



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**SÍNTESE E ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DE SURFACTANTES BIS-
GUANIDÍNICOS E PEI- β -CD**

ALBERT LEDER ST. JOHN

Florianópolis
Maio/2020

Albert Leder St. John

**SÍNTESE E ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DE SURFACTANTES BIS-
GUANIDÍNICOS E PEI- β -CD**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos
Orientador

Me. Gean Michel Dal Forno
Coorientador

Florianópolis
Maio/2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca Universitária da UFSC

St. John, Albert Leder St. John

SÍNTESE E ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DE
SURFACTANTES BIS-GUANIDÍNICOS E PEI- β -CICLODEXTRINA /

Albert Leder St. John ; orientador, Josiel Barbosa

Domingos,coorientador, Gean Michel Dal Forno, 2021.

60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -

Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências

Físicas e Matemáticas, Graduação em Química, Florianópolis,2021.

Inclui referências.

1. Química. 2. Polietilenoimina. 3. β -ciclodextrina.

4.Guanidina. I. Domingos, Josiel Barbosa. II. Dal Forno, Gean Michel.

III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química. IV.

Título.

Este trabalho é dedicado aos meus pais e amigos, que sempre apoiam a minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos os integrantes do Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio) da UFSC, pelos ensinamentos repassados, pelo carinho e acolhimento dentro do laboratório e pela excelência dos profissionais.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Josiel Domingos pela condução do projeto e motivação durante essa época de pandemia para continuar exercendo a profissão de pesquisador. E ao meu coorientador Me. Gean Dal Forno, pela paciência no laboratório e pelas contribuições nesse trabalho.

A todos os meus colegas de sala e aos membros da Associação Atlética Acadêmica da Química (ATQ), pelos inúmeros trabalhos em equipes e contribuições no âmbito pessoal e profissional.

Agradecimentos aos integrantes do Laboratório de Polímeros e Surfactantes (POLISSOL) da UFSC Prof. Ismael Bellettini e a Luíza Schlüter, pelas medidas físico-químicas dos surfactantes, e por salientar a importância da cooperação entre laboratórios e a necessidade de compartilhamento de ideias e conceitos entre os vários ramos da ciência para o avanço ao conhecimento científico.

E agradeço aos meus pais Miriam e Peter St. John e minha irmã Alice St. John pelo apoio incessante aos meus estudos e por todo o respeito e carinho.

RESUMO

O avanço na química supramolecular de sistemas de liberação de fármacos (*drug delivery*) é marcado pela utilização e combinação de compostos biologicamente ativos e no planejamento de complexos moleculares cada vez mais sofisticados. A utilização da β -ciclodextrina (β -CD), para a formação de complexos hóspede-hospedeiro, e polietilenoimina (PEI), como agente transfectante, é destaque na elaboração de catalisadores macromoleculares, na forma de enzimas sintéticas, e no transporte de moléculas bioativas. Nesse trabalho foram sintetizados uma série inédita de surfactantes bis-guanidínicos (C_nBG) como aceptores e direcionadores para biomoléculas negativamente carregados e ligantes para centros metálicos. Os surfactantes foram obtidos via quatro etapas, das quais envolveram reações de proteção e desproteção de aminas e reações de alquilação e guanidização de aminas secundárias e primárias, respectivamente, e caracterizados via RMN de 1H e de ^{13}C e ATR-FTIR. Os rendimentos de cada etapa foram de moderados a ótimos, dependendo da cadeia alquílica. Simultaneamente, sintetizou-se a **PEI- β -CD** como hospedeira dos surfactantes C_nBG e para futura aplicação em meios biológicos.

Palavras-chave: Polietilenoimina, β -ciclodextrina, guanidina, sistemas de liberação de fármacos.

ABSTRACT

Advances in supramolecular chemistry and their approach at drug delivery systems is marked by the treatment and combination of biologically active compounds with drug carriers more and more sophisticated. The use of β -cyclodextrin (β -CD), as a promoter for host-guest complexes, and polyethylenimine, as transfection agent, offer unique conditions for the preparations of macromolecular catalysts, such like synzymes, and promising drug carriers. Herein, we describe the synthesis of bis(guanidine) surfactants (C_nBG) for the first time as an molecular glue for biomolecules containing oxyanionic groups and as binders for metal centers. The surfactants C_nBG were obtained in a four-phase process, such as protection and deprotection reactions of primary aminas and alkylation and guanidylation, respectively, of secondary and primary amines, and characterized by 1H and ^{13}C NMR and ATR-FTIR. The yields of each phase were moderate do excellent, depending on the alkyl chain. Simultaneously, branched polyethylenimine grafted with β -ciclodextrin where prepared to give **PEI- β -CD** as host for surfactants C_nBG and for future application in biological milieu.

Keywords: Polyethylenimine. β -cyclodextrin, guanidine, drug delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formas comerciais da polietilenoimina.....	16
Figura 2 – Ilustração do mecanismo de transfecção por efeito de esponja de prótons.....	17
Figura 3 – PEI modificada com a β -CD.....	18
Figura 4 – Exemplos de compostos pertencentes a classificação de CDs.....	19
Figura 5 – Exemplo da PEI- β -CD como estabilizante de fármaco no combate ao câncer.....	20
Figura 6 – Utilização da PEI- β -CD no planejamento racional de um sistema de liberação de fármacos.....	21
Figura 7 – Sistema de liberação de fármacos proposto por Kowalczyk e colaboradores.....	22
Figura 8 – Ilustração dos complexos hóspede-hospedeiro entre surfactantes e CDs.....	22
Figura 9 – Exemplos de guanidinas.....	23
Figura 10 – Ligações de hidrogênio entre cátion e guanidínio e íons aniônicas.....	24
Figura 11 – Utilização de PEI modificada como enzima sintética.....	24
Figura 12 – Grupo guanidínio como ligante para complexos de paládio (0).....	25
Figura 13 – Rota sintética para obtenção dos surfactantes.....	33
Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H obtidos durante a síntese do surfactante C_{16}BG	34
Figura 15 – Espectros de RMN de ^{13}C dos surfactantes C_nBG	35
Figura 16 – Espectros de FTIR-ATR dos surfactantes C_nBG	36
Figura 17 – Perfil da curva de condutividade vs concentração de tensoativo.....	37
Figura 18 – Tensão superficial vs $\ln \{[\text{C}_{16}\text{BG}]/(\text{mol L}^{-1})\}$	38
Figura 19 – Razão entre as intensidades I_1 e I_3 vs $[\text{C}_{16}\text{BG}]$	39
Figura 20 – Relação entre cmc e cadeia alquílica dos surfactantes.....	40
Figura 21 – Rota sintética para obtenção da PEI- β -CD.....	41
Figura 22 – Espectros de RMN de ^1H obtidos durante a síntese da PEI- β -CD.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pontos de fusão em °C dos produtos 4 e C _n BG.....	34
Tabela 2 – Intensidade dos sinais do carbono guanidínio e do carbono terminal e de maior intensidade da cadeia alquílica da Figura 14.....	35
Tabela 3 – cmc (mol L ⁻¹) dos surfactantes obtidos via diferentes métodos.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD Ciclodextrina

β -Lap β -Lapachona

RMN Ressonância magnética nuclear

PEI Polietilenoimina

ROP Polimerização pôr abertura de anel

DNA Ácido desoxirribonucleico

AMF Campo magnético alternado

Ad Adamantano

DOX Doxorrubicina

NQO1 NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1

FA Ácido Fólico

pDNA Plasmídeo

MNP Nanopartícula metálica magnética

FMN Monocleótido de flavina

NAD Dinucleótido de nicotinamida e adenina

DMSO Dimetilsulfóxido

P.F. Ponto de fusão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 POLIETILENOIMINA.....	16
2.2 CICLODEXTRINAS.....	18
2.3 COMPOSTOS GUANIDÍNIOS.....	22
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1.1 Reagentes e solventes.....	26
4.1.2 Instrumentação.....	26
4.1.2.1 Síntese e purificação.....	26
4.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	27
4.2.1 Medidas de condutividade.....	27
4.2.2 Medidas de fluorescência.....	27
4.2.3 Medidas de tensão superficial.....	28
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.3.1 Síntese dos surfactantes bis-guanidínicos.....	28
4.3.1.1 Síntese da 1,5-difalimida-3-azapentano (2).....	28
4.3.1.2 Síntese da 3-alkuil-1,5-difalimida-3-azapentano (3).....	28
4.3.1.2 Síntese da 1,5-diamina-3-alkuil-3-azapentano (4).....	29
4.3.1.3 Síntese do dicloreto de N,N'-[(alkuilamina)di-2,1-etanodil]bis-guanidina (C _n BG).....	29
4.3.2 Síntese do polímero modificado polietilenoimina-β-ciclodextrina.....	30
4.3.2.1 Síntese do tosil-imidazol (5).....	30
4.3.2.2 Síntese da mono-6-tosil-b-ciclodextrina (6).....	30
4.3.2.3 Síntese do polímero modificado polietilenoimina-β-ciclodextrina (PEI-β-CD).....	31

4.4 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO E TRATAMENTO/DESTINO DOS RESÍDUOS	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 SÍNTESE DOS SURFACTANTES BIS-GUANIDÍNICOS	32
5.2 CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC) DOS TENSOATIVOS	35
5.3 SÍNTESE DA PEI- <i>B</i> -CD	39
6 CONCLUSÕES	42
7 REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE A – Espectros de RMN de ¹H e de ¹³C dos produtos obtidos	47
APÊNDICE B – Gráficos das medidas de tensão superficial, de condutividade e de fluorescência	56
ANEXO A – DIREITO AUTORAIS	58

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sistemas supramoleculares suscetíveis a liberação de compostos biologicamente ativos (*drug delivery systems*) em células alvo, é cada vez mais recorrente na literatura, cujo objetivo é facilitar a introdução de fármacos, sondas, quimioterápicos, nanopartículas, etc. O polímero polietilenoimina (PEI), agente transfectante não viral, é comumente utilizado em sistemas de liberação de fármacos ou em terapias genéticas para encapsular plasmídeos (pDNA), com o objetivo de carregar o código genético para o interior de células.

Quanto a eficiência dos sistemas supramoleculares baseados na PEI, observa-se que a taxa de transfecção e a citotoxicidade do sistema são proporcionais ao tamanho da cadeia polimérica, devido a sua cadeia não clivável. Para minimizar essa limitação, a estrutura polimérica da PEI pode ser modificada com ciclodextrinas (CDs) aumenta a eficiência de transfecção e diminui a sua citotoxicidade, bem como melhora a solubilidade e a biodisponibilidade de espécies hidrofóbicas complexadas ao polímero.

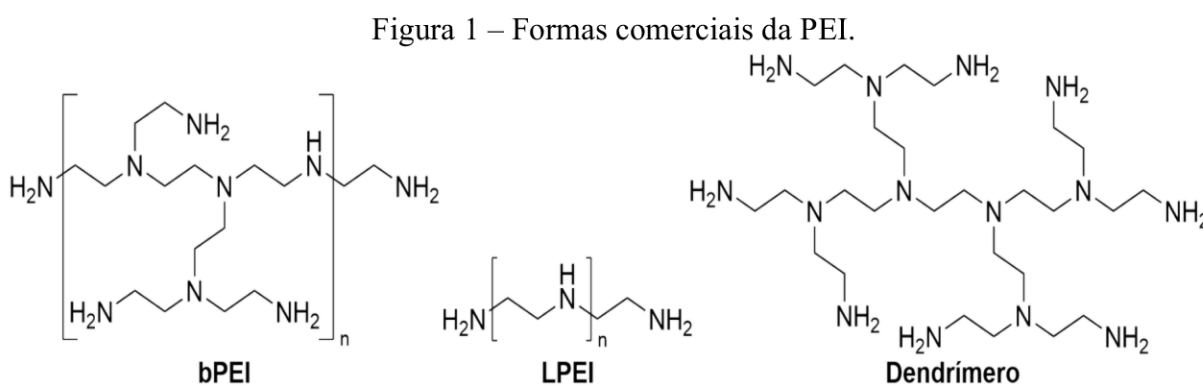
A β -CD é um oligossacarídeo conhecido por sua biodegradabilidade, solubilidade em água e por incorporar espécies hidrofóbicas, formando complexos hospede-hospedeiro (*host-guest*) estáveis, com inúmeros fármacos. O emprego de β -CDs derivatizadas e hospedeiras de surfactante guanidínicos, cátions comumente usados por proteínas e enzimas para reconhecer substâncias de origem biológica contendo grupos carboxila e fosfatos, visam um aumento da eficiência destes sistemas.

Logo, este projeto tem enfoque na síntese de uma série inédita de surfactantes bis-guanidínicos, para atuarem como aceptores da polietilenoimina- β -ciclodextrina (PEI- β -CD) e como ligantes para centros metálicos, e a determinação da concentração micelar crítica (cmc) dos tensoativos via medidas de condutividade, de tensão superficial e de fluorescência do estado estacionário do pireno. Concomitantemente, sintetizou-se a PEI- β -CD para a posterior incorporação dos surfactantes hospedeiros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLIETILENOIMINA

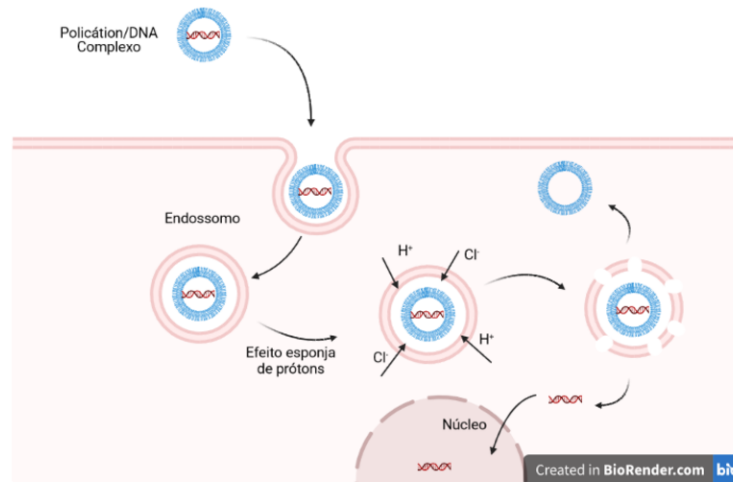
Comercialmente, a síntese da PEI é realizada por polimerização de abertura de anel (ROP) catiônica da aziridina, produzindo um polímero composto pela repetição da unidade monomérica (CH₂CH₂NH).¹ Conforme a condição da reação, é possível obter o polímero na sua forma linear (LPEI), parcialmente ramificada (bPEI) e repetidamente ramificada (dendrimeros).(Figura 1)



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Na literatura científica, modificações na cadeia polimérica da PEI são recorrentes em áreas da química supramolecular biológica e medicinal, devido a capacidade de encapsulamento e transfecção celular das nanoestruturas baseados em PEI. Características das quais decorrem do caráter catiônico, em pH fisiológico, e pela sua elevada eficiência de transfecção. Esse último é pertinente a alta afinidade com macromoléculas negativamente carregadas e, devido a sua atividade endosomolítica intrínseca, sendo capaz de carregar plasmídeos de DNA (pDNA) para dentro da célula por endocitose e na forma de complexos com tamanhos nanométricos (Figura 2).¹⁻³

Figura 2 – Ilustração do mecanismo de transfecção por efeito de esponja de prótons.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

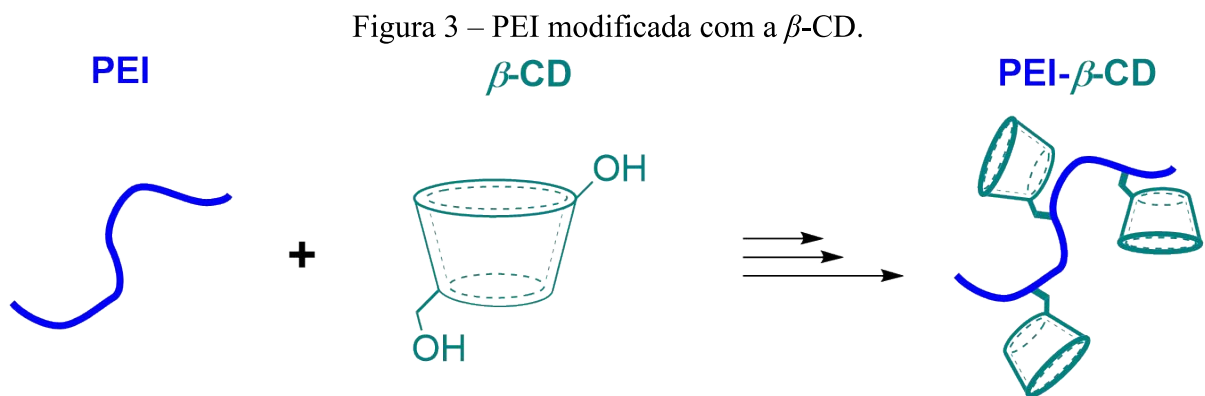
O mecanismo ilustrado na Figura 2, usado para explicar a atividade endossomolítica da PEI, é conhecido como “efeito esponja de prótons”. Primeiramente, ocorre espontaneamente a condensação e a adesão do polícatión ao pDNA, formando um complexo esférico de carga residual positiva, o que permite sua interação com as membranas celulares. Após a formação do endossomo, ocorre a ruptura da membrana endossomal em virtude da alta capacidade de tamponamento e flexibilidade para inchar quando protonado. Ou seja, o políplexo presente no endossomo absorve os prótons, devida a capacidade de tamponamento em uma ampla faixa de pH, e para neutralizar a carga positiva há um influxo simultâneo de íons cloreto (Cl⁻). Tais processos provocam o intumescimento do polímero e o inchaço do endossomo e, por fim, devida a combinação de ambos processos ocorre a desestabilização e o rompimento da membrana endossomal.^{4,5}

Além da sua aplicação na terapia gênica, existem pesquisas explorando o polímero como um catalisador para reações de Henry,⁶ como enzima sintética na reação de transferência de grupos fosforila,^{7,8} processo redox para obtenção de energia celular, também como estabilizante de nanopartículas⁹ e na imobilização enzimática.¹⁰

A PEI de alta massa molar possui maior eficiência de transfecção e facilidade em formar agregados comparado ao de baixa massa molar. Porém a citotoxicidade e a resposta do sistema imunológico também são maiores, devido ao caráter catiônico e não clivável, sendo essa a maior barreira para o uso clínico desse políplexo.²

A inserção de grupos cliváveis e biodegradáveis na cadeia polimérica auxiliam na diminuição da citotoxicidade e aumentam a eficiência de transfecção. Adições de copolímeros com caráter hidrofílico ou aniônico, para a supressão da carga positiva, e a inserção de grupos, como ligações de dissulfeto ou oligossacarídeos na cadeia polimérica, como a β -CD, são estratégias eficazes na redução da citotoxicidade da PEI.¹

Resultados de transfecção celular, obtidos por Pun e colaboradores¹¹ em testes com a PEI linear e ramificada derivatizadas com a β -CD (Figura 3), mostraram um aumento na concentração inibitória (IC_{50}) celular na magnitude de duas a três vezes, quando comparado com o polímero catiônico não modificado, mantendo a eficiência de transfecção semelhante ao derivado não substituído.



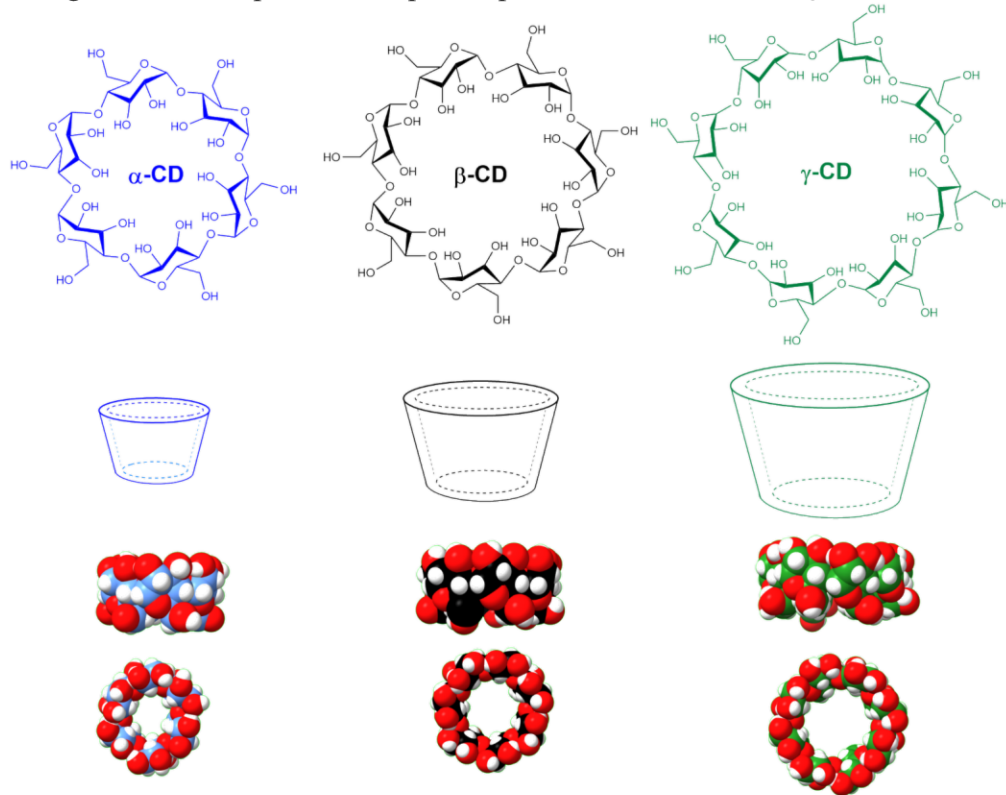
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Tang e colaboradores¹² utilizaram essa mesma ideia para aplicar o polímero na terapia genética em células neurais e em ratos. Observaram que o polímero é biocompatível com as células testadas e uma melhoria na eficiência de transfecção da PEI600- β -CD, quando comparado com a PEI600.

2.2 CICLODEXTRINAS (CD)

As CDs pertencem a família dos oligossacarídeos cíclicos e possuem a forma de um tronco de cone. As três principais CDs (Figura 4) de ocorrência natural são a α -CD, β -CD e γ -CD, correspondentes a seis, sete e oito repetições da unidade de glicose.¹³

Figura 4 – Exemplos de compostos pertencentes a classificação de CDs.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

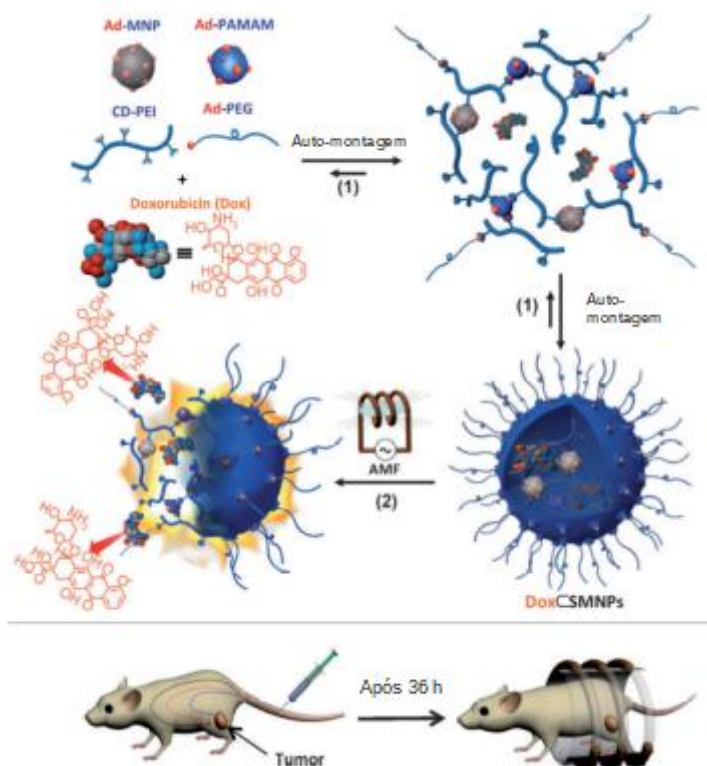
As CDs são solúveis em água, biocompatíveis, possuem baixo custo e possuem em sua estrutura uma cavidade interior hidrofóbica estável conhecida por encapsular uma grande variedade de moléculas.¹⁴ Os complexos formados entre a molécula hóspede e as CDs (hospedeira) são conhecidos como sistemas hóspede-hospedeiro.

Os sistemas hóspede-hospedeiro compostos por CD são usados em inúmeros setores, por exemplo: farmacêutico, alimentício, químico, cromatográfico, biotecnológico, agrícola, de higiene, perfumaria e cosméticos, medicinal, têxtil e do meio ambiente.¹⁴ Esses sistemas permitem que moléculas possam ser encapsuladas no interior das CDs e melhorem parâmetros físico-químicos como solubilidade, biodisponibilidade, estabilidade de compostos farmacêuticos e até na formação de estabilizantes para nanopartículas ou nanomicelas.

A ampla aplicação das CDs em medicamentos, e sua incorporação em polímeros, serve também para melhorar a biodisponibilidade e a bioestabilidade de fármacos.¹⁵ Lee e

colaboradores¹⁶ aplicaram essa propriedade em um sistema supramolecular contendo o adamantano (Ad) incluso nas CDs da PEI- β -CD, e usaram nanopartículas magnéticas na preparação do sistema supramolecular nanométrico e magnético com tamanho controlado (Figura 5).

Figura 5 – Exemplo da PEI- β -CD como estabilizante de fármaco no combate ao câncer.



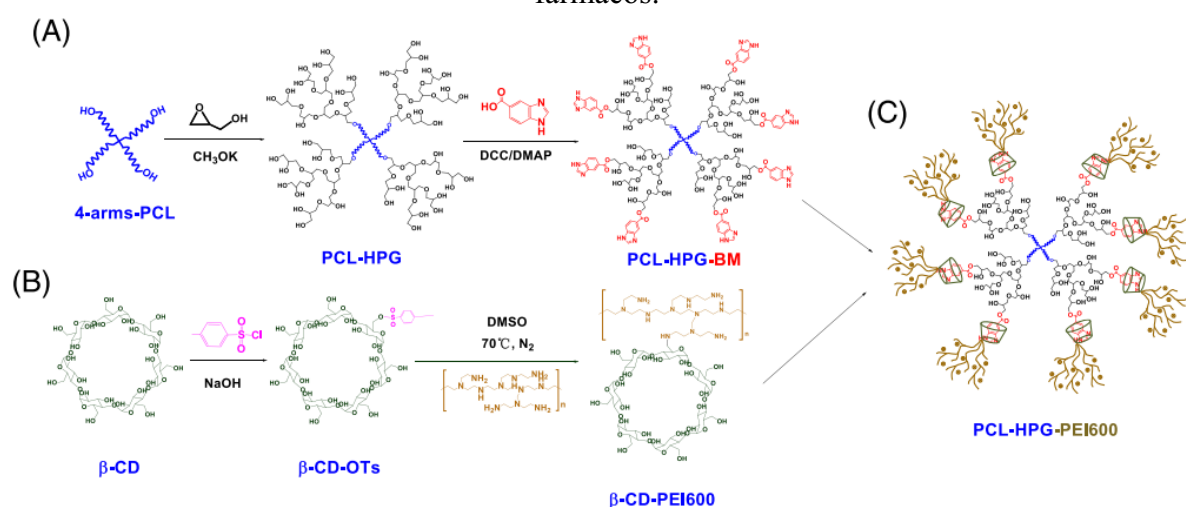
Fonte: Reproduzida com autorização de Lee *et al.*¹⁶ Copyright 2021 John Wiley & Sons.

A nanopartícula metálica magnética (Ad-MNP) funciona como um transformador embutido que converte a energia de uma fonte de campo magnético alternado (AMF) em calor, para acelerar a liberação do fármaco antineoplásico doxorrubicina (DOX). Após a aplicação da AMF por 2 min, aproximadamente 50% da DOX é liberada, mostrando uma inibição do crescimento tumoral superior, mesmo em concentrações muito baixas do fármaco, comparado a outros protocolos, diminuindo os efeitos colaterais.¹⁶

Zhou e colaboradores¹⁷ desenvolveram um sistema supramolecular, representado na Figura 6, com a β -CD e a PEI600 para o tratamento de células tumorais, usando o agente

antitumoral DOX e o plasmídeo pMMP-9. O complexo PCL-HPG-PEI600 se mostrou eficaz no transporte da DOX e da pMMP-9 para o interior celular, com uma taxa de transfecção maior que a PEI 25 kDa, tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. Ensaios em ratos apresentaram uma redução significativa dos tumores desenvolvidos, e uma alta taxa de transfecção e biocompatibilidade com o sangue.¹⁷

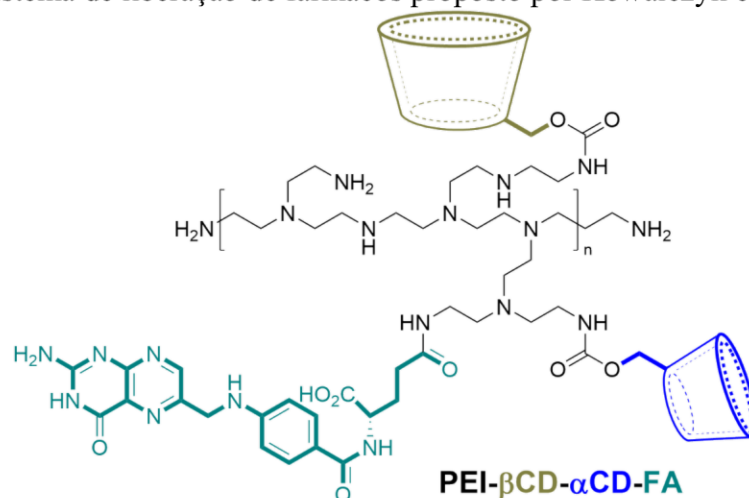
Figura 6 – Utilização da PEI- β -CD no planejamento racional de um sistema de liberação de fármacos.



Fonte: Reproduzida com autorização de Zhou *et al.*¹⁷ Copyright 2021 American Chemical Society

Recentemente, Kowalczyk e colaboradores¹⁸ propuseram um sistema multicomponente (Figura 7) contendo a bPEI 25 kDa derivatizada com β - e α -CDs, como hospedeiras para os agentes quimioterápicos DOX e β -lapachona (β -Lap). O polímero também foi substituído com o ácido fólico (FA), que é superexpressado em células cancerígenas, buscando uma seletividade na liberação dos fármacos. Na mesma pesquisa, observou-se um aumento na estabilidade biológica de ambos os agentes quimioterápicos em células A549 na magnitude de 10 vezes e, simultaneamente, um aumento na atividade anticancerígena na magnitude de 20 % a 40 % para a DOX e a β -Lap, respectivamente, quando encapsuladas no sistema de *drug delivery*.¹⁸

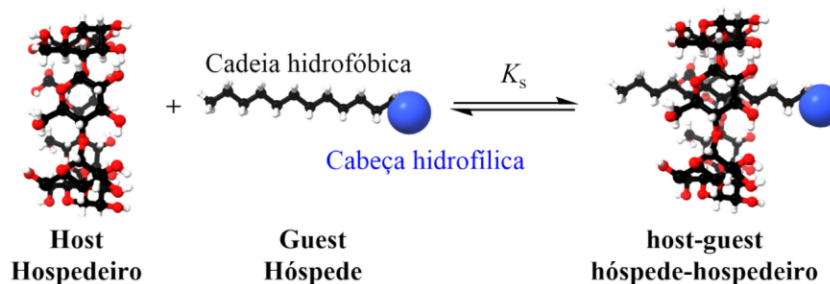
Figura 7 – Sistema de liberação de fármacos proposto por Kowalczyk e colaboradores.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

A força motriz para a formação dos complexos hópede-hospedeiro entre muitas moléculas em ciclodextrinas é o efeito hidrofóbico, devida alta hidrofobicidade do composto hópede. E, como supracitado, moléculas apolares com baixa solubilidade em água são conduzidas para a cavidade apolar das CDs. Uma ilustração desse sistema, de forma simplificada, e recorrente na maioria das publicações encontra-se na Figura 8 com um composto anfifílico, compostas por uma porção hidrofóbica/apolar e outra extremidade hidrofílica/apolar.¹⁹

Figura 8 – Ilustração dos complexos hópede-hospedeiro entre surfactantes e CDs.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

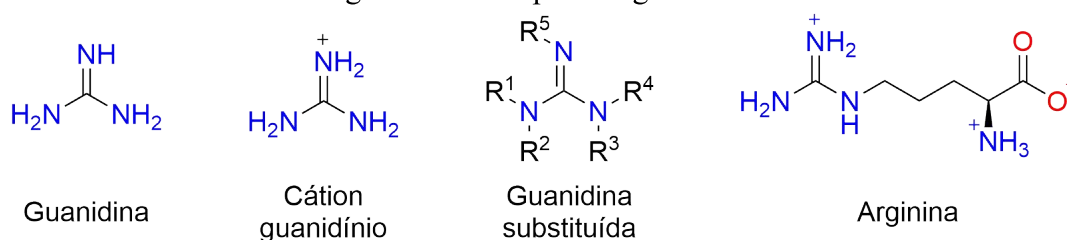
Quanto maior a porção hidrofóbica, ou a hidrofobicidade do composto, maior será a constante de associação (K_s). Tais constantes de formação de complexos hópede-hospedeiro em água geralmente variam entre 10^2 e 10^4 L mol⁻¹. Por exemplo, para derivados de

adamantano e β -CD foram observados valores mais altos, de até 10^5 L mol^{-1} . Desde que os hóspedes sejam suficientemente solúveis em água, a adição de substituintes hidrofílicas ou hidrofóbicas podem diminuir ou aumentar o valor de K_s , respectivamente.^{14,19}

2.3 COMPOSTOS GUANIDÍNIOS

As guanidinas são grupos funcionais contendo um átomo de carbono central ligado covalentemente a 3 nitrogênio (Figura 9). Possuem alta basicidade e predominantemente se encontram na forma de sal do ácido conjugado ($pK_a = 13,6$).

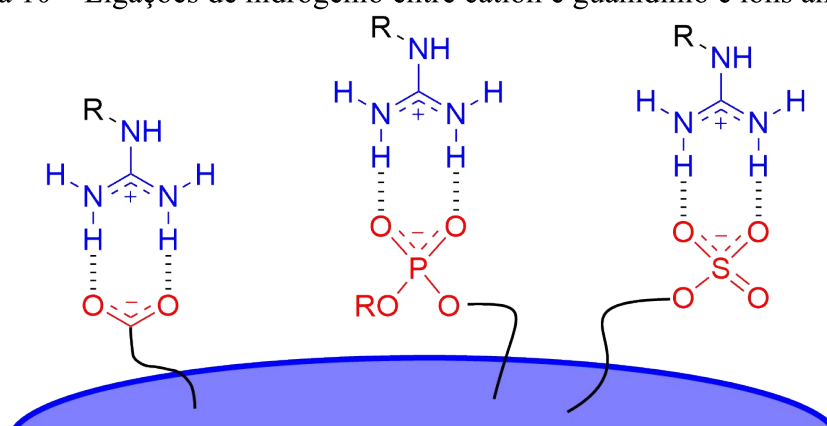
Figura 9 – Exemplos de guanidinas.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Usado comumente em sistemas biológicos, por proteínas e enzimas, para reconhecer e formar pontes salinas ou ligações de hidrogênio com várias substâncias de origem biológica, contendo grupos carboxila, fosfatos e sulfatos em suas estruturas (Figura 10).^{20,21} De fato, a guanidina é um grupo funcional comum em uma variedade de compostos sintéticos²² e naturais,²³ encontrados principalmente em aplicações na química bio-orgânica, na química medicinal e em complexos supramoleculares.

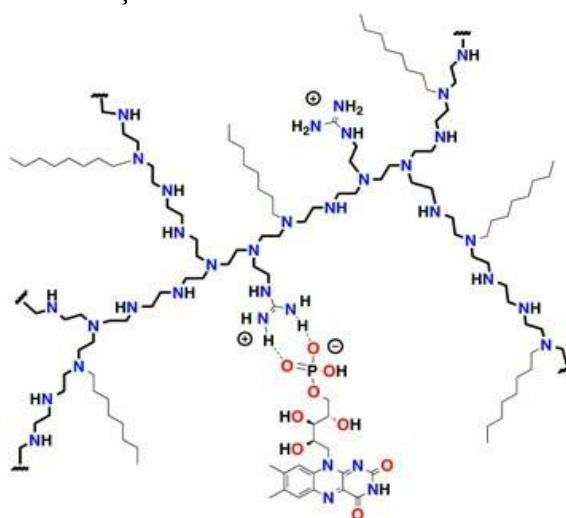
Figura 10 – Ligações de hidrogênio entre cátion e guanidínio e íons aniônicas.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Em uma pesquisa realizada por Frédéric Avenier e colaboradores,⁷ houve a modificação da PEI com grupos guanidínios (Figura 11) para incorporar a mononucleotídeo de flavina (FMN) por fissoção, gerando um microambiente hidrofóbico, e possibilitando o estudo da reação de redução da FMN com dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH). Os grupos guanidínios permitiram que a estrutura macromolecular fosse capaz de coletar eficientemente pares de elétrons do NADH, fornecendo rapidamente esses elétrons para cofatores redox como a porfirina de manganês (II), com uma taxa de melhoria de 4×10^3 em comparação com a FMN em solução.⁸

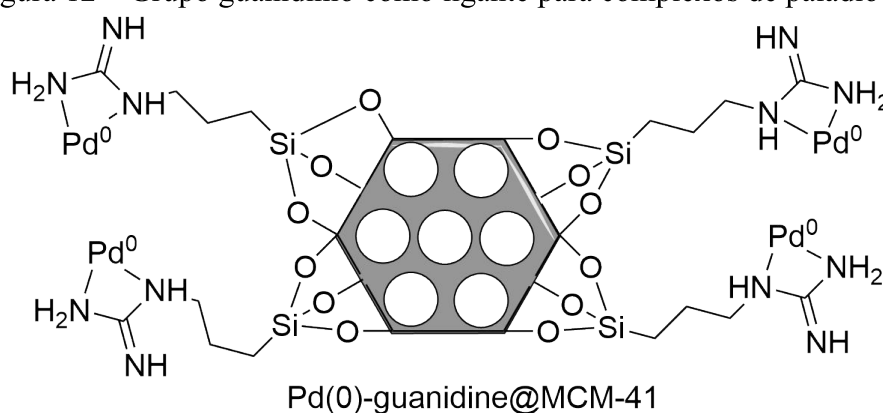
Figura 11 – Utilização de PEI modificada como enzima sintética.



Fonte: Reproduzida com autorização de Roux *et al.*⁸ Copyright 2021 Springer Nature.

As guanidinas também são encontradas na forma de ligantes para o paládio (II) em reações Suzuki^{24,25} e de Heck²⁶ e na formação de complexos com atividades antitumorais comparadas com a cisplatina.²⁷ Filian Hossein e pesquisadores^{28,29} desenvolveram um catalisador para reações Suzuki e Stille contendo grupos guanidínicos imobilizado em MCM-41 (Figura 12), peneira molecular mesoporoso hexagonal, como ligantes para o paládio (0).

Figura 12 – Grupo guanidíneo como ligante para complexos de paládio (0).



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

O catalisador foi empregado em reações Suzuki e Stille, reações de acoplamento C-C, e os autores obtiveram em dimetilsulfóxido (DMSO) rendimentos entre 60 % e 80 % com até a décima reutilização do catalisador em tempos reacionais relativamente baixos, entre quinze minutos e três horas, dependendo do substrato.²⁸

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo a síntese de surfactantes bis-guanidínicos (C_n BG), sua caracterização físico-química em solução, e a modificação do polímero PEI com o grupo β -CD, para futura aplicação na formação de complexos catalíticos supramoleculares.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar uma série de surfactantes alquílicos bis-guanidínicos (C_n BG);
- Determinar a concentração micelar crítica (cmc) dos respectivos surfactantes via tensão superficial, condutividade elétrica e fluorescência.
- Derivatizar o polímero PEI com o grupo β -CD.

4 METODOLOGIA

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio), estabelecido no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Campus Florianópolis, sob orientação do Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos e em cooperação com o Laboratório de Polímeros e Surfactantes (POLISSOL) UFSC – Campus Blumenau, com o Prof. Dr. Ismael Bellettini. A síntese e identificação dos compostos ocorreu no LaCBio e na Central de Análise do Departamento de Química na UFSC, e a concentração micelar crítica dos respectivos surfactantes foram determinadas pelo grupo do POLISSOL.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Reagentes e solventes

Todos os reagentes e solventes que foram utilizados neste trabalho são de elevado grau de pureza e foram obtidos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, Merck, Vetec e Synth, JT Baker, Fluka). Com exceções da água deionizada, a qual foi obtida por um deionizador TKA Smart2Pure presente no LaCBio, e do acetato de etila e do hexano, que foram obtidos a partir do processo de destilação do solvente comercial e no LaCBio, para sua purificação e posterior uso.

4.1.2 Instrumentação

4.1.2.1 Síntese e purificação

Todas as vidrarias e equipamentos manuseados durante o projeto estavam disponíveis no LaCBio. A purificação dos compostos por cromatografia em coluna, utilizando uma coluna de vidro, fase estacionária composta por Sílica gel (60 A, 70-230 mesh ASTM) e fase móvel de diferentes proporções de hexano e acetato de etila.

Todos os compostos sintetizados e purificados foram secos em uma bomba de vácuo EDWARDS, modelo RV3, antes das respectivas análises químicas e caracterizações. Os sólidos contendo resquícios de água foram liofilizados em uma bomba de alto-vácuo LABCONCO FreeZone 2.5.

4.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

As caracterizações e identificações dos compostos foram realizadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , e por infravermelho. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos com o uso dos espectrofotômetros de RMN Bruker AC 200 MHz e Bruker AS-400 400 MHz, disponível no Central de Análise do Departamento de Química na UFSC em Florianópolis.

4.2.1 Medidas de condutividade

As medidas de condutividade foram realizadas usando um condutivímetro HMCDB-150, com auxílio de uma cela com capacidade para 30,0 mL conectada em um banho termostaticado a $25 \pm 0,1$ °C. As medidas foram realizadas após a adição de volumes conhecidos da solução estoque de surfactantes. Para cada leitura, a concentração era corrigida devido a diluição ocorrida na cela que previamente continha 15 mL de água deionizada. Todas as medidas foram realizadas com as soluções sob agitação constante.

4.2.2 Medidas de fluorescência

As medidas de fluorescência do estado estacionário do pireno foram executadas em água destilada a $25 \pm 0,1$ °C. Uma solução de pireno de 10^{-6} mol L^{-1} foi preparada a partir de uma solução estoque 10^{-3} mol L^{-1} de pireno (Aldrich 99%) em etanol. As soluções dos surfactantes foram preparadas a partir da solução contendo pireno e deixadas atingir o equilíbrio pelo menos por 4 horas antes de registrar o espectro de emissão.

Os espectros de fluorescência do estado estacionário do pireno foram determinados em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 equipado com uma cela de quartzo de 1,0 cm termostaticado a $25 \pm 0,1$ °C sob agitação magnética. As fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas para 2,5 nm. As amostras foram excitadas em 336 nm e os espectros de emissão foram corridos de 360,0 e 500,0 nm. Tipicamente, os espectros de fluorescência foram realizados após a adição de volumes conhecidos da solução estoque de surfactante. Para cada leitura, a concentração era corrigida devido a diluição ocorrida na cela

que previamente continha 1,5 mL, de solução contendo igual concentração de pireno. A razão I_1/I_3 foi estimada analisando a relação da intensidade máxima do pico em 372,8 nm (I_1) e 384,0 nm (I_3).

4.2.3 Medidas de tensão superficial

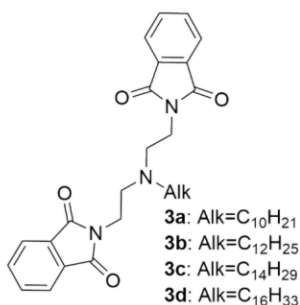
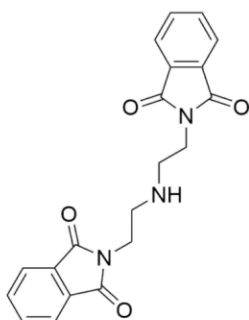
As medidas de tensão superficial foram feitas utilizando um tensiômetro da SURFACE ELETRO ÓPTICO, modelo DST30, escala de divisão $0,1 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ equipado com um anel de Pt-Ir-20 e frasco para conter a amostra em temperatura ambiente. Foram usados volumes de 5,0 mL de solução do correspondente surfactante, previamente preparada para cada medida.

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Síntese dos surfactantes bis-guanidínicos

4.3.1.1 Síntese da 1,5-diftalimida-3-azapentano (2)

Em um balão contendo a dietiltriâmina **1** (100 mmol), foram adicionados gota-a-gota 160 mL de ácido acético. Posteriormente, acrescentou-se o anidrido ftálico (224 mmol) e se manteve a mistura reacional sob agitação e refluxo por 4 horas. Em seguida, todo o ácido acético foi evaporado a pressão reduzida, e prosseguiu-se com a adição de 160 mL de etanol quente. Agitou-se a solução até a formação de um sólido branco correspondente ao produto **1**, e o produto foi filtrado e lavado com etanol frio. Rendimento: 79%. RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 8,01 (m, 4H), 7,46 (m, 4H), 3,84 (t, 4H).



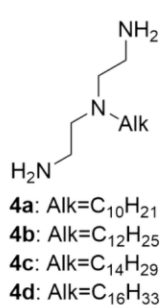
4.3.1.2 Síntese da 3-alkil-1,5-diftalimida-3-azapentano (3)

Manteve-se a mistura reacional contendo o composto **2** (20 mmol), o haleto de alquila (60 mmol), carbonato de potássio (60 mmol) e 300 mL de acetonitrila sob refluxo e agitação por 4 dias.

Após o período reacional, concentrou-se a mistura reacional a pressão reduzida e prosseguiu-se com a extração e lavagem* e a purificação em cromatografia em coluna. Composto (rendimento): **3a** (77 %), **3b** (77 %), **3c** (34 %) e **3d** (50 %). RMN de ^1H de **3d** (200 MHz, CDCl_3 , ppm): 7,80-7,66 (m, 8H), 3,78-3,71 (t, 4H), 2,82-2,75 (t, 4H), 2,55-2,48 (t, 2H), 1,28-1,07 (m, 28H), 0,91-0,85 (t, 3H).

4.3.1.2 Síntese da 1,5-diamina-3-alquil-3-azapentano (4)

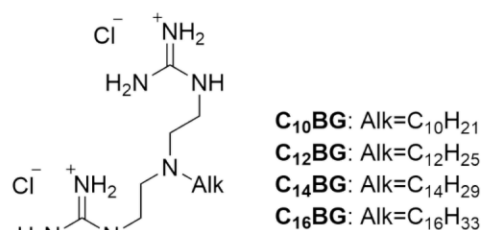
Manteve-se em um balão contendo o **3** (12 mmol), a hidrazina monohidratada (6 mL) e 250 mL de etanol sob agitação e fluxo por 24 horas. Em seguida, filtrou-se a reação, lavando com etanol gelado, concentrou-se o permeado a pressão reduzida e acrescentou-se



100 mL de diclorometano frio. Filtrou-se toda a ftalidrazida insolúvel e a evaporou-se todo o diclorometano. O permeado concentrado ofereceu o produto **4** como um óleo amarelo. Composto (rendimento): **4a** (>95 %), **4b** (76 %), **4c** (>95 %) e **4d** (64 %). RMN de ^1H de **4d** (200 MHz, CD_3OD , ppm): 3,31-3,29 (m, 5H), 2,73-2,67 (t, 4H), 2,55-2,48 (t, 2H), 1,47 (m, 2H), 1,28 (m, 26H). 0,93-0,86 (t, 3H).

4.3.1.3 Síntese do dicloreto de *N,N'*'-[(alquilamina)di-2,1-etanodil]bis-guanidina (C_nBG)

Adicionou-se em um balão de fundo redondo a dimetilformamida (5 mL), a 1H-pirazol-1-carbozamidina (10 mmol) e o **4** (5 mmol), e manteve-se sob agitação e a temperatura ambiente por 4 horas. Em seguida, se lavou a mistura reacional com 20 mL de acetato de etila e retirou-se o sobrenadante. O produto se cristalizou em 5 mL de metanol e 20 mL de acetato de etila e a purificação prosseguiu via recristalização do sólido obtido na etapa



anterior em metanol e acetato de etila nas mesmas proporções anteriores. Composto (rendimento): **C₁₀BG** (68 %), **C₁₂BG** (76 %), **C₁₄BG** (60 %) e **C₁₆BG** (64 %). RMN de ^1H de **C₁₆BG** (200 MHz, D_2O , ppm): 3,30

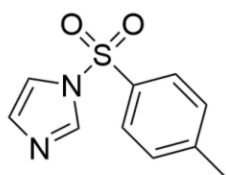
* Trásfegou-se a mistura reacional para o funil de separação contendo 100 mL de água deionizada. Extraíu-se a fase orgânica com diclorometano (3 x 50 mL).

(m, 5H), 2,73-2,66 (m, 4H), 2,57-2,46 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,28 (m, 26H), 0,92-0,99 (m, 3H). Análise elemental calculada para $C_{16}H_{39}Cl_2N_7$ (400,4370): C = 47,99, H = 9,82, N = 24,49. Encontrado: C = 47,92, H = 10,32, N = 24,19. Análise elemental calculada para $C_{20}H_{47}Cl_2N_7$ (456,5450): C = 52,62, H = 10,38, N = 21,48. Encontrado: C = 51,74, H = 10,59, N = 20,56.

4.3.2 Síntese do polímero modificado PEI- β -CD

4.3.2.1 Síntese do tosil-imidazol (5)

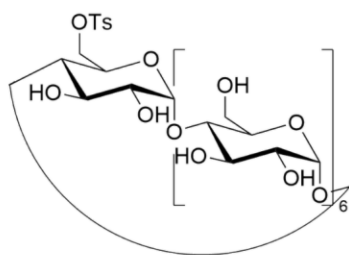
A uma mistura de imidazol (0,375 mol) e de cloreto de tosil (0,393 mol) em 300 mL de CH_2Cl_2 foram adicionados 500 mL de uma solução de bicarbonato de sódio 0,928 mol L^{-1} e, posteriormente, acrescentou-se a trietilamina (5,6 mL). A reação prosseguirá sob agitação e a temperatura ambiente por 24 horas. Extraiu-se a fase orgânica da mistura



reacional e o mesmo foi seco em sulfato de sódio. Purificou-se o produto via recristalização em 125,0 mL de diclorometano e 25,0 mL de hexano. Rendimento: 82%. P.F.: 68-70 °C.

4.3.2.2 Síntese da mono-6-tosil- β -CD (6)

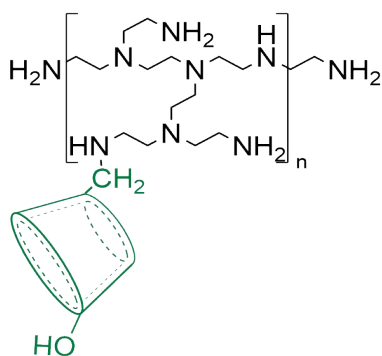
Adicionou-se o **5** (70 mmol) em um balão de fundo próprio contendo uma solução de β -ciclodextrina (18 mmol) em 450 mL de água destilada, e a reação prosseguiu sob agitação a temperatura ambiente por 2 h. Após este período, adicionou-se lentamente 25 mL de uma solução de hidróxido de sódio 9 mol L^{-1} por 30 minutos e, em seguida, o cloreto de amônio (24,0 g). Então a mistura foi concentrada até metade do seu volume soprando uma corrente de ar e filtrou-se o sólido branco formado a vácuo, lavando com 100 mL de água destilada gelada



e 200 mL de acetona. RMN de 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$, ppm): 7,75-7,73 (d, 2H), 7,43-7,41 (d, 2H), 5,83-5,66 (m, 14H), 4,83 (m, 5H), 4,76 (m, 2H), 4,57-4,45 (m, 4H), 4,34-4,29 (m, 1H), 4,20-1,15 (m, 1H), 3,64-3,21 (m, sobreposição com HDO), 2,42 (m, 3H).

4.3.2.3 Síntese do polímero modificado PEI- β -CD

Em um balão de fundo redondo foram adicionados o **6** (1.69 mmol), a bPEI (25 kDa, 282 mg, 11.3 μ mol) e 100 mL de DMSO e a reação prosseguiu sob agitação e a 70 °C por 72 h. Em um frasco de Erlenmeyer adicionou-se 2 L de acetona e a mistura reacional. Após a adição no frasco de Erlenmeyer, formou-se um sólido branco que foi removido por decantação e dissolvido em 30 mL de água destilada. A purificação seguiu por diálise transferindo a solução preparada anteriormente para uma membrana (*Dialysis membrane Spectra/Por*® 7 MWCO 10,000, 45 mm) e dialisada sob agitação lenta com cada uma das



seguintes soluções por pelo menos 2 h: EtOH a 20 % em HCl (50 mmol L⁻¹), HCl (50 mmol L⁻¹), água destilada (duas vezes), NaOH (50 mmol L⁻¹, duas vezes) e água destilada (três vezes). A solução final foi liofilizada, levando ao **PEI- β -CD** purificado. RMN de ¹H (400 MHz, D₂O, ppm): 4,92 (m, 1H), 3,64-3,21 (m, 13H), 2,79-2,49 (m, 5,5H).

4.4 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO E TRATAMENTO/DESTINO DOS RESÍDUOS

Os procedimentos de segurança e prevenção adotados durante todo o projeto foram conforme o Manual de Regras Básicas para Laboratórios de Química disponibilizado pelo Departamento de Química da UFSC e respeitando as normas da ABNT NBR 14785:2001.

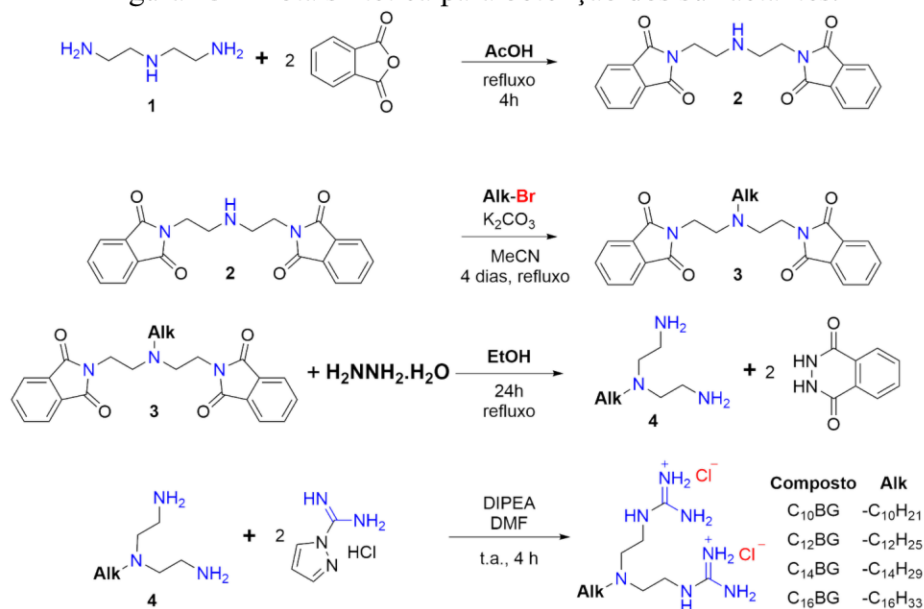
Os resíduos líquidos produzidos durante o projeto tiveram como destino três recipientes adequados e devidamente rotulados para o descarte correto. Esses mesmos foram recolhidos por pessoas autorizadas da empresa PROACTIVA MEIO AMBIENTE S.A.. Todas as reações efetuadas durante o projeto foram planejadas para gerarem o menor número de resíduos possíveis, visto o papel fundamental do químico na construção de metodologias atóxicas e ambientalmente amigáveis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DOS SURFACTANTES BIS-GUANIDÍNICOS

A metodologia adotada para a síntese da série inédita de surfactantes bis-guanidínicos prosseguiu via 4 etapas, os quais estão ilustrados na Figura 13. A primeira etapa tem como objetivo a proteção³⁰ das aminas primárias de **1**, uma vez que se deseja que ocorra somente a alquilação da amina secundária de **2** na etapa seguinte. E, após a etapa de desproteção de **3**, para proporcionar a guanidização⁵ das aminas primárias de **4** e formação dos tensoativos **C_nBG**, e a formação das cabeças polares dos surfactantes.

Figura 13 – Rota sintética para obtenção dos surfactantes.

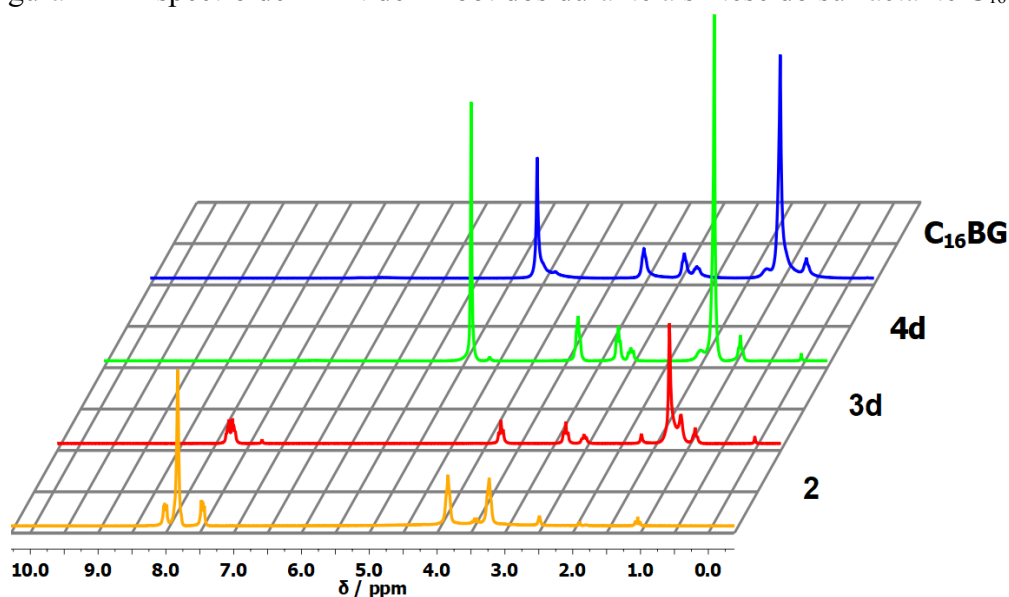


Todos os produtos foram identificados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e podem ser vistas no Apêndice A. Em específico, para os produtos **3** e **C_nBG** foram obtidos seus respectivos pontos de fusão (P.F.), disponível na Tabela 1, ao passo que estes encontravam-se no estado físico sólido a temperatura ambiente. Obteve-se também o P.F. experimental para o composto molecular **2** de 176-178 °C, P.F. próximo aos valores encontrados na literatura.^{30,31}

Tabela 1 – Pontos de fusão (P.F.) em °C dos produtos **4** e **C_nBG**.

Cadeia alquílica (Alk)	-C ₁₀ H ₂₁	-C ₁₂ H ₂₅	-C ₁₄ H ₂₉	-C ₁₆ H ₃₃
3	55-56	47-49	59-60	59-60
C_nBG	101-103	105-106	101	108-109

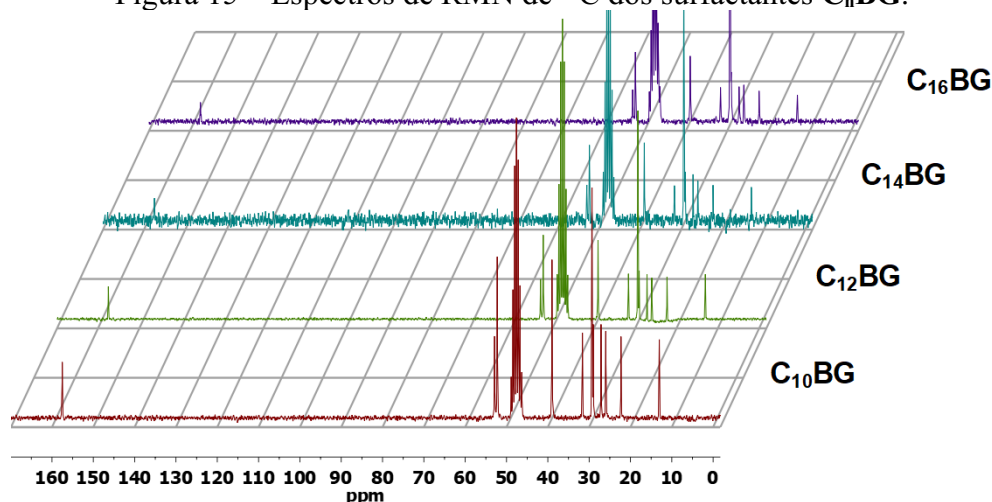
Por espectroscopia de RMN de ¹H pôde-se identificar os produtos (**Apêndice A**), ilustrados na Figura 14, formados em cada etapa da Figura 13. Nas etapas de proteção de **1** e desproteção de **3**, se observou o aparecimento (Figura A1) e desaparecimento (Figura A5-A7) dos hidrogênios aromáticos do grupo protetor entre 8,1 ppm e 7,3 ppm nos compostos **2** e **4**, respectivamente, na forma de dupletos. E na etapa de alquilação da diamina protegida **2**, o deslocamento químico correspondente aos hidrogênios da cadeia alquílica se encontram entre 1,4 ppm e 1,0 ppm e em 0,61 ppm, na forma de triplete (Figura A2-A4).

Figura 14 – Espectro de RMN de ¹H obtidos durante a síntese do surfactante C₁₆BG.

A partir dos tensoativos **C_nBG** previamente sintetizados e purificados, os espectros de RMN de ¹H (Figura A8-S11) apresentam sinais similares ao da Figura 14 e as integrações obtidas a partir dos sinais da cadeia alquílica apresentam valores incoerentes com o número de hidrogênios da cadeia alquílica. Como forma de distinguir os surfactantes, pelos espectros de RMN de ¹³C (Figura 15) nota-se que quanto maior a porção hidrofóbica do tensoativo,

menor é o sinal do carbono guanidínio e do carbono terminal da cadeia alquílica em 157 ppm e 14 ppm, respectivamente.

Figura 15 – Espectros de RMN de ^{13}C dos surfactantes C_nBG .

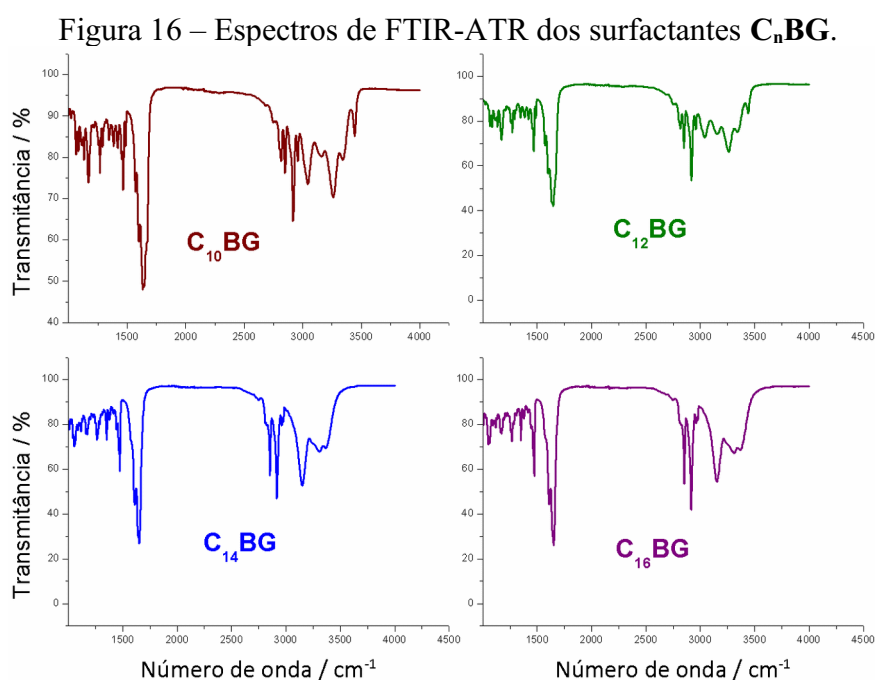


A despeito de integrações de sinais de RMN de ^{13}C não terem correlação com o número de átomos de carbonos, devida a ampla janela de tempo de relaxação spin-rede (T1) para diferentes tipos de átomos de carbono,³² é possível distinguir os tensoativos da Figura 14 em função da relação entre as intensidades dos sinais (I) do carbono guanidínio ($-\text{CN}_3$) ou do carbono terminal da cadeia alquílica ($-\text{CH}_3$) com o sinal de maior intensidade do carbono da cadeia alquílica ($-\text{C}_{\text{alk}}-\text{H}_2$) na amostra (Tabela 2). Consequentemente, por meio da comparação dos espectros de RMN de ^{13}C dos tensoativos (Figura A12-A15) em função do aumento da cadeia alquílica, observa-se que quanto maior a porção hidrofóbica dos tensoativos, menor é o sinal do carbono guanidínio e do carbono terminal.

Tabela 2 – Intensidades dos sinais do carbono guanidínio e do carbono terminal e de maior intensidade da cadeia alquílica da Figura 14.

	$-\text{C}_{\text{Alk}}-\text{H}_2$	$-\text{CN}_3$		$-\text{CH}_3$	
	Intensidade	Intensidade	$I_{\text{CAIk-H}_2}/I_{\text{CN}_3}$	Intensidade	$I_{\text{CAIk-H}_2}/I_{\text{CH}_3}$
C₁₆BG	266,1	6,84	15	24	11
C₁₄BG	27,7	2,3	12	3,6	8
C₁₂BG	554,4	88,8	6	120,5	5
C₁₀BG	239,0	59,9	4	82,4	3

As análises por espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR) dos tensoativos $C_n\text{BG}$ estão ilustradas na Figura 16. As bandas localizadas em $3150\text{-}3380\text{ cm}^{-1}$, $2920\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ e $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ são correspondentes, respectivamente, as vibrações simétricas e assimétricas das ligações do grupo NH_2 , $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ e do carbono guanidínio.



Também foram constatadas bandas na região entre 2800 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} nos produtos $C_{10}\text{BG}$ e $C_{12}\text{BG}$, que estão ausentes nos produtos $C_{14}\text{BG}$ e $C_{16}\text{BG}$, estas foram atribuídas aos estiramentos da ligação $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ do subproduto pirazol da reação da etapa de guanidização.³³

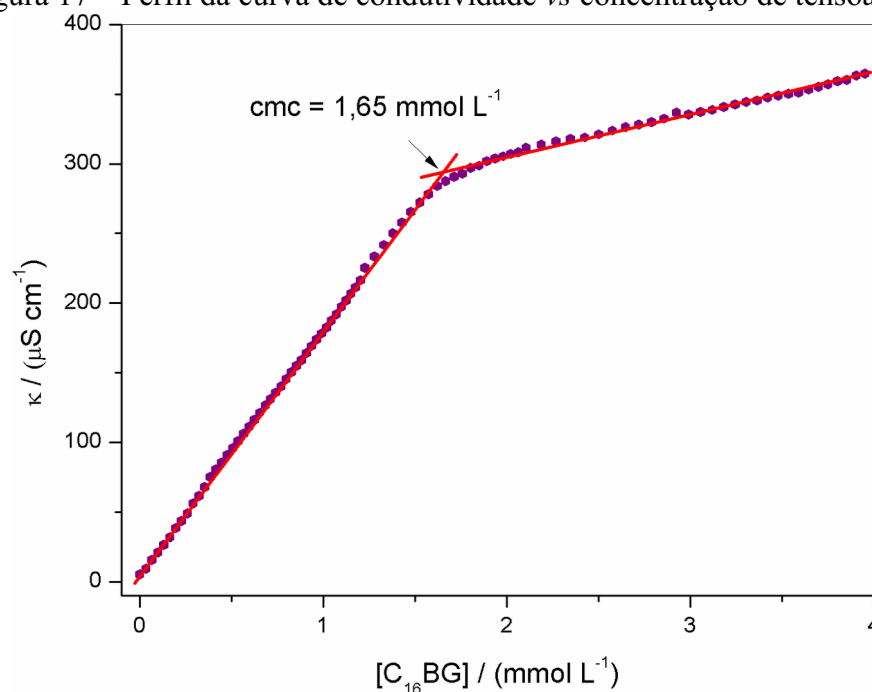
5.2 CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC) DOS TENSOATIVOS

Após a caracterização das estruturas dos surfactantes, foram realizadas experimentos para determinar suas respectivas concentrações micelares críticas, cmc, (Apêndice B). Este é um parâmetro de muita importância para os estudos de interações com a

β -CD, visto que as concentrações de tensoativo devem estar abaixo do cmc para não haver formação de micelas nos sistemas.

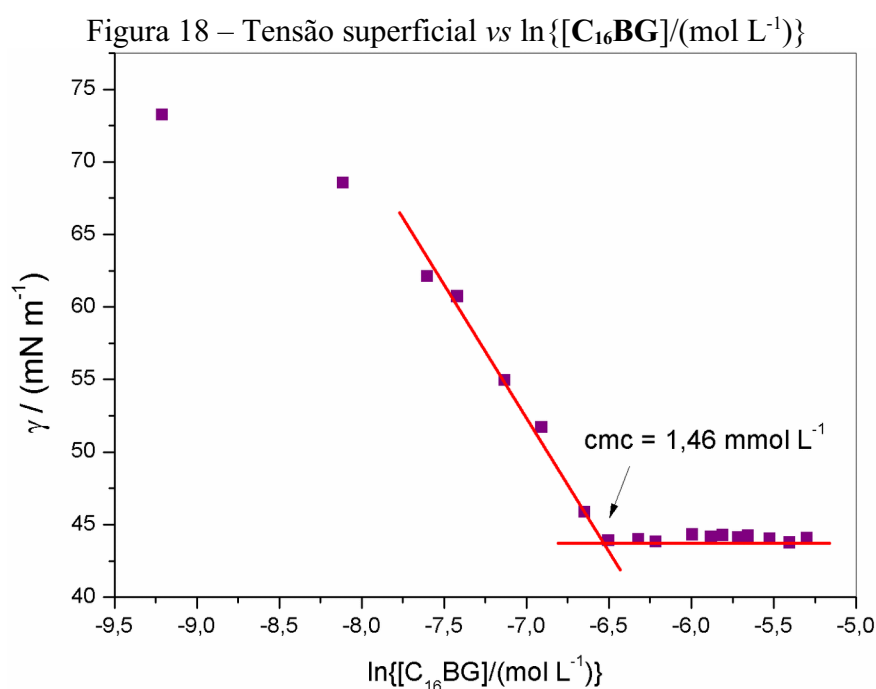
Quanto as análises e aos métodos empregados, as cmc dos tensoativos foram obtidas via medidas de condutometria, de fluorescência, usando o pireno como sonda fluorescente, e de tensiômetria. Por condutometria (Figura B1) observa-se uma diminuição na taxa de aumento da condutividade por adição de surfactante quando se atinge a cmc, como ilustra a Figura 17.

Figura 17 – Perfil da curva de condutividade vs concentração de tensoativo.



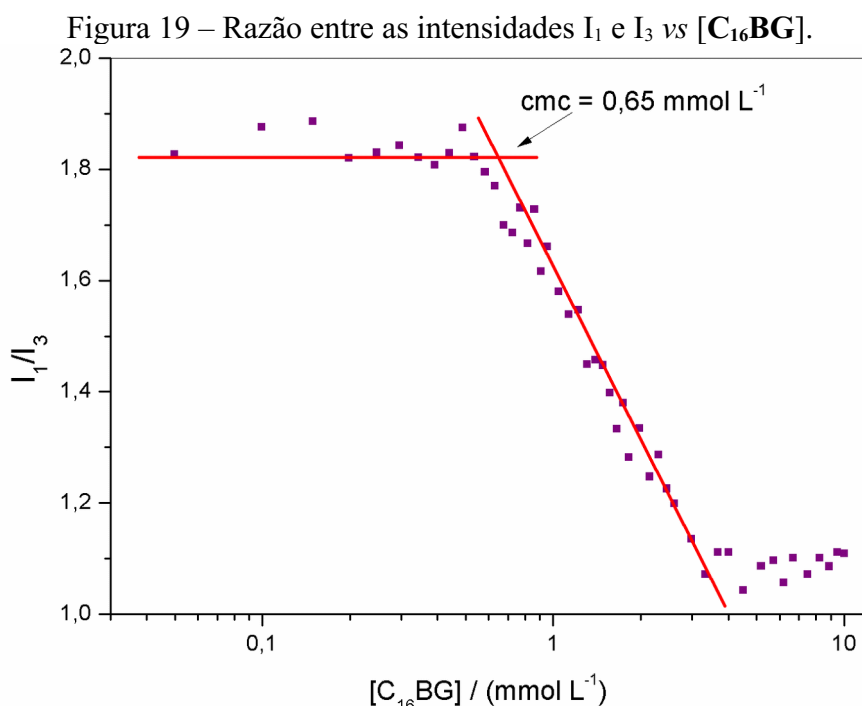
A determinação de cmc por condutividade (κ) é devido à mudança de comportamento do eletrólito/tensoativo após a formação da micela. Antes da formação da micela, o surfactante encontra-se na forma livre, conhecido como monômero, e comporta-se como um eletrólito forte, ou seja, a condutividade da solução aumenta consideravelmente conforme aumenta-se a concentração de surfactante é alta. A micela comporta-se como um eletrólito fraco, diminuindo consideravelmente a inclinação da reta. Pela intersecção das retas antes e depois da formação da micela é possível obter a cmc dos compostos iônicos C_nBG .

Por tensiometria, acompanhou-se a tensão superficial (γ) da solução conforme adicionou-se o surfactante (Figura B2). Na Figura 18 observa-se uma diminuição e uma estabilização da tensão superficial quando ocorre a micelização do tensoativo **C₁₆BG**.



A diminuição da tensão superficial é devido ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio da água na superfície da solução conforme a adição do surfactante. E a estabilização é correspondente a saturação da superfície da solução e o deslocamento do equilíbrio do surfactante da superfície para a solução na forma de micela.

Por fim, na determinação de cmc por fluorescência a escolha do pireno como sonda fluorescente foi devido a sua sensibilidade ao meio onde se encontra (Figura B3).³⁴ Quanto mais hidrofílico o meio maior é a relação entre os sinais de emissão em 372 nm (I_1) e 384 nm (I_3), e conforme atinge-se o cmc e ultrapassa-se o valor a relação diminuí devido a transição da sonda fluorescente para o meio hidrofóbico no interior da micela (Figura 19).



Os valores da cmc para os surfactantes **4** obtidos via diferentes métodos encontram-se na Tabela 3. Observa-se que os valores por fluorescência são menores que dos métodos anteriores, este é devido a indução na formação da micela por conta da hidrofobicidade do pireno, auxiliando na força motriz pelo efeito hidrofóbico.

Tabela 3 – cmc (mmol L^{-1}) dos surfactantes obtidos via diferentes métodos.

Surfactante	Condutividade	Tensão superficial	Fluorescência
C₁₂BG	3,40	3,24	1,90
C₁₄BG	2,15	3,10	1,21
C₁₆BG	1,65	1,46	0,65

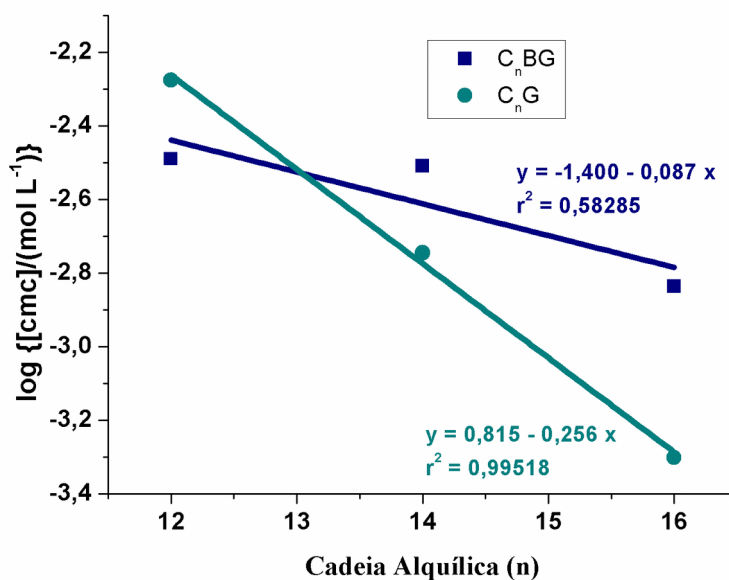
Para uma série homóloga de surfactantes, como os sintetizados nesse projeto, o pesquisador Traube propôs uma regra para poder prever a tensão superficial e a cmc dos surfactantes.³⁵ O estudo de Traube consiste em uma série de 1-alcanóis com cadeias alquílicas longas e prevê que a concentração necessária para reduzir a tensão superficial da água é proporcional ao número de átomos de carbono do tensoativo, expressa na equação (1).³⁵

Variações são observadas quando os tensoativos possuem pequenas cadeias alquílicas ou mais de uma cabeça polar.^{36,37}

$$\log(C_s) = B - n \log(K_T) \quad (1)$$

Onde C_s é a concentração de tensoativo, B é uma constante para a série homóloga e K_T é a Constante de Traube que é igual 3.^{35,38} Para a série de surfactantes sintetizados (C_nBG), observa-se que não há correlação entre a regra proposta para os tensoativos sintetizados (Figura 20), devida a presença de dois grupos polares guanidínicos, espaçados entre si. Enquanto em um estudo feito por Bouchal e colaboradores,³⁹ foram medidas as cmc dos tensoativos via tensão superficial com uma única cabeça polar (C_nG), e se observou uma linearização com a regra de Traube e uma constante K_T diferente de 3, também previsto por Traube contanto que a cadeia alquílica não seja pequena.⁴⁰

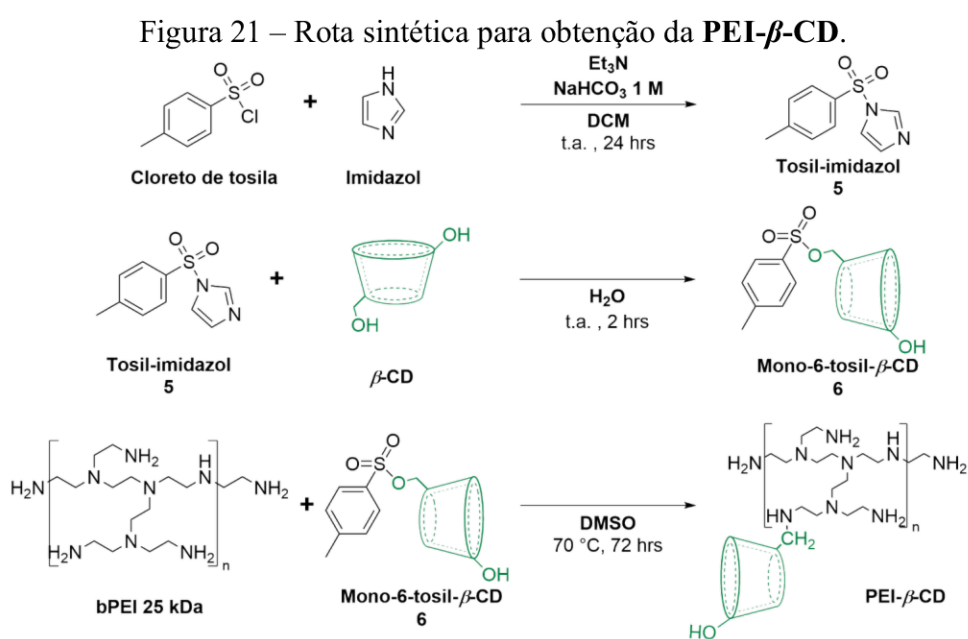
Figura 20. Reta obtida a partir da equação 2.



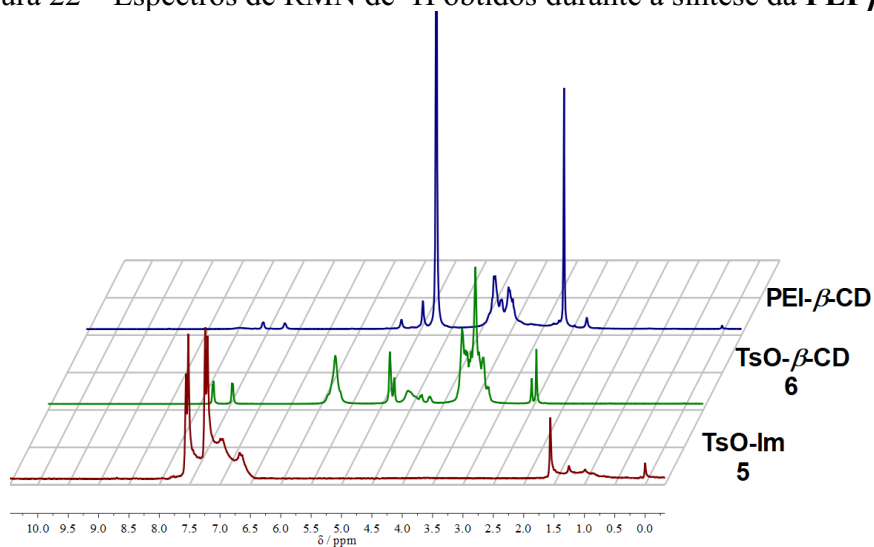
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

5.3 SÍNTESE DA PEI- β -CD

Sintetizou-se o composto **PEI- β -CD** via 3 etapas^{7,11,41} (Figura 21). A primeira etapa consiste na minimização da reatividade do cloreto de tosil com o grupo imidazol, para formar o tosil-imidazol **5** e impedir a poli-substituição da β -CD. E, por fim, a última etapa é a síntese da **PEI- β -CD** via substituição nucleofílica do grupo tosil de **6** por aminas primárias da polietilenoimina (bPEI 25 kDa).



Da mesma forma que os surfactantes, os produtos provenientes de cada etapa apresentados na Figura 20 foram identificados por espectroscopia de RMN de ^1H (Figura 22), nas quais os sinais referentes ao grupo tosil e imidazol **6** aparecem sobrepostos entre 8,0 ppm e 6,5 ppm, em 1,56 ppm encontra-se o sinal metileno do grupo tosil. Em seguida, prossegue-se com a monotosilação da β -CD em água, e observa-se o desaparecimento dos sinais do grupo imidazol acompanhado com o aparecimento dos sinais característicos da β -CD entre 3,80 ppm e 3,0 ppm. Por fim, foi possível acompanhar a modificação da PEI pelo surgimento de seus sinais característicos em 2,75 ppm.

Figura 22 – Espectros de RMN de ^1H obtidos durante a síntese da **PEI- β -CD**

Observa-se a permanência do grupo tosil em pequenas quantidades após a etapa de modificação da PEI, devida a incorporação de moléculas de tosil com grupo tolueno no interior do cone da β -CD, formando um complexo hóspede-hospedeiro, ou devido a formação de um sal entre a PEI, positivamente carregado em água, com o grupo tosil, negativamente carregado.

6 CONCLUSÕES

Foi sintetizada e caracterizada uma séria inédita de surfactantes (C_n **BG**) como aceptores e direcionadores para biomoléculas negativamente carregados, como carboxilatos e fosfatos. Ainda, foi sintetizado o polímero **PEI- β -CD** com perspectiva para estudos posteriores na formação de sistemas de liberação de fármacos, onde os surfactantes bis-guanidínicos mimetizariam um sítio ativo biológico capaz de introduzir espécies biologicamente ativas para o interior de células.

As estruturas dos surfactantes foram identificadas por espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C e a cmc dos tensoativos foram obtidas empregando diferentes metodologias, somente para o tensoativo C_{10} **BG** não foram obtidos valores de cmc, por este se apresentar extremamente solúvel em qualquer faixa de concentração.

Apresentou-se nessa pesquisa o desenvolvimento de um possível novo sistema biocompatível de liberação de fármacos contendo a β -CD, como hóspede para compostos biologicamente ativos em células, e com grupos guanidínios como sítios ativos para íons aniônicos presentes em meios celulares. Com perspectivas para uma futura continuação envolvendo os estudos das interações dos surfactantes com a β -CD, e estudos de complexação com íons metálicos, como cobre (I) e paládio, e sua aplicação na química bio-ortogonal.

Este tipo de abordagem interdisciplinar demonstra a importância da química em ciências biológicas, e visto que ainda há muito a ser explorado em pesquisas de elaboração de sistemas supramoleculares cada vez mais eficazes e a compreensão de sistemas como estes em pesquisas futuras.

7 REFERÊNCIAS

- [1]. Zhang, X.-Z.; Zeng, X.; Sun, Y.-X.; Zhuo, R.-X. 8 - Bioactive Materials in Gene Therapy. In *Bioactive Materials in Medicine*; Zhao, X., Courtney, J. M., Qian, H., Eds.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead Publishing, 2011; pp 179–219. <https://doi.org/10.1533/9780857092939.2.179>.
- [2]. Taranejoo, S.; Liu, J.; Verma, P.; Hourigan, K. A Review of the Developments of Characteristics of PEI Derivatives for Gene Delivery Applications. *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, *132* (25). <https://doi.org/10.1002/app.42096>.
- [3]. Schaffert, D.; Ogris, M. Nucleic Acid Carrier Systems Based on Polyethylenimine Conjugates for the Treatment of Metastatic Tumors. *Curr Med Chem* **2013**, *20* (28), 3456–3470. <https://doi.org/10.2174/0929867311320280004>.
- [4]. SOUZA, Andressa Pereira de; ROSA, Carlos André da Veiga Lima; MARQUES, Mariana Groke. **Transferência gênica de fibroblastos, oócitos e embriões suínos mediada por polietilenoimina**. 2019. 87f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2019.
- [5]. DEPIERI, L. V. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos para veiculação de siRNA na terapia gênica**. 2012. 91f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeira Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

- [6]. Ganesan, S. S.; Ganesan, A.; Kothandapani, J. Hyperbranched Polyamines: Tunable Catalysts for the Henry Reaction. *Synlett* **2014**, 25 (13), 1847–1850. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1378534>.
- [7]. Avenier, F.; Domingos, J. B.; Van Vliet, L. D.; Hollfelder, F. Polyethylene Imine Derivatives (‘Synzymes’) Accelerate Phosphate Transfer in the Absence of Metal. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (24), 7611–7619. <https://doi.org/10.1021/ja069095g>.
- [8]. Roux, Y.; Ricoux, R.; Avenier, F.; Mahy, J.-P. Bio-Inspired Electron-Delivering System for Reductive Activation of Dioxygen at Metal Centres towards Artificial Flavoenzymes. *Nature Communications* **2015**, 6 (1), 8509. <https://doi.org/10.1038/ncomms9509>.
- [9]. Signori, A. M.; Santos, K. de O.; Eising, R.; Albuquerque, B. L.; Giacomelli, F. C.; Domingos, J. B. Formation of Catalytic Silver Nanoparticles Supported on Branched Polyethyleneimine Derivatives. *Langmuir* **2010**, 26 (22), 17772–17779. <https://doi.org/10.1021/la103408s>.
- [10]. Virgen-Ortíz, J. J.; Santos, J. C. S. dos; Berenguer-Murcia, Á.; Barbosa, O.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. Polyethylenimine: A Very Useful Ionic Polymer in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts. *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5 (36), 7461–7490. <https://doi.org/10.1039/C7TB01639E>.
- [11]. Pun, S. H.; Bellocq, N. C.; Liu, A.; Jensen, G.; Machemer, T.; Quijano, E.; Schluep, T.; Wen, S.; Engler, H.; Heidel, J.; Davis, M. E. Cyclodextrin-Modified Polyethylenimine Polymers for Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15 (4), 831–840. <https://doi.org/10.1021/bc049891g>.

- [12]. Tang, G. P.; Guo, H. Y.; Alexis, F.; Wang, X.; Zeng, S.; Lim, T. M.; Ding, J.; Yang, Y. Y.; Wang, S. Low Molecular Weight Polyethylenimines Linked by β -Cyclodextrin for Gene Transfer into the Nervous System. *The Journal of Gene Medicine* **2006**, 8 (6), 736–744. <https://doi.org/10.1002/jgm.874>.
- [13]. Bruns, C. J.; Stoddart, J. F. *The Nature of the Mechanical Bond: From Molecules to Machines*, 1st edition.; Wiley: Hoboken, New Jersey, 2016.
- [14]. Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (21), 10940–10975. <https://doi.org/10.1021/cr500081p>.
- [15]. Davis, M. E.; Brewster, M. E. Cyclodextrin-Based Pharmaceuticals: Past, Present and Future. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2004**, 3 (12), 1023–1035. <https://doi.org/10.1038/nrd1576>.
- [16]. Lee, J.-H.; Chen, K.-J.; Noh, S.-H.; Garcia, M. A.; Wang, H.; Lin, W.-Y.; Jeong, H.; Kong, B. J.; Stout, D. B.; Cheon, J.; Tseng, H.-R. On-Demand Drug Release System for In Vivo Cancer Treatment through Self-Assembled Magnetic Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, 52 (16), 4384–4388. <https://doi.org/10.1002/anie.201207721>.
- [17]. Zhou, X.; Xu, L.; Xu, J.; Wu, J.; Kirk, T. B.; Ma, D.; Xue, W. Construction of a High-Efficiency Drug and Gene Co-Delivery System for Cancer Therapy from a PH-Sensitive Supramolecular Inclusion between Oligoethylenimine-Graft- β -Cyclodextrin and

- Hyperbranched Polyglycerol Derivative. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (42), 35812–35829. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14517>.
- [18]. Kowalczyk, A.; Kasprzak, A.; Poplawska, M.; Ruzycka, M.; Grudzinski, I. P.; Nowicka, A. M. Controlled Drug Release and Cytotoxicity Studies of Beta-Lapachone and Doxorubicin Loaded into Cyclodextrins Attached to a Polyethyleneimine Matrix. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (16), 5832. <https://doi.org/10.3390/ijms21165832>.
- [19]. Wenz, G.; Han, B.-H.; Müller, A. Cyclodextrin Rotaxanes and Polyrotaxanes. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (3), 782–817. <https://doi.org/10.1021/cr970027+>.
- [20]. Wexselblatt, E.; Esko, J. D.; Tor, Y. On Guanidinium and Cellular Uptake. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (15), 6766–6774. <https://doi.org/10.1021/jo501101s>.
- [21]. Mogaki, R.; Hashim, P. K.; Okuro, K.; Aida, T. Guanidinium-Based “Molecular Glues” for Modulation of Biomolecular Functions. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (21), 6480–6491. <https://doi.org/10.1039/C7CS00647K>.
- [22]. Cui, X.-Y.; Tan, C.-H.; Leow, D. Metal-Catalysed Reactions Enabled by Guanidine-Type Ligands. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (19), 4689–4699. <https://doi.org/10.1039/C8OB02240B>.
- [23]. Berlinck, R. G. S.; Bernardi, D. I.; Fill, T.; Fernandes, A. A. G.; Jurberg, I. D. The Chemistry and Biology of Guanidine Secondary Metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **2020**. <https://doi.org/10.1039/D0NP00051E>.

- [24]. Yang, H.; Han, X.; Ma, Z.; Wang, R.; Liu, J.; Ji, X. Palladium - Guanidine Complex Immobilized on SBA-16 : A Highly Active and Recyclable Catalyst for Suzuki Coupling and Alcohol Oxidation. *Green Chemistry* **2010**, *12* (3), 441–451. <https://doi.org/10.1039/B919175E>.
- [25]. Li, S.; Lin, Y.; Cao, J.; Zhang, S. Guanidine/Pd(OAc)₂-Catalyzed Room Temperature Suzuki Cross-Coupling Reaction in Aqueous Media under Aerobic Conditions. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (11), 4067–4072. <https://doi.org/10.1021/jo0626257>.
- [26]. Li, S.; Lin, Y.; Xie, H.; Zhang, S.; Xu, J. Brønsted Guanidine Acid–Base Ionic Liquids: Novel Reaction Media for the Palladium-Catalyzed Heck Reaction. *Org. Lett.* **2006**, *8* (3), 391–394. <https://doi.org/10.1021/ol052543p>.
- [27]. Legin, A. A.; Jakupec, M. A.; Bokach, N. A.; Tyan, M. R.; Kukushkin, V. Yu.; Keppler, B. K. Guanidine Platinum(II) Complexes: Synthesis, in Vitro Antitumor Activity, and DNA Interactions. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, *133*, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.12.007>.
- [28]. Filian, H.; Ghorbani-Choghamarani, A.; Tahanpesar, E. Pd(0)-Guanidine@MCM-41 as Efficient and Reusable Heterogeneous Catalyst for C–C Coupling Reactions. *J Porous Mater* **2019**, *26* (4), 1091–1101. <https://doi.org/10.1007/s10934-018-0698-9>.
- [29]. Filian, H.; Kohzadian, A.; Mohammadi, M.; Ghorbani-Choghamarani, A.; Karami, A. Pd(0)-Guanidine@MCM-41: A Very Effective Catalyst for Rapid Production of Bis

- (Pyrazolyl)Methanes. *Applied Organometallic Chemistry* **2020**, *34* (6), e5579. <https://doi.org/10.1002/aoc.5579>.
- [30]. Miranda, C.; Escartí, F.; Lamarque, L.; Yunta, M. J. R.; Navarro, P.; García-España, E.; Jimeno, M. L. New 1H-Pyrazole-Containing Polyamine Receptors Able To Complex L-Glutamate in Water at Physiological PH Values. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (3), 823–833. <https://doi.org/10.1021/ja035671m>.
- [31]. Anelli, P. L.; Lunazzi, L.; Montanari, F.; Quici, S. Doubly and Triply Bridged Polyoxapolyazaheterophanes Derived from 2,4,6-Trichloro-s-Triazine. *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (22), 4197–4203. <https://doi.org/10.1021/jo00196a019>.
- [32]. Silverstein, R. M.; Webster, F. X. *Spectrometric Identification of Organic Compounds, Solutions Manual*, 6th Edition.; Wiley: New York, 1998.
- [33]. AIST:Spectral Database for Organic Compounds,SDBS https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (accessed Mar 23, 2021).
- [34]. Piñeiro, L.; Novo, M.; Al-Soufi, W. Fluorescence Emission of Pyrene in Surfactant Solutions. *Advances in Colloid and Interface Science* **2015**, *215*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.010>.
- [35]. Eastoe, J. Surfactant Aggregation and Adsorption at Interfaces. In *Colloid Science*; John Wiley & Sons, Ltd, 2005; pp 50–76. <https://doi.org/10.1002/9781444305395.ch4>.

- [36]. Aranow, R. H.; Witten, L. Theoretical Derivation of Traube's Rule. *J. Chem. Phys.* **1958**, *28* (3), 405–409. <https://doi.org/10.1063/1.1744146>.
- [37]. Ly, H. V.; Longo, M. L. The Influence of Short-Chain Alcohols on Interfacial Tension, Mechanical Properties, Area/Molecule, and Permeability of Fluid Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **2004**, *87* (2), 1013–1033. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.034280>.
- [38]. Martínez-Vitela, M. A.; Gracia-Fadrique, J. The Langmuir-Gibbs Surface Equation of State. *Fluid Phase Equilibria* **2020**, *506*, 112372. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112372>.
- [39]. Bouchal, R.; Hamel, A.; Hesemann, P.; In, M.; Prelot, B.; Zajac, J. Micellization Behavior of Long-Chain Substituted Alkylguanidinium Surfactants. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17* (2), 223. <https://doi.org/10.3390/ijms17020223>.
- [40] Koopal, L. K.; Ralston, J. Chain Length Effects in the Adsorption of Surfactants at Aqueous Interfaces: Comparison of Existing Adsorption Models with a New Model. *Journal of Colloid and Interface Science* **1986**, *112* (2), 362–379. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(86\)90104-9](https://doi.org/10.1016/0021-9797(86)90104-9).
- [41]. Tan, T.; Tan, T.; Ng, S.; Wang, Y.; Xiao, Y. Synthesis of Mono-6-Tosyl- β -Cyclodextrin, a Key Intermediate for the Functional Cyclodextrin Derivatives. *Protocol Exchange* **2011**. <https://doi.org/10.1038/protex.2011.214>.

APÊNDICE A – Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C dos produtos obtidos

Figura A1 – Espectro de RMN de ^1H do composto **2** em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

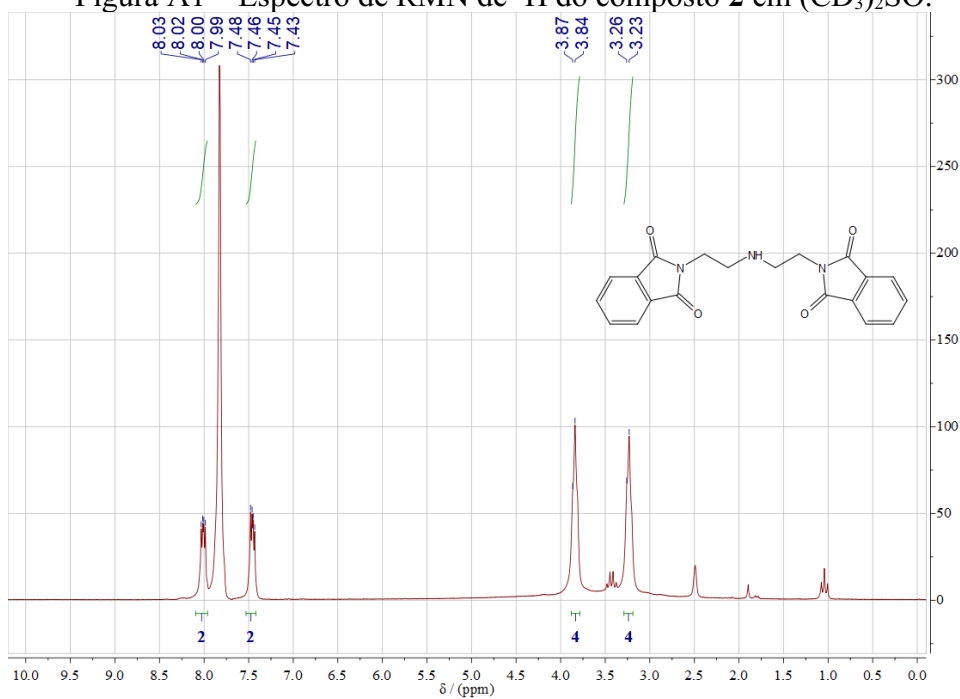


Figura A2 – Espectro de RMN de ^1H do composto **3a** em CDCl_3 .

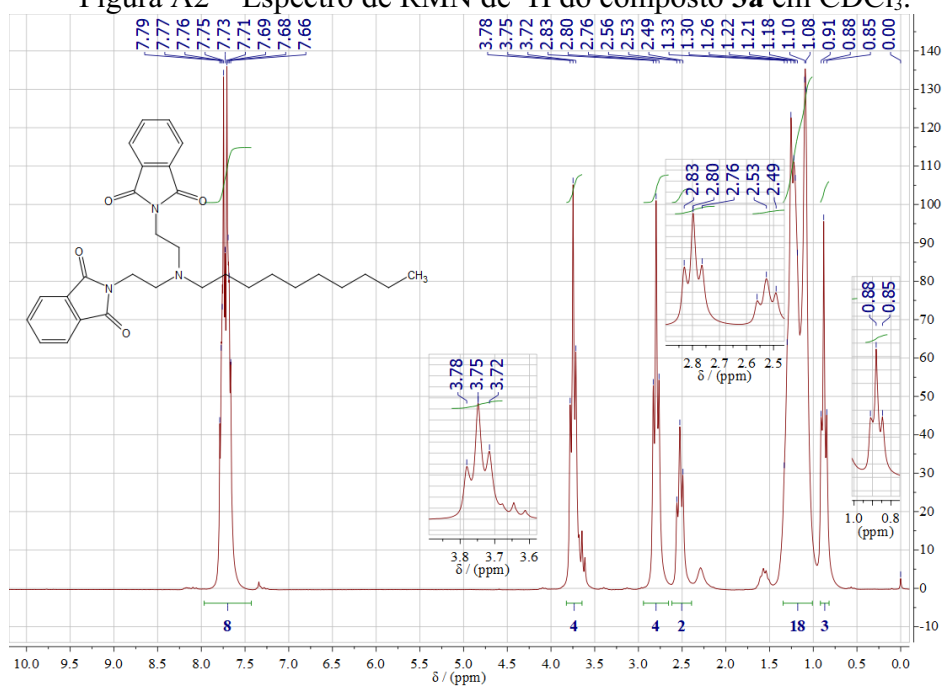


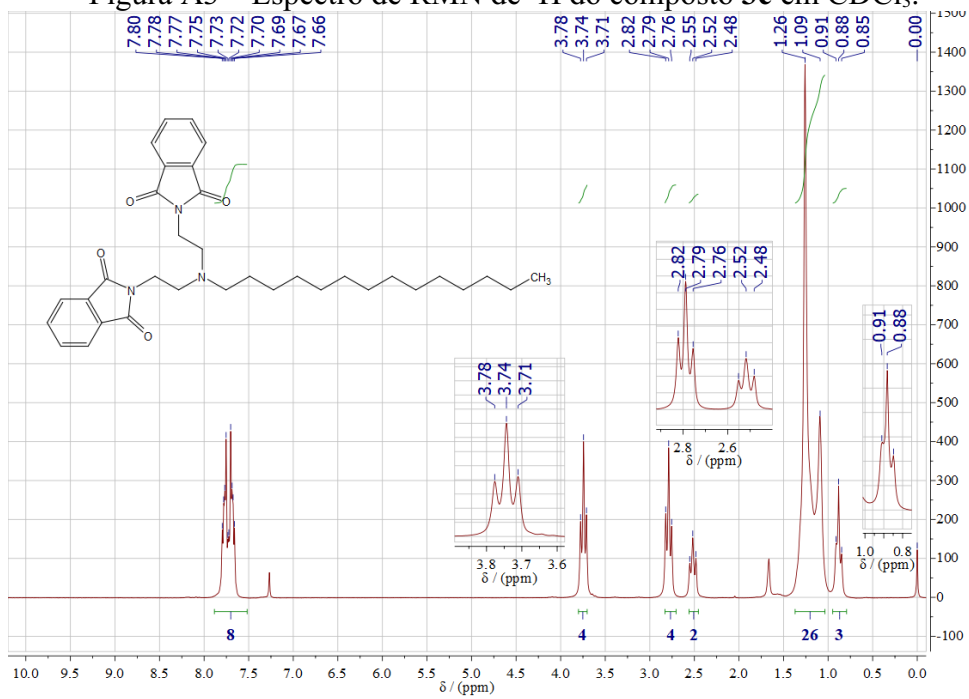
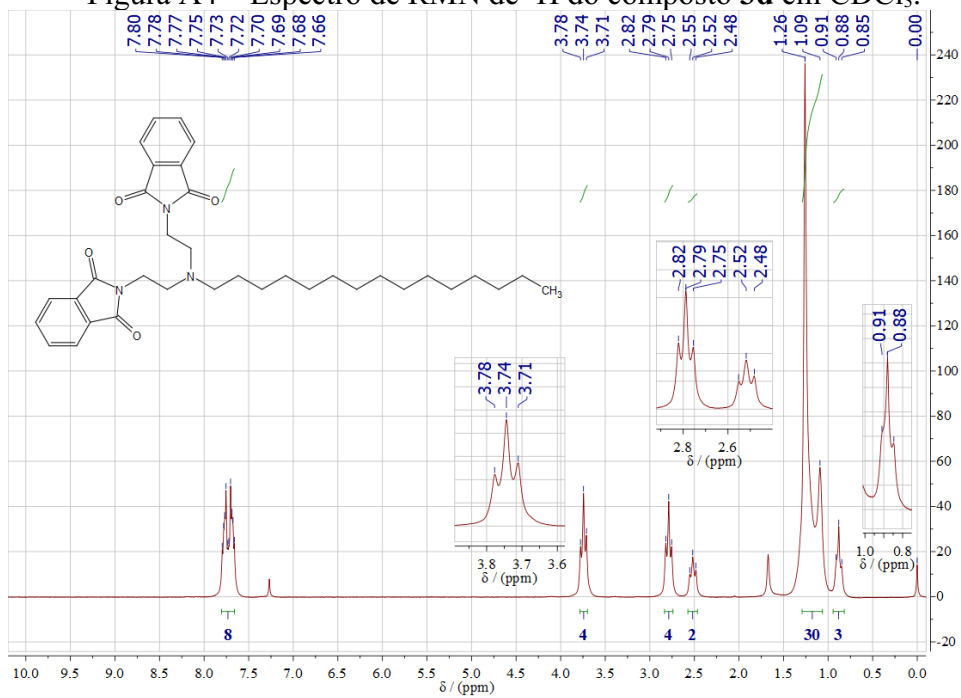
Figura A3 – Espectro de RMN de ^1H do composto **3c** em CDCl_3 .Figura A4 – Espectro de RMN de ^1H do composto **3d** em CDCl_3 .

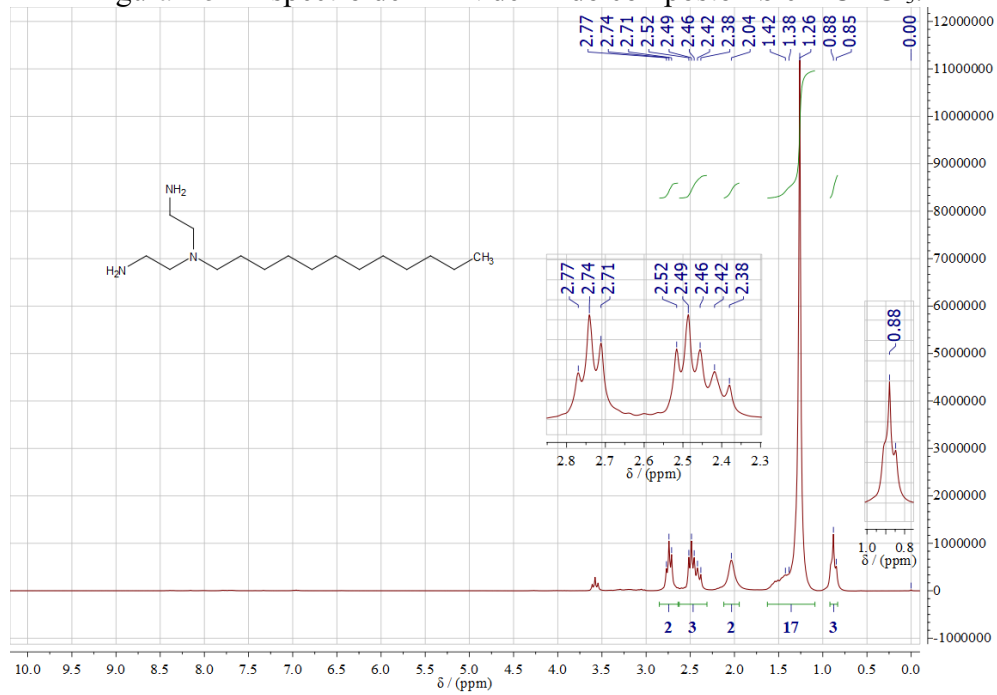
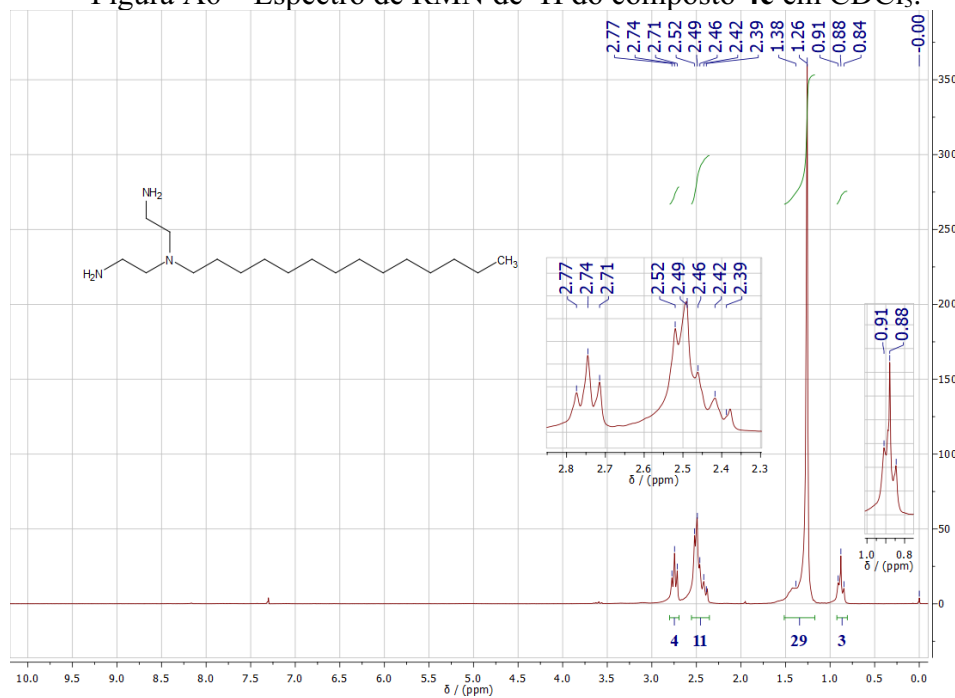
Figura A5 – Espectro de RMN de ^1H do composto **4b** em CDCl_3 .Figura A6 – Espectro de RMN de ^1H do composto **4c** em CDCl_3 .

Figura A7 – Espectros de RMN de ^1H do composto **4d** em CD_3OD .

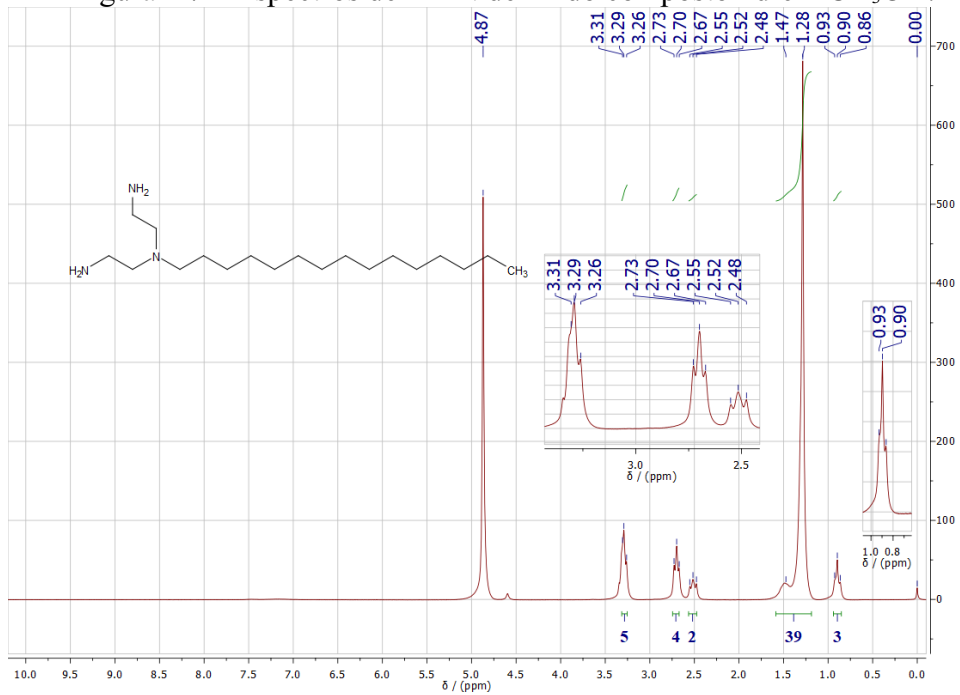


Figura A8 – Espectro de RMN de ^1H do composto **C₁₀BG** em CD_3OD .

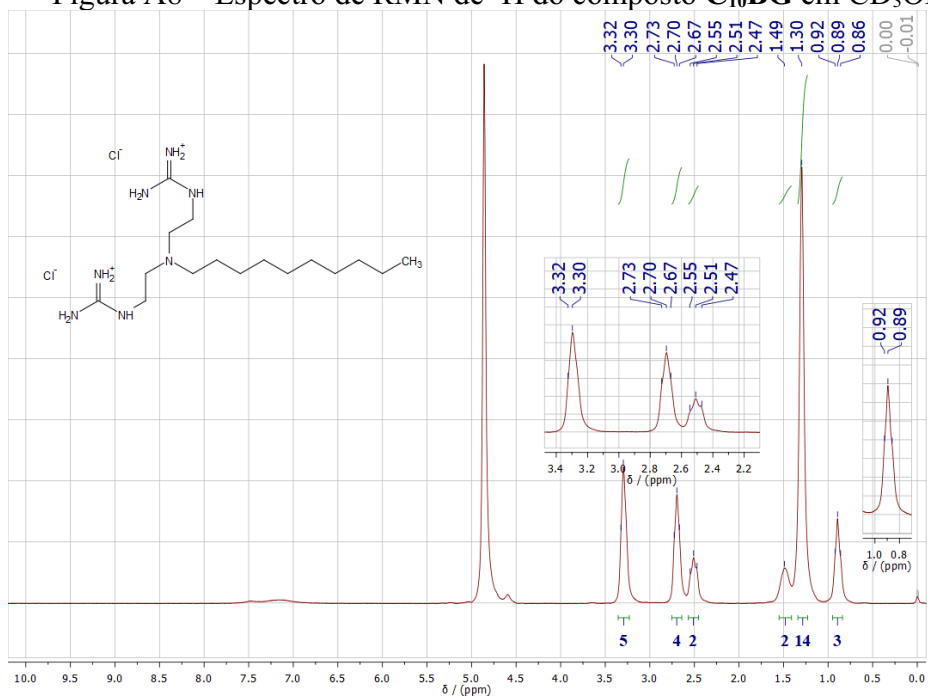


Figura A9 – Espectro de RMN de ^1H do composto C_{12}BG em CD_3OD .

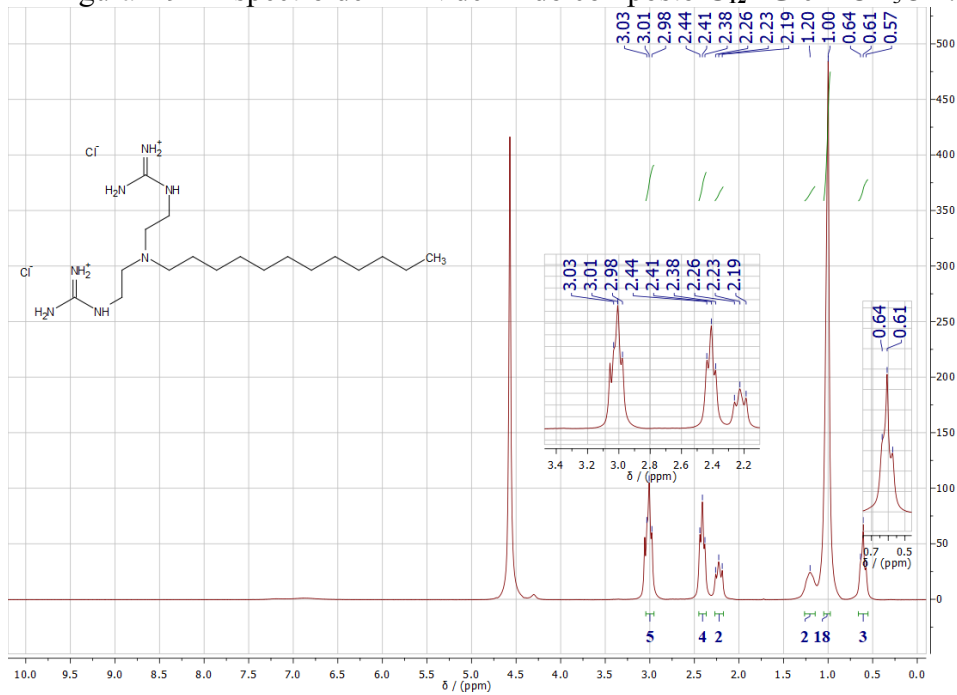


Figura A10 – Espectro de RMN de ^1H do composto C_{14}BG em CD_3OD .

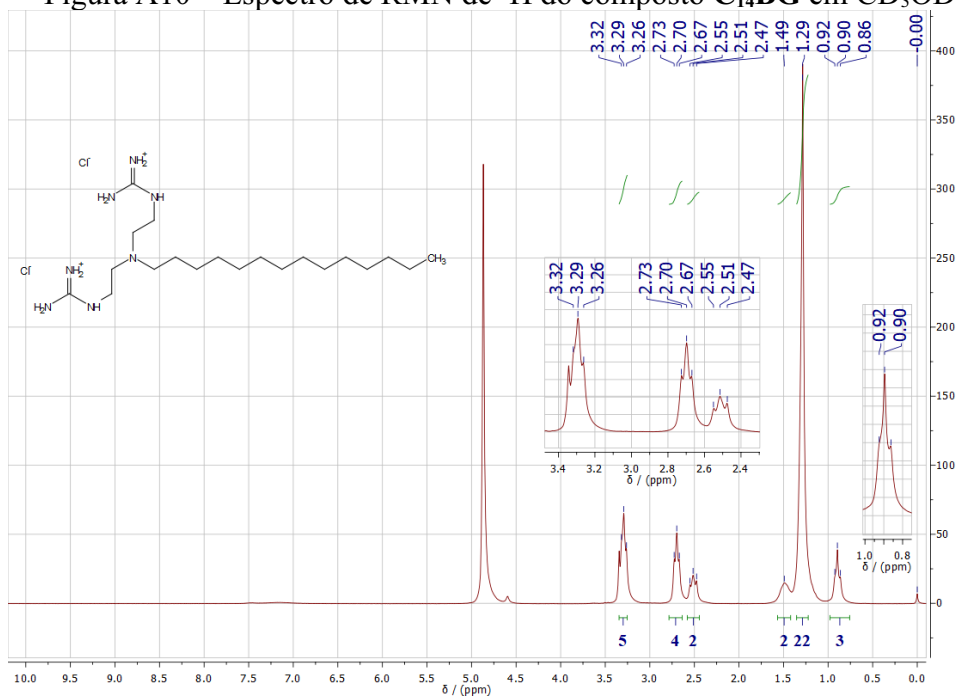


Figura A11 – Espectro de RMN de ^1H do composto C_{16}BG em CD_3OD .

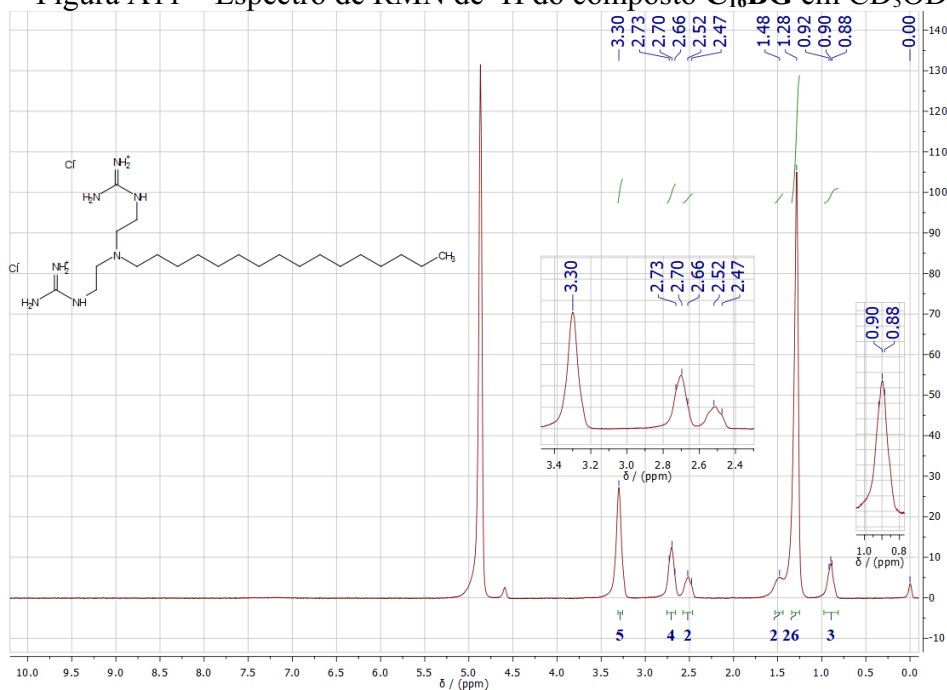


Figura A12 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto C_{10}BG em CD_3OD .

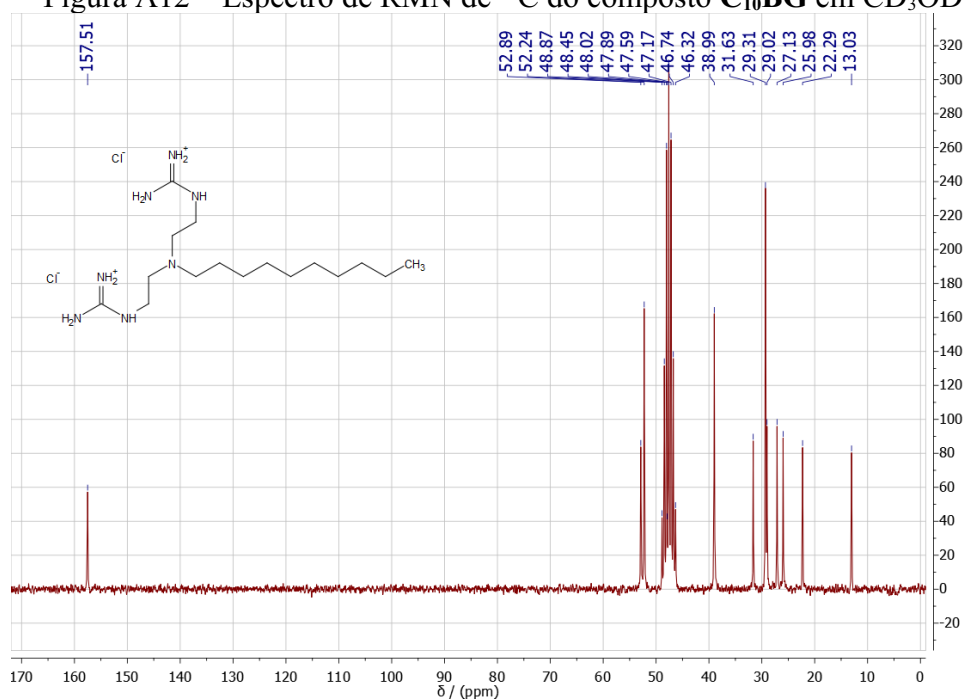


Figura A13 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto C_{12}BG em CD_3OD .

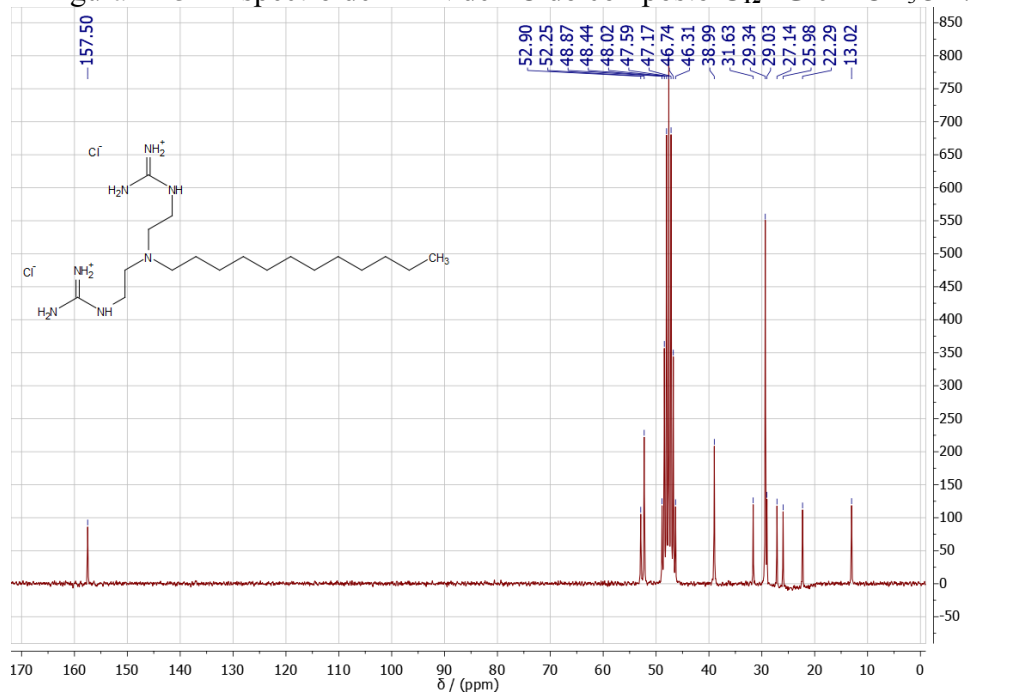


Figura A14 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto C_{14}BG em CD_3OD .

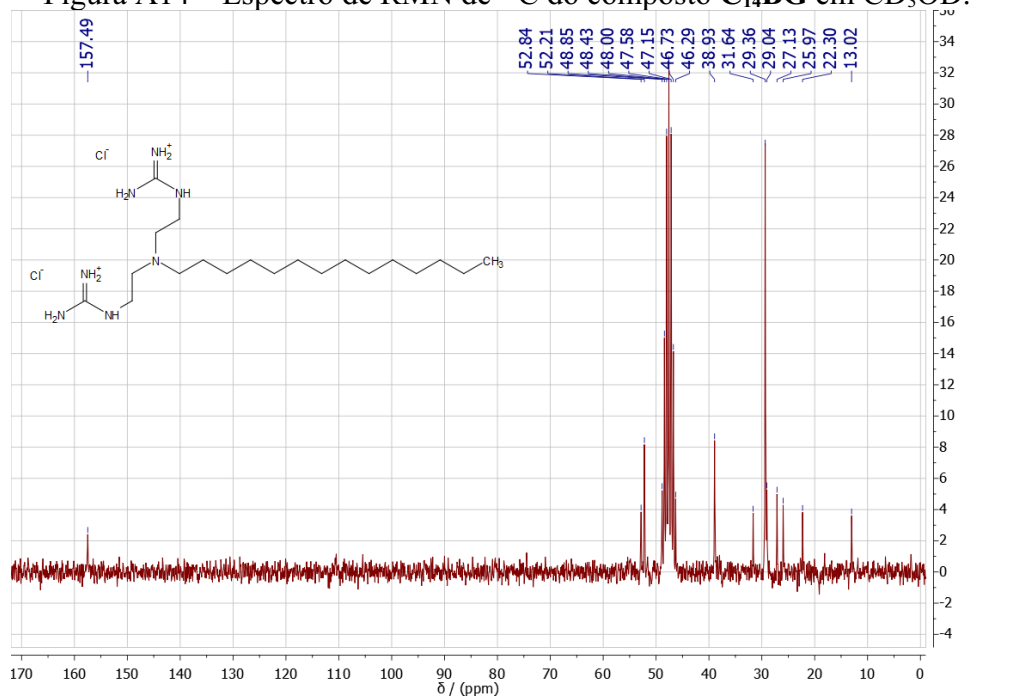


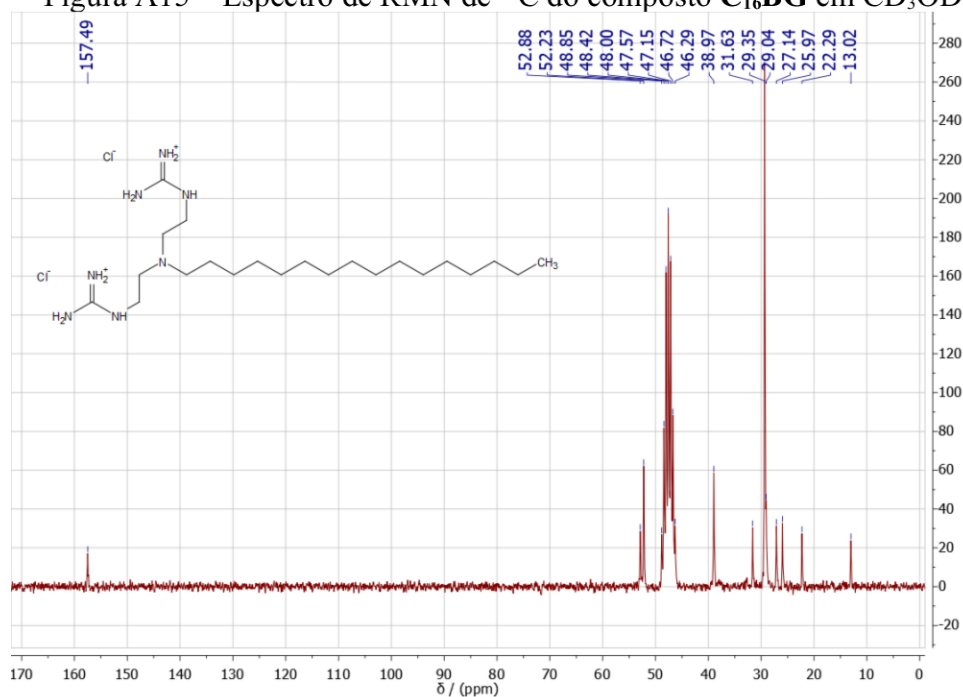
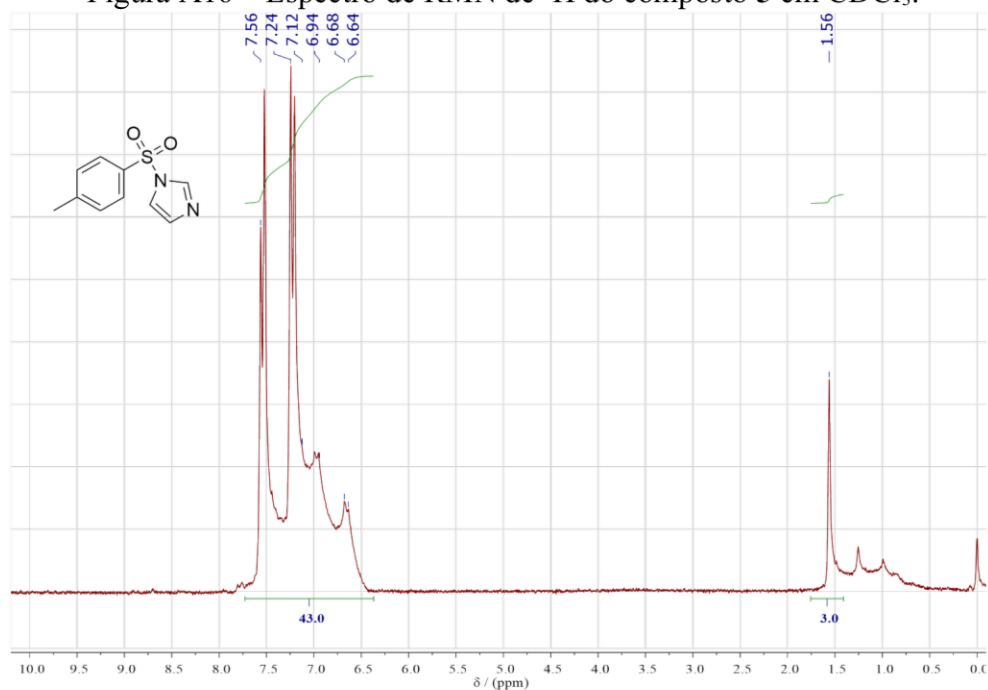
Figura A15 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto C_{16}BG em CD_3OD .Figura A16 – Espectro de RMN de ^1H do composto **5** em CDCl_3 .

Figura A17 – Espectro de RMN de ^1H do composto **6** em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

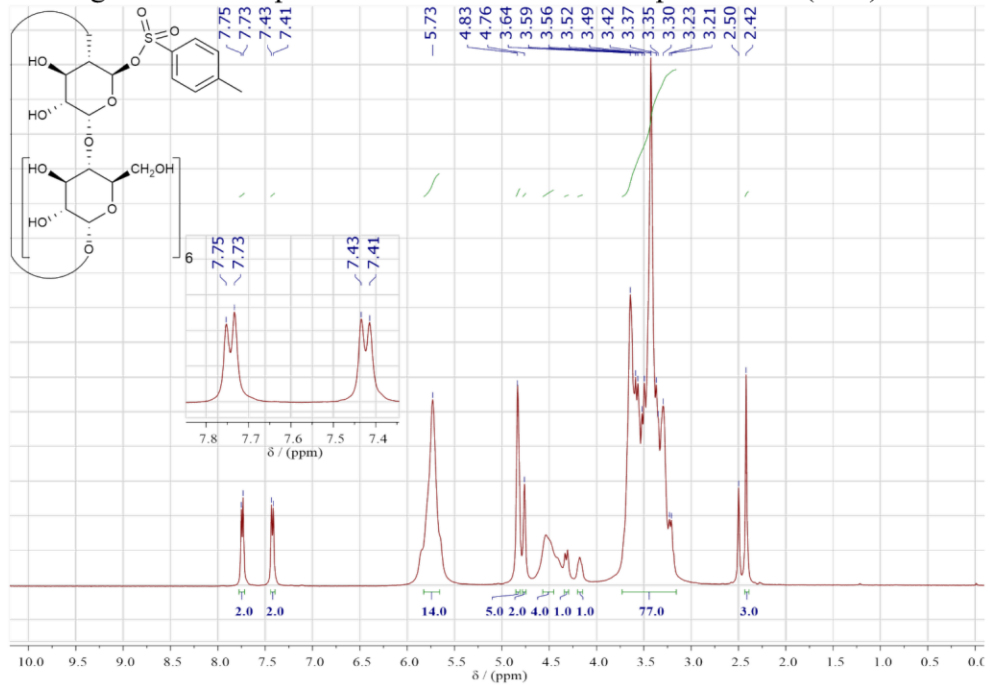
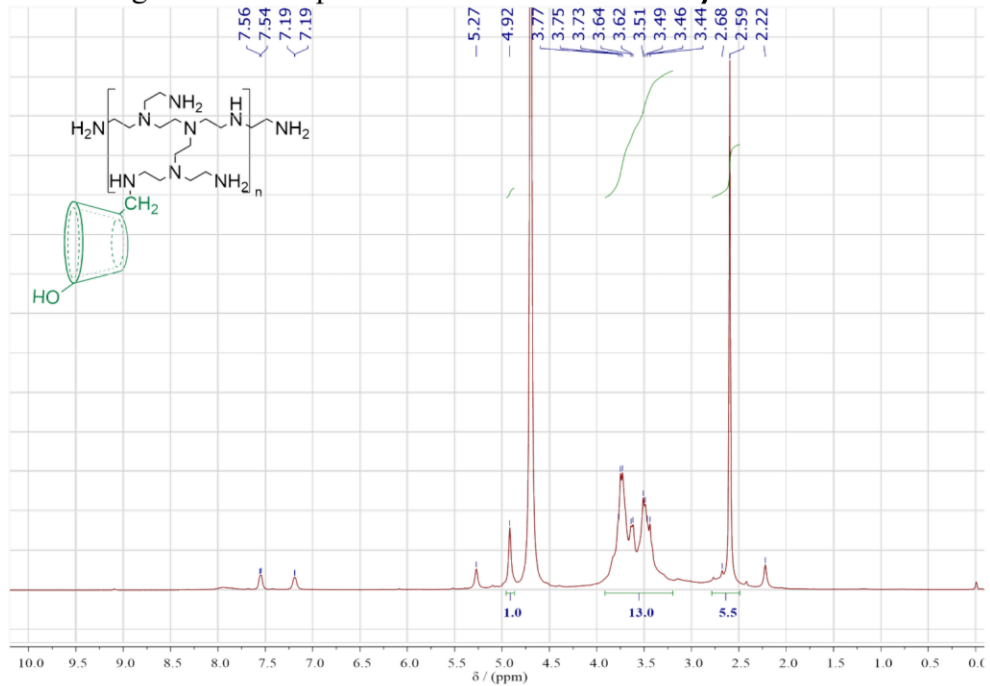
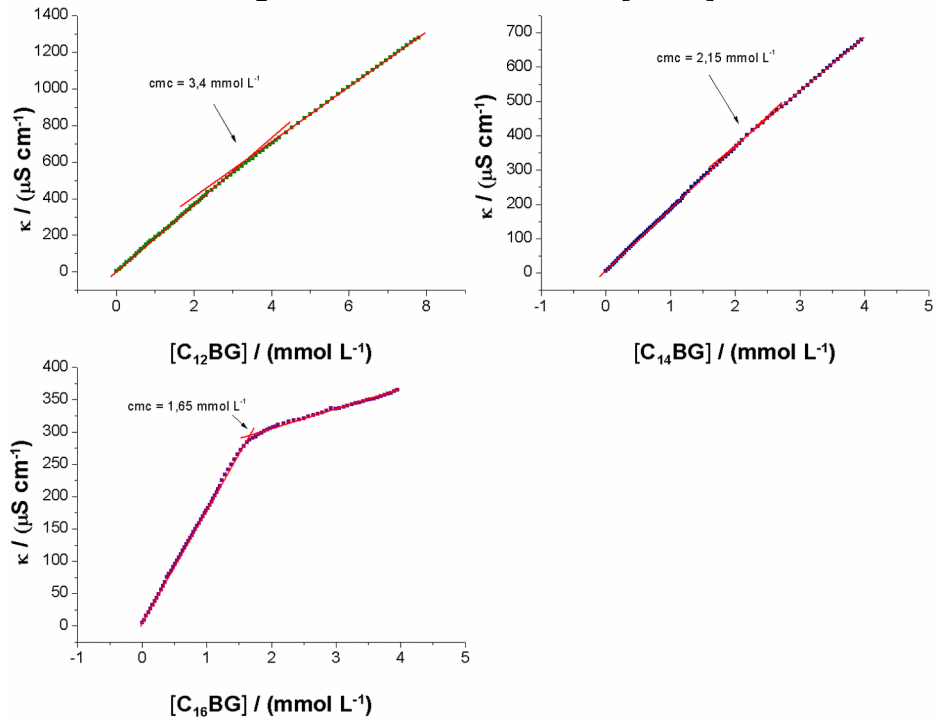


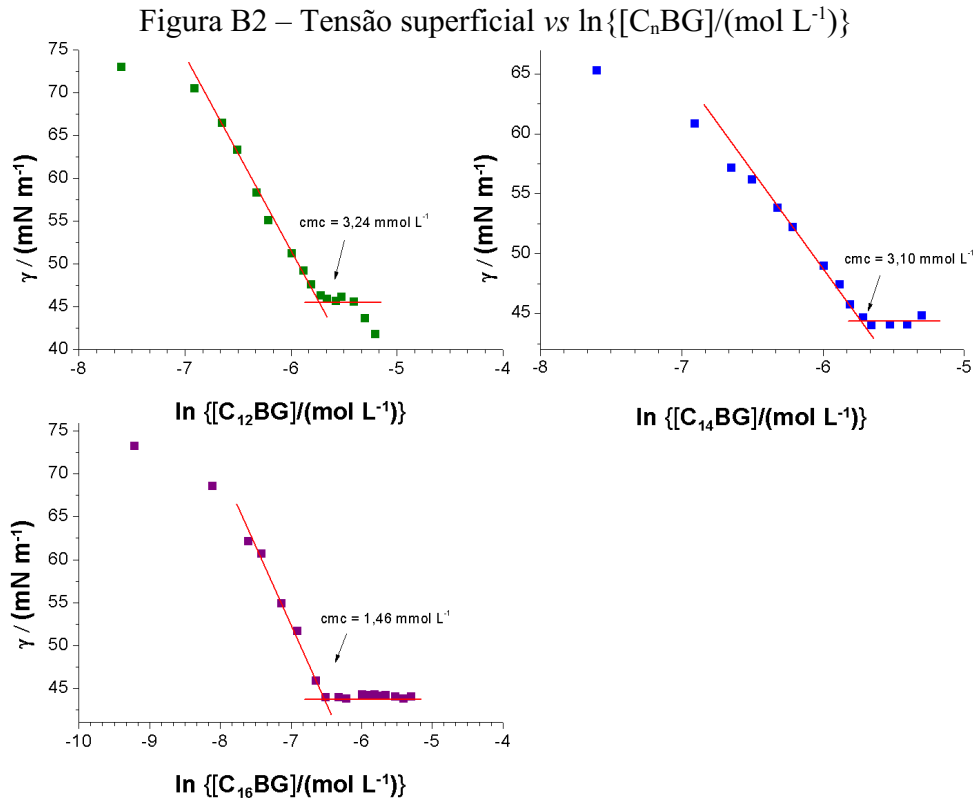
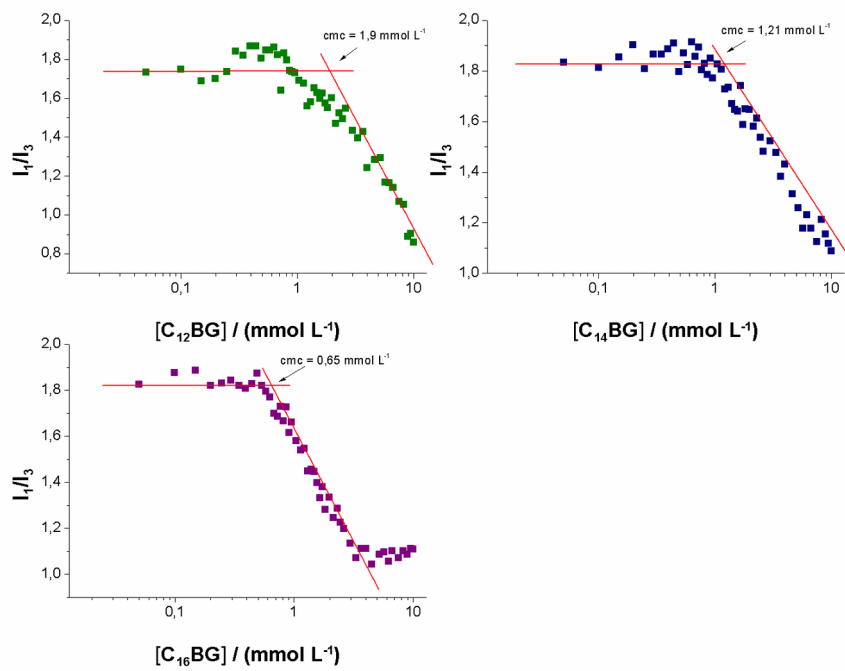
Figura A18 – Espectro de RMN de ^1H da PEI- β -CD em D_2O .



APÊNDICE B – Gráficos das medidas de tensão superficial, de condutividade e de fluorescência

Figura B1 – Condutividade vs $[C_nBG]$



Figura B3 – I_1/I_3 vs $[C_nBG]$ 

ANEXO A – DIREITO AUTORAIS



On-Demand Drug Release System for In Vivo Cancer Treatment through Self-Assembled Magnetic Nanoparticles

Author: Jae-Hyun Lee, Kuan-Ju Chen, Seung-Hyun Noh, et al

Publication: Angewandte Chemie International Edition

Publisher: John Wiley and Sons

Date: Mar 20, 2013

Copyright © 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Universidade Federal de Santa Catarina -- Albert St. John ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5052480137206

[Printable Details](#)

License date Apr 19, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Angewandte Chemie International Edition
Licensed Content Title	On-Demand Drug Release System for In Vivo Cancer Treatment through Self-Assembled Magnetic Nanoparticles
Licensed Content Author	Jae-Hyun Lee, Kuan-Ju Chen, Seung-Hyun Noh, et al
Licensed Content Date	Mar 20, 2013
Licensed Content Volume	52
Licensed Content Issue	16
Licensed Content Pages	5

Order Details

Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	2
Will you be translating?	No

About Your Work

Title	SÍNTESE E ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS DE SURFACTANTES BIS-GUANIDÍNICOS E PEI-β-CICLODEXTRINA
Institution name	Universidade Federal de Santa Catarina
Expected presentation date	May 2021

Additional Data

Portions	Scheme 1 Figure 3. a)
----------	-----------------------

📍 Requestor Location	📄 Tax Details
Universidade Federal de Santa Catarina Rua Virgínia Ledra 88	Publisher Tax ID EU826007151
Requestor Location Rio do Sul, 89160318 Brazil Attn: Universidade Federal de Santa Catarina	
\$ Price	
Total	0.00 USD

Would you like to purchase the full text of this article? If so, please continue on to the content ordering system located here: [Purchase PDF](#)
If you click on the buttons below or close this window, you will not be able to return to the content ordering system.

Total: 0.00 USD

[CLOSE WINDOW](#) [ORDER MORE](#)



RightsLink®



Home



Help



Email Support



Sign in



Create Account

Construction of a High-Efficiency Drug and Gene Co-Delivery System for Cancer Therapy from a pH-Sensitive Supramolecular Inclusion between Oligoethylenimine-graft- β -cyclodextrin and Hyperbranched Polyglycerol Derivative



Author: Xiaoyan Zhou, Lanqin Xu, Jiake Xu, et al

Publication: Applied Materials

Publisher: American Chemical Society

Date: Oct 1, 2018

Copyright © 2018, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
 - If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
 - Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
 - Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
 - One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.
- If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW



RightsLink®

?
Help✉
Email Support**Bio-inspired electron-delivering system for reductive activation of dioxygen at metal centres towards artificial flavoenzymes****SPRINGER NATURE****Author:** Yoann Roux et al**Publication:** Nature Communications**Publisher:** Springer Nature**Date:** Sep 30, 2015*Copyright © 2015, The Author(s)***Creative Commons**

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

To request permission for a type of use not listed, please contact [Springer Nature](#)