, em que cada elemento estrutural manifesta uma função específica e, ao mesmo tempo, define as propriedades da nanoestrutura final, à medida que o dendrímero cresce, geração após geração. Por exemplo, o núcleo poderá definir as propriedades do centro da macromolécula de acordo com sua forma, tamanho, multiplicidade e capacidade de direcionamento das camadas mais externas, geralmente via conexões covalentes dos ramos. O interior, que é a parte onde ocorre o acúmulo dos ramos, definirá o tipo e o volume dos espaços vazios e, consequentemente, a natureza esperada para as interações do tipo hóspede e hospedeiro em determinada estrutura dendrítica,

com determinado número de gerações (camadas). A superfície, formada por grupos terminais passivos ou reativos, pode ser planejada para diversas funções. Esses três componentes da arquitetura (núcleo, interior e superfície) serão responsáveis pelas propriedades físicas e químicas dos dendrímeros, como por exemplo, seu tamanho, forma e flexibilidade (TOMALIA, 2005).

Os dendrímeros são sintetizados em etapas, em sequência repetitiva de reações com o objetivo de garantir camadas completas, a cada geração, levando, teoricamente, a produto que é unimolecular e monodisperso. Os processos sintéticos, desenvolvidos para o preparo de dendrímeros, permitem o estreito controle dos parâmetros críticos para o planejamento molecular, tais como, tamanho, forma e química da superfície/interior. Técnicas de síntese, comprovadamente efetivas, incluem: método convergente, de Tomalia e colaboradores (1990), tendo como exemplo dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), e método divergente, de Frèchet e colaboradores (1994). Há, também, a estratégia de auto-organização de Zimmerman e colaboradores (1996). Esses métodos se mostraram eficientes na geração de macromoléculas bem definidas com propriedades únicas (MAJOROS *et al.,* 2008).

Uma das formas latentes de um fármaco, inativa, obtida por modificação molecular, que libera a forma ativa em determinado local ou região, mediante reação química ou enzimática *in vivo*, é denominada pró-fármaco (WERMUTH, 1984). Os pró-fármacos têm sua estrutura molecular planejada para melhorar as propriedades biofarmacêuticas, farmacocinéticas ou farmacodinâmicas em relação ao protótipo ativo (CHUNG *et al.,* 2005; SILVA *et al.,* 2005). Tal forma de transporte pode levar à minimização da toxicidade, maior adesão ao tratamento, liberação lenta do fármaco e, também, pode aumentar a seletividade para com o tecido ou célula alvo (fármacos dirigidos) (CHUNG *et al.,* 2008).

Os dendrímeros têm se destacado como transportadores potenciais de fármacos, podendo atuar tanto pelo encapsulamento de fármacos na estrutura dendrítica (forma farmacêutica) quanto pela interação do fármaco com os grupos terminais de sua superfície via atrações eletrostáticas ou ligações covalentes (pró-fármacos) (CHENG, 2012).

O desenvolvimento de um pró-fármaco dendrimérico pode envolver as seguintes estratégias: (1) Ligar o fármaco à superfície do dendrímero, estabelecendo, por exemplo, ligação covalente; (2) Incluir grupo espaçante, responsável por promover as ligações entre os ramos; (3) Usar ramos que contêm o fármaco, o que leva ao aumento da quantidade de fármacos na macromolécula a cada geração consecutiva (GIAROLLA *et al.,* 2010, 2012).

Algumas das aplicações biológicas das macromoléculas dendriméricas incluem o desenvolvimento de sensores fluorescentes (ANDRONOV, FRECHET, 2000; CAMINADE *et al.,* 2010), catalisadores (de JESUS, FLORES, 2008), transportadores de genes (DUTTA *et al.,* 2010), agentes de contraste para ressonância magnética nuclear (VILLARAZA *et al.,* 2010), desenvolvimento de vacinas (HEEGAARD *et al.,* 2010), antivirais, antimicrobianos, terapia do câncer e enzimas artificiais (LIU, FRÉCHET, 1999; D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005; YANG, KAO, 2006; PATEL *et al.,* 2010). Também, podem ser utilizados em doença de Chagas (FERNANDEZA *et al.,* 2008; ROMERO, MORILLA, 2010), malária (BHADRA *et al.,* 2005; AGRAWAL *et al.,* 2007; SANTOS-MAGALHÃES, MOSQUEIRA, 2010) e tuberculose (SOSNIK *et al.,* 2010; ZHANG, ZHOU, 2011).

A interação entre dendrímero e fármaco é um tema que tem atraído, significativamente, o interesse dos pesquisadores. As aplicações desses sistemas incluem o uso para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade do fármaco, para atuar como modelador da liberação e/ou como direcionador do fármaco (D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005; NAJLAH *et al.,* 2006; MENJOGE *et al.,* 2010; SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016), quando houver grupos diretores para determinadas células.

1.2. PRÓ-FÁRMACOS E DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

Doenças tropicais infecciosas, como infecções por protozoários ou helmintos ou outras, como a anemia falciforme, são reconhecidas como doenças negligenciadas em relação a doenças como câncer, obesidade e envelhecimento, que recebem bilhões de dólares de investimento anual para o desenvolvimento de novos fármacos. As doenças negligenciadas ocorrem, principalmente, em áreas de extrema pobreza e são, por si só, promotoras da pobreza. Por essa razão, recebem atenção insuficiente dos fabricantes de fármacos, que não consideram tais doenças como sendo alvos lucrativos (DNDi, 2013; CHUNG *et al.,* 2008).

Existe escassez de fármacos eficazes, seguros, menos tóxicos e com preços acessíveis para as doenças tropicais negligenciadas ou infecciosas, tais como doença de Chagas, malária, leishmaniose, dengue, filariose linfática, tuberculose e enfermidades transmitidas por helmintos. A resistência aos compostos disponíveis na terapêutica e tratamentos de longa duração são alguns dos desafios a serem vencidos pela comunidade científica (JAKOBSEN *et al.,* 2011).

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é parasitose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, para a qual os fármacos benznidazol e nifurtimox são os únicos disponíveis no mercado farmacêutico. Esses quimioterápicos têm se mostrado limitados e, frequentemente, inapropriados para as fases crônicas da doença, por apresentarem baixa eficiência e por provocarem graves efeitos adversos. Neste contexto, o hidroximetilnitrofural (NFOH) tem se mostrado como potencial candidato a fármaco, para o tratamento da doença de Chagas, por apresentar maior atividade *in vitro* que o benznidazol e por ter toxicidade quatro vezes menor que a do fármaco de partida correspondente, o nitrofural (CHUNG *et al.,* 2003, 2008; dos SANTOS *et al*., 2011), além de se mostrar com atividade igual ao benznidazol *in vivo*, mas com menor toxicidade que este fármaco (DAVIES *et al.*, 2010). A farmacocinética mostra que ele é 20 vezes mais distribuído que o protótipo nitrofural, o que pode ser responsável pela maior atividade do NFOH em relação ao protótipo (SERAFIM *et al*., 2013). Os flavonóides são outros compostos promissores para o combate ao mal de Chagas (TEMPONE *et al*., 2007).

A leishmaniose, causada por parasitas do gênero *Leishmania*, é doença para a qual a quimioterapia disponível é escassa (CHUNG *et al.,* 2008; TASDEMIR *et al.,* 2006). Os medicamentos utilizados no tratamento da leishanioses visceral e da leishmaniose tegumentar americana são o antimoniato de *N*-metil glicosamina, o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal, esses fármacos são tóxicos e podem apresentar eventos adversos, demandando, portanto, pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (PELISSARI *et al*., 2011).

Flavonóides como a quercetina e a 3-hidroxiflavona mostraram boa atividade antichagásica e leishmanicida *in vitro*, mas apresentaram atividade leishmanicida *in vivo* menor que a do padrão, miltelfosina (TASDEMIR *et al.,* 2006). Portanto, são protótipos promissores para o desenvolvimento de pró-fármacos com maior biodisponibilidade e potencialmente úteis para o tratamento dessas doenças negligenciadas (GIAROLLA *et al.,* 2010).

1.3. CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DE PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS

A caracterização analítica de dendrímeros é tarefa difícil, para a qual as técnicas geralmente reportadas são: ressonância magnética nuclear acoplada à espectrometria de massas (RMN-MS); cromatografia de permeação em gel (GPC, também conhecida como cromatografia

de exclusão por tamanho, SEC); cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); cromatografia líquida de ultra desempenho (UPLC); bombardeamento de átomos acoplado à espectrometria de massas (FAB-MS); ionização por *eletrospray* acoplada à espectrometria de massas (ESI-MS); espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-Vis); espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR); ionização da matriz assistida por Laser com detecção por tempo de voo acoplado à espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS); espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS); espalhamento de nêutrons de baixo ângulo (SANS); espalhamento dinâmico de luz (DLS); titulação potenciométrica; eletroforese em gel de poliacriloamida (PAGE) e eletroforese capilar (CE) (BIRICOVA, LAZNICKOVA, 2009).

A utilização de métodos de derivação dos dendrímeros pela adição de unidades promotoras da detecção tem sido reportada na literatura. Estudo das interações intermoleculares de dendrímeros PAMAM (poliamidoamina) G2, G4 e G6 (com 2, 4 e 6 gerações ou camadas), em soluções aquosas, com concentrações de 0,01 a 75% m/m, foi realizado utilizando duas técnicas analíticas espectroscópicas, ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e despolarização da fluorescência. Os resultados mostraram que não houve agregação dos dendrímeros em solução aquosas com concentrações menores que 5% m/m e que acima de 30% m/m a mobilidade das unidades adicionadas diminui drasticamente, devido ao aumento da viscosidade da solução (JOCKUSCH *et al.,* 2002).

Majoros e colaboradores (2008) apresentaram série de estratégias de síntese e caracterização de dendrímeros híbridos, POPAM, construídos a partir de um núcleo de polipropilenoimina (PPI ou POMAM), com adição de camadas sucessivas de poliamidoamina (PAMAM). A formação de camadas completas ou a presença de defeitos (degradação dos dendrons ou presença de ramificações não ligadas nas camadas) na estrutura dos dendrímeros foi monitorada por C^{13}-RMN. A massa molecular e o raio hidrodinâmico dos dendrímeros foram estimados por cromatografia de permeação em gel com detecção por índice de refração (GPC-RI). Os resultados dessas análises, juntamente com aqueles obtidos por HPLC-UV, indicaram a obtenção de produtos relativamente uniformes quanto ao tamanho das partículas (monodispersos).

A adaptação de métodos de separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para a separação de dendrímeros PAMAM com superfície funcionalizada por grupos amina, carboxila e hidroxila, de baixa dispersividade e hidrossolúveis, foi reportada

como sendo alternativa analítica viável, apesar das dificuldades envolvidas na contenção da difusão, fixação e revelação dos produtos dendriméricos. Neste estudo, as manchas dos eluogramas foram coletadas e caracterizaram-se os dendrímeros recuperados por MALDI-TOF (SHARMA *et al*., 2005).

A modificação da superfície de dendrímeros, frequentemente, gera conjugados com estrutura complexa, cuja caracterização requer métodos analíticos capazes de fornecer informações como distribuição de massas, pureza e grau de funcionalização da superfície molecular. Neste sentido, Cason e colaboradores (2008) compararam a eficiência das técnicas UPLC-UV e HPLC-UV na separação de conjugados dendriméricos obtidos por modificação da superfície de dendrímeros PAMAM G4 com amina e biotina. Os resultados encontrados indicaram a técnica de UPLC com sendo adequada para a detecção e separação tanto de dendrímeros não modificados quanto de dendrímeros com diferentes graus de transformação.

Por outro lado, Muller e Hol (2011) questionaram a eficácia de alguns métodos analíticos, geralmente empregados para demonstrar a homogeneidade da razão número de ligantes/nanopartícula. Estudando os produtos de diferentes reações de funcionalização da superfície de dendrímeros PAMAM G5, os autores verificaram que o uso da média aritmética da razão número de ligantes/nanopartícula pode fornecer resultados equivocados sobre a composição do produto e rendimento da reação. De acordo com os autores, algumas das técnicas analíticas que fornecem apenas a razão média do número de ligantes/nanopartícula são: RMN; espectrofotometria UV-Vis; FT-IR e análise elementar. No entanto, técnicas como GPC, HPLC, MALDI-TOF-MS, CE e PAGE podem resolver a distribuição dos componentes quanto à essa razão. Os autores apresentaram o uso de HPLC-UV em conjunto com método matemático de ajuste de picos (desconvolução do cromatograma), como alternativa para a especiação química, ou seja, elucidação da distribuição percentual dos dendrímeros em função do número de ligantes adicionados.

Pró-fármacos dendriméricos, com até três gerações, foram sintetizados a partir de unidades de ácido salicílico, ligadas umas às outras por ligações diéster hidrolisáveis. As estruturas dendriméricas obtidas a cada geração foram confirmadas por FT-IR, H^1-RMN, C^{13}-RMN e MALDI-TOF-MS. Neste estudo, a natureza monodispersa do material foi demonstrada por RMN e GPC-RI (TANG *et al*., 2006).

1.3.1. Caracterização de dendrímeros por eletroforeses capilar

A electroforese capilar (CE) é uma técnica de separação amplamente utilizada na investigação, desenvolvimento e no controle de qualidade de produtos farmacêuticos. Na CE, os analitos se movem por influência de um campo eletromagnético e a separação ocorre devido às diferenças nas velocidades de migração de cada analito, ou melhor, devido às diferenças entre suas mobilidades eletroforéticas, μ (TAVARES, 1996).

A CE é uma técnica atraente na pesquisa e desenvolvimento e no controle de qualidade na indústria farmacêutica, uma vez que oferece várias vantagens sobre a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), as quais incluem a simplicidade, rapidez, robustez e baixo custo da análise. Ademais, a CE possibilita a separação em diversos modos de operação de moléculas carregadas ou neutras (SEKHON, 2011).

Existem várias estratégias de separação por eletroforese capilar incluindo: (1) Eletroforese Capilar de Zona (CZE); (2) Eletroforese Capilar não aquosa (NACE); (3) Eletroforese Capilar em Gel (CGE); (4) Cromatografia Eletrocinética Capilar (CEKC); (5) Cromatografia Micelar Eletrocinética (MEKC); (6) Cromatografia Eletrocinética de Microemulsão (MEEKC); (7) Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF); (8) Isotacoforese Capilar (CITP); (9) Eletrocromatografia Capilar Pressurizada (pCEC); (10) Eletroforese Capilar por Afinidade (ACE); (11) Eletroforese Capilar por Imunoafinidade (IACE); (12) Nanoeletroforese Capilar (NCE); (13) Eletroforese Capilar baseada em Microchip (Microchip-based CE) e (14) Eletroforese Capilar Microfluídica (MFCE) (SEKHON, 2011).

A eletroforese capilar, em seus diversos modos de operação, tem se mostrado extremamente útil na investigação de propriedades físico-químicas de dendrímeros, propriedades estas importantes para o entendimento de seu comportamento biológico. Nessa parte do presente estudo efetuou-se revisão dos trabalhos científicos publicados entre 2005 e 2012 (indexados na Web of Knowledge, ISI), que utilizaram a técnica de CE na caracterização de dendrímeros. Deu-se atenção especial às investigações da dispersividade molecular (homogeneidade, monodispersividade ou pureza) e à elucidação estrutural das macromoléculas dendriméricas projetadas para uso farmacêutico.

Shi, Majoros e Baker Jr (2005) apresentaram revisão bibliográfica sobre a análise por CE de diversos dendrímeros PAMAM, envolvendo desde derivados simples a complexos

multifuncionais. Nesta, os autores discorrem sobre aspectos conceituais importantes para o entendimento do comportamento eletroforético dessas macromoléculas. Alguns dos trabalhos citados nessa revisão serão discutidos aqui, para melhor contextualização da nossa pesquisa.

As diferentes gerações de PAMAM.NH2 (gerações completas G2-G5, com grupos amina na superfície) ao serem analisadas por CZE, em capilar de sílica e eletrólito ácido, pH 2,5, apresentaram mobilidades eletroforéticas diferentes entre si, apesar da semelhança das razões carga/massa (estimadas por SEC e titulação potenciométrica) dessas estruturas. Nesse estudo, a baixa resolução dos picos e a alta variância dos tempos de migração (t_m) indicaram que a separação das gerações do PAMAM.NH2 (catiônico) ocorre devido à adsorção à parede do capilar, principalmente, em gerações menores (G0 e G1). O uso de capilar recoberto com metilsilano aumentou a reprodutibilidade dos t_m, mas não melhorou a separação. Neste caso, foi necessária a desconvolução dos picos do eletroferograma para a avaliação da mistura de PAMAMs de G2 a G5. Ademais, a técnica de PAGE possibilitou separações mais nítidas que aquelas obtidas por CZE ou CEC, provavelmente, devido ao efeito de filtração ou peneiramento (SHI *et al*., 2005a).

Sedláková e colaboradores (2006) avaliaram a separação de PAMAM.NH2 G1-G7 e impurezas relacionadas a G1 usando CE com recobrimento dinâmico e eletrólito com pH 7,4 (fisiológico, importante em ensaios biológicos). Em seu estudo, o melhor polímero para recobrimento neutro foi a polietilenoimina a 0,05% (brometo de hexadeciltrimetilamônio e etilenodiamina também foram testados). Observou-se separação completa de G0, G1 e G2. No entanto, a resolução e a eficiência de separação foram baixas em gerações maiores (G3-G7). Ademais, os autores apresentam estudos interessantes da mobilidade eletroforética dos dendrímeros e sua relação com a estrutura molecular (flexibilidade, densidade de carga, massa molar).

Em investigação sobre como a mobilidade eletroforética (μ) varia com a carga e a massa molar (MM) de dendrímeros PAMAM G5, parcialmente acetilados, observou-se que a μ dos dendrímeros catiônicos diminui, não linearmente, com o aumento do grau de substituição, dada a diminuição da relação carga/massa. Sugeriu-se que efeitos de adsorção na parede do capilar, blindagem por contra íons e raio hidrodinâmico influenciam a separação dos dendrímeros, tanto catiônicos quanto aniônicos (PAMAM.COOH, também denominados PAMAM de meia

geração). A dependência não linear da μ com a relação carga/massa mostra que são múltiplos os fatores que governam a migração eletroforética dessas macromoléculas (SHI *et al.,* 2006a).

Em avaliação do potencial de dendrímeros como transportadores de oligonucleotídeo biologicamente ativo, o uso de CZE em capilar de sílica, com eletrólito ácido (pH 1,5), modificado com acetonitrila, possibilitou a separação e quantificação de dendrímeros catiônicos, baseados em α,ε-poli-L-lisina de diferentes gerações (G2-G6). Observou-se proporcionalidade entre o número (experimental, determinado por titulação potenciométrica) de grupos amino (cargas positivas) na superfície do dendrímeros e os respectivos tempos de migração. Apesar de observada a separação dos picos na mistura de dendrímeros, estes apresentaram base alargada e não alcançaram a separação em linha de base, o que, provavelmente, se deve à presença de pequenas quantidades de impurezas ou ao complexo mecanismo de separação eletroforética (EOM *et al.,* 2007).

Os problemas de reprodutibilidade do t_m, adsorção no capilar e baixa resolução, até então encontrados, na análise por CE de mistura de diferentes gerações dos dendrímeros PAMAM.NH2 (catiônicos, eletrólito ácido) foram superados com o emprego de capilar permanentemente recoberto com poli-álcool vinílico (PVA), conforme relatado por Carter, Desai e Sharma (2007). Nas condições aplicadas, as gerações de G0 a G5 foram completamente separadas em 15 minutos. A mobilidade aparente foi, em média, 50% menor que aquela observada com capilar não recoberto e 20% menor do que em capilar silanizado. A aplicação desse método na caracterização de PAMAM com diferentes núcleos confirmou a presença de impureza (resíduos do material de partida, subprodutos ou dendrímeros relacionados) em cada geração de PAMAM e sugeriu que os dendrímeros com núcleos maiores apresentam menor dispersão estrutural, ou maior pureza, do que aqueles com núcleos menores.

Chan e colaboradores (2007) desenvolveram um método de quantificação de derivado dendrimérico do fulereno (contendo dendron de poliamidoamina e núcleo C60) por CZE e MEEK, em amostras de soro humano. Neste estudo, o uso de capilar não recoberto e eletrólito básico (pH 9,2) garantiu a linearidade na determinação do dendrímero e a adição de dodecilsulfato de sódio, SDS, à amostra evitou a formação de complexos entre o composto de interesse e as proteínas do soro.

Os dendrímeros PAMAM.COOH e PAMAM-SAH (contendo grupos ácido succínico na superfície), polianiônicos, de diferentes gerações, não são efetivamente separados por CE em

capilar não recoberto, devido, principalmente, às diferenças mínimas das razões carga/massa e ausência de interação com o capilar. Este efeito não é verificado nas gerações menores, nas quais a presença de estruturas imperfeitas, quando funcionalizadas, levam a diferentes razões massa/carga, o que permite sua separação por CE. Já os *Core-shell* tecto(dendrímeros) apresentam razões carga/massa diferentes do dendrímeros de mesma massa molar (MM), o que possibilita a separação desses (SHI *et al.,* 2005b).

Diante do sucesso no uso de capilar recoberto com PVA para separação reprodutível de PAMAM catiônico, em outro estudo aplicou-se sistema semelhante para a separação de PAMAM aniônicos. Nas condições desenvolvidas, o método usando ACE permitiu a separação dos dendrímeros de gerações menores G1-G3. No entanto, as gerações maiores G4-G8 mostraram picos largos e co-eluídos, provavelmente, devido ao efeito de blindagem por contra íons, o qual exerce maior força de inibição no fluxo das gerações menores (estruturas mais abertas) (DESAI, SHI, BAKER JR, 2008).

Os trabalhos citados até aqui demonstraram que os parâmetros moleculares dos dendrímeros PAMAM, como número de grupos amina e massa molar, deduzidos a partir das estruturas teóricas não são estreitamente consistentes com os dados experimentais, tornando evidente a existência de estruturas imperfeitas, como aquelas contendo ramos perdidos, produtos de ciclização dos ramos, dímeros, traços de compostos de partida e superfícies com funcionalização incompleta (LOPEZ-ANDARIAS *et al.,* 2012).

Neste sentido e em continuação a seus estudos com o PAMAM, Shi e colaboradores (2006b) investigaram a pureza, a distribuição de carga e a μ dos dendrímeros usando CE e PAGE, em conjunto com outras técnicas, como SEC-UV-LS, MALDI-TOF, RMN e titulação potenciométrica. Os autores fornecem uma sequência de passos analíticos para a investigação da estrutura, grau de substituição e dispersividade do PAMAM e seus derivados (funcionalizados com acetamidas, hidroxilas e carboxilas terminais). Esse protocolo analítico foi aplicado com sucesso na caracterização de PAMAM.NH2 G7 e de derivado fluorescente relatado por Hong e colaboradores (2009).

Heigl e colaboradores (2009) também observaram a presença de impurezas (defeitos estruturais) no PAMAM.NH2 G0-G7, comercial, durante seu estudo da interação do tipo hóspede-hospedeiro entre dendrímero e sílica, utilizando CZE e espectroscopia no infravermelho próximo, em conjunto com outras técnicas, além de aplicação de calibração multivariada.

Ademais, nesse trabalho utilizou-se a análise da mobilidade molecular por eletroforese em fase-gasosa (GEMMA) na determinação do tamanho molecular médio dos dendrímeros.

CE se mostrou eficiente na análise da heterogeneidade de dendrímeros PAMAM contendo unidades de fármaco (metotrexato) e grupo diretor (ácido fólico) ligados à superfície. Nesse caso, os espectros dos produtos de partida no UV-Vis e a desconvolução dos picos do eletroferograma permitiram a determinação do grau de substituição dos dendrímeros sintetizados (SHI *et al*., 2006c).

Peptídeos dendriméricos, com potencial atividade antimicrobiana, foram sintetizados e caracterizados quanto à pureza, usando CZE, com eletrólito ácido, em conjunto com RMN, HPLC e MALDI-TOF (NIEDERHAFNER *et al.,* 2010). No entanto, os pesquisadores não apresentaram discussão acerca das limitações da estimativa da pureza por normalização das áreas dos picos ou sobre a pureza dos picos observados por CE e HPLC.

Complexos dendriméricos, baseados em poli-L-lisina, potencialmente aptos ao uso como agentes de contraste, foram caracterizados quanto ao perfil de impurezas e à estabilidade, usando método eletroforético validado por Vetterlein e colaboradores (2006, 2007). Estes autores apresentaram a aplicação bem-sucedida da CE-UV nos testes de estabilidade e quantificação de impurezas de baixa massa molar, porém, sugeriram o uso CE-MS para melhor elucidação da pureza e estrutura química dos dendrímeros relacionados. Posteriormente, este grupo de pesquisa reportou o uso de técnicas analíticas hifenadas, modernas, que incluem o uso de CE, MALDI-TOF e dicroísmo circular para a compreensão do perfil de distribuição e da estrutura molecular de complexos dendriméricos. O trabalho destes autores, publicado em 2006, foi pioneiro na investigação da identidade das impurezas de dendrímeros destinados ao uso médico e na elucidação da pureza dos picos obtidos por EC. Ademais, o estudo apresenta o potencial da CE e confirma a necessidade de uma plataforma analítica envolvendo técnicas quantitativas e qualitativas para a elucidação estrutural dos dendrímeros e seus subprodutos de síntese.

Leriche e colaboradores (2012) relataram os avanços na investigação da pureza dos dendrímeros PAMAM.NH2 G1, tendo na CE técnica chave para separação desses, seguida por elegante método de elucidação dos subprodutos de síntese por MALDI-TOF/TOF. Nessa abordagem, o eletrólito contendo o pico de interesse foi coletado e analisado por espectrometria de massas para a elucidação da estrutura molecular, por interpretação do padrão de fragmentação.

Lalwani e colaboradores (2009a) investigaram extensivamente o comportamento eletroforético de dendrímeros análogos ao PAMAM, baseados em ramos que contêm grupos triazina. Diante dos resultados do aprimoramento do método por CE, usando capilares não recobertos, os autores levantam algumas questões interessantes: Como a mobilidade efetiva dos dendrímeros aniônicos varia em função da força iônica do eletrólito? Como a mobilidade efetiva varia em função do pH, ou seja, qual é a constante de dissociação dos grupos funcionais dos dendrímeros (no eletrólito)? Em estudo posterior, esses pesquisadores utilizaram com sucesso CE e MALDI-TOF para estimar a pureza e a estabilidade química dos dendrímeros aniônicos. Além disso, foi desenvolvido método por CE para avaliação do caráter anfótero (faixa de ponto isoelétrico) dos dendrímeros (LALWANI *et al.,* 2009b).

O uso de CE no estudo das interações de complexação ou blingadem entre dendrímeros e fármacos, genes ou peptídeos tem se mostrado de grande valia. Por exemplo: Zou e colaboradores (2010) apresentaram o uso de CE (nos modos FACE e ACE) para a determinação de propriedades físico-químicas (como constante de blindagem ou de associação), importantes na compreensão do comportamento fisiológico de potenciais nanotrasportadores dendriméricos. Os autores citam que descrever a interação dos polímeros dendríticos com seu ambiente químico é um desafio emergente, principalmente, porque a maior parte das aplicações farmacêuticas dos dendrímeros faz uso de interações não covalentes entre o dendrímero e uma entidade química.

Em trabalho pioneiro no uso de ACE para a avaliação das interações intermoleculares entre peptídeos e dendrímeros PAMAM, Dribek e colaboradores (2007) avaliaram eletroferogramas de peptídeos obtidos com diferentes concentrações de dendrímero no eletrólito, em pH fisiológico. Além disso, utilizaram-se capilares com recobrimento dinâmico de policloreto de dialildimetilamônio nos testes com PAMAM.NH2 de G2-G5 (catiônico) e de polióxido de etileno nos testes com PAMAM.COOH G2-G5 (aniônicos). A abordagem analítica desenvolvida permitiu o ganho no entendimento dos parâmetros que influenciam a interação Peptídio-PAMAM e pode ser útil para a varredura de outros dendrímeros com propriedades físico-químicas diversas.

A CE possui algumas características bastante úteis ao estudo das interações de blindagem ligante-proteína, entre as quais se destaca a possibilidade de observação direta e análise dos complexos formados. Por exemplo, a investigação das interações intermoleculares entre PAMAM.NH2 G4 e albuminas do soro humano e bovino foi realizada usando ACE (em conjunto com outras técnicas), para a análise de amostras contendo proporções crescentes de PAMAM e

concentração fixa de proteína. Observou-se que a adição de dendrímeros à proteína diminui a área do pico da proteína e também diminui o t_m. Nesse estudo, o número de sítios de blindagem foi calculado por extrapolação da curva de área do pico em função da razão molar dendrímero/proteína. Ademais, estudos por calorimetria permitiram a determinação de parâmetros termodinâmicos, como a constante de associação dos complexos. Já a avaliação das proteínas por dicroísmo circular forneceu informação acerca de sua estrutura secundária. Por fim, a utilização de sonda fluorescente ligada a proteína e do potencial zeta mostraram a densidade de carga da superfície dos dendrímeros (SHCHARBIN *et al.,* 2007).

No mesmo sentido, Montealegre e colaboradores (2012) realizaram estudo interessante sobre o uso de dendrímeros como promotores da separação de proteínas em CE e, também, utilizaram CE para inferir sobre a pureza dos dendrímeros baseados em carbossilanos contendo grupos ácido carboxílico na superfície. De maneira geral, os dendrímeros foram eficientes no aprimoramento da resolução dos perfis de proteínas vegetais investigados.

A discussão apresentada sobre a análise de dendrímeros por CE mostrou a importância que esta técnica tem desempenhado na determinação das propriedades físico-químicas e farmacológicas dos dendrímeros e seus derivados. Dessa forma, a CE tem contribuído enormemente na busca pela efetiva aplicação médica dessa tecnologia. Em conclusão, o uso de CE em condições eletroforéticas apropriadas e em conjunto com espectrometria de massas permite a caracterização dos dendrímeros quanto à pureza, estabilidade, constantes de dissociação/associação. No entanto, o uso de plataforma de técnicas analíticas apropriadas é essencial para a elucidação das estruturas químicas dos polímeros dendríticos (TORASKAR *et al*., 2011; BIRICOVA, LAZNICKOVA, 2009).

1.4. ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS

Apesar de existirem vários tipos de polímeros disponíveis no mercado, poucos possuem propriedades adequadas (solubilidade, biocompatibilidade, atoxicidade e falta de imunogenicidade) para promover a liberação de fármacos. A alta dispersividade da maioria dos polímeros clássicos pode levar a comportamento farmacocinético irreprodutível, devido à variação do perfil de distribuição das massas molares, em diferentes lotes do produto (VASEI *et al.,* 1999). Já os polímeros dendriméricos têm alto potencial para o uso como plataformas no

preparo de transportadores de fármacos solúveis, permeáveis e dirigidos, por exemplo, pela ligação covalente de diferentes unidades à superfície do dendrímero (Figura 2, IHRE *et al.,* 2002).

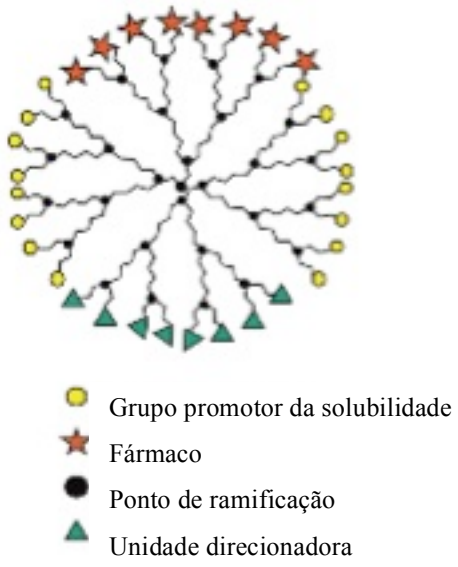


Figura 2: Representação esquemática ilustrativa de um pró-fármaco dendrimérico dirigido (IHRE *et al.,* 2002).

Para que a administração oral do pró-fármaco seja viável, a ligação covalente entre dendrímero e fármaco deve ser estável nos fluidos gastrointestinais e durante o transporte através das células epiteliais, mas deve ser hidrolisável após a absorção. Neste sentido, estudos da natureza da ligação covalente e estabilidade de pró-fármacos dendriméricos e derivados, baseados em PAMAM G0 como núcleo, ácido lático ou etilenoglicol como espaçantes e no fármaco naproxeno, foram apresentados por Najlah e cobaboradores, em 2006. Os materiais foram ensaiados quanto à hidrofilicidade pela determinação do coeficiente de partição em sistema bifásico (1-octanol/tampão fosfato pH 7,4), estabilidade à hidrólise química a 37 ^{o}C (em ácido clorídrico aquoso pH 1,2, tampão fosfato pH 7,4 e tampão borato pH 8,4) e enzimática (em plasma humano 80%), utilizando a quantificação do fármaco, dendrímeros e seus derivados, nas amostras, por HPLC-UV.

Adicionalmente, a investigação *in vitro* destes pró-fármacos dendriméricos foi expandida pela realização dos ensaios de estabilidade em homogeneizado de fígado de rato 50% (que é mais rico em esterases que o plasma humano), de toxicidade, quando expostos a células Caco 2

(células do adenocarcinoma intestinal humano), e permeabilidade através da membrana da célula Caco 2 (NAJLAH *et al.,* 2007).

A ligação covalente entre dendrímero e fármaco, hidrolisável ou biodegradável, oferece a oportunidade de melhor controle da liberação do fármaco do que se consegue com a complexação dos mesmos. O uso de ligações do tipo amida fornece conjugado dendrímero-fármaco mais estável, enquanto o uso de ligações do tipo éster pode levar à liberação mais rápida do fármaco. Contudo, ambas as ligações podem ser clivadas por hidrólise química ou enzimática (D'EMANUALE, ATTWOOD, 2005). A taxa de liberação de um fármaco por hidrólise ácida geralmente obedece à seguinte ordem: éster > carbonato > carbamato > amida (D´SOUZA, TOPP, 2004; SOYEZ, SCHACHT, VANDERKERKEN, 1996).

A hidrólise enzimática das ligações do tipo éster é mediada por carboxil esterases distribuídas por diferentes tecidos e no sangue. A taxa de hidrólise enzimática de um pró-fármaco na forma de éster é influenciada pelo impedimento estérico, hidrofilicidade e massa molar. Carbonatos podem sofrer hidrólise enzimática, enquanto, carbamatos são menos hidrolisados pelas esterases do que os ésteres e carbonatos. Já as ligações do tipo amida são muito estáveis à hidrólise enzimática (CHENG, 2012)

Uma outra abordagem para a liberação de pró-fármacos dendriméricos foi apresentada por McGrath, em 2005. Esse autor propôs o planejamento e síntese de dendrímeros desmontáveis, cuja liberação demanda o ataque de uma única subunidade da macromolécula, por estímulo químico ou físico, que desencadeia a desmontagem em cascata da estrutura dendrimérica.

Estudos preliminares dos mecanismos de liberação de potenciais pró-fármacos dendriméricos (baseados em núcleo de inositol, com ácido L-málico como espaçante e hidroximetilnitrofural - NFOH, quercetina ou 3-hidroxiflavona como compostos bioativos), utilizando as ferramentas da modelagem molecular, mostraram que cada pró-fármaco possui um comportamento único em relação às propriedades investigadas. Os resultados de modelos moleculares contendo de um a três ramos sugeriram que o átomo de carbono carboxílico, da unidade ácido L-málico, mais próximo à unidade ativa, pode ser hidrolisado e consequentemente, liberar os fármacos (GIAROLLA *et al.,* 2010). Já os resultados dos modelos contendo de quatro a seis ramos apontaram o átomo de carbono carboxílico, da unidade ácido L-málico, mais próximo ao núcleo como o ponto de quebra mais promissor da ligação éster (GIAROLLA *et al.,* 2012).

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Face ao exposto, tendo em vista o caráter promissor dos pró-fármacos dendriméricos e considerando a necessidade de desenvolvimento de novos quimioterápicos ativos em doenças negligenciadas, bem como a importância do suporte químico analítico para alcançar esse propósito, o objetivo geral deste trabalho é avaliar a identidade, pureza e liberação por hidrólise química de dois potenciais pró-fármacos dendriméricos (Figura 3) planejados para serem ativos em doença de Chagas e leishmaniose.

A

B

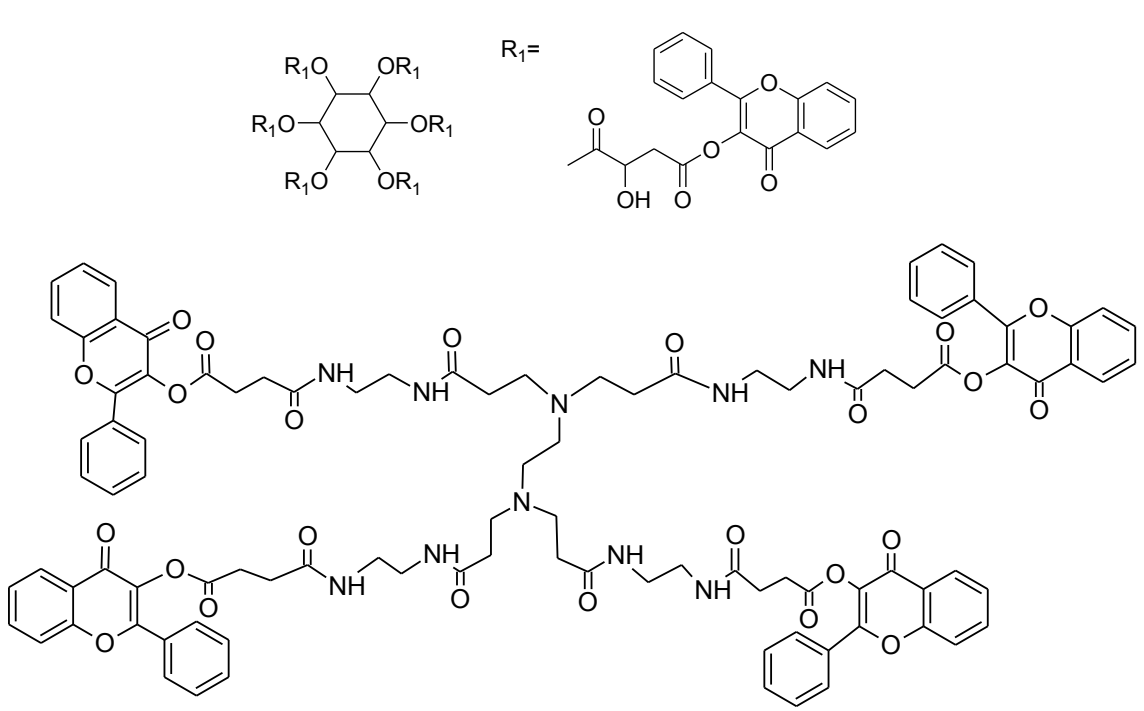


Figura 3: Potenciais pró-fármacos dendriméricos planejados para leishmaniose e doença de Chagas. Sendo: A – dendrímero baseado em inositol como núcleo; B – dendrímero PAMAM-G0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona.

No dendrímero, planejado por pesquisadores do LAPEN (Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos em Doenças Negligenciadas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo), apresentado na Figura 3 A, estruturalmente, o foco central é o inositol, porque permite a adição

de, no máximo, seis ramificações. Já o ácido L-málico foi escolhido como espaçante por conter grupos que permitem a esterificação com o centro e com o composto ativo, assim como o crescimento do dendrímero (FERREIRA, GIAROLLA, 2007; GIAROLLA *et al.,* 2010, 2012).

Adicionalmente, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar o dendrímero PAMAM-G0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona, usando ácido succínico como espaçante (Figura 3 B) e caracterizar o material obtido. Neste dendrímero, o foco central é o PAMAM-G0, por ser material biocompatível, hidrossolúvel e que permite o crescimento do dendrímero. Já o ácido succínico foi escolhido como espaçante por conter grupos funcionais que permitem a amidação com o foco central e a esterificação com o composto bioativo (3-hidroxiflavona).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAL EM GERAL

Utilizaram-se reagentes e solventes com grau de pureza analítico ou puríssimo (grau HPLC), conforme a necessidade de cada procedimento e técnica, sendo esses: hidróxido de sódio, ácido trifluoracético, ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido bórico, ácido fórmico, ácido 3-cicloexilamino-1-propanossulfônico (CAPS), tetraborato de sódio (bórax), dodecilsulfato de sódio (SDS), fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, bicarbonato de sódio, acetonitrila, metanol, hidróxido de amônio, bicarbonato de sódio, acetato de etila, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), tolueno, trietilamina, acrilato de metila, etilenodiamina (EDA), anidrido succínico, cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC.HCl), ninhidrina, verde de bromocresol, sulfato de sódio anidro e 3-hidroxiflavona. A 3-hidroxiflavona esterificada com ácido málico protegido - [2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxalan-4-il)acetato de 4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-3-ila] - e a 3-hidroxiflavona esterificada com ácido málico - {ácido 2-hidroxi-4-oxo-4-[(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-3-il)oxi]butanóico} - foram sintetizadas por pesquisadores do LAPEN (FERREIRA, GIAROLLA, 2007).

As análises em HPLC foram realizadas com coluna cromatográfica contendo octadecilsilano como fase estacionária, C18, da marca Shimadzu, Shim-pack VP-ODS, com 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e 5 μm de tamanho de partícula, e pré-coluna de

mesma fase estacionária, com 10 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e 5 μm de tamanho de partícula.

Nos ensaios por CE, utilizaram-se capilares em sílica da marca Beackman Coulter, com 0,75 μm de diâmetro interno, 380 μm de diâmetro externo, revestidos com poliacriloamida e com diferentes comprimentos.

Todas as fases móveis e eletrólitos preparados foram filtrados em membrana de celulose regenerada com 0,45 μm de poro.

O monitoramento das reações foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se placas de sílica-gel como fase estacionária.

Para a purificação dos compostos sintetizados utilizaram-se colunas de sílica-gel com 230-400 mesh, octadecilsilano (C18) e Sephadex LH-20.

Vidrarias comuns em laboratório analítico, como balões volumétricos, béqueres, pipetas e outras, também foram utilizadas.

3.2. EQUIPAMENTOS

Durante o desenvolvimento das atividades descritas neste trabalho utilizaram-se os seguintes equipamentos: (1) Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção no ultravioleta (HPLC-UV) e injetor automático, da marca Shimadzu; (2) Eletroforese capilar com detecção no ultravioleta e visível (CE-DAD) da marca Beakman Coulter, modelo ACE MDQ; (3) Espectrofotômetro UV-Vis da marca Shimadzu, modelo U-1800; (4) Espectrofotômetro com microplaca marca Tecan, modelo Infinite M200. (5) Cromatógrafo preparativo com detecção no UV da marca Biotage, modelo Isolera. (6) Espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier, FT-IR, marca Shimadzu, modelo IRAffinity-1. (7) Espectrômetro de ressonância magnética nuclear, RMN, marca Bruker, modelo Advance DPX 300.

Adicionalmente, equipamentos comuns em laboratório analítico, como pHmetro e outros, também foram utilizados.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Estudo prévio da estabilidade em solução dos intermediários do dendrímero baseado em inositol como núcleo

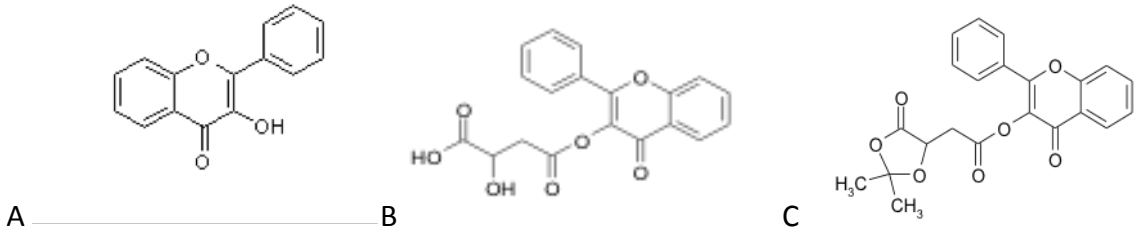


Figura 4: Estrutura química dos precursores da síntese do dendrímero baseado em inositol como núcleo: 3-hidroxiflavona (A), 3-OH-AM (B) e 3-OH-AMP (C).

Os ensaios iniciais de desenvolvimento dos métodos de quantificação da 3-hidroxiflavona e determinação da pureza cromatográfica por HPLC envolveram o estudo da estabilidade dos compostos de interesse (Figura 4) em soluções estoque, em solventes orgânicos e em soluções de trabalhado, aquosas, com diferentes pH.

Determinou-se a estabilidade dos analitos, precursores da síntese dos dendrímeros, 3-hidroxiflavona, 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxalan-4-il)acetato de 4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-3-ila e ácido 2-hidroxi-4-oxo-4-[(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-3-il)oxi]butanóico (doravante abreviados por 3-OH-AMP e 3-OH-AM, respectivamente), em solução a 50 μg/mL em metanol e acetonitrila.

Para isso, as soluções em estudo foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, com tampa e batoque de polipropileno, e estocadas em geladeira por 3 semanas. A cada semana, as soluções foram diluídas a 5 μg/mL nos mesmos solventes e efetuaram-se medidas, por espectrofotometria no UV-Vis, em comprimentos de onda previamente selecionados. As medidas em cada tempo de armazenamento foram comparadas empregando-se a análise estatística ANOVA, *one-way*, com 95% de confiança.

Foi realizado um estudo prévio da estabilidade do 3-OH-AM em soluções com diferentes valores de pH contendo 20 μg/mL desse composto, preparadas com misturas de acetonitrila e soluções aquosas ácidas ou básicas, na proporção 40:60.

As soluções aquosas avaliadas estão descritas na Tabela 1. A estabilidade à hidrólise foi monitorada medindo-se a absorbância das soluções, imediatamente após seu preparo, em 238, 340 e 350 nm, por 2 horas, com leituras a cada 30 segundos.

Tabela 1: Soluções aquosas utilizadas no preparo das amostras

Solução	pH
Ácido clorídrico 1 mol/L	0,33
Ácido trifluoracético 0,1% v/v	2,18
Água desionizada	5,50
Bicarbonato de sódio 0,1 mol/L	8,35
Hidróxido de sódio 0,1% m/v	12,55

3.3.2 Método de quantificação da 3-hidroxiflavona por HPLC-UV

Com o objetivo de fornecer suporte à síntese do dendrímero baseado em inositol como núcleo, bem como de outros dendrímeros de 3-hidroxiflavona estudados pelo LAPEN, desenvolveram-se métodos de quantificação da 3-hidroxiflavona e de determinação da pureza cromatográfica dos compostos de interesse (Figura 4) por HPLC-UV.

3.3.2.1 Otimização dos parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos avaliados no aprimoramento da separação e detecção dos compostos de interesse por HPLC foram: a proporção dos solventes durante o gradiente da fase móvel; o uso dos ácidos fórmico (0,1 % v/v), fosfórico (0,1 % v/v) e trifluoracético (0,5, 0,1 e 1,5 % v/v) na fase móvel; o volume da câmara de mistura dos solventes, em 2,6 ou 0,5 mL, o comprimento de onda de detecção, em 238 ou 254 nm.

A injeção de 20 μL das soluções dos analitos em mistura de ácido trifluoracético 0,1% v/v e acetonitrila, 60:40, seguida do gradiente de fase móvel descrito na Tabela 2, com detecção em 254 nm foram as melhores condições experimentais obtidas.

Tabela 2: Gradiente de fase móvel

Tempo (min)	A – Ácido trifluoracético, %	B – Acetonitrila, %
0	60	40
10	60	40
16	30	70
20	30	70
25	60	40
30	60	40

3.3.2.2 Verificação do desempenho do método

O método desenvolvido teve seu desempenho verificado mediante avaliação dos parâmetros analíticos relacionados à linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. Os procedimentos utilizados para a avaliação desses parâmetros analíticos e os respectivos critérios de aceitação foram aqueles recomendados pela ANVISA e descritos na RE 899, de 25 de maio de 2003 para métodos analíticos (Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos).

Foi utilizado padrão secundário de 3-hidroxiflavona, da marca Sigma-Aldrich, com teor e pureza cromatográfica de 100%. A fase móvel foi preparada com acetonitrila grau HPLC, água ultrapurificada (grau HPLC) e ácido trifluoroacético grau analítico. Efetuou-se a pesagem dos materiais em balança semianalítica e realizaram-se as dissoluções em vidraria volumétrica aferida (classe A).

a) Linearidade

Para o estudo da linearidade do método, efetuaram-se duas curvas de calibração, em dias diferentes. As curvas foram construídas utilizando-se 7 soluções com concentrações que variavam de 20 a 80 µg/mL e realizaram-se as injeções em duplicata. A linearidade foi observada a partir do cálculo do coeficiente de correlação linear.

b) Precisão

A precisão reflete a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragens múltiplas de uma mesma amostra. Neste trabalho, a precisão foi avaliada em dois níveis: precisão intra-dia e precisão inter-dia (representando a repetibilidade e a precisão intermediária, respectivamente), em concentração alta, média e baixa, 20, 50 e 80 µg/mL.

Injetaram-se as soluções de trabalho em triplicata e observou-se a precisão utilizando-se o desvio padrão relativo das medidas.

c) Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Limite de detecção é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas.

Prepararam-se soluções contendo concentrações progressivamente menores do analito, de 1 µg/mL até 1 ng/mL. Em seguida, preparam-se curvas de calibração na faixa de 10 a 20 ng/mL, em triplicata. Calcularam-se, então, os limites a partir do desvio padrão dos interceptos e da inclinação média dessas três curvas (Equação 1).

Equação 1: $LD = \frac{DPx3}{a}$ Equação 2: $LQ = \frac{DPx10}{a}$

Sendo: LD – limite de detecção; LQ – limite de quantificação; DP – desvio padrão do intercepto, e a – inclinação média das curvas.

Adicionalmente, buscou-se determinar a repetibilidade dos valores obtidos na concentração limite de quantificação. Para isso, preparou-se uma curva de calibração com 5 soluções, contendo de 20 a 140 ng/mL de 3-hidroxiflavona e uma solução contendo 26 ng/mL foi injetada em triplicata.

3.3.2.3 Adaptação do método de determinação da 3-hidroxiflavona por HPLC-UV para avaliação da pureza cromatográfica dos compostos de interesse

Para avaliar a pureza cromatográfica das amostras do protótipo 3-hidroxiflavona e dos produtos de síntese derivados desse, 3-OH-AMP e 3-OH-AM, o método de quantificação da 3-hidroxiflavona por HPLC-UV foi adaptado, prolongando-se de 4 para 14 minutos o platô a 90% de acetonitrila, no programa de gradiente da fase móvel. Esta adaptação foi feita para que os resíduos dos materiais de partida, as impurezas ou os produtos de degradação eluíssem pela

coluna e fossem detectados no cromatograma. As demais condições experimentais foram mantidas. O método adaptado apresenta tempo total de corrida de 46 minutos, seguindo o gradiente mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Gradiente da fase móvel do método de pureza cromatográfica

Tempo (min)	A – Ácido trifluoracético 0,1%, %	B – Acetonitrila, %
0	60	40
6	60	40
22	10	90
36	10	90
41	60	40
46	60	40

Neste método, a pureza dos analitos foi estimada pela normalização da área dos picos no cromatogramas e pela relação direta entre as porcentagens em áreas dos picos de cada analito e a porcentagem em massa dos analitos na amostra.

3.3.3 Método de determinação da 3-hidroxiflavona por eletroforese capilar

3.3.3.1 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

Avaliou-se a quantificação da 3-hidroxiflavona em capilar de sílica não modificado, utilizando-se o modo de separação conhecido por Eletroforese Capilar de Zona, CZE. Para a realização desses experimentos o método proposto por Wang e colaboradores (2004) foi adaptado e algumas condições instrumentais foram variadas.

Na avaliação do eletrólito mais adequado à quantificação da 3-hidroxiflavona, prepararam-se tampões de tetraborato de sódio (bórax) a 35 mM, com pH entre 8,5 e 10,5, ajustado pela adição de hidróxido de sódio ou ácido bórico. Coletaram-se os eletroferogramas fazendo-se a injeção da 3-hidroxiflavona a 100 μg/mL em mistura contendo 50% de eletrólito e 50% de acetonitrila, mantendo-se a pressão em 0,5 psi por 5 segundos, seguida da aplicação de 20 kV de tensão por 20 minutos. O capilar de sílica com 50,2 cm de comprimento total, 40 cm de

comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno utilizado foi mantido a 25 ^{o}C e a detecção foi feita em 238 nm.

Em adição, avaliou-se o uso de tampão fosfato (Na_2HPO_4 17,5 mM e KH_2PO_4 17,5 mM em pH 10,0 e 10,5) e tampão CAPS (ácido 3-cicloexilamino-1-propanossulfônico - pKa 10,4 - 35 mM em pH 9,5, 10,0 e 10,6) como eletrólitos.

3.3.3.2 Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)

As condições experimentais propostas por Yu Zhang e colaboradores (2007) foram, incialmente, empregadas para a quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC. Em seguida, variaram-se algumas condições analíticas, buscando-se desempenho analítico apropriado.

O pH do eletrólito variou entre 9,5 e 10,5. Avaliaram-se as quantidades de dodecilsulfato de sódio (SDS) e de bórax no eletrólito, empregando-se planejamento fatorial com 2 fatores (concentrações de SDS e bórax) em três níveis (SDS a 20, 30 e 40 mM e bórax a 5, 15 e 20 mM). A tensão aplicada durante a separação variou entre 11 e 30 kV. Utilizaram-se diferentes procedimentos de injeção da amostra e de limpeza do capilar, bem como capilares de sílica de 40 e 20 cm de comprimento efetivo.

As condições experimentais mais adequadas foram: eletrólito contendo 30 mM de SDS, 15 mM de bórax e 10% v/v de etanol em pH 10,0, com injeção da 3-hidroxiflavona (de 5 a 80 μg/mL) em mistura contendo 90% de eletrólito e 10% de etanol, mantendo-se a pressão em 0,5 psi por 5 segundos, seguida da aplicação de 11 kV de tensão por 13 minutos em capilar de sílica com 31,2 cm de comprimento total, 20 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno, a 25 ^{o}C, com detecção em 238 nm.

No início de cada dia de testes ou a cada 9 corridas o capilar foi limpo com solução de NaOH em água a 0,01 M sob 20 psi de pressão por 6 minutos, com água por 6 minutos e com eletrólito por 10 minutos. Entre as corridas de um mesmo dia o capilar foi limpo com solução de NaOH em água a 0,01 M sob 20 psi de pressão por 2 minutos, com água por 2 minutos e com eletrólito por 6 minutos.

O método desenvolvido teve seu desempenho verificado mediante avaliação dos parâmetros analíticos relacionados à seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. Assim como no método por HPLC, os procedimentos utilizados para a avaliação do método por MEKC e os respectivos critérios de aceitação foram aqueles

recomendados pela ANVISA e descritos na RE 899 de 25 de maio de 2003 (Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos).

3.3.4 Ensaios de liberação química da 3-hidroxiflavona a partir do intermediário 3-OH-AM

Para obter os meios de liberação química, prepararam-se 4 soluções, sendo 3 tampões com valores de pH iguais a 5,0, 7,4, e 8,5, e uma solução de secreção gástrica simulada não enzimática. Essas foram escolhidas de forma a simular as diferentes condições fisiológicas às quais o fármaco pode estar exposto no organismo. Devido à baixa solubilidade da 3-hidroxiflavona em soluções aquosas, utilizaram-se meios contendo 5% de acetonitrila.

A solução de secreção gástrica simulada não-enzimática foi composta por KCl 75 mM e HCl 125 mM, em pH 1,2. O tampão em pH 5,0 foi preparado com 35 mM de ácido cítrico e 65 mM de citrato trissódico. O tampão em pH 7,4 foi preparado com NaH_2PO_4 4,3 mM e Na_2HPO_4 16,2 mM. Preparou-se o tampão em pH 8,5 com NaCl 50 mM, H_3BO_3 50 mM e $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 50 mM, sendo o pH ajustado com ácido bórico.

Realizaram-se os ensaios de liberação da 3-hidroxiflavona, utilizando-se duas técnicas analíticas diferentes, HPLC-UV e espectrofotometria UV em microplaca.

Nos ensaios de liberação monitorados por HPLC, prepararam-se soluções do composto 3-OH-AM, 4,5 µg/mL, no tampão com pH 7,4, colocou-se em banho-maria a 37 °C e coletaram-se alíquotas para injeção a cada 30 minutos. O método de quantificação foi adaptado para tais ensaios, excluindo-se do programa do gradiente da fase móvel o platô a 90% de acetonitrila, já que não se observaram picos nesta região, de forma a encurtar o tempo total de corrida e permitir análises mais rápidas. O gradiente foi aplicado da forma descrita na Tabela 4, em tempo total de 26 minutos.

Tabela 4: Gradiente da fase móvel do método adaptado para os ensaios de liberação química

Tempo (min)	A – Ácido trifluoracético 0,1%, %	B – Acetonitrila, %
0	60	40
6	60	40
18	30	70
22	60	40
26	60	40

Nos ensaios de liberação por UV em microplaca, prepararam-se soluções em triplicata não só do composto 3-OH-AM, mas, também, da concentração final esperada de 3-hidroxiflavona e de brancos, nos diferentes pH (com 5% de acetonitrila) e em diferentes concentrações (3-OH-AM a 25, 15 e 7,5 μg/mL e 3-hidroxiflavona a 16,7, 10,0 e 5,0 μg/mL). Obtiveram-se os espectros de absorbância no tempo zero e após 24 h e fez-se acompanhamento da liberação, monitorando-se a absorbância em 350 nm a cada 5 minutos, por 24 h.

A solução-estoque de 3-OH-AM foi adicionada aos poços da microplaca imediatamente antes de cada teste. Manteve-se a temperatura da microplaca em 37 °C e utilizou-se uma película plástica transparente ao UV para evitar a evaporação.

3.3.5 Síntese e caracterização do dendrímero PAMAM-G0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona

A obtenção do dendrímero de PAMAM-G0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona envolve diferentes etapas e produtos intermediários. A rota sintética utilizada para a obtenção desse dendrímero é apresentada na Figura 5.

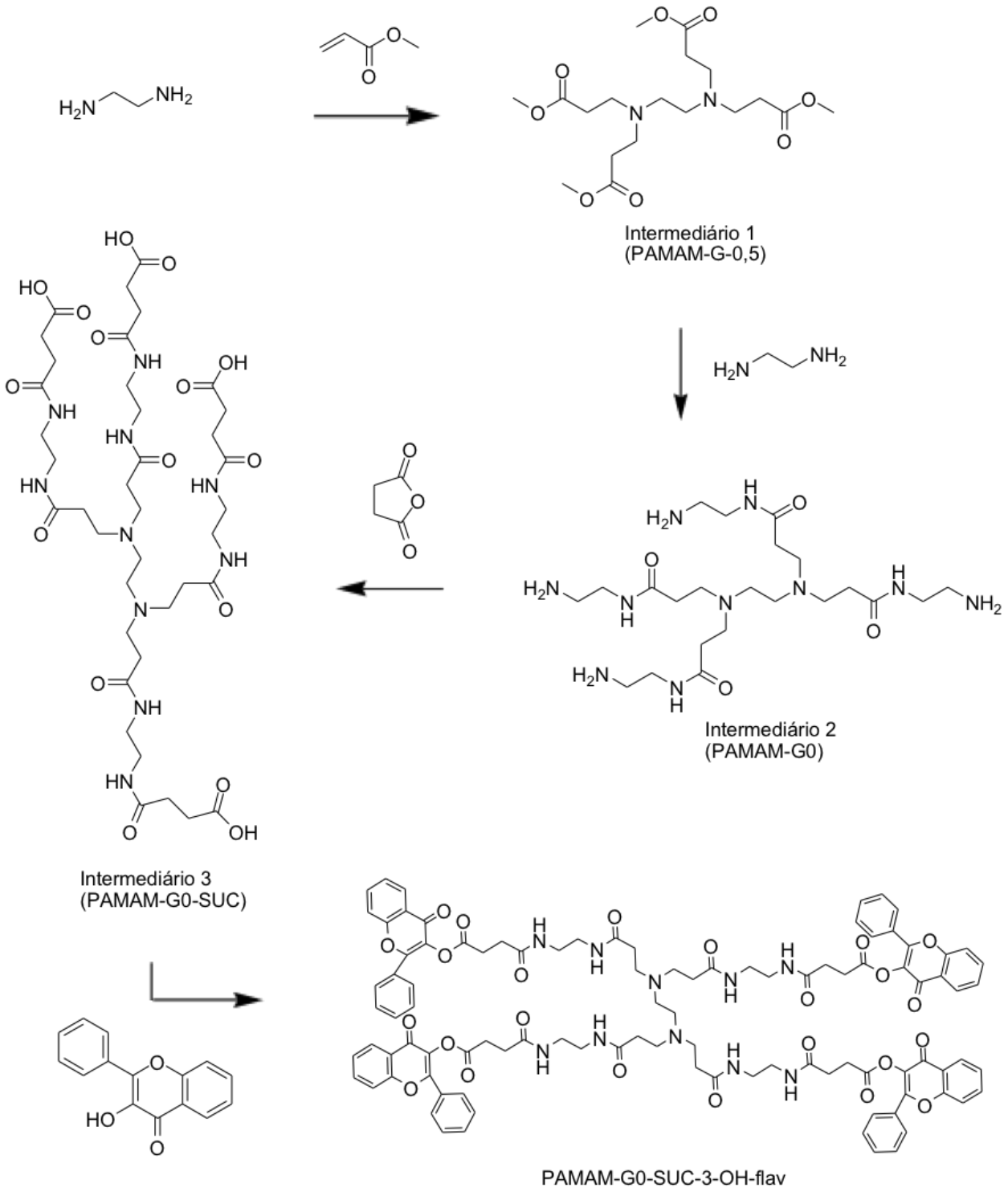


Figura 5: Esquema geral das diferentes etapas de síntese envolvidas na obtenção do dendrímero PAMAM-G0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona (PAMAM-G0-SUC-3-OH-flav).

Na primeira etapa de síntese, o PAMAM-G-0,5 (Intermediário 1) foi sintetizado conforme procedimento adaptado de Meltzer e colaboradores (1992a,b). Para isso, adicionou-se 0,3 mol de etilenodiamina (EDA) a 160 mL de metanol, previamente borbulhados com nitrogênio por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se, lentamente, 1,68 mol de acrilato de metila à solução de EDA, com o auxílio de uma cânula. A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 72 horas, ou até o consumo completo da EDA, o que foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se metanol/clorofórmio 2/8 como fase móvel e ninhidrina como revelador. O metanol e o excesso de acrilato de metila foram retirados em rota-evaporador a 40 ^{o}C.

O produto bruto da reação foi purificado por extração em fase sólida, adsorvendo-se o produto de interesse em 80 g de sílica-gel, efetuando-se a lavagem das impurezas com 500 mL de clorofórmio e eluindo-se o PAMAM-G-0,5 (intermediário 1) com 300 mL de metanol/clorofórmio 1/1. Após a evaporação do solvente, o intermediário 1 foi caracterizado por Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (H^1-RMN) e carbono (C^{13}-RMN) para a confirmação da identidade estrutural.

A síntese do intermediário 2 (PAMAM-G0) foi realizada dissolvendo-se 10 mmol do intermediário 1 em 10 mL de metanol e 1,2 mol de EDA em 40 mL do mesmo solvente. Ambas as soluções foram desoxigenadas, borbulhando-se argônio por 30 minutos, e a solução de intermediário 1 foi adicionada lentamente à solução de EDA, em banho de gelo seco e etanol a -30 ^{o}C, com o auxílio de uma cânula. A mistura reacional permaneceu sob agitação em geladeira com temperatura entre 4 e 6 ^{o}C, por 7 dias, e à temperatura ambiente, por mais 24 horas.

A reação foi monitorada por CCD com metanol/clorofórmio 2/8, para avaliar o consumo do intermediário 1 e por CCD com solução aquosa de hidróxido de amônio 10% (v/v)/metanol 1/9, para avaliar a formação do intermediário 2 (PAMAM-G0), em ambos os casos utilizando-se ninhidrina como revelador. O metanol e o excesso de EDA foram removidos em rota-evaporador com temperatura entre 35 e 40 ^{o}C, com o auxílio de 2 porções de mistura contendo 120 mL de tolueno e 10 mL de metanol mais 2 porções de 10 mL de metanol (procedimento adaptado de Meltzer e colaboradores, 1992(a) e Peterson e colaboradores, 2001). O intermediário 2 foi caracterizado por FT-IR, H^1-RMN, C^{13}-RMN e ESI^+-MS para a confirmação da identidade estrutural.

Para a obtenção do PAMAM-G0 succinoilado, denominado PAMAM-G0-SUC (intermediário 3), dissolveram-se 2 mmol de PAMAM-G0 (intermediário 2) e 12 mmol de anidrido succínico em 6 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 24 horas (SHI *et al*., 2006 b), e o solvente evaporado sob pressão reduzida a 60 ^{o}C por 72 horas. A reação foi monitorada por CCD em placa de sílica-gel com fase móvel constituída de hidróxido de amônio 10 % (v/v)/metanol 1/9, usando-se ninhidrina e verde de bromocresol como reveladores.

O produto bruto da síntese do intermediário 3 foi purificado por cromatografia preparativa em fase reversa, com detecção em 214 nm, utilizando-se 24 gramas de sílica C18 (octadecilsilano) como fase estacionária e gradiente de metanol (de 0 a 30%) em água. Por fim, o solvente aquoso foi removido com o auxílio de liofilizador e o produto da síntese e purificação do intermediário 3 foi caracterizado por FT-IR, H^1-RMN e C^{13}-RMN para a confirmação da identidade estrutural.

O dendrímero PAMAM-G0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona (PAMAM-G0-SUC-3-OH-flav) foi obtido dissolvendo-se 0,25 mmol de intermediário 3 e 2 mmol de EDC.HCl em 16 mL de DMSO e a solução foi agitada por 15 minutos. Em seguida, adicionaram-se 0,15 mmol de dimetilaminopiridina (DMAP), 2 mmol de 3-hidroxiflavona e 2 mmol de trietilamina – foi utilizado excesso de 100% de EDC.HCL e de 100% de 3-hidroxiflavona em relação à quantidade equivalente molar da reação. A mistura foi agitada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 17 dias. Durante esse período, a reação foi monitorada por CCD com hidróxido de amônio 10 % (v/v) em metanol/clorofórmio 1/9. Após o término desse período, adicionaram-se 32 mL de acetato de etila e a mistura foi extraída com 3 porções de 15 mL mais 3 porções de 10 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio 0,1 mol/L. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente removido com o auxílio de rota-evaporador.

O produto bruto da síntese do PAMAM-G0-SUC-3-OH-flav foi purificado por meio de recristalização a frio do excesso de 3-hidroxiflavona em 6 mL de acetonitrila por quatro dias, seguido de nova etapa de recristalização com mais 3 mL de acetonitrila. Em seguida, efetuou-se a separação da 3-hidroxiflavona remanescente por cromatografia preparativa, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol 100% como fase móvel. Por fim, o produto de interesse foi isolado por cromatografia preparativa em sílica-gel com gradiente de metanol (de 0 a 30%)

em clorofórmio e caracterizado por FT-IR, H^1-RMN e C^{13}-RMN para a confirmação da identidade estrutural.

3.3.6 Liberação química da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV

Avaliou-se a taxa de hidrólise do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em soluções contendo 10% de acetonitrila, em diferentes pH, sendo essas: secreção gástrica simulada não-enzimática pH 1,2, tampão citrato pH 5,0, tampão fosfato pH 7,4 e tampão borato pH 8,5.

A solução de secreção gástrica simulada não-enzimática foi composta por KCl 75 mM e HCl 125 mM, com pH igual a 1,2. O tampão em pH 5,0 foi preparado com 35 mM de ácido cítrico e 65 mM de citrato trissódico. O tampão em pH 7,4 foi preparado com NaH_2PO_4 4,3 mM e Na_2HPO_4 16,2 mM. Preparou-se o tampão em pH 8,5 com NaCl 50 mM, H_3BO_3 50 mM e $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 50 mM, sendo o pH ajustado com ácido bórico. Adicionalmente, preparou-se solução estoque de PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV a 0,44 mg/mL, em acetonitrila.

Em *vial* de 1,5 mL, adicionaram-se 0,9 mL de tampão, 0,1 mL de solução estoque de PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV e homogeneizou-se. As soluções foram mantidas no amostrador automático do HPLC-UV a 37 ^oC por 16 horas e efetuou-se uma injeção de cada amostra por hora.

Para a determinação do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV neste ensaio, o método de determinação da pureza cromatográfica do 3-OH-AM (item 3.3.1.4) foi adaptado, alterando-se a porção aquosa da fase móvel de ácida (0,1% ácido trifluoracético) para alcalina (0,1% trietilamina) e mantendo-se os demais parâmetros.

3.3.6 Ensaio de atividade do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em amastigota de *T. cruzi*

Esse ensaio foi realizado no LNBio, CNPEM, em Campinas, por Carolina Borsoi de Moraes, em células humanas de osteossarcoma ósseo, U2OS, infectadas por duas cepas de *T. cruzi*: uma sensível ao benznidazol, fármaco de referência, cepa Curitiba, e outra parcialmente resistente ao benznidazol, cepa Y(SS). O método seguido é o descrito em Moraes et al. (2014). Determinaram-se: EC50, concentração do composto que causa redução de 50% na infecção,

comparativamente à referência e é medida de potência; CC50, que consiste na concentração do composto que causa redução de 50% no número de células, e é medida de citotoxicidade; Atividade máxima, que corresponde à inibição máxima da infecção, em comparação aos controles e é medida de eficácia contra o parasito; SI, índice de seletividade, calculado pela divisão de CC50 por EC50.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS INTERMEDIÁRIOS DO DENDRÍMERO DE 3-HIDROXIFLAVONA BASEADO EM INOSITOL COMO NÚCLEO

Os compostos de interesse no presente estudo estão envolvidos em estratégia de obtenção de dendrímero com potencial atividade antichagásica e leishmanicida. A 3-hidroxiflavona é esterificada com ácido málico protegido (AMP) para a obtenção do 3-OH-AMP e este é hidrolisado para a formação do 3-OH-AM, que, por sua vez, deve ser usado como ramo da estrutura do dendrímero proposto. Essa sequência de reações foi realizada por pesquisadores do LAPEN (GIAROLLA *et al.,* 2010) e é mostrada na Figura 6.

A

B

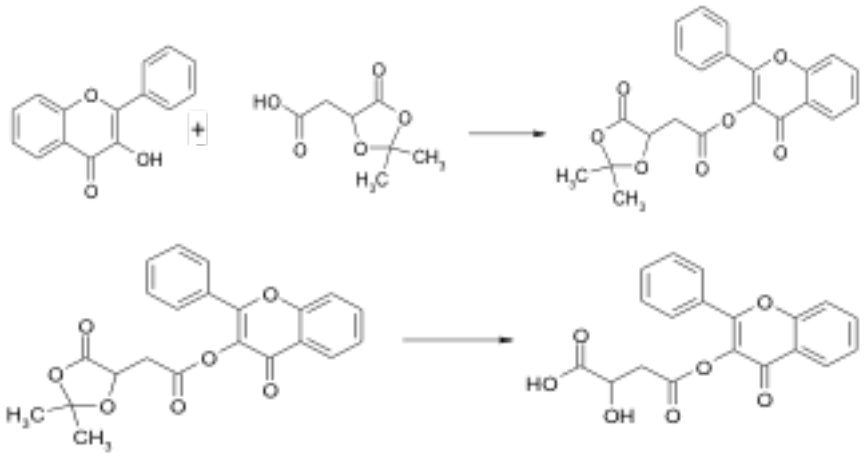


Figura 6: Reações de obtenção do 3-OH-AMP (A) e 3-OH-AM (B).

O emprego da técnica de UV-Vis no estudo da estabilidade de compostos químicos é um desafio analítico, uma vez que a absorção no UV está relacionada à presença de grupos cromóforos, que podem ser preservados nos produtos de degradação, prejudicando a seletividade na análise de mistura de compostos estruturalmente semelhantes. Entretanto, quando se observa a presença de comprimento de onda em que apenas o composto de interesse absorve, pode-se obter a seletividade desejada.

A seleção dos comprimentos de onda mais adequados para o acompanhamento da estabilidade dos compostos em estudo foi realizada pela comparação dos espectros de absorção no UV-Vis de cada analito em cada um dos solventes.

A Tabela 5 apresenta os comprimentos de onda de máxima e mínima absorção dos diferentes analitos, bem como aqueles selecionados para o monitoramento da estabilidade das soluções analíticas.

Tabela 5: Comprimentos de onda selecionados para o monitoramento de cada analito

Analito	**Solvente**	**Comprimentos de onda, nm**		
		Máximos	**Mínimos**	**Selecionados**
3-hidroxiflavona	Metanol	214,0, 238,5, 305,0, 343,5 e 409,0	221,5, 273,0, 317,0 e 387,0	238,5 e 343,5
	Acetonitrila	227,4, 237,4, 242,0, 304,4 e 340,0	221,8, 239,8, 272,0 e 316,2	227,5 e 340,0
3-OH-AMP	Metanol	216,0, 247,0 e 293,0	230,0 e 264,0	247,0, 293,0 e 343,5
	Acetonitrila	246,0, 288,5 e 306,5	229,5 e 264,0	246,0, 288,5 e 340,0
3-OH-AM	Metanol	245,0 e 298,0	227,0 e 266,0	245,0, 298,0 e 343,5
	Acetonitrila	245,0 e 292,0	229,0 e 264,5	245,0, 292,0 e 340,0

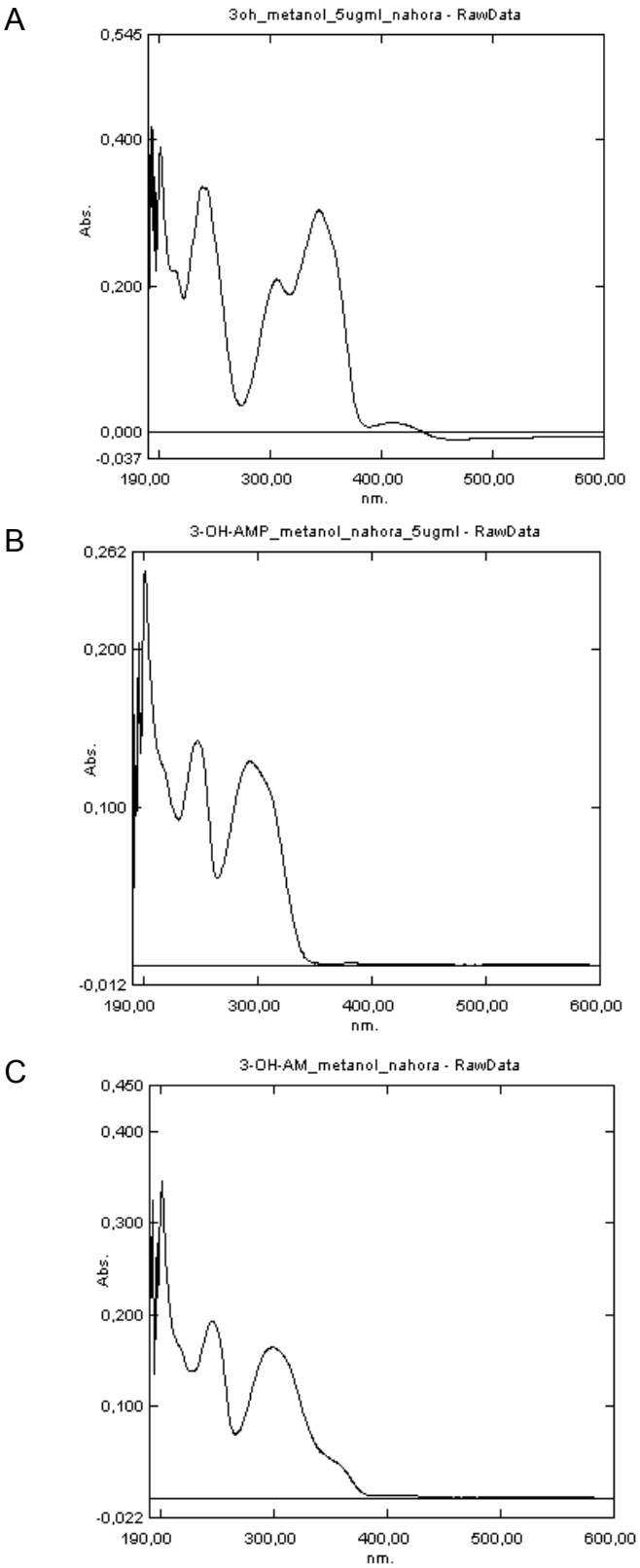


Figura 7: Espectros no ultravioleta (em metanol) dos compostos: 3-hidroxiflavona (A), 3-OH-AMP (B) e 3-OH-AM (C).

As estruturas químicas dos compostos de interesse possuem grupos cromóforos semelhantes e, portanto, é de se esperar que seu espectro de absorção no UV tenha aspecto similar, o que foi, de fato, observado (Tabela 5 e Figura 7). As diferenças nos espectros desses compostos podem ser atribuídas às novas ligações interatômicas formadas, que modificam a facilidade com que os elétrons presentes no orbital molecular se excitam, deslocando as bandas de absorção para comprimentos de onda maiores ou menores (efeitos de conjugação batocrômico e hipsocrômico, respectivamente – PAVIA *et al*., 2009).

A comparação dos espectros da 3-hidroxiflavona, 3-OH-AMP e 3-OH-AM, em metanol, (Figura 7) mostra que a modificação da estrutura da 3-hidroxiflavona leva ao deslocamento do maior comprimento de onda de máxima absorção para valores menores (409,0, 293,0 e 292,0 nm – Tabela 5), ou seja, é observado efeito hipsocrômico.

A Figura 8 apresenta os resultados de absorbância das soluções de 3-hidroxiflavona em metanol e em acetonitrila, ao longo do tempo.

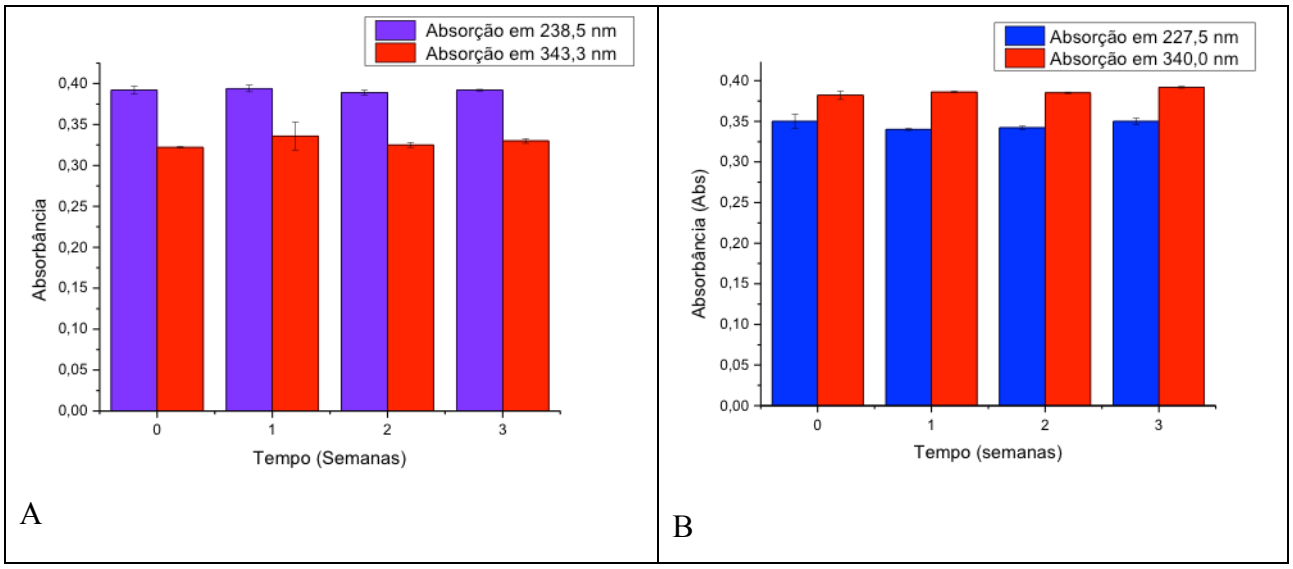


Figura 8: Absorbância média das soluções de 3-hidroxiflavona em metanol (A) e em acetonitrila (B), ao longo do tempo.

Para ambos os comprimentos de onda e solventes analisados, a análise estatística ANOVA reporta que não há diferença significativa entre as médias dos dados de cada semana. Considerando-se que essas medidas foram representativas da concentração de 3-hidroxiflavona (e com base na ausência de modificação de seu espectro ao longo do período de armazenamento),

estima-se que esse analito foi estável nas condições utilizadas e que, portanto, tanto o metanol quanto a acetonitrila são solventes apropriados para seu preparo e armazenamento.

A Figura 9 apresenta os resultados do estudo de estabilidade da solução de 3-OH-AMP em metanol e acetonitrila.

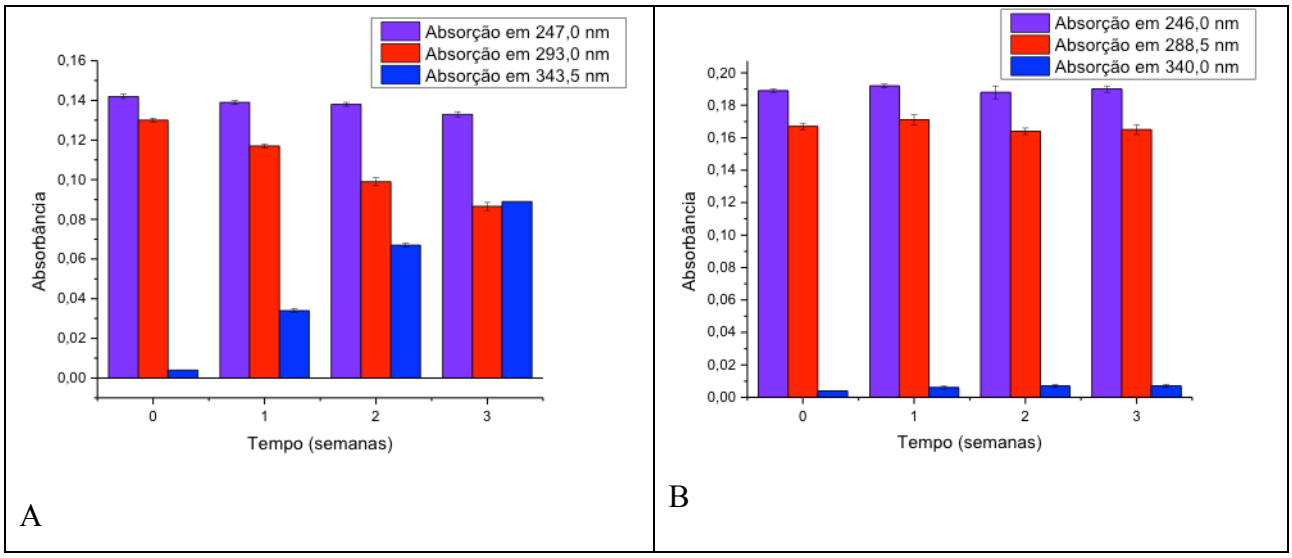


Figura 9: Resultados do estudo de estabilidade da solução de 3-OH-AMP em metanol (A) e acetonitrila (B).

O resultado do ANOVA para as médias das medidas da solução de 3-OH-AMP em metanol em 247 nm indica que não há diferença significativa entre as mesmas. Já nas médias nos demais comprimentos de onda, a diferença foi significativa.

Na Figura 9 A, é possível observar o declínio dos valores de absorbância em 293 nm e o aumento em 343,5 nm, indicando a degradação por hidrólise do 3-OH-AMP com formação de 3-hidroxiflavona. Por essa razão, a solução de 3-OH-AMP em metanol não se mostrou adequada para a utilização como solução estoque em estudos posteriores.

No estudo do 3-OH-AMP em acetonitrila (Figura 8 B), ainda que haja variação significativa das médias da medida em 288,5 nm, não é possível observar a degradação, pois não há variação significativa em 340 nm, comprimento de onda em que seria observada a formação de 3-hidroxiflavona. Portanto, essa solução seria mais adequada para utilização como solução estoque em relação àquela em metanol.

A Figura 10 apresenta os resultados do estudo de estabilidade da solução de 3-OH-AM em metanol e acetonitrila.

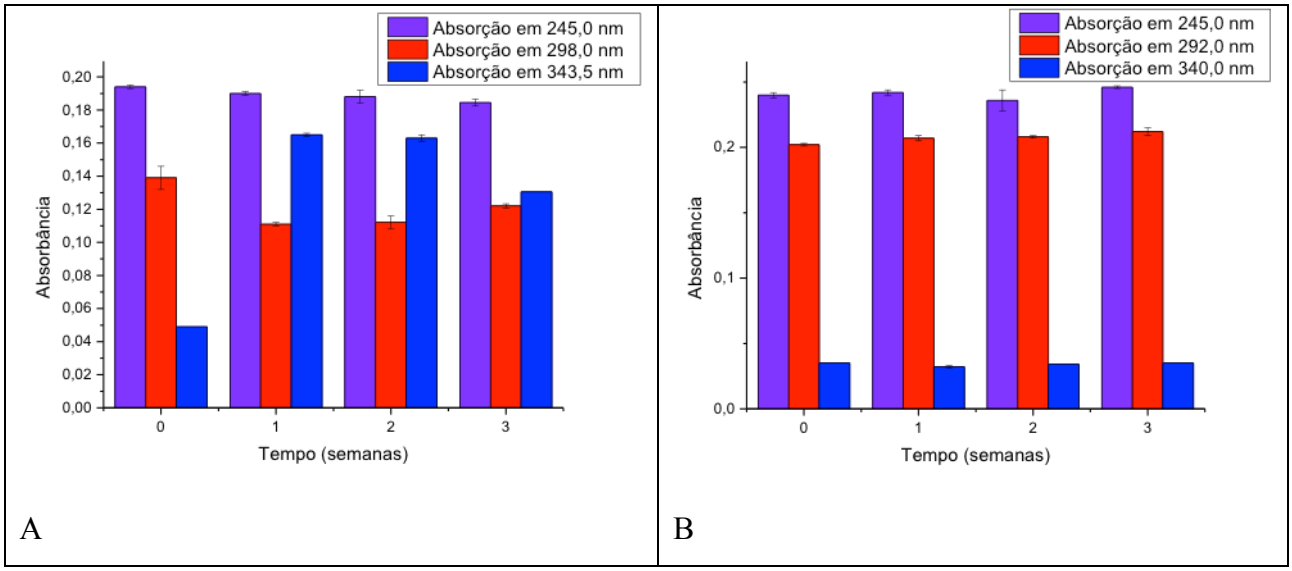


Figura 10: Resultados do estudo de estabilidade da solução de 3-OH-AM em metanol (A) e acetonitrila (B).

De maneira similar ao observado para o 3-OH-AMP em metanol, o 3-OH-AM também sofreu degradação, que foi observada pela mudança significativa dos valores de absorbância nos três comprimentos de onda, sobretudo, pelo aumento da absorção em 343,5 nm (Figura 10 A). Provavelmente, ocorreu a hidrólise da ligação éster, pois o metanol é um solvente polar prótico, condição que favorece esta reação de degradação. Não se deve descartar, também, a auto-hidrólise pelo ácido carboxílico do 3-OH-AM.

Ainda que haja diferença significativa entre as médias das absorbâncias da solução de 3-OH-AM, em acetonitrila, ao longo das semanas (Figura 10 B), indicada pela ANOVA, não há indícios de que tenha ocorrido degradação expressiva neste caso, uma vez que não se observou acréscimo significativo da absorção em 340 nm, típico da formação de 3-hidroxiflavona. Os resultados da ANOVA devem ser observados com cautela, uma vez que, provavelmente, esses estão relacionados ao elevado desvio padrão das medidas, o que impede a comparação das médias (a variância das médias deve ser comparável para que as mesmas também o sejam). Assim, no caso do 3-OH-AM, a solução estoque em acetonitrila se mostra interessante para aplicação na rotina de análises por HPLC.

De maneira geral, as soluções dos analitos em acetonitrila foram mais apropriadas para uso como soluções estoque do que aquelas em metanol.

O estudo inicial da estabilidade do 3-OH-AM em soluções aquosas (a 20 μg/mL) foi realizado utilizando-se misturas de acetonitrila e soluções ácidas ou básicas, na proporção 40:60.

Os dados de estabilidade foram obtidos pela leitura no comprimento de onda que permite maior especificidade para a 3-hidroxiflavona (produto de degradação), 340 nm, e normalizaram-se os valores de absorbância pela absorbância inicial. Adicionalmente, utilizaram-se os dados obtidos nos primeiros minutos dos testes, em que se verifica correlação linear e a inclinação da reta representa a velocidade de formação da 3-hidroxiflavona, nas condições aplicadas. Esses resultados estão apresentados na Tabela 6 e Figura 11.

Tabela 6: Equações de velocidade de formação da 3-hidroxiflavona em soluções com diferentes pH

Solução	**Equação da curva de formação de 3-hidroxiflavona**	**pH da porção aquosa (60 % v/v)**
1- Ácido clorídrico 1 mol/L	$y = -4{,}38.10^{-5}.x + 1{,}0037$	0,33
2- Ácido trifluoracético 0,1% v/v	$y = 3{,}55.10^{-4}.x + 1{,}00216$	2,18
3- Água desionizada	$y = 0{,}005\,.x + 1{,}00217$	Cerca de 5,5
4- Bicarbonato de sódio 0,1 mol/L	$y = 0{,}060.x + 1{,}00597$	8,35
5- Hidróxido de sódio 0,1% m/v	$y = 1{,}14.x + 0{,}76371$	12,55

Sendo: y = absorbância normalizada, x = tempo em minutos.

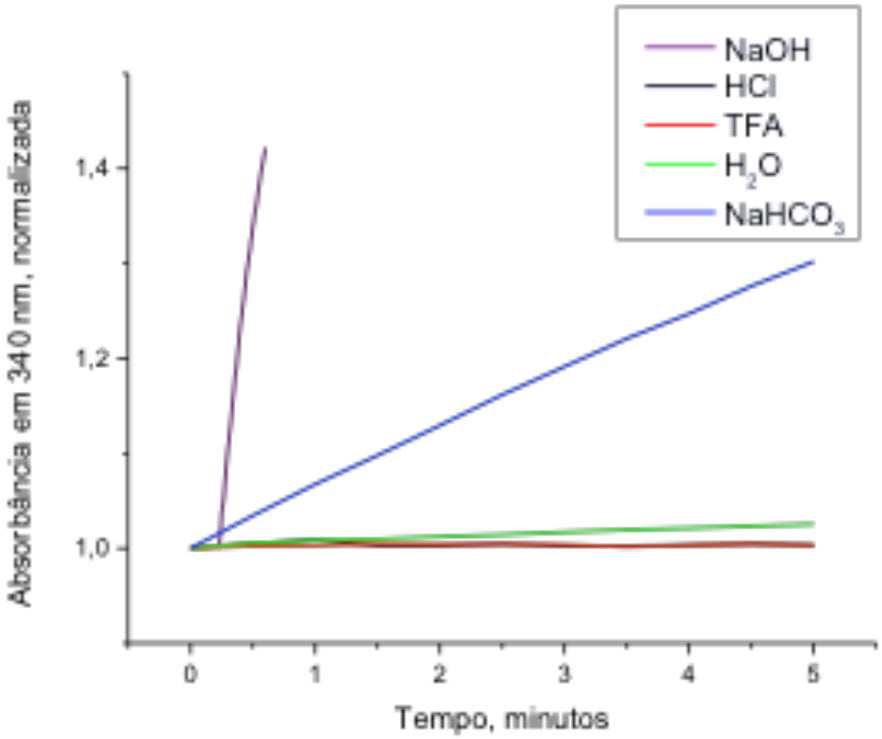


Figura 11: Curvas de formação de 3-hidroxiflavona devido à hidrólise do 3-OH-AM em soluções com diferentes valores de pH.

Na Tabela 6 e Figura 11, observam-se diferenças significativas na velocidade inicial de degradação do 3-OH-AM nas diferentes condições de pH (diferentes inclinações). Nas soluções com os ácidos clorídrico e trifluoracético, a velocidade de formação de 3-hidroxiflavona foi muito lenta e não foi possível afirmar que a mesma ocorre apenas com base nesses dados (curvas em preto e vermelho, sobrepostas – Figura 11). Nesses dois casos, as inclinações são baixas e o erro experimental da medida pode ter sido mais relevante que a variação oriunda da formação de 3-hidroxiflavona. Por essa razão, não foi possível comparar as velocidades desses dois casos. No entanto, sabe-se que a degradação em meio ácido ocorre lentamente, pois, em análises por HPLC, observou-se a formação de 3-hidroxiflavona em soluções de 3-OH-AM em ácido trifluoracético armazenadas por alguns dias.

Na amostra preparada com água desionizada, a formação da 3-hidroxiflavona é mais rápida do que em meio ácido, porém mais lenta do que em meio básico (Figura 11).

Coletaram-se os espectros de UV das soluções no início e no final dos testes de estabilidade, com o intuito de confirmar a conversão de 3-OH-AM em 3-hidroxiflavona. Os

espectros obtidos após o teste foram, em geral, semelhantes ao espectro da 3-hidroxiflavona em acetonitrila, com exceção da solução de hidróxido de sódio. Para compreender se se tratava de modificação do espectro relativa ao meio, ou se novas espécies químicas haviam sido formadas, coletou-se um espectro no UV de uma solução do padrão de 3-hidroxiflavona no mesmo solvente (60% hidróxido de sódio 0,1% m/v e 40% acetonitrila). Esse espectro foi semelhante ao obtido ao final da degradação, levando à conclusão de que a modificação do espectro é resultado da modificação do meio e que a degradação do 3-OH-AM em meio básico, assim como nos demais valores de pH, ocorre por hidrólise com a formação de 3-hidroxiflavona.

Estes ensaios permitiram concluir que o composto 3-OH-AM sofre degradação nas diferentes soluções avaliadas. Essa degradação se dá em diferentes velocidades, sendo que na presença de ácido ela é mais lenta.

4.2 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA 3-HIDROXIFLAVONA POR HPLC-UV

4.2.1 Otimização dos parâmetros cromatográficos

Durante o desenvolvimento do método de quantificação da 3-hidroxiflavona por HPLC-UV utilizaram-se como referência quatro métodos de separação e quantificação de flavonoides presentes na literatura (FABRE *et al.,* 2001; PHAM *et al.,* 2007; RAK, FODOR e ABRANKÓ, 2010; WANG, HUANG, 2004). O método proposto por Pham e colaboradores (2007) se mostrou interessante por empregar detecção no UV, disponível na Central Analítica do Departamento de Farmácia. Os métodos propostos por Rak, Fodor e Abrankó (2010) e por Fabre e colaboradores (2001) são focados na detecção por espectrometria de massas, mas, ainda assim, forneceram informações interessantes acerca da composição da fase móvel e das proporções do gradiente.

Avaliaram-se os ácidos trifluoracético, fórmico e fosfórico a 0,1% v/v na composição da porção aquosa da fase móvel, conforme empregados nos trabalhos de referência. O uso desses ácidos levou a diferentes oscilações nas linhas de base dos cromatogramas, em resposta à variação da proporção dos solventes durante o gradiente. A amplitude dessa oscilação foi menor quando empregado o ácido trifluoracético, como apresentado na Tabela 7. Assim, esse foi o promotor da acidez da fase móvel mais adequado para o método analítico em desenvolvimento.

Tabela 7: Desvio da linha de base em cromatogramas obtidos com o uso de diferentes ácidos na fase móvel

Ácido	pH	Desvio da linha base, mV
Trifluoracético	2,17	5
Fórmico	2,88	35
Fosfórico	2,35	10

O emprego de diferentes concentrações de ácido trifluoracético foi avaliado na busca por menores oscilações na linha base e menores fatores de cauda dos picos de interesse. Os resultados desses testes estão apresentados na Tabela 8, mostrando que o uso de 0,15% do ácido levou a fatores de cauda um pouco menores, porém, também provocou maior desvio na linha base. Considerando-se que o pH da porção aquosa da fase móvel, com 0,1% desse ácido (pH=2,17), já está próximo ao limite mínimo recomendado pelo fabricante da coluna cromatográfica utilizada (pH=2,00), optou-se pelo uso de 0,1% ao invés de 0,15% de ácido trifluoracético.

É importante observar que nestes experimentos empregaram-se amostras de solução dos analitos em acetonitrila, o que pode levar a picos menos simétricos do que com o uso de amostra em mistura de solventes semelhante à utilizada no início do gradiente de fase móvel. A modificação da solução amostra de apenas acetonitrila para mistura com 60% de solução ácida e 40% de acetonitrila se mostrou mais apropriada, já que a resolução, o fator de cauda e a largura do pico foram melhorados.

Tabela 8: Desvio da linha base, resolução e fator de cauda para cada composto de interesse com diferentes concentrações de ácido trifluoracético

Concentração de ácido, % v/v	Desvio da linha base, mV	3-hidroxiflavona		3-OH-AM	
		Resolução, min	Fator de Cauda	Resolução, min	Fator de Cauda
0,15	7,5	7,455	2,034	10,603	1,311
0,10	5,0	7,184	2,255	10,550	1,328
0,05	2,5	6,587	2,749	10,169	1,356

Outro parâmetro instrumental avaliado buscando-se linha base mais adequada foi o tamanho da câmara de mistura de solvente do gradiente. Com a câmara de mistura de 2,6 mL, a linha base sofre um decréscimo gradual entre 15 e 22 minutos. Já com a câmara de 0,5 mL, foi possível observar o decréscimo mais rápido, entre 15 e 20 minutos. Essas variações são coerentes com a composição da fase móvel em cada tempo e mostram resposta mais rápida à modificação

do gradiente com o uso da câmara menor, conforme esperado. O emprego da câmara de mistura de 2,6 mL se mostrou mais interessante por levar a uma menor oscilação na linha de base.

Nos testes iniciais utilizou-se detecção em 238 nm, comprimento de onda de máxima absorção do espectro UV da 3-hidroxiflavona. No entanto, sabendo-se que o desvio da linha base se deve à presença do ácido trifluoracético, decidiu-se avaliar outros comprimentos de onda para a detecção, de forma a obter resposta apropriada dos compostos de interesse e minimizar a influência da composição da fase móvel na linha base. Para isso, efetuou-se determinação do espectro UV da solução de ácido trifluoracético e observou-se que em 254 nm a absorbância desta solução é bastante reduzida.

Uma vez que os compostos 3-OH-AM e 3-hidroxiflavona apresentam absorção relevante em 254 nm (Figura 7), que este comprimento de onda é adequado para a detecção de possíveis impurezas e leva a uma linha base mais estável, a detecção em 254 nm passou a ser empregada no presente estudo.

Como etapa final no desenvolvimento do método de quantificação da 3-hidroxiflavona por HPLC avaliou-se o desempenho desse método observando-se os parâmetros de linearidade, precisão, recuperação e os limites de detecção e quantificação nas condições ótimas encontradas.

a) Linearidade

A linearidade foi verificada a partir de duas curvas de calibração, obtidas em dias diferentes, cada uma com duplicata de injeção nas seguintes concentrações de 3-hidroxiflavona: 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µg/mL. A linearidade foi observada a partir do cálculo do coeficiente de correlação linear (R^2). A Tabela 9 e Figura 12 apresentam os dados obtidos. Ambas as curvas apresentam coeficiente de linearidade de 0,999, que é superior ao proposto pela RE 899 (0,99) e demonstra a linearidade da resposta do método na faixa de concentrações avaliada.

Tabela 9: Curvas analíticas para a 3-hidroxiflavona

Curva	Equação da Reta	Coeficiente de Correlação
A	$y = 8{,}2.10^4x - 1{,}2.10^5$	$R^2 = 0{,}999$
B	$y = 8{,}5.10^4x - 2{,}0.10^4$	$R^2 = 0{,}999$

Sendo y a resposta em área e x a concentração em µg/mL

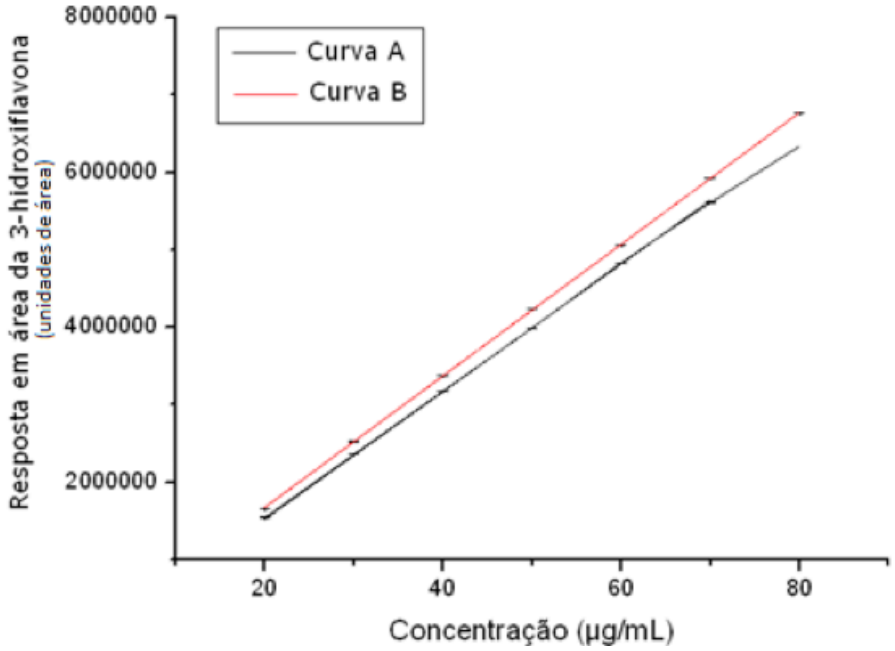


Figura 12: Curvas analíticas da 3-hidroxiflavona por HPLC-UV

b) Precisão

Para avaliar a precisão intra-dia, prepararam-se soluções de 3-hidroxiflavona a 20, 50 e 80 µg/mL e cada uma delas foi injetada em triplicata. Para observar, também, a precisão intermediária (inter-dia) preparou-se uma nova solução estoque de padrão e efetuou-se mais uma série de diluições e injeções em dias diferentes. Para cada corrida, a concentração de 3-hidroxiflavona foi calculada utilizando-se a curva mais recente à data do teste e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Desvio padrão relativo das análises intra- e inter-dia, de quantificação da 3-hidroxiflavona por HPLC

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada – dia 1 (µg/mL)	Precisão intra-dia, % (n=3)	Precisão inter-dia, % (n=6)
20	20,40	0,03	1,54
50	50,16	0,04	0,12
80	80,95	0,04	0,62

Observa-se na Tabela 10 que os desvios padrão relativos das análises intra-dia foram menores que 0,05 % e que em dias diferentes, os mesmos foram sempre menores do que 2%, o

que está em acordo com os critérios de aceitação propostos pela ANVISA na RE 899 (≤ 2% intra-dia e ≤ 5% inter-dia). Vale lembrar que o desvio padrão relativo referente às análises de um mesmo dia reflete os erros intrínsecos ao equipamento, como nas etapas de injeção da amostra e integração do pico, e corresponde à repetibilidade do método. Já o desvio padrão de análises em dias diferentes reflete os erros do procedimento analítico como um todo e corresponde à precisão intermediária do método.

Existe uma diferença entre as curvas de calibração produzidas em dias diferentes, que pode ser observada pelas diferentes equações mostradas na Tabela 9 e na Figura 12. Tal fato aponta para a necessidade de confecção de curvas de calibração diárias, indicando que existe variabilidade inerente de dia para dia, o que precisa ser contornado. A confecção de curvas de calibração diárias auxilia na correção dessa variabilidade, que pode ser explicada, por exemplo, pela diferença de temperatura entre dias diferentes, uma vez que o equipamento utilizado nos experimentos não apresenta forno de coluna, ou por variações inerentes aos procedimentos de pesagem, diluição e injeção dos padrões.

c) Recuperação

A partir dos dados obtidos na análise de precisão, foi possível calcular, também, a recuperação, ou seja, a relação em porcentagem entre o valor esperado e o valor obtido de concentração. A recuperação obtida em concentrações alta, média e baixa é indicativa da exatidão do método.

Os valores de exatidão obtidos para as concentrações de 20, 50 e 80 µg/mL nas duas séries de análises estão organizados na Tabela 11.

Tabela 11: Recuperação do método na quantificação da 3-hidroxiflavona por HPLC

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada – dia 1 (µg/mL)	Recuperação – dia 1 (%)	Concentração calculada – dia 2 (µg/mL)	Recuperação – dia 2 (%)
20	20,40	102,0	19,84	99,2
50	50,16	100,3	50,04	100,1
80	80,95	101,2	80,03	100,0

A norma RE 899 não determina valores de aceitação para a exatidão em ensaios analíticos de natureza não biológica, citando apenas que os valores devem ser próximos de 100%. Neste trabalho, valores de recuperação entre 98 e 102% foram considerados aceitáveis, conforme

proposto por Ermer e Miller (2005). Assim, os dados apresentados na Tabela 11 mostram que o método desenvolvido forneceu valores apropriados de recuperação nos diferentes níveis de concentração avaliados.

d) Limites de Detecção e Quantificação

Para a determinação dos limites de detecção e quantificação, realizou-se um ensaio preliminar, no qual se avaliou a menor concentração de 3-hidroxiflavona capaz de gerar uma resposta visualmente identificável. Concentrações progressivamente menores foram injetadas e mesmo a concentração de 1 ng/mL foi capaz de gerar um pico, ainda que este não fosse identificado pelos parâmetros de integração empregados no método.

Elaboraram-se curvas de calibração em baixas concentrações, usando-se três concentrações diferentes 10, 15 e 20 ng/mL e em triplicata (Tabela 12). A partir dessas, foi possível observar os valores de inclinação média (24,1), intercepto médio (-118,5) e desvio padrão do intercepto (62,8) necessários para o cálculo dos limites de detecção e quantificação (item 3.3.2.2).

Tabela 12: Curvas analíticas em baixas concentrações. Sendo y a resposta em área e x a concentração em ng/mL

Curva	Equação da Reta	Coeficiente de correlação linear
1	$y = 19{,}9x - 65{,}5$	$R^2 = 0{,}880$
2	$y = 29{,}8x - 188$	$R^2 = 0{,}916$
3	$y = 22{,}6x - 102{,}6$	$R^2 = 0{,}920$

Os limites de detecção e quantificação foram estimados em 7,8 ng/mL e 26,1 ng/mL, respectivamente. O limite de quantificação encontrado foi cerca de mil vezes menor do que a faixa de trabalho selecionada. O desvio padrão relativo no limite de quantificação (26 ng/mL) foi de 3,3% e a recuperação, de 112%. Esses valores são maiores que aqueles obtidos em concentrações mais altas, no entanto, foram considerados aceitáveis.

Em conclusão, o método desenvolvido apresentou desempenho analítico satisfatório em relação à separação e quantificação da 3-hidroxiflavona.

4.3 DETERMINAÇÃO DA PUREZA CROMATOGRÁFICA DE 3-HIDROXIFLAVONA, 3-OH-AMP E 3-OH-AM

A adaptação do método desenvolvido para a determinação da pureza cromatográfica dos compostos de interesse foi realizada a fim de oferecer suporte à síntese e purificação do dendrímero baseado em inositol como núcleo, através da verificação da pureza de materiais de partida, do tempo necessário para as reações, do rendimento de processos de purificação e até mesmo da identidade das principais impurezas presentes (por comparação dos tempos de retenção).

Sabe-se que para a melhor exatidão na estimativa da pureza de materiais usando-se o método de normalização das áreas dos picos, devem-se conhecer os fatores de correção das respostas das diferentes impurezas em relação ao composto principal, fator esse que está relacionado às diferentes intensidades das respostas do analito e das impurezas no comprimento de onda da análise. Neste trabalho, não foi possível o cálculo dos fatores de correção da resposta devido à indisponibilidade dos produtos 3-OH-AMP e 3-OH-AM com alta pureza (pelo menos padrões secundários) para a realização dos ensaios de determinação destes.

Durante o desenvolvimento do método, certificou-se de que todos os compostos, possíveis de serem detectados, eluíssem com resolução adequada (R>1,25) e reprodutibilidade dos tempos de retenção. Ademais, efetuaram-se injeções periódicas do solvente da amostra, branco, para monitorar a linha de base do cromatogramas e evitar picos fantasma. A Tabela 13 mostra o tempo de retenção, resolução e largura do pico do composto principal, obtido na análise dos dois produtos de síntese e da 3-hidroxiflavona. Estes resultados demonstram a boa adequabilidade e o desempenho satisfatório das condições analíticas alcançadas.

Tabela 13: Parâmetros de avaliação dos picos calculados para o método de pureza cromatográfica

Composto	Tempo de retenção, min. ± DPR, %	Resolução* ± DPR, %	Largura do pico, min ± DPR, %
3-hidroxiflavona	17,7; 0,4	**	0,3; 0,2
3-OH-AMP	19,1; 0,3	5; 3	0,2; 0,8
3-OH-AM	7; 2	2; 3	0,3; 2

Legenda: DPR = desvio padrão relativo *A resolução foi calculada de acordo com a Equação 2, proposta pela USP (*United States Pharmacopeia*). **Equação 2:** $R = 2x\frac{t_r - t_{rp}}{W + W_p}$, sendo R a resolução de um dado pico, t_r o tempo de retenção, W a largura desse pico, e t_{rp} e W_p o tempo de retenção e a largura do pico anterior. **No caso da 3-hidroxiflavona, como as amostras tinham 100% de pureza, não havia pico anterior ao composto de interesse para ser utilizado no cálculo da resolução.

Existe baixa variação no tempo de retenção dos compostos, o que é favorável ao método, evitando que haja confusão entre os picos dos compostos de interesse e possíveis impurezas. Além disso, a resolução dos picos foi elevada, sempre maior do que 2, o que é muito interessante e especialmente importante no caso do composto 3-OH-AMP, que tem tempo de retenção próximo a outro composto de interesse, a 3-hidroxiflavona. A Figura 13 mostra um cromatograma típico de avaliação da pureza cromatográfica de uma amostra de 3-OH-AM. Neste caso, a pureza cromatográfica do composto era de 89%, sendo as principais impurezas a 3-hidroxiflavona (6%) e o 3-OH-AMP (4%).

Apesar de terem sido obtidos picos adequadamente resolvidos (R≥2,0), da ausência de assimetria dos picos e de não terem sido observadas evidências de co-eluição, a avaliação da seletividade do método de pureza cromatográfica desenvolvido depende da confirmação da pureza dos picos do composto principal e das principais impurezas.

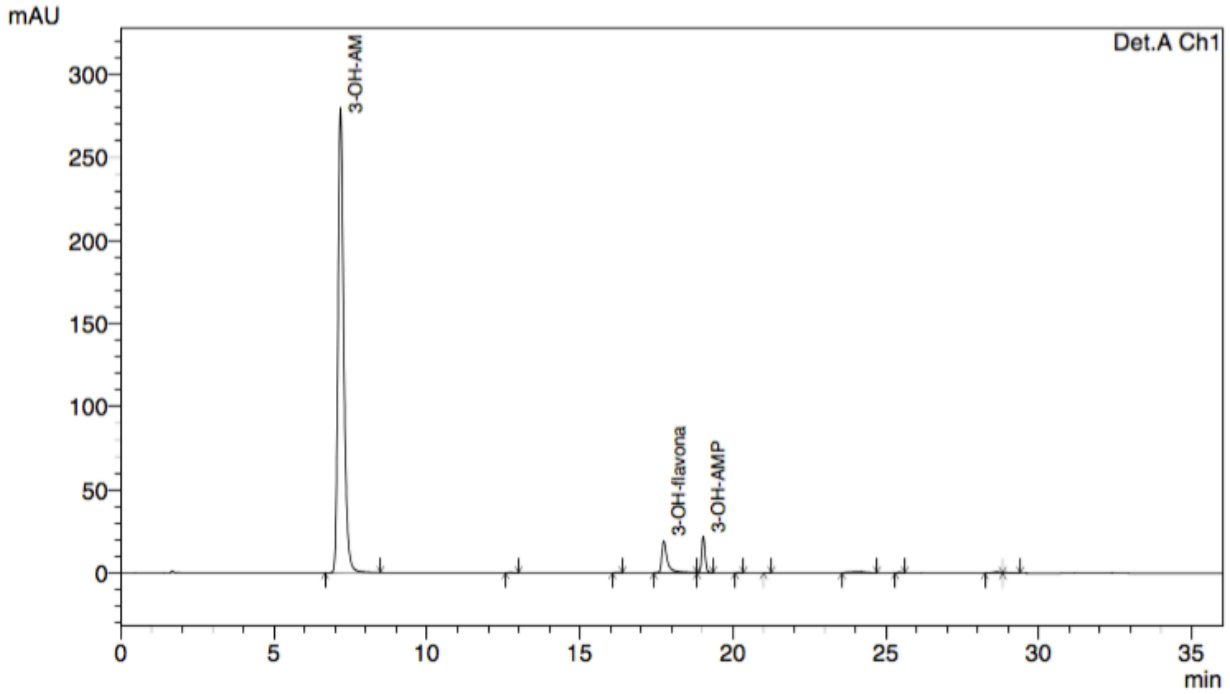


Figura 13: Cromatograma típico do teste de pureza cromatográfica do 3-OH-AM, com absorbância em mAu e tempo em minutos. Os picos correspondentes aos compostos conhecidos estão de acordo com as siglas dos compostos dos quais derivam.

Estimaram-se as purezas de diversas amostras resultantes de diferentes estratégias de síntese do dendrímero de 3-hidroxiflavona baseado em inositol como núcleo, como os intermediários 3-OH-AMP e 3-OH-AM. O produto da reação de esterificação da 3-hidroxiflavona com ácido L(-)-málico protegido (3-OH-AMP, Figura 4 C) foi, geralmente, obtido com pureza cromatográfica entre 95,8 e 97,9%, sendo as principais impurezas presentes a 3-hidroxiflavona e o 3-OH-AM. Já o 3-OH-AM, produto da desproteção dos grupos hidroxila e ácido carboxílico do 3-OH-AMP (Figura 4 B), foi obtido com pureza entre 68,0 e 94,1% nos procedimentos de síntese avaliados, sendo as principais impurezas presentes a 3-hidroxiflavona e o 3-OH-AMP.

Essa ferramenta de análise foi utilizada na seleção das melhores condições de síntese e extração, sobretudo para o 3-OH-AM, que foi obtido com pureza variável nos diferentes procedimentos. Acompanharam-se, também, algumas tentativas de ligação do 3-OH-AM com o foco central etilenoglicol, nas quais se observou a formação de 3-hidroxiflavona com o tempo. Neste caso, o acompanhamento por HPLC permitiu observar o tempo necessário para o consumo completo do material de partida, além da formação de grande quantidade de subprodutos.

Nos procedimentos de rotina, o 3-OH-AMP é separado dos demais subprodutos de sua síntese por cromatografia líquida preparativa com detecção no UV, em coluna de sílica (com partículas de 50 μm de diâmetro médio), com hexano e acetato de etila como fase móvel em gradiente de concentração, utilizando-se cromatógrafo automatizado. No entanto, no caso do 3-OH-AM observou-se que ocorre a degradação desse composto ao longo da coluna, provavelmente por hidrólise da ligação éster, com liberação de 3-hidroxiflavona e ácido málico.

Testaram-se duas estratégias de purificação do 3-OH-AM por recristalização, precipitação a frio e adição de solvente no qual o composto de interesse é insolúvel para induzir a precipitação seletiva do 3-OH-AM. Em ambos os casos, buscou-se manter a 3-hidroxiflavona dissolvida e precipitar o 3-OH-AM. Os resultados desses ensaios e um resumo de cada procedimento avaliado estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Condições experimentais e resultados dos testes de recristalização do 3-OH-AM

Recristalização	**Mistura de solventes**	**Separação do precipitado**	**Incremento da pureza cromatográfica, %**
Por precipitação a frio	Ciclo-hexano:éter etílico 1:1	Centrifugação e lavagem com ciclo-hexano 1:1	1,7
		Centrifugação e lavagem com ciclo-hexano:éter etílico 2:1, em três etapas	1,6
Por precipitação seletiva	Ciclo-hexano:éter etílico 2:1	Centrifugação e lavagem com ciclo-hexano	2,6
		Centrifugação e lavagem com ciclo-hexano:éter etílico 4:1	1,7

Em todos os testes de recristalização utilizaram-se combinações de ciclo-hexano e éter etílico como solvente por estes serem apróticos, na tentativa de minimizar a degradação do 3-OH-AM.

Nos ensaios de purificação por precipitação a frio obtiveram-se incrementos na pureza cromatográfica do 3-OH-AM de 94,4 para 96,0% e esse incremento não foi aumentado com o uso de solvente mais apolar (portanto, com maior afinidade pela 3-hidroxiflavona) na lavagem do sólido coletado. Essa técnica fornece produtos com maior tamanho de partícula que a adição de solvente no qual o composto de interesse é insolúvel, o que é coerente com uma precipitação mais lenta, a qual permite maior crescimento dos cristais.

No teste em que se utilizou a técnica de precipitação seletiva com lavagem do precipitado com ciclo-hexano a frio, obteve-se o maior incremento na pureza, 2,6%, tendo-se obtido 3-OH-AM com 97,0% de pureza cromatográfica. Esta foi a melhor condição experimental para a purificação desse composto por recristalização, entre as avaliadas.

O grau de pureza alcançado na purificação do 3-OH-AM, 97,0%, é adequado para ampla caracterização espectrométrica da identidade do mesmo, entre outras. No entanto, a falta de estabilidade química desse composto dificulta a determinação exata e precisa do seu teor em porcentagem massa/massa, bem como a preservação desse teor durante o armazenamento.

A dificuldade de purificação e a baixa estabilidade do composto 3-OH-AM apresentam forte relação com a dificuldade de obtenção do dendrímero de primeira geração. Nas tentativas de ligação a focos centrais realizadas, observou-se a liberação da 3-hidroxiflavona no meio reacional, reduzindo em muito o rendimento e dando origem a grande quantidade de subprodutos. Diante desse fato, propôs-se, a busca por novas estratégias de síntese do dendrímero.

4.4 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA 3-HIDROXIFLAVONA POR ELETROFORESE CAPILAR

4.4.1 Determinação da 3-hidroxiflavona por CZE

O desenvolvimento de método de quantificação de 3-hidroxiflavona por eletroforese capilar realizado neste estudo teve como finalidade fornecer alternativa analítica para os testes de estabilidade química e enzimática dos dendrímeros derivados desse composto. Além disso,

pretendeu-se ter familiaridade com esta técnica analítica a fim de facilitar o bom desempenho em futuras análises dos dendrímeros.

A literatura apresenta variedade de métodos, com diferentes estratégias para a separação e detecção de flavonoides por eletroforese capilar. Neste trabalho, a estratégia proposta por Wang e Huang, em 2004, que emprega tampão tetraborato de sódio, 35 mM, como eletrólito, foi adaptada para a realização dos experimentos iniciais.

O pH do eletrólito é um dos parâmetros analíticos mais importantes em análises por eletroforese capilar, já que este determina a carga dos analitos durante sua migração eletroforética.

A 3-hidroxiflavona, com pKa estimado em 9,3, deve se apresentar na forma aniônica em eletrólito suficientemente alcalino, para que sua migração eletroforética seja diferenciada de outros compostos neutros, na sua determinação por CZE. No eletrólito selecionado, a 3-hidroxiflavona negativamente carregada será arrastada pelo fluxo eletrosmótico em direção ao cátodo (CZE na direção normal).

Avaliaram-se eletrólitos baseados em tampão tetraborato de sódio com valores de pH entre 8,5 e 10,5, a fim de selecionar o pH mais adequado para a quantificação da 3-hidroxiflavona por CZE. Os resultados desses testes estão apresentados na Figura 14.

Observa-se que o uso de eletrólito com pH = 10,0 foi a condição que forneceu resposta e simetria do pico mais adequadas.

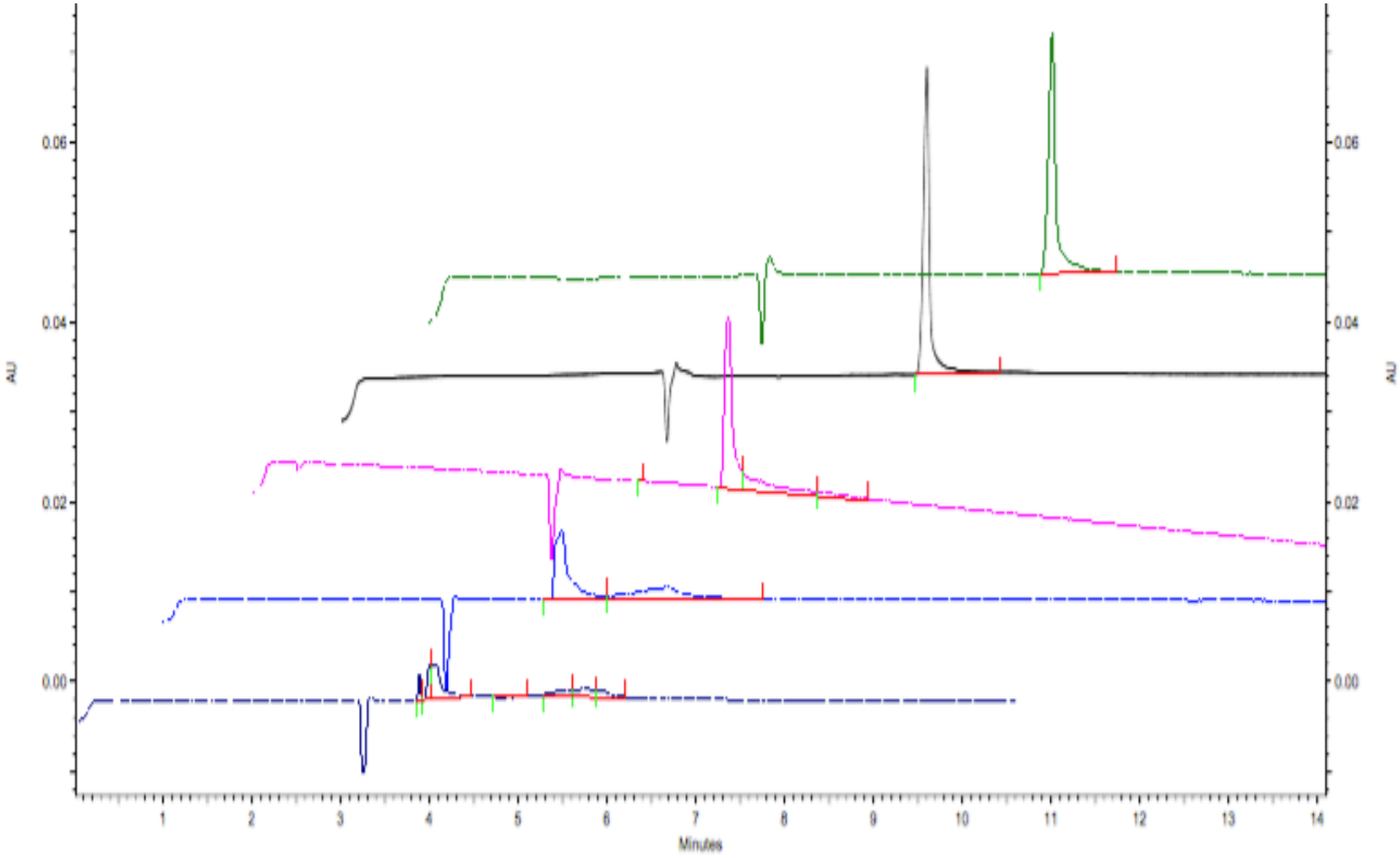


Figura 14: Eletroferogramas da 3-hidroxiflavona em eletrólitos com diferentes valores de pH, empregando-se o modo CZE. Os traços em azul escuro, azul claro, rosa, preto e verde referem-se aos pH 8,5, 9,0, 9,5,10,0 e 10,5, respectivamente.

No entanto, durante a realização desses testes observaram-se várias quedas de corrente, provavelmente devido à precipitação do analito no capilar, o que pode ser justificado pela baixa solubilidade desse em água e pelo uso de solvente orgânico (acetonitrila 50% v/v) na amostra, mas não no eletrólito. Ademais, observou-se baixa reprodutibilidade do tempo de migração em corridas consecutivas, o que indica a ocorrência de adsorção do analito ao capilar. Com isso, optou-se por avaliar um modo de separação por CE mais apropriado para analitos pouco solúveis, utilizando-se SDS (dodecilsulfato de sódio) e etanol no eletrólito, empregando-se MEKC.

4.4.2 Determinação da 3-hidroxiflavona por MEKC

A separação em MEKC baseia-se na partição diferenciada do analito entre as micelas e o solvente. Essa técnica pode ser empregada com solutos carregados ou neutros e pode incluir micelas fixas ou móveis. MEKC tem grande utilidade na separação de misturas que contenham espécies iônicas e neutras e tornou-se de grande valor para a separação de fármacos muito hidrofóbicos, em relação aos seus metabólitos polares (SEKHON, 2011).

No presente estudo, o uso de tampão bórax 15 mM, pH 10,0, contendo SDS a 30 mM e 10% v/v de etanol, proposto por Yu Zhang e colaboradores (2007) para a separação e quantificação de flavonoides, foi utilizado como método de partida em sequência de testes, visando ao aprimoramento desse método para a quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC.

Nos testes para avaliação do pH do eletrólito (entre 9,5 e 10,5) e da tensão aplicada (20, 25 ou 30 KV), utilizou-se capilar de sílica com 40 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno, mantido a 25 ^{o}C, com detecção no UV, em 238 nm e injeção de 60 μg/mL de 3-hidroxiflavona, em solvente contendo 90% v/v de eletrólito e 10% v/v de etanol. Os resultados desses testes (Tabela 15) mostram que o ajuste do pH do eletrólito para 10,0 e a aplicação de 20 KV de tensão durante a corrida foram as condições mais interessantes, levando à maior resposta (área) em menor tempo de análise e à maior relação sinal ruído, na busca pela maior frequência analítica e o menor limite de quantificação possíveis.

Tabela 15: Avaliação do pH do eletrólito e da tensão aplicada na quantificação de 3-hidroxiflavona por MEKC

pH do eletrólito	**Área, UA - DPR, %**	**Tempo de migração, min – DPR, %**	**Razão sinal ruído**	**Largura do pico, min**	**Desvio da linha base, UA**
9,5	169584 - 2	16,2 - 1	113	0,92	0,0007
10,0	147029 - 1	14,4 - 2	551,5	0,55	0,002
10,5	134044 - 2	13,6 - 2	492,2	0,54	0,001
Tensão, KV					
20	147029 - 1	14,4 - 2	551,5	0,55	0,002
25	132052 - 1	12,5 - 1	51,5	0,64	0,0002
30	101889 ± 1	9,9 - 1	33,2	0,52	0,0001

Sendo: UA = unidade de área e DPR = desvio padrão relativo.

Avaliaram-se as quantidades de dodecilsulfato de sódio (SDS) e de bórax no eletrólito, empregando-se planejamento fatorial com 2 fatores (concentrações de SDS e bórax) em três níveis (SDS a 20, 30 e 40 mM e bórax a 5, 15 e 20 mM). Os resultados desses experimentos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Avaliação da composição do eletrólito na quantificação de 3-hidroxiflavona por MEKC

[SDS]:[bórax]	**Área, UA - DPR, %**	**Tempo de migração, min – DPR, %**	**Razão sinal ruído**	**Largura do pico, min**	**Desvio da linha base, UA**
20:5	106684 – 1	8,3 – 0,8	744	0,62	0,0007
20:15	150153 - 0,5	12,2 – 2	235	0,52	0,0007
20:20	213129 – 2	15,0 – 1	252	0,75	0,0005
30:5	100339 – 0,4	9,7 – 0,8	257	0,56	0,0004
30:15	147029 – 1	14,4 – 2	552	0,55	0,002
30:20	171823 – 0,8	18,9 – 2	318	0,77	0,0003
40:20	225426 – 3	24,9 - 2	458	1,00	0,0008

Sendo: UA = unidade de área e DPR = desvio padrão relativo.

Os dados da Tabela 16 mostram que o uso de eletrólitos mais fortes (com concentrações maiores de SDS e bórax) leva a acréscimos no tempo de migração, o que pode ser explicado pelo aumento da viscosidade do eletrólito, o que dificulta o fluxo eletrosmótico, e, ainda, leva a picos com áreas maiores. Esse último resultado pode parecer estranho, uma vez que foram injetadas amostras com a mesma concentração de analito. Provavelmente, a solvatação do analito por quantidades maiores de SDS justifica os acréscimos na área dos picos. Tal relação inversa entre tempo de migração e área dificulta a obtenção de um método rápido e com limite de quantificação baixo, como desejado. Portanto, em busca da maior área, no menor tempo de migração, com a maior relação sinal-ruído e menor oscilação do eletroferograma, em termos de largura do pico e linha de base, optou-se pelo emprego de 30 mM de SDS e 15 mM de bórax como a composição mais adequada para o eletrólito na quantificação da 3-hidroxiflavona.

Visando a aumentar a frequência analítica do método, reduziu-se o comprimento efetivo do capilar de 40 para 20 cm, com consequente redução do tempo de migração do analito (de 14,5 para 8 minutos) e do tempo de limpeza entre as corridas.

Com o capilar menor, foi necessário o ajuste da tensão aplicada para 11 KV (com corrente desenvolvida durante a separação de cerca de 62 μA), para não prejudicar a simetria do pico.

Em todos os testes descritos até o momento, utilizou-se injeção hidrodinâmica, mantendo-se 0,5 psi de pressão por 5 segundos. Visando a aumentar a área do pico e minimizar o limite de quantificação, avaliaram-se injeções por maior tempo ou usando pressão maior (0,5 psi por 8 segundos e 1 psi por 5 segundos). No entanto, com esse aumento no volume de injeção, obtiveram-se eletroferogramas com picos duplos ou assimétricos, mostrando que a injeção a 0,5 psi por 5 segundos é mais adequada para o método em desenvolvimento.

Utilizaram-se diferentes procedimentos de limpeza do capilar, a fim de se selecionar o uso ou não de NaOH 0,01 M entre as corridas e o tempo de limpeza com cada solução (NaOH 0,01 M, água e eletrólito). O emprego da sequência: NaOH 0,01 M a 20 psi por 2 minutos, água a 20 psi por 2 minutos e eletrólito a 20 psi por 6 minutos foi a condição que proporcionou menores oscilações na linha base e no tempo de migração do analito, entre as avaliadas, em seis corridas consecutivas.

Uma vez definidas as condições experimentais, o desempenho do método de quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC foi avaliado, observando-se sua seletividade, linearidade, precisão, recuperação e os limites de detecção e quantificação.

A seletividade do método foi avaliada utilizando-se ferramenta do *software* (do detector DAD), que realiza o cálculo do índice de similaridade (SI) dos espectros, coletados entre 190 e 400 nm ao longo de todo o pico do analito. O índice de similaridade pode variar de 0 a 1, sendo que um SI igual a 1 se refere a picos completamente puros (relativos a um único composto) e valores de SI iguais ou menores que 0,9 são característicos de picos impuros. No método desenvolvido para a quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC obtiveram-se picos do analito com SI de 0,97, em média, o que demonstra a eficiência desse método na separação da 3-hidroxiflavona e sua seletividade.

O método apresentou resposta linear em concentrações do analito de 1 a 80 μg/mL, R^2=0,997, com intervalo de quantificação mais adequado entre 5 e 80 μg/mL. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,7 e 5 μg/mL (precisão, n=6, igual a 4% e recuperação igual a 99%), respectivamente.

As equações de duas curvas analíticas, em seis níveis de concentração, estão apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17: Equações das curvas analíticas da 3-hidroxiflavona por MEKC

Curva	Equação
A	$y = 5234{,}6x - 8327{,}9$
B	$y = 5389{,}4x - 9361{,}3$

Sendo y a resposta em área e x a concentração

A precisão do método foi avaliada em dois níveis (intra-dia e inter-dia) e em três concentrações (alta, média e baixa), com injeções em sextuplicata. Os desvios padrão relativos encontrados estão mostrados na Tabela 18. Observa-se que esses foram menores ou iguais a 3% entre corridas de um mesmo dia e menores ou iguais a 5% entre corridas de dias diferentes.

Tabela 18: Desvio padrão relativo das análises intra- e inter-dia de quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC

Concentração teórica, μg/mL	Concentração calculada – dia 1, μg/mL	Precisão intra-dia, % (n=6)	Precisão inter-dia, % (n=12)
23,4	22,2	2	5
58,5	59,7	2	3
81,9	83,8	3	5

A Tabela 19 apresenta os dados de recuperação do analito em três níveis de concentração, em dois dias diferentes. Nota-se que as porcentagens de recuperação encontradas, entre 86 e 102%, excederam os limites almejados, de 98 a 102%. Diante disso, avaliou-se o uso de 8-hidroxiquinolina como padrão interno, a fim de compensar as oscilações na resposta do analito.

Tabela 19: Resultados de recuperação na quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC

Concentração teórica (µg/mL)	Recuperação – dia 1 (%)	Recuperação – dia 2 (%)
20	95	86
50	102	95
80	102	92

O método de quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC com 8-hidroxiquinolina como padrão interno mostrou linearidade (R^2=0,997 de 1 a 80 µg/mL), intervalo linear (entre 5 e 80 µg/mL) e limites de detecção e quantificação (0,6 e 5 µg/mL, respectivamente) semelhantes àqueles obtidos sem o uso do padrão interno. Já os resultados dos testes de precisão intra-dia e de recuperação, apresentados na Tabela 20, mostraram que apesar do ganho em recuperação (de, no mínimo, 86% para, no mínimo, 95%) a precisão intra-dia foi prejudicada com o uso do padrão interno.

Tabela 20: Precisão e recuperação na quantificação da 3-hidroxiflavona por MEKC com 8-hidroxiquinolina como padrão interno

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada – dia 1 (µg/mL)	Recuperação – dia 1 (%)	Precisão intra-dia, % (n=6)
20	20,5	102	1
50	49,8	100	6
70	71,2	102	5

4.5 COMPARAÇÃO DOS METODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA 3-HIDROXIFLAVONA POR MEKC E HPLC

Técnicas analíticas como cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia de fluido supercrítico (SFC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC) e eletroforese capilar (CE) têm sido reportadas para a separação e determinação de flavonoides. Dentre estas, HPLC é a técnica mais amplamente empregada em análises quali e quantitativas devido à sua boa reprodutibilidade e sensibilidade. A eletroforese capilar permite que a análise seja feita em períodos curtos de tempo, com alta eficiência na separação e baixo consumo de amostra e tampões. No entanto, os métodos por CE apresentam altos limites de detecção, especialmente, em detecções espectrofotométricas em linha, *on-column*, devido ao caminho óptico reduzido (TIAN, QIN, 2009).

Neste trabalho desenvolveram-se métodos para a determinação da 3-hidroxiflavona por HPLC e por CE, ambas as técnicas com detecção no ultravioleta. Os métodos desenvolvidos por HPLC e CE apresentaram resposta linear no intervalo de 1 a 80 μg/mL, com coeficientes de correlação linear maiores que 0,99.

A avaliação da precisão e da recuperação dos métodos em três níveis de concentração (20, 50 e 80 μg/mL) mostrou que a técnica de HPLC fornece resultados mais precisos e exatos, já que o desvio padrão máximo dos resultados inter-dia por HPLC (1,54%) foi menor que aquele por CE (5%) e os valores de recuperação do analito por HPLC (entre 99,2 e 102,0%) foram mais próximos de 100% do que aqueles obtidos por CE (entre 86 e 102%).

O método por HPLC apresentou limites de detecção e quantificação da ordem de ng/mL, os quais foram cerca de mil vezes menores que aqueles por CE (da ordem de μg/mL). Esse resultado era esperado, uma vez que, o caminho óptico por HPLC (1 mm) é maior que o do CE (75 μm).

Comparando-se a frequência analítica dos métodos desenvolvidos, o tempo total de corrida por HPLC foi de 26 minutos, o que é ligeiramente maior que os 23 minutos necessários para a análise do flavonoide por CE.

No mais, a análise por CE apresenta menor custo, por necessitar de quantidades reduzidas de tampões e solventes orgânicos.

Por fim, conclui-se que o método por HPLC foi mais sensível, preciso e exato na quantificação da 3-hidroxiflavona, enquanto que o método por CE foi ligeiramente mais rápido e menos custoso.

4.6 LIBERAÇÃO QUÍMICA DA 3-HIDROXIFLAVONA A PARTIR DO INTERMEDIÁRIO 3-OH-AM

Os ensaios de liberação da 3-hidroxiflavona a partir do 3-OH-AM foram realizados por espectrofotometria no UV, em microplaca, porque essa técnica permite uma maior frequência de leituras, controle da temperatura, agitação das soluções durante o teste e a adição do analito no meio imediatamente antes do início das leitura. Para a realização do ensaio de liberação por HPLC ou EC com frequência analítica equivalente, a exposição do analito aos diferentes meios deveria ser feita em banho maria e as amostras armazenadas até o momento da injeção o que leva a um maior erro analítico.

Inicialmente obtiveram-se os espectros no UV das soluções dos analitos e do branco no tempo zero, a fim de se verificar comprimento de onda adequado para o monitoramento da formação da 3-hidroxiflavona. Os espectros do 3-OH-AM (em duplicata), da 3-hidroxiflavona e do branco em suco gástrico simulado, podem ser observados na Figura 15.

Observa-se que apesar de o comprimento de onda de 350 nm ter sido considerado seletivo para a 3-hidroxiflavona, as soluções de 3-OH-AM apresentaram pequena absorção neste comprimento de onda. Isso se deu porque a amostra de 3-OH-AM utilizada no ensaio continha cerca de 5% de 3-hidroxiflavona.

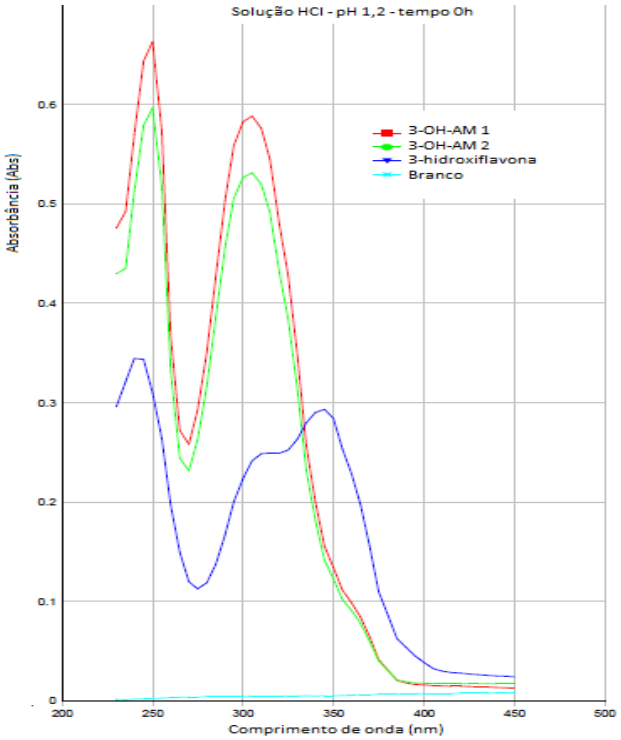


Figura 15: Espectros no UV do 3-OH-AM em duplicata (em verde e em vermelho), da 3-hidroxiflavona (em azul escuro) e do branco (em azul claro) em suco gástrico simulado.

A liberação da 3-hidroxiflavona em tampão bórax pH 8,5, fosfato pH 7,4, citrato pH 5,0 e solução de secreção gástrica simulada não-enzimática (com 5% de acetonitrila) pode ser observada nas Figuras de 16 a 19, respectivamente.

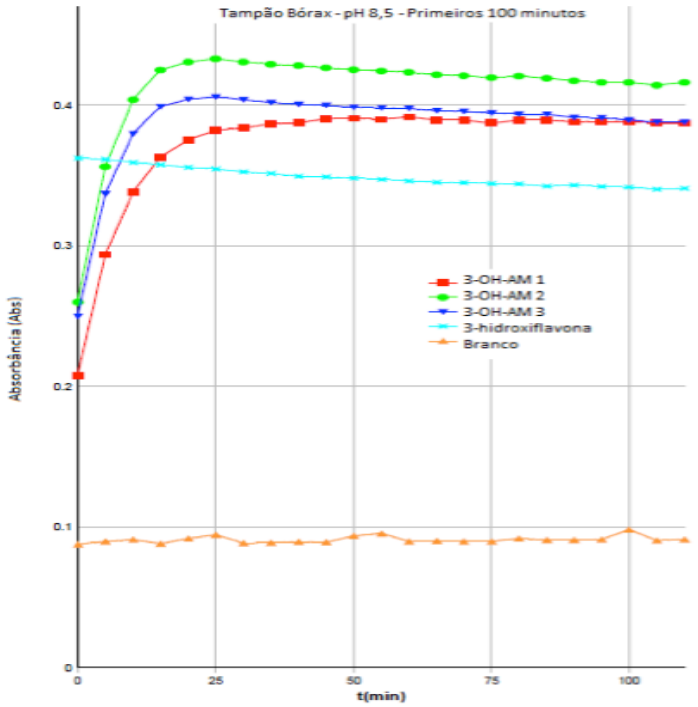


Figura 16: Liberação da 3-hidroxiflavona em tampão bórax pH 8,5 nos primeiros 100 minutos. As soluções de 3-OH-AM, em triplicata, são apresentadas em verde, azul escuro e vermelho, a 3-hidroxiflavona em ciano e o branco, em laranja.

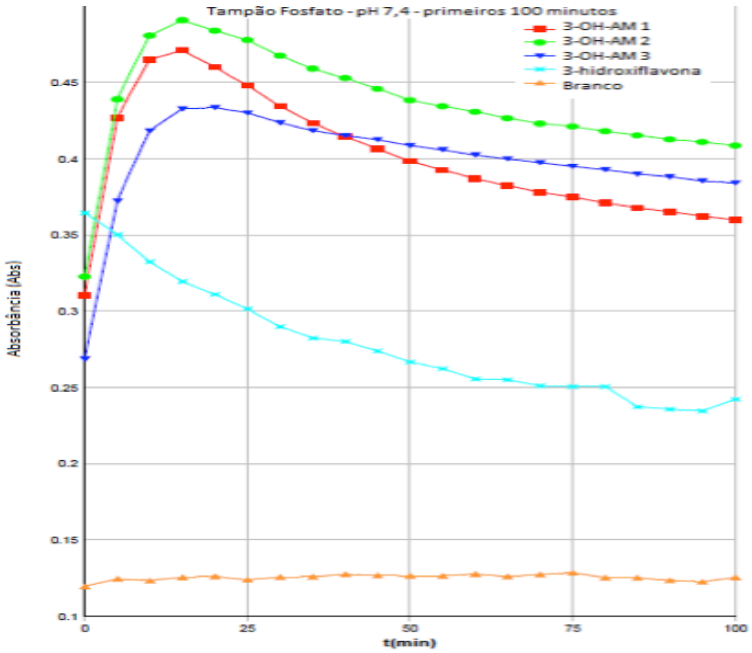


Figura 17: Liberação da 3-hidroxiflavona em tampão fosfato pH 7,4 nos primeiros 100 minutos. As soluções de 3-OH-AM, em triplicata, são apresentadas em verde, azul escuro e vermelho, a 3-hidroxiflavona em ciano e o branco, em laranja.

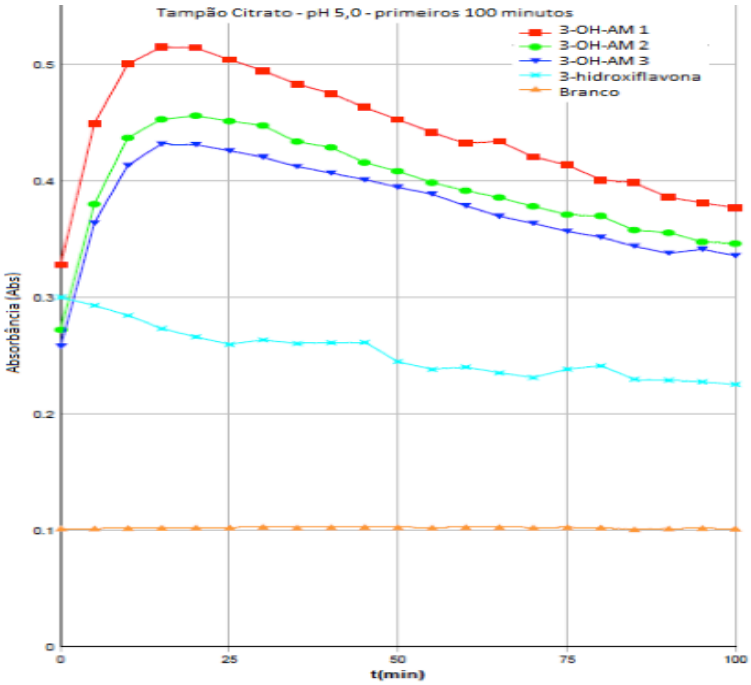


Figura 18: Liberação da 3-hidroxiflavona em tampão pH 5,0, nos primeiros 100 minutos. As soluções de 3-OH-AM, em triplicata, são apresentadas em verde, azul escuro e vermelho, a 3-hidroxiflavona em ciano e o branco, em laranja.

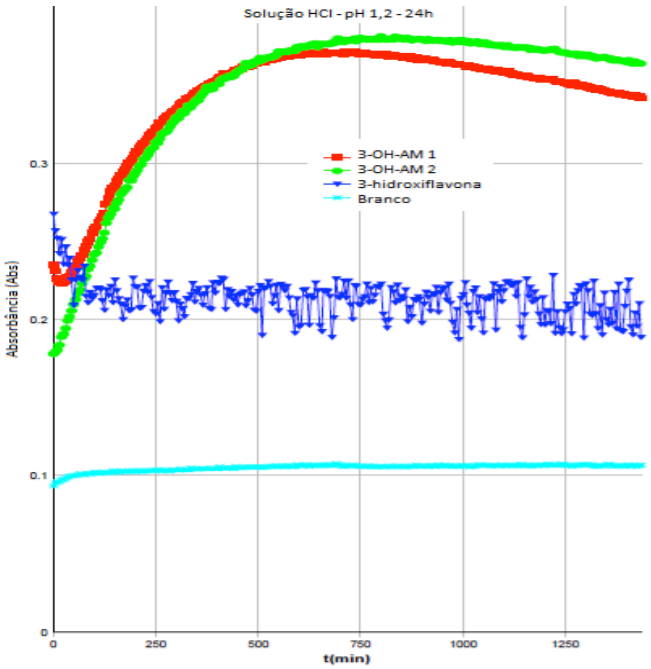


Figura 19: Liberação da 3-hidroxiflavona em solução de secreção gástrica simulada não-enzimática (HCl pH 1,2), por 24 h. As soluções de 3-OH-AM, em duplicata, são apresentadas em verde e vermelho, a 3-hidroxiflavona em azul escuro e o branco, em ciano.

Observou-se a liberação completa da 3-hidroxiflavona após cerca de 20 minutos nos pH 8,5, 7,4 e 5,0 (Figuras 16, 17 e 18, respectivamente). Na solução com pH 1,2 (Figura 19), a liberação foi mais lenta, sendo que ao final de 24 h, cerca de 70% da 3-hidroxiflavona havia sido liberada. No entanto, enquanto se esperava que a absorbância permanecesse constante após a completa liberação, ocorreu diminuição da absorbância com o tempo, causada pela precipitação da 3-hidroxiflavona formada.

Nas condições nas quais se verificou a completa liberação da 3-hidroxiflavona, o espectro no UV das soluções avaliadas por 24 horas coincide com o espectro deste composto, o que gera evidência de que o aumento da absorbância em 350 nm corresponde à formação de 3-hidroxiflavona e não de outros produtos. Já no meio com pH 1,2 observou-se que o espectro da solução após 24 horas não coincide com o da 3-hidroxiflavona e que o mesmo espectro é coerente com a mistura desse composto com o 3-OH-AM, mostrando que nessa condição a liberação não foi completa.

Os ensaios de liberação tornaram evidente a rapidez com a qual ela ocorre nos pH de 5,0 a 8,5. Considerando-se a aplicação do dendrímero completo no tratamento de doenças, isso implicaria que, caso o 3-OH-AM fosse liberado da matriz dendrimérica, a liberação da 3-hidroxiflavona a partir dele aconteceria rapidamente no plasma (pH 7,4) e também em outros tecidos. É possível, ainda, que a ação de esterases plasmáticas aumentasse ainda mais a velocidade dessa liberação.

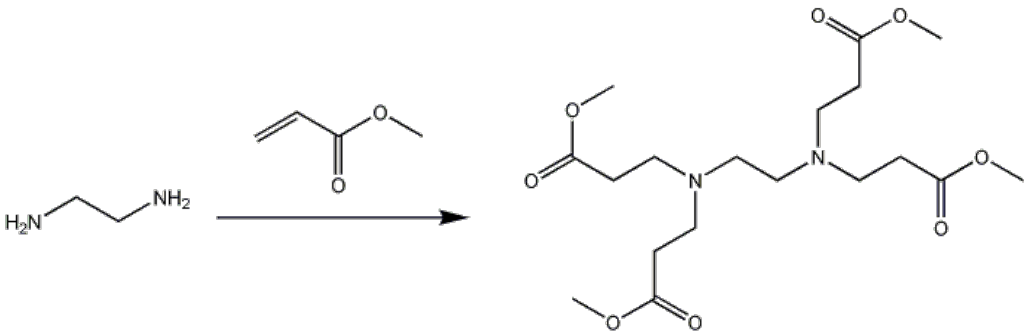
Além disso, caso se decidisse testar o 3-OH-AM como pró-fármaco da 3-hidroxiflavona, provavelmente o problema da baixa disponibilidade oral não seria corrigido, tendo em vista que a liberação ocorreria rapidamente no lúmen intestinal (pH entre 5,0 e 8,0).

Por outro lado, espera-se que a liberação da 3-hidroxiflavona, ou mesmo do 3-OH-AM, a partir do dendrímero completo ocorra de forma mais lenta, devido ao impedimento estérico da densa estrutura molecular. Ademais, propõe-se que o ácido carboxílico livre do 3-OH-AM contribui para a auto-hidrólise da ligação éster, já que o composto 3-OH-AMP, em que o ácido carboxílico foi esterificado, é menos suscetível à hidrólise do que o 3-OH-AM. No dendrímero completo, esta porção da molécula estaria ligada ao foco central através de uma ligação éster ou amida, portanto, ao menos inicialmente, não contribuiria com a hidrólise deste.

4.7 SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DO DENDRÍMERO PAMAM-G0 FUNCIONALIZADO COM 3-HIDROXIFLAVONA

Tendo-se em vista de que não foi possível se obter o dendrímero total, com base no inositol e ácido málico protegido, decidiu-se partir para a síntese de dendrímero descrito na literatura, como o PAMAM, mas inédito, tendo-se em vista que a latenciação com a 3-hidroxiflavona não se encontra descrita. Dessa forma, poder-se-ia aplicar, ao menos, a quantificação da 3-hidroflavona liberada nos ensaios de degradação química.

4.7.1 Síntese do dendrímero PAMAM-G-0,5



Reação 1: Esquema da síntese do PAMAM-G-0,5.

Para a síntese do PAMAM-G-0 funcionalizado com 3-hidroxiflavona foi utilizada estratégia de síntese divergente (Figura 5), em que o dendrímero cresce do núcleo para as extremidades. Inicialmente foi obtido o PAMAM-G-0,5 (intermediário 1) pela reação de etilenodiamina com acrilato de metila. O material obtido após purificação apresentou-se como um líquido levemente esverdeado, viscoso e translúcido, cujos espectros de FT-IR, H^1-RMN e C^{13}-RMN são apresentados nas Figuras 20, 21 e 22 e Tabelas 21, 22 e 23.

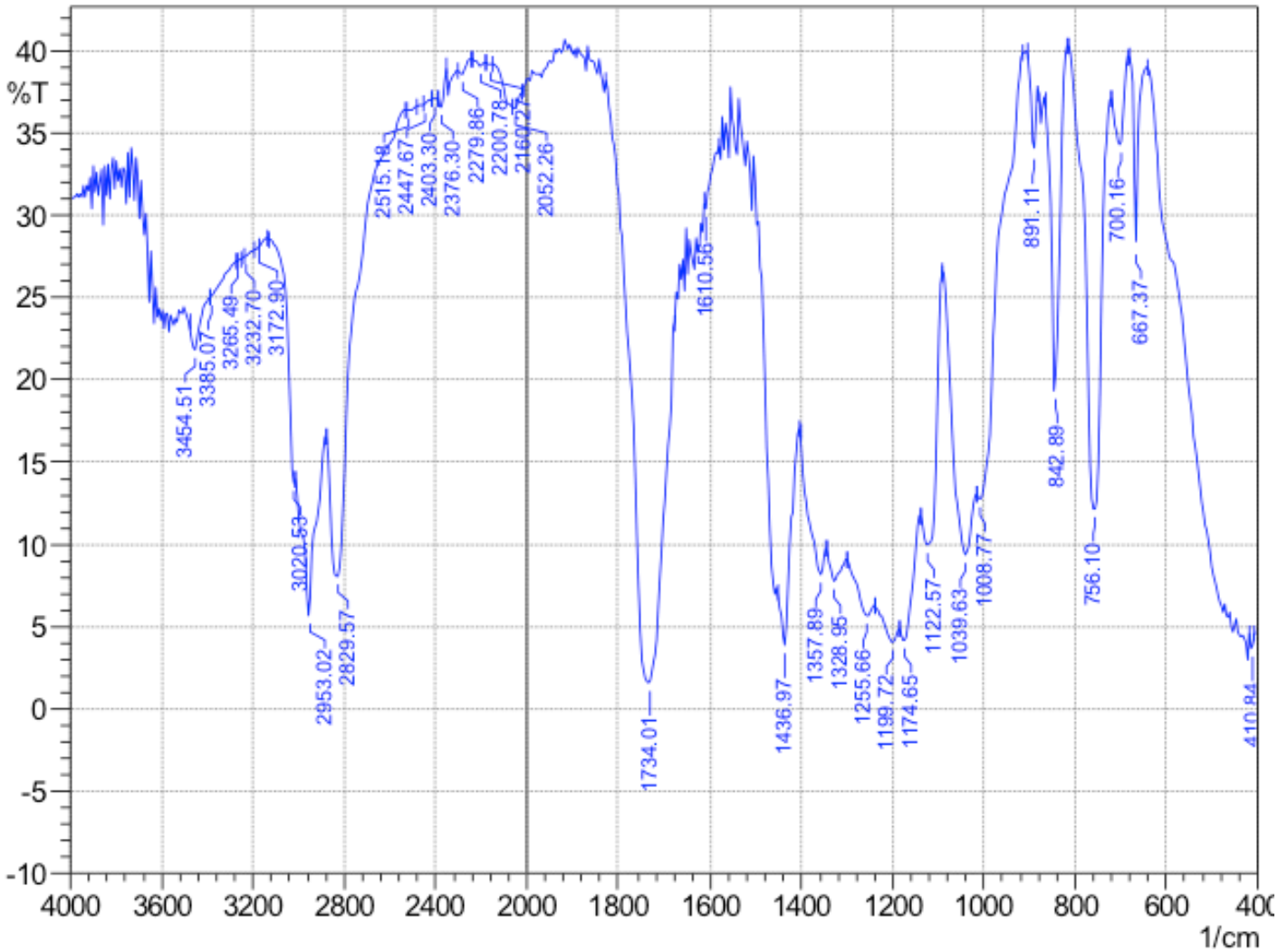


Figura 20: Espectro no infravermelho do PAMAM-G-0,5 em NaCl.

Observaram-se bandas de absorção no infravermelho (IV) coerentes com as funções químicas do PAMAM-G-0,5 (Figura 20 e Tabela 21).

Tabela 21: Atribuição dos sinais de FT-IR do PAMAM-G-0,5 (Figura 20)

Valores medidos, 1/cm	Valores de referência*, 1/cm	Atribuição
1199	1250 – 1020	νC-N – aminas
1255	1240	νC-O – ésteres (acetatos)
1436	1450	δ_aC-H - metila
1734	1750 – 1735	νC=O – ésteres
2953, 2829	3000 – 2840	νC-H – alifático

Sendo: ν = estiramento e δ_a = deformação assimétrica. * SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMIE, 2005.

A identidade estrutural do PAMAM-G-0,5 foi confirmada por RMN de hidrogênio e carbono, uma vez que foram observados sinais com valores de deslocamento químico, multiplicidade e número de hidrogênios coerentes com o esperado (Figuras 21 e 22, Tabelas 22 e 23).

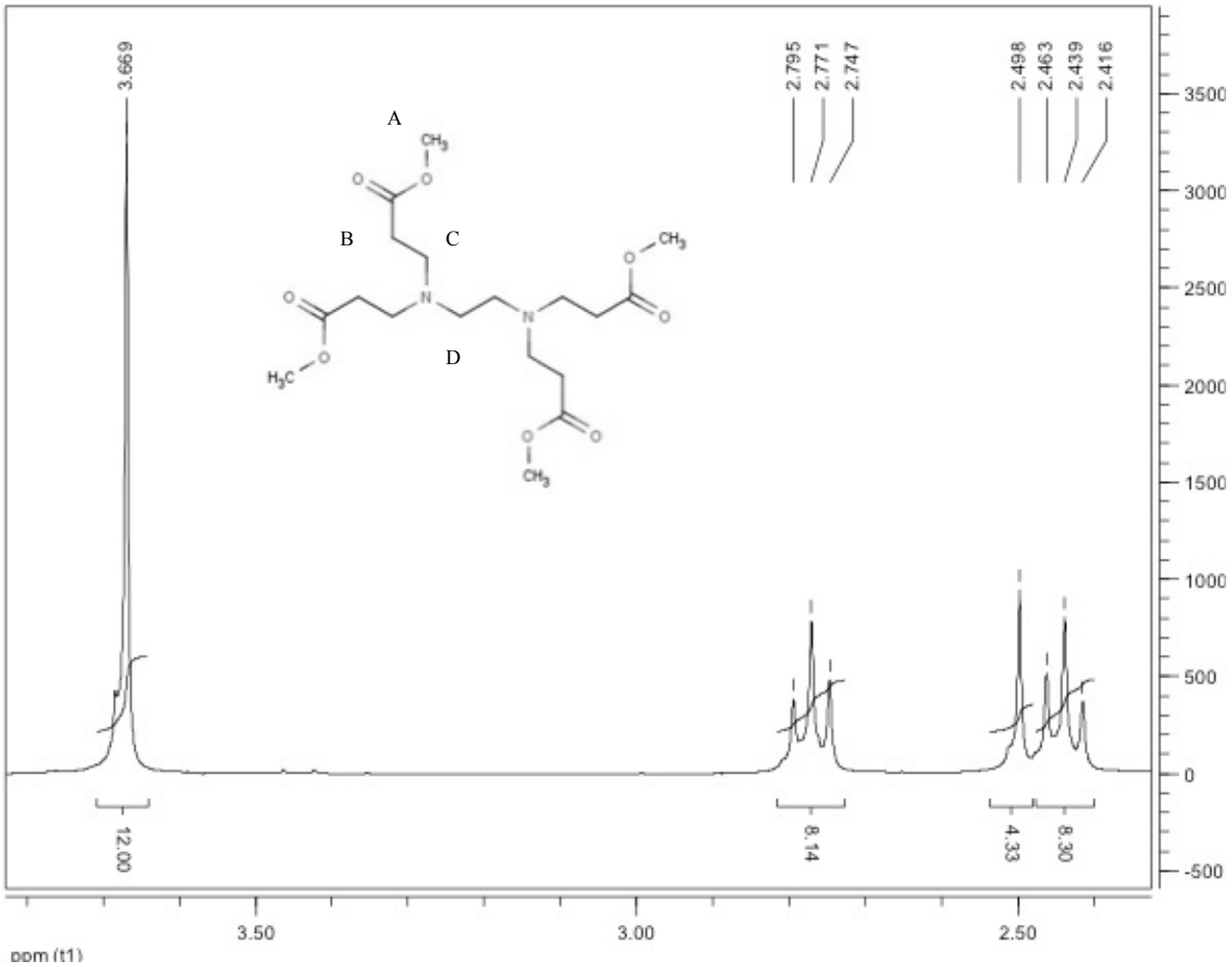


Figura 21: Espectro de H^1-RMN (300 MHz) do PAMAM-G-0,5 em $CDCl_3$.

Tabela 22: Atribuição dos sinais de H^1-RMN do PAMAM-G-0,5 (Figura 21)

Atribuição	Deslocamento químico, δ, ppm	Multiplicidade	Número de hidrogênios
A	3,67	Singleto	12
B	2,44; J=6 Hz	Tripleto	8
C	2,77; J=6 Hz	Tripleto	8
D	2,50	Singleto	4

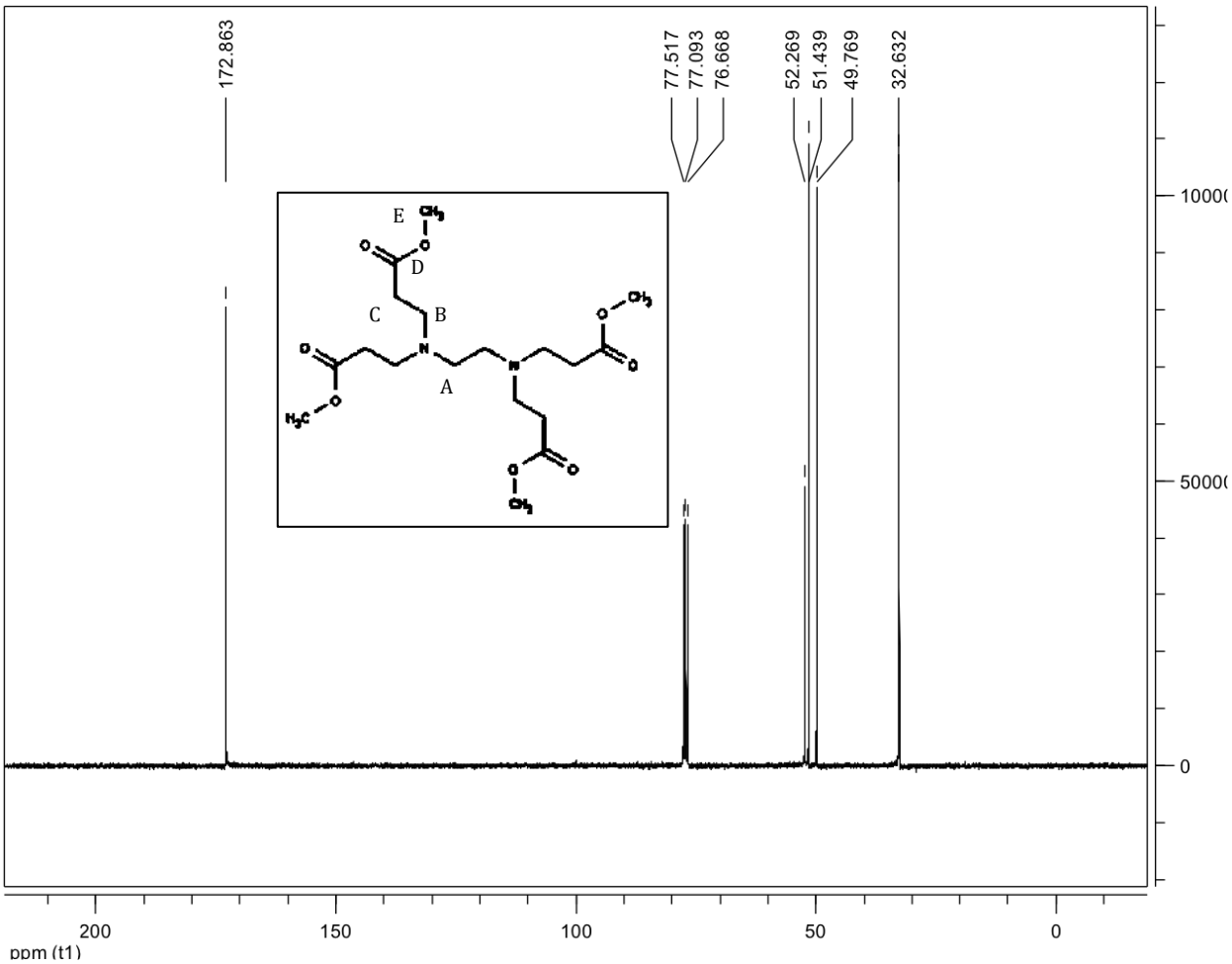
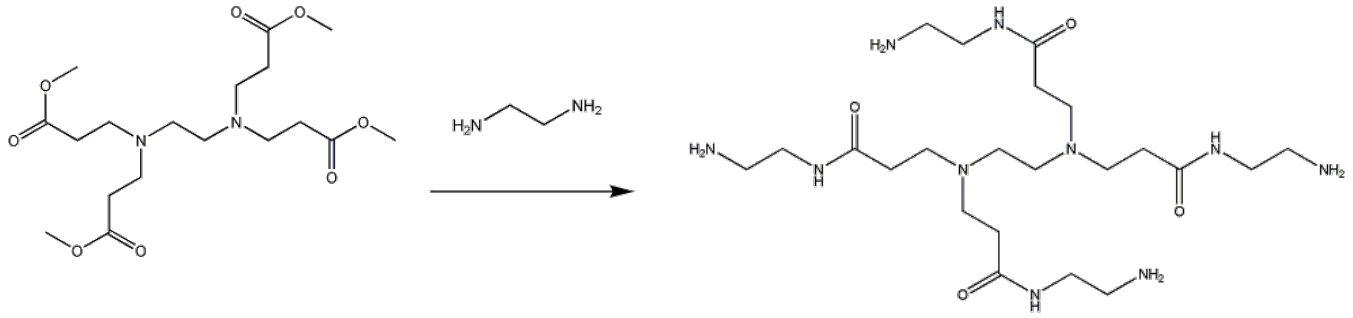


Figura 22: Espectro de C^{13}-RMN (75 MHz) do PAMAM-G-0,5 em $CDCl_3$

Tabela 23: Atribuição dos sinais de C^{13}-RMN do PAMAM-G-0,5 (Figura 22)

Atribuição	**Deslocamento químico, δ, ppm**
A	51,43
B	49,76
C	32,63
D	172,86
E	52,26
Clorofórmio ($CDCl_3$)	77,08

4.6.2 Síntese do dendrímero PAMAM-G0



Reação 2: Esquema da síntese do PAMAM-G0.

Na síntese do PAMAM-G0 utilizou-se 100% de excesso de EDA a fim de favorecer a reação dos quatro ésteres do PAMAM-G-0,5 com apenas uma das aminas da EDA (PAMAM-G0) e reduzir o tempo de formação do mesmo. O meio reacional foi mantido em banho de gelo seco em etanol, com temperatura entre -20 e -25 ºC, adicionou-se, lentamente, solução do poliéster à solução de EDA, em atmosfera inerte de argônio, a fim de impedir a formação de subprodutos indesejados, como por exemplo, o produto da ciclização dos ramos (GIORDANENGO, 2007).

Após a evaporação do solvente, o material obtido (líquido viscoso, esverdeado) foi caracterizado utilizando-se as técnicas de FT-IR, H^1-RMN, C^{13}-RMN e ESI-MS (no modo positivo). Os espectros são apresentados nas Figuras de 23 a 28 e Tabelas de 24 a 26.

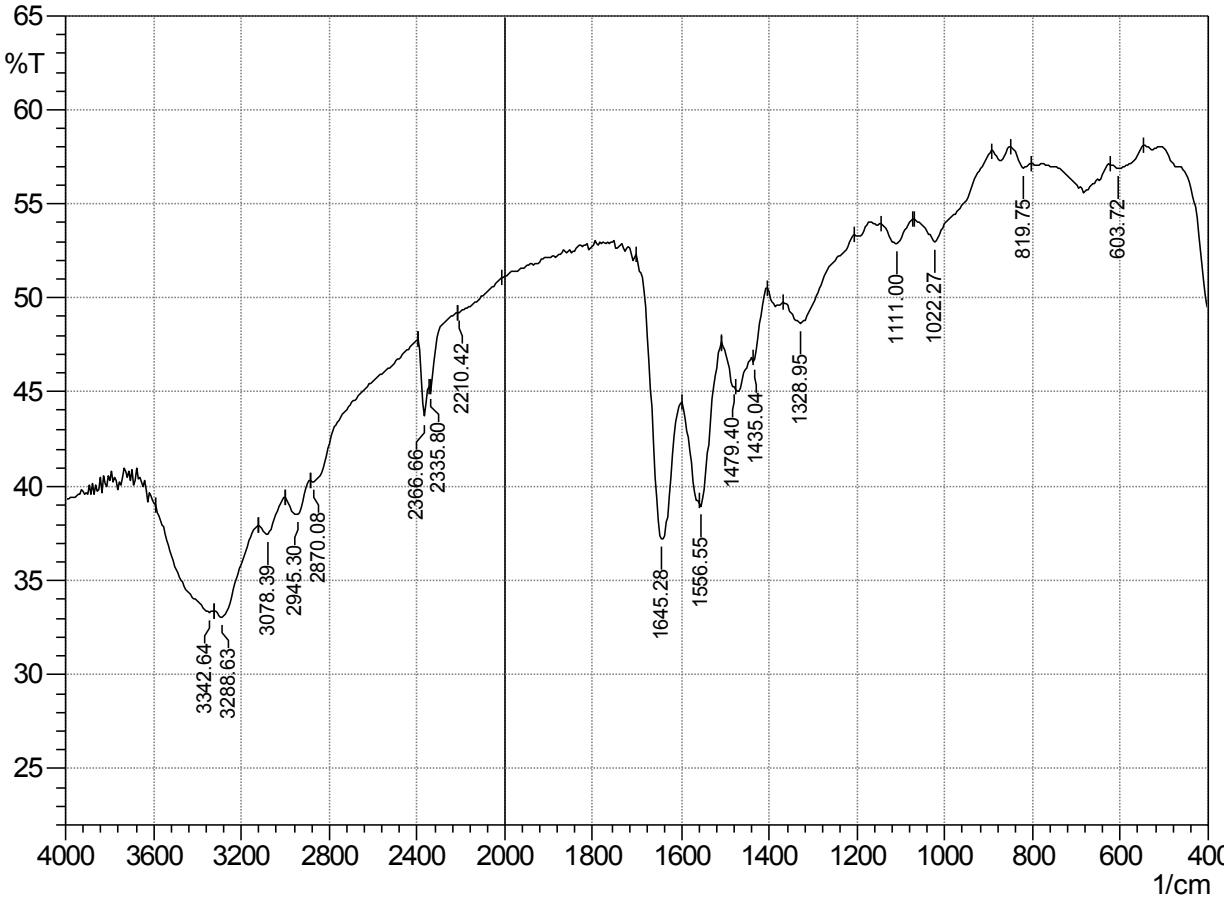


Figura 23: Espectro no infravermelho do PAMAM-G0 em NaCl.

Tabela 24: Atribuição dos sinais de FT-IR do PAMAM-G0 (Figura 23).

Valores medidos, 1/cm	Valores de referência*, 1/cm	Atribuição
1022 -1111	1250 – 1020	νC-N – amina
1556	1650 – 1515	δN–H – amida
1645	1640	νC=O – amida (secundária alifática)
2945, 2870	3000 – 2840	νC-H – alifático
3342, 3288	3550 – 3200	νN-H – amina

Sendo: ν = estiramento e δ = deformação. * SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMIE, 2005.

A pureza cromatagráfica de um dos lote de PAMAM-G0, levemente amarelado, foi de 85%, avaliada por CZE, com eletrólito ácido, conforme método descrito por Peterson e colaboradores, 2001.

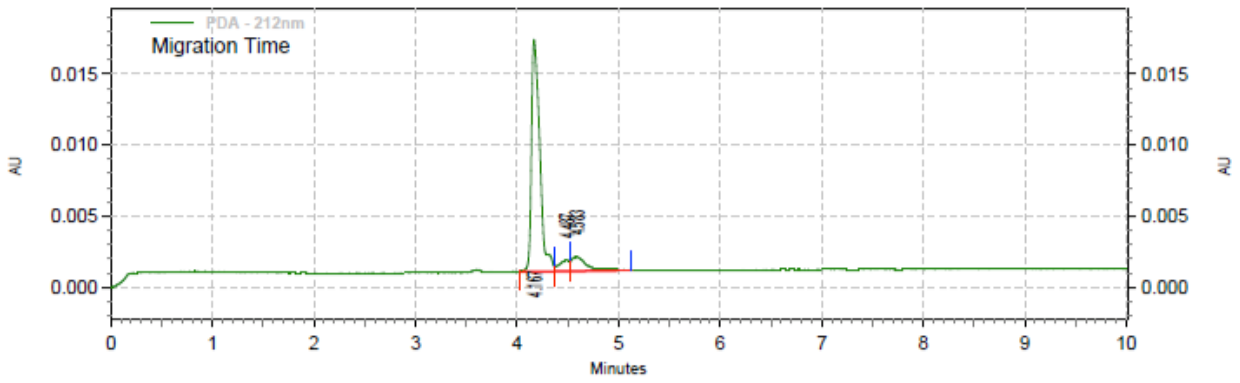


Figura 24: Eletroferograma do PAMAM-G0, obtido por CZE, conforme método descrito por Peterson e colaboradores, 2001.

O espectro de H^1-RMN do material obtido na síntese do PAMAM-G0 (Figuras 25 e 26 e Tabela 25) é coerente com o esperado, apesar do número elevado de hidrogênios obtidos pela integração dos sinais B e F, o que indica a presença de impurezas, que podem ter sido formadas pelo aquecimento excessivo durante a evaporação da EDA, uma vez que, quando aquecido em torno de 80 ^{o}C, o material apresenta mudança de cor de verde claro para amarelo, indicativo da produção de produto secundário.

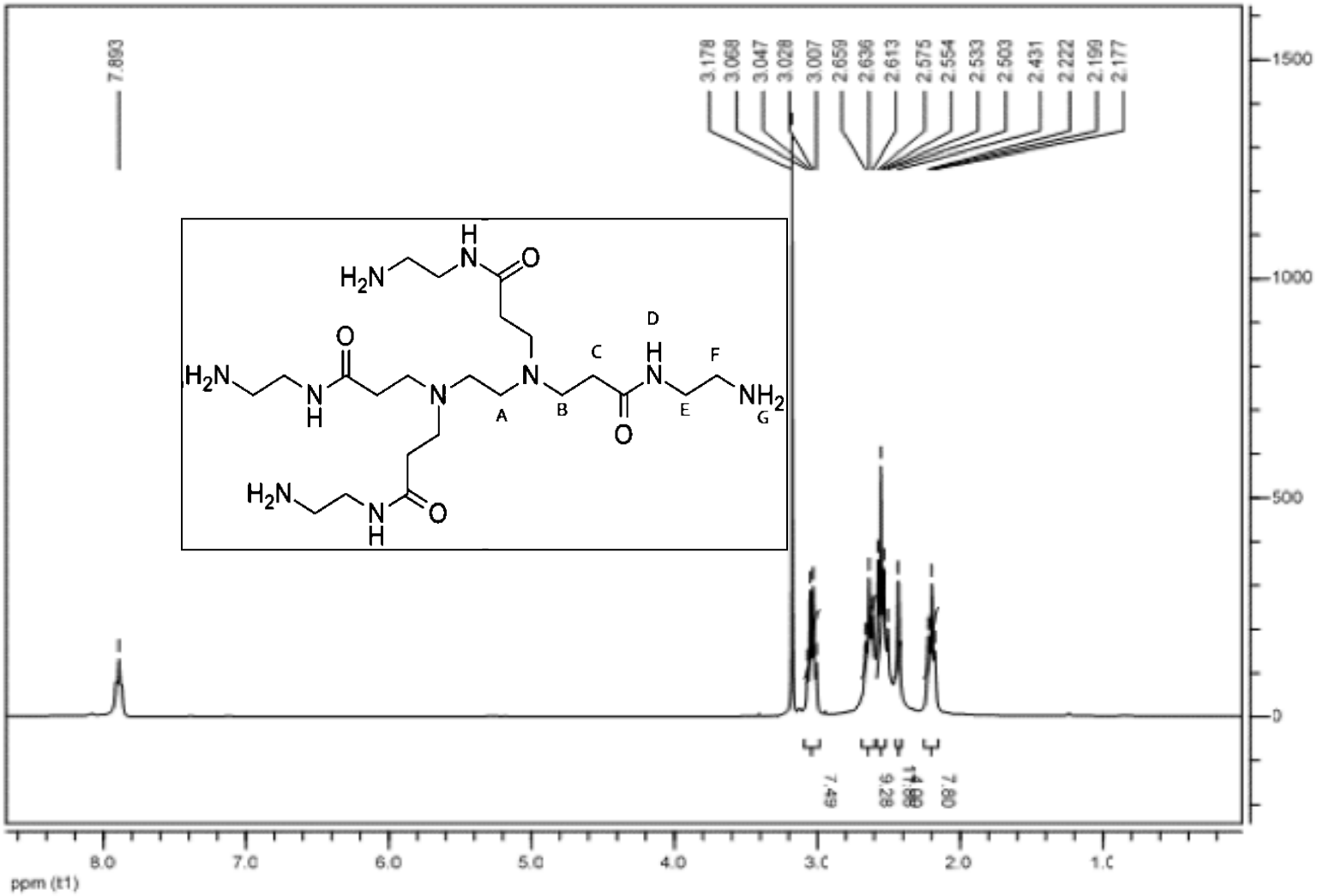


Figura 25: Espectro de H^1-RMN(300 MHz) do PAMAM-G0 em DMSO-d_6.

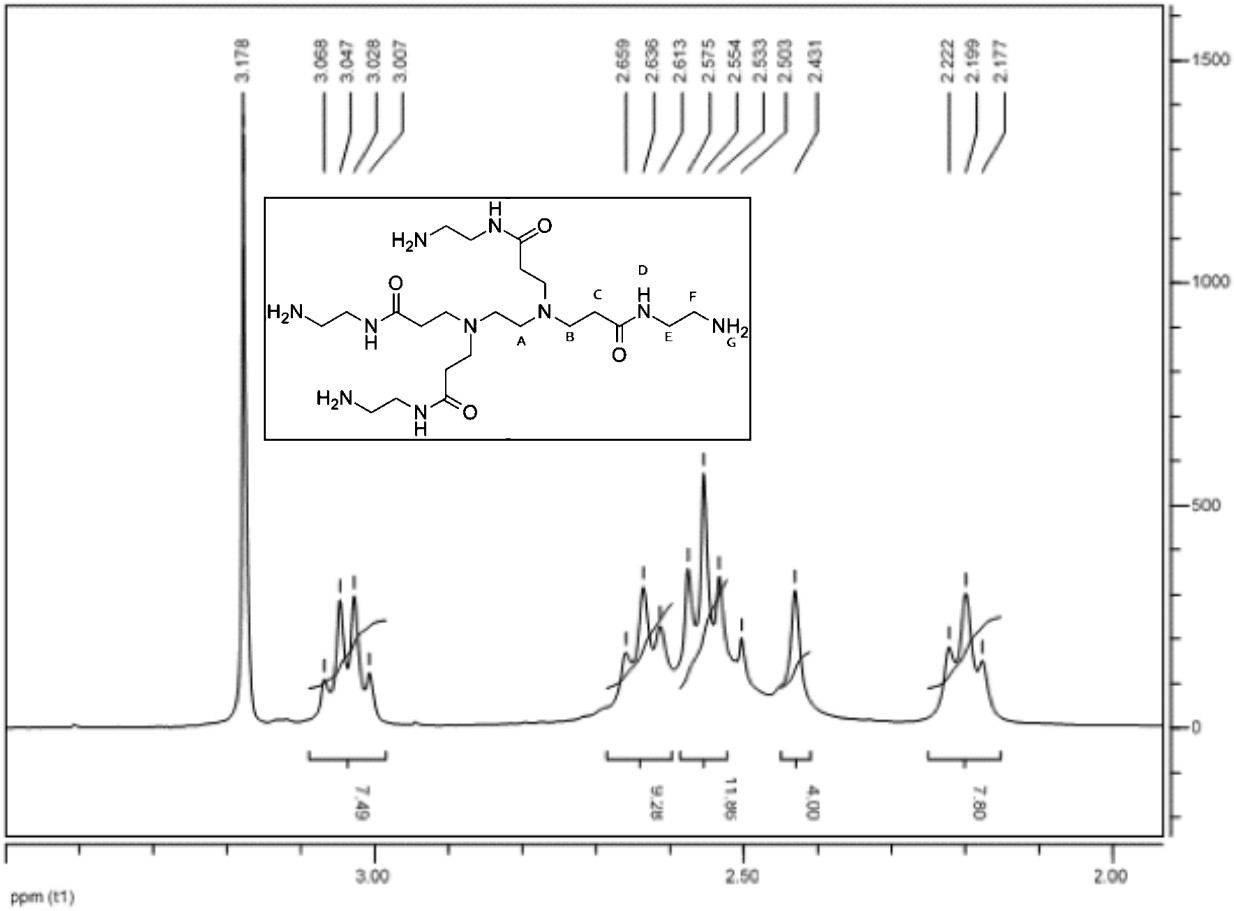


Figura 26: Espectro de H^1-RMN (300 MHz) do PAMAM-G0 em DMSO-d6, com ampliação na região entre 2 e 4 ppm.

Tabela 25: Atribuição dos sinais de H^1-RMN do PAMAM-G0 (Figuras 25 e 26)

Atribuição	Deslocamento químico, δ, ppm	Multiplicidade	Número teórico de hidrogênios
A	2,43	Singleto	4
B	2,55; J=6 Hz	Tripleto	8
C	2,20; J=6 Hz	Tripleto	8
D	7,89	Tripleto	4
E	3,04	Quarteto	8
F	2,64; J=6 Hz	Tripleto	8
G	Não detectado	Tripleto	8
Metanol	3,17	Singleto	-
Dimetilsulfóxido, DMSO	2,50	Singleto	-

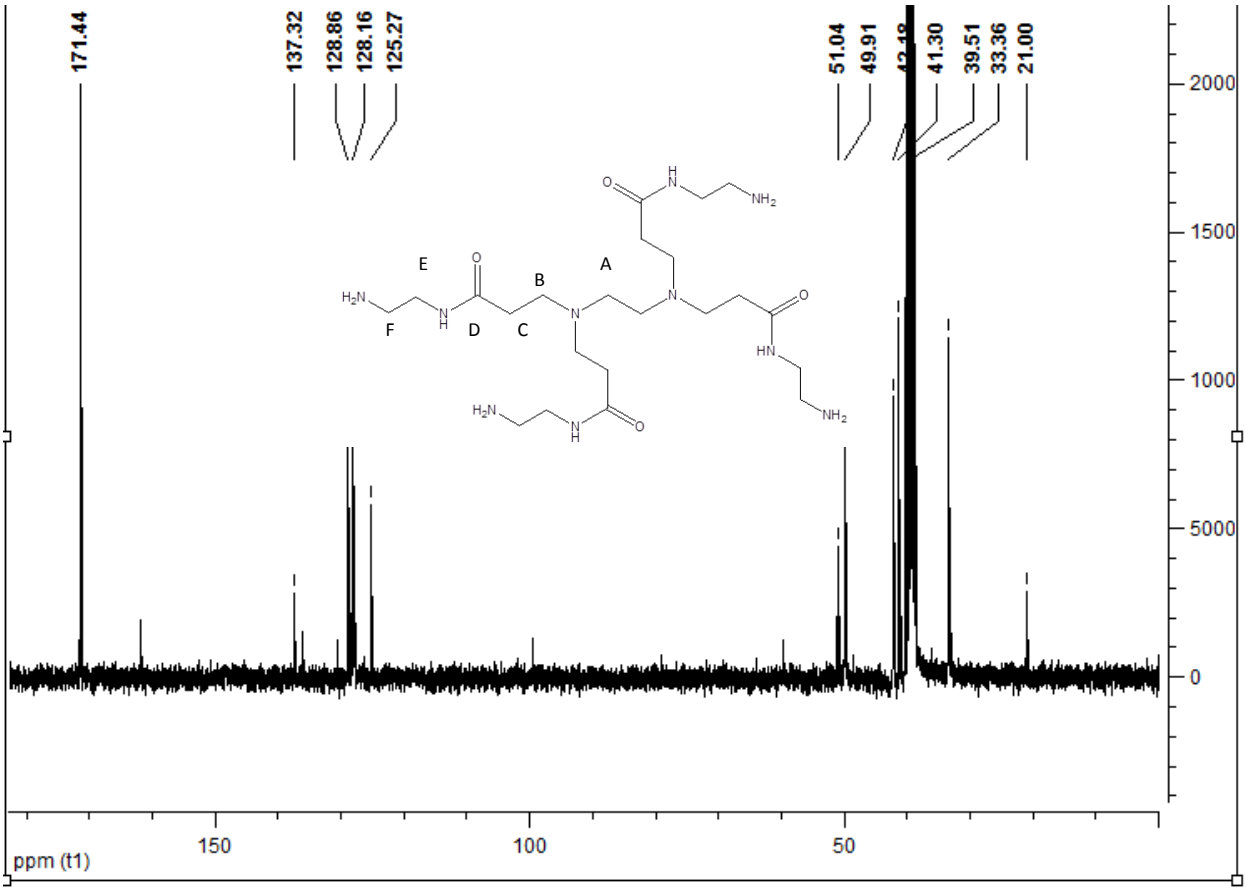


Figura 27: Espectro de C^{13}-RMN(75 MHz) do PAMAM-G0 em DMSO-d6.

Tabela 26: Atribuição, proposta para os sinais de C^{13}-RMN do PAMAM-G0 (Figura 27)

Atribuição	Deslocamento químico, δ, ppm
A	41,30
B	42,18
C	33,36
D	171,44
E	42,18
F	49,91
Tolueno	21,00; 125,27; 128,16; 128,86; 137,32
Metanol	51,04
Dimetilsulfóxido, DMSO	39,51

No espectro de C^{13}-RMN do PAMAM-G0 observam-se os sinais referentes aos carbonos desse composto (Figura 27). A atribuição proposta (Tabela 26), sugere que o carbono E apresentou o mesmo deslocamento químico (42,18 ppm) que o carbono B, o que é baseado no fato de ambos possuem átomo de nitrogênio adjacente, assim como os carbonos A, com

deslocamento químico semelhante - 41,30 ppm. Ademais, notam-se sinais referentes a resíduos dos solventes utilizados no isolamento do PAMAM-G0, ou seja, na remoção do excesso de EDA, metanol e tolueno. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do tolueno não são observados no espectro de H^1-RMN apresentado na Figura 25 porque esse espectro foi obtido após etapa adicional de purificação para a remoção do tolueno residual por arraste, com metanol, em rota-evaporador.

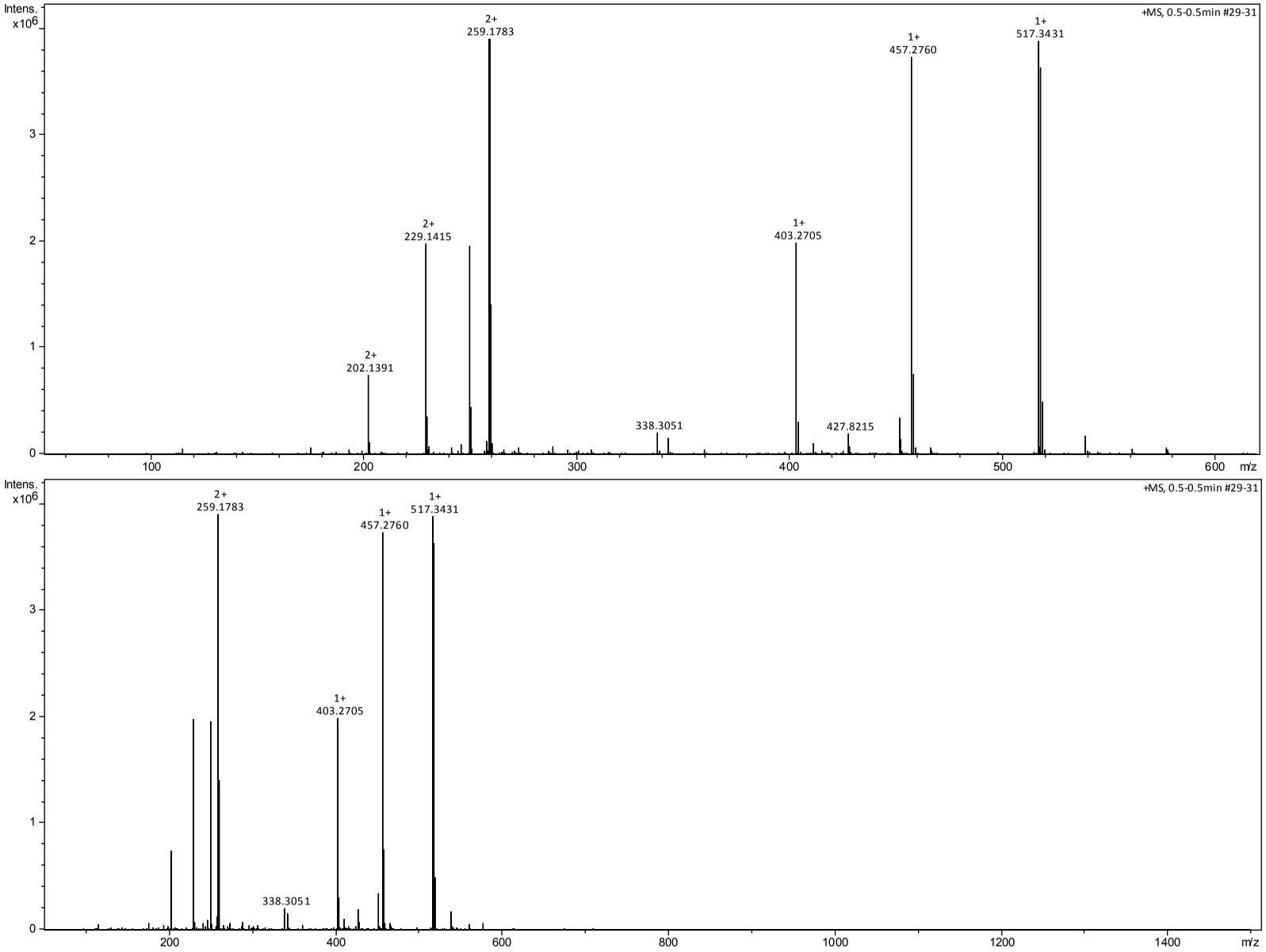
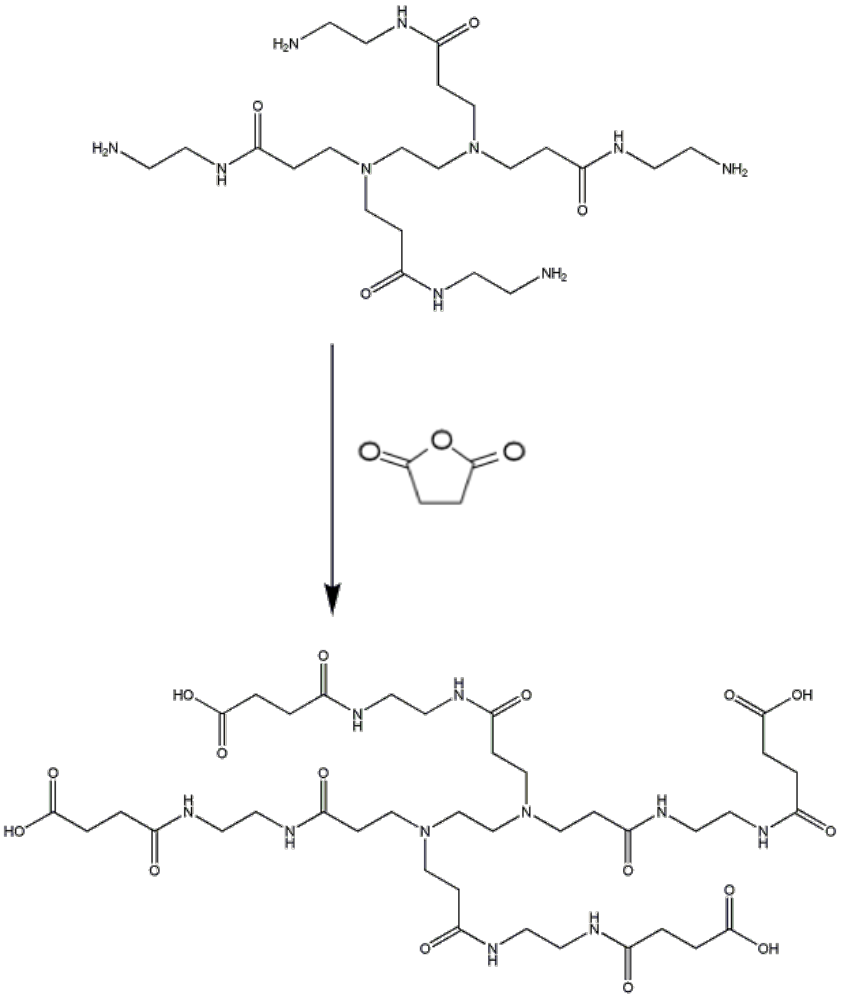


Figura 28: Espectro de massas (ESI^+-MS) do PAMAM-G0 (massa molar = 516,68 g/mol) em metanol.

Na análise por espectrometria de massas (Figura 28) foi detectado fragmento com massa molar (517,34 g/mol) referente ao PAMAM-G0 protonado. Observam-se fragmentos de menor massa molar 457,28, 259,18 g/mol e outros, provavelmente formados na fonte de ionização por clivagem do PAMAM-G0.

De maneira geral, verifica-se que os dados obtidos na caracterização do produto sintetizado são coerentes com a obtenção do PAMAM-G0 desejado.

4.6.3. Síntese do dendrímero PAMAM-G0 succinoilado (PAMAM-G0-SUC)



Reação 3: Esquema da síntese do PAMAM-G0-SUC.

Na síntese do PAMAM-G0-SUC utilizaram-se 50% de excesso de anidrido succínico, a fim de favorecer a formação do composto tetra-substituído, e um volume reduzido de DMSO (6 mL) para facilitar sua evaporação e reduzir o tempo de exposição da mistura reacional ao aquecimento (cerca de 60 ºC).

Após a purificação por cromatografia preparativa em fase reversa e liofilização do solvente aquoso, o material obtido (sólido branco, cristalino, altamente higroscópico, com faixa de fusão entre 64 e 68 ^{o}C) foi caracterizado por FT-IR, H^{1}-RMN e C^{13}-RMN. Os espectros são mostrados nas Figuras de 29 a 31 e a atribuição dos sinais nas Tabelas 27, 28 e 29.

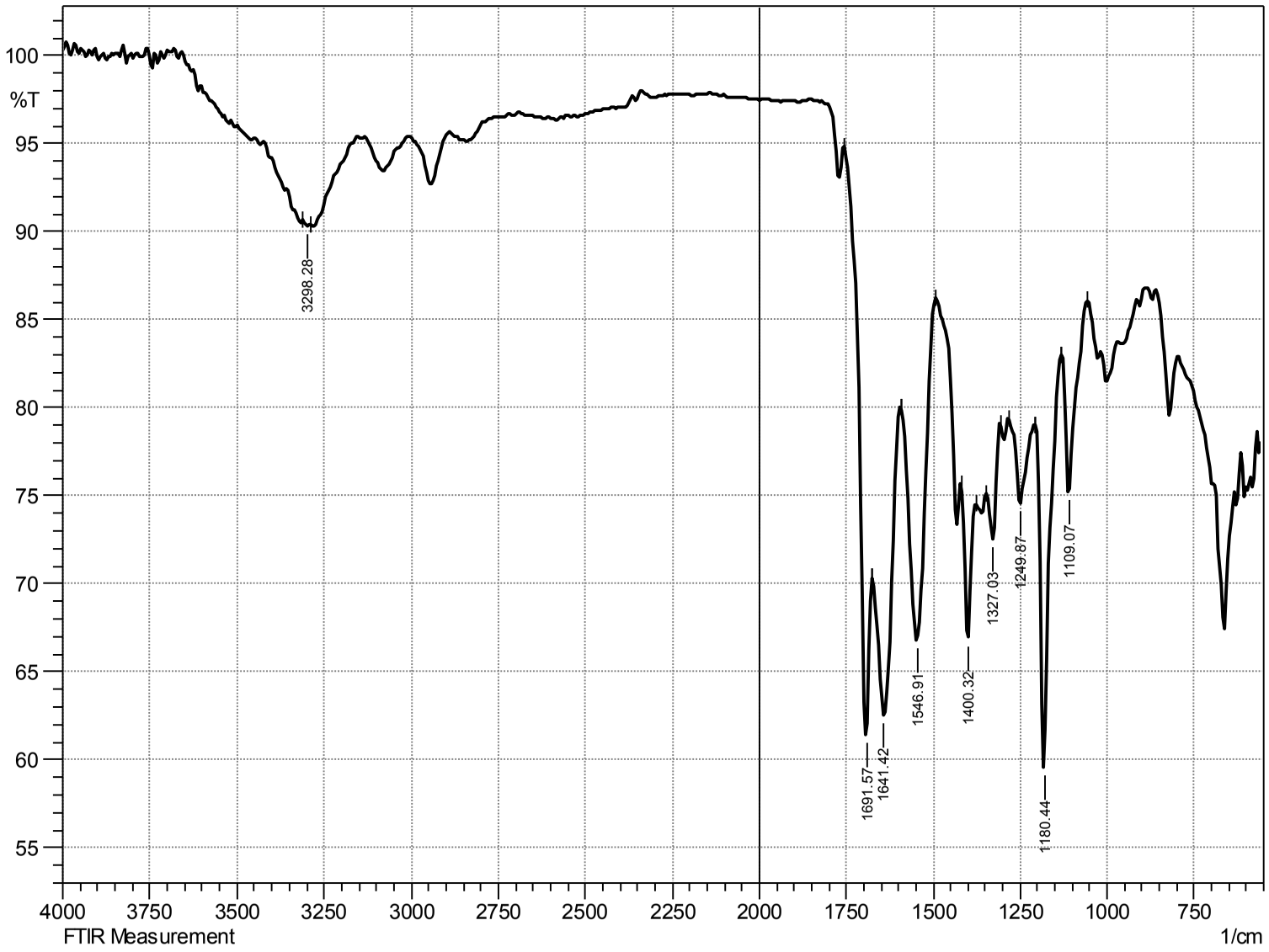


Figura 29: Espectro no infravermelho do PAMAM-G0-SUC em fonte de ATR.

Tabela 27: Atribuição dos sinais de FT-IR do PAMAM-G0-SUC (Figura 29).

Valores medidos, 1/cm	Valores de referência*, 1/cm	Atribuição
1249	1320 – 1210	νC-O-ácido carboxílico
1400	1440 – 1395	δC–OH, ácido carboxílico
1546	1655 – 1550	δN–H – amida
1691	1720 – 1680, 1640	νC=O – ácido carboxílico (alifático com interação intermolecular do tipo ligação de hidrogênio), νC=O – amida (alifática)
3298	3300 – 2500	νO-H – ácido carboxílico (com interação intermolecular do tipo ligação de hidrogênio)

Sendo: ν = estiramento e δ = deformação. * SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMIE, 2005.

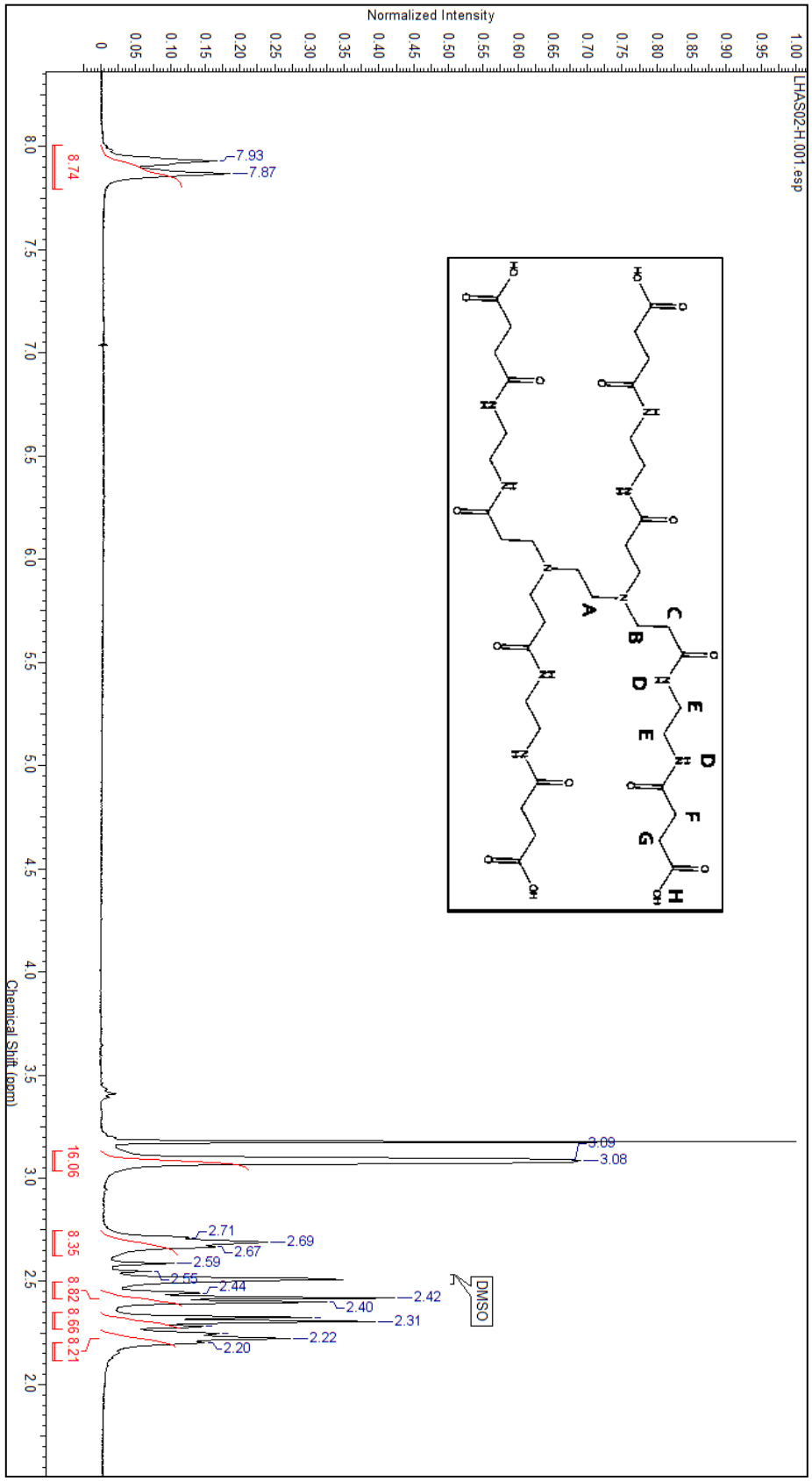


Figura 30: Espectro de H'-RMN (300 MHz) do PAMAM-G0-SUC em DMSO-d_6.

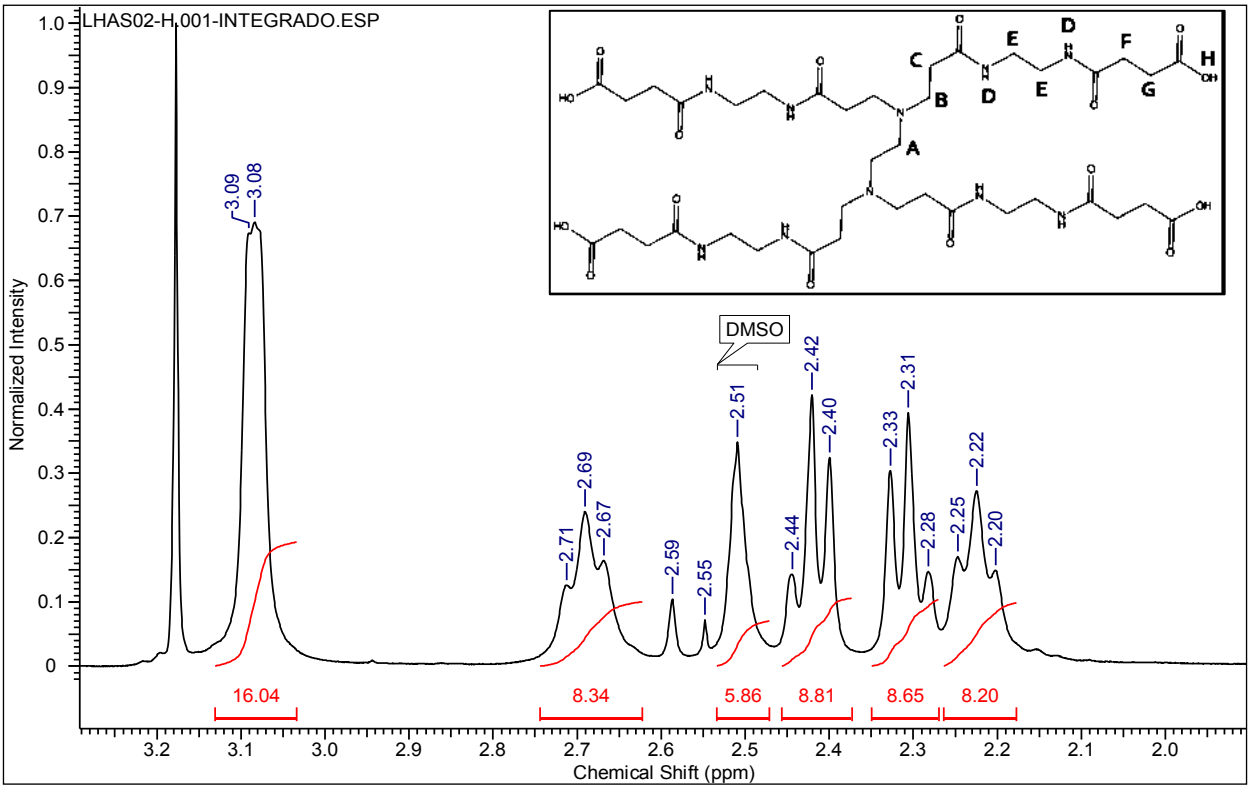


Figura 31: Espectro de H¹-RMN (300 MHz), expandido (região 2,0 a 3,2 ppm), do PAMAM-G0-SUC em DMSO-d_6.

Tabela 28: Atribuição proposta para os sinais de H^1-RMN do PAMAM-G0-SUC (Figuras 30 e 31).

Atribuição	Deslocamento químico, δ, ppm	Multiplicidade	Número teórico de hidrogênios
A	Não detectado	Singleto	4
B	2,69; J=6 Hz	Tripleto	8
C	2,22; J=6 Hz	Tripleto	8
D	7,87	Tripleto	8
E	3,09	Singleto	16
F	2,32; J=6 Hz	Tripleto	8
G	2,42; J=6 Hz	Tripleto	8
H	Não detectado	Singleto	4
Metanol	3,18	Singleto	-
Dimetilsulfóxido, DMSO	2,51	Singleto	-

A análise do espectro de H¹-RMN do composto obtido (Figuras 30 e 31, e Tabela 28) mostra que os sinais conferem com o esperado para o PAMAM-G0-SUC, quanto à multiplicidade dos sinais e número de hidrogênios. A mudança na proporção dos sinais (simetria) dos tripletos G

e F pode estar relacionada a efeitos de interações inter e intramoleculares favorecidas pela concentração elevada da amostra analisada, cerca de 40 mg/mL. Adicionalmente, o sinal A, que deveria aparecer como um singleto na região próxima a 2,43 ppm (conforme material de partida – Tabela 25) não foi observado. Provavelmente este se sobrepõe ao sinal do DMSO em 2,51 ppm. Ademais, ocorrem sinais de baixa intensidade em 2,55 e 2,59 ppm, possivelmente decorrentes da presença de impurezas.

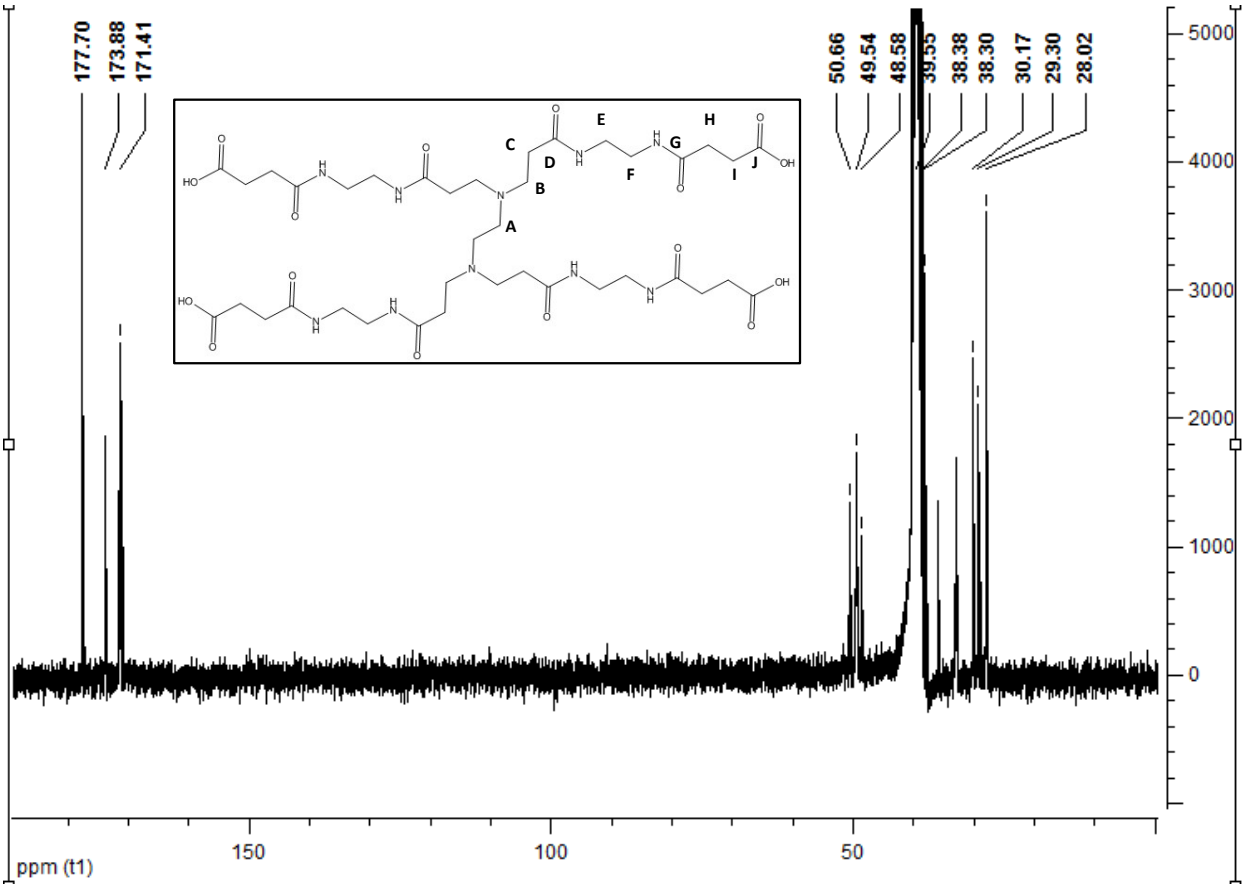


Figura 32: Espectro de C¹3-RMN (75 MHz) do PAMAM-G0-SUC em DMSO-d_6.

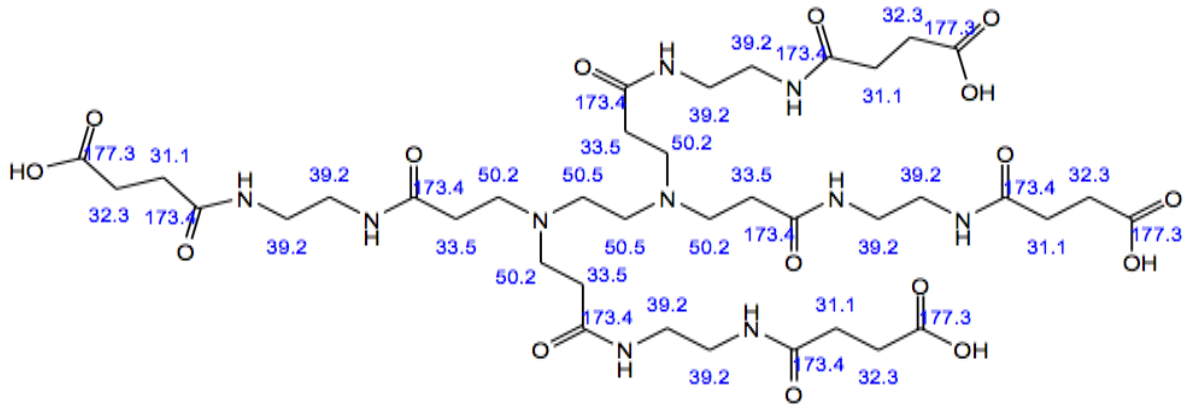


Figura 33: Valores de deslocamento químico, em ppm, previstos com auxílio do software ChemDraw$^{(R)}$ para o espectro de C^{13}-RMN (75 MHz) do PAMAM-G0-SUC (em DMSO-d_6).

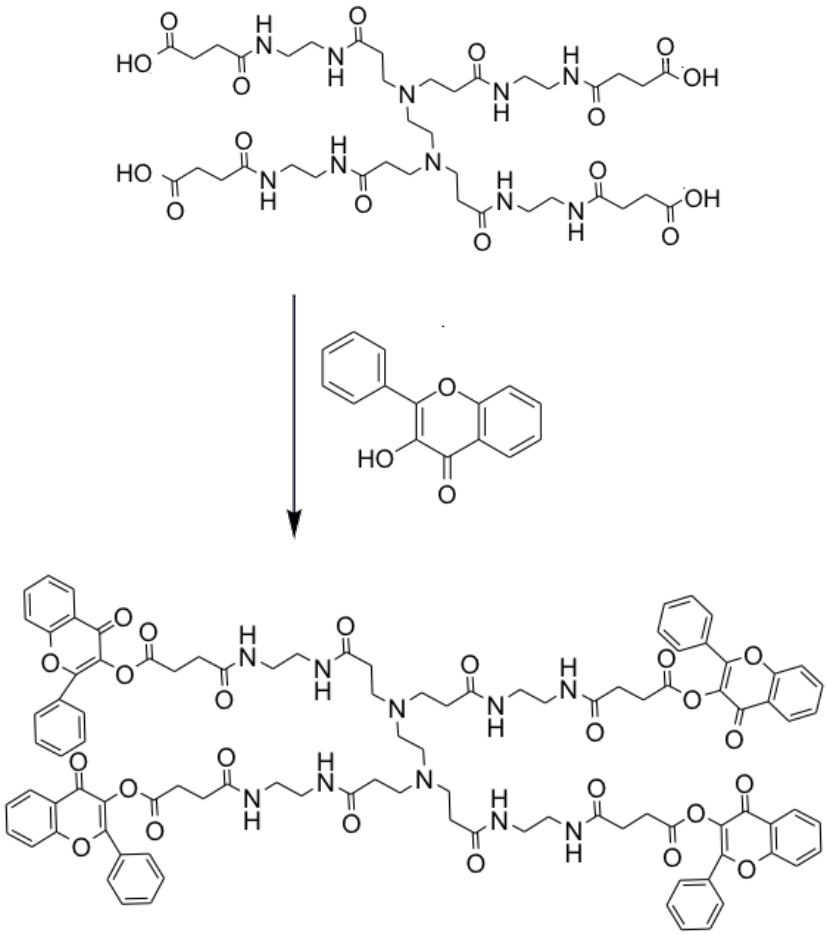
Tabela 29: Atribuição proposta para os sinais de C^{13}-RMN do PAMAM-G0-SUC (Figura 32)

Atribuição	**Valores medidos δ, ppm**	**Valores simulados (ChemDraw$^{(R)}$)**
A	48,58	50,5
B	49,54	50,2
C	30,17	33,5
D	171,41	173,4
E	38,30	39,2
F	38,38	39,2
G	173,88	173,4
H	28,02	31,1
I	29,30	32,3
J	177,70	177,3
Metanol	50,66	-
Dimetilsulfóxido, DMSO	39,55	-

A atribuição dos sinais do espectro de C^{13}-RMN do PAMAM-G0-SUC (Figura 32 e Tabela 29) foi feita com o auxílio da previsão do mesmo, calculada no software ChemDraw$^{(R)}$ (Figura 33). Nota-se que foram obtidos sinais com valores bastante semelhantes aos previstos para os carbonos do composto desejado. Adicionalmente, sugere-se que o sinal em 50,66 ppm se deva à presença de resíduo do metanol utilizado na etapa de purificação.

De maneira geral, verifica-se que os dados obtidos na caracterização do produto de síntese e purificação são coerentes com a obtenção do PAMAM-G0-SUC.

4.6.4. Síntese do dendrímero PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV



Reação 4: Esquema da síntese do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV.

A síntese do dendrímero PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV ($C_{98}H_{96}O_{24}N_{10}$ – 1797,88 g/mol) envolve a esterificação da 3-hidroxiflavona com o PAMAM-G0-SUC, utilizando agente condensante EDC e DMAP como catalizador. Ademais, utilizaram-se 100 % (mol/mol) de excesso de EDC.HCl, 100 % (mol/mol) de excesso de 3-hidroxiflavona e elevado tempo de reação (17 dias), a fim de favorecer a esterificação completa dos ácidos carboxílicos do material de partida e obtenção do produto tetrassubstituído.

O monitoramento do andamento da reação por CCD revelou quatro novas manchas amarelas na placa, indicando a formação dos quatro derivados do PAMAN-G0-SUC. As novas manchas apresentaram valores de fator de retenção (RF) maiores que o do PAMAM-G0-SUC (RF = 0) e menores do que da 3-hidroxiflavona (RF = 0,86). A mancha de maior RF (0,21 - referente ao derivado mais apolar) aparece após quatro dias de reação e apresenta aumento de tamanho/intensidade ao longo do tempo, enquanto a mancha de menor RF (0,07 - referente ao derivado mais polar) não é detectada a partir do oitavo dia de reação. Tais observações sugerem a formação de derivados mono, bi, tri e tetrassubstituídos e que o derivado monossubstituído foi totalmente consumido. No entanto, mesmo após prolongado tempo de reação (17 dias) observaram-se as manchas relativas aos compostos bi e trissubstituído, o que indica que parte do material de partida teve esterificação incompleta.

A etapa inicial de purificação do material obtido foi feita por extração líquido-líquido para retirada do EDU (ureia do EDC), DMAP, piridina e DMSO. Em seguida realizou-se a recristalização do excesso de 3-hidroxiflavona em acetonitrila. O sobrenadante da recristalização foi seco em rota-evaporador e purificado por cromatografia preparativa, utilizando-se Sephadex-LH20 e metanol para retirar a 3-hidroxiflavona residual.

A remoção da 3-hidroxiflavona residual em resina Sephadex-LH20 mostrou-se mais eficiente do que com a utilização de sílica-gel como fase estacionária, uma vez que o sistema cromatográfico com sílica leva à degradação da 3-hidroxiflavona com formação de impureza que impregna na fase estacionária e elui em todas as frações, prejudicando a pureza do produto final.

A separação dos dendrímeros com diferentes graus de substituição foi realizada em coluna de sílica-gel e permitiu o isolamento satisfatório do possível produto tetrassubstituído, relativo a mancha de RF 0,21, o que foi verificado pelo resultado da pureza cromatográfica em HPLC-UV, 99,7% (Figura 34-A). As Figura 34-B e 34-C apresentam os cromatogramas da fração contendo o composto trissubstituído e da 3-hidroxiflavona, respectivamente, obtidos com o mesmo método (fase móvel alcalina, 0,01 % v/v de trietilamina em água). Nota-se que o cromatogramas do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (tempo de retenção 17,08 minutos) não apresenta picos de 3-hidroxiflavona (tempo de retenção 8,05 minutos) ou do derivado trissubstituído (tempo de retenção 19,31 minutos).

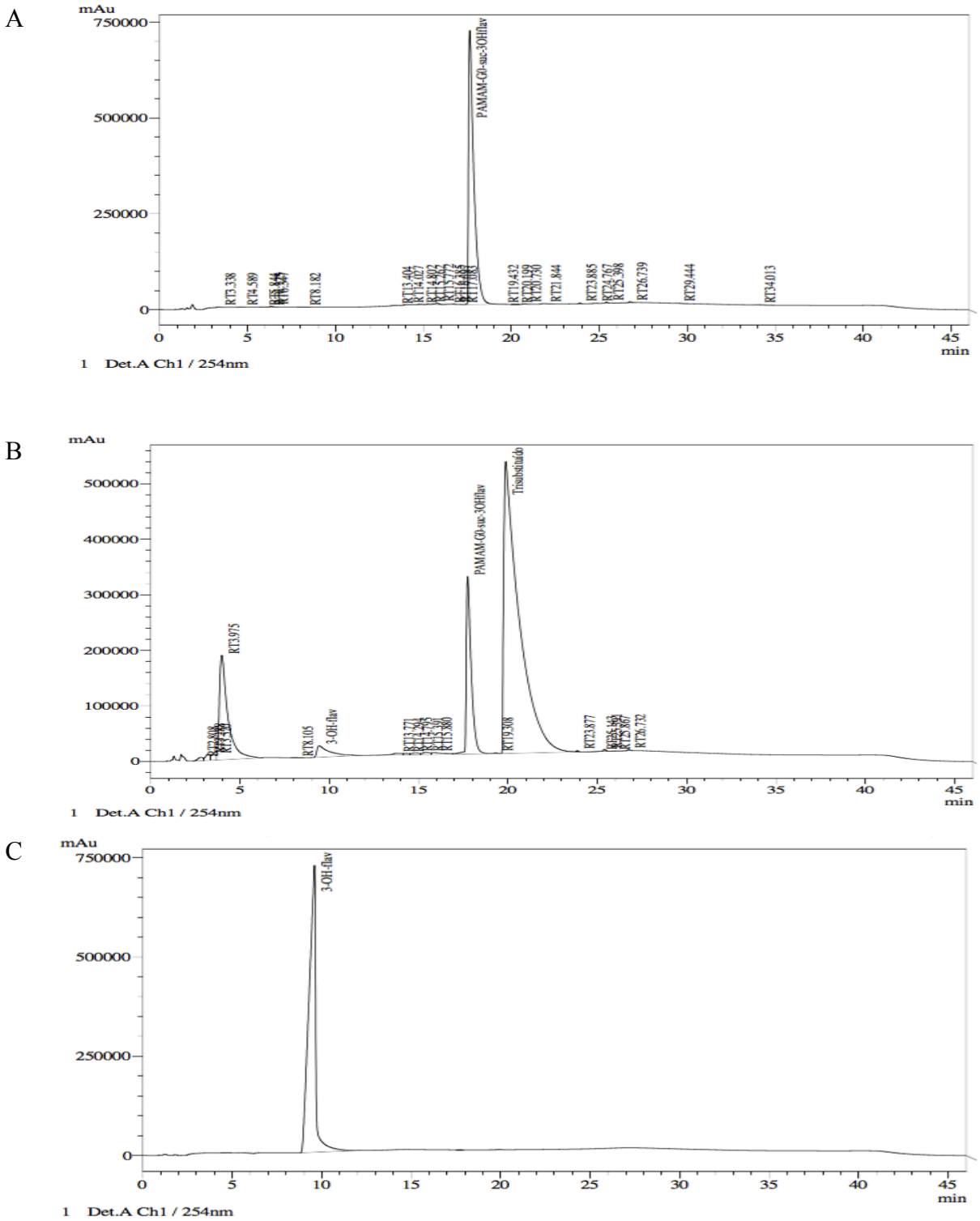


Figura 34: A – Cromatograma do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (relativo à fração da mancha de RF 0,21); B – Cromatograma do PAMAM-G0-SUC trissubstituído (relativo à fração da mancha de RF 0,15); C – Cromatograma da 3-hidroxiflavona (material de partida).

O material obtido após evaporação do solvente da fração contendo o composto tetrassubstituído e refrigeração apresentou-se como um sólido amarelo (Figura 35), com faixa de temperatura de fusão entre 108,0 e 109,3 ^{o}C. Esse composto foi caracterizado por UV-vis, FT-IR, C^{13}-RMN e H^{1}-RMN.

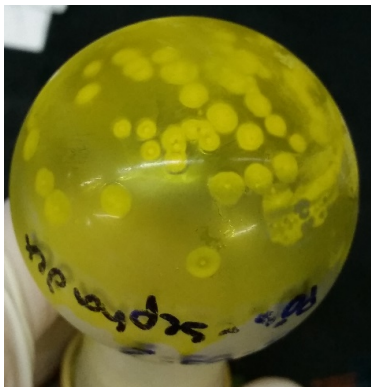


Figura 35: Imagem do sólido obtido na síntese do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV.

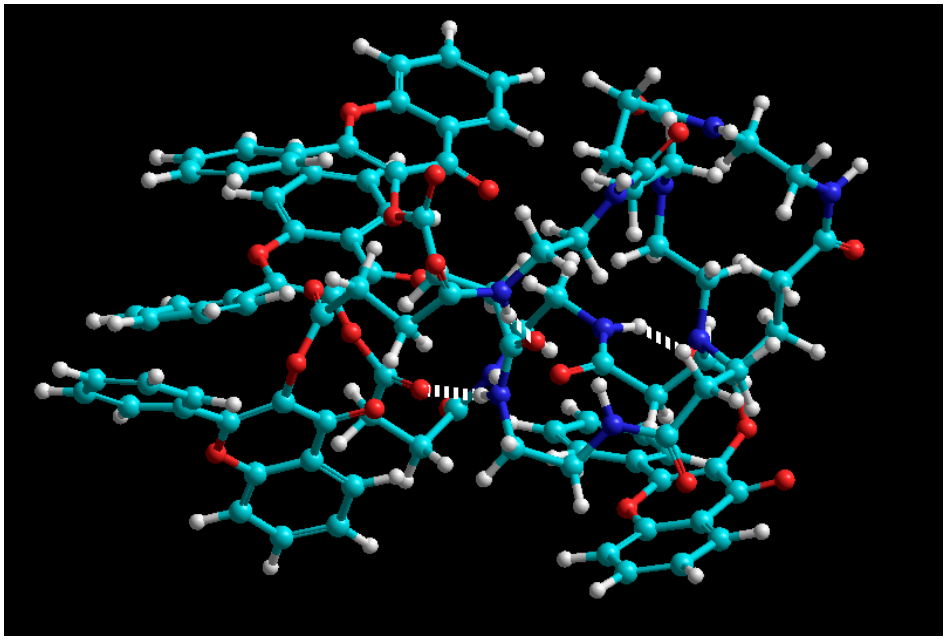
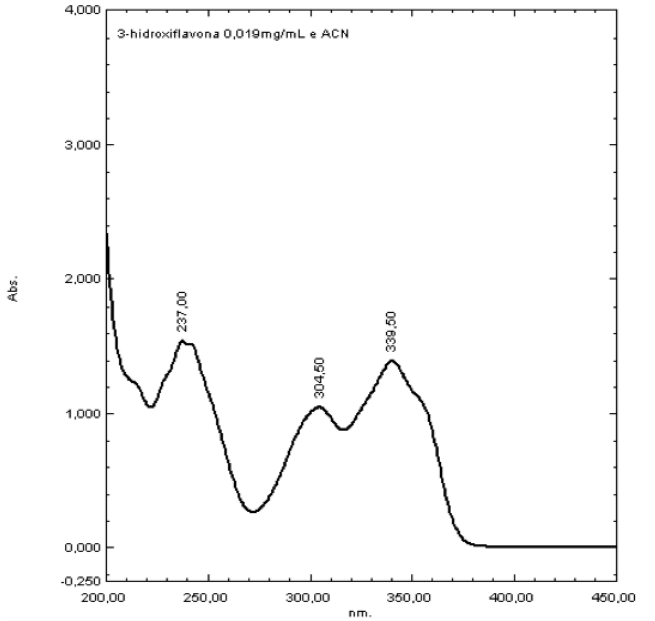


Figura 36: Conformação de menor energia, em vácuo, do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, após minimização realizada no software HyperChem$^{(R)}$, com carbonos apresentados em ciano, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho e nitrogênio em azul.

A Figura 36 mostra imagem da conformação de menor energia do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, em vácuo, simulada por mecânica molecular, no software HyperChem$^{(R)}$ (métodos

Polak-Ribiere e Amber 3). O estudo sugere que, em vácuo, a molécula tende a assumir configuração de menor energia em que as interações intermoleculares do tipo π-π, entre os anéis aromáticos do flavonóide, e as ligações de hidrogênio, dos oxigênios das carbonilas, são maximizadas.

A



B

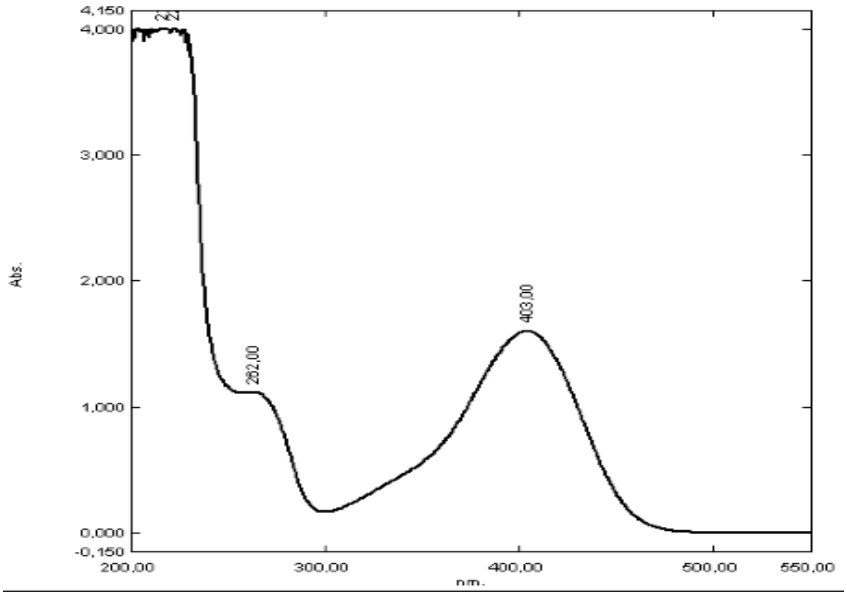


Figura 37: Espectro no UV-vis da 3-hidroxiflavona (A) e do produto de sua esterificação PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (B), em acetonitrila.

O espectro no UV-vis do material obtido (Figura 37-B) apresenta máximos (262 e 403 nm) e mínimo (300 nm) diferentes daqueles da 3-hidroxiflavona (Figura 37-A - máximos: 237, 305 e 340 nm, mínimo 222, 272 e 316 nm). Já o PAMAM-G0-SUC (material de partida) não apresenta grupo cromóforo com absorção no visível, mas absorve em comprimentos de onda menores que 215 nm. Portanto, sugere-se que a banda de absorção em 403 nm do espectro do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV se deve à presença do flavonóide na estrutura química desse composto.

No espectro no infravermelho apresentado na Figura 38 observam-se bandas de absorção que podem ser associadas aos grupos funcionais da estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (Tabela 30).

A comparação do perfil dos espectros de FT-IR do poli(ácido carboxílico) e do álcool com o do produto de sua reação de esterificação (Figura 39) mostra que o material obtido não apresenta as bandas de estiramento O-H presentes nos materiais de partida (ácido carboxílico – 3298 1/cm, álcool – 3753 e 3653 1/cm), o que indica o consumo dos materiais de partida e formação do produto de interesse, com bandas características na região de carbonilas (Tabela 30).

Tabela 30: Atribuição proposta para os sinais de FT-IR do PAMAM-G0-SUC-3OH-FLAV (Figura 38)

Valores medidos, 1/cm	**Valores de referência*, 1/cm**	**Atribuição**
1271, 1170	1300 – 1000	νC-O – ésteres
1585, 1448	1600 – 1585, 1500 – 1400	νC=C – aromático
1612	1640	νC=O – amida (secundária alifática)
1699	1730 – 1715, 1685 – 1666	νC=O – ésteres insaturados, cetona beta-insaturada
2958	3000 – 2840	νC-H – alifático

Sendo: ν = estiramento e δ = deformação. * SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMIE, 2005.

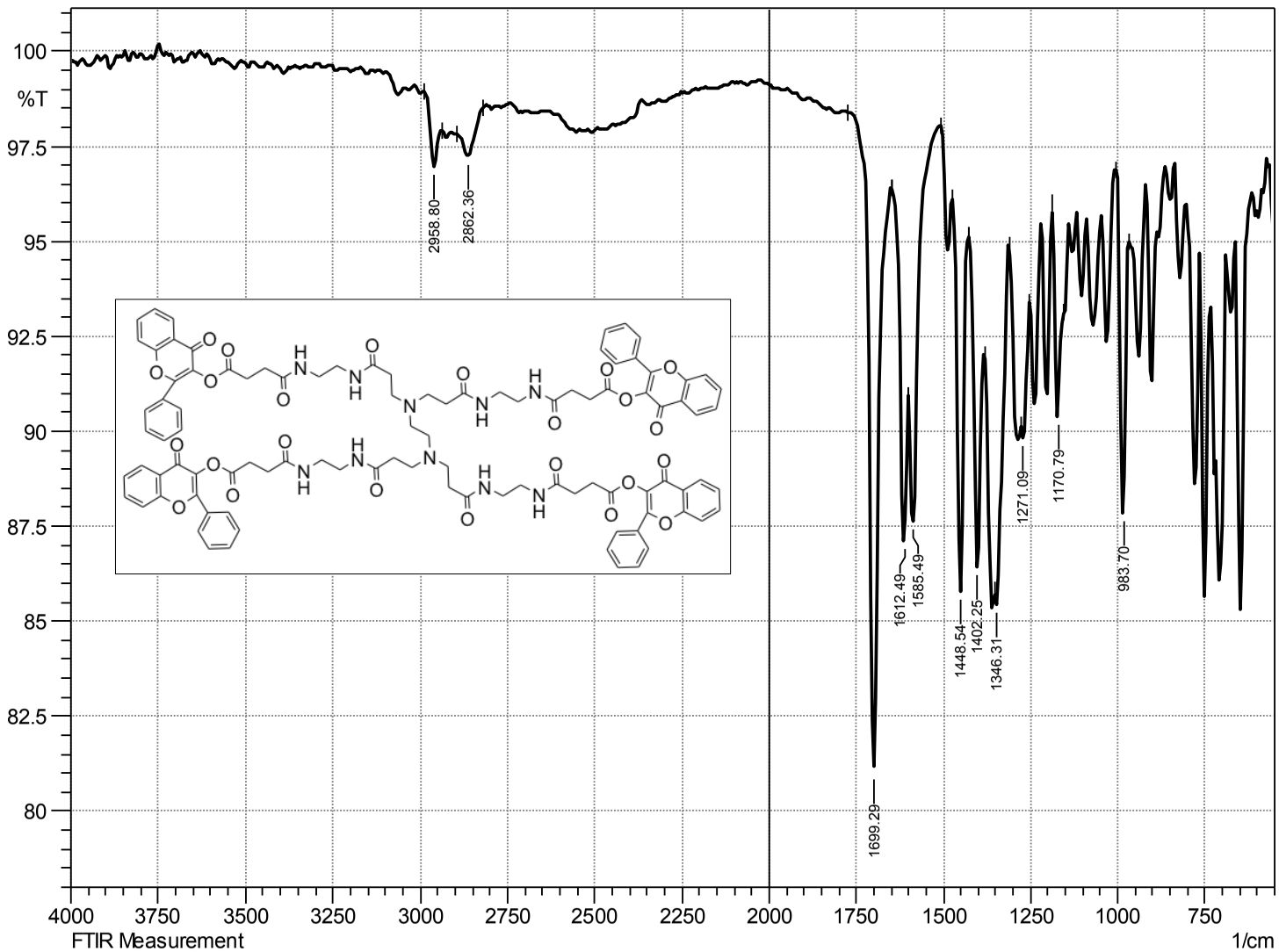


Figura 38: Espectro no infravermelho do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em fonte de ATR.

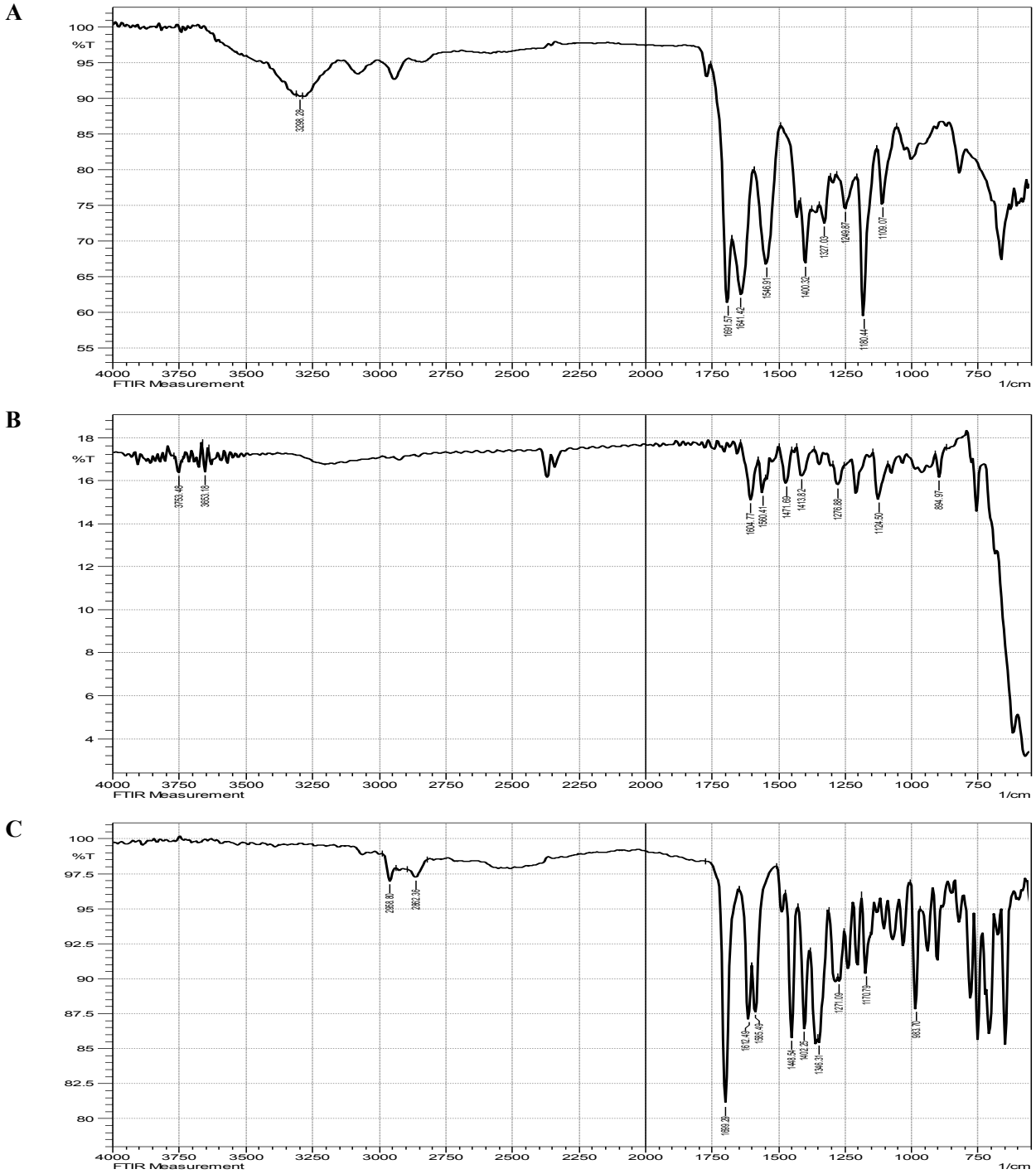


Figura 39: Comparação dos espectro no infravermelho dos materiais de partida, PAMAM-G0-SUC (A) e 3-hidroxiflavona (B), e do produto final PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (B), em fonte de ATR.

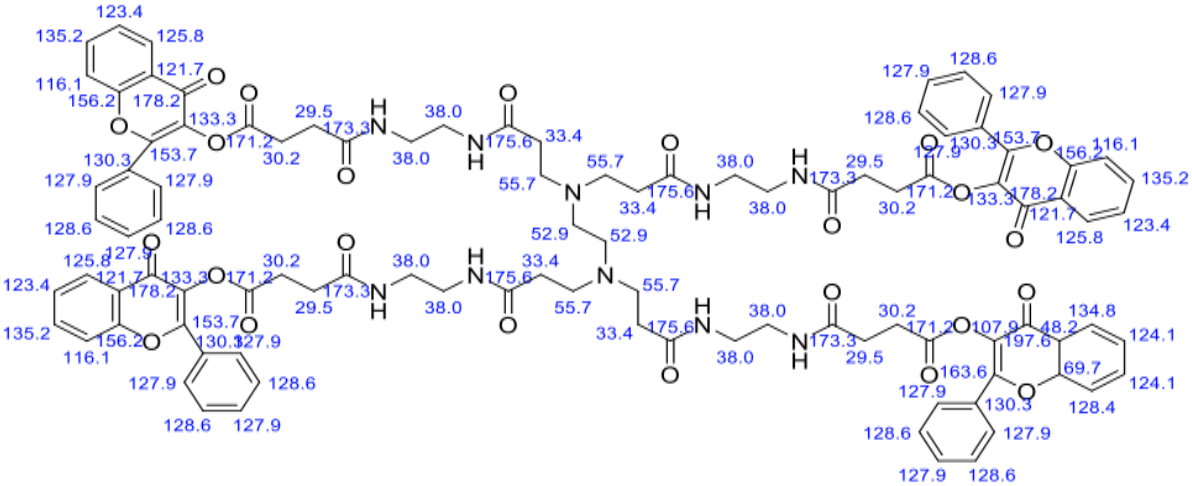
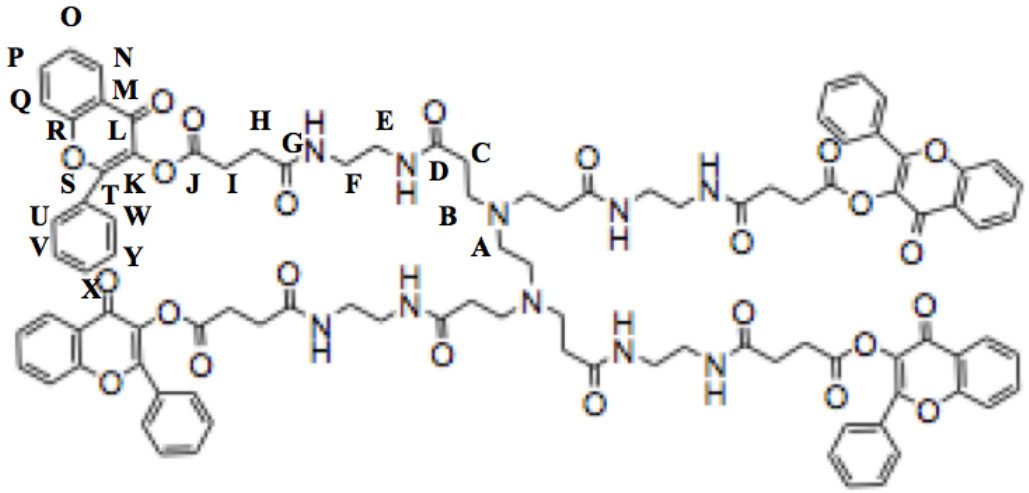


Figura 40: Estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV com os valores de deslocamento químico, em ppm, do espectro de C^{13}-RMN previstos no software ChemDraw$^{(R)}$.

A)



B)

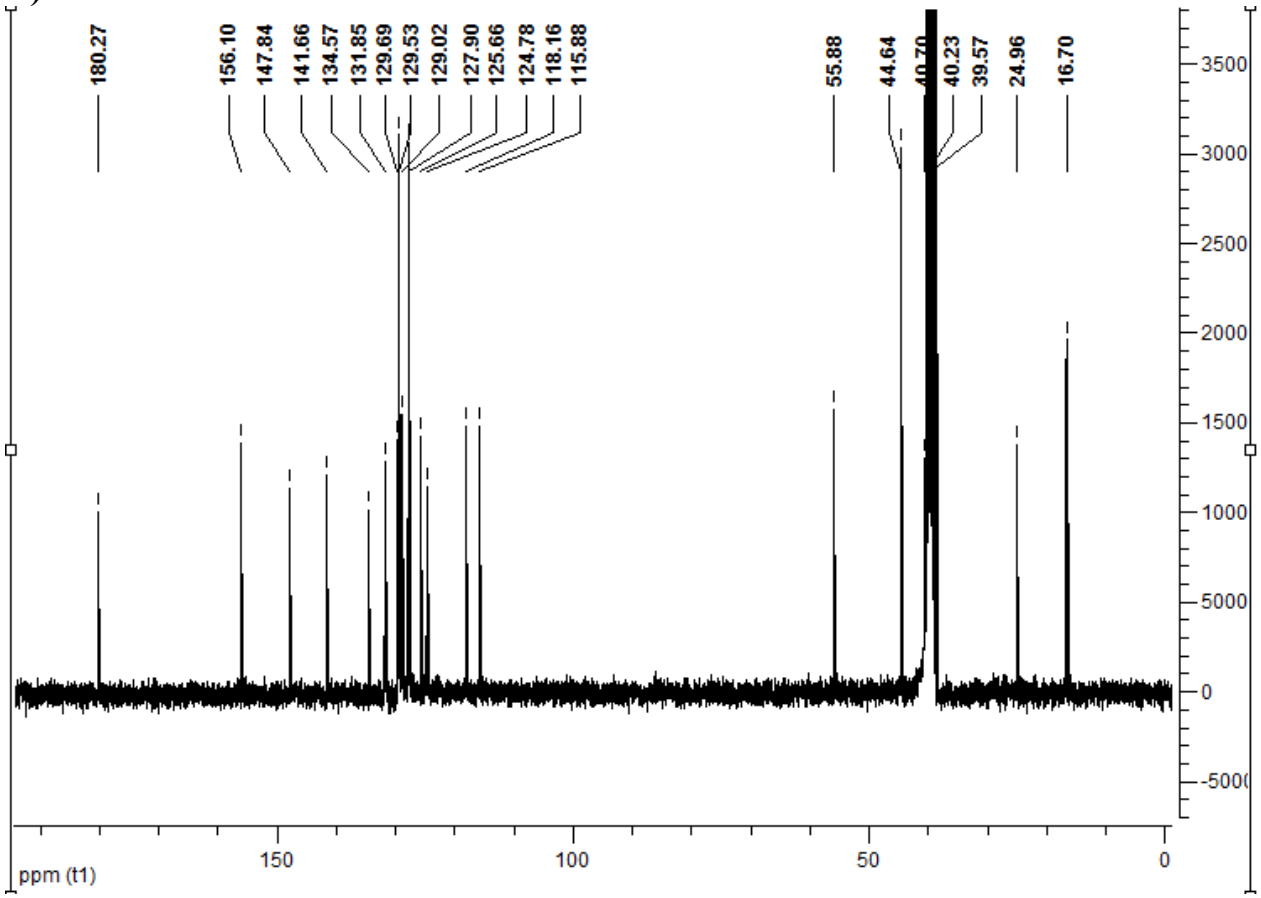


Figura 41: Estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV com os carbonos nomeados (A) e espectro de C^{13}-RMN (75 MHz) do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em DMSO d_6 (B).

Tabela 31: Atribuição proposta para os sinais de C^{13}-RMN do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (Figura 41)

Atribuição	Valores medidos δ, ppm	Valores simulados (ChemDraw$^{(R)}$) δ, ppm
A	55,88	52,9
B	55,88	55,7
C	24,96	33,4
D	147,84	175,5
E	44,64	38,0
F	44,64	38,0
G	147,84	173,3
H	40,23	29,5
I	40,70	30,2
J	156,10	171,2
K	129,69	133,3
L	180,27	178,2
M	118,16	121,7
N	125,66	125,8
O	124,78	123,4
P	131.85	135,2
Q	115,88	116,1
R	141,66	156,2
S	134,57	153,7
T	129,53	130,3
U	127,90	127,9
V	129,02	128,6
X	127,90	127,9
Y	129,02	128,6
W	127,90	127,9
Acetato de etila	16,70	-
Dimetilsulfóxido, DMSO	39,57	-

A análise do espectro de C^{13}-RMN do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (Figura 41-B), realizada com o auxilio da simulação do mesmo no ChemDraw$^{(R)}$ (Figura 40), mostra que foram obtidos sinais que podem ser relacionados aos carbonos da estrutura química de interesse (Tabela 31). Nota-se que boa parte dos sinais atribuídos apresentaram descolamento químico bastante semelhante ao previsto (por exemplo, sinais com valores medidos de 180,3, 129,0 e 127,9 ppm e valores previsto de 178,2, 128,6 e 127,9 ppm, respectivamente). Alguns sinais estão bastante deslocados em relação a previsão (por exemplo, os sinais com valores medidos de 24,9 e 147,8 ppm e valores previstos de 33,4 e 175,5, respectivamente). De maneira geral, o espectro obtido apresenta perfil semelhante ao previsto, no entanto, não é possível deduzir a estrutura molecular do composto sintetizado com base nesse espectro. Para isso, seriam necessários

estudos adicionais de caracterização por RMN, por exemplo estudos de acoplamento de conjugação H^1-C^{13} (como HETCOR, HMQC, HSQC).

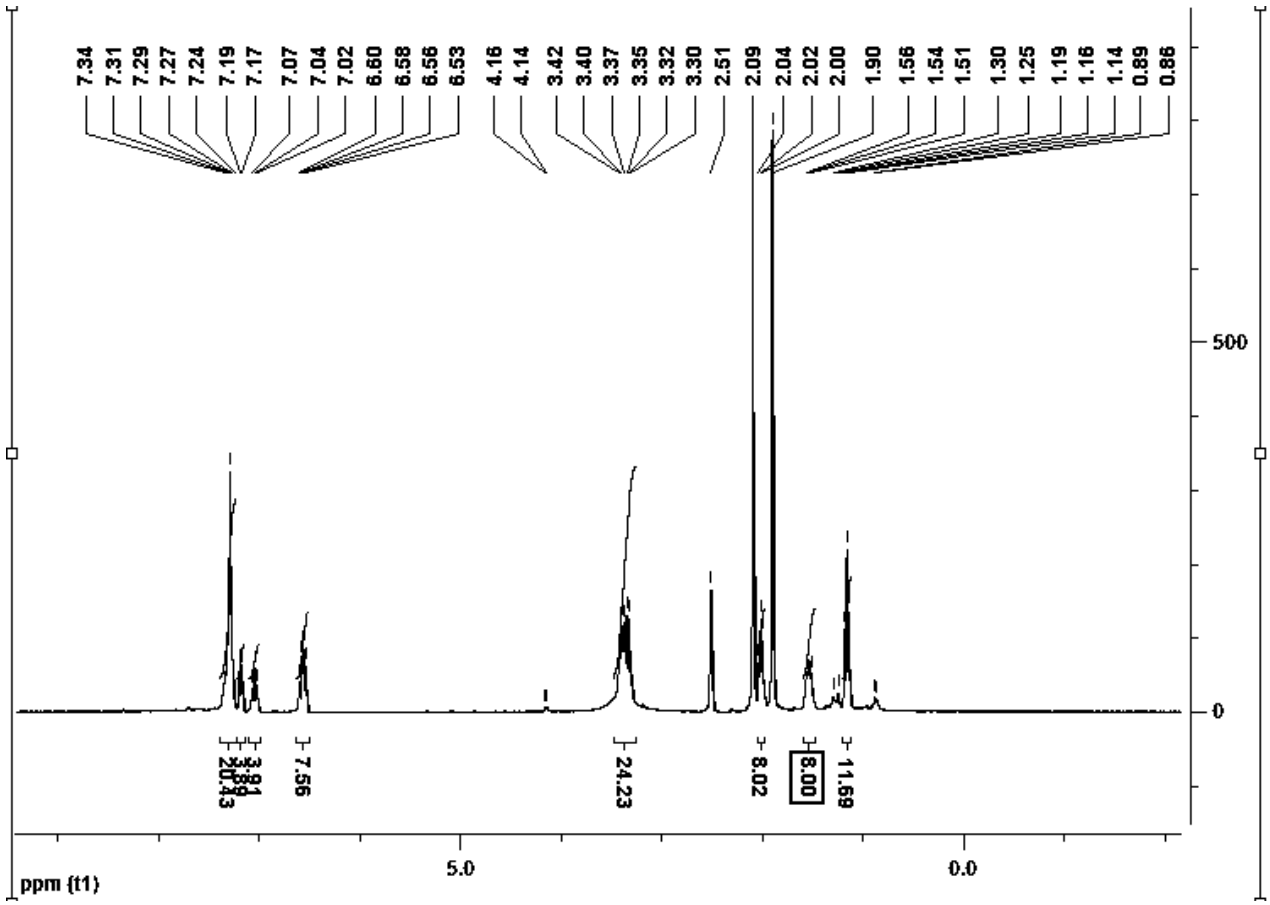
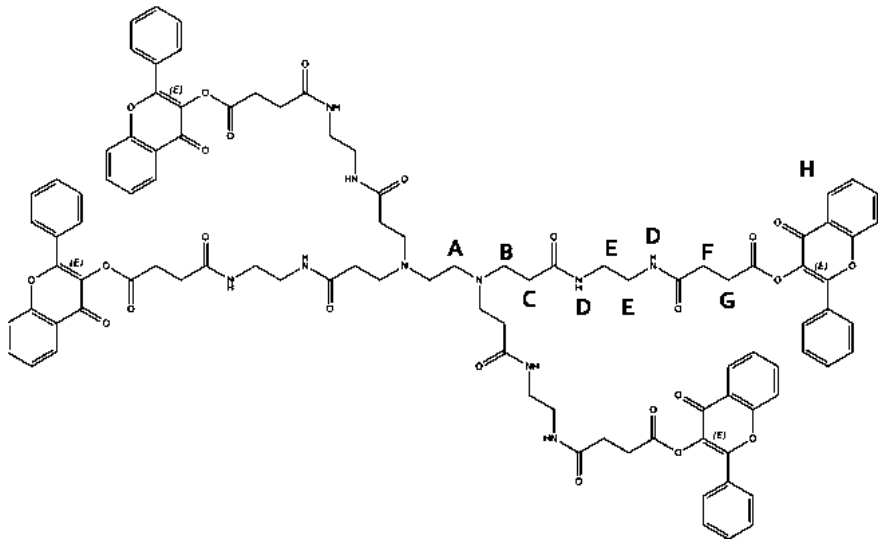


Figura 42: Espectro de H^1-RMN (300 MHz)do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, purificado por CCD preparativa em sílica-gel.

A)



B)

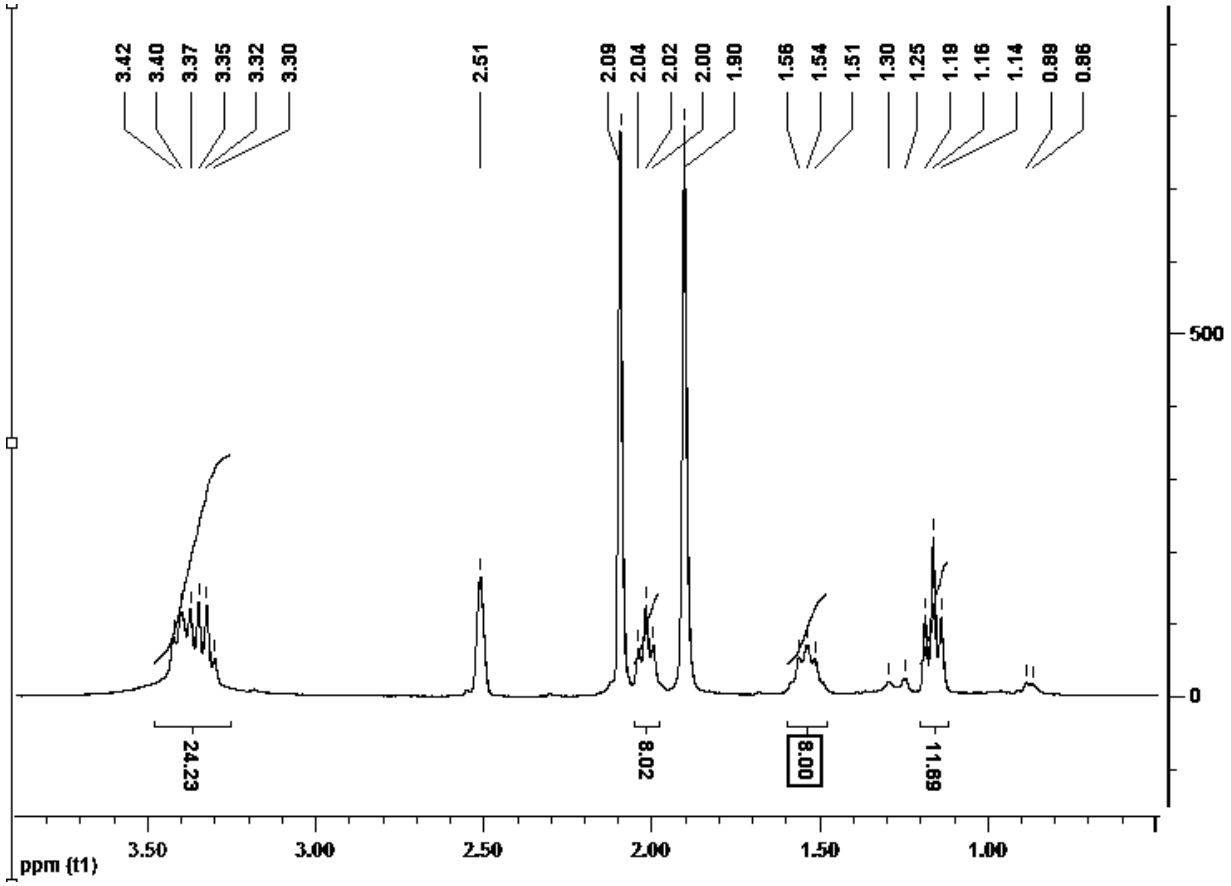


Figura 43: Estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV com os hidrogênios nomeados (A) e espectro de H^1-RMN (300 MHz) desse composto, purificado por CCD preparativa em sílica-gel, na região entre 0 e 3,9 ppm, em DMSO-d_6.

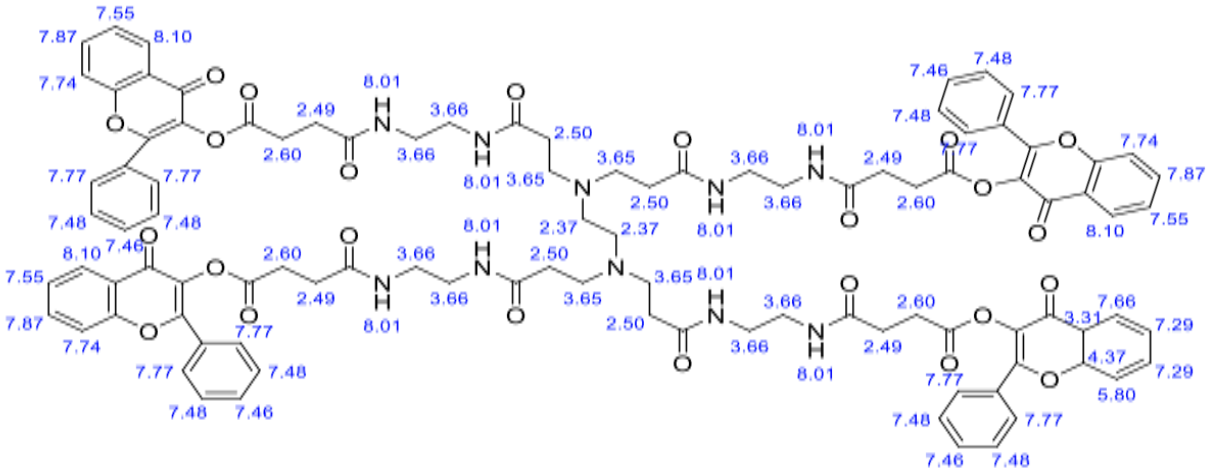


Figura 44: Estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV com os valores de deslocamento químico, em ppm, do espectro de H^1-RMN previstos com o software ChemDraw(R).

Tabela 32: Atribuição proposta para os sinais de H^1-RMN do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV purificado por CCD preparativa em sílica gel (Figuras 42 e 43)

Atribuição	**Valores medidos, δ, ppm**	**Valores simulados (ChemDraw(R)), δ, ppm**	**Multiplicidade**	**Número teórico de hidrogênios**
A	1,16	2,37	Singleto	4
B	3,40, J = 6 Hz	3,63	Tripleto	8
C	1,16, J = 6 Hz	2,50	Tripleto	8
D	Não detectado	8,01	Dois tripletos	8
E	3,34	3,66	Quarteto	16
F	2,02, J = 6 Hz	2,49	Tripleto	8
G	1,54, J = 6 Hz	2,60	Tripleto	8
H	6,56 – 7,34	7,46 – 8,01	Multipleto	36
Acetato de etila	4,15, 1,90, 0,89	-	Quarteto, singleto, tripleto	-
DMSO	2,51	-	Singleto	-

O espectro de H^1-RMN do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV purificado por CCD preparativa (sílica-gel) é apresentado nas Figuras 42 e 43. Observam-se sinais que podem ser atribuídos aos hidrogênios A, B, C, E, F, G e H da estrutura almejada, com multiplicidade e número de hidrogênios coerentes com o esperado (Tabela 32), o que confirma a identidade estrutural do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV sintetizado.

O sinal A não foi detectado isoladamente. Acredita-se que o mesmo se sobrepõe ao sinal C, uma vez que o número de hidrogênios calculados na integração desse sinal (doze) é coerente com a soma dos hidrogênios A e C.

Os sinais A, C e G encontram-se deslocados em relação ao valores previstos pelo software ChemDraw(R) (Tabela 32), o que pode estar relacionado a efeitos de interações intra e intermoleculares não considerados na simulação. Para os demais hidrogênios (com exceção D) a semelhança entre os valores medidos e simulados é satisfatória (Tabela 32).

O sinal D não foi detectado, o que provavelmente ocorre por se tratar de hidrogênios ligados diretamente a átomo muito eletronegativo (nitrogênio). Esses hidrogênios geralmente apresentam sinais de baixa intensidade ou não são detectados, uma vez que são trocados com o solvente e estão sujeitos a ligações de hidrogênio (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMIE, 2005).

Adicionalmente, são observados sinais referentes a resíduo do solvente acetato de etila, utilizado na transferência de frascos do material. Os sinais desse solvente em 4,15 ppm (quarteto, 2H) e 0,89 ppm (tripleto, 3H) apresentam baixa intensidade, o que indica a baixa concentração do mesmo.

O singleto em 2,09 ppm, mostra a presença de impureza desconhecida, que pode estar relacionada à degradação da 3-hidroxiflavona (remanescente no material bruto) quando em contato com a sílica-gel utilizada na purificação, uma vez que a mancha relativa a esse subproduto está presente na CCD do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV purificado por CCD.

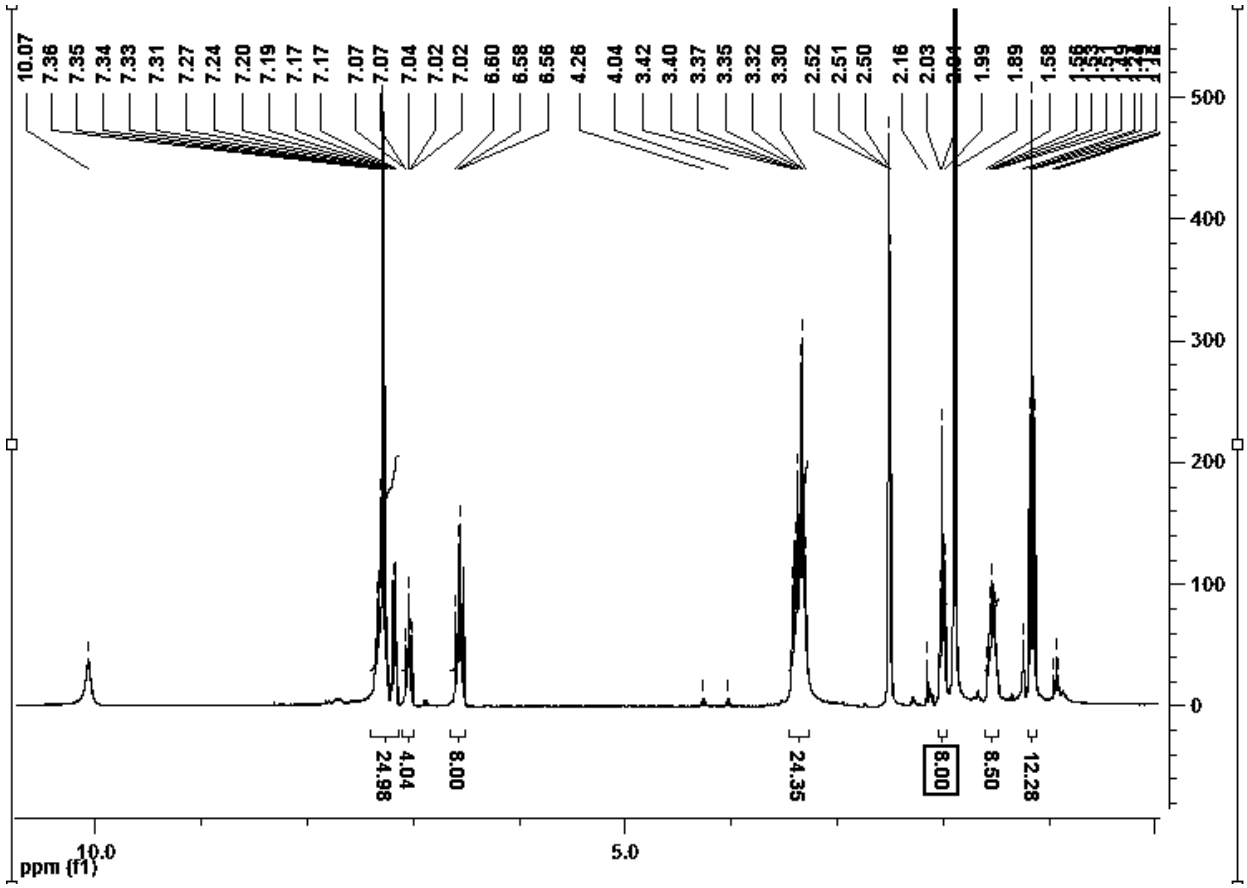
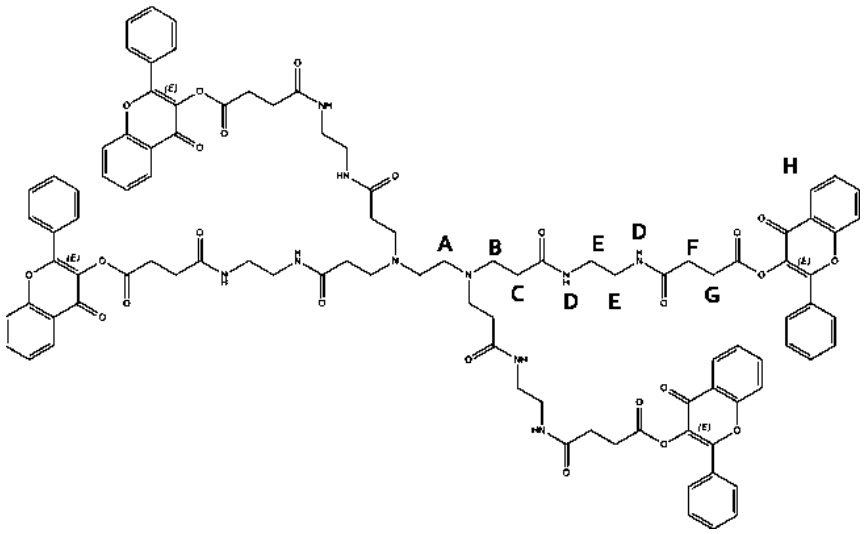


Figura 45: Espectro de H^1-RMN (300 MHz) do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, purificado em colunas de Sephadex-LH20 e sílica-gel, em DMSO-d_6.

A)



B)

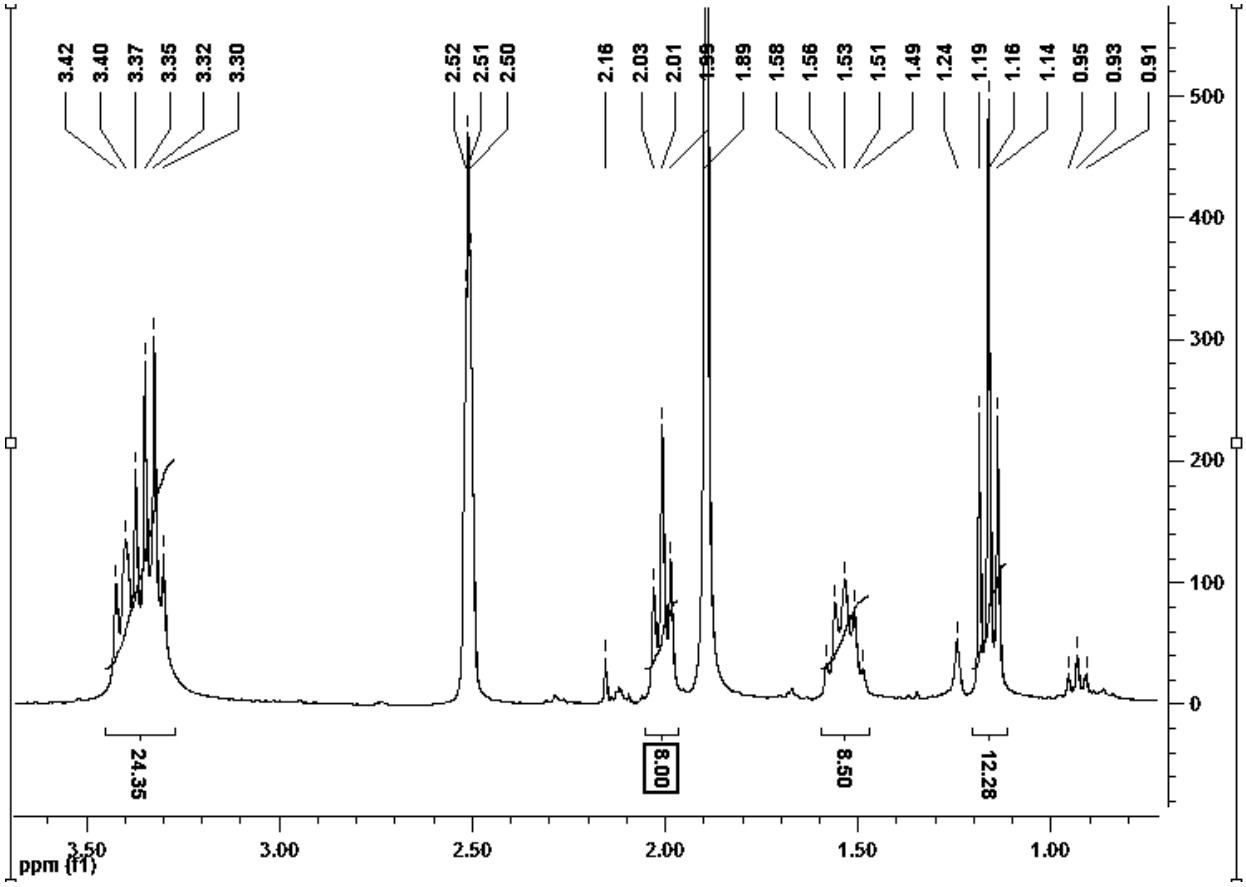


Figura 46: Estrutura química do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV com os hidrogênios nomeados (A) e espectro de H^1-RMN (300 MHz) do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, purificado em colunas de Sephadex-LH20 e sílica-gel, ampliado na região em 0 e 3,7 ppm, em DMSO-d_6 (B).

Tabela 33: Atribuição proposta para os sinais de H^1-RMN do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, purificado em colunas de Sephadex-LH20 e sílica gel, (Figuras 45 e 46)

Atribuição	**Valores medidos, δ, ppm**	**Valores simulados (ChemDraw$^{(R)}$), δ, ppm**	**Multiplicidade**	**Número teórico de hidrogênios**
A	1,16	2,37	Singleto	4
B	3,40, J = 6 Hz	3,63	Tripleto	8
C	1,16, J = 6Hz	2,50	Tripleto	8
D	Não detectado	8,01	Dois tripletos	8
E	3,34	3,66	Quarteto	16
F	2,01, J = 6 Hz	2,49	Tripleto	8
G	1,53 J = 6 Hz	2,60	Tripleto	8
H	6,56 – 7,36	7,46 – 8,01	Multipleto	36
Acetato de etila	4,15, 1,89, 0,93	-	Quarteto, Singleto, Tripleto	-
Dimetilsulfóxido, DMSO	2,51	-	Singleto	-

O espectro de H^1-RMN do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV purificado em duas etapas de cromatografia preparativa (com colunas de Sephadex-LH20 e de sílica-gel) apresentado nas Figuras 45 e 46-B é semelhante ao espectro obtido após purificação em CCD preparativa (Figuras 42 e 43-B). Observa-se que o emprego de Sephadex-LH20 na remoção da 3-hidroxiflavona residual permitiu a obtenção de material com maior pureza, livre da impureza responsável pelo sinal em 2,09 ppm. No entanto, são detectados sinais de baixa intensidade (0,93, 1,24, 2,01 e 10,07 ppm), não atribuídos, que indicam a presença de pequena quantidade de impurezas desconhecidas no produto final.

Por fim, a caracterização do produto da esterificação da 3-hidroxiflavona com PAMAM-G0-SUC (carboxílico) por CCD, UV-vis, FT-IR, C^{13}-RMN e H^1-RMN, apresentada, mostra dados coerentes com a obtenção do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, com alta pureza. No entanto, seria interessante expandir a caracterização da identidade desse dendrímero com o uso de espectrometria de massas e técnicas avançadas de RMN, o que pode ser realizado em trabalhos futuros.

4.6.5. Liberação química da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV

No ensaio de liberação da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV por HPLC-UV, monitoraram-se as áreas dos picos de ambos compostos ao longo do tempo. As áreas do pico do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV foram normalizadas pela área inicial e avaliou-se o acréscimo da área do pico da 3-hidroxiflavona.

Os resultados da liberação em pH 1,2 estão apresentados na Figura 47. Observa-se que o dendrímero de 3-hidroxiflavona é estável por 16 horas, a 37,0 ^{o}C, em meio ácido, o que é confirmado pela ausência de pico no tempo de retenção da 3-hidroxiflavona.

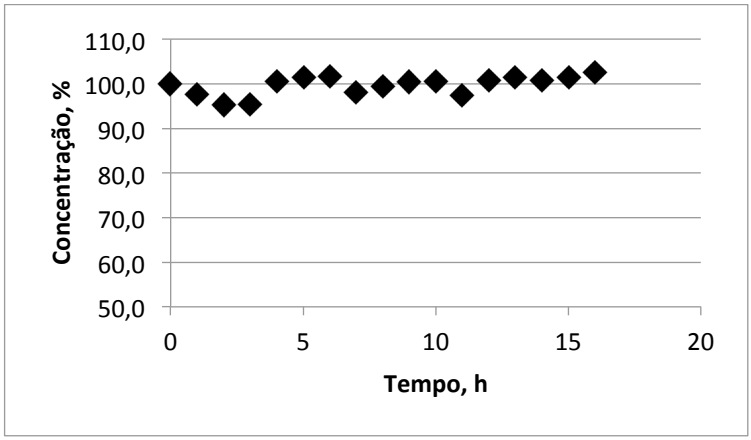


Figura 47: Concentração de PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em solução gástrica simulada sem enzima (pH 1,2) em função do tempo.

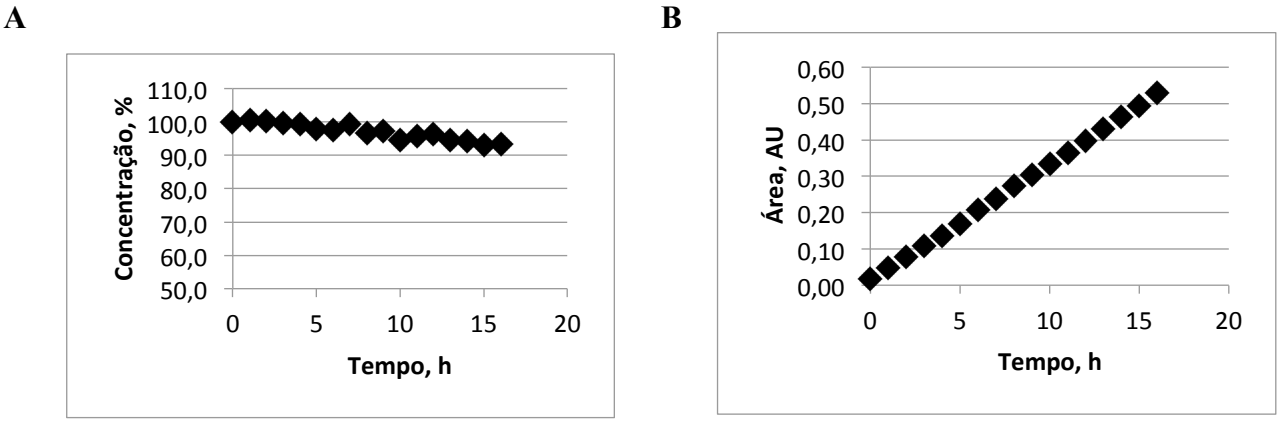


Figura 48: Liberação da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em tampão citrato (pH 5,0), sendo: A – concentração do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em função do tempo e B – área do pico da 3-hidroxiflavona em função do tempo.

Após 16 horas de ensaio em tampão citrato, pH 5,0 (Figura 48-A), observou-se leve redução (cerca de 7 %) da concentração de PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV, além da detecção e acréscimo da concentração de 3-hidroxiflavona (Figura 48-B).

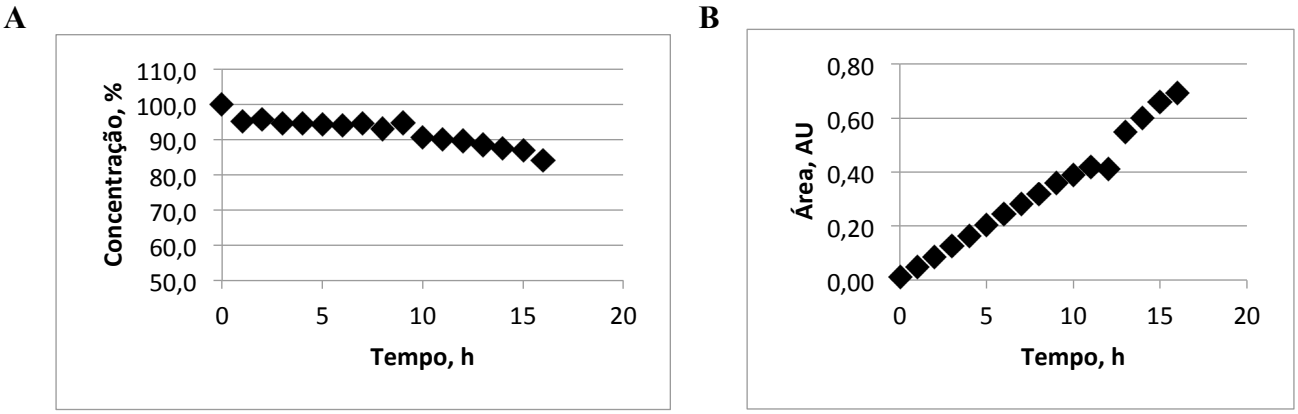


Figura 49: Liberação da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em tampão fosfato (pH 7,4), sendo: A – concentração do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em função do tempo e B – área do pico da 3-hidroxiflavona em função do tempo.

Em tampão fosfato, pH 7,4, o PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV (Figura 49-A) foi hidrolisado, com liberação de 3-hidroxiflavona (Figura 49-B), em uma taxa maior que a observada no ensaio em pH 5,0, sendo que, houve redução de cerca de 16 % da concentração do dendrímero tetrassubstituído após 16 horas a 37,0 ^{o}C.

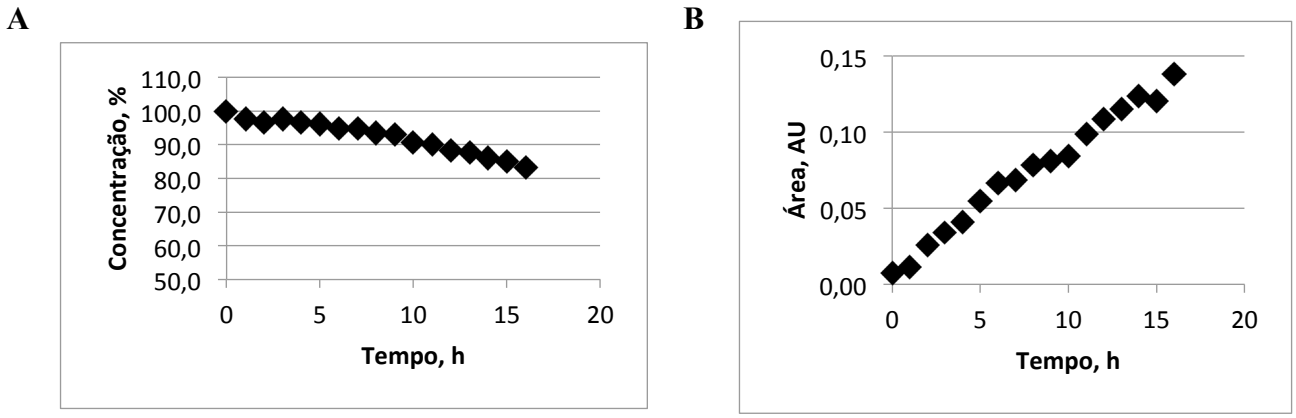


Figura 50: Liberação da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em tampão borato (pH 8,5), sendo: A – concentração do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em função do tempo e B – área do pico da 3-hidroxiflavona em função do tempo.

A Figura 50 mostra os resultados da liberação da 3-hidroxiflavona em pH 8,5. Nota-se que nesse pH a redução da concentração do dendrímero ocorre em uma taxa bastante semelhante à observada em pH 7,4.

De maneira geral, os dados são coerentes com o esperado para a hidrólise de ésteres, uma vez que a liberação foi mais rápida em meio alcalino do que em meio ácido.

Os ensaios de liberação da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV mostraram que não houve liberação em solução gástrica simulada e a mesma foi lenta em pH entre 5,0 e 8,5. Provavelmente, no caso da aplicação do dendrímero por administração oral, a porção ativa da molécula não seria liberada no estômago, mas, sim, lentamente, no lúmen intestinal, podendo o dendrímero ser absorvido. Ademais, no plasma e outros tecidos a taxa de liberação deve ser aumentada pela ação de esterases, o que corrigiria o problema da baixa biodisponibilidade do protótipo ativo.

4.8 ATIVIDADE DO PAMAM-G0-SUC-3OH-FLAV EM AMASTIGOTAS DE *T. CRUZI*

Os resultados dos ensaios da atividade *in vitro* do PAMAM-G-0-SUC-3-OH-FLAV, comparativamente aos dendrímeros PAMAM-G0 e PAMAM-G0-SUC, além dos compostos de referência, benznidazol e nifurtimox, em amastigotas encontram-se na Tabela 34.

Observa-se que o dendrimero PAMAM-G0-SUCC-3-OH-FLAV apresenta EC50 (potência) menor que as referências, benznidazol e nifurtimox, contra a cepa Y (Curitiba), e maior que o benznidazol e menor que o nifurtimox em cepa Y (SS). Os valores de atividade máxima, em porcentagem (eficácia), foram maiores que o benznidazol em ambas as cepas, maior que o nifurtimox em cepa Y (SS) e menor que esse em cepa Y (Curitiba). Os dendrímeros intermediários não apresentaram atividade significativa, conforme esperado. Os valores de CC50 (citotoxicidade) foram menores que o nifurtimox nas cepas de *T. cruzi* avaliadas e o índice de seletividade foi menor que aqueles das referências.

Em resumo, o dendrímero de 3-hidroxiflavona apresentou atividade moderada em *T. cruzi* e baixa seletividade. Tais resultados sugerem que o PAMA-G0-SUCC-3-OH-FLAV requer otimização molecular, por exemplo, pela substituição de uma das unidades de 3-hidroxiflavona por grupo diretor, manose ou inositol, que dirigem o dendrímero para o receptor de manose dos macrófagos (WILSON, PEARSON, 1988) e, consequentemente, para o interior do parasito, considerando-se, nesse último caso, que o inositol é precursor biossintético de constituintes da superfície celular, cuja molécula inicial é o fosfolipídeo fosfatidilinositol (OLIVEIRA, EINICKER-LAMAS, 2000; EINICKER-LAMAS *et al.,* 2000).

Tabela 34: Resultados da atividade em amastigotas de *T. cruzi*, cepas Y (Curitiba) e Y (SS) em comparação com referências.

Composto	*Trypanosoma cruzi* Y (Curitiba)						*Trypanosoma cruzi* Y (SS)					
	EC50 (mM)		CC50 (mM)		Índice de seletividade (IS)	Atividade Máx (%)	EC50 (mM)		CC50 (mM)		Índice de seletividade (IS)	Atividade Máx (%)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão			Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão		
Benznidazol	3,29	0,43	--	--	>122	100,38	62,632	17,91	--	--	>6,4	88,17
Nifurtimox	1,60	0,04	71,90	45,08	45,08	105,93	5,99	0,14	70,29	0,70	11,73	92,45
PAMAM G0-SUC	--	--	--	--	--	0,82	--	--	--	--	--	26,01
PAMAM-G0	--	--	--	--	--	5,25	--	--	--	--	--	18,32
PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV	**10,74**	**1,02**	**7,49**	**1,39**	**0,70**	**102,03**	**7,82**	**4,81**	**9,07**	**1,10**	**1,16**	**177,71**

Sendo: EC50, concentração do composto que causa redução de 50% na infecção, comparativamente à referência e é medida de potência; CC50, que consiste na concentração do composto que causa redução de 50% no número de células, e é medida de citotoxicidade; Atividade máxima, que corresponde à inibição máxima da infecção, em comparação aos controles e é medida de eficácia contra o parasito; SI, índice de seletividade, calculado pela divisão de CC50 por EC50.

5. CONCLUSÕES

Desenvolveu-se método linear, específico e preciso para a quantificação simultânea da 3-hidroxiflavona e do produto de esterificação desta com ácido málico (3-OH-AM), por HPLC-UV. Ademais, com pequenas alterações desse método foi possível avaliar a pureza cromatográfica dos intermediários da síntese do dendrímero de 3-hidroxiflavona com base em ácido málico como espaçante e inositol como núcleo.

O método de determinação da 3-hidroxiflavona por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) foi desenvolvido e teve seu desempenho avaliado com sucesso. Comparando-se esse método com a determinação por HPLC conclui-se que, de maneira geral, o método por HPLC foi mais sensível, preciso e exato na quantificação da 3-hidroflavona. Por outro lado, o método por CE foi mais rápido e de menor custo. Esses métodos mostraram-se úteis no suporte à otimização dos processos de síntese e purificação dos potenciais pró-fármacos dendriméricos estudados.

Observou-se que a liberação química da 3-hidroxiflavona a partir do intermediário 3-OH-AM em tampões com diferentes valores de pH, se dá de forma lenta em meio ácido e, progressivamente, mais rápida em condições de neutras a alcalinas. Adicionalmente, o intermediário 3-OH-AM mostrou-se instável em água e em metanol. Provavelmente, esse efeito ocorre porque o ácido carboxílico livre do 3-OH-AM contribui para a auto-hidrólise da ligação éster, já que o composto 3-OH-AMP, em que o ácido carboxílico foi esterificado (protegido), é menos suscetível à hidrólise.

O 3-OH-AM mostrou-se instável às condições reacionais de diferentes estratégias de síntese do dendrímero, avaliadas pelo grupo (LAPEN), o que impediu a obtenção do dendrímero de 3-hidroxiflavona com base em ácido málico como espaçante e inositol como núcleo, conforme proposto, levando ao planejamento de novas estruturas moleculares para o dendrímero de 3-hidroxiflavona, como o derivado de PAMAM.

Embora os métodos desenvolvidos inicialmente no trabalho não tenham sido aplicados para o derivado do PAMAM, estes serão de grande utilidade, quando os dendrímeros derivados de 3-OH-AM, com inositol ou outro foco central, forem obtidos.

Quanto ao derivado de PAMAM, o dendrímero PAMAM-G0 funcionalizado com quatro unidades de 3-hidroxiflavona usando ácido succínico como espaçante foi sintetizado e caracterizado quanto à identidade e pureza.

A estratégia de síntese divergente utilizada envolveu a síntese dos intermediários PAMAM-G-0,5, PAMAM-G0 e PAMAM-G0-SUC e, por fim, a esterificação desse último com a 3-hidroxiflavona. A purificação dos compostos intermediários e produto final envolveu o uso de técnicas como cromatografia preparativa, extração líquido-líquido e recristalização. Já a identificação desses compostos foi realizada com o auxílio das técnicas de FT-IR, H^1-RMN e C^{13}-RMN, além de ESI^+-MS, no caso do PAMAM-G0.

Não se observou liberação da 3-hidroxiflavona a partir do PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV em solução gástrica simulada e a mesma foi lenta em pH entre 5,0 e 8,5. Provavelmente, no caso da aplicação desse potencial pró-fármaco dendrímero no tratamento de doenças, por administração oral, a porção ativa da molécula não seria liberada no estômago, mas, lentamente, no lúmen intestinal, podendo o dendrímero ser absorvido. Ademais, no plasma e em outros tecidos, a taxa de liberação deve ser aumentada pela ação de esterases, o que corrigiria o problema da baixa biodisponibilidade do protótipo ativo.

O PAMAM-G0-SUC-3-OH-FLAV e os intermediários PAMAM-G0 e PAMAM-G0-SUC foram ensaiados em amastigotas de cepas de *T. cruzi*, Y (Curitiba) e Y (SS), comparativamente ao benznidazol e ao nifurtimox (fármacos de referência). O dendrímero de 3-hidroxiflavona apresentou atividade moderada e baixo índice de seletividade. Tais resultados sugerem a necessidade de otimização molecular em busca de maior seletividade, por exemplo, pela substituição de uma das unidades de 3-hidroxiflavona por grupo diretor manose ou inositol, que dirige o dendrímero para o interior do parasito ou do macrófago, onde o parasito pode ficar. Os intermediários PAMAM-G0 e PAMAM-G0-SUC não apresentaram atividade, conforme esperado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P; GUPTA, U; JAIN, N.K. Glycoconjugated peptide dendrimers-based nanoparticulate system for the delivery of chloroquine phosphate. *Biomaterials*, v.28, p.3349-3359, 2007.

ANDRONOV, A.; FRECHET, J.M.J. Light-harvesting dendrimers. *Chemical Communications*, p.1701-1710, 2000.

BHADRA, D.; YADAV, A.K; BHADRA, S; JAIN, N.K. Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, v.295, p.221-233, 2005.

BIRICOVA, V.; LAZNICKOVA, A. Dendrimers: analytical characterization and applications. *Bioorganic Chemistry*, v.37, p.185-192, 2009.

CAMINADE, A.M.; DELAVAUX-NICOT, B.; LAURENT, R.; MAJORAL, J.P. Sensitive sensors based on phosphorus dendrimers. *Current Organic Chemistry*, v.14, p.500-515, 2010.

CARTER, B.; DESAI, A.; SHARMA, A. Use of poly(vinyl alcohol)-coated capillaries for separation of amino-terminated polyamidoamine dendrimers. *Electrophoresis*, v.28, p.335-340, 2007.

CASON, C.A.; OEHRLE, S.A.; FABRE, T.A.; GIRTEN, C.D.; WALTERS, K.A.; TOMALIA, D.A. HAIK, K.L.; BULLEN, H.A. Improved methodology for monitoring poly(amidoamine) dendrimers surface transformations and product quality by Ultra Performance Liquid Chromatography. *Journal of Nanomaterials*, v. 2008, article ID 456082, 7 pages.

CHAN, K. C.; VEENSTRA, T. D.; MCNEIL, S. E.; HALEEM, I. J. Analysis of fullerene-based nanomaterial in serum matrix by CE. *Electrophoresis,* v.28, p.1518-1524, 2007.

CHENG, Y. *Dendrimer-based drug delivery systems*: from theory to practice. Shanghai: John Wiley & Sons, 2012, 514 p.

CHUNG, M.C; FERREIRA, E.I; SANTOS, J.L; GIAROLLA, J; RANDO, D.G; ALMEIDA, A.E; BOSQUESI, P.L; MENEGON, R.N; BLAU, L Prodrugs for the treatment of neglected diseases. *Molecules*, v.13, p.616-677, 2008.

CHUNG, M.C.; GÜIDO, R.V.C.; MARTINELLI, T.F.; GONÇALVES, M.F.; POLLI, M.C.; BOTELHO, K.C.A.; VARANDA, E.A.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E.I. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic hydroxymethhylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.11, p.4779-4783, 2003.

CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GÜIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas no transporte de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.155-179, 2005.

DAVIES, C.; CARDOZO, R.M.; NEGRETTE, O.S.; MORA, M.C.; CHUNG, M.C.; BASOMBRÍO, M.A. Hydroxymethylnitrofurazone is active in a murine model of Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, p. 3584-3589, 2010.

D'EMANUELE, A.D.; ATTWOOD, D. Dendrimer - drug interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, p.2147-2162, 2005.

De JESUS, E.; FLORES, J. C. Dendrimers: solutions for catalyst separation and recycling-a review. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v.47, p.7968-7981, 2008.

DESAI, A.; SHI, X.; BAKER, J. R. JR. CE of poly(amidoamine) succinamic acid dendrimers using a poly(vinyl alcohol)-coated capillary. *Electrophoresis,* v.29, p.510-515, 2008.

DNDi, Drugs for Neglected Diseases Initiative. Diseases and Projects. http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases Acesso: 5 de dezembro de 2013.

Dos SANTOS, K.S.C.R; MATOS, J.R.; FERREIRA, E.I. Synthesis and chemical characterization of a polymeric prodrug for prolonged release of nitrofurazone. *Macromolecular Symposia*, v.299/300, p.113-123, 2011.

DRIBEK, M.; LE POTIER, I.; RODRIGUES, A. PALLANDRE, A. FATTAL, E.; TAVERNA, M. Determination of binding constants of vasoactive intestinal peptide to poly(amidoamine) dendrimers designed for drug delivery using ACE. *Electrophoresis,* v.28, n.13, p.2191-2200, 2007.

D`SOUZA, A.J.M.; TOPP, E.M. Release from polymeric prodrugs: linkages and their degradation. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.93, p.1962-1979, 2004.

DUTTA, T.; JAIN, N.K.; McMILLAN, N.A.J.; PAREKH, H.S. Dendrimer nanocarriers as versatile vectors in gene delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v.6, p.25-34, 2010.

EINICKER-LAMAS, M.; ALMEIDA, A.C.; TODOROV, A.G.; CASTRO, S.L.; CARUSO-NEVES, C.; OLIVEIRA, M.M. Characterization of the myo-inositol transport system in *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Biochemistry*, v.267, p.2533-2537, 2000.

EOM, K. D.; PARK, S. M.; TRAM, H. D.; KIM, M. S.; YU, R. N.; YOO, H. Dendritic α,ε-poly(L-lysine)s as delivery agents for antisense oligonucleotides. *Pharmaceutical Research*, v.24, n.8, p.1581-1589, 2007.

ERMER, J.; MILLER, J. H. McB. (Eds.) *Method validation in pharmaceutical analysis. A Guide to best practice.* Weinheim: WILEY-VCH, 2005. 403p.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERCQ, J. Determination of flavones, flavonol and flavanone aglycones by negative ion trap mass spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry,* v.12, p.707-715, 2001.

FERNANDEZA, L.; CALDERO, M.; MARTINELLI, M.; STRUMIA, M.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M.; SILBERB, J.J.; SANTO, M. Evaluation of a new dendrimeric structure as prospective drugs carrier for intravenous administration of antichagasic active compounds. *The Journal of Physical Chemistry*, v.21, p.1079-1085, 2008.

FERREIRA, E.I.; GIAROLLA, J. Pró-fármaco dendrimérico. Processo para sua preparação e composições contendo os mesmos. Protocolo de nº. 018070068714 junto à delegacia do INPI. 2007.

FRÉCHET, J. M. J. Functional polymers and dendrimers: Reactivity, molecular architecture, and interfacial energy. *Science,* v.263, p.1710–1715, 1994.

GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; RANDO, D.G.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling study on the disassembly of dendrimers designed as potential antichagasic and antileishmanial prodrugs. *Journal of Molecular Modeling*, v.18, p.2257-2269, 2012.

GIAROLLA, J.; RANDO, D.G.; PASQUALOTO, K.F.M.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling as a promising tool to study dendrimer prodrugs delivery. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v.939, p.133-138, 2010.

GIORDANENGO, R.; MAZARIN; WU, J.; PENG, L.; CHARLES, L. Propagation of structural deviations of poly(amidoamine) fan-shape dendrimers (generations 0-3) characterized by MALDI and electrospray mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry,* v. 266, p. 62-76, 2007.

HEEGAARD, P.M.H.; BOAS, U.; SORENSEN, N.S. Dendrimers for vaccine and immunostimulatory uses. A review. *Bioconjugate Chemistry*, v.21, 405-418, 2010.

HEIGL, N.; BACHMANN, S.; PETTER, C.H.; MARCHETTI-DESCHMANN, M.; ALLMAIER, G.; BONN, G.K.; HUCK, C.W. Near-infrared spectroscopic study on guest-host interactions among G0-G7 amine-terminated poly(amidoamine) dendrimers and porous silica materials for simultaneously determining the molecular weight and particle diameter by multivariate calibration techniques. *Analytical Chemistry,* v.81, n.4, p.5655-5662, 2009.

HERRERO-MARTÌNEZ, J.M.; SANMARTIN, M.; ROSÉS, M.; BOSCH, E.; RÀFOLS, C. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* v.26, p.1886-1895, 2005.

HONG, S.; RATTAN, R.; MAJOROS, I.J.; MULLEN, D.G.; PATERS, J.L.; SHI, X.; BIELINSKA, A.U.; BLANCO, L.; ORR, B.G.; BAKER JR, R.J.; HOLL, M.M.B. The role of ganglioside GM1 in cellular internalization mechanisms of poly(amidoamine) dendrimers. *Bioconjugate Chemistry*, v.20, p.1503-1513, 2009.

IHRE, H.R.; DE JESÚS, O.L.P.; SZOKA, JR, F.C.; FRÉCHET, J.M.J. Polyester dendritic systems for drug delivery applications: Design, synthesis, and characterization. *Bioconjugate Chemistry*, v.13, p.443−452, 2002.

JAKOBSEN, P.H.; WANG, M.W.; NWAKA, S. Innovative partnerships for drug discovery against neglected diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.5, p.e1221-e1224, 2011.

JOCKUSCH, S.; TURRO, N.J.; OTTAVIANI, M.F.; TOMALIA, D.A. An EPR and Fluorescence Depolarization study of intermolecular interactions of dendrimers at medium and highly concentrated aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science,* v.256, p.223–227, 2002.

LALWANI, S.; VENDITTO, V.J.; CHOUAI, A.; RIVERA, G.E.; SHAUNAK, S.; SIMANEK, E.E. Electrophoretic behavior of anionic triazine and PAMAM dendrímeros: Methods for improving resolution and assessing purity using capillary electrophoresis. *Macromolecules,* v.42, p.3152-3161, 2009a.

LALWANI, S.; CHOUAI, A.; PEREZ, L.M.; SANTIAGO, V.; SHAUNAK, S.; SIMANEK, E.E. Mimicking PAMAM dendrimers with amphoteric, hybrid triazine dendrimers: A comparison of dispersity and stability. *Macromolecules,* v.42, p.6723-6732, 2009b.

LERICHE, E-D.; MAIRE, F.; GROSSEL, M.C.; LANGE, C.M.; LOTELIER-BOURHIS, C. Off-line capillary electrophoresis/matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry for analysis of synthesized poly(amido)amine dendrimers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.26 p.1718-1724, 2012.

LIU, M.; FRÉCHET, J.M.J. Designing dendrimers for drug delivery. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, v.2, p.393-401, 1999.

LÓPEZ-ANDARIAS, J.; GUERRA, J.; CASTAÑEDA, G.; MERINO, S.; CEÑA, V.; SÁNCHEZ-VERDÚ, P. Development of microwave-assisted reactions for PAMAM dendrimers synthesis. *European Journal of Organic Chemistry*, v.2012, p.2331-2337, 2012.

MAJOROS, S.N.J.; WILLIAMS, C.R.; TOMALIA, D.A.; BAKER, J.R. New dendrimers: synthesis and characterization of POPAM PAMAM hybrid dendrimers. *Macromolecules,* v.41, p.8372-8379, 2008.

MCGRATH, D.V. Dendrimer disassembly as a new paradigm for the application of dendritic structures. *Molecular Pharmaceutics*, v.2, n.4, p.253-263, 2005.

MELTZER, A. D.; TIRRELL, D. A.; JONES, A. A.; INGLEFIELD, P. T.; HEDSTRANG, D. M.; TOMALIA, D. A. Chain dynamics in poly(amidoamine) dendrimers: a study of carbon-13 NMR relaxation parameters. *Macromolecules*, v.25, n.18, p.4541-4548, 1992(a).

MELTZER, A. D.; TIRRELL, D. A.; JONES, A. A.; INGLEFIELD, P. T. Chain dynamics in poly(amidoamine) dendrimers: a study of proton NMR relaxation parameters. *Macromolecules*, v.25, n.18, p.4549-4552, 1992(b).

MENJOGE, A.R.; KANNAM, R.M.; TOMALIA, D.A. Dendrimer-based drugs and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discovery Today*, v.15, n.5, p.171-185, 2010.

MONTEALEGRE, C.; RASINES, B.; GÓMEZ, R.; DE LA MATA, F.J.; GARCÍA-RUIZ, C.; MARINA, M.L. Characterization of carboxylate-terminated carbosilane dendrimers and their evaluation as nanoadditives in capillary electrophoresis for vegetable protein profiling. *Journal of Chomatography A*, v.1234, p.16-21, 2012.

MORAES, C.B.; GIARDINI, M.A.; KIM, H.; FRANCO, C.H.; ARAUJO-JUNIOR, A.M.; SCHENKMAN, S.; CHATELAIN, E.; FREITAS-JUNIOR, L.H. *Trypanossoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Scientific Reports*, v.4, n.4703, p.1-11, 2014.

MULLEN, D.G.; HOL, M.M.B. Heterogeneous ligand-nanoparticle distributions: A major obstacle to scientific understanding and commercial translation. *Accounts of Chemical Research*, v.44, n.11, p.1135–1145, 2011.

NIEDERHAFNER, P.; BEDNÁROVÁ, L.; BUDESÍNSKY, M.; SAFARÍK, M.; EHALA, S.; JEZEK, J.; BOROVICKOVÁ, L.; FUCÍK, V.; CEROVSKÝ, V.; SLANINOVÁ, J. Melectin MAPs: the influence of dendrimerization on antimicrobial and hemolytic activity. *Amino Acids,* v.39, p. 1553-1564, 2010.

NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; ATTWOOD, D.; D'EMANUELE, A. Synthesis, characterization and stability of dendrimer prodrugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.308, p.175-182, 2006.

NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; ATTWOOD, D.; D'EMANUELE, A. *In vitro* evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.336, p.183-190, 2007.

OLIVEIRA, M.M.; EINICKER-LAMAS, M. Inositol metabolism in *Trypanosoma cruzi*: potential target for chemotherapy against Chagas' disease. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.72, p.413-419, 2000.

PATEL, T.D.; PARIKH, B.N.; GOTHI, G.D.; DAVE, J.B.; PATEL, C.N. A review on pharmaceutical and non pharmaceutical applications of dendrimer. *Journal of Global Pharma Technology*, v.2, p.5-7, 2010.

PAVIA, D.L, LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S., VYVYAN, J.R. *Introduction to Spectroscopy*. Washington: Brooks/Cole CENGAGE Learning. Ed.5, 2009.

PELISSARI, D.M.; CECHINEL, M.P.; SOUSA-GOMES, M.L.; LIMA JÚNIOR, F.E.F. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.20, n.1, p.107-110, 2011.

PETERSON, J.; EBBER, A.; ALLIKMAA, V.; LOPP, M. Synthesis and CZE analysis of PAMAM dendrimers with an ethylenediamine core. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry*, v.50, n.3, p.156-166, 2001.

PHAM, M.H.; MENET, M.; DUGAY, A.; REGAZZETTI, A.; DAUZONNE, D.; AUZEIL, N.; SHERMAN, D, CHABOT, G.G. Characterization of monohydroxylated derivatives of the anticancer agent flavones-8-acetic acid by liquid chromatography with on-line UV and mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* v.21, p.3373-3386, 2007.

RAK, G.; FODOR, P.; ABRANKÓ, L. Three-step HPLC-EIS-MS/MS procedure for screening and identifying non-target flavonoid derivatives. *International Journal of Mass Spectrometry*, v.290, p.32-38, 2010.

ROMERO, E.L; MORILLA, M.J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.62, p.576-588, 2010.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S; MOSQUEIRA, V.C.F. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.62, p.560-575, 2010.

SANTOS, S.S.; FERREIRA, E.I.; GIAROLLA, J. Dendrimer Prodrugs. *Molecules*, v.21, n.6, p. 686-707, 2016.

SEDLÁKOVÁ, P.; SVOBODOVÁ, J.; MILKSIK, I.; TOMÁS, H. Separation of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers generations by dynamic coating capillary electrophoreses. *Journal of Chromatography B*, v.841, p.135-139, 2006.

SEKHON, B. S. An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, v.2, p.2-36, 2011.

SERAFIM, E. O.P.; SILVA, A. T. A.; MORENO, A. H.; VIZIOLI, E. O.; FERREIRA, E. I.; PECCININI, R. G.; RIBEIRO, M. L.; CHUNG, M. C. Pharmacokinetics of hydroxymethylnitrofurazone, a promising new prodrug for Chagas' disease treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.75, p.6106-6109, 2013.

SHARMA, A.; DESAI, A.; ALI, R.; TOMALIA, D.A. Polyacrylamide gel electrophoresis separation and detection of polyamidoamine dendrimers possessing various cores and terminal groups. *Journal of Chromatography A,* v.1081, p.238–244, 2005.

SHCHARBIN, D.; JANICKA, M.; WASIAK, M.; PALECZ, B.; PRZYBYSZEWSKA, M. ZABORSKI, M.; BRYSZEWSKA, M. Serum albumins have five sites for binding of cationic dendrimers. *Biochimica et Biophysica Acta,* v.1774, p.946-951, 2007.

SHI, X.; BÁNYAI, I.; LESNIAK, W. G.; ISLAM, M. T.; ORSZÁGH, I.; BALOGH P.; BAKER JR, J. R.; BALOGH, L. P. Capillary electrophoresis of polycationic poly(amidoanmine) dendrimers. *Electrophoresis*, v.26, p.2949-2959, 2005a.

SHI, X.; BÁNYAI, I.; RODRIGUEZ, K.; ISLAM, M. T.; LESNIAK, W.; BALOGH, L.P.; BAKER JR, J. R. J. Electrophoretic mobility and molecular distribution studies of poly(amidoamine) dendrimers of defined charges. *Electrophoresis,* v.27, p.1758-1767, 2006a.

SHI, X.; LESNIAK, W.; ISLAM, M. T.; MUNIZ, M. C.; BALOGH, L. P.; BAKER JR, J. R. Comprehensive characterization of surface-functionalised poly(amidoamine) dendrimers with acetamide, hydroxyl and carboxyl groups. *Colloids and Surfaces A*, v.272, p.139-150, 2006b.

SHI, X.; MAJOROS, I. J.; BAKER JR, J. R. Capillary electrophoresis of poly(amidoamine) dendrimers: From simple derivatives to complex multifunctional medical nanodevices. *Molecular Pharmaceutics*, v.2, n.4, p.278-294, 2005.

SHI, X.; MAJOROS, I. J.; PATRI, A. K.; BI, X.; ISLAM, M. T.; DESAI, A.; GASER, T. R.; BAKER JR, J. R. Molecular heterogeneity analysis of poly(amidoamine) dendrimers-based mono- and multifunctional nanodevices by capillary electrophoresis. *The Analyst*, v.131, p.374-381, 2006c.

SHI, X.; PATRI, A. K.; LESNIAK, W.; ISLAM, M. T.; BAKER JR, J. R.; BALOGH, L. P. Analysis of poly(amidoamine)-succinamic acid dendrimers by slab-gel and capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, v.26, p.2960-2967, 2005b.

SILVA, A. T. A. ; CASTRO, L. F. ; GÜIDO, R. V. C. ; CHUNG, M. C. ; FERREIRA, E. I . Advances in prodrug design. *Mini - Reviews in Medicinal Chemistry,* v.5, p.893-914, 2005.

SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X., KIEMIE, J.D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* New York: John Wiley & Sons, Inc. Ed.7, 2005.

SOSNIK, A.; CARCABOSO, A.M; GLISONI, R.J; MORETTON, M.A; CHIAPPETTA, D.A. New old challenges in tuberculosis: Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.62, p.547-559, 2010.

SOYEZ, H.; SCHACHT, E.; VANDERKERKEN, S. The crucial role of spacer group in macromolecular prodrug design. *Advanced Drug Delivery Review*s, v.21, p.81-106, 1996.

TANG, S.; JUNE, S.M.; HOWELL, B.A.; CHAI, M. Synthesis of salicylate dendritic prodrugs. *Tetrahedron Letters,* v.47, p.7671–7675, 2006.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro, in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, p.1352-1364, 2006.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Química Nova*, v.19, n.2, p.173-181, 1996.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; MADY, C.; FERNANDES, F. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American trypanosomiasis. *Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, v.5, p.222-235, 2007.

TIAN, J.; QIN, W. Quick and sensitive determination of flavonoids by capillary electrophoresis-potential gradient detection. *The Japan Society for Analytical Chemistry,* v.25, p.1119-1123, 2009.

TOMALIA, D.A. Architecturally driven properties based on the dendritic state. *High Performance Polymers*, v.13, p.S1-S10, 2001.

TOMALIA, D.A. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Progress in Polymer Science*, v.30, p.294-324, 2005.

TOMALIA, D.A.; NAYLOR, A.M.; GODDARD, W.A., III. Starburst dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter. *Angewandte Chemie, International Edition*, v.29, p.138–175, 1990.

TORASKAR, M.P.; PANDE, V.G.; KADAM, V.J. Dendrimer: A new approach in pharmacy. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, v.1, n.4, p.1100-1107, 2011.

VETTERLEIN, K.; BÜCHE, K.; HILDEBRAND, M.; SCRIBA, G.K.E.; LEHMANN, J. Capillary electrophoresis for the characterization of the complex dendrimeric contrast agent Gadomer. *Electrophoresis*, v.27, p.2400–2412, 2006.

VETTERLEIN, K.; BERGMANN, U.; BÜCHE, K.; WALKER, M.; LEHMANN, J.; LINSCHEID, M.W.; SCRIBA, G.K.E.; HILDEBRAND, M. Comprehensive profiling of the complex dendrimeric contrast agent Gadomer using a combined approach of CE, MS, and CE-MS. *Electrophoresis,* v.28, p.3088–3099, 2007.

VILLARAZA, A.J.L.; BUMB, A.; BRECHBIEL, M.W. Macromolecules, dendrimers and nanomaterials in magnetic resonance imaging: The interplay between size, function and pharmacokinetics. *Chemical Reviews*, v.110, p.2921-2959, 2010.

WILSON, M.E.; PEARSON, R.D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. *Infection and Immunity*, v.56, p.363-369, 1988.

WANG, S-P.; HUANG, K-J. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A,* v.1032, p.273-279, 2004.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursos. In: JOLLE, G., WOOLDRIGE, K.R.M. (Eds.) *Drug Design*: fact or fantasy? London: Academic Press, 1984. p.47-72.

YANG, H.; KAO, W. J. Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v.17, p. 3-19, 2006.

YU ZHANG; CHEN, J.; MA, X-M.; SHI, Y-P. Simultaneous determination of flavonoids in *Ixeridium gracile* by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* v.45, p.742-746, 2007.

ZHANG, J.; ZHOU, X. Novel 3-dimensional dendrimer platform for glycolipid microarray. *Biosensors and Bioelectronics* (2011).

ZOU, T.; OUKACINE, F.; LE SAUX, T.; COTTET, H. Neutral coatings for the study of polycation/multicharged anion interactions by capillary electrophoresis: Application to dendrigraft poly-L-lysines with negatively multicharged molecules. *Analytical Chemistry*, v.82, n.17, p.7362-7368, 2010.

ANEXO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 7787619/1 - Lorena Cristine Paes

Email:	lorenapaes@usp.br
Data de Nascimento:	24/10/1980
Cédula de Identidade:	RG - 4039971 - GO
Local de Nascimento:	Estado de Goiás
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Química - Universidade Estadual de Campinas - São Paulo - Brasil - 2004
Mestrado:	Química - Área: Química Analítica (1) - Universidade Estadual de Campinas - São Paulo - Brasil - 2007

Curso:	Doutorado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula:	15/05/2012
Início da Contagem de Prazo:	15/05/2012
Data Limite para o Depósito:	12/09/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 15/05/2012 até o presente. Email: hajudan@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 15/05/2012
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 15/05/2016 até 12/09/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 04/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 15/05/2012 Prorrogação em 04/04/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016

Impresso em: 07/09/2016 20:42:28

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 7787619/1 - Lorena Cristine Paes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5808-1/1	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos (Planejamento de Fármacos: As Bases para o Desenvolvimento de Candidatos a Anti-neoplásicos)	11/06/2012	17/06/2012	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBF5808-1/2	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos (Planejamento de Fármacos: As Bases para o Desenvolvimento de Candidatos a Anti-neoplásicos)	02/07/2012	08/07/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5724-7/1	Latenciação	14/08/2012	26/10/2012	90	6	100	B	N	Concluída
FBF5794-2/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	15/08/2012	23/10/2012	30	2	90	A	N	Concluída
FBF5705-5/1	Planejamento de Fármacos	20/08/2012	28/10/2012	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5784-2/1	Eletroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	17/10/2012	18/12/2012	90	6	100	A	N	Concluída
QFL5963-1/1	Dendrímeros como Nanocarreadores para “drug delivery” celular: Síntese, Caracterização e sua Interação com Interfaces Biológicas (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	08/12/2014	14/12/2014	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	24
Estágios:			
Total:	0	20	24

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:
1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 2878, de 26.08.2005..

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016
Impresso em: 07/09/2016 20:42:28

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 7787619/1 - Lorena Cristine Paes

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
43287	Elizabeth Igne Ferreira	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016
Impresso em: 07/09/2016 20:42:28