



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Desenvolvimento de transportadores neuroprotetores derivados de macrociclos permeáveis à barreira hematoencefálica

Maria Cristina Pereira Lemos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Graça Baltazar
Co-orientador: Prof. Doutora Carla Cruz

Covilhã, 6 de Junho 2016

Dedicatória

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

Agradecimentos

Nesta seção dos agradecimentos, não é o suficiente para agradecer a todas as pessoas que de alguma forma direta ou indiretamente me ajudaram neste longo percurso. Desta forma, deixo apenas algumas palavras de agradecimento a todos que me ajudaram a realizar um sonho.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora e co-orientadora, Professora Graça Baltazar e Professora Carla Cruz, respectivamente, por todo o apoio, disponibilidade, transmissão de conhecimentos e confiança depositada em mim ao longo deste ano e meio. Mas, essencialmente obrigada por me ajudarem a ultrapassar os problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho.

Um grande agradecimento a todos os meus amigos, colegas de curso e de laboratório por toda a compreensão e incentivos de força, mas acima de tudo por toda a vossa paciência.

Por último, e os mais importantes, à minha família nomeadamente aos meus pais e ao meu irmão, por terem proporcionado a realização de um sonho, mas principalmente por estarem sempre lá quando mais precisava, por nunca desistirem de acreditar em mim e pela força que me deram ao longo destes anos. Espero que daqui por diante, vos possa agradecer e compensar por tudo o que fizeram por mim. Obrigada do fundo do coração.

Resumo

A entrega de fármacos ao sistema nervoso central é dificultada pela presença da barreira hematoencefálica (BHE). Uma das possíveis estratégias consiste no uso de transportadores macrocíclicos derivados de calixarenos, devido à sua capacidade de penetração celular. Estes compostos possuem características semelhantes às ciclodextrinas (CDs), que pertencem à mesma família, e que conseguem permeabilizar a BHE. Assim sendo, este trabalho foca-se no desenvolvimento de compostos derivados de calixarenos, capazes de interagir com aminoácidos e permear a BHE. Os compostos foram sintetizados, purificados e caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A interação e formação dos complexos derivados de calixarenos e os aminoácidos L-leucina e L-isoleucina foram avaliadas por titulações de RMN de ^1H , de modo a identificar os locais de ligação envolvidos na formação do complexo. O efeito dos compostos na proliferação celular na linha celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foi avaliado por MTT, de modo a verificar a compatibilidade para serem usados como transportadores e agentes neuroprotetores. Para o derivado E foi ainda avaliado o efeito celular por avaliação da morfologia nuclear por microscopia de fluorescência.

Da síntese química resultam três macrocíclicos, os quais foram posteriormente estudados. A formação dos complexos de calixarenos (derivado E, Calix NH_2 e Calix Pyr) com aminoácidos foi seguida por RMN de ^1H . Os dados do ensaio de MTT em conjunto com os dados de morfologia nuclear, por microscopia de fluorescência mostraram que a exposição das células SH-SY5Y ao derivado E ou aos compostos Calix NH_2 e Calix Pyr, não alterou a viabilidade e a proliferação celular. Em conjunto estes resultados sugerem que o derivado E, os compostos Calix NH_2 e o Calix Pyr são moléculas promissoras para serem usados como moléculas com capacidade de permear a BHE.

Palavras-chave

Calixarenos, barreira hematoencefálica, aminoácidos e viabilidade celular.

Abstract

The delivery of drugs to the central nervous system is hindered by the presence of the blood brain barrier (BBB). One possible strategy to overcome this difficulty is the use of macrocyclic derivatives of calixarenes due its capacity to permeate cellular membranes. These compounds possess characteristics similar to cyclodextrins (CDs), which belong to the same family, and that can permeate the BBB. Thus, this work focuses on the development of calixarene derivatives capable of interacting with amino acids and permeate the BBB. The compounds were synthesized, purified and characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). The interaction and complex formation of calixarenes derivatives and amino acids L-leucine and L-isoleucine were evaluated by ¹H NMR in order to identify the binding sites involved in complex formation. To verify putative cytotoxic effects of these compounds cell viability and proliferation was assessed in human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) by the MTT assay and analysis of the nuclear morphology.

Chemical synthesis resulted in three macrocyclic compounds, which were subsequently studied. The formation of complexes between calixarene derivatives (E derivative, NH₂ and Calix Calix Pyr) and amino acids was followed by ¹H NMR. The MTT test data together with the information about the nuclear morphology showed that exposure of SH-SY5Y cells to the calixarene derived E or the Calix Calix Pyr NH₂ did not alter the viability or cellular proliferation. Together the results suggest that the derivative E and the compounds Calix Calix Pyr NH₂ are promising molecules for use as molecules with ability to permeate the BBB.

Keywords

Calixarenes, blood brain barrier, aminoacids and cell viability.

Índice

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Palavras-chave	vii
Abstract.....	vii
Keywords.....	ix
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Acrónimos.....	xix
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1. Calixarenos	1
1.1.1. Propriedades físico-químicas e estrutura	2
1.2. Calixarenos como estratégia de entrega de aminoácidos no Sistema Nervoso Central (SNC)	5
1.3. Métodos para estudar a interação entre os derivados de calixarenos e os aminoácidos	7
1.4. Avaliação dos efeitos celulares dos macrocíclicos derivados de calixarenos	8
Capítulo 2	10
Objetivos.....	11
2.1. Objetivos específicos	11
Capítulo 3	12

Materiais e Métodos.....	13
3.1. Síntese Química	13
3.1.1. Materiais	13
3.1.2. Procedimento de Cromatografia.....	13
3.1.3. Equipamentos	14
3.1.4. Procedimento experimental.....	14
3.1.4.1. Síntese do 2,2',2'',2'''-(((1 ⁵ ,3 ⁵ ,5 ⁵ ,7 ⁵ -tetra-terc-butil-1,3,5,7(1,3)- tetrabenzenociclo-octafano-1 ² ,3 ² ,5 ² ,7 ² -tetraoil) tetraquis(propano-3,1 -diil)) tetraquis (iosindolina-1,3-diona) (Derivado B)	16
3.1.4.2. Síntese do 3,3',3'',3'''- ((15,35,55,75-tetra-terc-butil-1,3,5,7(1,3)- tetrabenzenociclo-octafano-12,32,52,72 tetraoil)tetraquis(oxi))tetraquis (propan-1- amina) (Derivado C).....	17
3.1.3.3. Síntese do 2,2',2'',2'''-(((15,35,55,75-tetra-terc-butil-1,3,5,7(1,3)- tetrabenzenociclo-octafano-12,32,52,72 tetraoil)tetraquis(oxi))tetraquis (pentan- 5,1-diyl))tetraquis(isoindolina-1,3-diona) (Derivado D)	18
3.1.3.4. Síntese do 5,5',5'',5'''-(((15,35,55,75-tetra-terc-butil-1,3,5,7(1,3)- tetrabenzenociclo-octafano-12,32,52,72-tetraoil)tetraquis(oxi))tetraquis (pentan-1- amina) (Derivado E).....	19
3.1.3.5. Síntese do 15,35,55,75-tetranitro-1,3,5,7 (1,3)-tetrabenzenociclo- octafano-12,32,52,72-tetraol (Derivado F)	20
3.1.3.6. Síntese do 15,35,55,75-tetraamino-1,3,5,7 (1,3) -tetrabenzenociclo- octafano - 12,32,52,72-tetraol (Derivado G)	20
3.1.5. Outros compostos derivados de calixarenos	21
3.2. Análise da Interação dos Ligandos com os Aminoácidos.....	22
3.2.1. Técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	22
3.2.1.1. Materiais	22
3.2.1.2. Preparação dos Aminoácidos	22

3.2.1.3. Preparação dos ligandos	22
3.2.1.4. Preparação dos complexos ligandos-aminoácidos.....	23
3.2.1.5. Experiências de RMN	23
3.3. Avaliação Biológica dos transportadores macrociclos.....	24
3.3.1. Material	24
3.3.1.1. Reagentes	24
3.3.1.2. Equipamentos	24
3.3.2. Tipo de células utilizadas no estudo e a sua cultura	25
3.3.2.1. Células de Neuroblastoma humano (SH-SY5Y)	25
3.3.3. Técnicas de cultura celular	25
3.3.3.1. Preparação dos meios de cultura	25
3.3.3.2. Cultura Celular	26
3.3.3.3. Tripsinização.....	26
3.3.3.1. Contagem e Cultura celular.....	27
3.3.3.2. Estudo do efeito dos compostos na viabilidade celular	28
3.3.3.2.1. Derivados C, E e G.	28
3.3.3.2.2. Derivado E.	29
3.3.3.2.3. Calix NH ₂ , Calix Pyr e L-leucina.	31
3.3.3.3. Ensaio da viabilidade Celular - MTT	33
3.3.3.4. Microscopia de Fluorescência.....	34
3.3.4. Análise Estatística	35
Capítulo 4	36

Resultados e Discussão	37
4.1. Síntese Química	37
4.2. Análise da interação dos calixarenos com os aminoácidos.....	40
4.2.1. Titulação do aminoácido com o derivado E.....	40
4.2.2. Titulação do aminoácido com o Calix NH ₂ e com o Calix Pyr.....	40
4.3. Avaliação Biológica	42
4.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células SH-SY5Y	42
4.3.1.1. Efeitos dos derivados de calixarenos sintetizados nas células SH-SY5Y....	42
4.3.1.1.1. Análise da morfologia nuclear	46
4.3.1.1.2. Efeitos dos Calix NH ₂ , Calix Pyr e Complexos.	47
Capítulo 5	51
Conclusões	51
Capítulo 6	53
Perspetivas Futuras	53
Capítulo 7	54
Bibliografia	55

Lista de Figuras

Fig. 1: Estrutura molecular do calix[<i>n</i>]areno e as suas respetivas cavidades (adaptado Lo and Wong 2008).	2
Fig. 2: Representação esquemática da formação dos complexos de inclusão baseada em calixarenos e fármacos e a sua descomplexação (adaptado Zhou, Li, and Yang 2015).	3
Fig. 3: Conformações do calix[4]areno (adaptado Lo and Wong 2008).	4
Fig. 4: Estrutura representativa da Barreira Hematoencefálica (adaptado de Bicker et al. 2014).	6
Fig. 5: Reação de redução do MTT a cristais de formazano de MTT (adaptado por (Stockert et al. 2012).	9
Fig. 6: Esquema geral da síntese dos derivados de calix[4]areno. A) 4-terc-butilcalix[4]areno; C) 3,3',3'',3'''-((15,35,55,75-tetra-terc-butil-1,3,5,7(1,3)-tetrabenzenociclo-octafano-12,32,52,72 tetraol)tetraquis(oxi))tetraquis (propan-1-amina); E) 5,5',5'',5'''-((15,35,55,75-tetra-terc-butil-1,3,5,7(1,3)-tetrabenzenociclo-octafano-12,32,52,72-tetraol)tetraquis(oxi))tetraquis (pentan-1-amina); G) 15,35,55,75-tetraamina-1,3,5,7 (1,3) - tetrabenzenociclo-octafano - 12,32,52,72-tetraol.	15
Fig. 7: Compostos derivados de <i>p</i> -terc-butilcalix[4]areno. A) Calix-Pyr e o B) Calix NH ₂	21
Fig. 8: Esquema representativo da microplaca para o primeiro ensaio de todos os derivados nas diferentes concentrações (1, 10, 20 e 30 μM), com o tempo de incubação de 6h. (C= Controlo, meio sem soro; DMSO= dimetilsulfóxido; DC= derivado C; DE= derivado E; DG= derivado G).	28
Fig. 9: Esquema representativo das microplacas para o segundo ensaio, com os derivados à mesma concentração mas incubados a tempos diferentes. (C= Controlo; DMSO= dimetilsulfóxido; DC= derivado C; DE= derivado E; DG= derivado G)	29
Fig. 10: Esquema representativo das microplacas para o ensaio com o derivado E, a diferentes concentrações com a incubação a 6h. (C= Controlo; DMSO= dimetilsulfóxido e 0,01; 0,05; 0,1; 1,0; 1,5 μM e 5 μM as concentrações usadas para o derivado E).	30

Fig. 11: Esquema representativo das microplacas para o ensaio com o derivado E, a diferentes tempos de incubação com a concentração de 0,05 e 5 μ M. (C= Controlo; DMSO= dimetilsulfóxido; a roxa estão representados os tempos de incubação da concentração de 0,05 μ M e a laranja estão representados os tempos de incubação com a concentração de 5 μ M).	31
Fig. 12: Esquema representativo das microplacas para o ensaio com o composto Calix NH ₂ , Calix Pyr e L-leucina, a diferentes concentrações com a incubação a 6h. (C= Controlo; DMSO= dimetilsulfóxido e 1; 5; 10; 15 e 20 μ M as concentrações usadas para ambos os compostos. A azul corresponde ao Calix NH ₂ , o verde ao Calix Pyr e o vermelho à L-leucina).	32
Fig. 13: Esquema representativo das microplacas para o ensaio com o composto Calix NH ₂ , Calix Pyr, Calix NH ₂ complexado à L-leucina e Calix Pyr complexado à L-leucina a 10 μ M a diferentes tempos de incubação. (C= Controlo; DMSO= dimetilsulfóxido; AA= L-leucina. A roxo corresponde ao tempo de incubação das 6h, o laranja das 12h e o rosa das 24h).	33
Fig. 14: Reação química representante da redução do MTT a formazano.	34
Fig. 15: Compostos após a alquilação do composto de partida. i) Derivado B e o ii) Derivado D.	38
Fig. 16: Compostos finais resultantes da hidrazinólise. i): Derivado C e ii): Derivado E.	38
Fig. 17: Compostos resultantes da modificação do cone superior. i) Composto obtido pela reação de nitração (Derivado F), ii) Composto final resultante da reação NH ₂ NH ₂ (Derivado G).	39
Fig. 18: Derivados de calixarenos finais.	39
Fig. 19: Espetros de RMN de ¹ H da titulação do Calix NH ₂ :leucina, desde o Calix NH ₂ isolado até à proporção de 1:4.	41
Fig. 20: Espetros de RMN de ¹ H da titulação do Calix Pyr:leucina, desde o Calix Pyr isolado até à proporção de 1:4.	42
Fig. 21: Redução do MTT por células SH-SY5Y após o tratamento com as diferentes concentrações dos derivados de calixarenos sintetizados. As células foram incubadas durante 6 h com concentrações entre 1 μ M a 30 μ M. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média \pm SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's.	43

Fig. 22: Redução de MTT por células SH-SY5Y após incubação com os derivados de calixareno sintetizados na concentração de 30µM e durante a 6h, 12h, 24h e a 48h. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. *p <0,05; ***p <0,001 quando comparado com o controlo..... 44

Fig. 23: Gráfico da redução de MTT por células SH-SY5Y após a exposição por um período de 6h ao derivado E em concentrações entre 0,05µM a 5µM. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. ***p <0,001 quando comparado com o controlo..... 45

Fig. 24: Redução do MTT por células SH-SY5Y após incubação durante os tempos indicados com o derivado E 0,05 e 5µM. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. (Rosa: Derivado E, Azul: DMSO, Verde: Controlo)..... 46

Fig. 25: Efeito do derivado E (0,05 e 5µM) com incubação de 48 e 72h, numa cultura de células SH-SY5Y. Imagens de fluorescência de culturas de SH-SY5Y expostas ao derivado E, estas imagens foram obtidas através de microscópio de fluorescência Zeiss, usando uma ampliação de 63x. 47

Fig. 26: Redução do MTT por células SH-SY5Y após exposição a Calix NH₂ e Calix Pyr (1µM - 20µM) durante 6h. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. 48

Fig. 27: Redução de MTT por células SH-SY5Y após a exposição da L-leucina (1µM a 20µM) por um período de 6h. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. 49

Fig. 28: Redução de MTT por células SH-SY5Y após incubação de 6, 12 ou 24h com o Calix NH₂ (■), Calix Pyr (■) e os Complexos (▲) a 10µM. Os dados foram expressos em percentagem de controlo (◆) e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. ***p <0,05 quando comparado com o controlo. 50

Lista de Acrónimos

BHE/BBB	Barreira Hematoencefálica/ Blood-brain barrier
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CDs	Ciclodextrinas
D ₂ O	Água deuterada
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
FBS	Fetal bovine sérum - Soro Bovino Fetal
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MeOH	Metanol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico
PBS	Tampão Salino Fosfato
PFA	Paraformaldeído
SH-SY5Y	Células humanas do neuroblastoma
SNC	Sistema Nervoso Central
RMN/NMR	Ressonância Magnética Nuclear/Nuclear magnetic resonance
TMS	Tetrametilsilano
TSP	Trimetilsilil Propiónico

Capítulo 1

Introdução

Os investigadores têm dado importância ao tratamento de doenças cerebrais e ao desafio em entregar fármacos ao cérebro. Um dos grandes problemas que existe para a entrega de fármacos é que mais de 98% destes não consegue ultrapassar a BHE (Tabatabaei et al. 2015).

Uma das estratégias que tem vindo a ser estudadas para ultrapassar este problema é o uso de transportadores macrocíclicos derivados de calixarenos, visto que estes conseguem permear as membranas celulares (Bagnacani et al. 2013).

1.1. Calixarenos

Nas últimas três décadas, os calixarenos têm adquirido um papel importante tanto na ciência básica como na aplicada (de Fátima, Fernandes, and Sabino 2009). Os calixarenos são designados como a terceira geração dos recetores supramoleculares, como as CDs e os éteres de coroa (Sirit and Yilmaz 2009; Ebdelli et al. 2014). Estes são sintetizados a partir da reação de condensação entre o formaldeído e o fenol *p*-substituído. Os calixarenos pertence à classe dos macrocíclicos (Hu et al. 2015), e possuem duas cavidades, como se pode observar na Fig. 1, em que a cavidade superior é definida pelos substituintes dos anéis fenólicos e corresponde à parte hidrofóbica do calixareno, este possui também uma cavidade inferior que é composto pelos grupos hidroxilos dos fenóis tornando assim esta cavidade hidrofílica (Sirit and Yilmaz 2009; Lo and Wong 2008).

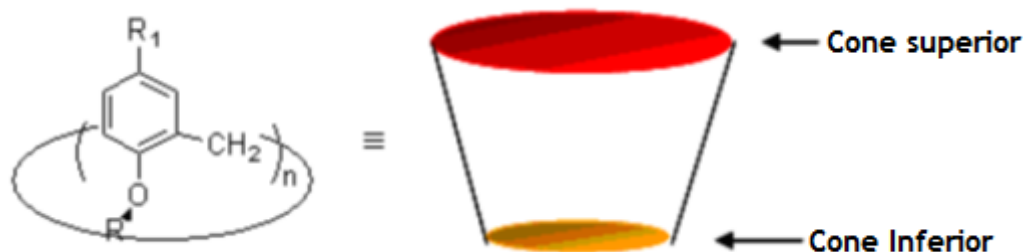


Fig. 1: Estrutura molecular do calix[n]areno e as suas respetivas cavidades (adaptado Lo and Wong 2008).

O número [n] dos calixarenos corresponde ao número de anéis fenólicos aromáticos numa única molécula, e este n pode ser 4, 6 ou 8 (Kurzątkowska et al. 2015). Os derivados destas moléculas possuem várias atividades biológicas tais como, antifúngica, antiviral, antibacteriana, anticancerígena, antioxidante, inibição enzimática e entre outras (de Fátima, Fernandes, and Sabino 2009; Creaven, Donlon, and McGinley 2009). Estes também possuem aplicações como recetores de catiões e aniões, transportadores de iões e sensores (Hong and Ham 2008).

Os calixarenos têm sido muito usados devido à sua grande capacidade de ser modificados em termos estruturais e funcionais (Memon and Yilmaz 2001). Esta capacidade tem sido muito útil para a conceção e desenvolvimento de novos fármacos, como por exemplo o calix[8]areno complexado com a heparina, o *p*-sulfonatocalix[4,6]areno, e o calix[6]arenohexaéster (Talotta, Gaeta, and Neri 2015; Da Silva, Lazar, and Coleman 2004). Entre essas características temos, a variabilidade conformacional, possuir uma cavidade adequada para iões ou moléculas de inclusão pequenas, ter a capacidade de ser usado como *scaffold*, ter a capacidade de formar complexos, formar ligandos ditópicos que possuam locais de ligação em ambas as cavidades, e ter a capacidade de combinar ligandos para a formação de sensores, vetores e dispositivos moleculares (de Fátima, Fernandes, and Sabino 2009).

1.1.1. Propriedades físico-químicas e estrutura

Os calixarenos possuem características únicas, nomeadamente estabilidade física e química, flexibilidade e aptidão de interações hóspede-hospedeiro (Ebdelli et al. 2014), o que permite que estes possam ser usados em diversas aplicações. Eles têm sido utilizados como

transportadores de fármacos, por causa da sua atividade biológica, estrutura química, afinidade e seletividade para moléculas alvo. A desvantagem destes compostos é terem fraca solubilidade em soluções aquosa. Para contornar este problema, os calixarenos podem ser modificados por adição de grupos polares ou por modificações quirais, como aminoácidos e péptidos (Drakalska et al. 2014). A utilização de aminoácidos e péptidos possui inúmeras vantagens, porque são moléculas naturais e possuem versatilidade quiral e os seus derivados são comerciais. Além disso, os aminoácidos promovem interações não covalentes que ajudam o processo de reconhecimento molecular (Wierzbicki, Jędrzejewska, and Szumna 2014). Os calixarenos formam complexos de inclusão com aminoácidos obtendo-se recetores sintéticos biologicamente ativos (Santos et al. 2015). A formação destes complexos ocorre através das interações hidrofóbicas, ligações de hidrogénio, empilhamento π - π , transferência de cargas, entre outras, com os calixarenos, os quais permitem a reversão de complexação para descomplexação, como se pode evidenciar na Fig. 2 (Zhou, Li, and Yang 2015).

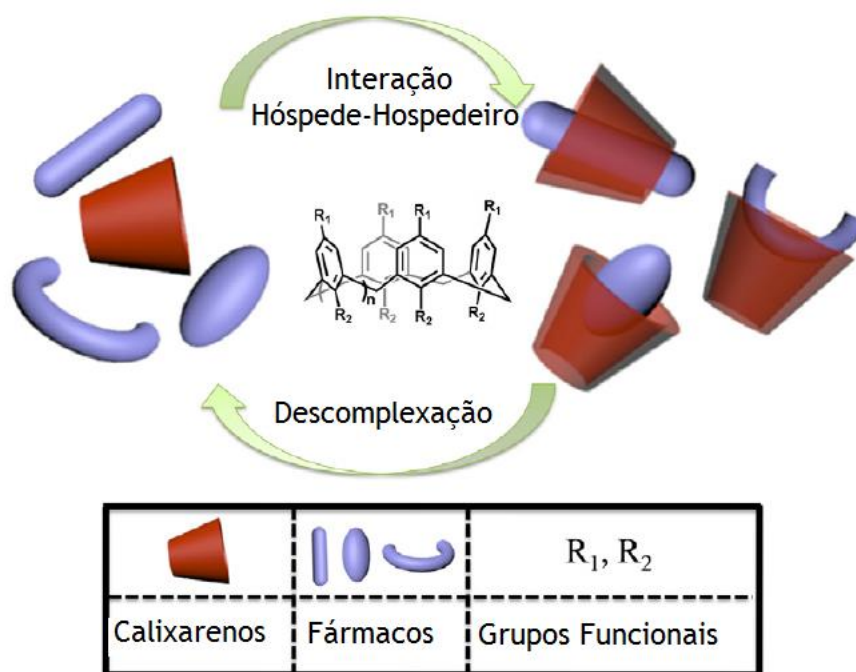


Fig. 2: Representação esquemática da formação dos complexos de inclusão baseada em calixarenos e fármacos e a sua descomplexação (adaptado Zhou, Li, and Yang 2015).

Da família dos calixarenos faz parte o calix[4]areno, o membro mais pequeno desta família (Hu et al. 2015), com capacidade de ligar a vários tipos de metais. *Diamond et al*, em 1986 demonstrou que este calixareno era um sensor para iões de sódio, permitindo a sua quantificação na corrente sanguínea. O calix[4]areno possui 4 conformações que diferem na posição dos grupos fenólicos, apresentando uma forma de “cone” quando os substituintes

possuem a mesma orientação, “cone-parcial” quando existe uma unidade aromática invertida em relação às outras, “1,2-alternado” e “1,3-alternado” quando existem dois anéis aromáticos invertidos (Lo and Wong 2008). Estas conformações podem ser visualizadas na Fig. 3.

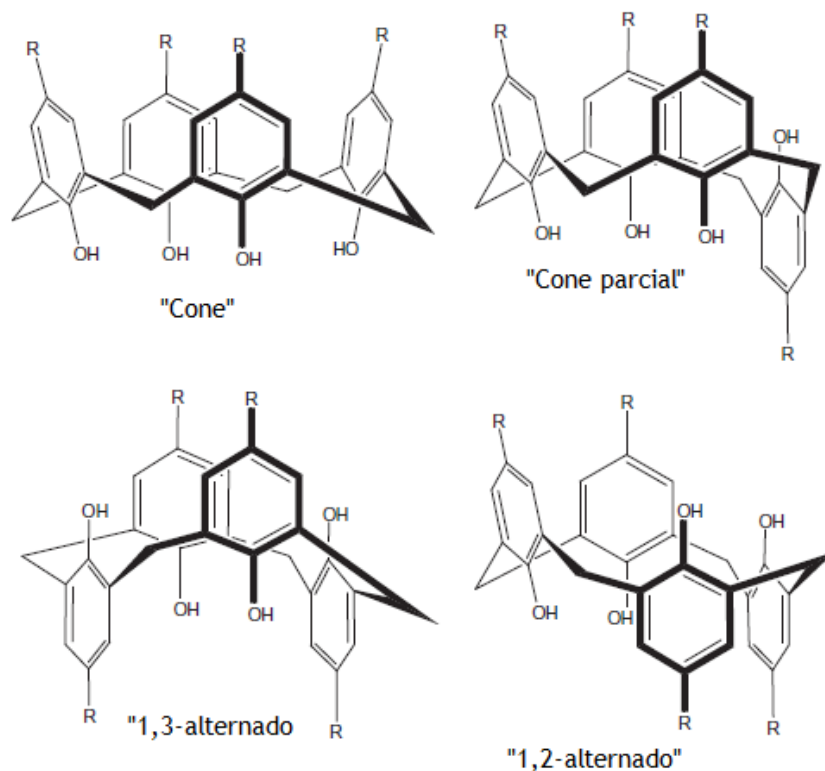


Fig. 3: Conformações do calix[4]areno (adaptado Lo and Wong 2008).

Os calixarenos são compostos ideais para a complexação com iões metálicos por causa da sua estrutura rígida. Ambas cavidades do calixareno podem ser modificadas de acordo com o que se pretende. Ou seja, no caso de se pretender complexar seletivamente com metais a cavidade a ser modificada é a superior, enquanto se a modificação for efetuada na cavidade inferior, esta vai contribuir para o aumento da sua cavidade o que permite complexar com moléculas maiores, aniões, aminoácidos entre outras podendo funcionar como transportador molecular (Patra et al. 2012). A inserção de grupos amins tanto no cone superior como no inferior favorece a conformação em forma de “cone” do calix[4]areno. Esta modificação causa coeficientes de partição maiores que o composto comercial, indicando assim uma maior solubilidade na camada orgânica sobre uma vastíssima gama de pH (Wolf et al. 1999). Os amino-calix[4]areno é uma das classes de calixarenos solúveis em água, este possuem interações fortes com os substratos aniônicos (Da Silva, Lazar, and Coleman 2004).

Neste contexto, a espectroscopia de RMN tem vindo a ser usada para caraterizar a interação e a formação de complexos de inclusão com outras moléculas, nomeadamente aminoácidos e péptidos (de Fátima, Fernandes, and Sabino 2009).

Por causa das caraterísticas e das vantagens que os calix[n]arenos possuem, estes foram os escolhidos para a realização deste trabalho, a fim de explorar a sua interação com aminoácidos e analisar a capacidade de permear a BHE.

1.2. Calixarenos como estratégia de entrega de aminoácidos no Sistema Nervoso Central (SNC)

O desenvolvimento de novas terapias contra doenças no SNC tem vindo a ser um enorme desafio por causa da presença da BHE (Kolter et al. 2015). A complexidade da BHE dificulta o acesso dos fármacos ao cérebro, causando assim uma exposição insuficiente do SNC ao princípio ativo dos fármacos (Bicker et al. 2014). Ou seja, mais de 98% dos agentes neuroterapêuticos não conseguem atravessar a BHE e nem conseguem atingir a sua concentração terapêutica (Kolter et al. 2015). Esta barreira foi identificada em experiências que envolveram a injeção de um corante no sangue periférico circulante em animais adultos, o qual corou todos os tecidos do corpo, exceto o cérebro, evidenciando a presença de uma barreira (Hagan and Ben-Zvi 2014). Estas experiências foram realizadas na Germania no final do século 19 e parte do século 20 (Banks 2015). A BHE é uma barreira dinâmica e forma uma interface complexa entre o sangue e o SNC. É constituída por células endoteliais microvasculares do cérebro cercado por péricitos, astrócitos, microglia e neurónios (Fig. 4). A interação entre estas células constitui a unidade funcional designada unidade neurovascular (Campos-Bedolla et al. 2014).

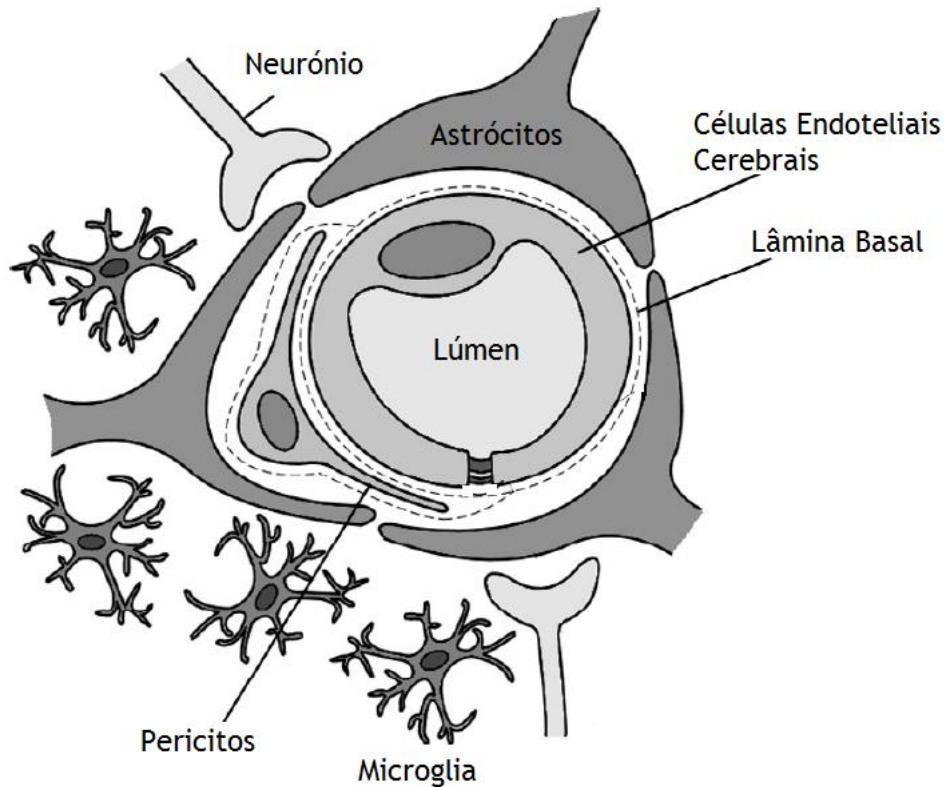


Fig. 4: Estrutura representativa da Barreira Hematoencefálica (adaptado de Bicker et al. 2014).

O endotélio microvascular na BHE é caracterizado pela presença de junções oclusivas entre as células endoteliais adjacentes, as fenestrações são completamente ausentes desta barreira e este possui poucas vesículas pinocitóticas. O endotélio microvascular tem um papel fundamental no transporte e na manutenção da homeostase do SNC (Campos-Bedolla et al. 2014; Mendes et al. 2015). Esta barreira é muito importante porque ajuda na regulação do microambiente delicado do SNC (favorecendo condições ótimas para o funcionamento neuronal) e é responsável pela manutenção de uma área relativamente imunitariamente privilegiada. A sua função está dependente da expressão e da localização das junções oclusivas e dos complexos de junções de adesão entre as células endoteliais do SNC (Alvarez et al. 2015).

O uso de sistemas de entrega de fármacos, por exemplo transportadores macromoleculares (CDs, calixarenos e éteres de coroa), vesículas coloidais e nanogéis, representam uma estratégia inovadora capaz de passar a BHE, e minimizar assim os níveis de fármacos sistêmicos e consequentemente os seus efeitos secundários. A combinação destes transportadores com materiais macromoleculares e lipídicos, como moléculas nativas/biológicas, conduziu ao avanço dos dispositivos supramoleculares. Estes dispositivos são promissores para a entrega de fármacos devido à sua capacidade de atravessar a BHE de

um modo não invasivo. Para obter uma ação local, a superfície dos dispositivos supramoleculares pode ser alterada adicionando pequenos peptídeos. Transportadores macromoleculares promissores para a entrega de fármacos são os calixarenos e as CDs, visto poderem formar interações intermoleculares com vários compostos. Destes transportadores as CDs têm-se destacado como sistemas de entrega de fármacos por terem a capacidade de entregar fármacos ao cérebro. Pois estas causam a permeabilização da BHE através da abertura temporária das junções de oclusão da BHE e a diminuição da atividade do complexo de efluxo da mutltidroga Glicoproteína P (P-gp). As CDs são oligossacáridos cíclicos formados por 6, 7 e 8 resíduos de glucose (resultantes da clivagem do amido (Vecsernyés et al. 2014)) e estas são denominadas por α -, β - e γ -CDs respetivamente (Paolino et al. 2011). Esta molécula é constituída por duas cavidades em forma de cone, em que a cavidade exterior é constituída pelos grupos hidroxilos tornando hidrofílica esta cavidade, por outro lado a cavidade interior é hidrofóbica e é formada pelas ligações glicosídicas de oxigénio (Vecsernyés et al. 2014). Estas conseguem formar complexos de inclusão que podem modificar as caraterísticas físico-químicas e biológicas das moléculas hóspedes, estabilizar ambos os componentes do sistema molecular e melhorar a solubilidade dos compostos farmacêuticos (Paolino et al. 2011). As CDs e os calixarenos pertencem à família de macrocíclicos e possuem caraterísticas muito semelhantes. Uma vez que já existem estudos que comprovam que as CDs conseguem permeabilizar a BHE, neste projeto selecionaram-se os calixarenos por estes serem semelhantes e provavelmente se comportarem da mesma forma.

1.3. Métodos para estudar a interação entre os derivados de calixarenos e os aminoácidos

Existem alguns métodos usados para estudar a interação e formação do complexo entre os derivados de calixareno e os aminoácidos/péptidos, tais como a espectroscopia de RMN e a espetrometria de massa (de Fátima, Fernandes, and Sabino 2009). A espectroscopia de RMN é uma técnica não destrutiva, permitindo a elucidação estrutural dos calixarenos e complexos. Esta é uma técnica com alta resolução para a caraterização de biomoléculas, fornecendo informações acerca da sua estrutura e dinâmica (Petroff 1988; Assfalg et al. 2015). O fundamento desta técnica baseia-se na capacidade de núcleos, essencialmente ^{13}C , ^1H , ^{31}P , ^{19}F , ^{15}N , entre outros (Pastor and Martínez-Viviente 2008), absorverem a energia de radiofrequências. Esta absorção é depois quantificada e origina um espetro representativo do composto (Solomons and Fryhle 2001). Através da análise dos espetros de RMN existem três aspetos essenciais que se deve ter em conta, o desvio químico, intensidade do sinal e a largura da linha. O desvio químico representa o ambiente químico local de cada núcleo, a

intensidade do sinal está relacionada com o número de núcleos de ressonância a uma dada frequência, enquanto a largura da linha tem relacionamento com a taxa de relaxação do spin transversal, que depende do tempo de correlação rotacional das espécies observadas (Assfalg et al. 2015). A técnica de RMN tem vindo a ser usada em estudos *in vitro*, o que possibilita estudar as interações entre os calixarenos e os ácidos nucleicos, proteínas ou até as membranas celulares (de Fátima, Fernandes, and Sabino 2009).

Na espectroscopia de RMN é possível obter espectros unidimensionais, bidimensionais, tridimensionais e quadridimensionais (Shigemitsu et al. 2015). Os espectros unidimensionais mais usados são os espectros de protão (^1H) e o espectro de carbono (^{13}C), mas existem outros tipos de espectros, como o espectro de azoto (^{15}N), de flúor (^{19}F) e de fosfato (^{31}P) (Pastor and Martínez-Viviente 2008). No espectro de ^1H é possível saber quantos prótons constituem a molécula, através da integração das ressonâncias. Este tipo de experiência possui vantagens significativas, tais como, o tempo de ensaio curto, preparação da amostra simples, sensível, não destrutivo e quantitativo (Park et al. 2015). Ele tem a maior sensibilidade de que qualquer outro núcleo estável é 100% abundante na natureza e é encontrado em praticamente todos os metabolitos. Devido a estas vantagens ao adquirir o espectro de ^1H -RMN é possível obter informações estruturais sobre macromoléculas complexas (Petroff 1988). Enquanto o espectro de ^{13}C é possível saber qual é o número total de carbonos existentes na molécula, mas também se consegue diferenciar estes carbonos em quaternários, terciários, secundários e primários. Em relação aos espectros bidimensionais podem ser separados em homonuclear (COSY, TOCSY) e em heteronuclear (HMBC, HSQC). Estes espectros permitem uma caracterização mais pormenorizada da molécula, visto que permite identificar a correlação e a interação entre os sinais obtidos nos espectros unidimensionais (Pastor and Martínez-Viviente 2008).

1.4. Avaliação dos efeitos celulares dos macrocíclicos derivados de calixarenos

O desenvolvimento de novas terapias para tratar algumas patologias no SNC tem sido um derradeiro desafio, e quando estas novas terapias são descobertas devem ser analisadas ao nível da viabilidade/proliferação celular.

Um dos ensaios mais usados para avaliar este aspeto são os ensaios que têm por base um sal tetrazólico como o brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)(Stepanenko and Dmitrenko 2015). Este ensaio foi descrito pela primeira vez por Mosman em 1983, e baseia-se na capacidade das células metabolicamente ativas reduzirem e converterem o MTT

(composto amarelo) em cristais de formazano de cor púrpura escuro e insolúveis em água (Angius and Floris 2015; Lupu and Popescu 2013; Stockert et al. 2012). Esta reação está representada na Fig. 5.

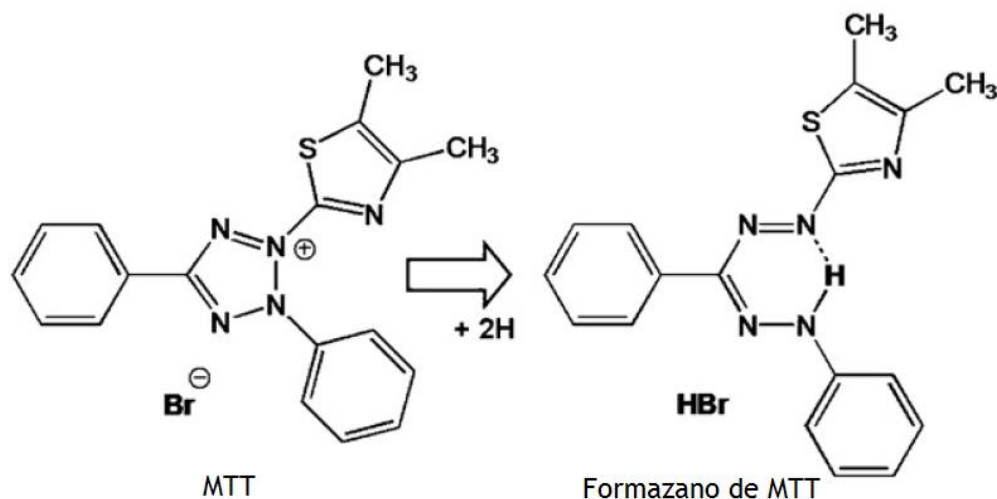


Fig. 5: Reação de redução do MTT a cristais de formazano de MTT (adaptado por (Stockert et al. 2012)).

O produto formado é solúvel em solventes orgânicos como o dimetilsulfóxido (DMSO) ou o isopropanol. A densidade ótica da solução formada é quantificada por espectrofotometria a um comprimento de onda compreendido entre os 450nm e os 600nm. A absorvância obtida é proporcional ao número de células viáveis (Lupu and Popescu 2013). A realização deste ensaio na elaboração do trabalho é essencial, pois o objetivo é sintetizar derivados de calixarenos que não sejam citotóxicos pois o objetivo é usar estes compostos como transportadores de aminoácidos através da BHE, sendo essencial que estes não provoquem danos a nível celular.

É de extrema importância que se façam ensaios de citotoxicidade/viabilidade celular aos novos compostos macrociclos sintetizados. A interação destes compostos com os aminoácidos e o seu transporte até à BHE pode vir a revelar interesse para aplicações com interesse terapêutico ao nível do SNC.

Capítulo 2

Objetivos

Este projeto tem como objetivos, sintetizar compostos macrocíclicos derivados de calixarenos e avaliar a sua capacidade de ligar os aminoácidos L-leucina e L-isoleucina e exercer ação neuroprotetora.

2.1. Objetivos específicos

- Sintetizar compostos macrocíclicos derivados de calixarenos transportadores dos aminoácidos (L-leucina e L-isoleucina);
- Avaliar a formação dos complexos e a interação dos transportadores com os aminoácidos, através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN);
- Estudar a distribuição subcelular dos transportadores e avaliar o impacto na viabilidade celular em células SH-SY5Y;

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Síntese Química

3.1.1. Materiais

Os compostos comercialmente obtidos foram todos usados nas reações químicas sem purificação prévia. O 4-terc-butilcalix[4]areno (99%) (CAS: 60705-62-6) e o hidreto de sódio (NaH) (60%) (CAS: 7646-69-7) foram adquiridos na Acrös Organics. O nitrato de sódio (NaNO₃) (99,5%) (CAS: 7631-99-4) foram adquiridos pela Chem-Lab. Enquanto o *N*-(3-bromopropil)ftalamida (98%) (CAS: 5460-29-7), o *N*-(-5-bromopentil)ftalamida (95%) (CAS: 954-81-4), o paládio de carbono (Pd/C) (10wt%) e a hidrazina monohidratada (NH₂NH₂) foram adquiridos pela Sigma Aldrich. Os solventes, diclorometano (CH₂Cl₂) (99,9%) (CAS: 75-09-2), o dimetilformamida (DMF) (99,98%) (CAS: 68-12-2) e o clorofórmio (CHCl₃) (99,99%) (CAS: 67-66-3) foram adquiridos pela Fischer Chemical enquanto o metanol (MeOH) (99,8%) (CAS: 67-56-1) foi adquirido à Scharleau. O ácido clorídrico (HCl) (37%) (CAS: 7647-01-0) foi comprado à VWR We Enable Science, e o ácido trifluoroacético (CF₃COOH) (CAS: 76-05-1) foi adquirido à Fischer Chemical.

3.1.2. Procedimento de Cromatografia

O isolamento e purificação dos derivados finais foi realizada por cromatografia de coluna. Para isso, o produto foi dissolvido em 1mL de CH₂Cl₂ e na coluna utilizou-se como fase estacionária sílica gel 0,060-0,200 nm, adquirida à Merck, e como fase móvel foi usado CH₂Cl₂:MeOH (6:4, v:v), ou CH₂Cl₂:MeOH (5:1, v:v), ou CH₂Cl₂ apenas.

3.1.3. Equipamentos

As reações químicas desenvolvidas foram executadas em placas com agitação magnética e controle temperatura da marca Heidolph. A evaporação de solventes orgânicos ocorreu em evaporadores rotativos da marca Büchi.

Os espectros de RMN foram adquiridos no espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz. Os solventes usados para a obtenção dos espectros foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano (TMS).

A caracterização dos derivados foi realizada por espectroscopia de RMN, e relativamente aos espectros de ^1H , a ordem é a seguinte: nome do solvente, desvio químico (ppm), integração, multiplicidade e atribuição da molécula. Para os espectros de ^{13}C RMN segue-se a seguinte ordem: solvente e desvio químico.

3.1.4. Procedimento experimental

Os solventes foram previamente destilados e secos através do seguinte método: ativaram-se os *peneiros moleculares-4A* numa mufla durante 24 h. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente durante cerca de 24 h e de seguida colocaram-se os *peneiros moleculares* dentro de um frasco e adicionou-se o solvente de interesse. Seguidamente foi adicionada a quantidade de solvente a secar num balão de 250mL com os peneiros moleculares. Posteriormente, o balão foi colocado sobre uma manta de aquecimento, em contato com um destilador, um condensador e por um adaptador.

Na Fig. 6, encontram-se esquematizados os passos principais da síntese dos derivados do 4-tert-butilcalix[4]areno.

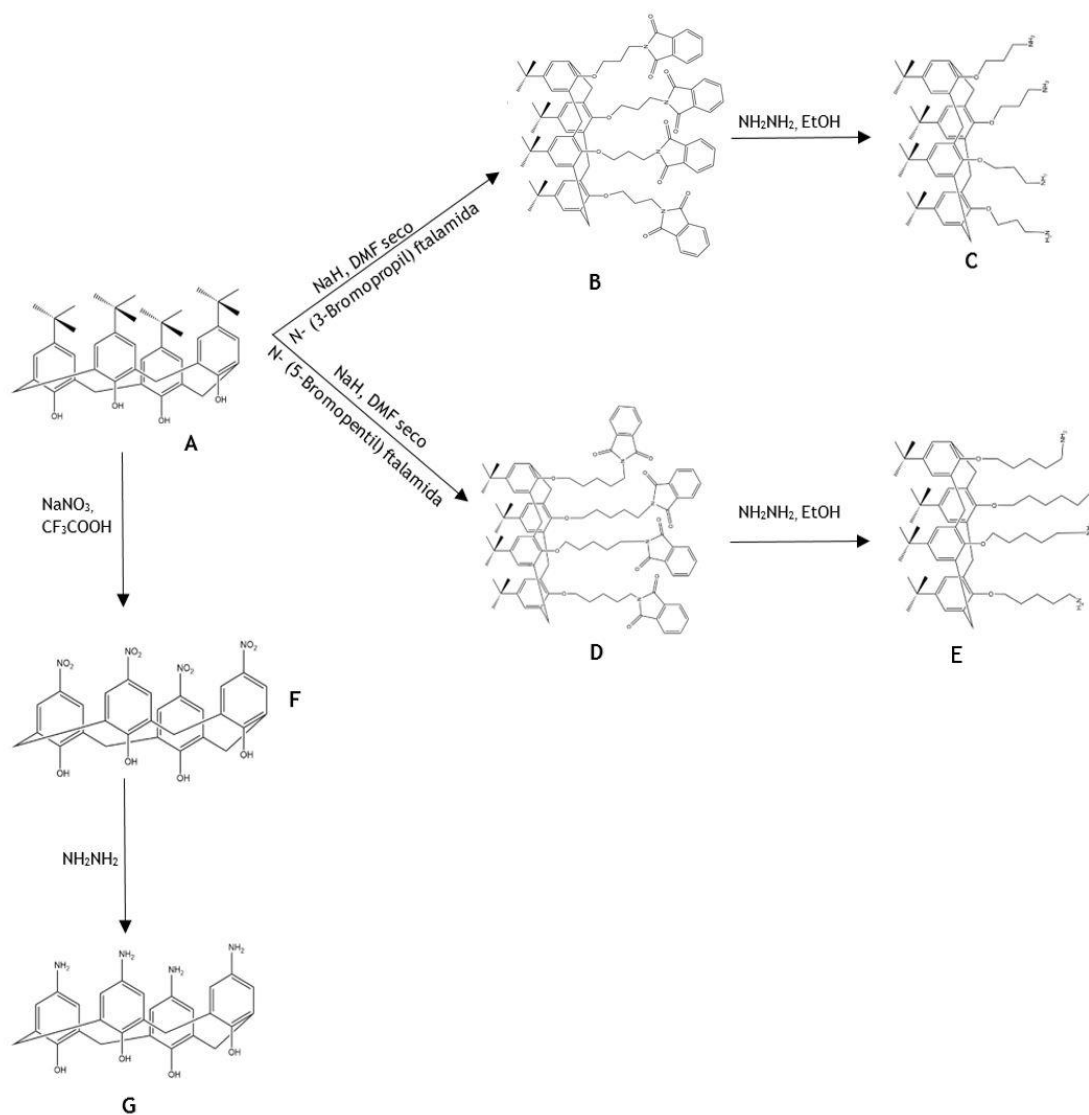
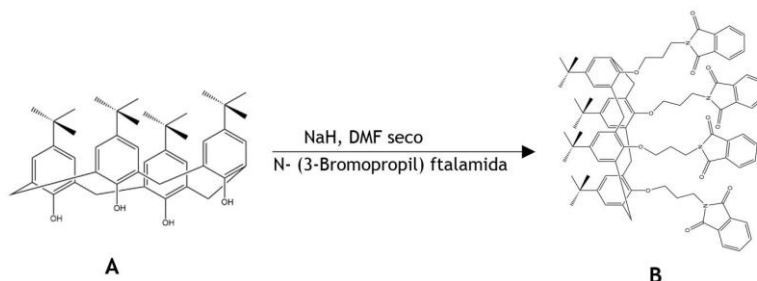


Fig. 6: Esquema geral da síntese dos derivados de calix[4]areno. A) 4-*tert*-butilcalix[4]areno; C) 3,3',3'',3'''-((15,35,55,75-tetra-*tert*-butil-1,3,5,7(1,3)-tetrabenzenociclo-octafano-12,32,52,72 tetraol)tetraquis(oxi))tetraquis (propan-1-amina); E) 5,5',5'',5'''-((15,35,55,75-tetra-*tert*-butil-1,3,5,7(1,3)-tetrabenzenociclo-octafano-12,32,52,72-tetraol)tetraquis(oxi))tetraquis (pentan-1-amina); G) 15,35,55,75-tetraamina-1,3,5,7 (1,3) -tetrabenzenociclo-octafano - 12,32,52,72-tetraol.

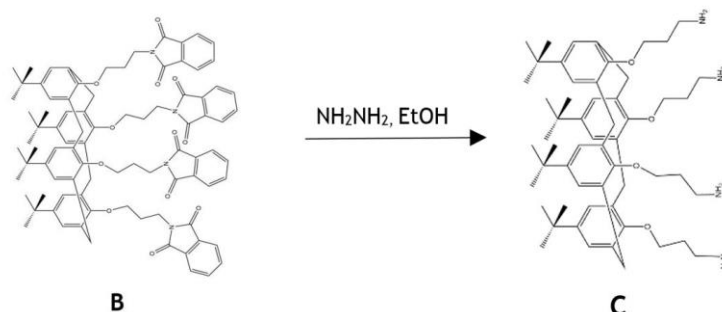
3.1.4.1. Síntese do 2,2',2'',2'''-(((1⁵,3⁵,5⁵,7⁵-tetra-terc-butil-1,3,5,7(1,3)-tetrabenzenociclo-octafano-1²,3²,5²,7²-tetrail) tetraquis(propano-3,1 -diil)) tetraquis (iosindolina-1,3-diona) (Derivado B)



Num balão de fundo redondo de duas tubuladoras de 250mL, dissolveu-se o 4-terc-butilcalix[4]areno (A) (0,61g, 0,94 mmol) em 25 mL de DMF e deixou-se em agitação sob azoto durante 30 min. Depois, adicionou-se o NaH (0,21g, 60 wt% em óleo, 9,2 equivalentes por cada grupo OH) lentamente. A mistura ficou sob agitação à temperatura ambiente durante 1h, sendo posteriormente adicionado à reação o *N*-(3-bromopropil)ftalamida (2,32g, 9,2mmol), durante 6 dias. Ao fim destes dias a reação foi parada com a adição de 1M de HCl (15mL), o sólido resultante desta reação foi filtrado através de um filtro de Büchner. O produto bruto foi dissolvido em CHCl₃ (50mL) sendo depois lavado com uma solução a 1M de HCl (3x50mL). A fase orgânica foi separada e seca com a adição de sulfato de sódio (NaSO₄) e de seguida o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Para obter o derivado B mais puro, fez-se uma recristalização usando uma solução CH₂Cl₂/MeOH (35mL de cada) que se adicionou ao balão para dissolver todo o seu conteúdo. O conteúdo foi filtrado para um novo balão de fundo redondo e sob pressão reduzida os solventes foram evaporados. O rendimento da reação foi de 21,23% (280 mg de derivado B).

O derivado B foi analisado em RMN os seus dados são os seguintes. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ=7,87-7,83 (m, 8H, PhtH_b), 7,68-7,64 (m, 8H, PhtH_a), 7,05 (s, 12H, ArH), 4,25-4,16 (m, 12H, OCH₂CH₂CH₂), 3,85 (s, 8H, ArCH₂Ar), 2,57-2,48 (m, 8H, OCH₂CH₂CH₂), 1,21 (s, 36H, C(CH₃)₃) ppm. ¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ= 168,32; 168,25; 140,9; 133,43; 131,96; 132,13; 125,6; 123,12; 74,45; 36,69; 34,18; 33,8; 29,8 ppm.

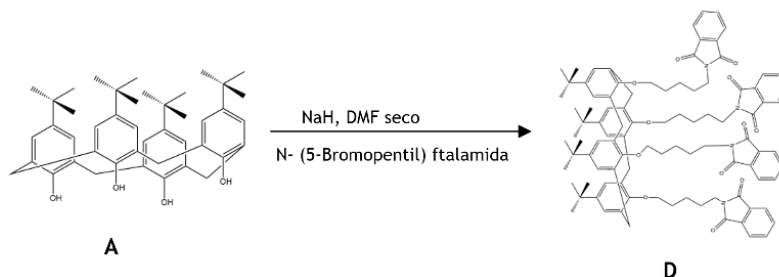
3.1.4.2. Síntese do 3,3',3'',3'''- ((15,35,55,75-tetra-terc-butil-1,3,5,7(1,3)-tetrabenzenociclo-octafano-12,32,52,72 tetrail)tetraquis(oxi))tetraquis (propan-1-amina) (Derivado C)



O derivado B (0,21g 0,15 mmol) foi dissolvido em etanol 99,9% (20mL) num balão de fundo redondo de 50mL, sob agitação e à temperatura ambiente. Seguidamente adicionou-se gota a gota a NH_2NH_2 (780 μL , 16mmol), sendo a mistura colocada em refluxo durante 12h. Posteriormente a solução foi arrefecida num banho de gelo, verificando a formação de um precipitado branco. De seguida, a mistura foi filtrada e depois procedeu-se à sua evaporação sob pressão reduzida. Adicionou-se água (H_2O) (50mL) ao produto e realizou-se uma extração com CH_2Cl_2 (4x40mL). Evaporou-se novamente o solvente e deixou-se secar o derivado na estufa de vácuo. Seguidamente realizou-se uma recristalização para o composto ficar mais puro. Para tal, adicionaram-se 30mL de CHCl_3 quente ao balão e fez-se uma filtração para um novo balão e procedeu-se à evaporação do solvente e deixou-se na estufa a secar. Como último passo, para obter o derivado mais puro, realizou-se cromatografia em coluna com o eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (5:1, v:v).

O derivado C foi analisado por RMN os seus dados são os seguintes. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 6,96$ (s, 12H, ArH), 4,22 (t, $J = 15,90$ Hz, 4H, ArCH_2Ar), 3,9 (t, $J = 8,75$ Hz, 24H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3,17 (t, $J = 13,66$ Hz, 4H, ArCH_2Ar), 2,03 (br.s, 8H, NH_2), 1,13 (s, 36H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm. ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 149,32$; 143,04; 131,06; 124,90; 74,25; 38,63; 33,35; 32,8; 30,63; 28,63 ppm.

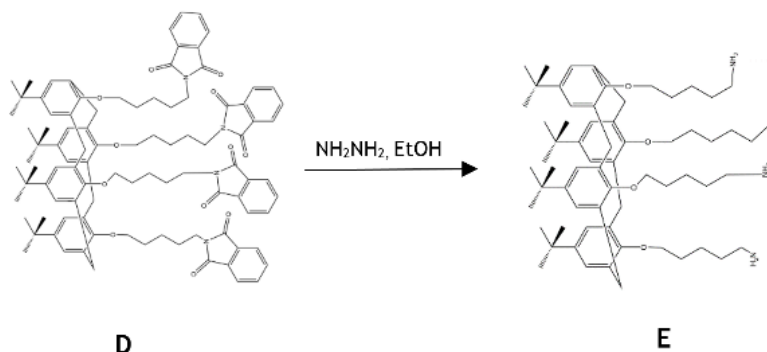
3.1.3.3. Síntese do 2,2',2'',2'''-(((15,35,55,75-tetra-terc-butil-1,3,5,7(1,3)-tetrabenzenaciclo-octafano-12,32,52,72 tetrail)tetraquis(oxi))tetraquis (pentan-5,1-diyl))tetraquis(isoindolina-1,3-diona) (Derivado D)



Num balão de fundo redondo de duas tubuladoras de 250mL, dissolveu-se o 4-terc-butilcalix[4]areno (A) (0,61g, 0,94 mmol) em 25 mL de DMF e deixou-se em agitação sob azoto durante 30 min. De seguida adicionou-se o NaH (0,21g, 60 wt% em óleo, 9,2 equivalentes por cada grupo OH) muito cuidadosamente. A mistura obtida ficou em agitação à temperatura ambiente durante 1h e posteriormente foi adicionado à reação o *N*-(-5-bromopentil)ftalamida (2,56 g, 9,2n mmol) e a reação ficou a decorrer durante 6 dias. Após esse tempo a reação foi parada por a adição de 1M de HCl (15mL) e o sólido resultante desta reação foi filtrado com um filtro de Büchner. O produto foi posteriormente dissolvido em CHCl₃ (50mL) e lavado com 1M de HCl (3x50mL). A fase orgânica foi separada e seca com a adição de NaSO₄. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Para obter o derivado D mais puro, fez-se uma recristalização usando uma solução de CH₂Cl₂/MeOH (35mL de cada), A solução foi filtrada para um novo balão de fundo redondo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O rendimento da reação foi de 15,81 % (240 mg de derivado D).

O derivado D foi analisado por RMN os seus dados são os seguintes. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ=7,65-7,63 (m, 8H, PhtH_b), 7,53-7,51 (m, 8H, PhtH_a), 7,39-7,35 (s, 12H, ArH), 4,46 (d, J= 12,34 Hz, 4H, ArCH₂Ar), 4,05 (d, J= 13.3 Hz, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 3,75 (t, J= 8.01 Hz, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 3,21 (d, J= 12.34 Hz, 4H, ArCH₂Ar), 1,34 (s, 36H, C(CH₃)₃) ppm. ¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ= 168,13; 151,29; 133,79; 133,37; 132,72; 128,40; 122,93; 122,55; 75,67; 31,4; 31,13; 29,6 ppm.

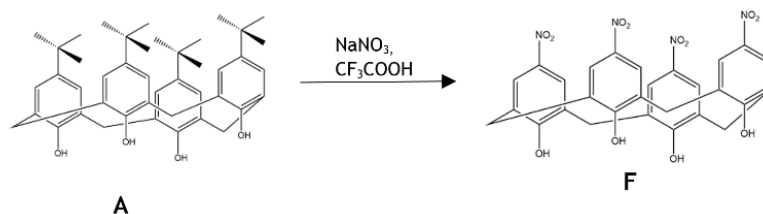
3.1.3.4. Síntese do 5,5',5'',5'''-((15,35,55,75-tetra-terc-butil-1,3,5,7(1,3)-tetrabenzenaciclo-octafano-12,32,52,72-tetrail)tetraquis(oxi))tetraquis (pentan-1-amina) (Derivado E)



O derivado D (0,21g 0,15 mmol) foi dissolvido em etanol 99,9% (20mL) num balão de fundo redondo de 50mL, sob agitação e à temperatura ambiente. Seguidamente adicionou-se gota a gota a NH_2NH_2 (1,180 mL, 24,5 mmol), sendo a mistura colocada em refluxo durante 12h. Posteriormente a solução foi arrefecida num banho de gelo, verificando a formação de um precipitado branco. De seguida, a mistura foi filtrada e depois procedeu-se à evaporação sob pressão reduzida do solvente. Adicionou-se H_2O (50mL) ao produto e realizou-se uma extração com CH_2Cl_2 (4x40mL). Evaporou-se novamente o solvente e deixou-se secar o composto na estufa de vácuo. Por fim realizou-se uma recristalização por adição de 30mL de CHCl_3 quente ao balão seguida de filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida e posteriormente seco na estufa. Para obter o derivado mais puro, realizou-se cromatografia em coluna com a mistura eluentes CH_2Cl_2 :MeOH (6:4, v:v) em que o substrato apresenta um RF de 0,83. Da eluição obteve-se um óleo de cor castanha, com um rendimento de 68 % (220 mg de derivado E).

O derivado E foi analisado por RMN os seus dados são os seguintes. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 6,96 (s, 12H, ArH), 3,89 (t, J= 15,90 Hz, 8H, ArCH_2Ar), 3,64 (s, 20H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,65-1,58 (m, 20H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,13 (s, 36H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm. ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 153,3; 145,6; 132,46; 125,38; 75,24; 41,06; 32,88; 30,46; 30,39; 30,02 ppm.

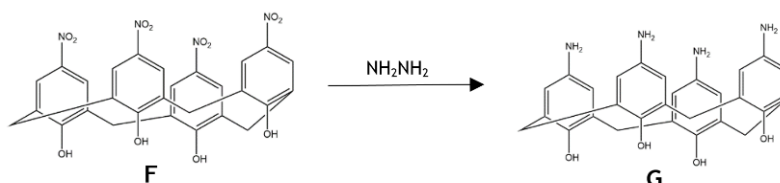
3.1.3.5. Síntese do 15,35,55,75-tetranitro-1,3,5,7 (1,3)-tetrabenzenociclo-octafano-12,32,52,72-tetraol (Derivado F)



Num balão de fundo redondo de 100mL adicionou-se o derivado A (0,05g, 0,077 mmol) e NaNO_3 (3,4g, 10mmol por cada grupo terc-butil). De seguida adicionou-se gota a gota de CF_3COOH (3,1mL, 10mmol por cada grupo terc-butil). A mistura foi deixada sob agitação durante a noite, à temperatura ambiente. A reação foi parada por adição de H_2O (75mL) e efetuada uma extração com CH_2Cl_2 (3x50mL). A fase orgânica foi lavada com H_2O (100mL) e seca com a adição de NaSO_4 ; de seguida evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. O produto puro foi obtido pela precipitação com MeOH (50mL), filtragem do sólido e evaporação do solvente sob pressão reduzida. O rendimento da reação foi de 45 % (103 mg de derivado F).

O derivado F foi analisado por RMN os seus dados são os seguintes. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 8,06 (s, 4H, OH), 7,50 (s, 4H, ArH) e 4,30-4,23 (m, 8H, ArCH_2Ar) ppm. ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 165,99; 134,25; 129,10 e 67,7 ppm.

3.1.3.6. Síntese do 15,35,55,75-tetraamino-1,3,5,7 (1,3) - tetrabenzenociclo-octafano - 12,32,52,72-tetraol (Derivado G)



O derivado F (0,1053g, 0,0174 mmol) foi dissolvido em etanol 99,9% (10mL), adicionado cuidadosamente o NH_2NH_2 (17 μL) e seguidamente o paládio de carbono (10%). A reação foi colocada em refluxo durante a noite. No fim da reação adicionou-se um pouco de celite ao

funil de Büchner e realizou-se a filtração. O filtro foi lavado com CH_2Cl_2 sendo este depois evaporado sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi dissolvido em CH_2Cl_2 (30mL) e seco com NaSO_4 . Após evaporação do solvente sob pressão reduzida realizou-se uma recristalização adicionando 30mL de CHCl_3 quente ao balão seguida de filtração e evaporação do solvente. Por fim, para obter o derivado mais puro, realizou-se a cromatografia em coluna com o eluente CH_2Cl_2 .

O derivado G foi analisado em RMN os seus dados são os seguintes. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 8,03 (s, 4H, OH), 5,22 (s, 4H, ArH), 4,23-4,16 (m, 8H, ArCH_2Ar) e 3,57 (brs, 8H, NH_2) ppm. ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 164,94; 133,23; 128,7; 66,74 ppm.

3.1.5. Outros compostos derivados de calixarenos

Na realização deste trabalho, além dos composto mencionados anteriormente também utilizou-se mais dois compostos que já tinham sido sintetizados pelo grupo e que se encontram descritos no seguinte artigo Santos et al. 2015. Na Fig.7 pode-se observar os dois compostos escolhidos para este trabalho.

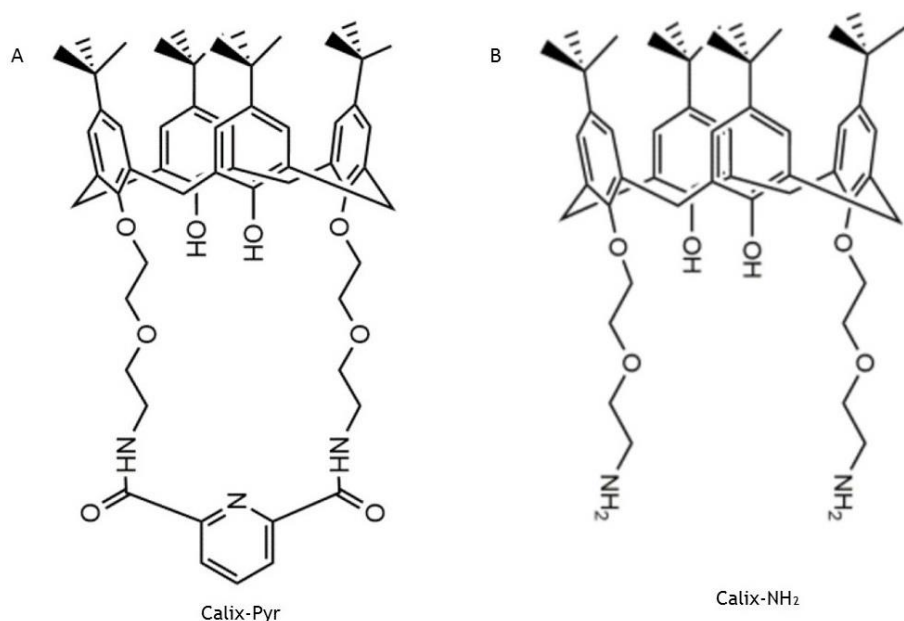


Fig. 7: Compostos derivados de *p*-terc-butilcalix[4]areno. A) Calix-Pyr e o B) Calix NH₂.

3.2. Análise da Interação dos Ligandos com os Aminoácidos

3.2.1. Técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

3.2.1.1. Materiais

A L-leucina (CAS: 61-90-5) foi adquirida na USBTM e a L-isoleucina (CAS: 73-32-5) foi obtida na Sigma Aldrich. O tampão salino fosfato (PBS) (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM e Na₂HPO₄ 8,1 mM, pH 7,4) x1.

A água deuterada (D₂O) foi adquirida à Euriso-Top, o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆), enquanto o ácido trimetilsilil propiónico (TSP).

3.2.1.2. Preparação dos Aminoácidos

Os aminoácidos foram preparados numa solução DMSO (80%) e H₂O (20%). A L-Leucina (0,0015g) foi dissolvida em 2mL da solução de DMSO:H₂O (8:2) obtendo-se assim uma concentração de 0,005M. Enquanto a L-isoleucina (0,0013g) foi dissolvida em 2mL da solução, com uma concentração de 0,0049M. Em seguida, procedeu-se à aquisição de um espectro de RMN de ¹H com 10% de D₂O para cada um dos aminoácidos. A L-leucina foi ainda preparada numa solução de H₂O:D₂O (8:2), na qual se obteve uma concentração de 0,13 M.

3.2.1.3. Preparação dos ligandos

O derivado E foi preparado em 500µL de DMSO com 10% de DMSO-d₆, obtendo uma concentração final de 0,036M, enquanto o Calix-NH₂ e o Calix-Pyr, foram preparados em 1mL de DMSO-d₆ e as concentrações obtidas foram de 1,92mM e 1,83mM, respetivamente. Estas concentrações foram utilizadas para os ensaios com a L-leucina e com a L-isoleucina.

3.2.1.4. Preparação dos complexos ligandos-aminoácidos

A solução do complexo ligando-aminoácido com estequiometria de 1:1, 1:2 foi preparada em tubos de RMN de 5mm com uma percentagem final de DMSO de 86,06% e 75,53%, respetivamente, para o derivado E. Estes dados são em relação aos ensaios realizados com a L-leucina dissolvida na solução de DMSO: H₂O (8:2).

A titulação por RMN não resultou, por causa das soluções não estarem dissolvidas no mesmo solvente, levando que o aminoácido começasse a precipitar interferindo assim com a aquisição dos espectros de ¹H. Por isso foi necessário realizar esta titulação por outro método. Posteriormente dissolveu-se o derivado E em 250 µL de DMSO com concentração de 0,036M. O volume do derivado foi dividido em dois balões de fundo redondo. Colocou-se os balões sob agitação durante a noite. De seguida adicionou-se a um balão 2 equivalentes de L-leucina e ao outro balão 2 equivalentes de L-isoleucina, e deixou-se sob agitação durante 72h. Para verificar se a complexação ocorreu fez-se uma análise por espectroscopia de RMN de ¹H.

Para a formação do complexo com os ligandos, Calix-NH₂ e o Calix-Pyr, com a L-leucina a estequiometria estudada foi de 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:4. A percentagem final de DMSO no tubo de RMN foi de 94,69% para ambos os ligandos. Neste ensaio a mistura de solventes para dissolver a L-leucina foi H₂O:D₂O (80:2).

3.2.1.5. Experiências de RMN

Os espectros de RMN ¹H foram adquiridos no espectrómetro Bruker AVANCE-400, operando com uma frequência de 400.13 MHz para o protão. Os espectros obtidos possuem uma largura espectral de 16 ppm, 32 e 512 *scans* para cada espectro e o tempo de estabilização entre cada ensaio foi de 10 minutos. Os espectros de RMN foram adquiridos e processados com o *software* TOPSPIN 3.1.

3.3. Avaliação Biológica dos transportadores macrocíclos

3.3.1. Material

3.3.1.1. Reagentes

Nos ensaios em células o meio de cultura usado foi o MEM (*Minimum Essential Medium*) suplementado com a *mistura F-12 de Ham* (Sigma-Aldrich). O soro Bovino Fetal (FBS), o antibiótico estreptomicina/penicilina o corante azul de triptano, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT) (CAS:298-93-1) foram adquirido à Sigma Aldrich, o DMSO à VWR e o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) à Panreac (Estados Unidos).

3.3.1.2. Equipamentos

Na execução dos ensaios celulares foram utilizados vários equipamentos, tais como, a câmara de fluxo laminar Vertical NuAire, de Classe II, que foi usada para trabalhar em condições de assepsia em grande parte do trabalho, a estufa Nuair DHD Autoflow CO₂ Air-Jacketed a 37°C para manter a atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂, foi utilizada para incubar as células, a centrífuga Bioblock Scientific (Sigma-3K18C) utilizada para a separação das células dos meios em que se encontram, os microscópios óticos Olympus CKX 40/41 foram utilizados para a observação e controlo do estado das células, para aquecer os meios de cultura, soro e tripsina foi utilizado o banho de aquecimento da Fisher Scientific. Um leitor espectrofotométrico de microplacas Anthos 2020 foi usado para quantificar a absorvância dos cristais de formazano no ensaio de MTT com recurso ao *software Microplate Manager* (MPM 6).

3.3.2. Tipo de células utilizadas no estudo e a sua cultura

Para a realização deste estudo, foi utilizada a linha celular de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Esta linha celular foi mantida em meio de cultura MEM-F12, de modo a permitir o crescimento e diferenciação celular.

3.3.2.1. Células de Neuroblastoma humano (SH-SY5Y)

As células SH-SY5Y derivam de uma linha celular obtida a partir de uma biópsia de medula óssea de uma mulher. Esta linha celular é frequentemente usada como modelo neuronal em diferentes estudos, nomeadamente a avaliação de efeitos neurotóxicos/neuroprotetores a diferentes substâncias (Garcimartín et al. 2015).

As células SH-SY5Y foram mantidas em meio de cultura MEM-F12, suplementado com 10% de FBS e com 1% de antibiótico. As células foram cultivadas em frascos de cultura (T-flasks) de 75 cm² ou de 25 cm² e incubadas a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% CO₂. A substituição do meio foi efetuada a cada 2-3 dias. Quando a confluência celular era atingida as células eram tripsinizadas e expandidas para novos frascos de cultura. Nos ensaios experimentais foram utilizadas células entre as passagens 4^a a 13^a.

3.3.3. Técnicas de cultura celular

3.3.3.1. Preparação dos meios de cultura

O meio MEM F-12 foi preparado em água Mili-Q sendo o pH ajustado a 7,2. O meio suplementado com FBS é denominado de meio completo, enquanto o meio sem a adição do FBS é designado de meio incompleto. Após a preparação deste meio, este foi esterilizado por filtração. O meio foi armazenado a uma temperatura de 4 a 8°C. Antes da sua utilização o meio foi sempre previamente aquecido num banho a 37°C.

3.3.3.2. Cultura Celular

A linha celular usada na realização deste trabalho estava armazenada no banco de células em azoto líquido. O tubo de criopreservação que continha a nossa linha celular esteve primeiramente a -80°C durante a noite sendo depois transferido para -20°C durante 1h e finalmente colocou-se à temperatura ambiente. De modo a remover o meio de congelação, a um tubo de centrífuga foram adicionados 10mL de meio completo, previamente aquecido ao qual se adicionou o conteúdo da alíquota de criopreservação. Este tubo foi centrifugado a 150rpm durante 4min, e após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 10mL de meio completo. Por fim, transferiu-se todo o conteúdo do tubo de centrífuga para um frasco de cultura de 75cm², sendo este incubado a 37°C em atmosfera humidificada com 5% de CO₂.

3.3.3.3. Tripsinização

Em condições adequadas de cultura as células crescem e diferenciam-se. Quando atingem a fase exponencial de crescimento, ou seja, quando as células atingiram cerca de 80 a 90% de confluência celular foram sujeitas a tripsinização e foram expandidas para novos frascos de cultura. Para a tripsinização após aspiração do meio de cultura foi feita uma lavagem das células com 5mL de PBS. Após esta lavagem foram adicionados 3mL de uma solução de tripsina (7,5 mg/mL) na qual as células foram incubadas a 37°C até que as células aderentes à superfície do frasco de cultura se comesçassem a destacar, o que foi confirmado por observação em microscópio. Quando a maior parte das células ficou em suspensão terminou-se a reação por adição de 7mL de meio MEM-F12 suplementado com FBS e antibiótico (previamente aquecido a 37°C). Posteriormente, a suspensão celular foi transferida para um tubo de centrífuga e após uma centrifugação de 4min a 150 rpm o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em meio de cultura completo.

Criopreservação das células

As células podem ser conservadas por longos períodos de tempo a -180°C (azoto líquido) na presença de um reagente crioprotetor, como por exemplo o DMSO. Este tratamento permite manter as células por um período de até 3 anos. Para congelar as células estas devem manter-se em cultura até atingirem confluência. Atingida a confluência procede-se à tripsinização (descrita acima). A suspensão celular obtida após a tripsinização é centrifugada, o sobrenadante é descartado e o *pellet* é ressuspendido num volume adequado de meio de cultura completo com 10% de DMSO. A suspensão celular é dividida por tubos de criopreservação (1mL/tubo), colocados -20°C durante 4 h, transferidos para -80°C durante 12-15h, e sendo por fim armazenados a -180°C em azoto líquido.

3.3.3.1. Contagem e Cultura celular

Para os ensaios de viabilidade celular as células foram cultivadas em placas com 24 ou 96 poços a uma densidade de $1,11 \times 10^6$ e $0,17 \times 10^6$ célula/poço, respetivamente. Para determinar a densidade de células na suspensão celular após a execução do procedimento de tripsinização é efetuada a contagem das células. A contagem é feita a partir de uma amostra de 20 μL da suspensão celular, à qual se junta o mesmo volume de azul tripano. Após homogeneização esta mistura é colocada sob uma lamela numa câmara de Neubauer, e o número de células presentes nos quatro quadrantes é contada com o auxílio do microscópio. O volume necessário da suspensão celular é diluído no volume total de meio de cultura necessário para preparar o número de poços necessário. Em cada poço das placas de cultura com 24 poços foram adicionados 600 μL de suspensão celular final, enquanto nas placas de cultura de 96 poços o volume adicionado foi de 200 μL da suspensão celular final. As células foram incubadas por um período de 48h, de modo a permitir a aderência e crescimento celular.

3.3.3.2. Estudo do efeito dos compostos na viabilidade celular

3.3.3.2.1. Derivados C, E e G.

Para iniciar os ensaios foram preparadas soluções concentradas dos derivados C, E e G de 10mM em DMSO.

Após 48h em cultura as placas foram observadas ao microscópio para verificar o estado/morfologia celular. Confirmado o estado das células o meio de cultura foi aspirado e a cada poço foi adicionado 600 μ L de meio MEM-F12 incompleto, sendo então adicionados os derivados em teste nas concentrações desejadas (1, 10, 20 e 30 μ M), tendo o cuidado de garantir que a concentração final de DMSO nos ensaios não ultrapassasse 1%. Cada condição experimental foi sempre realizada em triplicado. As células foram incubadas com os derivados durante 6h. O efeito dos derivados na viabilidade celular foi analisado pelo ensaio de MTT. Na Fig.8 está esquematizado a composição das placas de 24 poços.

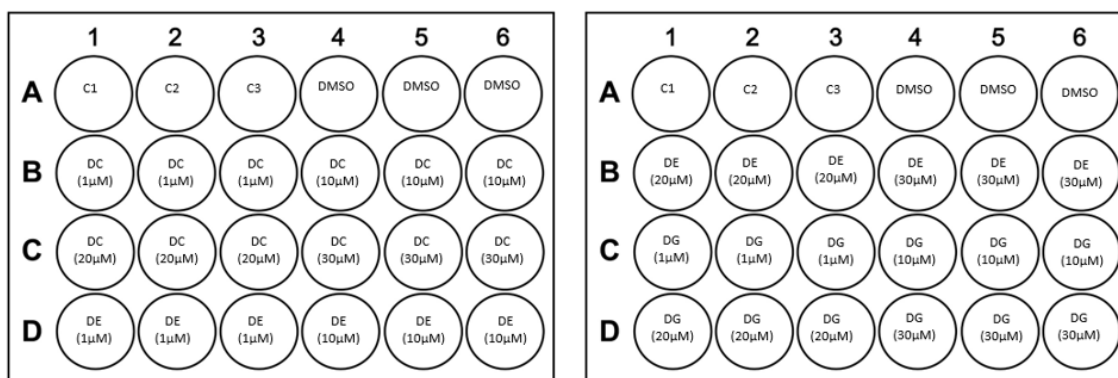


Fig. 8: Esquema representativo da microplaca para o primeiro ensaio de todos os derivados nas diferentes concentrações (1, 10, 20 e 30 μ M), com o tempo de incubação de 6h. (C= Controlo, meio sem soro; DMSO= dimetilsulfóxido; DC= derivado C; DE= derivado E; DG= derivado G).

Após a realização deste ensaio, realizou-se outro ensaio com a concentração mais elevada (30 μ M) dos diferentes derivados em estudo, visto que com a análise dos resultados obtidos na primeira experiência esta concentração era a mais relevante para avaliarmos os efeitos de viabilidade celular. Como na experiência anterior aspirou-se o meio dos poços e adicionou-se

600µL de meio incompleto e de seguida procedeu-se à incubação dos 3 derivados a tempos diferentes. Os tempos testados foram, 6h, 12h, 24h e 48h como se pode verificar pela Fig. 9. Ao fim deste tempo realizou-se o ensaio de MTT, para avaliar a viabilidade celular.

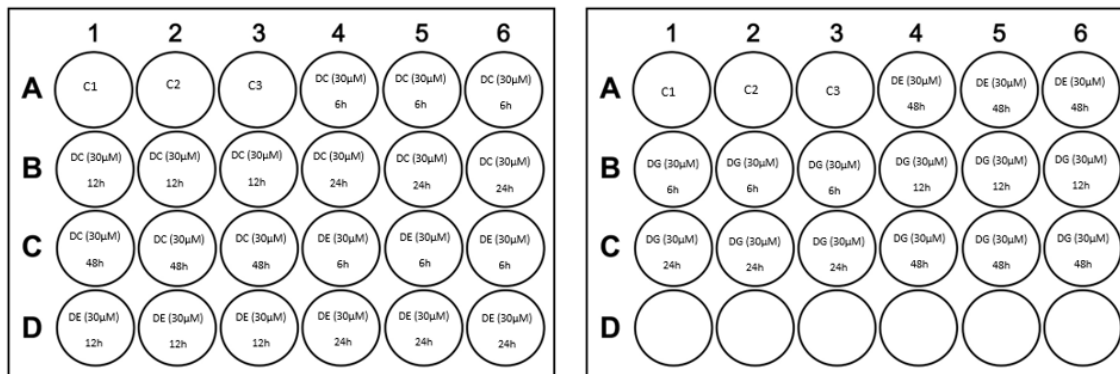


Fig. 9: Esquema representativo das microplacas para o segundo ensaio, com os derivados à mesma concentração mas incubados a tempos diferentes. (C= Controlo; DMSO= dimetilsulfóxido; DC= derivado C; DE= derivado E; DG= derivado G)

Estas duas experiências realizadas os derivados utilizados não estavam completamente puros, portanto realizou-se uma nova experiência com os derivados mais puros (após cromatografia por coluna) para ver se o seu efeito era igual ou se verificava alguma alteração na viabilidade celular.

Depois de se tentar purificar os derivados C, E e G, só conseguiu-se purificar o derivado E, portanto as experiências realizadas só foram testadas com este derivado como se pode verificar na secção seguinte.

3.3.3.2.2. Derivado E.

Inicialmente foi-se testar este derivado a diferentes concentrações (0,01; 0,05; 0,1; 1,0; 1,5 e 5µM) para avaliar a sua citotoxicidade celular usando o esquema representado na Fig. 10. O tempo de incubação com o derivado a estas concentrações foi de 6h.

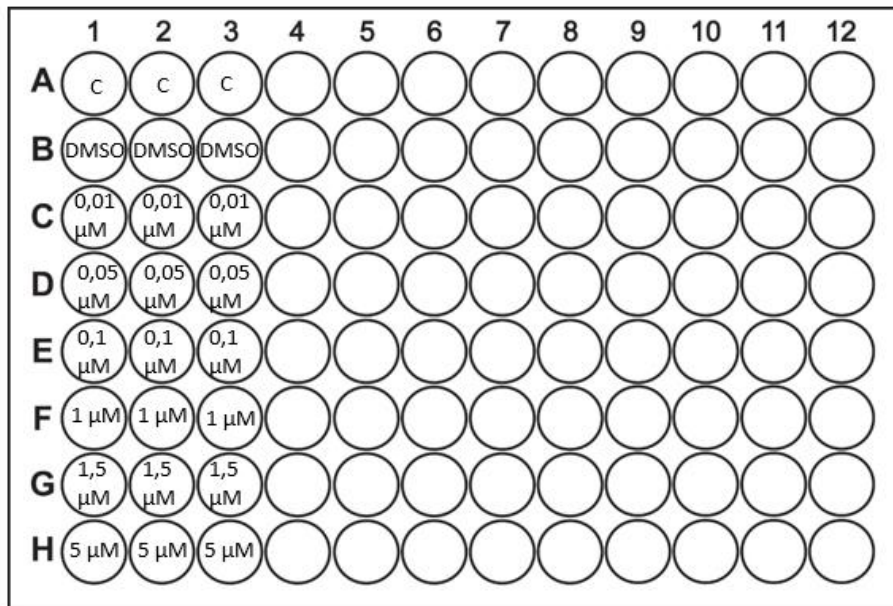


Fig. 10: Esquema representativo das microplacas para o ensaio com o derivado E, a diferentes concentrações com a incubação a 6h. (C= Controlo; DMSO= dimetilsulfóxido e 0,01; 0,05; 0,1; 1,0; 1,5 μM e 5 μM as concentrações usadas para o derivado E).

Pretendeu-se determinar o efeito de uma exposição mais prolongada das células ao derivado E. Para isso procedeu-se ao estudo ao longo do tempo em que se testou o efeito de exposições até 72h de concentrações com baixa toxicidade celular e outra com alta toxicidade (0,05 μM e 5 μM) deste derivado (Fig. 11).

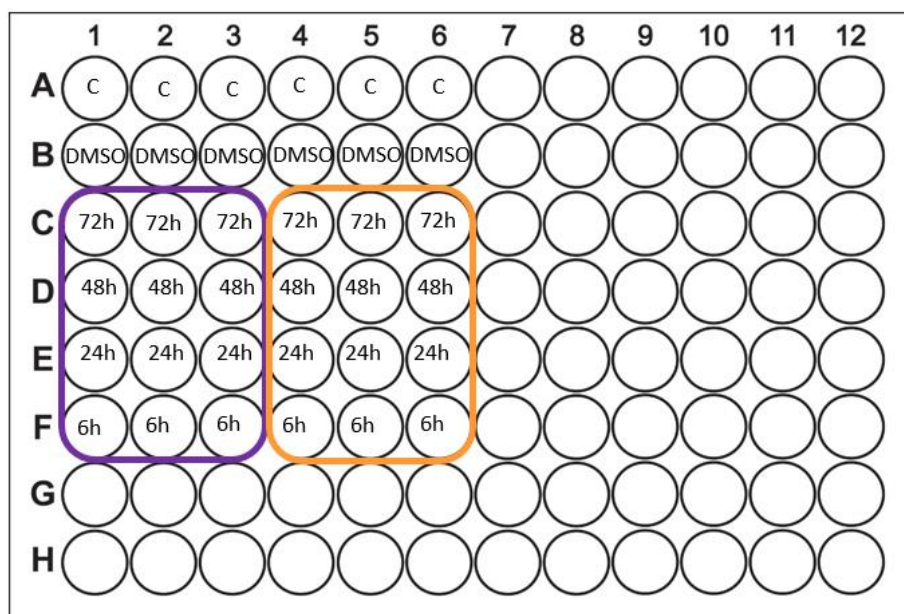


Fig. 11: Esquema representativo das microplacas para o ensaio com o derivado E, a diferentes tempos de incubação com a concentração de 0,05 e 5 μ M. (C= Controlo; DMSO= dimetilsulfóxido; a **roxa** estão representados os tempos de incubação da concentração de 0,05 μ M e a **laranja** estão representados os tempos de incubação com a concentração de 5 μ M).

3.3.3.2.3. Calix NH₂, Calix Pyr e L-leucina.

Foram realizados ensaios celulares para o Calix NH₂, Calix Pyr e L-leucina. Par tal preparou-se uma solução inicial dos 3 compostos de 4,86mM, 5,86mM e 0,13M respetivamente. A L-leucina foi dissolvida em H₂O, enquanto os calixarenos foram dissolvidos em DMSO.

Após 48h em cultura as placas de cultura foram observadas ao microscópio para verificar o estado/ morfologia celular. Confirmado o estado das células o meio de cultura foi aspirado e a cada poço adicionado 200 μ L de meio MEM-F12 incompleto, sendo posteriormente adicionados os compostos a testar nas seguintes concentrações, 1, 5, 10, 15 e 20 μ M, tendo sempre em atenção que o DMSO não ultrapasse 1% em cada poço. As células foram incubadas durante 6h e seguidamente para testar a sua viabilidade celular foi realizado o ensaio de MTT. Na Fig. 12 está representado o esquema desta experiência numa placa de 96 poços.

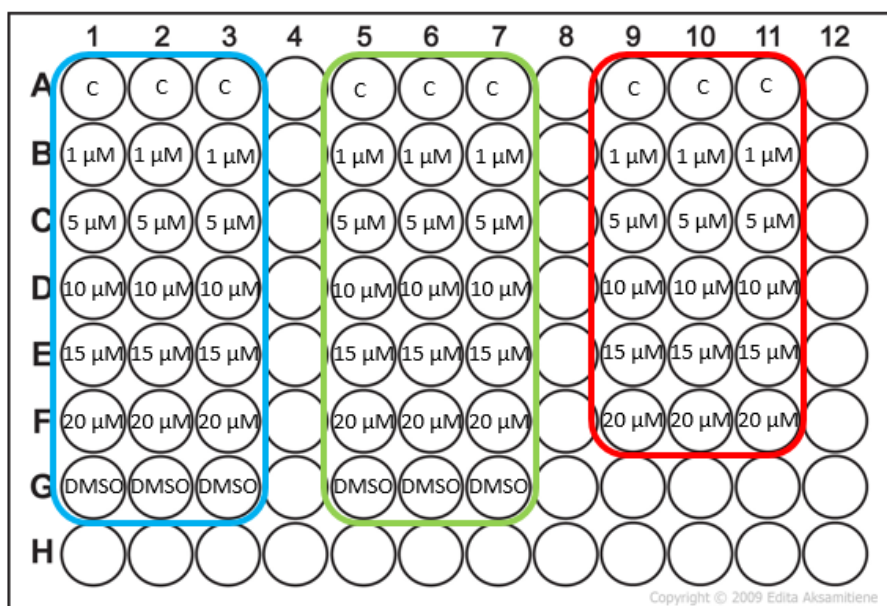


Fig. 12: Esquema representativo das microplacas para o ensaio com o composto Calix NH₂, Calix Pyr e L-leucina, a diferentes concentrações com a incubação a 6h. (C= Controlo; DMSO= dimetilsulfóxido e 1; 5; 10; 15 e 20 μM as concentrações usadas para ambos os compostos. A azul corresponde ao Calix NH₂, o verde ao Calix Pyr e o vermelho à L-leucina).

Com estes compostos ainda foi realizado mais um ensaio. Neste ensaio pretendeu-se estudar a viabilidade celular dos compostos Calix NH₂ e Calix Pyr a 10μM isoladamente e na presença de L-leucina à mesma concentração. Este ensaio vai nos permitir avaliar se o complexo provoca aumento da viabilidade celular ou se esta se mantém igual.

Após a aspiração do meio da placa, adicionaram-se 200μL de meio incompleto e incubou-se os compostos a tempos diferentes (6h, 12h e a 24h) como se pode verificar pela Fig. 13. Ao fim das 24h procedeu-se ao ensaio de MTT, para analisar a viabilidade celular.

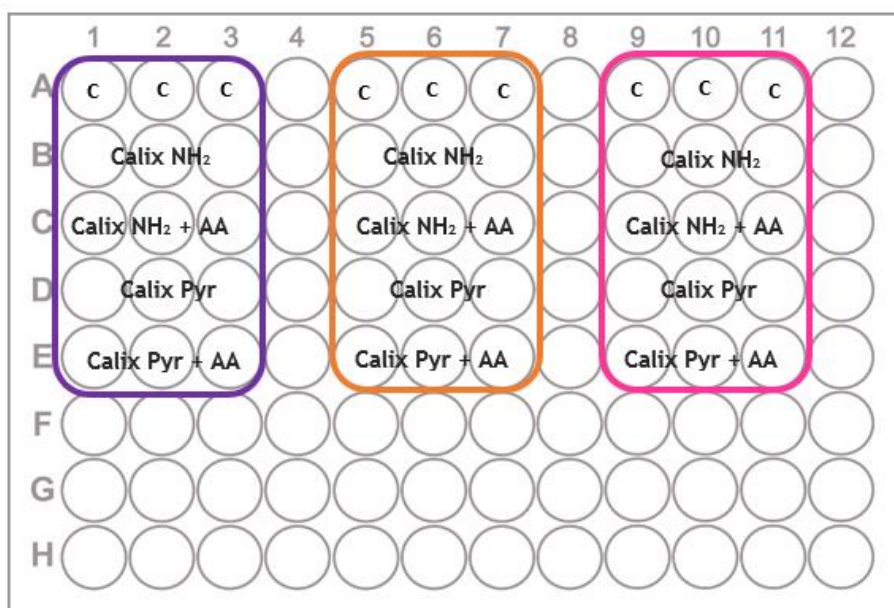


Fig. 13: Esquema representativo das microplacas para o ensaio com o composto Calix NH₂, Calix Pyr, Calix NH₂ complexado à L-leucina e Calix Pyr complexado à L-leucina a 10µM a diferentes tempos de incubação. (C= Controlo; DMSO= dimetilsulfóxido; AA= L-leucina. A **roxo** corresponde ao tempo de incubação das 6h, o **laranja** das 12h e o **rosa** das 24h).

3.3.3.3. Ensaio da viabilidade Celular - MTT

Para avaliar a citotoxicidade e a viabilidade celular dos compostos nas células foi usado o ensaio de MTT (Angius and Floris 2015). Este método consiste na redução do sal brometo de 3-(4,5- dimetiliazol-2-il) 2,5-difenil-tetrazólio, que apresenta uma cor amarela e é solúvel em água, pela ação das desidrogenases e agentes redutores que estão presentes nas células vivas, são formados cristais de formazano insolúveis que possuem uma cor roxa (Fig.14) (Angius and Floris 2015; Stockert et al. 2012). A quantidade de formazano produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Stockert et al. 2012)

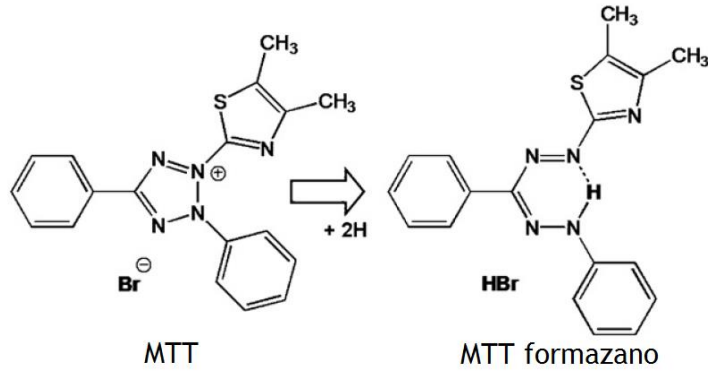


Fig. 14: Reação química representante da redução do MTT a formazano.

A formação dos cristais de formazano foi avaliada por espectrofotometria após dissolução dos cristais em solventes orgânicos.

Terminados os tempos de exposição aos compostos em estudo o meio foi aspirado e a cada poço foi adicionado 300µL do reagente MTT. As células foram incubadas com este composto durante 1h a 37°C. Após este período a solução de MTT foi aspirada com cuidado e para solubilizar os cristais foram adicionados 300µL de 0,04M de HCl-isopropanol. Por fim, foram transferidos 200µL de cada poço para uma microplaca de 96 poços, de modo a medir a absorvância a 570nm, com uma referência de 620nm num leitor ELISA de microplacas (BioRad, X Mark TM). Para os ensaios realizados em placas de 96 poços, todo o procedimento foi realizado da mesma forma, com exceção do volume da solução de MTT e de HCl-isopropanol que foi 200 µL e não houve transferência para a microplaca de 96 poços

3.3.3.4. Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência foi realizada com o intuito de verificar se a morfologia dos núcleos era indicadora de células viáveis ou apoptóticas. Este estudo foi realizado para o derivado E com a concentração de 0,05 e 5 µM, às 48 e 72h.

Primeiramente, foram preparadas as placas com lamelas de 0,15mm numa placa de 12 poços.

Prosseguiu-se para a tripsinização das células SH-SY5Y e de seguida incubaram-se as células a uma concentração de 0,17 x 10⁶ células/poço na placa previamente preparada com as

lamelas. Após atingirem a confluência desejada (cerca de 80%), as células foram incubadas com o derivado E.

Seguidamente, incubaram-se as células com o marcador nuclear Hoescht a $2\mu\text{M}$, preparado em PBS, durante 10 minutos. Após esse tempo, aspirou-se a solução e foi feita uma lavagem com PBS. De seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% durante 10 minutos. Terminado este período foi aspirado o PFA e fez-se uma lavagem com PBS. Após a lavagem colou-se uma gota de PBS nas lamelas para que estas não secassem e seguidamente procedeu-se à montagem das lamelas nas lâminas usando o meio de montagem fluorescente DAKO (DAKO North America Inc.). As lâminas foram analisadas no microscópio AxioObserver Zeiss e o *software* utilizado foi o AxioVision Rel (versão 4.8.1).

3.3.4. Análise Estatística

A viabilidade celular obtida em presença dos diferentes compostos foi comparado com o controlo (meio de cultura sem soro). O efeito das diferentes concentrações dos compostos foi comparado com o controlo e entre as diferentes concentrações. Os gráficos finais representam a média \pm erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi feita através do teste One-way ANOVA, seguido do teste Bonferroni's Multiple Comparison. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise dos dados foi usado o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Este capítulo está dividido por 3 seções: na primeira seção, será abordada a síntese e caracterização dos compostos derivados de calixarenos, na segunda parte será discutida a interação dos compostos sintetizados com os aminoácidos, na terceira seção são apresentados os resultados da avaliação biológica dos compostos bem como os complexos formados (compostos mais aminoácidos).

4.1. Síntese Química

Os derivados de calixarenos desenvolvidos no presente trabalho foram sintetizados com o objetivo de serem potenciais ligandos para interagir com aminoácidos, nomeadamente com a L-leucina e a L-isoleucina, e possibilitar o seu transporte através da barreira hematoencefálica.

Após a síntese e a caracterização dos compostos, pretendeu-se avaliar a possibilidade destes atuarem como transportadores. Adicionalmente, também se avaliou a atividade citotóxica dos compostos sintetizados na linha celular SH-SY5Y.

Os derivados do 4-tert-butilcalix[4]areno foram preparados utilizando dois tipos de síntese com dois passos principais. Para os derivados C e E, primeiramente realizou-se uma alquilação do composto de partida com o NaH em DMF seco e com o (3-bromopropil)- e (5-bromopentil)-ftalimida, respetivamente, obtendo-se os intermediários da reação que se encontram representados na Fig. 15.

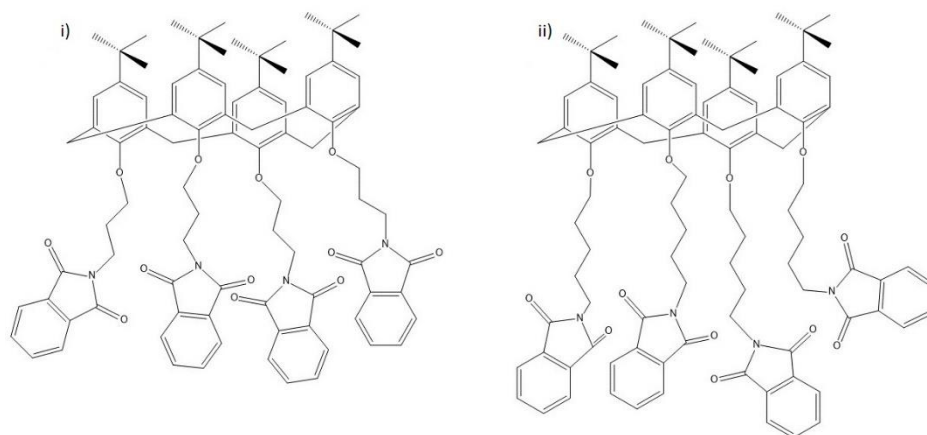


Fig. 15: Compostos após a alquilação do composto de partida. i) Derivado B e o ii) Derivado D.

O segundo passo da síntese conduziu à obtenção dos compostos macrocíclicos finais, através do processo de hidrazinólise com NH_2NH_2 , dos grupos ftalimida resultando os derivados C e E representados na Fig. 16.

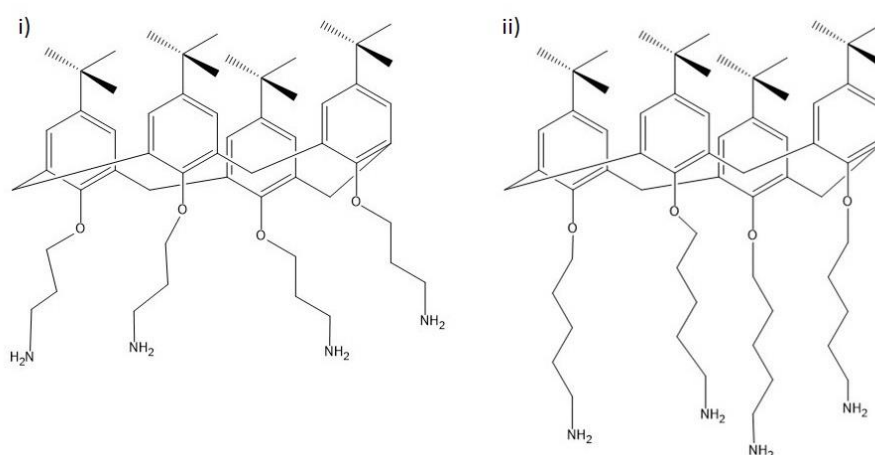


Fig. 16: Compostos finais resultantes da hidrazinólise. i): Derivado C e ii): Derivado E.

Em relação ao derivado G, a sua síntese também foi realizada por dois passos fundamentais. O primeiro passo do procedimento foi a reação de nitração com NaNO_3 e CF_3COOH originando o composto intermediário, que está representado na Fig. 17 i.

Enquanto o segundo passo é representado pela reação de redução usando a NH_2NH_2 , que origina o composto final da síntese. Este composto está representado na Fig. 17 ii.

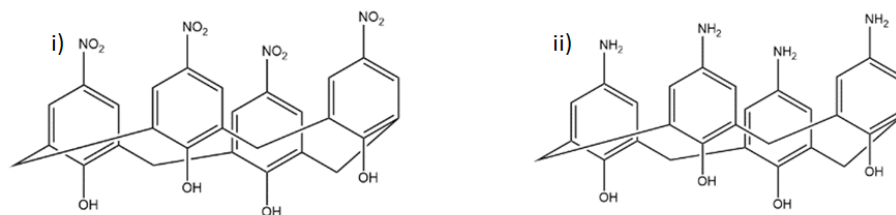


Fig. 17: Compostos resultantes da modificação do cone superior. i) Composto obtido pela reação de nitração (Derivado F), ii) Composto final resultante da reação NH_2NH_2 (Derivado G).

Da síntese química obtivemos três derivados de calixarenos que estão representados na Fig. 18. Estes calixarenos contêm grupos amina que são capazes de interagir com os aminoácidos. Os derivados sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C e bidimensionais (2D). Estes derivados foram sujeitos ao método de purificação por cromatografia de coluna e o derivado E foi único que conseguimos obter. Logo os ensaios de complexação com aminoácidos e os ensaios de citotoxicidade celular irão ser efetuados utilizando este derivado.

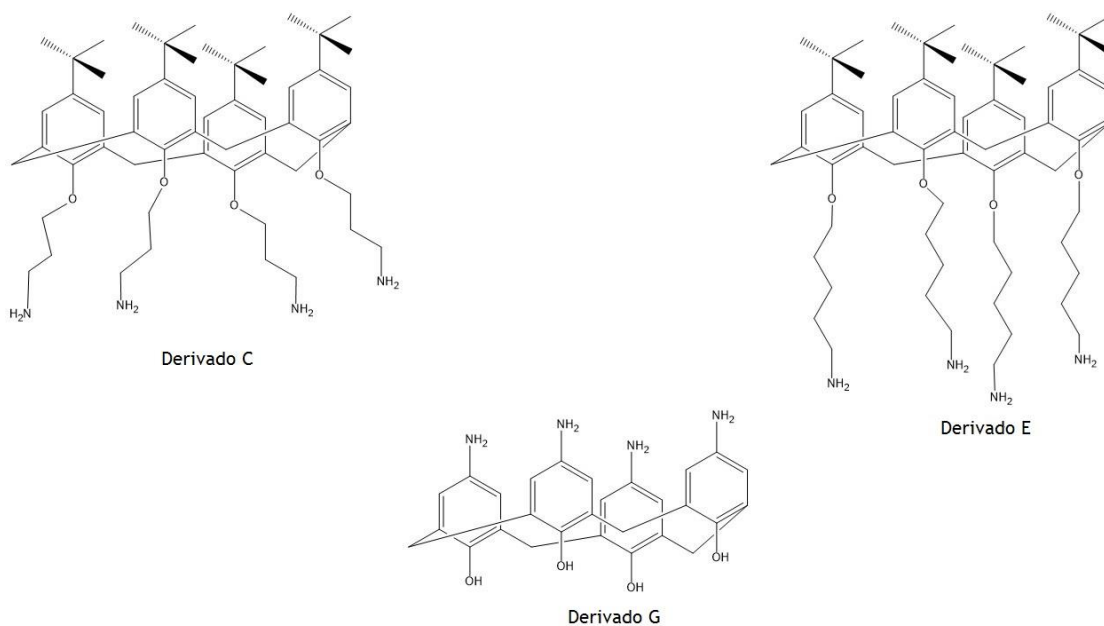


Fig. 18: Derivados de calixarenos finais.

4.2. Análise da interação dos calixarenos com os aminoácidos

A interação entre a L-leucina e os calixarenos foram estudados por titulações de RMN de ^1H . As experiências realizaram-se por adição de L-leucina à solução dos derivados de calixareno. As alterações dos espectros resultantes podem ser visualizadas tendo em conta o alargamento dos sinais dos prótons, alteração do desvio químico, que pode ser influenciado pela quantidade de L-leucina adicionada quando se forma o complexo. Estas variações determinam o local da interação da L-leucina com os derivados de calixareno.

A L-leucina foi adicionada aos derivados C, E e G, e aos compostos Calix NH_2 e ao Calix Pyr (previamente sintetizados e publicados no grupo de investigação e utilizados para comparação), nas proporções (1:1), (1:2), (1:3) e (1:4) composto:leucina em DMSO.

4.2.1. Titulação do aminoácido com o derivado E.

O derivado E sintetizado foi titulado com a L-leucina e L-isoleucina, mas no espectro de RMN de ^1H não conseguimos ver a interação entre o ligando e o aminoácido. Estes ensaios não foram possíveis de realizar devido à precipitação do aminoácido, impedindo a continuação dos estudos de interação por espectroscopia de RMN. Para que este estudo fosse possível de realizar devíamos de ter o ligando e o aminoácido dissolvidos na mesma solução para que não houvesse precipitação do aminoácido. Mas esta condição não foi possível realizar pois o derivado E dissolve em DMSO e tal não se verificava na L-leucina e na L-isoleucina. O derivado E é pouco solúvel em água não permitindo obter concentrações na ordem dos mM, que é a concentração desejada para realizar os estudos no RMN.

4.2.2. Titulação do aminoácido com o Calix NH_2 e com o Calix Pyr.

Os compostos Calix NH_2 e Calix Pyr foram titulados com a L-leucina e a sua interação foi analisada por RMN de ^1H . Os espectros obtidos desta titulação encontram-se nas Fig. 19 e 20, e pela análise da variação do desvio químico, verificou-se a formação do complexo entre os compostos Calix NH_2 e Calix Pyr e a L-leucina. No entanto a variação do desvio químico foi

pequena, cerca de 0,01 ppm, relativo aos prótons metilo do grupo $C(CH_3)_3$ (parte ampliada dos espectros, Fig. 19 e 20) dos Calix NH_2 e Calix Pyr, é visível uma pequena variação do desvio químico e maior largura do pico, sendo estas alterações mais evidentes no espectro de 1H do complexo Calix Pyr:leucina (Fig. 20).

No espectro da titulação do Calix NH_2 com L-leucina (Fig. 19) o pico correspondente aos prótons do $C(CH_3)_3$ do Calix NH_2 isolado o δ é 1,17 ppm, enquanto quando titulamos com a L-leucina na proporção de 1:4 este sinal tem uma variação de desvio químico de 0,01 ppm. Em relação à titulação realizada com o composto Calix Pyr obtivemos um resultado similar que o Calix NH_2 .

Contudo estas diferenças não são muito significativas em termos de variação de desvio químico após formação do complexo.

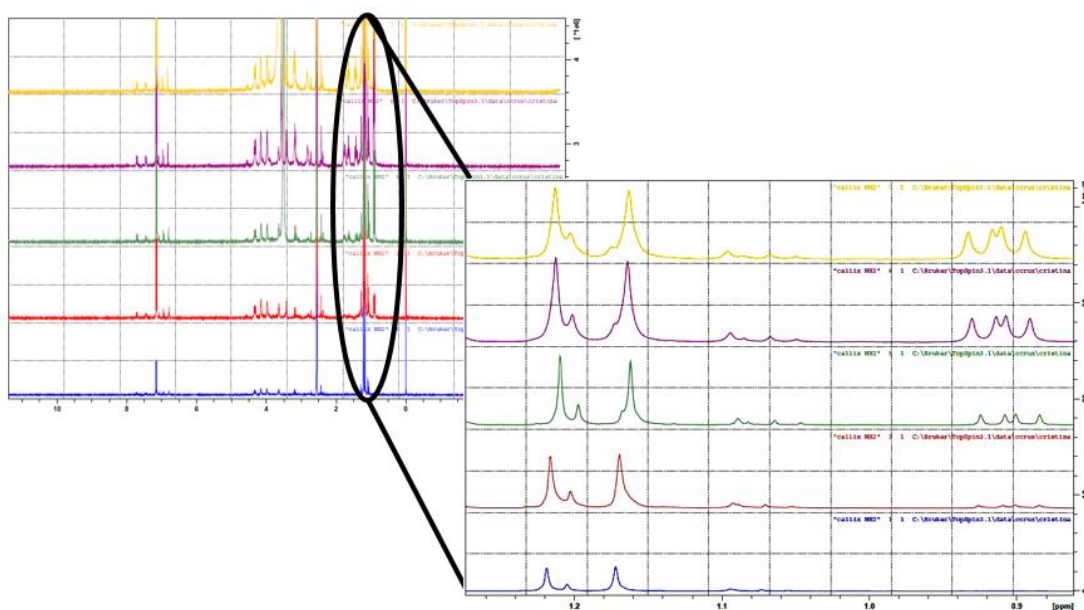


Fig. 19: Espectros de RMN de 1H da titulação do Calix NH_2 :leucina, desde o Calix NH_2 isolado até à proporção de 1:4.

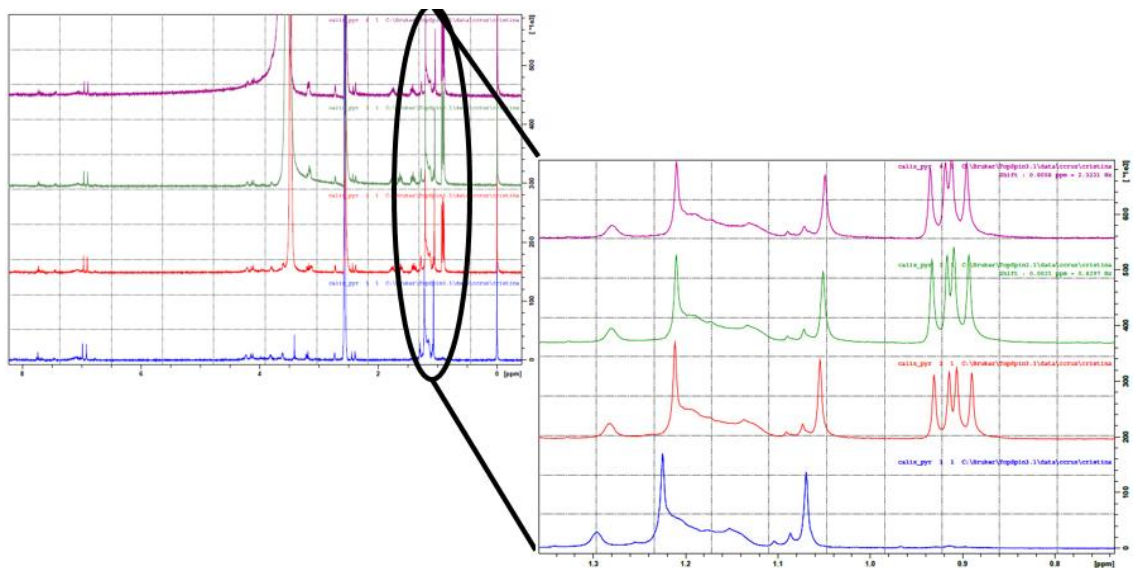


Fig. 20: Espectros de RMN de ^1H da titulação do Calix Pyr:leucina, desde o Calix Pyr isolado até à proporção de 1:4.

4.3. Avaliação Biológica

4.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células SH-SY5Y

4.3.1.1. Efeitos dos derivados de calixarenos sintetizados nas células SH-SY5Y.

Os compostos derivados de calixarenos sintetizados (derivados C, E e G) foram desenvolvidos com o intuito de atuarem como transportadores de aminoácidos neuroprotetores. Para este objetivo é crucial determinar que estes compostos não exercem efeitos citotóxicos.

De modo a avaliar o efeito dos derivados sintetizados na viabilidade ou proliferação celular, procedeu-se à realização do ensaio de MTT após a exposição da cultura celular SH-SY5Y a diferentes concentrações destes compostos durante 6h. Os resultados deste ensaio estão representados na Fig. 21.

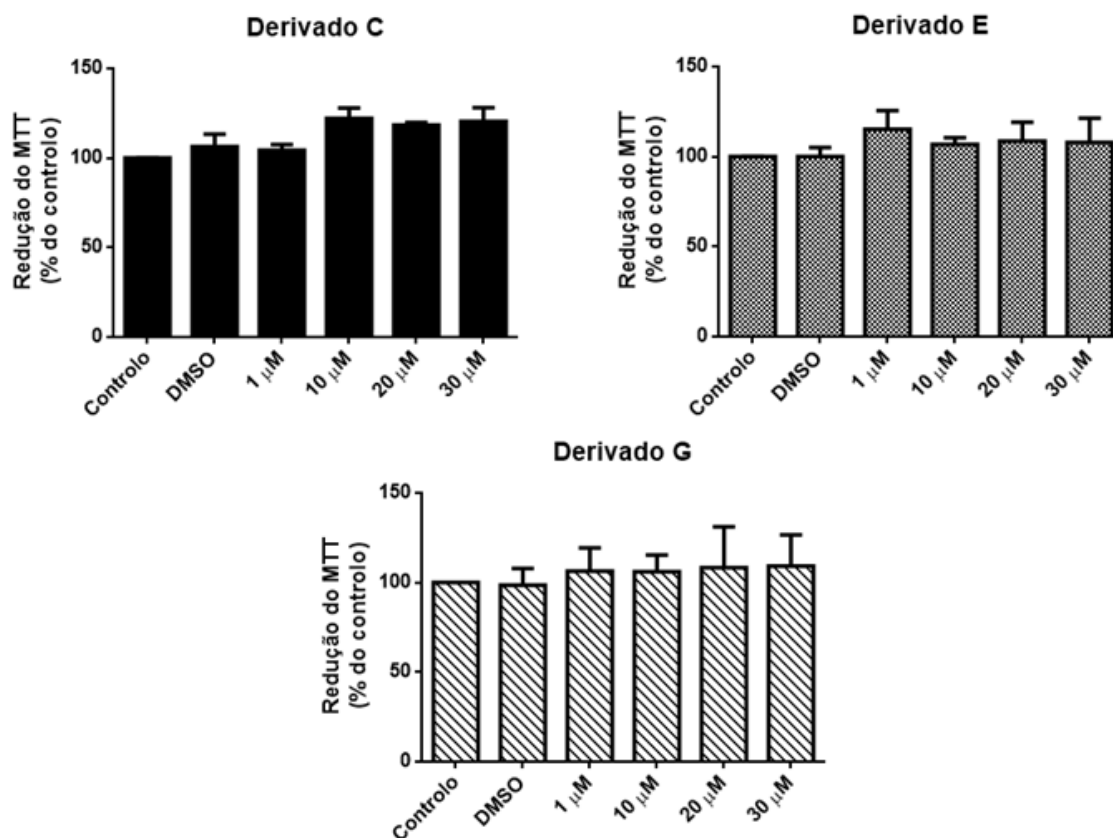


Fig. 21: Redução do MTT por células SH-SY5Y após o tratamento com as diferentes concentrações dos derivados de calixarenos sintetizados. As células foram incubadas durante 6 h com concentrações entre 1 μ M a 30 μ M. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média \pm SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's.

Na gama de concentrações testadas (1 a 30 μ M), nenhum dos derivados testados alterou de forma significativa a redução do MTT comparativamente com o controlo (Fig. 21), sugerindo que a exposição de 6h com os diferentes derivados não compromete a viabilidade/proliferação celular.

Sabendo que a concentração máxima testada de cada derivado não induziu redução do MTT, procedemos à continuação dos ensaios de MTT com testes de exposições mais prolongadas (6 a 48h) com a concentração mais elevada dos derivados testados inicialmente (30 μ M). Os resultados do ensaio ao longo do tempo estão representados na Fig. 22.

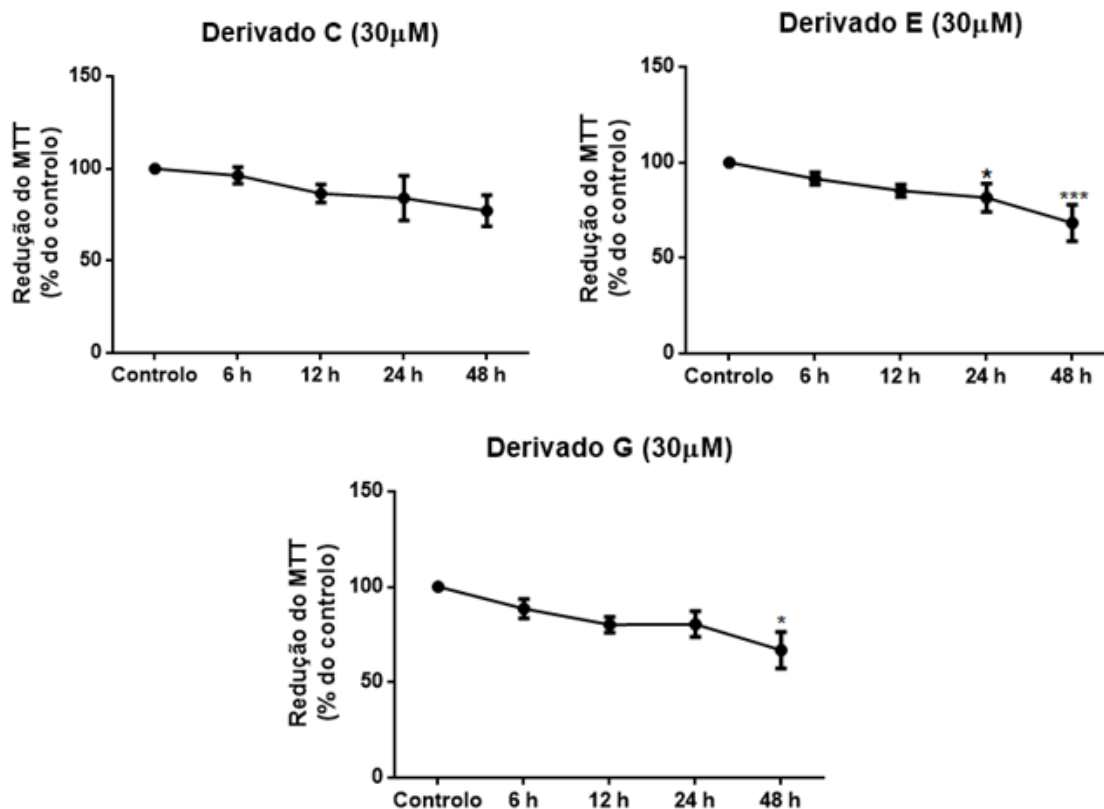


Fig. 22: Redução de MTT por células SH-SY5Y após incubação com os derivados de calixareno sintetizados na concentração de 30µM e durante a 6h, 12h, 24h e a 48h. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. *p <0,05; ***p <0,001 quando comparado com o controlo.

Nos estudos realizados ao longo do tempo (6 a 48h), foi possível observar uma diminuição da redução do MTT comparativamente ao controlo. O derivado C apresenta uma pequena diminuição na redução do MTT às 48h, mas esta diminuição não é estatisticamente significativa. Enquanto, os derivados E e G, induziram uma diminuição significativa da redução do MTT. O derivado E, induziu uma diminuição de 18,43% e 31,68% em relação ao controlo às 24h e 48h respetivamente, já o derivado G induziu uma diminuição de 33,16% às 48h em comparação com o controlo.

Os resultados obtidos nestas experiências demonstravam que o derivado C é bastante promissor para concretizar o objetivo do trabalho, ou seja, os resultados obtidos revelaram que este derivado não foi citotóxico para a linha celular SH-SY5Y e apresenta potencialidade de ser usado como transportador de aminoácidos neuroprotetores. Mas estes resultados suscitaram algumas dúvidas em relação à purificação dos derivados do calixareno sintetizados. Chegou-se a esta conclusão devido a resultados previamente obtidos por Santos

et al., 2015, em que foi mostrado que o composto Calix NH₂, o qual é semelhante ao derivado C e E, aumentou de forma acentuada a morte celular de células de uma linha tumoral de mama (MCF-7) e de próstata (LNCaP). Com base nestes dados decidiu-se proceder à purificação dos derivados de calixarenos através de uma cromatografia de coluna de sílica. Desta purificação só foi possível obter quantidades suficientes para prossecução do trabalho para o derivado E, razão pela qual os ensaios seguintes se restringiram a este composto.

Assim, fomos avaliar novamente a citotoxicidade do derivado E purificado na linha celular SH-SY5Y após uma exposição de 6h. Num ensaio preliminar analisou-se o efeito de diversas concentrações deste derivado de modo a compreender qual seria a concentração que causaria menor morte celular. Os resultados desta experiência são mostrados na Fig. 23.

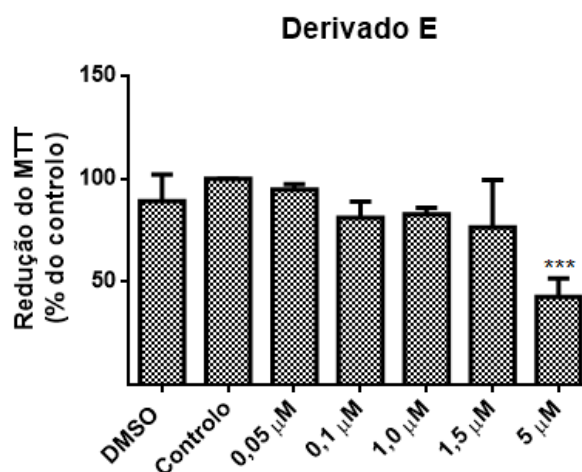


Fig. 23: Gráfico da redução de MTT por células SH-SY5Y após a exposição por um período de 6h ao derivado E em concentrações entre 0,05µM a 5µM. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. ***p <0,001 quando comparado com o controlo.

Da gama de concentrações estudadas (0,05 a 5µM), só a concentração máxima testada resultou numa diminuição estatisticamente significativa da redução de MTT em relação ao controlo, esta redução foi de 57,29% (Fig. 23)

Tendo em conta os dados obtidos foi decidido analisar o efeito de exposições mais prolongadas do derivado E na concentração mínima previamente testada e também na concentração mais elevada que já induziu perda de viabilidade celular. Os dados relativos a esta experiência são mostrados na Fig. 24.

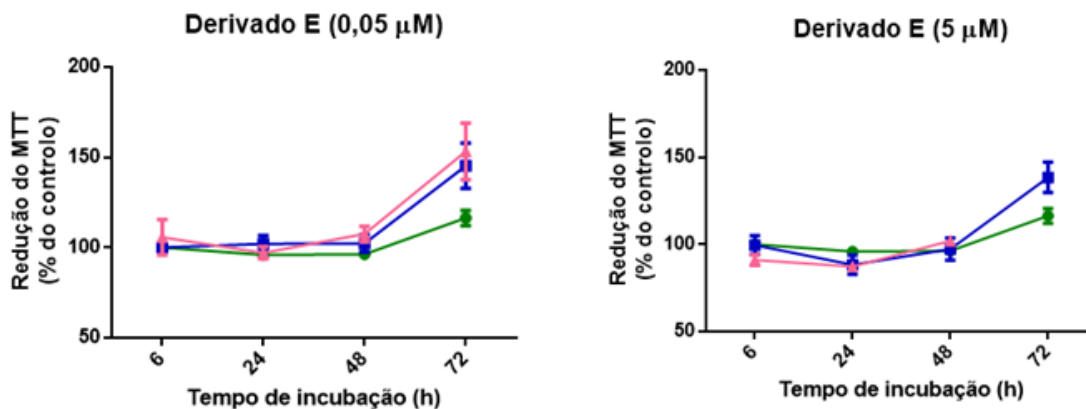


Fig. 24: Redução do MTT por células SH-SY5Y após incubação durante os tempos indicados com o derivado E 0,05 e 5µM. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. (Rosa: Derivado E, Azul: DMSO, Verde: Controlo)

Da análise dos efeitos do derivado após diferentes períodos de incubação (6 a 72h), foi possível observar um aumento da redução do MTT comparativamente aos resultados obtidos às 6h, o que pode ser explicado pela proliferação celular que ocorre ao longo deste período. Os resultados obtidos mostram que para concentrações testadas o derivado E não alterou de forma significativa a viabilidade/proliferação celular, pois não provoca diminuição na redução do MTT. Na experiência do derivado E a 5µM, o estudo às 72h, os resultados obtidos foram muito díspares não permitindo tirar qualquer conclusão. Devido à extrema variabilidade esses dados não foram incluídos no gráfico. Os ensaios com esta concentração devem ser repetidos.

4.3.1.1.1. Análise da morfologia nuclear

Para complementar os dados obtidos com os ensaios de MTT procedeu-se à análise da morfologia nuclear das células expostas ao derivado E através da incubação com o marcador fluorescente Hoescht. Para este ensaio as células SH-SY5Y foram expostas ao derivado E durante 48 e 72h, nas concentrações de 0,05 e 5 µM. O aspeto das células após exposição ao derivado E durante 48 e 72h pode ser observado na Fig. 25.

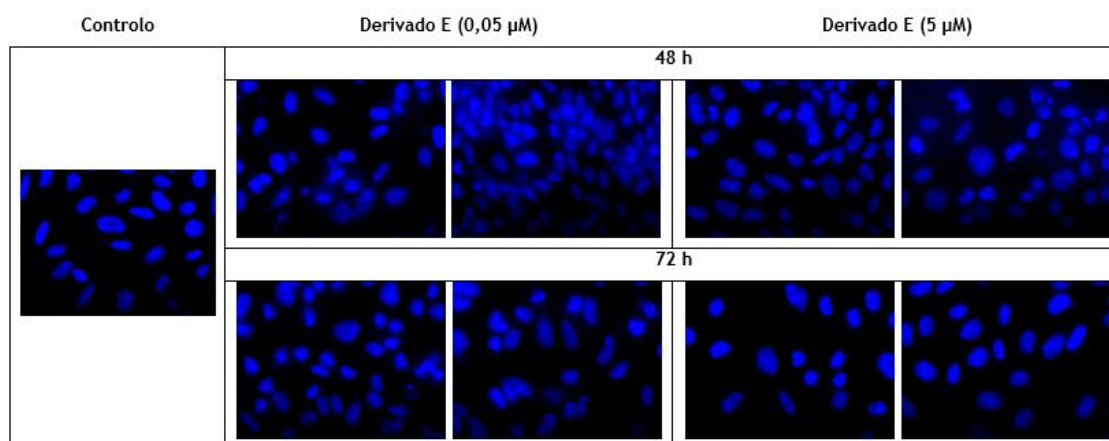


Fig. 25: Efeito do derivado E (0,05 e 5 μM) com incubação de 48 e 72h, numa cultura de células SH-SY5Y. Imagens de fluorescência de culturas de SH-SY5Y expostas ao derivado E, estas imagens foram obtidas através de microscópio de fluorescência Zeiss, usando uma ampliação de 63x.

Por análise do marcador nuclear Hoescht (imagens representativas apresentadas na Fig. 25), concluímos que nenhuma das concentrações, ou tempos de exposição, testados alteraram a morfologia nuclear das células SH-SY5Y, ou seja, as células incubadas com o derivado E possuem um aspeto similar ao das células controlo. No entanto, em ambas as concentrações existem alguns núcleos, mais pequenos e condensados, indicadores de células em processo apoptótico. Esta morfologia é observada em igual extensão nas células controlo (não exposta ao derivado E). Estes dados vão ao encontro aos obtidos nos ensaios de MTT na secção 3.4.1.1. No seu conjunto os resultados indicam que o derivado E na gama de concentrações testada não altera a viabilidade ou proliferação celular, sendo por isso promissor como estratégia de ligação/entrega de aminoácidos neuroprotetores.

4.3.1.2. Efeitos dos Calix NH_2 , Calix Pyr e Complexos.

Paralelamente aos estudos realizados, averiguou-se a citotoxicidade celular do Calix NH_2 e Calix Pyr, compostos anteriormente sintetizados pelo grupo. A estes dois compostos foi adicionado o aminoácido L-leucina, de modo a verificar se a complexação conferia alguma alteração da citotoxicidade dos compostos.

Inicialmente, e de modo a conhecer o efeito do Calix NH_2 e Calix Pyr a nível celular, procedeu-se a ensaios de MTT após a exposição da linha celular SH-SY5Y a diferentes

concentrações destes compostos durante 6h. Os resultados obtidos neste ensaio estão representados na Fig. 26.

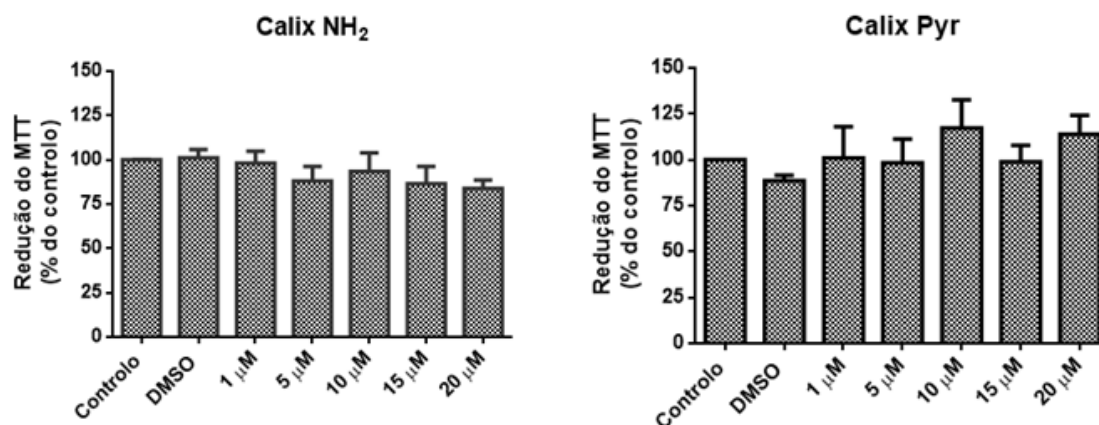


Fig. 26: Redução do MTT por células SH-SY5Y após exposição a Calix NH₂ e Calix Pyr (1μM - 20μM) durante 6h. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's.

Para a gama de concentrações testadas (1 a 20μM) nenhum dos compostos testados provocou diminuição na redução de MTT comparativamente com o controlo, sugerindo que para exposições de 6h estes compostos não comprometem a viabilidade/proliferação celular.

De seguida procedeu-se à complexação do Calix NH₂ e o Calix Pyr a L-leucina. A avaliação da complexação foi seguida por titulações de RMN de ¹H. Paralelamente avaliou-se também o efeito na viabilidade/proliferação celular da exposição das células à L-leucina (1-20 μM). Os dados obtidos podem ser observados na Fig. 27.

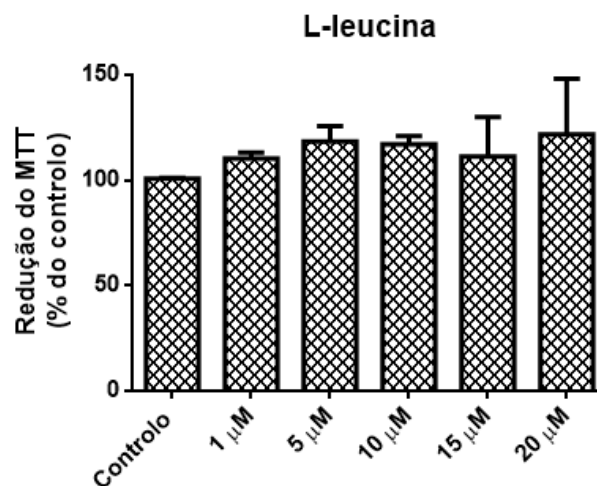


Fig. 27: Redução de MTT por células SH-SY5Y após a exposição da L-leucina (1μM a 20μM) por um período de 6h. Os dados foram expressos em percentagem de controlo e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's.

Pela análise dos resultados representados na Fig. 27 concluímos que a L-leucina não provoca diminuição na redução do MTT, como era de esperar, visto que este aminoácido está descrito na literatura como agente neuroprotetor.

De modo a entender melhor a citotoxicidade do Calix NH₂, Calix Pyr e dos complexos (Calix NH₂/Pyr + L-leucina) realizaram-se estudos com exposições mais prolongadas e com a concentração de 10μM. A escolha desta concentração foi feita com base em estudos anteriores do grupo que mostraram que para esta concentração e exposição de 48h resultava em morte da totalidade das células das linhas tumoral de mama (MCF-7) e da próstata (LNCaP).

Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados no gráfico da Fig. 28.

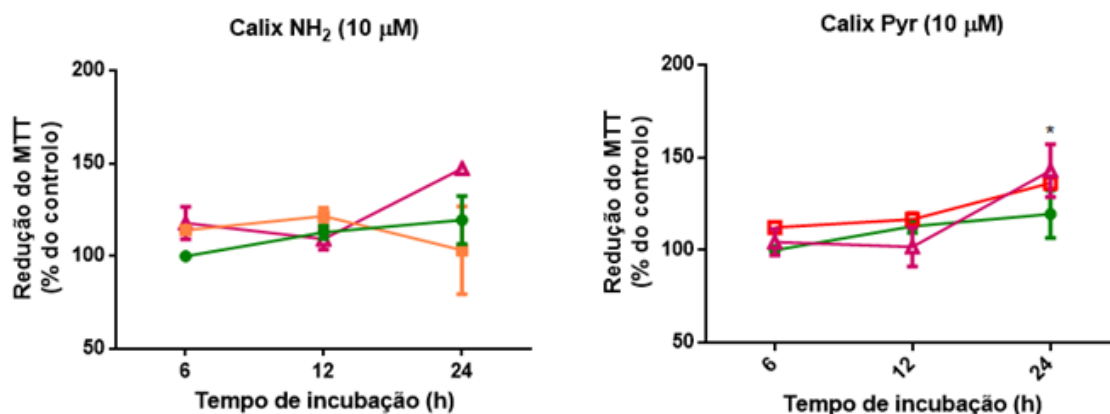


Fig. 28: Redução de MTT por células SH-SY5Y após incubação de 6, 12 ou 24h com o Calix NH₂ (■), Calix Pyr (■) e os Complexos (▲) a 10μM. Os dados foram expressos em percentagem de controlo (●) e representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicados. A análise estatística foi feita utilizando o teste One-way ANOVA seguido do teste Bonferroni's. ***p <0,05 quando comparado com o controlo.

No seu conjunto os resultados mostraram que não houve alterações significativas da redução do MTT para os tempos de incubação testados em qualquer dos compostos. É de notar que para ambos os compostos quando estes se encontram complexados com a L-leucina foi observado um ligeiro aumento na redução do MTT, estatisticamente significativo para incubações de 24h com Calix Pyr em comparação com as 6h. Estes resultados sugerem que nas concentrações e tempos de exposição testados os compostos, quer isolados quer complexados à L-leucina, não comprometem com a viabilidade/proliferação celular.

No seu conjunto os resultados obtidos sugerem que o derivado E a 0,05 μM, o Calix NH₂ e o Calix Pyr são moléculas promissoras para a complexação com os aminoácidos e para atuarem como agentes neuroprotetores.

Capítulo 5

Conclusões

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de novos compostos macrocíclicos derivados de calixarenos que formem complexos com os aminoácidos L-leucina e L-isoleucina e atuem como agentes neuroprotetores.

A síntese dos derivados teve como base o 4-tert-butilcalix[4]areno, devido à sua capacidade de complexação com moléculas. A caracterização dos derivados foi efetuada por espectroscopia de RMN, bem como os estudos de interação entre os derivados e a L-leucina. Os estudos de complexação que envolveram o derivado E não foram conclusivos devido à baixa solubilidade dos derivados em solução aquosa. No entanto foi avaliada a complexação com outros dois compostos derivados de calixarenos, os Calix NH₂ e Calix Pyr, verificando-se a formação do complexo nos espectros de RMN de ¹H, através da variação do desvio químico e do aumento da largura da banda dos prótons do grupo C(CH₃)₃ dos Calix NH₂ e Calix Pyr. Os estudos de citotoxicidade celular dos derivados de calixarenos e dos Calix NH₂ e do Calix Pyr foram realizados em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) pelo ensaio de viabilidade celular MTT. Tendo em conta os resultados dos estudos dose-resposta e da exposição prolongada dos compostos, mostraram que o derivado E a uma concentração de 0,05µM, o Calix NH₂ e o Calix Pyr não alteraram a viabilidade e a proliferação celular. Os resultados do derivado E a 5µM, até às 48h não apresenta alterações na viabilidade, mas os resultados às 72h não foram esclarecedores quanto ao seu efeito. Em relação aos estudos celulares com os complexos (Calix NH₂ e Calix Pyr com a L-leucina) mostraram que estes não afetam a viabilidade/proliferação celular.

Por microscopia de fluorescência, avaliou-se a morfologia celular das células SH-SY5Y incubadas com o derivado E. Verificou-se que as células na sua maioria se apresentavam com morfologia normal relativamente ao controlo, indo de encontro aos resultados obtidos nos ensaios do MTT.

Após os estudos realizados com Calix NH₂ e o Calix Pyr, foi possível observar que estes compostos são promissores para serem usados para interação/entrega de aminoácidos neuroprotetores e o derivado E é uma molécula promissora como agente neuroprotetor. Deste

modo pretende-se explorar estes compostos, alargando os seus estudos à interação com péptidos e estudos em sistemas *in-vivo*.

Capítulo 6

Perspetivas Futuras

Como perspectivas de desenvolvimento futuro deste trabalho, são de considerar e incluir-se os seguintes pontos:

- Otimizar a etapa de purificação dos derivados C e G e estudar o seu efeito nas células SH-SY5Y;
- Estudar a interação dos derivados de calixarenos com os aminoácidos e péptidos, nomeadamente leucina-isoleucina, visto existirem estudos que indicam o aumento da expressão de fatores neurotróficos ou eles próprios exercerem uma ação neuroprotetora;
- Avaliar a viabilidade ou proliferação celular dos derivados e complexos com aminoácidos/péptidos nas células SH-SY5Y;
- Repetir as experiências de fluorescência para avaliar o efeito dos derivados na morfologia das células.
- Testar os derivados sintetizados em diferentes vias de administração em murghanos e avaliar a distribuição dos transportadores nos tecidos.

Capítulo 7

Bibliografia

Alvarez, Jorge Ivan, Olivia Saint-Laurent, Alisha Godschalk, Simone Terouz, Casper Briels, Sandra Larouche, Lyne Bourbonnière, Catherine Larochelle, and Alexandre Prat. 2015. "Focal Disturbances in the Blood-brain Barrier Are Associated with Formation of Neuroinflammatory Lesions." *Neurobiology of Disease* 74. Elsevier Inc.: 14-24. doi:10.1016/j.nbd.2014.09.016.

Angius, Fabrizio, and Alice Floris. 2015. "Liposomes and MTT Cell Viability Assay: An Incompatible Affair." *Toxicology in Vitro* 29 (2). Elsevier Ltd: 314-19. doi:10.1016/j.tiv.2014.11.009.

Assfalg, Michael, Laura Ragona, Katuscia Pagano, Mariapina D'Onofrio, Serena Zanzoni, Simona Tomaselli, and Henriette Molinari. 2015. "The Study of Transient Protein-nanoparticle Interactions by Solution NMR Spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bbapap.2015.04.024.

Bagnacani, Valentina, Valentina Franceschi, Michele Bassi, Michela Lomazzi, Gaetano Donofrio, Francesco Sansone, Alessandro Casnati, and Rocco Ungaro. 2013. "Arginine Clustering on calix[4]arene Macrocycles for Improved Cell Penetration and DNA Delivery." *Nature Communications* 4. Nature Publishing Group: 1721. doi:10.1038/ncomms2721.

Banks, W.a. 2015. "The Blood-Brain Barrier in Neuroimmunology: Tales of Separation and Assimilation." *Brain, Behavior, and Immunity* 44. Elsevier Inc.: 1-8. doi:10.1016/j.bbi.2014.08.007.

Bicker, Joana, Gilberto Alves, Ana Fortuna, and Amílcar Falcão. 2014. "Blood-Brain Barrier Models and Their Relevance for a Successful Development of CNS Drug Delivery Systems: A Review." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87 (3). Elsevier B.V.: 409-32. doi:10.1016/j.ejpb.2014.03.012.

Campos-Bedolla, Patricia, Fruzsina R. Walter, Szilvia Veszélka, and Mária a. Deli. 2014. "Role

- of the Blood-Brain Barrier in the Nutrition of the Central Nervous System.” *Archives of Medical Research* 45 (8): 610-38. doi:10.1016/j.arcmed.2014.11.018.
- Creaven, Bernadette S., Denis F. Donlon, and John McGinley. 2009. “Coordination Chemistry of calix[4]arene Derivatives with Lower Rim Functionalisation and Their Applications.” *Coordination Chemistry Reviews* 253 (7-8): 893-962. doi:10.1016/j.ccr.2008.06.008.
- Da Silva, E, A N Lazar, and A W Coleman. 2004. “Biopharmaceutical Applications of Calixarenes.” *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 14 (1). Elsevier Masson SAS: 3-20. doi:10.1016/S1773-2247(04)50001-1.
- de Fátima, Angelo, Sergio Antonio Fernandes, and Adão Aparecido Sabino. 2009. “Calixarenes as New Platforms for Drug Design.” *Current Drug Discovery Technologies*. doi:10.2174/157016309788488302.
- Drakalska, Elena, Denitsa Momekova, Yana Manolova, Dessislava Budurova, Georgi Momekov, Margarita Genova, Liudmil Antonov, Nikolay Lambov, and Stanislav Rangelov. 2014. “Hybrid Liposomal PEGylated calix[4]arene Systems as Drug Delivery Platforms for Curcumin.” *International Journal of Pharmaceutics* 472 (1-2). Elsevier B.V.: 165-74. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.06.034.
- Ebdelli, R., S. Ben Dkhil, T. Azib, R. Ben Chaabane, I. Dumazet-Bonnamour, H. Ben Ouada, and J. Davenas. 2014. “Electrical, Optical and Morphological Properties of a New Chromogenic calix[4]arene Derivative.” *Synthetic Metals* 197. Elsevier B.V.: 112-18. doi:10.1016/j.synthmet.2014.09.007.
- Garcimartín, Alba, José Joaquín, Jorge Arturo Santos-lópez, María Elvira López-oliva, María Pilar, Francisco José Sánchez-muniz, and Juana Benedí. 2015. “Silicon as Neuroprotector or Neurotoxic in the Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line.” *Chemosphere* 135: 217-24.
- Hagan, Nellwyn, and Ayal Ben-Zvi. 2014. “The Molecular, Cellular, and Morphological Components of Blood-brain Barrier Development during Embryogenesis.” *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 1-9. doi:10.1016/j.semcdb.2014.12.006.
- Hong, Jooyeon, and Sihyun Ham. 2008. “Comparative Study of calix[4]arene Derivatives: Implications for Ligand Design.” *Tetrahedron Letters* 49 (15): 2393-96. doi:10.1016/j.tetlet.2008.02.061.
- Hu, Wen-Jing, Ming-Liang Ma, Yahu a. Liu, Jiu-Sheng Li, Biao Jiang, and Ke Wen. 2015. “Synthesis and Structures of Malonate Derivative-calix[4]arene Conjugates.” *Chinese Chemical Letters* 26 (7). Chinese Chemical Society and Institute of Materia Medica,

- Chinese Academy of Medical Sciences: 914-17. doi:10.1016/j.ccllet.2015.05.017.
- Kolter, Marise, Melanie Ott, Christian Hauer, Isolde Reimold, and Gert Fricker. 2015. "Nanotoxicity of Poly(n-Butylcyano-Acrylate) Nanoparticles at the Blood-brain Barrier, in Human Whole Blood and in Vivo." *Journal of Controlled Release* 197. Elsevier B.V.: 165-79. doi:10.1016/j.jconrel.2014.11.005.
- Kurzątkowska, Katarzyna, Serkan Sayin, Mustafa Yilmaz, Hanna Radecka, and Jerzy Radecki. 2015. "Calix[4]arene Derivatives as Dopamine Hosts in Electrochemical Sensors." *Sensors and Actuators B: Chemical* 218: 111-21. doi:10.1016/j.snb.2015.04.110.
- Lo, Pik Kwan, and Man Shing Wong. 2008. "Extended calix[4]arene-Based Receptors for Molecular Recognition and Sensing." *Sensors* 8 (9): 5313-35. doi:10.3390/s8095313.
- Lupu, a. R., and T. Popescu. 2013. "The Noncellular Reduction of MTT Tetrazolium Salt by TiO₂ Nanoparticles and Its Implications for Cytotoxicity Assays." *Toxicology in Vitro* 27 (5). Elsevier Ltd: 1445-50. doi:10.1016/j.tiv.2013.03.006.
- Memon, Shahabuddin, and Mustafa Yilmaz. 2001. "Synthesis and Binding Properties of Polymeric Calix [4] Arene Nitriles." *Reactive & Functional Polymers* 50: 77-84.
- Mendes, Bárbara, Cláudia Marques, Isabel Carvalho, Paulo Costa, Susana Martins, Domingos Ferreira, and Bruno Sarmiento. 2015. "Influence of Glioma Cells on a New Co-Culture in Vitro Blood-brain Barrier Model for Characterization and Validation of Permeability." *International Journal of Pharmaceutics* 490 (1-2). Elsevier B.V.: 94-101. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.05.027.
- Paolino, Donatella, Donato Cosco, Roberto Molinaro, Christian Celia, and Massimo Fresta. 2011. "Supramolecular Devices to Improve the Treatment of Brain Diseases." *Drug Discovery Today* 16 (7-8). Elsevier Ltd: 311-24. doi:10.1016/j.drudis.2011.02.006.
- Park, Kyun Joo, Minyoung Kim, Seunghwan Seok, Young-Wun Kim, and Do Hyun Kim. 2015. "Quantitative Analysis of Cyclic Dimer Fatty Acid Content in the Dimerization Product by Proton NMR Spectroscopy." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 149. Elsevier B.V.: 402-7. doi:10.1016/j.saa.2015.04.099.
- Pastor, Aurelia, and Eloísa Martínez-Viviente. 2008. "NMR Spectroscopy in Coordination Supramolecular Chemistry: A Unique and Powerful Methodology." *Coordination Chemistry Reviews* 252 (21-22): 2314-45. doi:10.1016/j.ccr.2008.01.025.
- Patra, Subrata, Debdeep Maity, Ravi Gunupuru, Pragati Agnihotri, and Parimal Paul. 2012. "Calixarenes: Versatile Molecules as Molecular Sensors for Ion Recognition Study."

Journal of Chemical Sciences 124 (6): 1287-99. doi:10.1007/s12039-012-0329-y.

Petroff, O a. 1988. "Biological 1H NMR Spectroscopy." *Comp Biochem Physiol B* 90 (2): 249-60.

Santos, Diana, João Medeiros-Silva, Sara Cegonho, Elisabete Alves, Filipa Ramilo-Gomes, Adriana O. Santos, Samuel Silvestre, and Carla Cruz. 2015. "Cell Proliferation Effects of calix[4]arene Derivatives." *Tetrahedron* 71 (40). Elsevier Ltd: 7593-99. doi:10.1016/j.tet.2015.07.077.

Shigemitsu, Yoshiki, Teppei Ikeya, Akihiro Yamamoto, Yuusuke Tsuchie, Masaki Mishima, Brian O Smith, Peter Güntert, and Yutaka Ito. 2015. "Evaluation of the Reliability of the Maximum Entropy Method for Reconstructing 3D and 4D NOESY-Type NMR Spectra of Proteins." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457 (2). Elsevier Inc.: 200-205. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.088.

Sirit, Abdulkadir, and Mustafa Yilmaz. 2009. "Chiral Calixarenes." *Turkish Journal of Chemistry* 33 (2): 159-200. doi:10.3906/kim-0901-36.

Solomons, T.W.Graham, and C.B Fryhle. 2001. "Química Organica 1."

Stepanenko, a.a., and V.V. Dmitrenko. 2015. "Pitfalls of the MTT Assay: Direct and off-Target Effects of Inhibitors Can Result in Over/underestimation of Cell Viability." *Gene*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.gene.2015.08.009.

Stockert, Juan C., Alfonso Blázquez-Castro, Magdalena Cañete, Richard W. Horobin, and Ángeles Villanueva. 2012. "MTT Assay for Cell Viability: Intracellular Localization of the Formazan Product Is in Lipid Droplets." *Acta Histochemica* 114 (8): 785-96. doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006.

Tabatabaei, Seyed Nasrollah, Hélène Girouard, Anne-Sophie Carret, and Sylvain Martel. 2015. "Remote Control of the Permeability of the Blood-Brain Barrier by Magnetic Heating of Nanoparticles: A Proof of Concept for Brain Drug Delivery." *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2015.02.027.

Talotta, C., C. Gaeta, and P. Neri. 2015. *Large Calixarenes: Synthesis and Properties. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.10828-5.

Vecsernyés, Miklós, Ferenc Fenyvesi, Ildikó Bácskay, Mária a. Deli, Lajos Szenté, and Éva Fenyvesi. 2014. "Cyclodextrins, Blood-Brain Barrier, and Treatment of Neurological Diseases." *Archives of Medical Research* 45 (8): 711-29.

doi:10.1016/j.arcmed.2014.11.020.

Wierzbicki, M., H. Jędrzejewska, and a. Szumna. 2014. "Chiral Calixarenes." *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 1-23. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.11030-3.

Wolf, Nicholas J, Emil M Georgiev, Alexander T Yordanov, Bruce R Whittlesey, H Fred Koch, and D Max Roundhill. 1999. "Synthesis and Crystal Structures of Lower Rim Amine and Carbamoyl Substituted Calixarenes as Transfer Agents for Oxyanions between an Aqueous and a Chloroform Phase." *Polyhedron* 18 (6): 885-96. doi:10.1016/S0277-5387(98)00375-1.

Zhou, Yue, Hui Li, and Ying-Wei Yang. 2015. "Controlled Drug Delivery Systems Based on Calixarenes." *Chinese Chemical Letters*. Chinese Chemical Society, 1-4. doi:10.1016/j.cclet.2015.01.038.