



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Novos complexos micelares de metais de
transição para aplicação na terapia dirigida contra
o cancro**

Bebiana Maria Sousa Pinto

Orientação: Prof. Doutor Paulo Mendes

Doutora Andreia Valente

Mestrado em Química

Área de especialização: *Química Orgânica*

Dissertação

Évora, 2016



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Novos complexos micelares de metais de transição para aplicação na terapia dirigida contra o cancro

Bebiana Maria Sousa Pinto

Orientação: Prof. Doutor Paulo Mendes

Doutora Andreia Valente

Mestrado em Química

Área de especialização: *Química Orgânica*

Dissertação

Évora, 2016

“ A persistência é o caminho do êxito”- Charles Chaplin

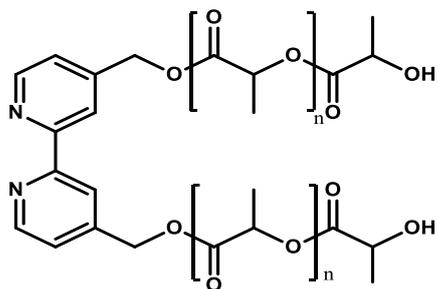
Índice Geral

Índice Geral.....	i
Índice de (co)polímeros e macroligandos poliméricos	iv
Índice de Complexos.....	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	ix
Índice de Esquemas	x
Índice de Anexos	xi
Agradecimentos	xii
Abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvi
Capítulo 1- Introdução Geral	1
1.1. Cancro- Incidência e Tratamento	2
1.2. Fármacos de platina em uso clínico para terapia do cancro	3
1.3. Polímeros como sistemas de veiculação de fármacos	5
1.3.1. Polímeros lineares.....	5
1.3.1.1. Complexos lineares de metal-polímero.....	6
1.3.2. Polímeros Anfifílicos como sistemas de veiculação de fármacos.....	9
1.4. Enquadramento do presente trabalho.....	15
Capítulo 2- Síntese e Caracterização de (co)Polímeros e Macroligandos Poliméricos	18
2.1. Introdução	19
2.1.1. Polimerização por Abertura de Anel (ROP).....	19
2.2. Síntese dos (co)polímeros e macroligandos poliméricos	21
2.2.1. PLA/bipy-CH ₂ OH (L1)	21

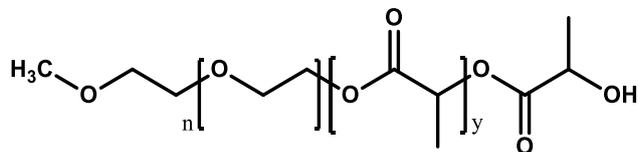
2.2.2. PLA- <i>b</i> -PEG (L2)	21
2.2.3. PLA/bipy-CH ₂ OH/D,L-Alanina/PEG (L4)	22
2.3. Caracterização dos (co)polímeros e macroligandos poliméricos	23
2.3.1. Caracterização através de espectroscopia de ¹ H-RMN	23
2.3.1.1. Determinação do Grau de Polimerização e da massa molecular	26
Capítulo 3- Síntese e Caracterização de Complexos	28
3.1. Introdução	29
3.2. Síntese e caracterização dos complexos [M(bipy) ₃][PF ₆] _x (1a-3a).....	30
3.3. Síntese e caracterização dos complexos [M(bipy-CH ₂ OH) ₃][PF ₆] _x (1b-3b)	35
3.4. Síntese e caracterização dos complexos macromoleculares.....	43
3.4.1. Síntese e caracterização do complexo [Fe(L1) ₃][PF ₆] ₂ (4a).....	43
3.4.2. Síntese e caracterização do complexo [Fe(L4) ₃][PF ₆] ₂ (4b)	47
3.5. Complexos micelares	49
3.5.1. Método de evaporação do co-solvente	50
3.5.2. Método de dissolução direta	55
Capítulo 4- Estudo de Estabilidade e Atividade Biológica	57
4.1. Estudo de estabilidade através de espectroscopia de UV-Vis.....	58
4.2. Estudos de viabilidade celular em linhas celulares tumorais humanas.....	62
Capítulo 5- Conclusões e Perpetivas Futuras	66
Capítulo 6-Materiais e Métodos	70
6.1. Considerações Gerais	71
6.2. Caracterização	71
6.2.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)	71
6.2.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	72
6.2.3. Espectroscopia de Ultravioleta e Visível (UV-Vis)	72
6.2.4. Análise Elementar.....	72
6.2.5. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	72

6.2.6. Estudos de viabilidade celular	73
6.3. Síntese e caracterização de co(polímeros) e macroligandos poliméricos.....	74
6.3.1. Ligando L1	74
6.3.2. Ligando L2	74
6.3.3. Intermediário L3	75
6.3.4. Ligando L4	75
6.4. Síntese e caracterização de complexos.....	76
6.4.1. Síntese do complexo [Fe(bipy) ₃][PF ₆] ₂ (1a)	76
6.4.2. Síntese do complexo [Co(bipy) ₃][PF ₆] ₃ (2a).....	77
6.4.3. Síntese do complexo [Zn(bipy) ₃][PF ₆] ₂ (3a).....	78
6.4.4. Síntese do complexo [Fe(bipy-CH ₂ OH) ₃][PF ₆] ₂ (1b)	79
6.4.5. Síntese do complexo [Co(bipy-CH ₂ OH) ₃][PF ₆] ₃ (2b).....	80
6.4.6. Síntese do complexo [Zn(bipy-CH ₂ OH) ₃][PF ₆] ₂ (3b).....	81
6.4.7. Síntese do complexo [Fe(L1) ₃][PF ₆] ₂ (4a)	82
6.4.8. Síntese do complexo [Fe(L4) ₃][PF ₆] ₂ (4b)	82
Referências Bibliográficas	84
Anexos.....	I

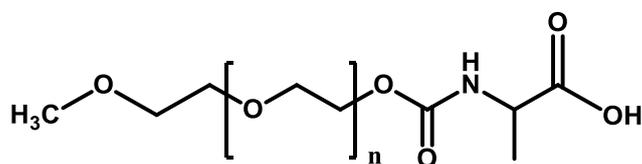
Índice de (co)polímeros e macroligandos poliméricos



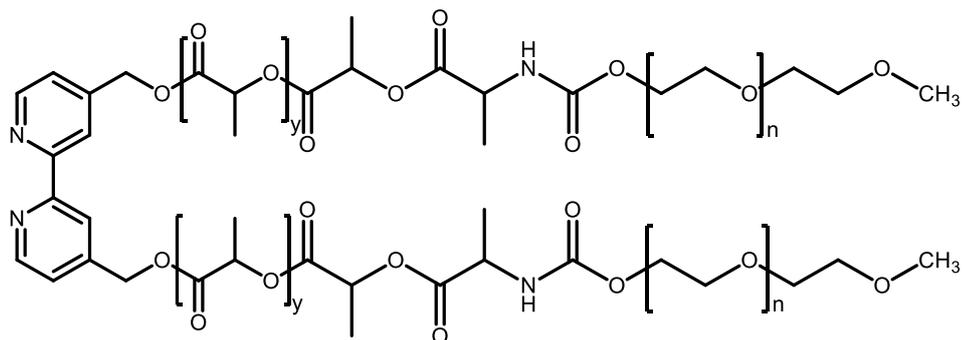
L1



L2

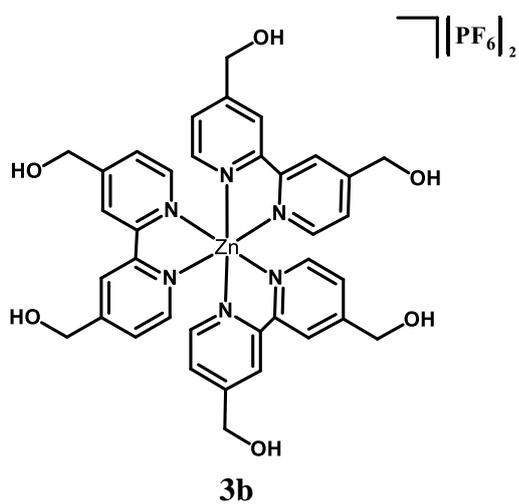
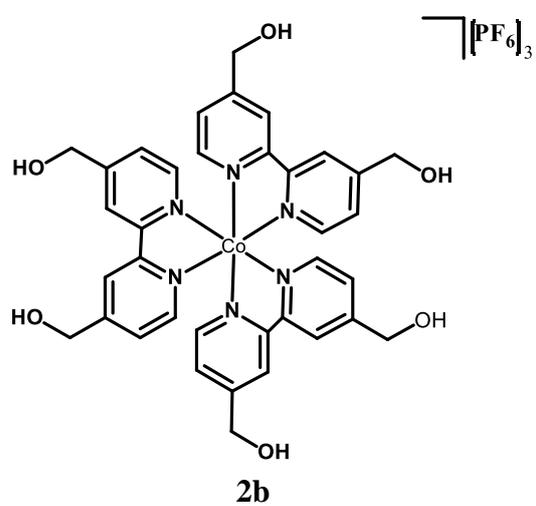
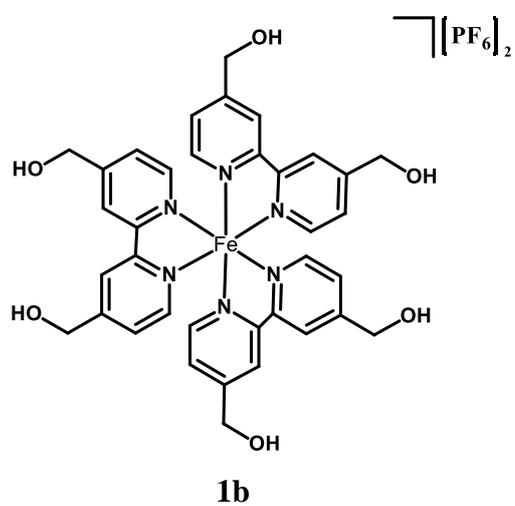
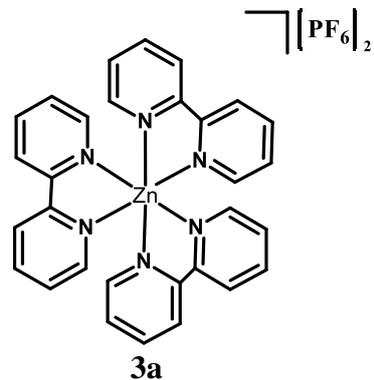
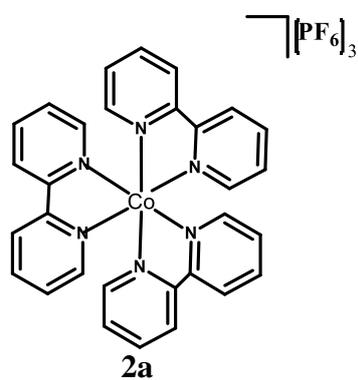
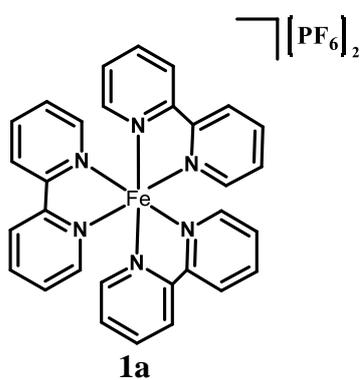


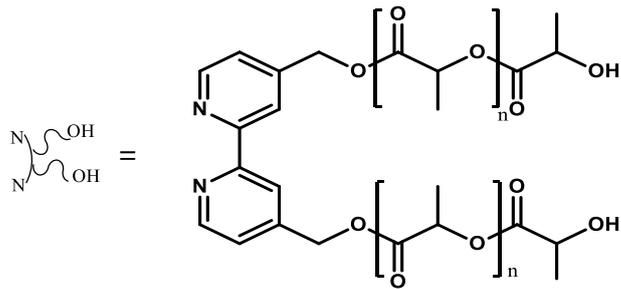
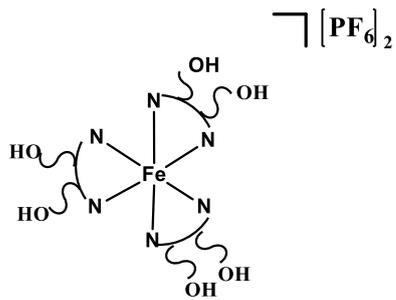
L3



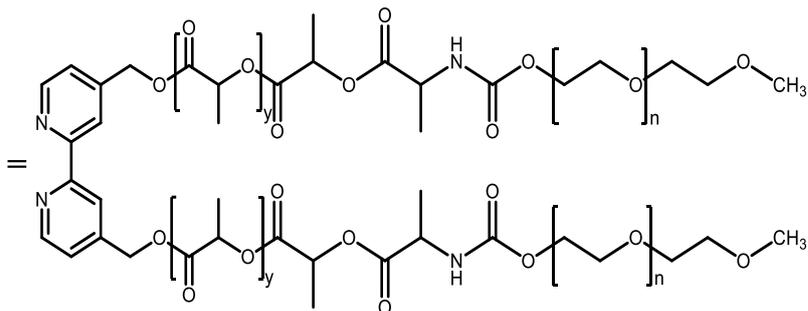
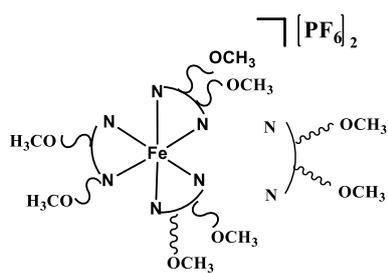
L4

Índice de Complejos





4a



4b

Índice de Figuras

Figura 1. Cancros com maior taxa de mortalidade e a sua respetiva incidência. Adaptado de ⁵	2
Figura 2. Fórmula estrutural da cisplatina.....	4
Figura 3. Fórmula estrutural da carboplatina (A), oxaliplatina (B) e nedaplatina (C).....	5
Figura 4. Estruturas das cadeias repetitivas dos seguintes polímeros: PLA (A) e PGA (B).....	6
Figura 5. Complexo metálico polimérico $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-Cp})(\text{PPh}_3)(\text{mHBL})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$. ²⁴	7
Figura 6. Estrutura química do $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-Cp})(\text{bipy})(\text{PPh}_3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ (TM34). ²⁵	8
Figura 7. Complexos metálicos poliméricos de ferro $[\text{Fe}^{\text{II}}(\eta^5\text{Cp})(\text{CO})(\text{PPh}_3\text{COR})(\text{NCL})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ e $[\text{Fe}^{\text{II}}(\eta^5\text{-Cp})(\text{CO})\text{I}(\text{PPh}_3\text{COR})]$ onde R=OH ou PLLA-Adn e NCL=derivados de benzonitrilo. Adaptado de ²⁹	9
Figura 8. Tipos de nanopartículas utilizados como sistemas de distribuição de fármacos: Lipossomas (A), nanopartículas (B), nanocápsulas (C) e micelas poliméricas (D) Adaptado de ³²	10
Figura 9. Bloco de copolímero Pluronic®. Adaptado de ³⁹	12
Figura 10. Vectorização passiva mediada pelo efeito EPR. A vasculatura dos tecidos normais é revestida por células endoteliais, impedindo o extravasamento de NPs. Adaptado de ⁴¹	13
Figura 11. Mecanismo de polimerização via monómero ativado.....	20
Figura 12. Espectro de ¹ H-RMN em CDCl ₃ referente ao ligando L1 com a atribuição dos prótons.....	24
Figura 13. Espectros de ¹ H-RMN em CDCl ₃ referentes aos ligandos L2 e L4 com a atribuição dos prótons.....	25
Figura 14. Numeração dos prótons e carbonos dos complexos $[\text{M}(\text{bipy})_3][\text{PF}_6]_x$	31
Figura 15. Espectros de ¹ H-RMN em acetona- <i>d</i> ₆ do ligando 2,2'-bipiridina e do composto 2a , com a atribuição dos prótons.....	32
Figura 16. Espectros eletrónicos do ligando livre e dos compostos 1a , 2a e 3a em DMSO.....	35
Figura 17. Numeração dos prótons e carbonos dos complexos com fórmula geral $[\text{M}(\text{bipy-CH}_2\text{OH})_3][\text{PF}_6]_x$	37
Figura 18. Espectros de ¹ H-RMN em DMSO- <i>d</i> ₆ do ligando 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina e do composto 2b , com a atribuição dos prótons.....	37
Figura 19. Espectro eletrónico do ligando livre e dos complexos 1b , 2b e 3b em DMSO.....	42
Figura 20. Espectro eletrónico do complexo 1b em DMSO e metanol.....	42
Figura 21. Numeração dos prótons e dos carbonos do ligando no complexo 4a	44
Figura 22. Espectro eletrónico do complexo 4a em DMSO.....	46

Figura 23. Numeração dos prótons e dos carbonos do complexo 4b	48
Figura 24. Espectros de ¹ H-RMN em CDCl ₃ do complexo 4b	48
Figura 25. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas 1a + PLA-<i>b</i>-PEG , com uma escala 3x3 μm.....	51
Figura 26. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas 2a + PLA-<i>b</i>-PEG , com uma escala 3x3 μm.....	52
Figura 27. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas 3a + PLA-<i>b</i>-PEG , com uma escala 3x3 μm.....	52
Figura 28. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas 1a + PLA-<i>b</i>-PEG , com uma escala 1,27x1,27 μm.....	54
Figura 29. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas 2a + PLA-<i>b</i>-PEG , com uma escala 1x1 μm.....	54
Figura 30. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas 3a + PLA-<i>b</i>-PEG , com uma escala 1,2x1,2 μm.....	55
Figura 31. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas obtidas a partir do complexo 4b , com uma escala 3x3 μm.....	56
Figura 32. Estabilidade do complexo 1b ao longo de 24 horas em DMSO/DMEM.....	59
Figura 33. Espectro normalizado do t _{mix} e às 24 horas para o complexo 1b	60
Figura 34. Variação da intensidade das bandas 310 nm, 357 nm e 529 nm ao longo do tempo, para o espectro eletrônico do complexo 1b	60
Figura 35. Estabilidade do complexo 2b ao longo de 24 horas em DMSO/DMEM.....	61
Figura 36. Estabilidade do complexo 3b ao longo de 24 horas em DMSO/DMEM.....	62
Figura 37. Variação da intensidade das bandas 295 nm e 306 nm ao longo do tempo, para o espectro eletrônico do complexo 3b	62
Figura 38. Resultados dos ensaios de viabilidade na linha celular MDAMB231 para o complexo 4b	64

Índice de Tabelas

Tabela 1. Graus de polimerização e massas moleculares de todos os ligandos sintetizados.....	27
Tabela 2. Desvios químicos dos prótons (ppm) em acetona- <i>d</i> 6 para o composto 2a e do ligando (bipy) e em metanol- <i>d</i> 4 para os compostos 1a e 3a e do ligando (bipy).....	32
Tabela 3. Dados espectroscópicos de UV-Vis do ligando livre e dos compostos 1a-3a , em DMSO.....	34
Tabela 4. Desvios químicos dos prótons principais (ppm) em acetona- <i>d</i> 6, DMSO- <i>d</i> 6 e metanol- <i>d</i> 4 para os compostos 1b-3b e do ligando (bipy-CH ₂ OH).....	38
Tabela 5. Desvios químicos dos carbonos (ppm) em acetona- <i>d</i> 6 para o composto 1b	39
Tabela 6. Desvios químicos dos carbonos (ppm) em DMSO- <i>d</i> 6 para o composto 2b	39
Tabela 7. Desvios químicos dos carbonos (ppm) em metanol- <i>d</i> 4 para o composto 3b	40
Tabela 8. Dados espectroscópicos de UV-Vis dos complexos 1b, 2b e 3b em DMSO e metanol.....	41
Tabela 9. Desvios químicos dos prótons principais (ppm) em CDCl ₃ para o ligando livre L1 e para o complexo 4a	45
Tabela 10. Valores de IC ₅₀ (μM± desvio padrão) obtidos para os complexos 1a-3a, 1b-3b, 4a e para os complexos micelares obtidos a partir de 1a-3a e 4b para a linha celular MDAMB231, após 48h.....	63
Tabela 11. Lista de solventes usados durante este trabalho, respectivas propriedades e modos de secagem.....	71

Índice de Esquemas

Esquema 1. Esquema da polimerização do D,L-Lactídeo utilizando a DMAP como catalisador e a da 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina como iniciador, com a obtenção de L1	21
Esquema 2. Esquema da polimerização do D,L-Lactídeo utilizando a DMAP como catalisador e a do PEG como iniciador, com a obtenção de L2	22
Esquema 3. Esquema da reação de esterificação de L1 com o intermediário L3 , com a formação de L4	23
Esquema 4. Esquema reacional para as sínteses dos compostos 1a a 3a	30
Esquema 5. Esquema reacional para as sínteses dos complexos 1b a 3b	36
Esquema 6. Esquema reacional para a obtenção do complexo 4a	44
Esquema 7. Esquema reacional para a obtenção do complexo 4b	47
Esquema 8. Método de preparação das nanopartículas através da evaporação do co-solvente....	50

Índice de Anexos

Anexo 1. Espetro de FTIR do ligando L1	II
Anexo 2. Espetro de FTIR do ligando L2	II
Anexo 3. Espetro de ¹ H-RMN do composto 1a em metanol- <i>d4</i>	III
Anexo 4. Espetro de ¹ H-RMN do composto 3a em metanol- <i>d4</i>	III
Anexo 5. Espetro de ³¹ P-RMN do composto 3a em metanol- <i>d4</i>	IV
Anexo 6. Espetro de FTIR do composto 1a	IV
Anexo 7. Espetro de FTIR do composto 2a	V
Anexo 8. Espetro de FTIR do composto 3a	V
Anexo 9. Espetro de ¹ H-RMN do composto 1b em acetona- <i>d6</i>	VI
Anexo 10. Espetro de ¹ H-RMN do composto 3b em metanol- <i>d4</i>	VI
Anexo 11. Espetro de HSQC do composto 1b em acetona- <i>d6</i>	VII
Anexo 12. Espetro de HMBC do composto 1b em acetona- <i>d6</i>	VII
Anexo 13. Espetro de HSQC do composto 2b em DMSO- <i>d6</i>	VIII
Anexo 14. Espetro de HMBC do composto 2b em DMSO- <i>d6</i>	VIII
Anexo 15. Espetro de HSQC do composto 3b em metanol- <i>d4</i>	IX
Anexo 16. Espetro de HMBC do composto 3b em metanol- <i>d4</i>	IX
Anexo 17. Espetro de FTIR do composto 1b	X
Anexo 18. Espetro de FTIR do composto 2b	X
Anexo 19. Espetro de FTIR do composto 3b	XI
Anexo 20. Espetro de ¹ H-RMN do composto 4a em CDCl ₃	XI
Anexo 21. Espetro de FTIR do composto 4a	XII

Agradecimentos

Quero expressar um agradecimento muito especial à minha orientadora, a Doutora Andreia Valente pelo apoio, esforço, ensinamentos, paciência e pela disponibilidade e dedicação que sempre demonstrou em orientar esta dissertação de mestrado.

Ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Mendes por todo o apoio, ensinamentos, pelo tempo que me dedicou transmitindo os mais úteis conhecimentos, com confiança, e pela sua crítica sempre atempada.

À coordenadora do Laboratório de Química Organometálica da FCUL, Professora Doutora Maria Helena Garcia pela hipótese que me foi dada, pois permitiu-me adquirir novos conhecimentos na área da química, bem como a possibilidade de realizar o trabalho de dissertação de mestrado.

A todos os meus colegas de laboratório (Adhan, Anabela, David, Francisco, Patrícia, Sofia, Tânia e Inês), pela convivência, ensinamentos, entajuda e principalmente pela boa disposição sempre prestada.

Quero expressar o meu agradecimento especial à Leonor Côrte-Real por todas as ajudas no laboratório, pelas tarefas difíceis de fluorescência e por todos os ensinamentos.

Agradeço também à Professora Doutora Manuela Ribeiro Carrott, diretora do Mestrado em Química na Universidade de Évora, pela disponibilidade sempre prestada e pelo apoio. Não posso deixar de agradecer às minhas colegas de mestrado da Universidade de Évora, pela boa disposição e pelos conhecimentos transmitidos.

Quero expressar também o meu agradecimento à Doutora Ana Viana pelos estudos de AFM, pois foram bastante importantes nesta dissertação de mestrado e à Doutora Fernanda Marques pelos estudos de viabilidade celular.

Agradeço à Leonor e ao Luís pela presença, preocupação, afeto e amizade.

Um agradecimento incalculável à minha família, e em especial, à minha mãe, Carlos Reis e às minhas irmãs, por terem estado sempre do meu lado e terem feito com que este trabalho valesse a pena. Vocês foram, sem dúvida, as pessoas que mais me viram crescer e apoiaram, sem nunca julgar. A motivação, alegria, força, amor e confiança que sempre proporcionaram, foram as motrizes deste trabalho e a vocês o dedico!

Quero agradecer ainda, à Universidade de Évora, enquanto estabelecimento onde me licenciiei e onde me proponho a concluir o mestrado em Química, instituição que me abraçou durante estes cinco anos.

Abreviaturas

AFM	Microscopia de Força Atômica (<i>Atomic-force microscopy</i>)
Add-PLLA	Polilactídeo contendo a adenina como grupo terminal
Bipy	2,2'-Bipiridina
Bipy-CH₂OH	4,4'-Bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina
CDI	1,1'-Carbonildiimidazole
CMC	Concentração micelar crítica
Cp	Ciclopentadienilo
DDS	Sistemas de entrega de drogas (<i>Drug Delivery Systems</i>)
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Grau de Polimerização (<i>Degree of Polymerization</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPR	Retenção e Permeação Melhorada (<i>Enhanced Permeability and Retention</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared</i>)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HOMO	Orbital ocupada de maior energia (<i>Highest occupied molecular orbital</i>)
Hopg	<i>Highly oriented pyrolytic graphite</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC₅₀	Concentração inibitória a 50 % (<i>Half maximal inhibitory concentration</i>)
ILCT	Transferência de Carga Intraligando (<i>Intraligand Charge Transfer</i>)
LMCT	Transferência de Carga Ligando-Metal <i>Ligand-to-Metal Charge Transfer</i>)
LUMO	Orbital desocupada de menor energia (<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>)

MLCT	Transferência de Carga Metal-Ligando (<i>Metal-to-Ligand Charge Transfer</i>)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
mPEG	Metil(polietilenoglicol)
NPs	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline System</i>
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Polilactídeo
PGA	Poli(ácido glicólico)
ppm	Partes por milhão
PPO	Poli(óxido de propileno)
PEO	Poli(óxido de etileno)
PMC	Complexos Metálicos Poliméricos (<i>Polymer-metal conjugates</i>)
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
¹³C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
¹H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de próton
³¹P-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de fósforo
ROP	Polimerização por abertura de anel (<i>Ring Opening Polymerization</i>)
TLC	Cromatografia de camada fina (<i>Thin-layer chromatography</i>)
UV-Vis	Espectroscopia de Ultravioleta e Visível

Resumo

Novos complexos micelares de metais de transição para a aplicação na terapia dirigida contra o cancro

O cancro é a segunda causa de mortalidade a nível mundial. Um dos problemas nos tratamentos atuais de quimioterapia relaciona-se com os efeitos secundários causados pela falta de seletividade dos fármacos utilizados. Assim, um dos desafios atuais é o desenvolvimento de sistemas terapêuticos que permitam potenciar o efeito dos fármacos e diminuir os seus efeitos nocivos.

Neste contexto, neste trabalho, foram sintetizados complexos de Fe, Co e Zn com fórmula geral $[M(\text{bipy-R})_3]^{x+}$, a partir dos quais foi possível obter sistemas micelares formados *in situ* pela adição de um copolímero de PLA-*b*-PEG ou por introdução de macroligandos poliméricos anfifílicos.

Os resultados mostram que as nanopartículas formadas apresentam tamanho e características adequadas para aplicações na terapia dirigida contra o cancro. Os resultados preliminares de citotoxicidade na linha tumoral humana da mama MDAMB231 indicam que todos os compostos estudados apresentam atividade citotóxica relevante, sendo os compostos micelares os mais promissores.

Palavras-chave: Agentes anticancerígenos; Copolímeros; Micelas; Compostos de coordenação.

Abstract

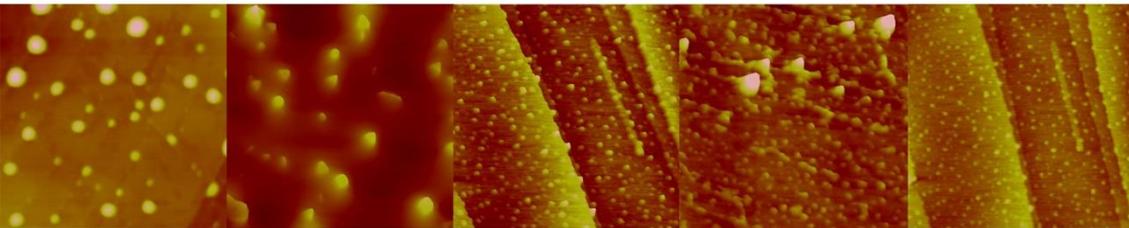
New micellar transition metals complexes for targeted therapy of cancer

Cancer is the second leading cause of mortality worldwide. One problem in the current chemotherapy treatments is related to the severe side effects caused by the lack of selectivity of the drugs in clinical use. Thus, one of the current challenges is the development of new therapeutic systems that allow maximizing the effect of the drugs and reducing their harmful effects.

In this context, several Fe, Co and Zn compounds of the general formula $[M(\text{bipy-R})_3]^{x+}$ were synthesized in order to obtain micellar systems, either by *in situ* addition of a PLA-*b*-PEG copolymer or by introducing amphiphilic macroligands.

The results show that the formed nanoparticles have size and characteristics suitable for applications in targeted therapy against cancer. Preliminary results of cytotoxicity in human breast cancer line MDAMB231 indicate that all the studied compounds show significant cytotoxic activity, being the micellar compounds the most promising agents.

Keywords: Anti-cancer agents; Copolymers; Micelles; Coordination Compounds.



Capítulo 1- Introdução Geral

1.1. Cancro- Incidência e Tratamento

O cancro é, atualmente, uma das principais causas de morte (sendo a primeira as doenças cardiovasculares) e é uma das patologias mais complexas e preocupantes na medicina atual.¹ Estima-se que, anualmente, sejam diagnosticados aproximadamente 11 milhões de novos casos de cancro e que cerca de 7 milhões de pessoas morram devido a esta doença. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera que o cancro será a primeira causa de morte no Mundo em 2020.^{2, 3}

As neoplasias com maior taxa de diagnóstico (em 2012) são o cancro do pulmão (1,60 milhões de pessoas), o cancro da mama (1,38 milhões de pessoas) e o cancro colorretal (1,20 milhões de pessoas) (Figura 1). Entre os homens, o cancro com maior taxa de diagnóstico é o da próstata, pulmões, colorretal, estômago e o cancro do fígado. Já nas mulheres, os mais frequentes são o cancro da mama, colo do útero e do cólon. As neoplasias com maior taxa de mortalidade a nível mundial são o cancro do pulmão, do estômago e o cancro do fígado.⁴

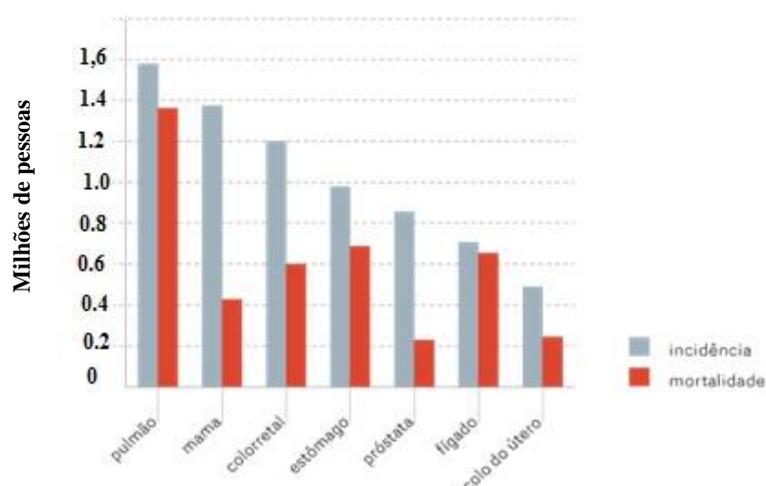


Figura 1. Cancros com maior taxa de mortalidade e a sua respetiva incidência. Adaptado de⁵

De uma forma geral, o cancro é designado como um processo lento, que se inicia numa única célula, devido a um evento mutacional em genes determinantes e que, depois, se desenvolve de forma descontrolada em múltiplos estádios, através da acumulação de alterações genéticas e epigenéticas que resultam na transformação de uma célula normal em células cancerígenas.⁶ Ainda existem algumas lacunas no conhecimento sobre a formação e metastização de neoplasias. Sabe-se que há uma contribuição de fatores externos como o tabaco, radiação, compostos químicos e ainda fatores internos, como a predisposição genética, alterações hormonais, bem como o sistema imunitário para a

incidência do cancro.⁷ Pode existir também uma contribuição individual ou em conjunto destes fatores para a carcinogénese, demorando algum tempo entre uma simples mutação pontual ao desenvolvimento de uma célula tumoral.⁸

Com o desenvolvimento de métodos terapêuticos tradicionais, com a evolução científica na procura de novos métodos e com a utilização de tratamentos de forma multidisciplinar, tem-se verificado, atualmente, uma redução na mortalidade de doentes oncológicos.²

A terapêutica convencional para o tratamento do cancro consiste na dissecação cirúrgica (quando possível), radioterapia, quimioterapia ou a combinação dos três. O uso de quimioterapia apresenta uma eficiência limitada, altos níveis de toxicidade e vários efeitos secundários indesejados. Outros problemas que podem surgir com este tipo de tratamento incluem a incapacidade dos fármacos para atuar de forma seletiva nos locais do tumor, e dificuldade na administração clínica dos mesmos, devido à metabolização e degradação a que são sujeitos, bem como aos mecanismos de resistência por parte das células.⁹

1.2. Fármacos de platina em uso clínico para terapia do cancro

Os metais, apesar de constituírem menos de 1% dos átomos dos organismos vivos, são essenciais à vida devido à sua participação em numerosos processos bioquímicos vitais. No entanto, muitos são tóxicos e mesmo aqueles que são essenciais tornam-se tóxicos quando presentes em excesso. Durante algum tempo os cientistas mostraram pouco interesse no desenvolvimento de novas terapêuticas baseadas em complexos metálicos devido, em parte, ao conhecimento relativo da sua toxicidade.¹⁰

A descoberta da atividade antitumoral da cisplatina (Figura 2), por Rosenberg, no final dos anos 60 do século XX, provou ser possível encontrar complexos metálicos com propriedades terapêuticas excelentes e constituiu um grande incentivo para o desenvolvimento e procura de novos complexos metálicos com atividade semelhante. Na realidade, os compostos de platina são utilizados atualmente no tratamento de cerca de 50-70% de todos os casos de cancro.

Após a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina, milhares de complexos de platina (Pt^{II} mas também Pt^{IV}) têm vindo a ser sintetizados e avaliados relativamente à sua capacidade de atuação como agentes antineoplásicos. Apesar da sua estrutura simples, a cisplatina, é um dos mais potentes conhecidos até hoje, tendo sido

utilizado como agente único ou em regimes de combinação para tratar uma variedade de tumores sólidos (testículos, cabeça, pescoço, ovários e bexiga).^{11,12}

A carboplatina (*cis*-diamina-(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platina(II)); Figura 3-A), foi introduzida clinicamente em 1992, sendo atualmente um dos fármacos mais utilizados em quimioterapia. A carboplatina difere quimicamente da cisplatina devido à existência do grupo carboxilato na molécula, tornando-a mais solúvel comparativamente à cisplatina, retardando a sua hidrólise o que, por sua vez, altera o seu perfil de toxicidade.^{11,13} O mecanismo de ação da carboplatina e da cisplatina é bastante semelhante pois possuem o mesmo tipo de atuação na inibição do DNA da célula tumoral. Depois de hidrolisado, o centro metálico de Pt^{II} interage diretamente com o DNA formando aductos originando, desta forma, ligações intra- e intercadeias que induzem a alterações estruturais.¹⁴

A oxaliplatina (*trans*-diaminociclohexanoxaloplatina(II)); Figura 3-B) revelou atividade em células tumorais resistentes, o que pode ser justificado pela maior captação celular e pela formação de adutos com o DNA que não são reconhecidos pelos mecanismos de reparação.¹⁵ Este foi o primeiro fármaco a ser aprovado capaz de superar a resistência tumoral através da formação de diferentes adutos com o DNA, pensando-se que o ligando oxalato fosse responsável pela diminuição significativa dos efeitos secundários quando comparado com a cisplatina.¹⁴

A nedaplatina (*cis*-diaminaglicolato-O,O'-platina(II)); Figura 3-C), é um metalofármaco de segunda geração. Este composto possui o mesmo grupo amina que a carboplatina mas os grupos cloreto abandonantes foram substituídos por um anel glicolato que atua como um ligando bidentado. A sua atividade antitumoral é muito similar à da cisplatina mas apresenta menor nefrotoxicidade. Além disso a sua solubilidade em água é também superior à da cisplatina, sendo que o seu perfil farmacocinético é muito semelhante ao da carboplatina.¹³

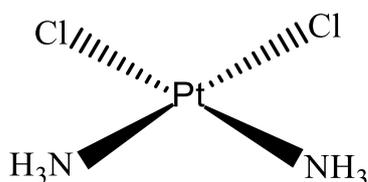


Figura 2. Fórmula estrutural da cisplatina.

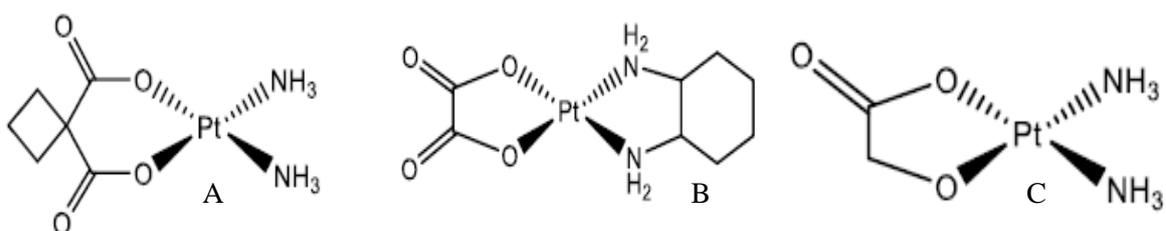


Figura 3. Fórmula estrutural da carboplatina (A), oxaliplatina (B) e nedaplatina (C).

Apesar de ser possível e evidentemente muito desejável que surjam novos compostos de platina capazes de resolver as limitações da cisplatina (principalmente a falta de seletividade para as células cancerígenas, o que origina severos efeitos secundários), nas últimas duas décadas assistiu-se ao desenvolvimento de um novo tipo de fármacos com mecanismos de ação e cinética diferentes dos fármacos tradicionalmente utilizados. Assim, foram testados vários metais que também provaram ter atividade anticancerígena e maior seletividade, como é o caso do titânio, ouro, vanádio, ferro e o ruténio.¹⁵

1.3. Polímeros como sistemas de veiculação de fármacos

1.3.1. Polímeros lineares

Com o intuito de colmatar alguns dos efeitos secundários causados pela utilização de compostos à base de platina, ruténio e outros metais, surgiu nas últimas décadas um crescente interesse no desenvolvimento de nanomateriais com o objetivo desenvolver novos sistemas terapêuticos.¹⁶ Nos últimos anos, tem havido um esforço significativo dedicado ao desenvolvimento da nanotecnologia para aplicações na área da biologia e na medicina.

A utilização de polímeros naturais e sintéticos no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos apresenta uma importância crucial devido ao número de polímeros, variedade de formulações disponíveis para controlar a velocidade, a duração e os locais de libertação de fármacos, o que resulta na constante procura de polímeros com propriedades otimizadas e relevantes na veiculação e vectorização de fármacos. Sendo assim, existem algumas características fundamentais para que um polímero possa ser utilizado como sistema de veiculação de fármacos, nomeadamente a grande superfície de contacto celular, forma tridimensional e biocompatibilidade.¹⁷

Neste contexto, surgiram alguns polímeros sintéticos biodegradáveis e bioreabsorvíveis como os poli(α -hidroxiácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos que são utilizados com a finalidade da preparação de nanopartículas para a veiculação de fármacos, dos quais faz parte o polilactídeo (PLA) (Figura 4-A), o poli(ácido glicólico) (PGA) (Figura 4-B), o poli(ácido(lático-co-glicólico) (PLGA) e as proteínas.¹⁸ Estes polímeros têm sido amplamente utilizados numa quantidade impressionante de formulações uma vez que são biocompatíveis e biodegradáveis. Isto deve-se, em grande parte, à excreção simplificada das matrizes poliméricas.^{19,20} Alguns dos polímeros utilizados ganharam a aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*) para a utilização na área biomédica, como por exemplo o PLA. Os produtos de degradação do PLA, PGA e PLGA são metabolitos não tóxicos e são eventualmente eliminados do corpo por uma simples hidrólise na forma de dióxido de carbono e água.²¹

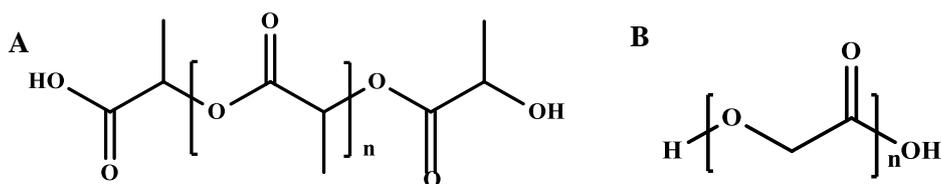


Figura 4. Estruturas das cadeias repetitivas dos seguintes polímeros: PLA (A) e PGA (B).

1.3.1.1. Complexos lineares de metal-polímero

A nanotecnologia, e a sua aplicação na área da biomedicina, em particular na terapêutica e diagnóstico oncológico, tem sido alvo de um desenvolvimento exponencial, com um impacto profundo no que respeita a cuidados de saúde e tratamento de doenças, principalmente no tratamento de vários tipos de cancro. Têm surgido ultimamente vários compostos organometálicos conjugados com cadeias poliméricas, dando origem a potenciais fármacos (PMCs, *polymer-metal conjugates*). Este desenvolvimento é baseado no efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention*), ou seja, na capacidade que as macromoléculas têm para a permeação e retenção nos tumores relativamente às moléculas que apresentam baixo peso molecular.^{22,23}

Existem já alguns trabalhos na literatura²² sobre macromoléculas aplicadas à entrega eficiente de fármacos, principalmente as de platina (Pt), sendo que numa fase inicial dos estudos foram utilizados outros metais, tais como o cobre, o paládio, ouro,

tungsténio e ruténio. A maioria das abordagens para o desenvolvimento de fármacos macromoleculares são baseados no efeito EPR, tal como já foi referido anteriormente. Este efeito foi identificado pela primeira vez por Maeda *et al* em 1986.²³ A FDA, só aprovou até agora onze nanopartículas para a terapia do cancro. Uma das razões desse facto poderá estar relacionado com a dificuldade de síntese dos macroligandos adequados. Assim, tornou-se relevante desenvolver estratégias novas e mais simples para o desenvolvimento de fármacos conjugados, sem recorrer a processos longos, como por exemplo, sínteses morosas e difíceis. Este passo poderá ser ultrapassado através da utilização de uma estratégia de coordenação que envolve um único passo.

Hoje em dia, os complexos de ruténio são uma alternativa atrativa à platina na terapia do cancro devido ao facto de apresentarem diferentes mecanismos de ação, menor toxicidade e pela variedade de ligandos a que se pode coordenar. A sinergia metal-ligando é importante na atividade biológica do complexo.²² Neste âmbito, o grupo de Química Organometálica do Centro de Química Estrutural – Pólo FCUL, publicou recentemente a síntese e resultados de citotoxicidade preliminares do primeiro complexo com o fragmento organometálico “Ru(η^5 -Cp)” conjugado com uma cadeia polimérica de polilactídeo na qual, na parte terminal das cadeias poliméricas, foram introduzidas moléculas derivadas da glucose, [Ru^{II}(η^5 -Cp)(PPh₃)(mHBL)][CF₃SO₃], RuPMC (mHBL = macroligando bidentado heteroaromático) (Figura 5).²⁴

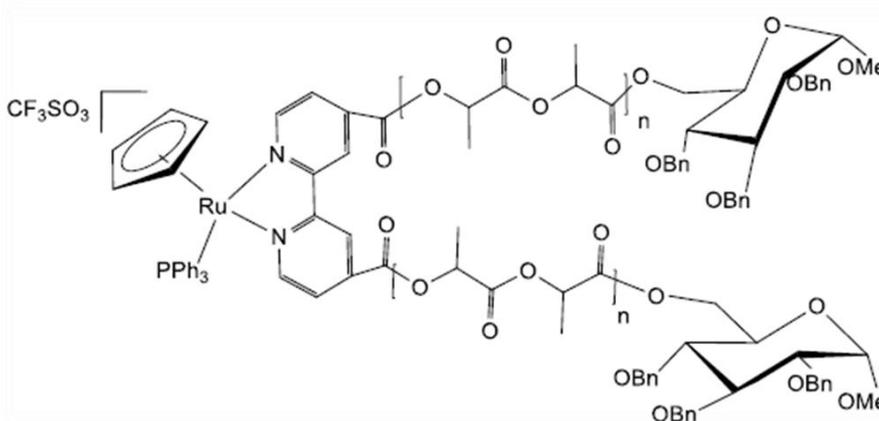


Figura 5. Complexo metálico polimérico [Ru^{II}(η^5 -Cp)(PPh₃)(mHBL)][CF₃SO₃].²⁴

Esta macromolécula poderá usufruir do efeito EPR devido à presença das duas cadeias poliméricas, constituídas por um polímero biodegradável e biocompatível (PLA), tal como já foi mencionado anteriormente. Revelou ótimos resultados em termos de

citotoxicidade bem como na acumulação nas células tumorais, até mesmo quando comparados com o seu composto parental, **TM34** (Figura 6).²⁴

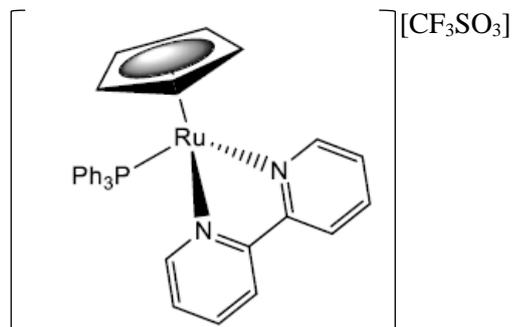


Figura 6. Estrutura química do $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-Cp})(\text{bipy})(\text{PPh}_3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ (**TM34**).²⁵

O **TM34**, apesar de ter revelado resultados muito promissores *in vitro* (~15 vezes mais ativo que a cisplatina contra células humanas do carcinoma do ovário, A2780, e ~100 vezes mais ativo contra as linhas celulares do cancro da mama, MCF7, e do carcinoma da próstata humano, PC3), induziu sérios efeitos tóxicos nos ensaios *in vivo* com ratinhos nude.^{26,27} Desta forma, pensa-se que esta segunda geração de compostos poderá colmatar os problemas de seletividade verificados nos de primeira geração. Os resultados preliminares apontam nesse sentido e a família de compostos foi entretanto patenteada.²⁸

Os resultados promissores obtidos pelo grupo de Química Organometálica da FCUL conduziram ao desenvolvimento de novos PMCs, variando o metal. O ferro é um elemento essencial para o bom funcionamento do nosso organismo, ajuda na produção da hemoglobina e enzimas e transfere oxigénio para o sangue. Para além de ser um metal essencial, é muito mais barato que o ruténio e que a platina, o que poderá ser uma mais-valia para a indústria farmacêutica. Neste contexto surgiram dois novos FePMCs com vista a serem utilizados para o tratamento oncológico. Estes dois compostos macromoleculares foram obtidos através de uma combinação do polilactídeo contendo a adenina como grupo terminal (Adn-PLLA) com metalofármacos baseados no fragmento organometálico “ $\text{Fe}(\eta^5\text{-Cp})$ ” (Figura 7- A e B).²⁹

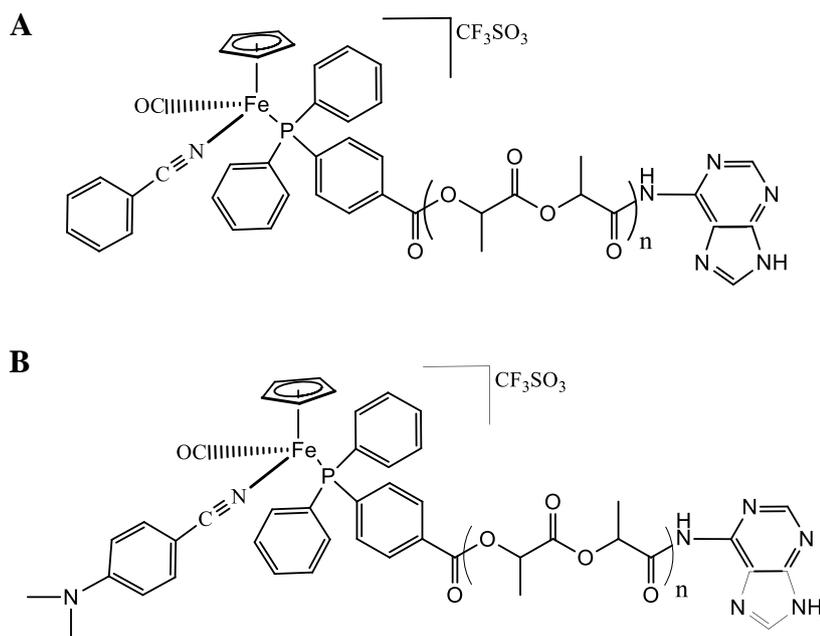


Figura 7. Complexos metálicos poliméricos de ferro $[\text{Fe}^{\text{II}}(\eta^5\text{-Cp})(\text{CO})(\text{PPh}_3\text{COR})(\text{NCL})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ e $[\text{Fe}^{\text{II}}(\eta^5\text{-Cp})(\text{CO})\text{I}(\text{PPh}_3\text{COR})]$ onde $\text{R}=\text{OH}$ ou PLLA-Adn e $\text{NCL}=\text{derivados de benzonitrilo}$. Adaptado de²⁹.

Os dois novos complexos organometálicos de ferro demonstraram possuir uma melhor citotoxicidade relativamente a complexos de baixo peso molecular semelhantes, com valores de IC_{50} na gama do micromolar.²⁹

1.3.2. Polímeros Anfífilicos como sistemas de veiculação de fármacos

Na segunda metade do século XX começaram a surgir os primeiros nanomedicamentos, rodeados de um grande cepticismo por parte da comunidade clínica, que colocava em causa o potencial terapêutico tendo em conta o seu tamanho, a real aplicabilidade para a produção industrial e a sua viabilidade económica.³⁰

A promoção da investigação interdisciplinar e da descoberta de mecanismos coloidais para a veiculação de fármacos entre os anos 1960 e 1970, conduziu ao desenvolvimento de nanotecnologias que incluíram os lipossomas (80-200 nm) (Figura 8-A), nanopartículas (20-1000 nm) (Figura 8-B), nanocápsulas (100-1000 nm) (Figura 8-C) e micelas poliméricas (50-200 nm) (Figura 8-D).^{15, 31} Torna-se importante sublinhar que cada uma das nanotecnologias foi categorizada em várias classes tendo em consideração as suas diferentes características físico-químicas, bem como o seu tamanho. Foram concebidas com o principal objetivo do fármaco conseguir alcançar um determinado órgão, célula doente ou compartimento intracelular (como por exemplo o

núcleo), dirigindo-o para longe de locais onde a sua ação poderia ser potencialmente tóxica (obtido deste modo um índice terapêutico ótimo) e/ou libertar a concentração requerida, durante apenas o tempo necessário de modo a maximizar o efeito farmacológico, minimizando desta forma a toxicidade não específica.^{30,31}

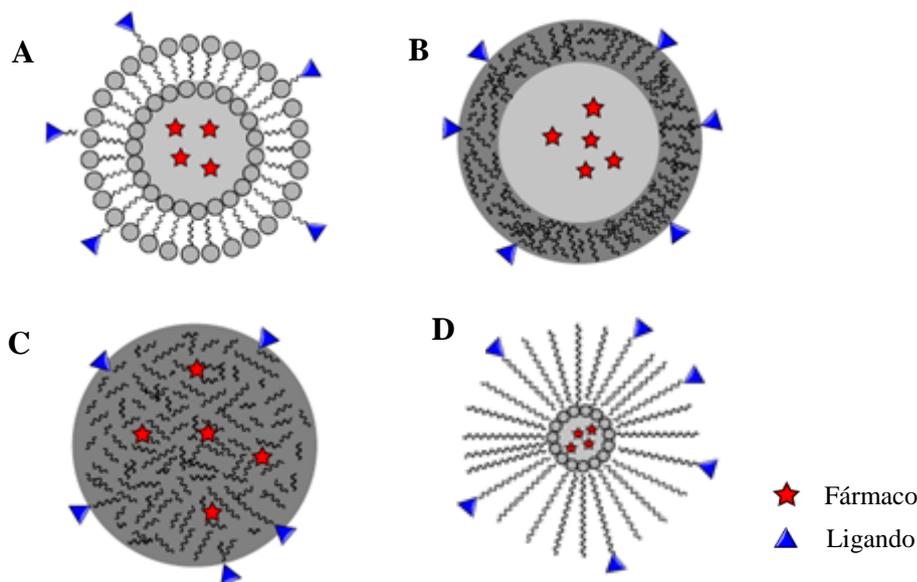


Figura 8. Tipos de nanopartículas utilizados como sistemas de distribuição de fármacos: Lipossomas (A), nanopartículas (B), nanocápsulas (C) e micelas poliméricas (D) Adaptado de³²

A aplicação das nanopartículas para a administração de fármacos foi inicialmente desenvolvida por *Speiser et al*³³ ao descrever um processo de obtenção de nanocápsulas constituídas por um material polimérico sintético capaz de reter fármacos e antigénios. Desde então, foram desenvolvidos inúmeros processos de produção, aplicados nos mais diversos fármacos e em diversas áreas terapêuticas (medicina e farmácia), quer para a administração oral, parentérica ou ocular.³⁴

Estes materiais evoluíram desde a sua aplicação em produtos que apresentavam capacidade de biodegradação, tais como sistemas de veiculação de fármacos, a macro- e microescala, e matrizes, que possam atuar como depósitos de fármacos capazes de exercer uma libertação controlada, até ao desenvolvimento de nanopartículas (NPs) multifuncionais, com vectorização e libertação controlada de fármacos.³⁵ Os polímeros podem também ser utilizados à superfície de outros tipos de nanossistemas. Por exemplo, o polietilenoglicol (PEG) é um polímero com propriedades hidrofílicas, que confere à nanopartícula a capacidade de evitar a eliminação ao nível do sistema reticuloendotelial. Por outro lado, a diminuição da excreção das nanopartículas, pode conduzir a um aumento

do tempo de semivida.³⁶ Deste modo, as NPs têm atraído um considerável interesse nos últimos anos devido às suas propriedades únicas e comportamentos proporcionados devido ao seu reduzido tamanho.³⁶

Em suma, as principais vantagens para a utilização de polímeros anfifílicos é que estes permitem a libertação do fármaco de forma controlada e um aumento da biodisponibilidade, o que conduz a uma redução da toxicidade bem como um aumento dos efeitos terapêuticos pois o fármaco é entregue com eficiência no local pretendido sem afetar os tecidos saudáveis. Idealmente os polímeros anfifílicos devem ser biodegradáveis e biocompatíveis, de fácil preparação e de baixo custo. Devem possuir, também, uma boa capacidade de transporte, isto é, armazenar/transportar uma grande quantidade de fármaco. Estes são fatores-chave para uma entrega eficiente do fármaco no tecido alvo.^{35,36}

As nanopartículas designadas por micelas poliméricas foram inicialmente propostas em 1984 pelo grupo de Bader *et al*¹⁹, mas a sua utilização como possíveis *drug delivery systems* (DDS) só foi introduzida no início dos anos 90. As micelas poliméricas podem dividir-se em dois grupos principais: as micelas surfactantes de baixo peso molecular e as micelas poliméricas. Em relação ao primeiro grupo existem vários tipos de surfactantes comerciais, sendo que o mais utilizado é Cremophor® EL. Este apresenta uma grande capacidade de solubilização de fármacos poucos solúveis em água. No entanto, pode estar associado a alguns efeitos secundários como a hipersensibilidade e nefrotoxicidade.³⁷

As micelas poliméricas têm sido amplamente estudadas e são estruturas com uma concentração micelar crítica (CMC) mais baixa, cerca de 1000 vezes inferior aos surfactantes de baixo peso molecular. Em contrapartida, apresentam maior estabilidade e atividade biológica. Este tipo de micelas é formado a partir de copolímeros anfifílicos, que se micelizam espontaneamente em misturas de solventes orgânicos e água, formando estruturas ramificadas de uma camada externa de um polímero hidrofílico e um polímero hidrofóbico.³⁸

A CMC é o fator que caracteriza a formação de micelas. A organização em bloco anfifílico está diretamente relacionada com este parâmetro, ou seja, as estruturas micelares associam-se espontaneamente, na qual a zona hidrofóbica forma o interior da nanocápsula e serve de reservatório para os fármacos também hidrofóbicos, enquanto que a zona hidrofílica forma o exterior da nanocápsula, estabilizando assim o interior hidrofóbico.³⁷

As micelas poliméricas formadas por copolímeros têm surgido nos últimos 20 anos como DDS promissores, principalmente na área da oncologia, tendo uma vasta aplicação no transporte de material genético, transporte de proteínas e de fármacos hidrofóbicos. Os Poloxâmeros (Polox), um tipo de micelas que têm sido muito utilizadas para fins medicinais, é comercializado com o nome Pluronic® e na sua constituição contêm blocos sintéticos hidrofílicos [Poli(óxido de etileno); PEO] e hidrofóbicos [Poli(óxido de propileno); PPO], apresentando-se em tribloco (Figura 9).^{38,39}

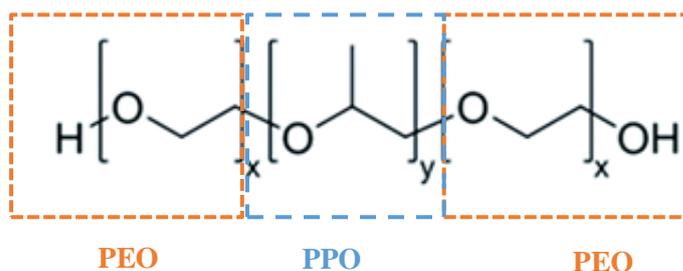


Figura 9. Bloco de copolímero Pluronic®. Adaptado de³⁹

Como já foi referido anteriormente, a micelização deste tipo de partículas ocorre de forma espontânea quando os polímeros são colocados num solvente orgânico, sendo este um método de produção de micelas bastante barato e rápido.⁴⁰

Os sistemas de nanopartículas surgem como os principais candidatos para a vectorização dos fármacos, uma vez que apresentam características vantajosas. As NPs têm um tempo de semivida prolongado e uma degradação moderada, permitindo que o fármaco tenha tempo para alcançar o tecido pretendido. Por outro lado, para a obtenção destas características, existem parâmetros que são fundamentais, tais como o tamanho da partícula, a natureza da superfície, composição dos monómeros bem como o seu peso molecular.^{40,41} Um dos principais objetivos da vectorização dos fármacos é localizar os agentes terapêuticos apenas e só nas células-alvo, eliminando deste modo a toxicidade não específica. Esta vectorização, através destes sistemas, pode ocorrer através de um mecanismo de vectorização passiva ou ativa.

A vectorização passiva ocorre essencialmente em tumores sólidos tirando o máximo de partido do efeito EPR. Este efeito é considerado um ponto fundamental para a terapêutica vectorizada antitumoral, como já foi referido.^{41,42} *Maeda* identificou que existia uma concentração elevada de fatores de permeabilidade vascular (óxido nítrico) e as partículas de baixo peso molecular não ficavam retidas na célula, regressando à corrente sanguínea por difusão passiva (Figura 10).⁴¹

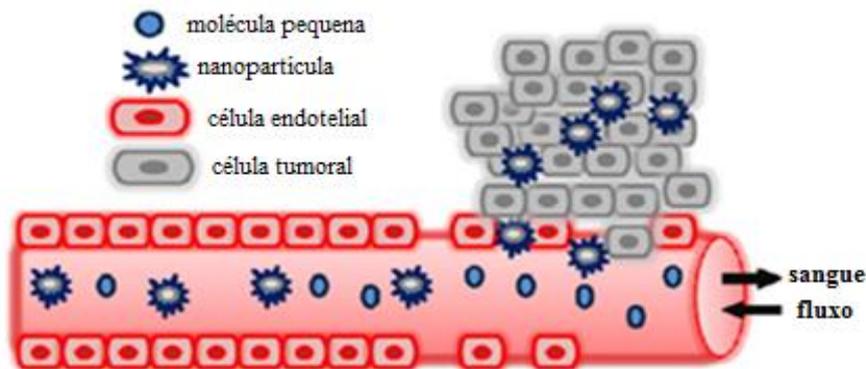


Figura 10. Vectorização passiva mediada pelo efeito EPR. A vasculatura dos tecidos normais é revestida por células endoteliais, impedindo o extravasamento de NPs. Adaptado de⁴¹

O mecanismo de vectorização passiva funciona quando o tamanho e as propriedades da superfície do nanossistema são favoráveis de modo a evitar a ação do sistema fagocitário mononuclear (SFM). Uma superfície hidrofílica nas NPs confere deste modo uma proteção contra a adsorção por parte de proteínas plasmáticas e pode ser conseguida recorrendo a revestimentos de polímeros hidrofílicos, como por exemplo o PEG, polissacáridos ou copolímeros anfifílicos, ramificados ou em bloco. A ligação covalente de copolímeros anfifílicos é geralmente preferencial, pois esta evita a agregação e a dessorção de ligandos quando em contacto com os componentes sanguíneos.⁴³

Uma estratégia alternativa consiste em utilizar as especificidades do microambiente tumoral para desenvolver nanossistemas de profármacos ativados pelo próprio tumor. Estes nanossistemas consistem na conjugação do fármaco com uma molécula tumoral específica, permanecendo inativos de modo a atingir o alvo pretendido.⁴⁴

Um desafio contínuo da medicina e da indústria farmacêutica é aperfeiçoar o desempenho dos fármacos no organismo humano, reduzindo as doses de administração, o nível de toxicidade e os efeitos colaterais, melhorando em grande parte a sua eficiência. Assim torna-se essencial melhorar alguns parâmetros, como por exemplo a solubilidade. Este parâmetro é um fator essencial para a eficiência do fármaco, independentemente da sua via de administração. Estima-se que quase metade dos fármacos falham na sua passagem para as formulações farmacêuticas devido à sua baixa solubilidade em água. O

aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água é, portanto, muito importante para incrementar a taxa de absorção no organismo (biodisponibilidade).⁴⁴

1.4. Enquadramento do presente trabalho

O cancro é considerado a segunda causa de morte a nível mundial, sendo hoje em dia um dos principais fatores de mortalidade. Desta forma, a investigação nesta área continua a procurar formas de otimizar os tratamentos, aliviando os efeitos secundários dos doentes, reduzindo os custos associados e aumentando desta forma o grau de seletividade para que o fármaco seja apenas entregue com exatidão no seu local de ação sem afetar os tecidos saudáveis.^{1,2} As limitações e os efeitos secundários associados ao tratamento recorrendo à quimioterapia conduziu ao aparecimento de novas estratégias, nas quais se combinam diferentes terapêuticas, com mecanismos de ação diferentes, levando a um efeito sinérgico. Esta estratégia permite a administração de uma menor quantidade de fármaco, diminuindo assim os efeitos adversos.

A nanotecnologia tem-se mostrado uma área promissora no desenvolvimento destes novos sistemas de transporte de fármacos tendo, desta forma, efeito sobre a sua biodistribuição. Neste âmbito o Grupo de Química Organometálica da FCUL, onde este trabalho foi realizado, desenvolveu uma nova geração de compostos organometálicos de ruténio e ferro que envolve a introdução de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis.^{21,23} No entanto, apesar dos resultados muito promissores em termos de atividade contra o cancro, estes compostos apresentam a limitação de não serem solúveis em água, o que poderá ser um entrave à sua futura utilização *in vivo*. A utilização de polímeros anfífilos poderá ajudar a ultrapassar este problema devido à possibilidade de formação de sistemas micelares solúveis em água, com a vantagem do fragmento metálico (e citotóxico) se encontrar protegido no centro da micela e poder ser apenas libertado no local-alvo.

Neste contexto, neste trabalho de dissertação, é proposta a síntese de complexos de Fe, Co e Zn contendo ligandos 2,2'-bipiridina e derivados com o objetivo final de obtenção de sistemas micelares em meio aquoso. A razão da escolha daqueles centros metálicos e de um ligando clássico N,N-bidentado deve-se ao facto destes ligandos e respetivos complexos apresentarem grande interesse devido às suas propriedades biológicas, tais como agentes antitumorais, desempenhando também um papel fundamental em atividades antibacterianas.^{45,46} Por exemplo, compostos derivados de ferro, cobalto e zinco com ligandos bidentados têm-se revelado promissores agentes quimioterapêuticos devido aos bons valores de citotoxicidade que apresentam em várias linhas tumorais, como por exemplo para o cancro da mama, cancro do cólon e cancro da

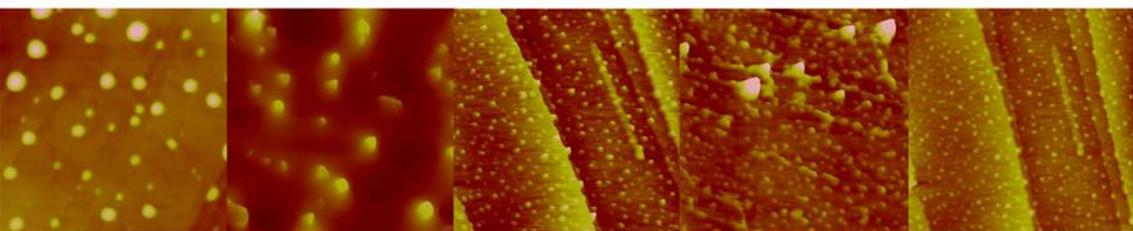
próstata.^{45,47,48} Além disso, a funcionalização adequada da 2,2'-bipiridina permite a formação de macroligandos com as propriedades adequadas para a formação posterior de sistemas micelares. Assim, o trabalho desenvolvido nesta dissertação de mestrado centra-se em três vertentes fundamentais:

- 1) Síntese de (co)polímeros e macroligandos poliméricos (discutida no capítulo 2):
 - a) PLA/bipy-CH₂OH;
 - b) PLA-*b*-PEG;
 - c) PLA/bipy-CH₂OH/D,L-Alanina/PEG;

- 2) Síntese de complexos e sistemas micelares (discutidos no capítulo 3):
 - a) complexos de fórmula geral [M(bipy)₃][PF₆]_x (onde M = Fe, Co e Zn; x = 2 (Fe, Zn) ou x = 3 (Co));
 - b) complexos de fórmula geral [M(bipy-CH₂OH)₃][PF₆]_x (onde M = Fe, Co e Zn; x = 2 (Fe, Zn) ou x = 3 (Co));
 - c) complexos de Fe contendo os ligandos macromoleculares PLA/bipy-CH₂OH e PLA/bipy-CH₂OH/D,L-Alanina/PEG;
 - d) micelas formadas *in situ* a partir da família de complexos [M(bipy)₃][PF₆]_x e do copolímero de PLA-*b*-PEG;
 - e) micelas formadas a partir do complexo de Fe contendo o ligando macromolecular PLA/bipy-CH₂OH/D,L-Alanina/PEG;

- 3) Estudo de estabilidade e atividade biológica (discutidas no capítulo 4):
 - a) complexos de fórmula geral [M(bipy)₃][PF₆]_x (atividade biológica);
 - b) complexos de fórmula geral [M(bipy-CH₂OH)₃][PF₆]_x (estabilidade e atividade biológica);
 - c) complexo de Fe contendo o ligando macromolecular PLA/bipy-CH₂OH (atividade biológica);
 - d) complexos micelares formados *in situ* a partir da família de complexos [M(bipy)₃][PF₆]_x e do copolímero de PLA-*b*-PEG (atividade biológica)
 - e) complexo micelar de Fe contendo o ligando macromolecular PLA/bipy-CH₂OH/D,L-Alanina/PEG (atividade biológica).

Os ligandos e os complexos foram caracterizados através das técnicas espectroscópicas usuais (RMN, FTIR e UV-Vis). As micelas obtidas foram caracterizadas através de microscopia de força atômica (AFM). A estabilidade biológica foi estudada por UV-Vis em solução contendo um meio celular. A atividade biológica foi testada através da determinação dos valores de IC_{50} na linha celular do adenocarcinoma da mama humano (MDAMB231).



Capítulo 2- Síntese e Caracterização de (co)Polímeros e Macroligandos Poliméricos

2.1. Introdução

Os tumores sólidos são geralmente caracterizados por apresentarem uma deficiência nos vasos linfáticos. A ineficiência do sistema linfático, em conjunto com o aumento da permeabilidade da vasculatura do tumor, resulta no efeito EPR. Assim, para retirar o máximo partido deste efeito tornou-se premente a síntese de compostos que apresentassem melhor seletividade para as células tumorais. Neste contexto, os polímeros biocompatíveis e biodegradáveis surgiram como uma boa alternativa. Neste sentido, foram escolhidos dois polímeros para este trabalho. Por um lado, o PLA enquadra-se neste grupo pois não apresenta toxicidade para o organismo. Já existem resultados na literatura neste âmbito, em que a utilização deste polímero acoplado a complexos de ruténio aumenta a internalização do ruténio nas células tumorais.²⁴ Outra propriedade do PLA é que este é metabolizado pelo organismo através de hidrólise, formando assim, o ácido láctico que, por sua vez, irá ser metabolizado via ácido tricarbóxico e posteriormente eliminado como dióxido de carbono pelo sistema respiratório.⁴⁹

O polilactídeo, juntamente com os seus copolímeros, como por exemplo o polilactídeo-*b*-polietilenoglicol (PLA-*b*-PEG), têm sido vistos como potenciais meios de transporte e veiculação de fármacos pois estes aumentam a biodistribuição e a biodisponibilidade do fármaco, uma vez que são solúveis em água e fluidos biológicos. Neste sentido, este trabalho abrangeu também a síntese deste tipo de copolímeros (PLA-*b*-PEG), com objetivo de originar complexos micelares formados *in situ* numa mistura de solvente orgânico e água (complexos **1a**, **2a** e **3a**; capítulo 3), além de complexos micelares contendo este tipo de macroligandos que originam micelas em meio aquoso (complexo **4b**; capítulo 3).

2.1.1. Polimerização por Abertura de Anel (ROP)

A síntese do PLA envolve uma polimerização por abertura de anel, ROP (*Ring Opening Polymerization*). Este tipo de polimerização é geralmente utilizada para a síntese de polímeros de alto peso molecular, permitindo um controlo sobre o processo, variar as propriedades do polímero obtido e, deste modo, ampliar os seus campos de aplicação. A polimerização por abertura de anel foi demonstrada, em 1932, por Wallace Carothers na qual foi possível a obtenção de um polímero com alto peso molecular.⁵⁰

O PLA, considerado um polímero verde, é obtido por polimerização do respetivo dímero cíclico, o lactídeo, que através da abertura do seu anel origina uma bifuncionalidade que, ao reagir com outras unidades monoméricas, forma uma cadeia

polimérica. A polimerização por abertura de anel pode ser classificada tendo em conta os mecanismos da reação e o tipo de iniciador. Desta forma existem três tipos de polimerização: polimerização aniônica, polimerização catiónica e mecanismos de coordenação-inserção.⁵⁰

No nosso caso em particular, a polimerização é catiónica prosseguindo através do mecanismo do monómero ativado pela presença de um catalisador, possibilitando assim a abertura do anel (Figura 11).⁵⁰

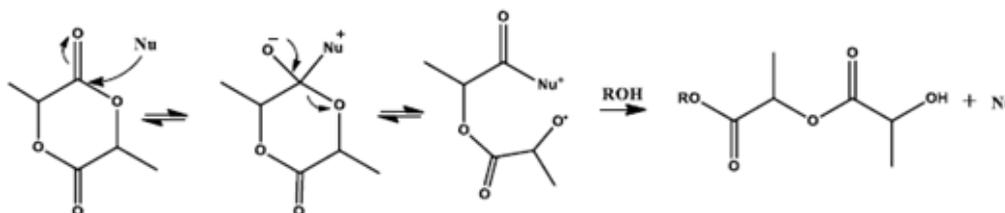


Figura 11. Mecanismo de polimerização via monómero ativado.

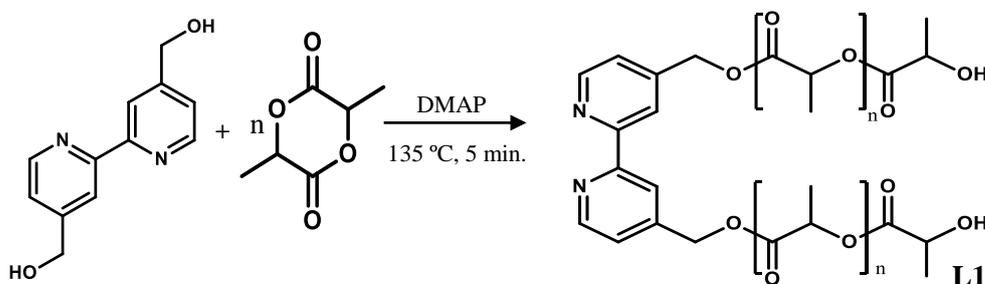
O PEG, na sua forma mais comum, é um poliéster linear ou ramificado com terminação de um grupo hidroxilo. O polietilenoglicol pode ser sintetizado de várias formas a partir do óxido de etileno, geralmente através de um mecanismo de polimerização aniônico por ataque de um íão hidróxido ao anel epóxido.⁵¹ Durante este trabalho recorreu-se à utilização de um PEG comercial.

Para a síntese do polilactídeo utilizou-se como monómero uma mistura racémica de D,L-Lactídeo ($M = 144 \text{ g/mol}$), como catalisador a DMAP (4-dimetilaminopiridina), e como iniciador, a 4,4'-bis(hidroxiometil)-2,2'-bipiridina. Para a síntese dos copolímeros, o iniciador utilizado foi o mPEG (metil(polietilenoglicol)) ($M = 2000 \text{ g/mol}$), resultando na formação de um polímero constituído por dois blocos distintos. Consoante o tempo de reação e a razão entre o monómero/iniciador, foi possível obter cadeias poliméricas de tamanhos diferentes. Desta forma, é possível, à partida, escolher o tamanho da cadeia desejado, o que torna a técnica bastante reproduzível.

2.2. Síntese dos (co)polímeros e macroligandos poliméricos

2.2.1. PLA/bipy-CH₂OH (L1)

Para esta polimerização pretendia-se uma razão de D,L-Lactídeo/iniciador igual a 10, ou seja, 5 unidades de D,L-Lactídeo para cada uma da molécula de bipiridina. A reação de polimerização decorreu a $135 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos (Esquema 1). O tempo e temperaturas reacionais foram selecionadas de acordo com a experiência que o Grupo de Química Organometálica tem neste tipo de polimerizações. Posteriormente foi feito o *quench* da reação utilizando uma mistura metanol:água (1:1). Para finalizar, o polímero foi lavado com éter etílico e seco sob vácuo.

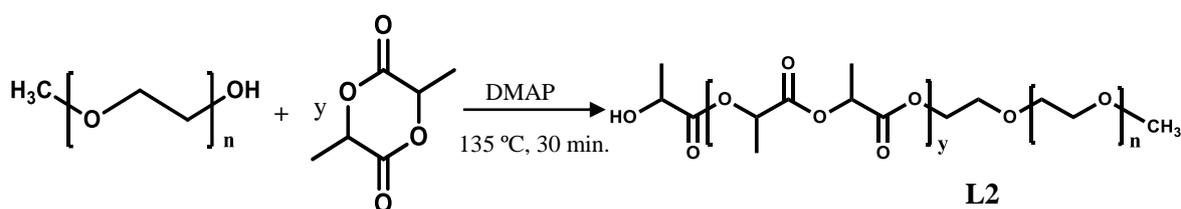


Esquema 1. Esquema da polimerização do D,L-Lactídeo utilizando a DMAP como catalisador e a da 4,4'-bis(hidroxiometil)-2,2'-bipiridina como iniciador, com obtenção de **L1**.

2.2.2. PLA-*b*-PEG (L2)

Com a realização desta polimerização pretendia-se a formação de um copolímero com uma razão D,L-Lactídeo/PEG igual a 5, ou seja, 5 unidades de D,L-Lactídeo por copolímero formado. O iniciador escolhido para esta reação foi o mPEG pois este vai permitir a formação de um copolímero em di-bloco devido à presença do grupo hidroxilo numa das extremidades. A reação de polimerização decorreu a $135 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 30 minutos

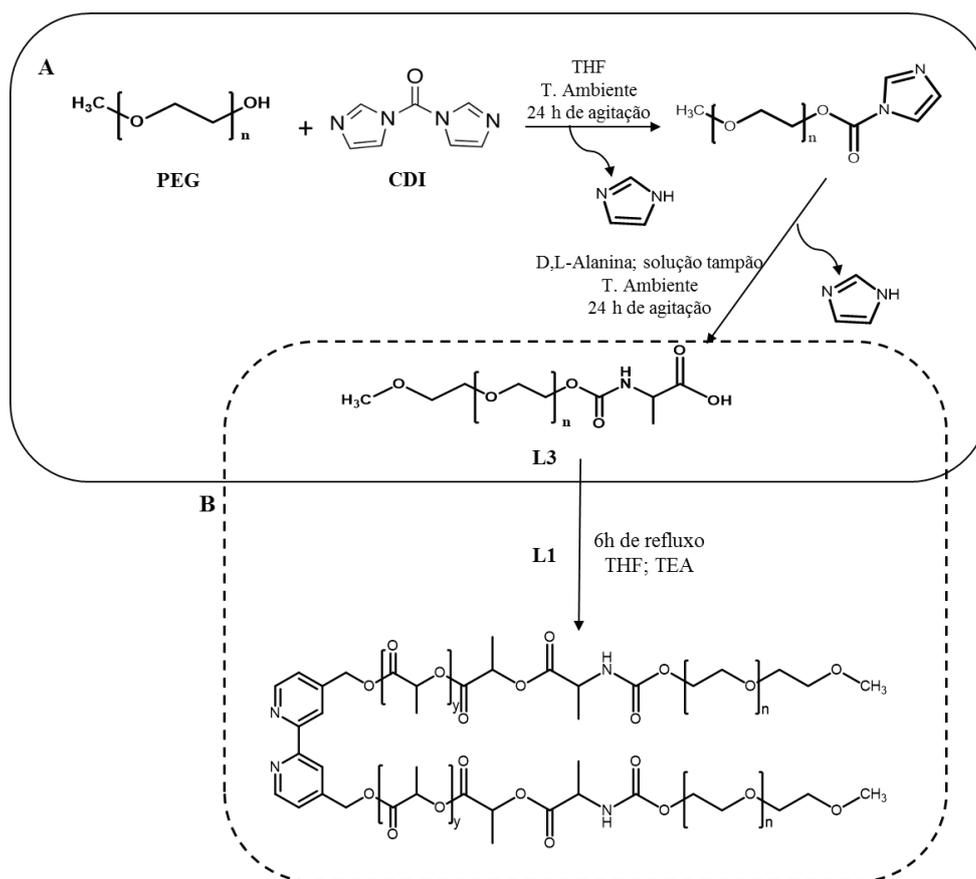
(Esquema 2). Posteriormente realizou-se o *quench* da reação com umas gotas de acetona. Para concluir, o polímero foi lavado com éter etílico e seco sob vácuo.



Esquema 2. Esquema da polimerização do D,L-Lactídeo utilizando a DMAP como catalisador e a do PEG como iniciador, com a obtenção de **L2**.

2.2.3. PLA/bipy-CH₂OH/D,L-Alanina/PEG (**L4**)

Para esta reação pretendia-se a formação de um copolímero funcionalizado com a bipyridina para permitir a coordenação ao centro metálico. Para tal, foi necessário realizar duas reações para alcançar o produto final. Assim, inicialmente utilizou-se o CDI (1,1'-carbonildiimidazole) para ativar o grupo hidroxilo presente na extremidade do mPEG. Foi também utilizado um aminoácido, a D,L- Alanina, de modo a criar uma ligação amida que permitisse a ligação seguinte ao PLA. A reação decorreu durante 48 horas, sob agitação e à temperatura ambiente, obtendo-se o intermediário **L3** (Esquema 3A). Uma reação de esterificação posterior entre o intermediário obtido e o ligando **L1** leva à formação do macroligando **L4** pretendido (Esquema 3B). Desta forma, dissolveu-se o ligando **L1** em tetrahydrofurano (THF) e adicionaram-se 2,5 equivalentes de trietilamina (TEA) de forma a desprotonar o próton ácido da cadeia terminal do ligando **L1**. A reação prosseguiu durante quarenta minutos sob agitação e à temperatura ambiente. Seguidamente adicionaram-se 2 equivalentes de **L3**. A reação decorreu durante seis horas à temperatura de refluxo do THF. De seguida, o solvente foi evaporado e o produto formado lavado duas vezes com água destilada (Esquema 3B). O copolímero foi caracterizado por ¹H-RMN.



Esquema 3. Esquema da reação de esterificação de **L1** com o intermediário **L3**, com a formação de **L4**.

2.3. Caracterização dos (co)polímeros e macroligandos poliméricos

Todos os ligandos foram caracterizados por ^1H -RMN. No caso dos ligandos **L1** e **L2** os estudos foram complementados com FTIR.

2.3.1. Caracterização através de espectroscopia de ^1H -RMN

Como é possível verificar através da figura 12, para o ligando **L1**, podem-se facilmente identificar os prótons correspondentes à cadeia principal de polilactídeo (H8), que apresentam um desvio químico de 5,16 ppm, e o grupo terminal da mesma cadeia (H8'), que apresenta um desvio químico a cerca de 4,36 ppm. Quanto aos prótons correspondentes aos grupos metilo, o sinal correspondente à cadeia principal de polilactídeo (H9) pode ser observado a 1,56 ppm, enquanto que o grupo metilo terminal (H9') apresenta um desvio químico de ~ 1,48 ppm.

Como o iniciador da polimerização foi a 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina observa-se, tal como era esperado, a presença de três sinais correspondentes aos três prótons característicos dos anéis aromáticos da bipiridina (H1, H2, H4 - ver a figura 12)

entre 8,70-7,25 ppm. O próton H6 correspondente ao grupo $-\text{CH}_2$ do ligando aparece sobreposto com o próton $-\text{CH}-$ da cadeia principal do polilactídeo a 5,16 ppm.

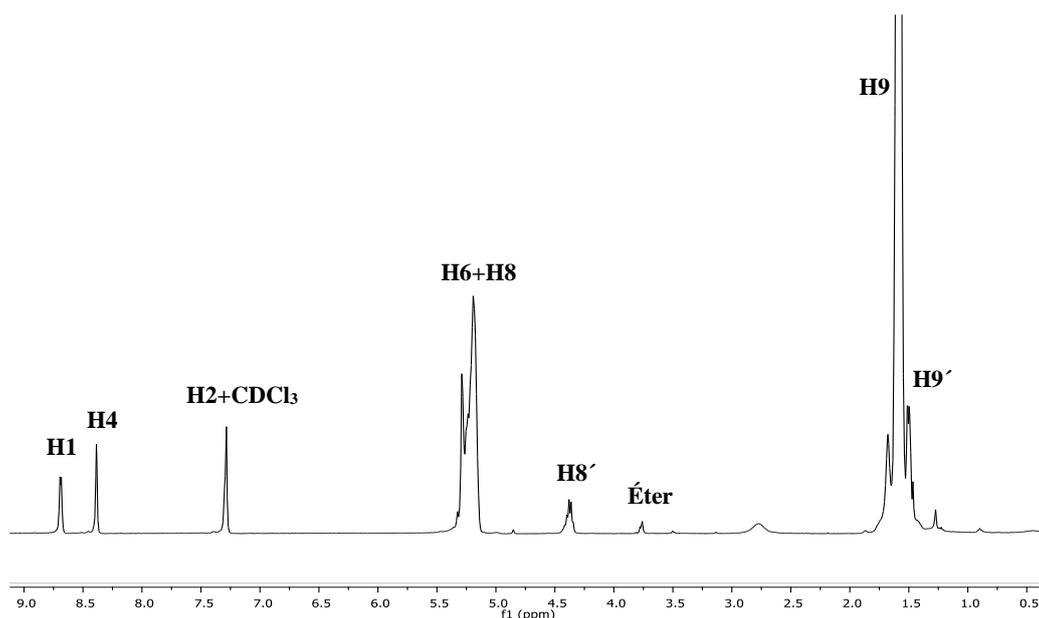


Figura 12. Espectro de ^1H -RMN em CDCl_3 referente ao ligando **L1** com a atribuição dos prótons.

Tal como foi dito anteriormente, o ligando **L1** também foi caracterizado por FTIR. Através da análise do espectro (Anexo 1) verifica-se a presença dos modos vibracionais característicos do PLA, nomeadamente a banda com intensidade forte a $\sim 3487\text{ cm}^{-1}$ devido à presença de um grupo hidroxilo na extremidade da cadeia polimérica e uma banda característica do estiramento $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, também da cadeia polimérica, a $\sim 1753\text{ cm}^{-1}$. A banda presente a $\sim 2962\text{ cm}^{-1}$ é atribuída ao estiramento $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ do anel aromático do iniciador utilizado na polimerização, a 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina.

Para os ligandos **L2** e **L4** os prótons correspondentes à cadeia principal do PLA são facilmente identificados pois apresentam um desvio químico de 5,11 ppm para o ligando **L2** e 5,16 ppm para o ligando **L4** em CDCl_3 (Figura 13). No caso dos prótons H1'+H4' e H8'+H14', que correspondem ao grupo $-\text{CH}-$ terminal do PLA e ao grupo $-\text{CH}_2-$ do PEG, apresentam um desvio químico a 4,28 ppm e a 4,36 ppm, respetivamente. Os prótons da cadeia principal do PEG apresentam um desvio químico de 3,57 ppm para o ligando **L2**, enquanto que para o ligando **L4** se encontra a 3,64 ppm. O grupo $-\text{CH}_3$ presente na extremidade do PEG apresenta um desvio químico 3,31 ppm e 3,37 ppm, para os ligandos **L2** e **L4**, respetivamente.

A principal diferença nestes dois ligandos é o iniciador utilizado na polimerização do lactídeo. No caso do ligando **L2** o iniciador utilizado foi o mPEG, enquanto que na do ligando **L4** o iniciador utilizado foi a 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina, resultando na presença de três sinais no espectro de RMN, nomeadamente um duplete (H1) a 8,67 ppm e dois singletos (H4 e H2) a 8,36 e 7,11 ppm, respetivamente (Figura 13). O protão H12 do grupo -CH₃ do aminoácido utilizado, a D,L-Alanina, apresenta-se sob a forma de duplete a 2,61 ppm. Não foi possível atribuir o protão -CH(CH₃)- (H13) da D,L-Alanina pois este encontra-se possivelmente sobreposto com o protão H9. A atribuição poderia ser confirmada se se realizasse um espectro bidimensional.

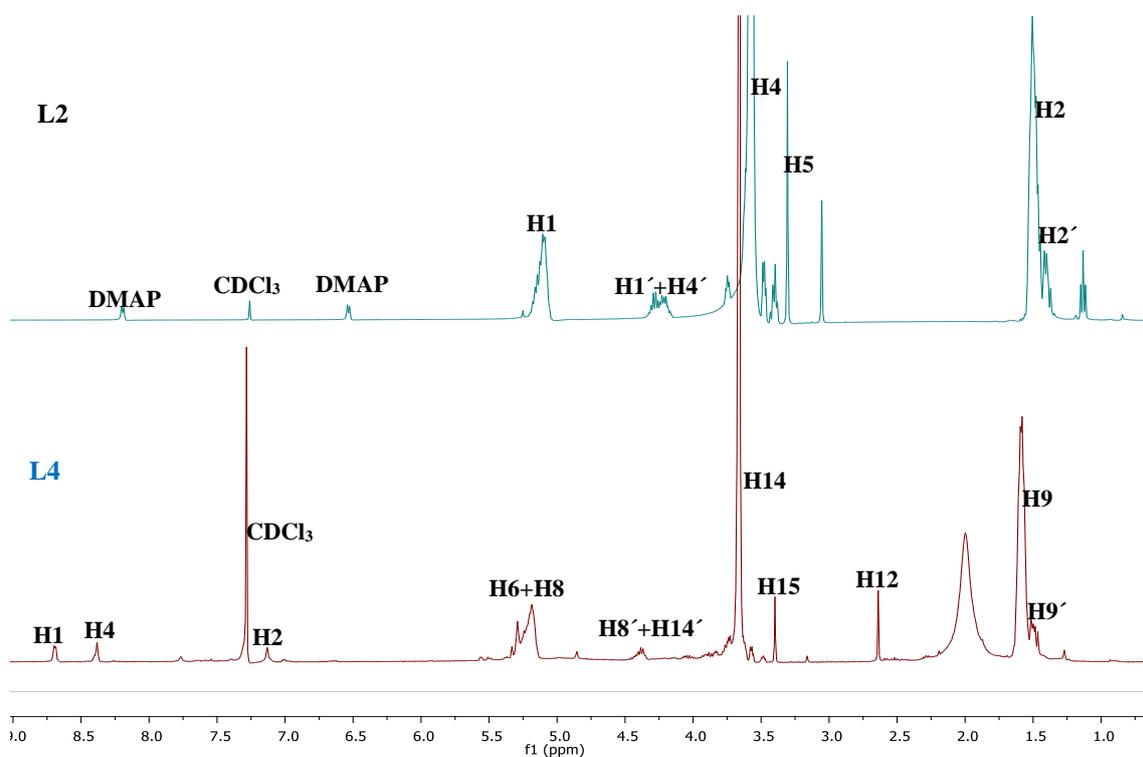


Figura 13. Espectros de ¹H-RMN em CDCl₃ referentes aos ligandos **L2** e **L4** com a atribuição dos prótons.

Como já foi mencionado anteriormente, o ligando **L2** foi também caracterizado por FTIR na qual se verificou a presença de um modo vibracional característico da presença de um grupo hidroxilo a $\sim 3425\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{O-H}}$). Além disso, verifica-se a presença dos modos vibracionais característicos do estiramento $\nu_{\text{C-H}}$ e do estiramento $\nu_{\text{C=O}}$ da cadeia polimérica do PLA a $\sim 2885\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1757\text{ cm}^{-1}$, respetivamente (Anexo 2).

2.3.1.1. Determinação do Grau de Polimerização e da massa molecular

Para a determinação do grau de polimerização (DP) do polilactídeo, a forma mais simples é através da análise do espectro de ^1H -RMN. Tendo como exemplo o ligando **L1**, e sabendo que o próton H8 (5,16 ppm) corresponde à unidade de repetição da cadeia polimérica e que o próton H8' (4,36 ppm) corresponde ao grupo terminal da mesma cadeia, é possível calcular o DP deste macroligando. Desta forma, para o cálculo, basta somar a área do próton H8, pela área do próton H8' e dividir pela área deste último (**Equação 1**).

$$(1) \quad \text{DP}_{\text{exp}} = \frac{A(\text{H8}) + A(\text{H8}')}{A(\text{H8}')} = \frac{19,8 + 2,09}{2,09} = 10,47$$

Desta forma, verifica-se que o ligando **L1** tem um DP total de 10,47 por cada braço da biperidina se considerarmos a unidade de repetição como sendo metade da molécula de D,L-Lactídeo, ou de 5, se considerarmos uma molécula completa de D, L-Lactídeo.

Considerando como unidade de repetição apenas meia molécula, a massa molecular resulta então da multiplicação do DP por 72 g/mol. Este valor tem que ser ainda multiplicado pelo número de cadeias poliméricas, que neste caso, são duas. Ao valor desta multiplicação soma-se a massa molecular do iniciador (4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-biperidina) (**Equação 2**).

$$(2) \quad \begin{aligned} \mathbf{M(\text{macroligando})} &= [(\text{DP} \times 72 \times \text{braços})] + \mathbf{M(\text{iniciador})} \\ &= (10 \times 72 \times 2) + 216,24 \\ &= 1656,24 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

Para a determinação do DP dos copolímeros é necessário recorrer a outra equação para efetuar o seu cálculo.⁵² Tendo como exemplo o ligando **L2**, o próton H1 (5,11 ppm) corresponde à unidade de repetição da cadeia polimérica (PLA) e os prótons H1'+H4' (4,28 ppm) correspondem aos grupos terminais da cadeia de PLA mais o próton da cadeia terminal do mPEG. Assim, usou-se a equação abaixo (**Equação 3**) para calcular o DP deste macroligando:

$$(3) \quad DP_{\text{exp}} = \frac{Ia \times ma' \times na'}{Ia' \times ma} = \frac{7,75 \times 3 \times 1}{2,98 \times 1} = 7,8$$

onde

Ia: integral do sinal CH da cadeia principal PLA (H1)

ma': número de prótons do grupo CH da cadeia terminal PLA mais o número de prótons do grupo CH₂ da cadeia terminal da terminal PEG (número total de prótons desse sinal)

na': número de unidades de repetição desse sinal

Ia': integral do sinal do -CH- do PLA mais o integral do -CH₂ do PEG terminal

ma: número de prótons da cadeia principal do PLA

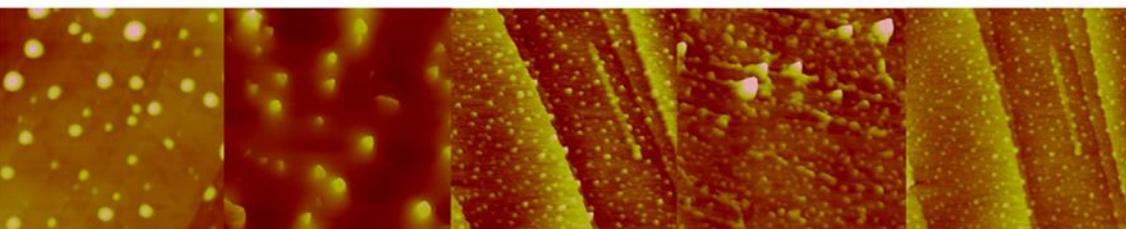
Para a determinação da massa molecular deste macroligando, o cálculo é muito semelhante ao efetuado para o ligando **L1**. Assim, a massa molecular do copolímero resulta da multiplicação do DP por 72 g/mol (metade da massa molecular do D,L-Lactídeo) a que se adiciona a massa molecular do iniciador (mPEG) (**Equação 4**).

$$(4) \quad \begin{aligned} M(\text{macroligando}) &= [(DP \times 72) + M(\text{iniciador})] \\ &= [(7,8 \times 72) + 2000] \\ &= 2561,6 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

Este método foi utilizado para o cálculo do DP e da massa molecular para os ligandos **L1**, **L2** e **L4**. Os valores do grau de polimerização e das massas moleculares de todos os ligandos sintetizados encontram-se compilados na tabela 1.

Tabela 1. Graus de polimerização e massas moleculares de todos os ligandos sintetizados.

Ligando	DP	Massa Molecular (g/mol)
L1	10,47	1656,24
L2	7,80	2561,60
L4	13,01	6127,76



Capítulo 3- Síntese e Caracterização de Complexos

3.1. Introdução

O ferro, o zinco e o cobalto são metais essenciais, desempenhando funções importantes no organismo humano. O ferro é um micronutriente essencial envolvido no transporte de oxigênio e no metabolismo energético, apresentando resultados promissores como agente anticancerígeno. Complexos derivados deste metal exibem uma elevada citotoxicidade para a linha tumoral do cólon humano.⁴⁷

Por outro lado complexos de cobalto têm sido muito estudados na última década devido à sua capacidade oxidativa, preferindo complexos que apresentam estados de oxidação formal +2 e +3. Em particular, os complexos de Co^{III} têm sido promissores devido à alta afinidade dos elétrons no seu estado trivalente e à sua capacidade de se ligar à molécula de DNA.⁵³

Complexos de Co^{II} e Co^{III} com bases de Schiff⁵⁴ têm apresentado valores de citotoxicidade elevados no tratamento do cancro da mama, apresentando a capacidade de inibir o crescimento de tumores primários e de metástases na ordem dos 45-80 % e 65-99%, respetivamente.^{45,55} Por exemplo, um complexo de Co^{II} contendo um derivado de 4-(4-aminofenil)morfolina apresentou atividade citotóxica para a linha tumoral HepG2 (linha celular derivada do carcinoma hepatocelular).⁵⁴ Para finalizar, complexos de zinco também são conhecidos por desempenharem um papel importante no tratamento do cancro da próstata.⁴⁸

Tal como já foi referido anteriormente, a escolha dos ligandos bidentados centra-se nas inúmeras propriedades biológicas que os complexos que contêm este tipo de ligandos apresentam, como por exemplo no papel fundamental que possuem como agentes anticancerígenos e atividade antibacteriana.⁴⁵

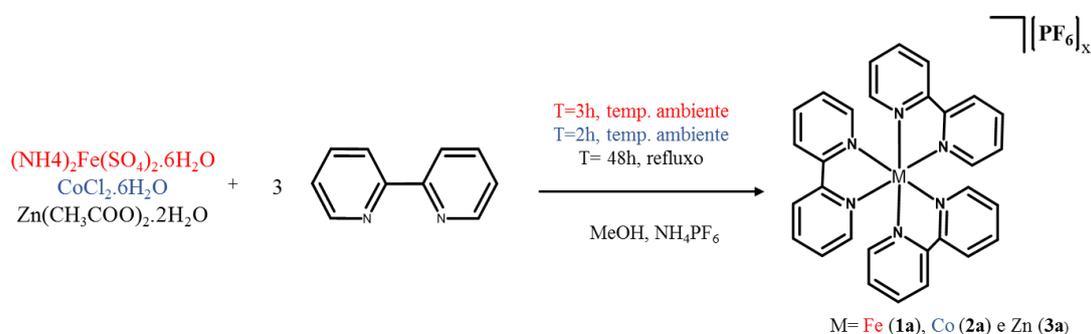
Nesta dissertação de mestrado foram sintetizadas três famílias de complexos. Uma primeira família de fórmula geral $[M(\text{bipy})_3][\text{PF}_6]_x$ (onde M = Fe (**1a**), Co (**2a**) e Zn (**3a**); $x = 2$ (Fe, Zn) ou $x=3$ (Co)); uma segunda de fórmula geral $[M(\text{bipy-CH}_2\text{OH})_3][\text{PF}_6]_x$ (onde M = Fe (**1b**), Co (**2b**) e Zn (**3b**); $x = 2$ (Fe, Zn) ou $x=3$ (Co)); e a terceira constituída por dois complexos de Fe contendo os ligandos macromoleculares **L1** e **L4**, respetivamente, $[\text{FeL1}_3][\text{PF}_6]_2$ (**4a**) e $[\text{FeL4}_3][\text{PF}_6]_2$ (**4b**). Os complexos **1a-3a** deram origem a sistemas micelares formados *in situ* através da sua mistura com o ligando **L2** em solvente orgânico e água. A partir do complexo **4b**, devido ao carácter anfifílico do macroligando, foi possível obter também micelas em solução aquosa. A principal diferença entre as duas famílias de micelas consiste na presença ou ausência de ligação

covalente entre o copolímero e o centro metálico, o que poderá ter influência na estabilidade das micelas formadas.

3.2. Síntese e caracterização dos complexos $[M(\text{bipy})_3][\text{PF}_6]_x$ (**1a-3a**)

Esta família de compostos ($M=\text{Fe}$, $x=2$ (**1a**); $M=\text{Co}$, $x=3$ (**2a**); $M=\text{Zn}$, $x=2$ (**3a**)) foi sintetizada seguindo procedimentos descritos na literatura.⁵⁶⁻⁵⁸

Para a obtenção destes compostos octaédricos foi necessário dissolver o excesso de ligando em metanol e à solução resultante foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Esquema 4). Os procedimentos relativos à síntese destes compostos encontram-se descritos no capítulo 6. Os complexos foram obtidos com rendimentos compreendidos entre 65-97%.



Esquema 4. Esquema reacional para as sínteses dos compostos **1a** a **3a**.

Tal como foi mencionado anteriormente todos estes compostos já se encontram descritos na literatura⁵⁶⁻⁵⁸ e todas as caracterizações feitas coincidem com o que está descrito. Os compostos foram caracterizados por RMN (^1H e ^{31}P), UV-Vis, FTIR e análise elementar que podem comprovar a sua estrutura e pureza. Os resultados da análise elementar encontram-se na secção experimental, no capítulo 6, e são compatíveis com a fórmula utilizada para o seu cálculo, $[\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{MF}_{12}\text{N}_6\text{P}_2]$ ($M = \text{Fe}, \text{Zn}$) e $[\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{MF}_{18}\text{N}_6\text{P}_3]$ ($M = \text{Co}$).

Os espectros de ^1H -RMN confirmam a coordenação dos três ligandos ao centro metálico. Considerando a numeração dada aos prótons (Figura 14), fizeram-se as atribuições, sendo que a informação se encontra compilada na tabela 2. Refira-se que nem todos os compostos obtidos se encontram caracterizados no mesmo solvente, o que não permite a comparação direta entre os três compostos. O composto **2a** foi caracterizado em acetona-*d*6 e os compostos **1a** e **3a** foram caracterizados em metanol-*d*4 devido a questões de solubilidade.

O facto dos centros metálicos dos complexos possuírem configuração eletrónica de valência d^6 (Fe^{II} e Co^{III}) e d^{10} (Zn^{II}) e o ligando poder ser considerado de campo forte (promovendo uma diferença energética HOMO-LUMO que favorece o emparelhamento de eletrões) faz com que todos os complexos formados sejam diamagnéticos. Este facto facilita a interpretação dos espetros de 1H -RMN pois os sinais geralmente são bem definidos. Refira-se ainda que a carga global dos complexos depende do metal, os complexos **1a** e **3a** apresentam carga global $2+$ e o complexo **2a** $3+$.

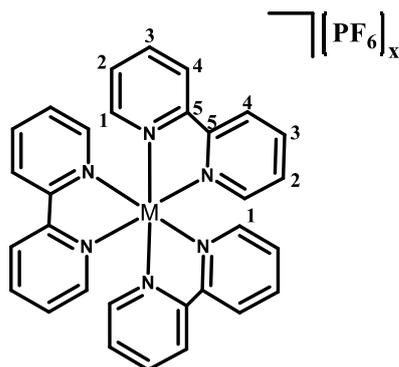
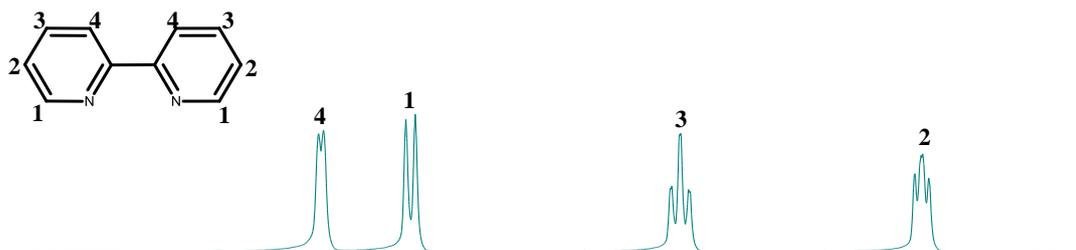


Figura 14. Numeração dos protões e carbonos dos complexos $[M(bipy)_3][PF_6]_x$.

Na figura 15 encontram-se o espetros de 1H -RMN do ligando e do composto **2a**. A análise dos espetros permitiu identificar os sinais correspondentes à 2,2'-bipiridina. Os protões aromáticos presentes no anel aromático do ligando aparecem no espetro de 1H -RMN sob a forma de dois dupletos a 8,68 ppm (H1) e 8,50 ppm (H4) e dois tripletos a 7,92 ppm (H3) e 7,40 ppm (H2). Comparando o espetro do ligando com o espetro do composto formado verifica-se uma desblindagem dos protões H3 (8,66 ppm), H1 (9,05 ppm) e H2 (7,93 ppm) e a blindagem do protão H4 (7,88 ppm).



Composto **2a**

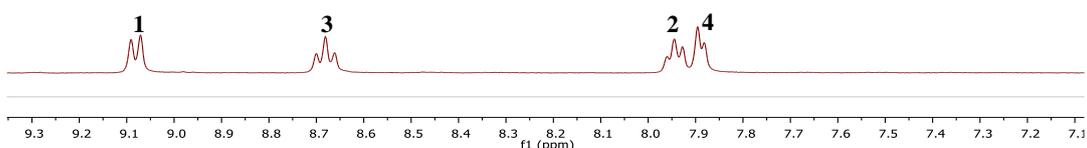


Figura 15. Espetros de ^1H -RMN em acetona- d_6 do ligando 2,2'-bipiridina e do composto **2a**, com a atribuição dos prótons.

Relativamente aos compostos **1a** e **3a** (Anexo 3 e 4), e tendo em conta a atribuição dos prótons segundo a figura 14, a informação dos dados de ^1H -RMN encontra-se também compilada na tabela 2. Verifica-se uma desblindagem do próton H1 nos dois compostos (**1a** e **3a**) relativamente à bipy. Os prótons H2 e H3 desblindaram em ambos os compostos e o próton H4 blindou no composto **1a** e desblindou no composto **3a**.

Tabela 2. Desvios químicos dos prótons (ppm) em acetona- d_6 para o composto **2a** e do ligando (bipy) e em metanol- d_4 para os compostos **1a** e **3a** e do ligando (bipy).

Compostos	Desvio químico δ (ppm)			
	H1	H2	H3	H4
	Acetona- d_6			
bipy	8,50	7,40	7,92	8,68
2a	9,06	7,93	8,66	7,88
	Metanol- d_4			
bipy	8,20	7,39	7,89	8,58
1a	8,75	7,50	8,19	7,50
3a	8,78	7,74	8,27	8,48

Através da análise de todos os espectros pode-se concluir que todos os compostos foram formados, pois através da comparação com o espectro do ligando livre verifica-se a presença de todos os sinais previstos. Verifica-se também a blindagem ou desblindagem de alguns sinais do ligando coordenado em relação aos sinais do ligando livre. As diferenças nos desvios químicos nos prótons da biperidina com a coordenação devem-se à ocorrência de efeitos eletrônicos que podem alterar a densidade eletrônica do ligando. Por um lado, é expectável a ocorrência de uma diminuição da densidade eletrônica dos prótons do ligando como consequência do facto dos complexos formados terem carga positiva. Por outro lado, o efeito indutivo (efeito σ) resultante da coordenação do ligando ao centro metálico provocará uma diminuição da densidade eletrônica dos prótons da biperidina mais próximos do local de coordenação, em particular o próton H1. Por último, a doação de densidade eletrônica do metal para o ligando por efeito da retrodoação π (em particular para o complexo **1a**) poderá originar a blindagem dos prótons da biperidina. As diferenças nos desvios químicos observados será, pois, o resultado da conjugação destes efeitos. Os dados mostram, de facto, uma desblindagem geral dos prótons H1, H2 e H3 para todos os compostos (expectável com base na carga dos complexos e também, no caso do próton H1, com base efeito indutivo), à exceção do próton H4 para **1a** e **2a**. No caso do complexo de zinco (**3a**), a desblindagem de H4, contrariamente a **1a** e **2a** poderá dever-se a uma menor retrodoação π por parte do centro metálico de Zn^{II} , que não é capaz de atenuar a desblindagem verificada, essencialmente pelo efeito da carga do complexo. Para além destes efeitos refira-se ainda a possibilidade de efeitos resultantes de interações entre os ligandos da biperidina na esfera de coordenação dos complexos.

Relativamente aos espectros de ^{31}P -RMN, estes apresentaram o septuplo característico do anião PF_6^- a cerca de -144 ppm para todos os complexos (Anexo 5).

A espectroscopia de UV-Vis, para além de ser mais uma técnica de caracterização de compostos, permite identificar possíveis bandas de transferência de carga que possam ocorrer entre o metal e os ligandos. Assim, um complexo pode absorver radiação resultando numa transferência de carga de um ligando para as orbitais de um centro metálico (bandas designadas LMCT), ou vice-versa (bandas designadas MLCT). Podem ocorrer também transferências de carga intraligando (ILCT), geralmente entre uma orbital não ligante (n) ou ligante (π) e uma orbital antiligante π^* , transições designadas como $n \rightarrow \pi^*$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$, respetivamente. Na tabela 3 encontram-se reunidos os valores de comprimentos de onda e as respetivas absorptividades molares determinadas para os três compostos.

Como as caracterizações para estes três compostos já são conhecidas da literatura⁵⁶⁻⁵⁸, o estudo de UV-Vis foi realizado num único solvente, DMSO, numa gama de concentrações entre 10^{-3} e 10^{-5} M. Na figura 16 estão representados os espectros eletrónicos para os três compostos estudados e o espectro eletrónico do ligando livre nos quais se verificou a presença das bandas $\pi \rightarrow \pi^*$ intensas características do ligando (bipy) entre os 287 nm e os 292 nm. Para além disso, verificou-se ainda no composto **1a** uma banda pouco intensa a 360 nm e uma banda larga composta aparentemente por duas transições eletrónicas, atribuíveis possivelmente a duas MLCT ou, a de menor intensidade, a uma transição essencialmente $d \rightarrow d$ a nível do centro metálico. A existência de uma transição eletrónica atribuível a MLCT apenas no complexo de ferro poderá dever-se a um maior carácter covalente na interação entre o centro metálico e o ligando, ou seja, a HOMO (centrada no metal) e a LUMO (centrada no ligando) terão energias relativamente próximas que favorecem a interação. De facto, sendo este centro metálico mais facilmente oxidável (HOMO de maior energia), torna o complexo mais suscetível a uma transferência eletrónica de baixa energia entre a HOMO e a LUMO. Neste contexto, é expectável que nos complexos de Co^{III} (**2a**) e Zn^{II} (**3a**) a interação entre o metal e o ligando tenha um carácter eletrostático mais pronunciado (HOMO's mais estabilizadas devido ao carácter mais eletrofílico destes centros metálicos), o que desfavorece uma interação adequada entre as HOMO e as LUMO e, conseqüentemente, desfavorecendo uma transferência eletrónica de baixa energia entre o centro metálico e o ligando. A ausência de bandas atribuíveis a transições eletrónicas $d \rightarrow d$ no complexo **3a** explica-se pelo facto das orbitais 3d do centro metálico de Zn^{II} estarem totalmente preenchidas ($3d^{10}$). Não são também observáveis transições eletrónicas $d \rightarrow d$ para o complexo de cobalto (**2a**), provavelmente por serem muito pouco intensas e/ou por ocorrerem a energia muito elevada.

Tabela 3. Dados espectroscópicos de UV-Vis do ligando livre e dos compostos **1a-3a**, em DMSO.

Compostos	λ (nm) ($\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)			
bipy	286 (15944)			
1a	292 (33832)	360 (sh)	491 (sh)	534 (4553)
2a	288 (12977)	-	-	-
3a	287 (10429)	-	-	-

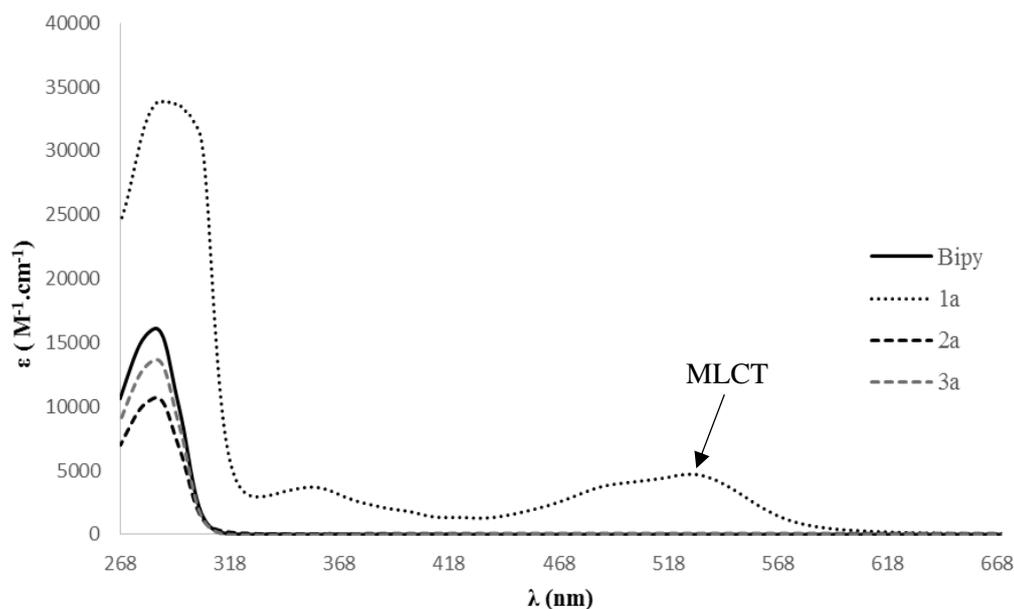


Figura 16. Espectros eletrônicos do ligando livre e dos compostos **1a**, **2a** e **3a** em DMSO.

Através da análise dos espectros de FTIR verifica-se a existência de bandas que comprovam mais uma vez a presença de modos vibracionais característicos dos compostos. Por exemplo, no caso do composto **1a** verifica-se, nomeadamente, a presença de uma banda a $\sim 1606\text{ cm}^{-1}$ correspondente do estiramento $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ do anel aromático da bipy e duas bandas a $\sim 557\text{ cm}^{-1}$ e a $\sim 835\text{ cm}^{-1}$ características do estiramento $\nu_{\text{P-F}}$ do contra-íão, PF_6^- (Anexo 6). Os espectros de FTIR para os compostos **2a** e **3a** encontram-se em anexo (Anexo 7 e 8, respetivamente), nos quais também se verifica a existência de bandas que comprovam a presença de modos vibracionais característicos destes compostos.

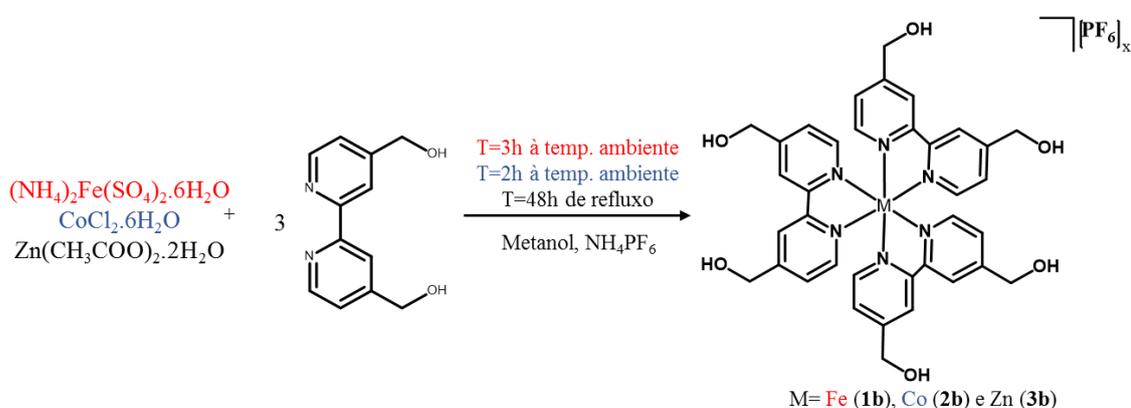
Todas estas caracterizações realizadas para estes três compostos estão de acordo com as caracterizações já publicadas na literatura.⁵⁶⁻⁵⁸

3.3. Síntese e caracterização dos complexos $[\text{M}(\text{bipy-CH}_2\text{OH})_3][\text{PF}_6]_x$ (**1b-3b**)

Para a obtenção desta família de compostos ($\text{M}=\text{Fe}$, $x = 2$ (**1b**); $\text{M}=\text{Co}$, $x = 3$ (**2b**); $\text{M}=\text{Zn}$, $x=2$ (**3b**)) recorreu-se parcialmente ao mesmo procedimento experimental usado para as sínteses dos compostos **1a-3a** descritos anteriormente, sendo que as principais diferenças se encontram no ligando utilizado e no método de purificação dos produtos finais para os complexos de ferro e cobalto, uma vez que o complexo de zinco já se encontra publicado na literatura.⁵⁸

Esta família de compostos foi sintetizada a partir do ligando 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina (bipy-CH₂OH), levando assim à formação de dois novos complexos, com dois metais de transição diferentes (ferro, cobalto), para além do complexo de zinco já reportado na literatura.

Para a obtenção dos compostos foi necessário dissolver o ligando, bipy-CH₂OH, em metanol. Posteriormente adicionou-se à mistura o outro reagente da reação, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, para a obtenção do composto **1b**, CoCl₂·6H₂O para a obtenção do composto **2b** e Zn(CH₃COO)₂·2H₂O para a obtenção do composto **3b** (Esquema 5). Os detalhes experimentais para a obtenção destes três compostos encontram-se na secção experimental, capítulo 6. Os rendimentos das reações descritas variam entre 43 e os 58 %, um pouco inferiores em relação aos compostos **1a-3a**.



Esquema 5. Esquema reacional para as sínteses dos complexos **1b** a **3b**.

Para a caracterização desta família de complexos foram utilizadas técnicas analíticas, tais como, UV-Vis, FTIR e análise elementar. Como os compostos **1b** e **2b** não se encontram publicados na literatura, a caracterização foi complementada com RMN (¹H, ¹³C e ³¹P, assim como técnicas bidimensionais). Embora já reportado na literatura⁵⁸, procedeu-se também à caracterização do composto **3b**. Os resultados da análise elementar dos compostos encontram-se no capítulo 6, sendo compatíveis com as fórmulas utilizadas para o seu cálculo, C₃₆H₃₆F₁₂MN₆O₆P₂ para M = Fe, Zn e C₃₆H₃₆F₁₈MN₆O₆P₃ para M=Co.

A observação dos espectros de RMN efetuados veio confirmar a coordenação do ligando ao centro metálico. Assim, considerando a numeração dada aos protões e aos carbonos, foram feitas as atribuições que estão apresentadas nas tabelas 4-7. A atribuição foi feita de acordo com a numeração dos átomos que consta na figura 17.

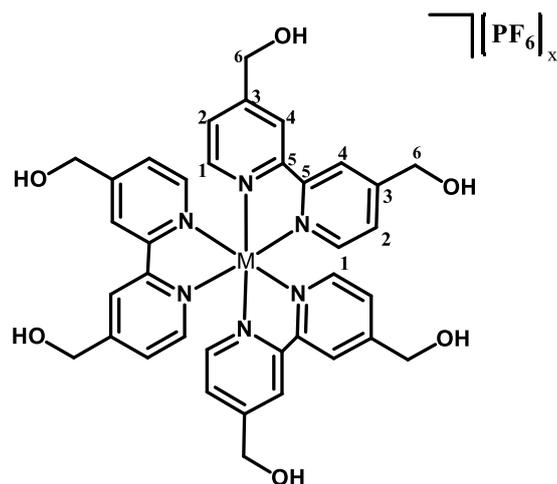


Figura 17. Numeração dos prótons e carbonos dos complexos com fórmula geral $[M(\text{bipy-CH}_2\text{OH})_3][\text{PF}_6]_x$.

De modo a confirmar a estrutura do produto final comparou-se este com o ligando livre utilizado para a reação. Comparando o espectro do ligando com o espectro do composto **2b** (Figura 18), o próton aromático H1 blindou com a coordenação ao metal, enquanto que os prótons H2, H4 e H6 sofreram uma desblindagem.

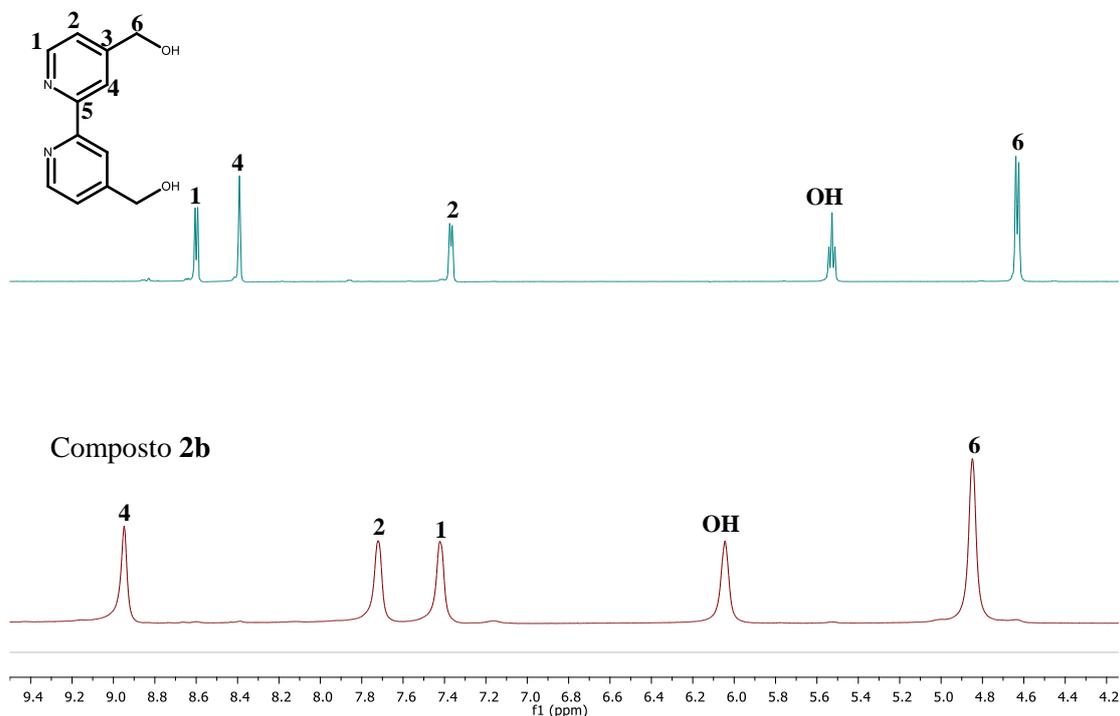


Figura 18. Espectros de $^1\text{H-RMN}$ em $\text{DMSO-}d_6$ do ligando 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina e do composto **2b**, com a atribuição dos prótons.

Tabela 4. Desvios químicos dos prótons principais (ppm) em acetona-*d*6, DMSO-*d*6 e metanol-*d*4 para os compostos **1b- 3b** e do ligando (bipy-CH₂OH).

Composto	Desvio químico δ (ppm)			
	Acetona- <i>d</i> 6			
	H1	H2	H4	H6
bipy-CH₂OH	8,60	7,40	8,50	4,79
1b	7,65	7,54	8,77	4,92
	DMSO- <i>d</i> 6			
	H1	H2	H4	H6
bipy-CH₂OH	8,60	7,37	8,39	4,63
2b	7,42	7,70	8,94	4,85
	Metanol- <i>d</i> 4			
	H1	H2	H4	H6
bipy-CH₂OH	8,61	7,47	8,25	4,92
3b	7,99	7,64	8,63	4,93

Através da análise de todos os espectros de ¹H-RMN conclui-se que todos os complexos foram formados, pois através da comparação com o espectro do ligando livre verifica-se a presença de todos os sinais previstos. Verifica-se também que ocorre a desblindagem e a blindagem de alguns sinais do ligando livre em relação aos sinais do ligando coordenado. Tal como já foi referido anteriormente as diferenças dos desvios químicos nos prótons do ligando com a coordenação devem-se à ocorrência de efeitos eletrónicos que podem alterar a densidade eletrónica do ligando.

Não sendo possível comparar diretamente os três complexos a nível do efeito da coordenação nos desvios químicos dos prótons, uma vez que foram caracterizados em solventes diferentes devido a questões de solubilidade, pode-se, contudo, observar tendências gerais. De um modo geral verifica-se para os três complexos uma blindagem do próton H1, que em parte poderá ser explicada pela doação de densidade eletrónica do metal para o ligando por efeito de retrodoação π (em particular para o Fe, sendo o centro metálico mais oxidável e, portanto, com um efeito de retrodoação π mais pronunciado). Não se excluem também efeitos resultantes da interação entre os ligandos na esfera de coordenação do centro metálico. O mesmo não se verificou para os prótons H2, H4 e H6 em que desblindaram em todos os complexos, o que é expectável pela diminuição da densidade eletrónica destes prótons do ligando como consequência do facto dos

complexos apresentarem carga positiva. Os espectros de ^1H -RMN dos compostos **1b** e **3b** encontram-se em anexo (Anexo 9 e 10, respectivamente).

Os espectros de ^{13}C -RMN dos complexos **1b**, **2b** e **3b** são muito semelhantes entre si no qual se verifica a presença de todos os sinais previstos. A análise dos espectros bidimensionais permitiu atribuir os sinais respectivos. Os espectros de HSQC e HMBC para os complexos de ferro, cobalto e zinco encontram-se em anexo (Anexos 11-16).

Em suma, analisando os espectros dos três compostos verifica-se a existência de todos os sinais expectáveis, comprovando assim as estruturas dos compostos em análise.

Tabela 5. Desvios químicos dos carbonos (ppm) em acetona-*d*₆ para o composto **1b**.

Composto 1b

Desvio químico δ (ppm); ^{13}C	HSQC ^1H	HMBC ^1H	Atribuição
62	4,92	8,77; 7,54; 4,92	C6
121	8,77	7,54; 4,92	C4
125	7,54	8,77; 7,65; 4,92	C2
154	7,65	7,54; 4,92	C1
156	-	7,65	C3
160	-	8,77; 7,65; 4,92	C5

Tabela 6. Desvios químicos dos carbonos (ppm) em DMSO- *d*₆ para o composto **2b**.

Composto 2b

Desvio químico δ (ppm); ^{13}C	HSQC ^1H	HMBC ^1H	Atribuição
60	4,85	8,75; 7,72; 7,42; 6,04	C6
123	8,95	7,72; 4,85	C4
127	7,70	8,75; 7,42; 4,85	C2
150	7,42	7,72	C1
154	-	8,95; 7,42	C5
160	-	7,42; 6,04; 4,85	C3

Tabela 7. Desvios químicos dos carbonos (ppm) em metanol-*d*4 para o composto **3b**.

Composto 3b

Desvio químico δ (ppm); ^{13}C	HSQC ^1H	HMBC ^1H	Atribuição
63	4,92	8,63; 7,64	C6
121	8,63	7,64; 4,92	C4
125	7,64	8,63; 7,99; 4,92	C2
148	7,99	-	C1
150	-	8,63; 7,64	C5
159	-	7,99; 4,92	C3

As bandas nos espectros de UV-Vis de compostos metálicos podem ser afetadas pelo solvente em que são feitas as soluções, efeito designado por solvatacristo. Consoante o solvente, as bandas podem sofrer alterações na posição, forma e intensidade. Os espectros de absorção desta família de compostos foram traçados em soluções de DMSO e metanol, na gama de concentrações 10^{-3} - 10^{-5} M (Tabela 8). Estes solventes apresentam polaridades distintas ($\mu_{\text{DMSO}} = 3,96$ D; $\mu_{\text{MeOH}} = 1,70$ D), o que poderá servir para avaliar possíveis efeitos solvatocrômicos.

Como é possível verificar através dos espectros em DMSO (Figura 19), estes são relativamente semelhantes aos obtidos para os complexos **1a-3a** no mesmo solvente. Os três complexos apresentam uma banda intensa na região do ultravioleta (*ca* 290 nm), atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ que ocorrem nos ligandos coordenados, por comparação com a banda observada no espectro do ligando livre.

Para além da transição característica do ligando, verificou-se para o composto **1b** uma banda larga composta aparentemente por duas transições eletrónicas, atribuíveis possivelmente a duas MLCT ou, relativamente à menos intensa, a uma transição $d \rightarrow d$ a nível do centro metálico. Tal como se verificou para o complexo **1a**, a existência de uma transição eletrónica MLCT poderá dever-se ao maior carácter covalente na interação entre o centro metálico e o ligando neste complexo, ou seja, a HOMO (centrada no metal) e a LUMO (centrada no ligando) terão energias relativamente próximas que favorecem a interação e a suscetibilidade de uma transferência eletrónica de baixa energia entre a HOMO e a LUMO. Por contraponto, é esperado que nos complexos de Co^{III} (**2b**) e Zn^{II}

(**3b**), tal como para **2a** e **3a**, a interação entre o metal e o ligando apresenta um carácter electrostático mais pronunciado, o que vai desfavorecer uma interação adequada entre aquelas orbitais e dificultar uma possível transferência eletrónica de baixa energia. Refira-se, a este respeito, que o complexo **2b** apresenta uma banda a 317 nm que poderá dever-se, de facto, a uma transição eletrónica que envolva o centro metálico.

Como foi referido anteriormente, a ausência de bandas atribuíveis às transições eletrónicas $d \rightarrow d$ no complexo **3b** é explicado pelo facto das orbitais 3d do centro metálico de Zn^{II} se encontrarem totalmente preenchidas ($3d^{10}$). Contudo, para o complexo **2b** verifica-se uma banda muito pouco intensa a 468 nm, provavelmente atribuída a uma transição deste tipo. Por último, refira-se que não se observam diferenças significativas na energia das bandas MLCT para os dois complexos de ferro estudados (**1a** e **1b**).

A figura 20 mostra a caracterização do complexo **1b** nos dois solventes usados. Verifica-se que os espectros são relativamente semelhantes não ocorrendo diferenças apreciáveis nas energias das transições eletrónicas, em particular para a MLCT, expectavelmente a mais sensível ao efeito da polaridade dos solventes, pelo que o efeito solvatocrómico para este complexo não é pronunciado.

Tabela 8. Dados espectroscópicos de UV-Vis dos complexos **1b**, **2b** e **3b** em DMSO e metanol.

Complexo	λ (nm) (ϵ M ⁻¹ cm ⁻¹)			
	DMSO			
bipy-CH₂OH	282 (14223)	-	-	-
1b	295 (37831)	360 (sh)	488 (sh)	537 (4608)
2b	287 (25677)	317 (23696)	468 (54)	-
3b	288 (17986)	-	-	-
	Metanol			
1b	300 (53072)	357 (sh)	490 (sh)	531 (8646)
2b	250 (sh)	306 (25579)	-	-

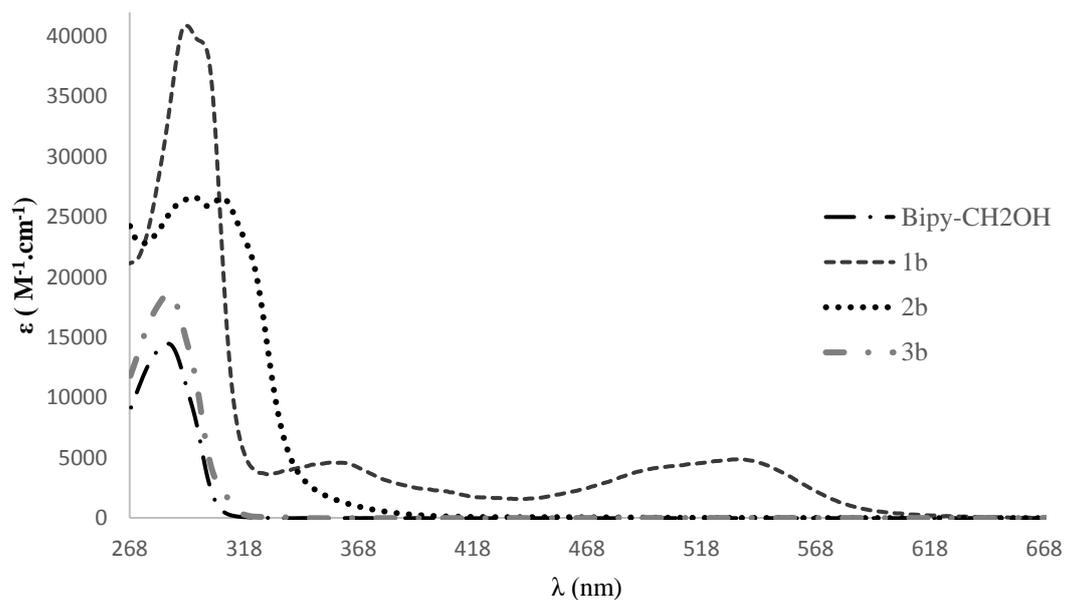


Figura 19. Espectro eletrônico do ligando livre e dos complexos **1b**, **2b** e **3b** em DMSO.

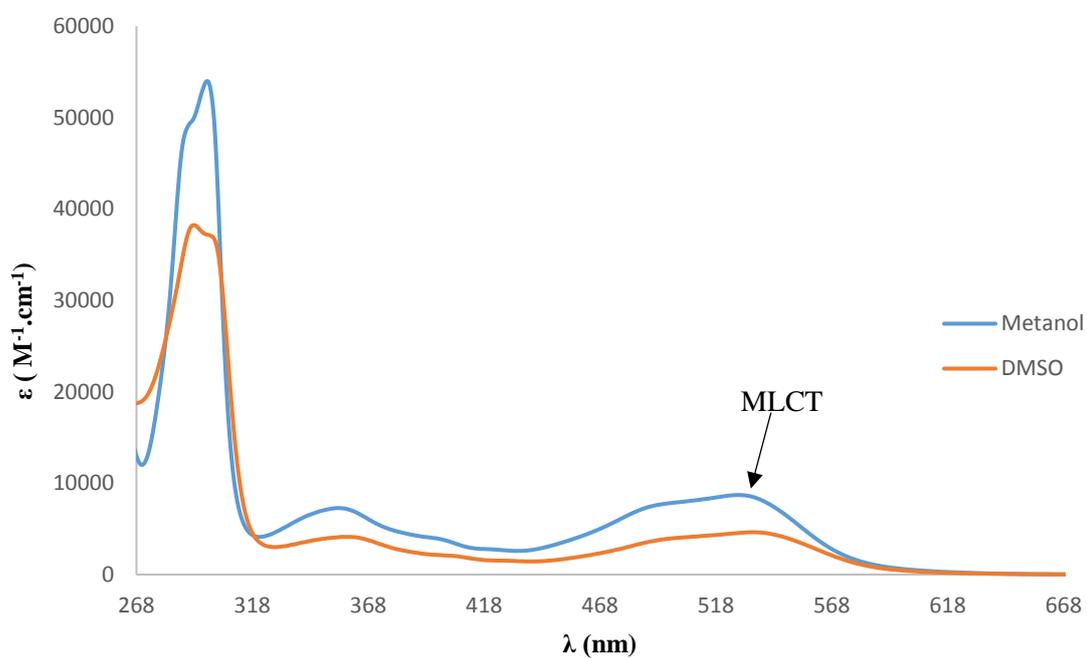


Figura 20. Espectro eletrônico do complexo **1b** em DMSO e metanol.

Através da análise do espectro de FTIR, verifica-se a existência de bandas que comprovam a existência de modos vibracionais característicos dos complexos em causa. Em todos os complexos, verifica-se uma banda característica da existência do grupo hidroxilo presente no ligando a $\sim 3290\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{O-H}}$) e uma banda a $\sim 1618\text{ cm}^{-1}$ pertencente ao estiramento $\nu_{\text{C=C}}$ do anel aromático do ligando. Observa-se ainda a presença do contra-íão, PF_6^- pelo aparecimento de duas bandas a $\sim 842\text{ cm}^{-1}$ e a $\sim 559\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{P-F}}$) em todos os complexos pertencentes a esta família. Para o complexo **3b** verifica-se ainda a presença de uma banda a 2906 cm^{-1} correspondente ao estiramento $\nu_{\text{C-H}}$ do anel aromático do ligando (Anexos 17, 18 e 19). Esta banda aparece unicamente para este complexo.

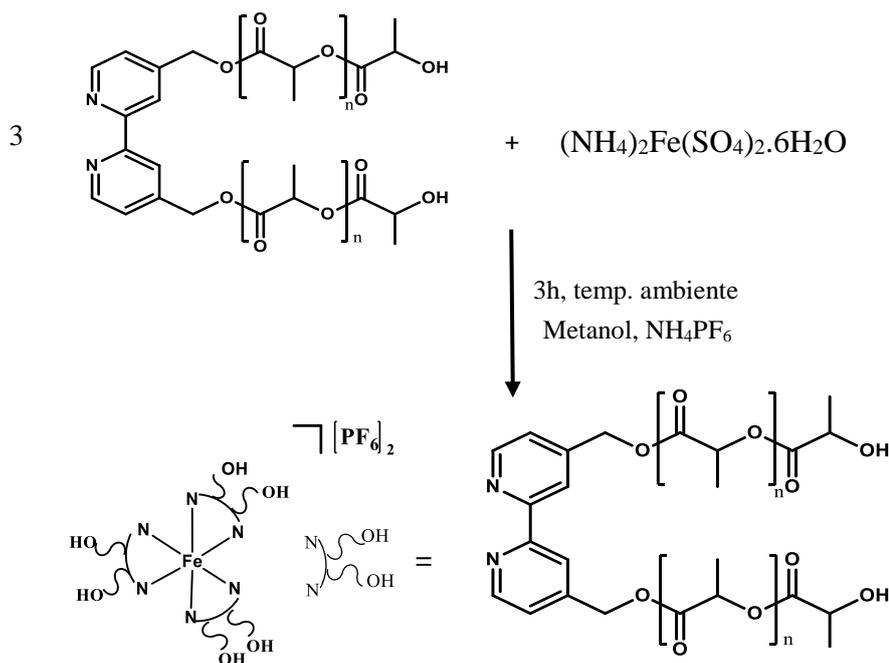
Todas as caracterizações realizadas confirmam as estruturas desta segunda família de compostos, mas é de realçar a diferença que o complexo de ferro exhibe na caracterização UV-Vis devido à presença, pelo menos, de uma banda MLCT, o que difere em relação aos outros compostos estudados de cobalto e zinco.

3.4. Síntese e caracterização dos complexos macromoleculares

Nesta dissertação de mestrado foram sintetizados dois novos complexos de ferro, um deles contendo o ligando **L1** (complexo **4a**) e o outro contendo o ligando **L4** (complexo **4b**). Selecionou-se o ferro para a síntese destes complexos macromoleculares pois, tendo em conta as sínteses realizadas anteriormente com o este metal, apresentavam melhores rendimentos, maior simplicidade e eram menos morosas relativamente às reações com o cobalto e o zinco. No entanto, de futuro pretendem-se sintetizar os complexos homólogos de cobalto e zinco.

3.4.1. Síntese e caracterização do complexo $[\text{Fe}(\text{L1})_3][\text{PF}_6]_2$ (**4a**)

Este complexo foi sintetizado seguindo o mesmo procedimento dos complexos **1a** e **1b**, sendo que a principal diferença se encontra no método de purificação. Para a obtenção deste complexo macromolecular foi necessário realizar primeiro uma reação de polimerização de modo a obter a bipyridina funcionalizada com o PLA (ligando **L1**), cuja descrição da síntese se encontra descrita no capítulo 2. O complexo foi obtido fazendo reagir $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e o ligando **L1** na presença de um excesso de NH_4PF_6 , com um rendimento de cerca de 32 % (Esquema 6).



Esquema 6. Esquema reacional para a obtenção do complexo **4a**.

A caracterização deste complexo foi feita recorrendo às várias técnicas analíticas, nomeadamente RMN (^1H e ^{31}P), UV-Vis e FTIR, tal como foi havia sido já realizado para os complexos descritos anteriormente.

Através da análise do espectro de ^1H -RMN confirmou-se a coordenação do ligando **L1** ao centro metálico de ferro. Assim, considerando a numeração dos prótons da bipyridina e da cadeia polimérica de PLA (Figura 21) foram feitas as atribuições que se encontram compiladas na tabela 9.

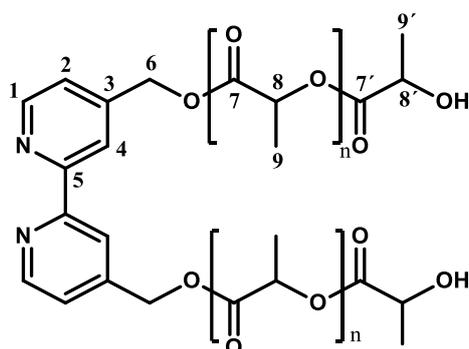


Figura 21. Numeração dos prótons e dos carbonos do ligando no complexo **4a**.

Tabela 9. Desvios químicos dos prótons principais (ppm) em CDCl₃ para o ligando livre **L1** e para o composto **4a**.

Composto	Desvio químico δ (ppm)							
	H1	H2	H4	H6	H8	H8'	H9	H9'
L1	8,67	7,26	8,35	5,16	5,16	4,36	1,56	1,48
4a	8,41	7,41	7,41	5,16	5,16	4,34	1,54	1,54

Através da análise do espectro do composto **4a** (Anexo 20) verifica-se a presença de todos os sinais correspondentes à biperidina (H1, H2, H4) na zona dos aromáticos. O sinal de $-\text{CH}_2$ da biperidina surge a 5,16 ppm juntamente com o $-\text{CH}-$ da cadeia principal da cadeia polimérica de PLA (H6+H8). O próton H8' corresponde ao grupo $-\text{CH}-$ da cadeia terminal do PLA e exibe um sinal a 4,34 ppm e, para terminar, os prótons H9+H9', pertencentes aos grupos $-\text{CH}_3-$ da cadeia polimérica, aparecem a 1,54 ppm.

Os dados para os prótons da biperidina mostram uma blindagem de H1 e H4 e uma desblindagem de H2 com a coordenação ao centro metálico. A blindagem de H1 e H4 poderá dever-se, em parte, ao efeito de retrodoação π e a possíveis interações entre os ligandos na esfera de coordenação do centro metálico. Não se verificam diferenças significativas nos desvios químicos dos prótons da cadeia polimérica, expectáveis tendo por base a distância ao centro metálico. Relativamente ao espectro ^{31}P -RMN, este apresentou um septupeto característico do anião PF_6^- a -144,3 ppm.

Através da análise do espectro de ^1H -RMN é possível chegar a uma estimativa da massa molecular do composto macromolecular, utilizando uma fórmula muito semelhante à utilizada no capítulo 2 para a determinação da massa molecular dos vários ligandos sintetizados. Assim, tendo em conta que o grau de polimerização do polímero utilizado para a reação foi igual a 6 e a massa molecular da unidade de repetição do PLA é 72 g/mol, a massa molecular deste complexo macromolecular pode ser determinada através da seguinte equação:

$$\begin{aligned}
 (5) \quad M(4a) &= [(\text{DP} \times 72 \times \text{braços})] + 3 \times M(\text{iniciador}) + M(\text{Ferro}) + 2 \times M(\text{PF}_6^-) \\
 &= 2592 + 648,72 + 55,85 + 289,82 \\
 &= 3586,39 \text{ g/mol}
 \end{aligned}$$

Os espectros de UV-Vis deste complexo macromolecular foram realizados em DMSO, numa gama de concentrações 10^{-3} - 10^{-5} M. O espectro obtido (Figura 22) é semelhante ao verificado para os restantes compostos de Fe sintetizados neste trabalho. Verifica-se, assim, a existência de uma banda intensa na região do ultravioleta, atribuída a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ da bipyridina, a 315 nm. A cadeia polimérica de PLA também absorve na região do ultravioleta.²⁹ Adicionalmente é visível a existência de um ombro na região do ultravioleta a 361 nm e uma banda larga composta na região do visível constituída, pelo menos, por duas transições eletrónicas, compatível com bandas características de transferência de carga que envolvem o centro metálico que neste caso, se deduz que possam ser do tipo MLCT e uma eventual transição $d \rightarrow d$.

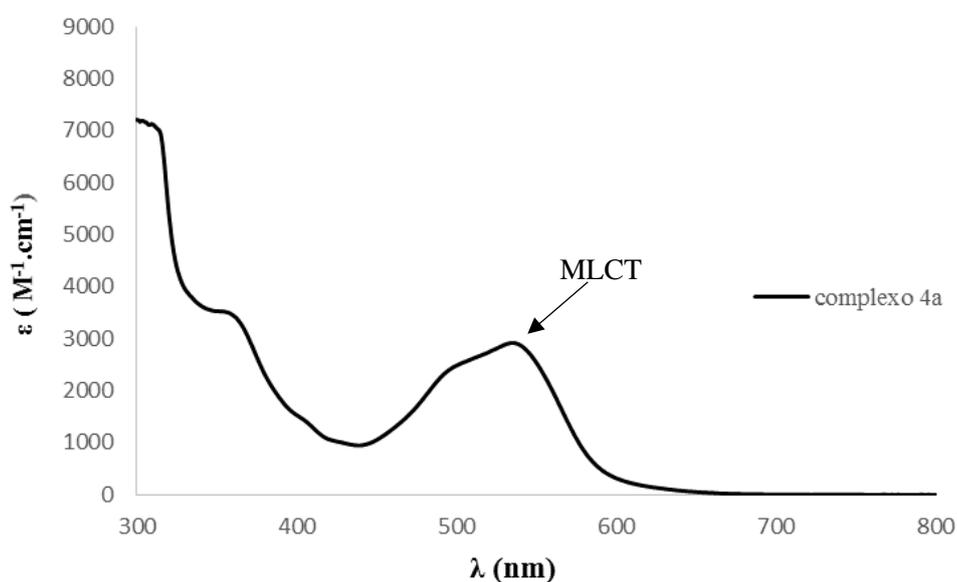


Figura 22. Espectro eletrónico do complexo **4a** em DMSO.

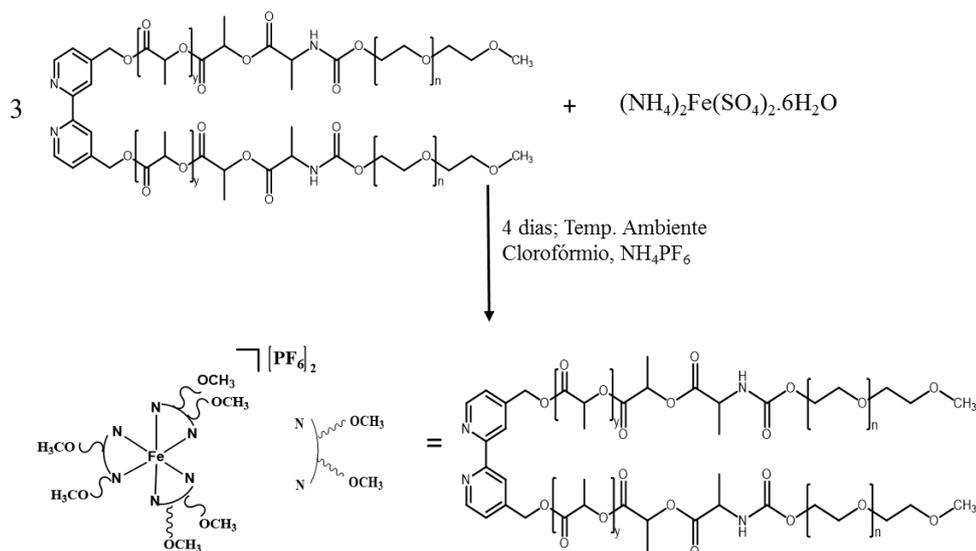
Relativamente ao espectro de FTIR, verifica-se a existência de bandas que comprovam a existência de modos vibracionais do complexo em causa (**4a**). Assim, o espectro exibe uma banda intensa característica da existência do grupo hidroxilo presente na cadeia principal de PLA a $\sim 3417 \text{ cm}^{-1}$ (ν_{O-H}) e uma banda a $\sim 2997 \text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento ν_{C-H} do anel aromático da bipyridina. Observa-se também uma banda característica do estiramento $\nu_{C=O}$ da cadeia polimérica a $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ e ainda a presença do contra-íão, PF_6^- pelo aparecimento de duas bandas a $\sim 846 \text{ cm}^{-1}$ e a $\sim 559 \text{ cm}^{-1}$ (Anexo 21).

3.4.2. Síntese e caracterização do complexo $[\text{Fe}(\text{L4})_3][\text{PF}_6]_2$ (**4b**)

Para a obtenção deste complexo macromolecular foi necessário realizar primeiramente uma reação de modo a obter o ligando **L4**, cuja síntese se encontra descrita no capítulo 2 (Esquema 3B).

O complexo **4b** foi obtido através de uma reação entre o ligando **L4** e $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em metanol. A caracterização deste complexo foi feita através de ^1H -RMN no qual se verificou que o PEG não se encontrava muito bem definido e apresentava valores de integração não compatíveis com a sua massa molecular (2000 g/mol). Pensou-se por isso que o solvente utilizado pudesse estar a degradar o mPEG.

A solução para este problema passou pela realização da mesma reação num outro solvente, o clorofórmio. Neste caso, o ligando **L4** e o $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tinham que ser parcialmente solúveis em clorofórmio, o que se verificou. O complexo foi, assim obtido pela reação entre o ligando **L4** e $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na presença de excesso de NH_4PF_6 (Esquema 7). O procedimento de síntese deste complexo foi mais difícil e moroso, comparativamente com o complexo **4a**.



Esquema 7. Esquema reacional para a obtenção do complexo **4b**.

A reação foi seguida através de TLC utilizando como eluente diclorometano:metanol (4 ml:200 μl). A reação deu-se como terminada quando não se verificou a existência de ligando livre. Os detalhes experimentais da síntese encontram-se descritos no capítulo 6.

Este complexo foi caracterizado através de RMN (^1H e ^{31}P).

A análise do espectro de ^1H -RMN veio confirmar a coordenação do ligando **L4** ao centro metálico de ferro. Deste modo, considerando as numerações efetuadas aos prótons da bipiridina e da cadeia polimérica de PLA e do PEG, na figura 23, foram realizadas as atribuições de todos os prótons que se encontram na figura 24.

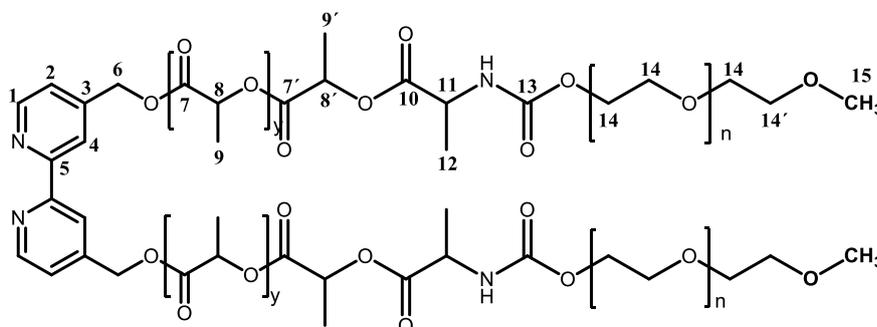


Figura 23. Numeração dos prótons e dos carbonos do complexo **4b**.

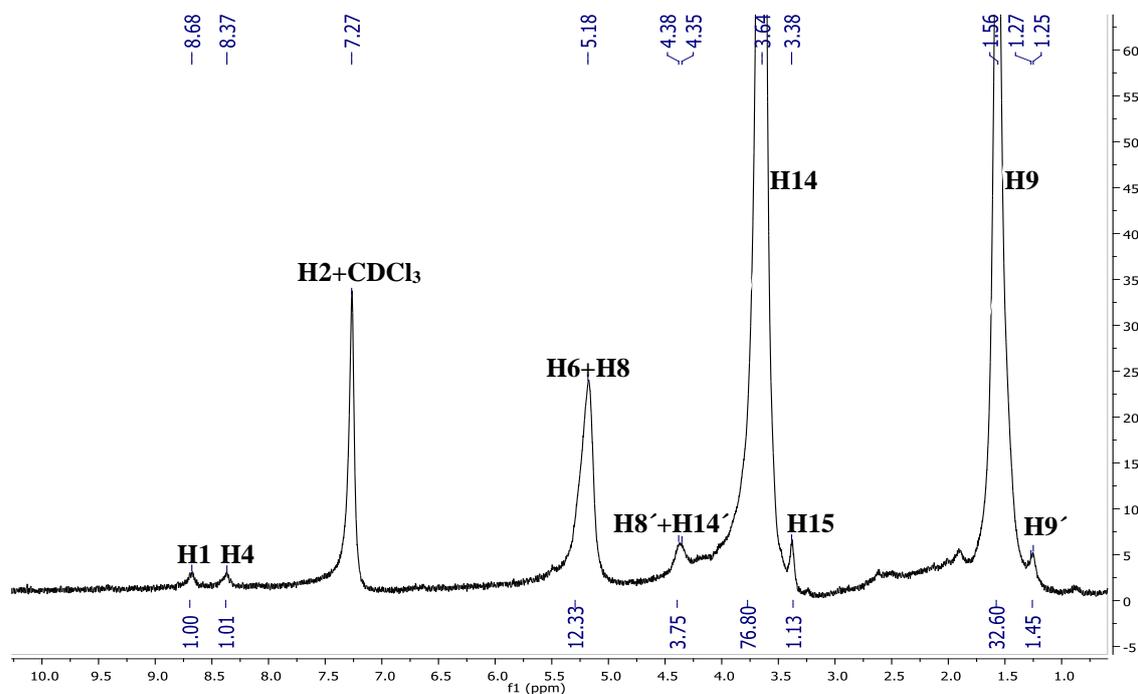


Figura 24. Espectros de ^1H -RMN em CDCl_3 do complexo **4b**.

A análise deste espectro é muito semelhante ao espectro do ligando **L4**, verificando-se a existência de todos os sinais da bipiridina na zona dos prótons aromáticos entre 8,68 ppm e 7,27 ppm (H1, H4 e H2). Os prótons $-\text{CH}_2-$ da bipiridina e $-\text{CH}-$ da cadeia principal do PLA (H6+H8) surgem a 5,18 ppm. Os prótons terminais das cadeias de PLA e PEG, H8'+H14', exibem um sinal a 4,36 ppm e a cadeia principal do PEG exibe um sinal a 3,64 ppm. O próton H15 (3,38 ppm), é atribuído ao grupo $-\text{CH}_3-$ terminal do PEG. Para terminar, os prótons H9 e H13 exibem um sinal a 1,56 ppm, correspondentes ao

grupo $-\text{CH}_3$ - da cadeia terminal de PLA e ao grupo $-\text{CH}(\text{CH}_3)$ - da D,L-Alanina. O próton H9' correspondente ao outro grupo $-\text{CH}_3$ - da cadeia de PLA exibe um sinal a 1,26 ppm. Pela análise verifica-se também a ausência do próton H12 no espectro do ligando **L4** podendo encontrar-se sobreposto com o próton correspondente à cadeia principal do PEG (H14).

A análise dos dois espectros (**L4** e do complexo **4b**) indicam que não se verificam grandes alterações a nível dos desvios químicos com a coordenação ao centro metálico. A alteração mais significativa é a desblindagem do próton H2 ($\Delta=0,15$ ppm), próton este que se situa no anel N,N-heteroaromático da bipyridina, o que de facto é expectável pois os efeitos são mais pronunciados neste local. Os restantes prótons já se encontram mais distantes do local de coordenação para serem afetados em grande extensão com a coordenação.

Tal como foi calculado para o complexo **4a**, através do espectro de ^1H -RMN é possível chegar a uma estimativa da massa molecular deste composto (**4b**), utilizando assim uma fórmula muito semelhante à equação 5. Sabendo que a massa molecular do ligando **L4** é igual a 6127,76 g/mol, a massa molecular do complexo pode ser determinada através da seguinte equação:

$$\begin{aligned} (6) \quad M(\mathbf{4b}) &= 3 \times M(\mathbf{L4}) + M(\text{Ferro}) + 2 \times M(\text{PEG}) \\ &= 18383,28 + 55,85 + 289,82 \\ &= 18728 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

3.5. Complexos micelares

Nesta dissertação de mestrado foram sintetizadas duas famílias envolvendo sistemas micelares. Os complexos micelares foram obtidos por duas vias: i) formados *in situ* por uma mistura de solvente orgânico e água; ii) formados por introdução de macroligandos poliméricos anfífilos, os quais, quando coordenados ao centro metálico, originam micelas em meio aquoso.

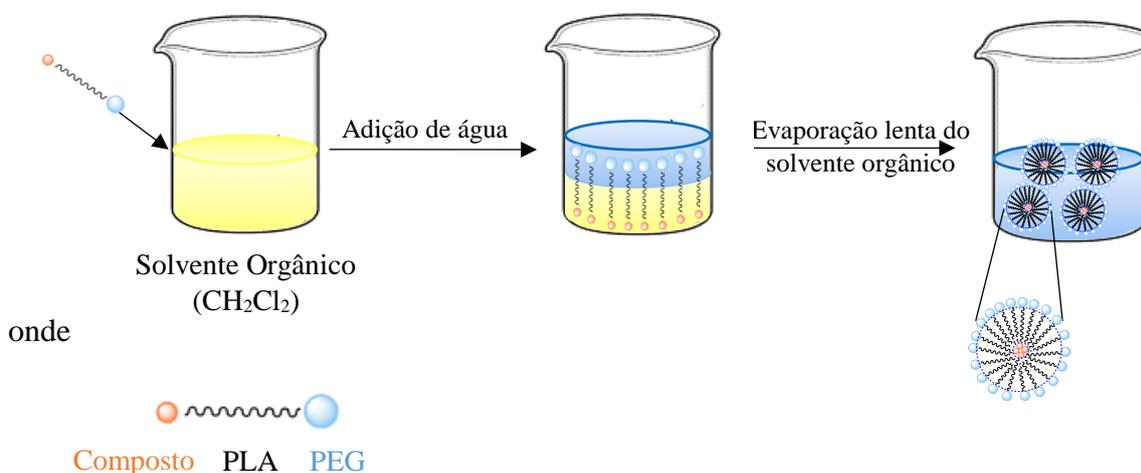
As nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas recorrendo a vários métodos, dependendo das aplicações pretendidas e das características físico-químicas dos polímeros utilizados e dos fármacos.⁵⁹ Nesta dissertação de mestrado utilizaram-se dois métodos de preparação diferentes que vão contribuir para a obtenção de NPs com as propriedades necessárias para a aplicação na terapia dirigida contra o cancro. A principal diferença entre os dois métodos é a miscibilidade dos solventes utilizados. No método de

evaporação do co-solvente, os solventes utilizados são imiscíveis enquanto que no segundo método, o da dissolução direta, os solventes são miscíveis.

3.5.1. Método de evaporação do co-solvente

Este método consiste na dissolução do complexo e do copolímero PLA-*b*-PEG num solvente orgânico apolar. Após a dissolução completa adiciona-se a fase aquosa e submete-se à emulsificação, por agitação das duas fases, seguida de uma emulsão originada por uma fonte de energia elevada, o ultrassons. O solvente orgânico é evaporado, por agitação magnética contínua e à temperatura ambiente.⁶⁰

Para este estudo foram utilizados os compostos **1a**, **2a** e **3a**, dado que são insolúveis em água. O solvente orgânico utilizado nesta preparação foi o diclorometano (4 ml) e para a fase aquosa foi usado um volume de 6 ml.⁶¹ Através deste método foram caracterizadas várias amostras, por microscopia de força atômica (AFM), com concentrações variáveis de complexo:copolímero, 9×10^{-5} mg/ml: 2×10^{-4} mg/ml e $9,38 \times 10^{-5}$ mg/ml: 2×10^{-4} mg/ml, respetivamente. O esquema seguinte mostra o método de preparação utilizado para a preparação das nanopartículas (Esquema 8).



Esquema 8. Método de preparação das nanopartículas através da evaporação do co-solvente.

As micelas preparadas a partir dos complexos **1a-3a** (**1a-3a** + PLA-*b*-PEG) foram analisadas numa superfície hidrofóbica, designada *hopg*-grafite. As nanopartículas resultantes apresentaram uma larga dispersão de tamanhos e verificou-se a existência de um grande aglomerado de partículas, originando o aparecimento de relevos mais acentuados. Para ser mais perceptível a visualização das nanopartículas foi necessário

escolher uma melhor zona das amostras em análise para as quais se verificou que o tamanho médio das nanopartículas variava entre os 150-300 nm para os complexos **1a** e **2a** e possuía um intervalo um pouco maior para o complexo **3a**, 150-400 nm (Figuras 25, 26 e 27).

Em suma, as dimensões das NPs obtidas por análise de AFM apresentam tamanho que pode ser aplicado em terapia dirigida contra o cancro, pois apresentam dimensões até 1000 nm. Contudo, deverão ser testados novos métodos de micelização, como por exemplo, diálise, de modo a obter tamanhos de nanopartículas mais homogéneos e também deverão ser testadas outras concentrações, pois o tamanho das partículas tem um papel importante na capacidade de atravessar as membranas biológicas. Com base em dados publicados na literatura, a vasculatura e as fenestrações podem sofrer modificações em diferentes condições patológicas. Por exemplo, o crescimento do tumor induz ao desenvolvimento da neovasculatura que é caracterizada pelo endotélio vascular descontínuo com grandes fenestrações na gama dos 200-780 nm⁶², permitindo assim a passagem de NPs que apresentem este tamanho, o que vai ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho.

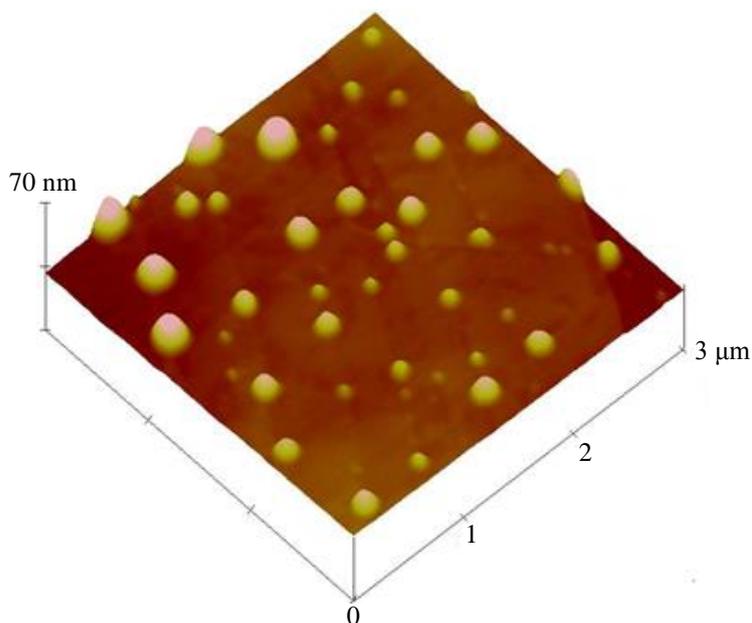


Figura 25. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas **1a** + **PLA-*b*-PEG**, com uma escala 3x3 µm.

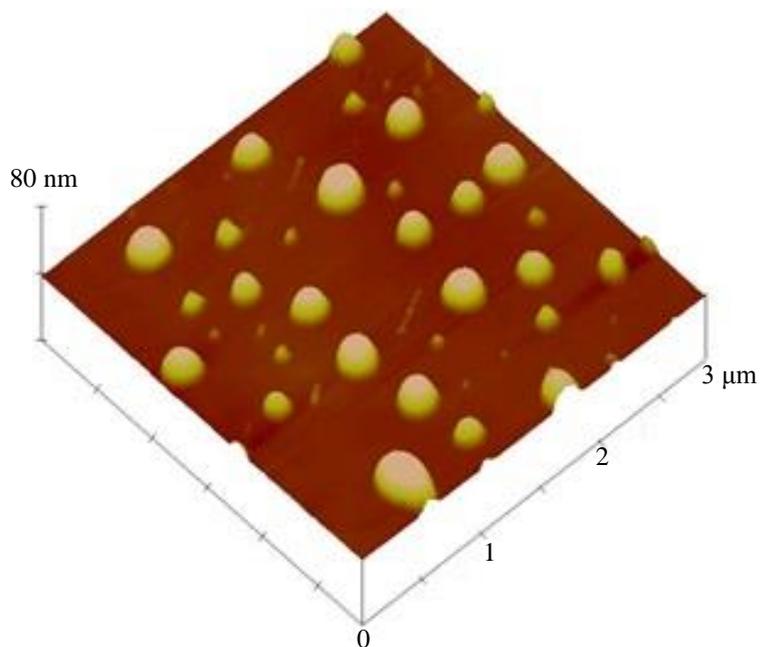


Figura 26. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas **2a + PLA-*b*-PEG**, com uma escala 3x3 μm .

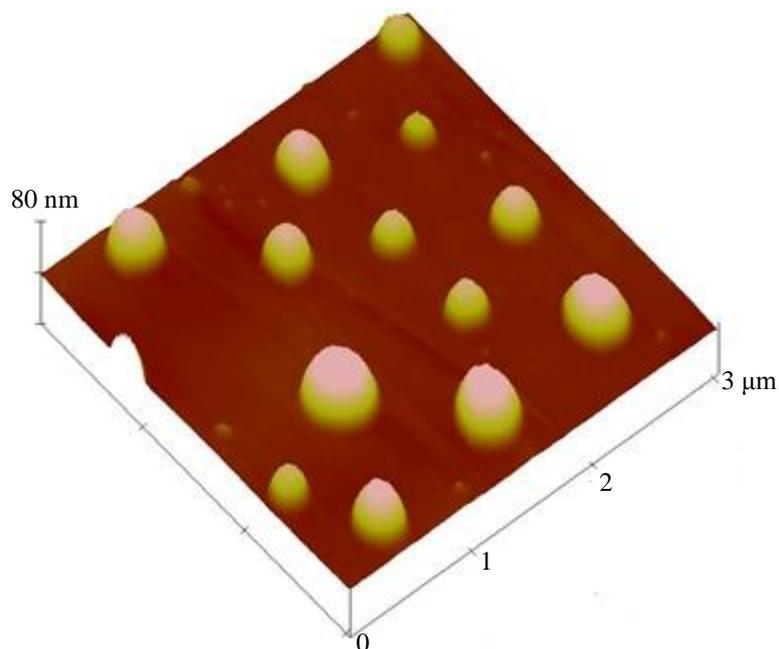


Figura 27. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas **3a + PLA-*b*-PEG**, com uma escala 3x3 μm .

Pela técnica de espectroscopia de fluorescência utilizando o pireno como fluoróforo, que funciona como sonda hidrofóbica, teve-se como objetivo a determinação da concentração micelar crítica com base nos espectros de emissão de fluorescência, em que as interações do pireno ocorrem entre as nanopartículas e a solução aquosa. Não foi,

contudo, possível a determinação da CMC utilizando esta técnica pois o método utilizado não se revelou reproduzível neste caso, ou seja, através do método de evaporação do co-solvente não foi possível controlar com exatidão as quantidades relativas de solvente que evaporam.

Ainda com o objetivo de inferir acerca da concentração micelar crítica (CMC), utilizaram-se as soluções com concentrações mais baixas, calculadas para a preparação das soluções para análise através de fluorescência, e analisaram-se as amostras por AFM. Assim, amostras com concentrações de 62,29 mg/ml de copolímero e 0,52 mg/ml de complexo de ferro e de cobalto (**1a** e **2a**) e 0,53 mg/ml de complexo de zinco foram caracterizadas por AFM. Através da análise das figuras 28, 29 e 30 verifica-se que todas as amostras apresentam a formação de micelas concluindo-se, portanto, que a CMC é igual ou inferior às concentrações utilizadas. No entanto, através desta análise pode-se também verificar que os tamanhos das nanopartículas já são significativamente mais reduzidos, comparativamente às amostras analisadas inicialmente. Também se observam zonas planas que deverão corresponder à adsorção ordenada de moléculas de grafite. Relativamente às amostras **1a** e **2a**, o intervalo de tamanho das NPs variam entre 29-55 nm e 35-51 nm, respetivamente, enquanto que para o composto **3a** o tamanho das nanopartículas é um pouco maior encontrando-se num intervalo entre 62-72 nm. Verificou-se também que o complexo de zinco (**3a**) apresenta nanopartículas com tamanhos superiores comparativamente aos dos complexos de ferro e de cobalto (**1a** e **2a**). A explicação para os tamanhos superiores das nanopartículas para o complexo de zinco (**3a**) poderá estar relacionada com o maior comprimento da ligação esperado entre o Zn^{II} e o ligando para o qual contribui o raio atómico do metal, pois o zinco apresenta maior raio atómico do que ferro e cobalto.

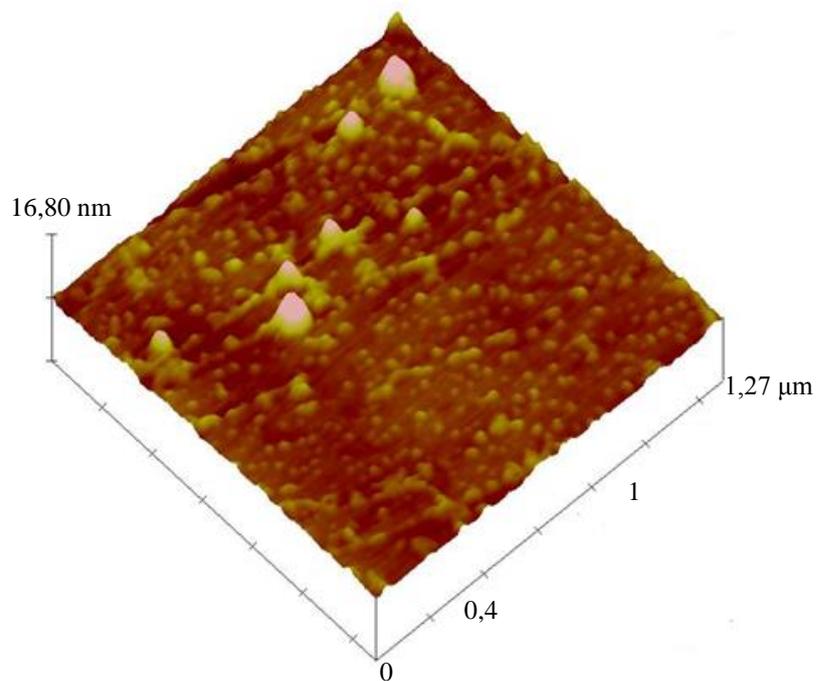


Figura 28. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas **1a + PLA-*b*-PEG**, com uma escala 1,27x1,27 μm.

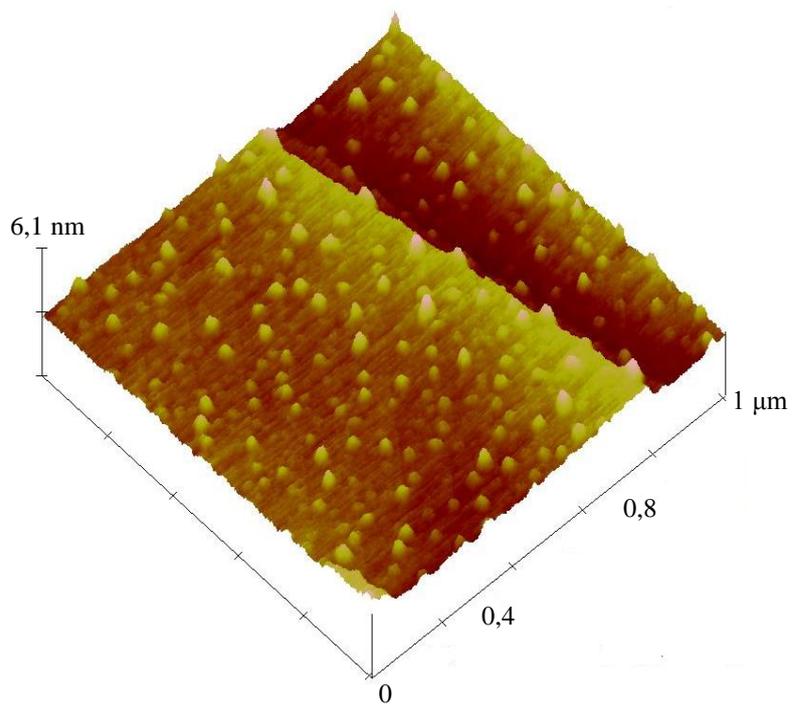


Figura 29. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas **2a + PLA-*b*-PEG**, com uma escala 1x1 μm.

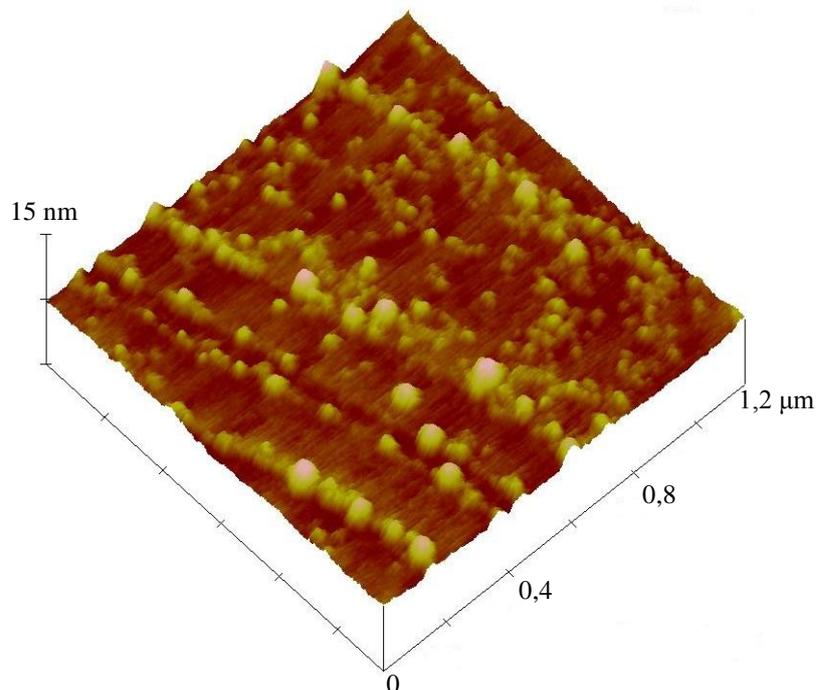


Figura 30. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas **3a** + **PLA-*b*-PEG**, com uma escala 1,2x1,2 μm.

O tamanho das nanopartículas obtidas nesta segunda análise está também de acordo com o tamanho de NPs para a aplicação nas terapias oncológicas, pois geralmente apresentam uma dimensão que varia num intervalo de 20-1000 nm.^{15,31} Diversos estudos têm demonstrado que o tamanho das NPs é um dos fatores que pode afetar diretamente a sua distribuição nas células tumorais.⁶³ O tamanho também pode afetar o tráfego intracelular, o que por sua vez pode influenciar a acumulação das NPs nas células tumorais. Assim, os tamanhos das NPs obtidos neste trabalho apresentam o requisito primordial para a aplicação na terapia dirigida contra o cancro.

3.5.2. Método de dissolução direta

Este método consiste em dissolver o complexo macromolecular num solvente orgânico miscível em água. Seguidamente, recorrendo a ultrassons, deixa-se agitar durante alguns minutos de modo a garantir que o complexo se encontre totalmente dissolvido. Posteriormente adiciona-se a fase aquosa e coloca-se no rotavapor de modo a evaporar o solvente orgânico. Tal como já foi referido anteriormente, a principal diferença entre os dois métodos é a miscibilidade dos solventes utilizados, sendo que neste caso os solventes são miscíveis.

O complexo macromolecular analisado através deste método foi o complexo **4b**. O solvente orgânico usado foi o THF em vez do diclorometano, usado no método anterior para **4a**, pois este complexo não é solúvel neste solvente.

As micelas preparadas para o composto **4b**, que apresentam uma concentração de 1,1 mg/ml, foram também caracterizadas por AFM utilizando como superfície, *hopp*-grafite. Como é possível observar através da análise da figura 31, a maioria das nanopartículas formadas apresentam tamanhos muito regulares existindo, no entanto, umas que apresentam tamanhos superiores, mas em menor quantidade. O intervalo de tamanho das NPs para o composto **4b** varia entre 164-318 nm, apresentando também um tamanho adequado para ser aplicado em terapia dirigida contra o cancro.

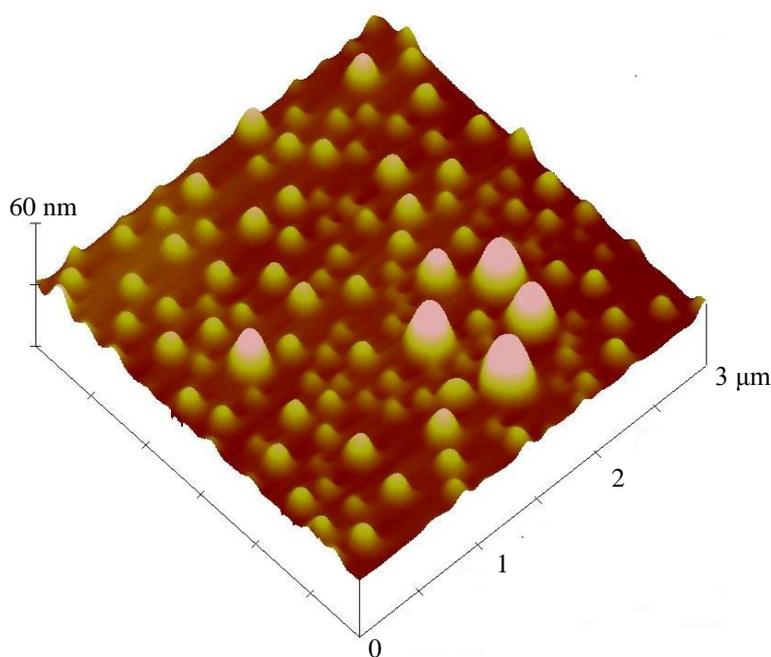
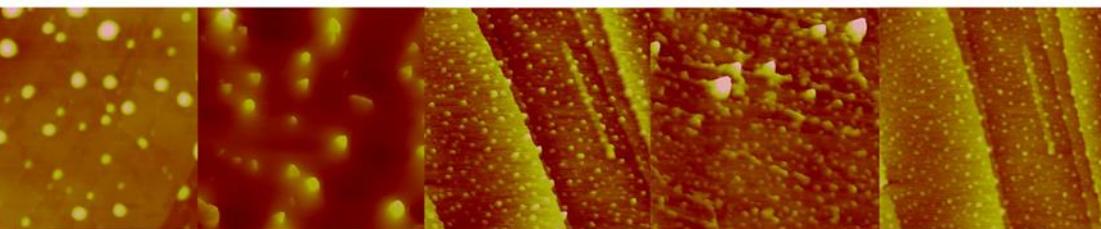


Figura 31. Imagem topográfica, obtida por AFM para as micelas obtidas a partir do complexo **4b**, com uma escala 3x3 μm.

Os dois métodos usados para originar complexos micelares são reprodutíveis, ou seja, permitem a formação de nanopartículas com tamanhos regulares, mas o método de evaporação do co-solvente, em particular, não é facilmente adaptável à escala industrial, uma vez que é um método que não permite o controlo da evaporação dos solventes utilizados e é um método um pouco demorado.



Capítulo 4- Estudo de Estabilidade e Atividade Biológica

4.1. Estudo de estabilidade através de espectroscopia de UV-Vis

O estudo da estabilidade de um complexo é um fator que é essencial para obter conhecimentos acerca da sua viabilidade para aplicação a nível terapêutico. São vários os processos que conduzem à alteração da estabilidade de um complexo, como a isomerização, a desidratação, a racemização, a hidrólise e processos de oxidação-redução.⁶⁴ Neste contexto, a avaliação da estabilidade de um complexo assume um enorme interesse pois esta permite avaliar a sua atividade num determinado período de tempo, de modo a compreender se o complexo exerce a sua atividade de forma isolada ou se decompõe originando outras espécies que poderão ser responsáveis pela atividade terapêutica.

Os complexos **1b**, **2b** e **3b** apresentados nesta dissertação de mestrado foram avaliados quanto à sua estabilidade de modo a perceber se sofrem alguma alteração que possa conduzir a alterações a nível químico. Os complexos **1a-3a** não foram estudados quanto à sua estabilidade pois já se encontram descritos na literatura. O estudo da estabilidade destes compostos foi efetuado em 5% de DMSO e 95 % de meio celular DMEM^a recorrendo à técnica de espectroscopia de UV-Vis. Durante a primeira hora foram realizadas leituras sucessivas de 15 em 15 minutos, e as leituras seguintes foram realizadas de hora a hora até às 6 horas de estudo. A última leitura foi feita no dia seguinte, 24 horas após a primeira leitura.

A percentagem de variação indica a percentagem de variação das absorvâncias ao longo do estudo para determinado comprimento de onda e foi calculada segundo a equação 7, aplicada aos comprimentos de onda máximos (absolutos e relativos) de absorção do espectro do composto em análise. Nesta expressão, t_i indica o tempo decorrido, $Ab_{t_{mix}}$ e Ab_{t_i} indicam o valor de absorvância para um dado comprimento de onda ao tempo de mistura (t_{mix}) e a cada tempo de medição (t_i), respetivamente.

$$(7) \quad \text{Variação}(\%) = \frac{Ab_{t_{mix}} - Ab_{t_i}}{Ab_{t_{mix}}} \times 100$$

O estudo de estabilidade do complexo **1b**, em DMSO/DMEM (Figura 32), indica que existe uma diminuição da intensidade das bandas que são atribuíveis a transições que

^a Meio celular que contém aminoácidos, vitaminas, proteínas e antibióticos.

envolvem o centro metálico a partir da primeira leitura (t_{mix}). Como se pode verificar, a alteração na absorção das bandas a 357 e 529 nm foi de cerca de -20 %, enquanto que a banda a 310 nm se manteve inalterada ao longo do tempo. Para tentar perceber este efeito, normalizaram-se os espectros a t_{mix} e para a leitura das 24 horas, verificando-se uma variação de aproximadamente +15 % na banda atribuível ao ligando (310 nm). Estas observações poderão indicar uma descoordenação das bipyridinas (Figura 33 e 34).

Por outro lado, pode-se também concluir que o composto é relativamente estável tendo em vista aplicações terapêuticas, uma vez que o seu tempo de meia vida é superior a 24 horas.

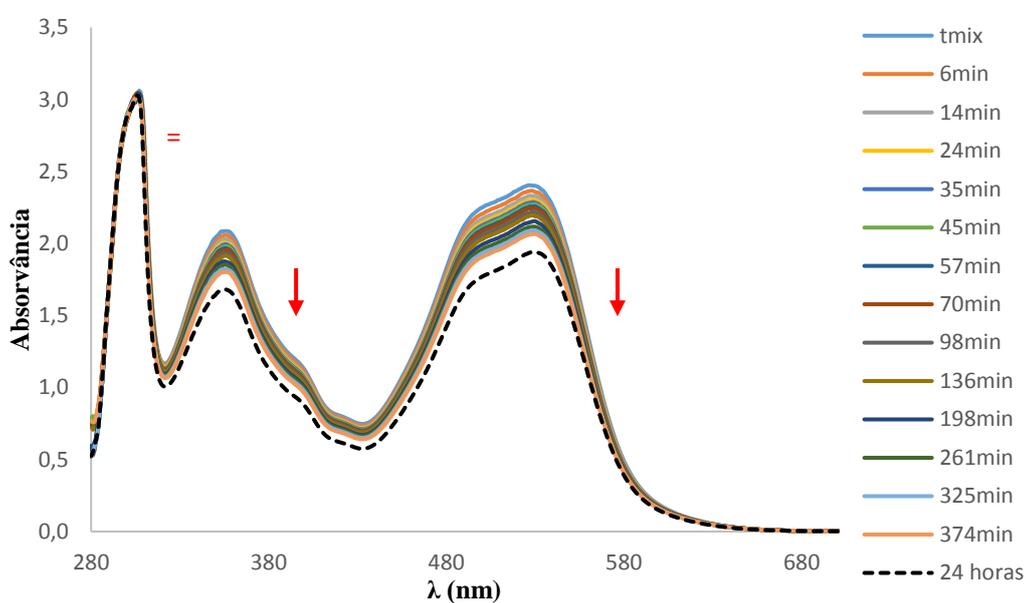


Figura 32. Estabilidade do complexo **1b** ao longo de 24 horas em DMSO/DMEM.

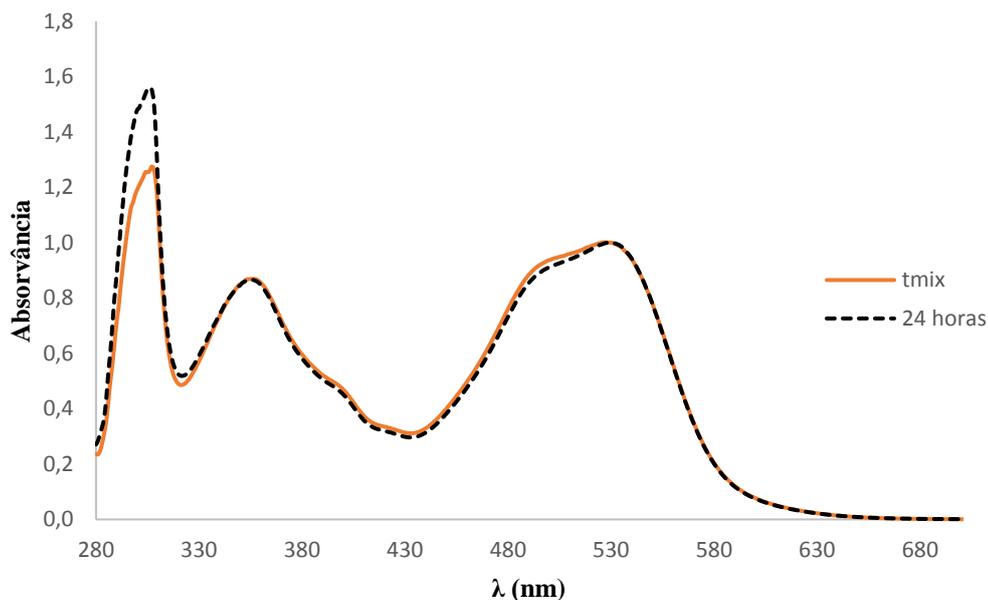


Figura 33. Espectro normalizado do t_{mix} e às 24 horas para o complexo **1b**.

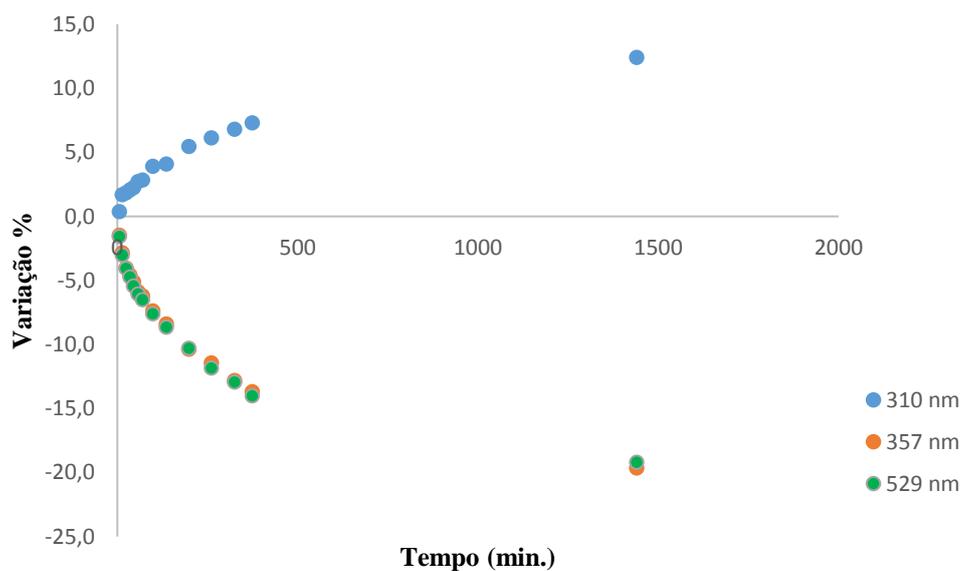


Figura 34. Variação da intensidade das bandas 310 nm, 357 nm e 529 nm ao longo do tempo, para o espectro eletrónico do complexo **1b**.

No caso do complexo **2b** é evidente uma clara evolução com o tempo do espectro eletrónico (Figura 35), podendo indicar a decomposição do complexo, formando uma ou mais espécies em solução. Nota-se claramente uma grande alteração entre os 300 e 322 nm, levando à formação de um ombro a 318 nm.

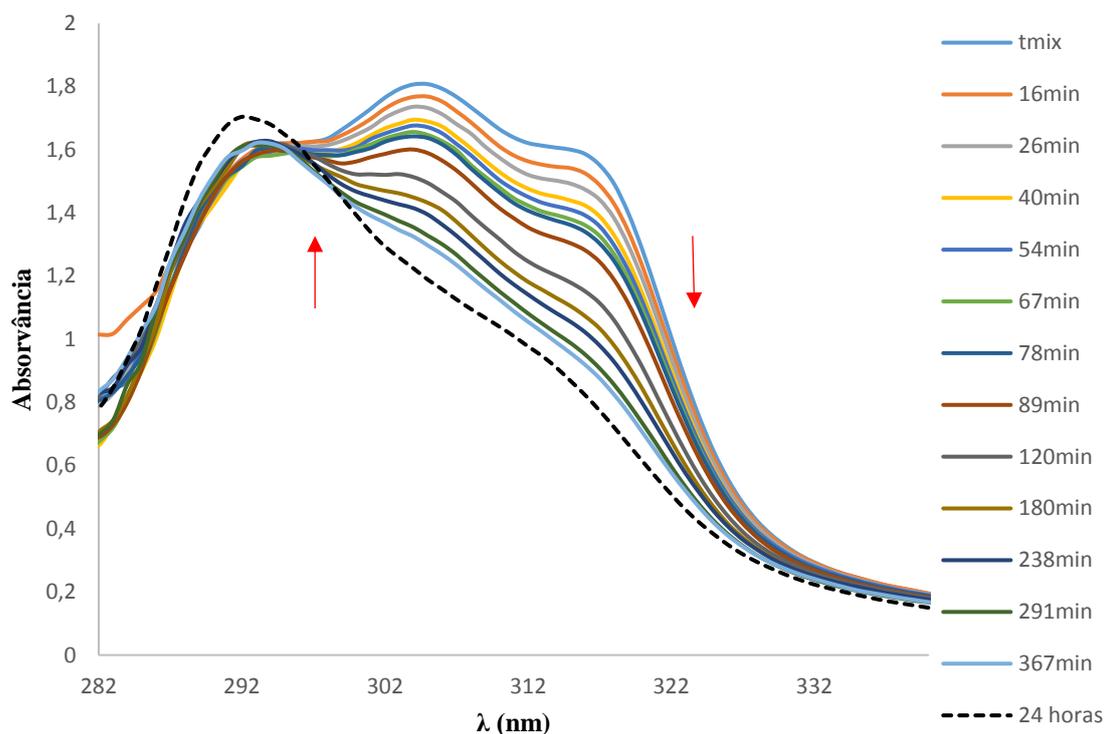


Figura 35. Estabilidade do complexo **2b** ao longo de 24 horas em DMSO/DMEM.

Em relação ao complexo **3b**, este mostrou-se ser estável ao longo das 24 horas (Figura 36). O espectro eletrónico manteve-se praticamente inalterado apresentando apenas uma variação da intensidade de todas as bandas inferior a 10%. Verifica-se a presença de um pequeno ombro a 306 nm que se alterou um pouco ao longo das 24 horas de análise, sugerindo que este complexo em meio celular poderá eventualmente interagir através dos grupos hidroxilo do ligando, estabelecendo pontes de hidrogénio com as proteínas existentes no meio celular (Figura 36 e 37).

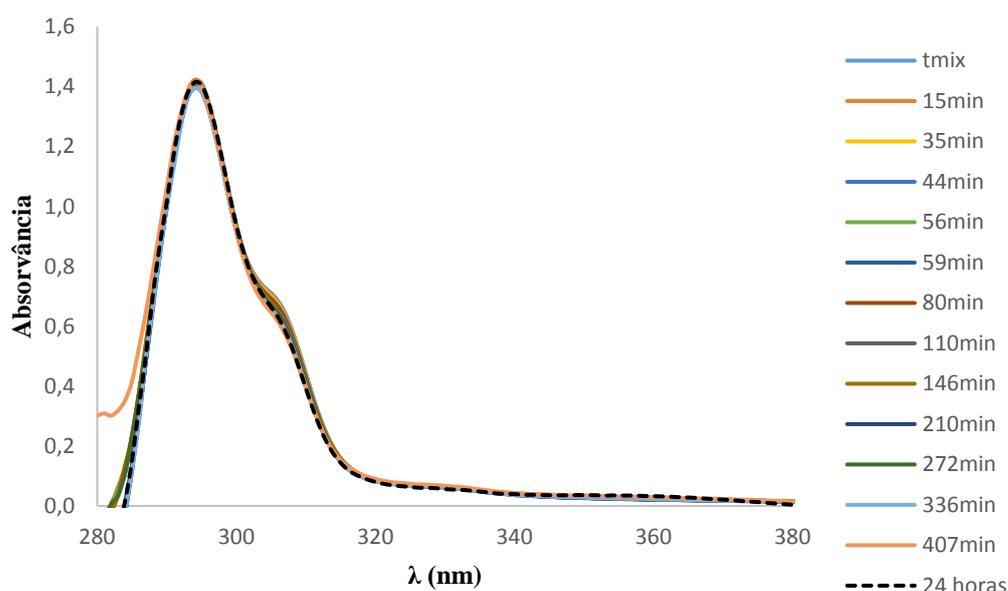


Figura 36. Estabilidade do complexo **3b** ao longo de 24 horas em DMSO/DMEM.

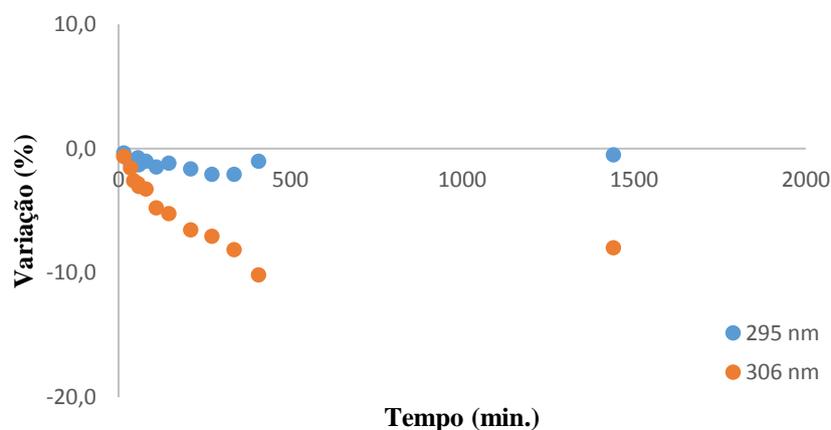


Figura 37. Variação da intensidade das bandas 295 nm e 306 nm ao longo do tempo, para o espectro eletrônico do complexo **3b**.

4.2. Estudos de viabilidade celular em linhas celulares tumorais humanas

O estudo da viabilidade celular é um ensaio essencial de modo a avaliar as potencialidades dos compostos sintetizados neste trabalho como potenciais agentes anticancerígenos. A atividade citotóxica dos complexos **1a-3a**, **1b-3b**, e **4a** e dos sistemas micelares dos complexos **1a-3a** obtidos *in situ* pela adição do copolímero de PLA-*b*-PEG

(**1a-3a + PLA-*b*-PEG**) e do sistema micelar do complexo de Fe contendo o macroligando PLA/bipy-CH₂OH/D,L-Alanina/PEG (**4b**) obtido pelo método de dissolução direta foram testados através da determinação dos valores de IC₅₀ na linha celular do adenocarcinoma da mama humano (MDAMB231). Esta linha celular é extremamente agressiva e atualmente não existe tratamento para este tipo de tumores.

O efeito dos complexos testados na viabilidade celular destas células foi avaliado após 48 horas de exposição. Os resultados apresentados nesta dissertação de mestrado foram obtidos no Instituto Tecnologia Nuclear realizados pela Doutora Fernanda Marques que cultivou e manipulou as células, e tratou todos os resultados obtidos.

Os resultados encontram-se compilados na tabela 10 e apresentam-se em termos de valores de IC₅₀, que corresponde à concentração necessária para inibir 50 % da população celular em estudo. Assim, um composto será mais citotóxico quanto menor for o valor de IC₅₀.

Tabela 10. Valores de IC₅₀ (μM± desvio padrão) obtidos para os complexos **1a-3a**, **1b-3b**, **4a** e para os complexos micelares obtidos a partir de **1a-3a** e **4b** para a linha celular MDAMB231, após 48h.

Amostras	IC ₅₀ (μM)
<i>Complexos</i>	
1a	99,2 ± 12,6
2a	61,1 ± 16,6
3a	120,9 ± 56
1b	86,6 ± 8,0
2b	66,1 ± 10,5
3b	32,4 ± 9,1
4a	83,4 ± 26,5
<i>Micelas</i>	
1a + PLA-<i>b</i>-PEG	37,8 ± 9,1
2a + PLA-<i>b</i>-PEG	10,2 ± 4,6
3a + PLA-<i>b</i>-PEG	24,2 ± 9,0
4b	*

* Não foi possível determinar devido à baixa concentração de amostra (ver texto)

Os resultados indicam que todos os complexos apresentam citotoxicidade na linha celular do adenocarcinoma da mama humano, nas condições experimentais utilizadas. Dentro da família **a**, o composto que apresenta melhor resultado é o composto **2a** e na família **b** é o complexo **3b**. Este é o complexo que apresenta maior citotoxicidade comparativamente aos restantes complexos estudados. Relativamente ao composto macromolecular **4a**, verifica-se que este apresenta um valor IC₅₀ às 48 h de ~83 μM, um

pouco melhor que os seus homólogos não poliméricos, o que mostra a vantagem do uso de um ligando polimérico. Os resultados globais mostram que todos os compostos estudados apresentam potencialidades anticancerígenas. Para a mesma linha celular e nas mesmas condições, a cisplatina ($IC_{50} \sim 40 \mu M^b$) é globalmente mais citotóxica do que os compostos sintetizados neste trabalho, excluindo o composto **3b** ($\sim 32 \mu M$) que apresenta uma citotoxicidade ligeiramente superior.

Relativamente aos resultados obtidos para os sistemas micelares **1a-3a + PLA-b-PEG**, estes indicam que as micelas formadas apresentam atividade citotóxica relevante nas condições utilizadas, bastante superiores à dos seus precursores **1a-3a**. Estes resultados revelam claramente a vantagem do uso dos sistemas micelares. Refira-se que todos estes sistemas estudados possuem valores de IC_{50} inferiores ao da cisplatina, em particular o sistema micelar **2a + PLA-b-PEG**, que apresenta maior citotoxicidade comparativamente aos restantes sistemas estudados.

Relativamente às micelas obtidas a partir do complexo **4b**, devido à escassez de amostra, não foi possível preparar soluções com concentrações superiores a $2,63 \mu M$, o que revelou ser insuficiente para a determinação do IC_{50} . No entanto, para esta concentração é já notória uma diminuição da percentagem da viabilidade celular, dando uma indicação das concentrações necessárias para um próximo estudo (Figura 38).

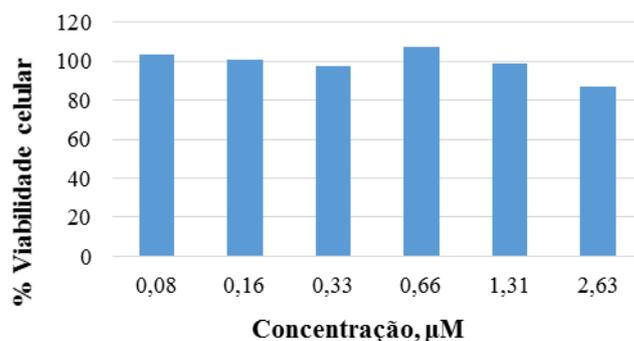
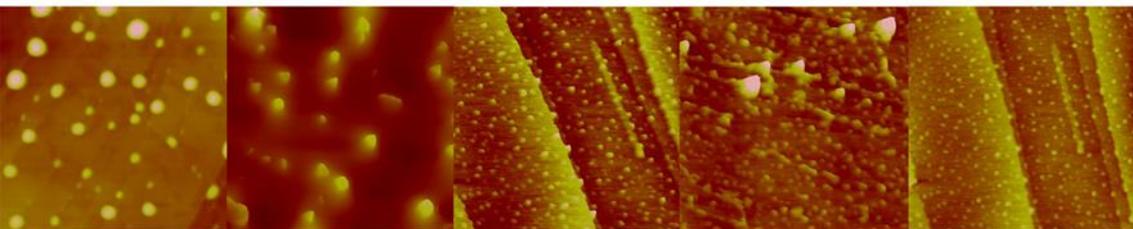


Figura 38. Resultados dos ensaios de viabilidade na linha celular MDAMB231 para o complexo **4b**.

^b Resultado obtido este ano no decorrer da Tese de Mestrado em Genética Molecular do licenciado Tiago Moreira, “Exploring the anticancer effects of multifunctional polymer-ruthenium conjugates”-em curso.

Em conclusão, verifica-se que os complexos micelares apresentam valores de IC₅₀ mais baixos comparativamente aos complexos análogos não micelares, cujos valores resultam numa citotoxicidade superior à da cisplatina.



Capítulo 5- Conclusões e Perpetivas Futuras

O objetivo fundamental deste trabalho era a formação de complexos micelares de metais de transição para a aplicação na terapia dirigida contra o cancro. Para o efeito foi necessário sintetizar três co(polímeros) (PLA-*b*-PEG, PLA/bipy-CH₂OH e PLA/bipy-CH₂OH/D,L-Alanina/PEG) e três famílias de complexos, precursores da formação dos sistemas micelares:

- a) complexos de fórmula geral $[M(\text{bipy})_3][\text{PF}_6]_x$ (M = Fe (**1a**), Co (**2a**) e Zn (**3a**); x = 2 (Fe, Zn) ou x=3 (Co));
- b) complexos de fórmula geral $[M(\text{bipy-CH}_2\text{OH})_3][\text{PF}_6]_x$ (M = Fe (**1b**), Co (**2b**) e Zn (**3b**); x = 2 (Fe, Zn) ou x=3 (Co));
- c) complexos de Fe contendo os ligandos macromoleculares PLA/bipy-CH₂OH (**4a**) e PLA/bipy-CH₂OH/D,L-Alanina/PEG (**4b**).

A partir dos complexos anteriores foi possível obter dois sistemas micelares:

- a) micelas formadas *in situ* a partir da família de complexos **1a-3a** e do copolímero de PLA-*b*-PEG;
- b) micelas formadas a partir do complexo **4b**.

Foi estudada a estabilidade dos complexos **1a-3a** e **1b-3b** por UV-Vis em solução contendo um meio celular e a atividade biológica de **1a-3a**, **1b-3b**, **4a** e dos sistemas micelares dos complexos **1a-3a** obtidos *in situ* pela adição do copolímero de PLA-*b*-PEG e do sistema micelar do complexo de Fe contendo o macroligando PLA/bipy-CH₂OH/D,L-Alanina/PEG (**4b**) através da determinação dos valores de IC₅₀ na linha celular do adenocarcinoma da mama humano (MDAMB231).

Os ligandos e os complexos foram caracterizados através das técnicas espectroscópicas usuais (RMN, FTIR e UV-Vis). Relativamente aos complexos **1a-3a** e **1b-3b**, não houve qualquer problema relacionado com a síntese e os complexos foram obtidos com rendimentos aceitáveis. A reação que representou um maior desafio foi a síntese do complexo de ferro contendo o macroligando copolimérico PLA/bipy-CH₂OH/D,L-Alanina/PEG (**4b**). A descoberta que o metanol degradava o PEG facilitou o processo, pois a reação ocorreu noutro solvente levando à formação do complexo pretendido.

Através das técnicas analíticas utilizadas foi possível comprovar as estruturas dos ligandos e dos complexos sintetizados. Verificou-se também que através da técnica de RMN, existe um conjunto de fatores, nomeadamente a carga dos complexos, efeitos

indutivos e de retrodoação π que desempenham um papel importante nos resultados obtidos, provocando assim alterações nos desvios químicos dos prótons do ligando com a coordenação.

Através dos espectros de UV-Vis verificou-se que apenas os complexos de ferro (**1a**, **1b** e **4a**) apresentam duas bandas, uma delas intensa, na zona do UV atribuível a uma transição eletrónica ILCT e outra, larga, composta por duas transições, presumivelmente atribuíveis a uma transição MLCT e, eventualmente, a uma transição $d \rightarrow d$.

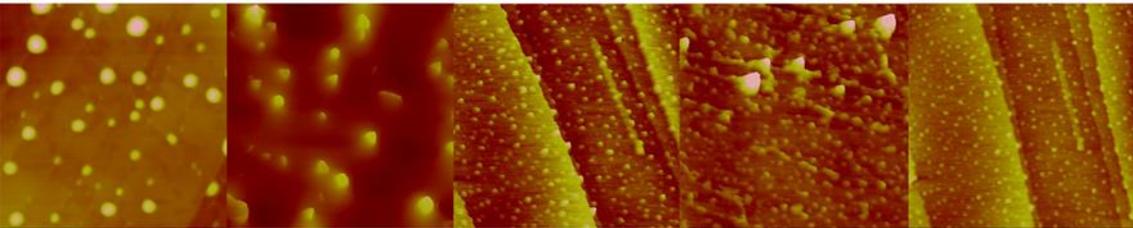
Os estudos de estabilidade em DMSO/DMEM por espectroscopia de UV-Vis indicam que o complexo de ferro **1b** e o complexo de zinco **3b** são mais estáveis do que o complexo de cobalto **2b**. Os complexos **1b** e **3b** mantêm-se estáveis ao longo das 24 horas, verificando-se uma variação de cerca 15 % das bandas do ligando no complexo **1b**, podendo indicar a descoordenação das bipyridinas. No complexo **2b** verifica-se alterações ao longo das 24 horas podendo indicar a formação de uma ou mais espécies em solução.

Na formação de micelas foram utilizados dois métodos de preparação das nanopartículas: o método de evaporação do co-solvente e o método de dissolução direta. As micelas obtidas foram caracterizadas através de microscopia de força atómica (AFM). O primeiro método foi testado para os complexos **1a-3a**, no qual se obteve nanopartículas que apresentam tamanho variável no intervalo 150-400 nm. A variação das concentrações relativas de complexo e copolímero permitiu obter NPs com tamanho mais reduzido, no intervalo de 29-129 nm. O segundo método foi testado apenas para o complexo de ferro **4b** no qual foram obtidas nanopartículas com tamanho no intervalo de 164-318 nm. Através da análise de AFM foi possível concluir que os dois métodos utilizados para a preparação de NPs são reprodutíveis, mas que dependem da concentração, e que estas apresentam tamanho que permite a possível aplicação em terapia dirigida contra o cancro.

Através dos ensaios de IC_{50} , verificou-se que todos os compostos apresentam citotoxicidade para a linha tumoral estudada (MDAMB231). Entre os compostos não micelares, verificou-se que o complexo de zinco **3b** foi aquele que mostrou melhor atividade citotóxica, com um valor de $IC_{50} = 32,4 \mu M$ às 48 horas. Os sistemas micelares mostraram ser bastante mais citotóxicos que os seus precursores, apresentando valores de IC_{50} mais baixos. Relativamente às micelas obtidas a partir do composto **4b**, as concentrações que foram possíveis usar foram demasiado baixas para causar a morte de 50 % da população celular, mas para a concentração de $2,63 \mu M$ é notória a diminuição da percentagem da viabilidade celular, sendo portanto um ótimo resultado. Os resultados

globais mostram que todos os compostos estudados apresentam potencialidades anticancerígenas, em particular os sistemas micelares, para os quais os valores de IC₅₀ são inferiores aos da cisplatina (40 μM). Os compostos de zinco, por se terem revelado os mais estáveis e também os mais citotóxicos serão, à partida, os compostos mais interessantes para a aplicação como agentes anticancerígenos.

Relativamente ao trabalho futuro, sugere-se a formação dos complexos de cobalto e de zinco análogos aos complexos **4a** e **4b**, bem como estudos de estabilidade e estudos de viabilidade celular em linhas celulares tumorais humanas. Sugere-se ainda a otimização do processo de síntese e purificação do complexo **4b**. Torna-se essencial também a otimização do método de preparação das nanopartículas de modo a garantir que o tamanho obtido das NPs seja mais uniforme. Outro método de preparação de nanopartículas a ser explorado é o da diálise.



Capítulo 6-Materiais e Métodos

6.1. Considerações Gerais

Todas as sínteses que serão descritas neste capítulo foram realizadas usando técnicas de *Schlenk* em atmosfera inerte de azoto de acordo com as técnicas de manipulação habituais neste tipo de trabalho.

Os solventes utilizados no decurso deste trabalho foram utilizados sem purificação prévia. Sempre que foi necessário usar solventes secos, estes foram-no de acordo com as metodologias geralmente utilizadas (Tabela 11).⁶⁵ Os ligandos 2,2'-bipiridina e 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina foram adquiridos à Sigma-Aldrich[®] e o NH₄PF₆ utilizado nas mesmas sínteses é procedente da Fluka[®].

Tabela 11. Lista de solventes usados durante este trabalho, respetivas propriedades e modos de secagem.

Solvente	Ponto de ebulição (°C)	Pré-secagem	Refluxo-Destilação
THF	66,0	-	Fio de sódio/benzofenona
Diclorometano	40,0	CaCl ₂	CaH ₂
n-Hexano	68,7	Fio de sódio	CaH ₂
Éter etílico	34,6	Fio de sódio	Fio de sódio/benzofenona

6.2. Caracterização

6.2.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H, ³¹P e ¹³C foram efetuados à temperatura ambiente num espectrómetro Bruker Avance 400 (operando a uma frequência de 400 MHz para ¹H, 162 MHz para ³¹P e 100,6 MHz para ¹³C). Usou-se como solventes clorofórmio-*d1* (99,9%), DMSO-*d6*, acetona-*d6* e metanol-*d4* adquiridos à Sigma-Aldrich, utilizados sem purificação adicional. Os desvios químicos são dados em partes por milhão (ppm) utilizando como referência o sinal residual do solvente (clorofórmio-*d1*: δH = 7,26 ppm, δC = 77,16 ppm; DMSO-*d6*: δH = 2,50 ppm, δC = 39,52 ppm; Acetona-*d6*: δH = 2,05 ppm, δC = 29,8 ppm e Metanol-*d4*: δH = 3,31 ppm, δC = 49,0 ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) são expressas em Hertz (Hz).

6.2.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho (IV) dos complexos sintetizados foram obtidos num espectrómetro *Shimadzu IRAffinity-1 FTIR*. Foram preparadas pastilhas de KBr (feitas ao ar) não tendo sido realizada qualquer calibração adicional.

6.2.3. Espectroscopia de Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

Os espectros eletrónicos dos complexos foram realizados num espectrofotómetro Jasco V- 560 de feixe duplo e em células de quartzo com comprimento ótico de 1 cm. Os solventes utilizados para a caracterização e ensaios de estabilidade dos complexos foram DMSO, diclorometano, metanol e DMEM. Todas as medições foram feitas ao ar e à temperatura ambiente. A concentração das soluções utilizadas para traçar os espectros encontram-se na gama dos 10^{-3} M a 10^{-5} M. As absorvidades molares foram determinadas segundo a equação de Lambert-Beer e o intervalo de comprimentos de onda observado esteve entre o valor *cut-off* de cada solvente e 900 nm.

6.2.4. Análise Elementar

As determinações das percentagens de C, H e N dos complexos foram realizadas no Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico, num equipamento Fissons Instruments, modelo EA1108.

6.2.5. Microscopia de Força Atómica (AFM)

O modo de caracterização por AFM foi realizado ao ar, utilizando um instrumento Multimode AFM com um controlador Nanoscope IIIa da Digital Instruments, Veeco, gravadas com uma sonda constante de 42 Nm^{-1} e uma ressonância com frequência de cerca de 300 kHz (TESP, Brucker). Para a imagiologia foi utilizada uma velocidade de varrimento de 1,7 Hz. A amostra foi colocada numa superfície recentemente clivada HOPG (*highly oriented pyrolytic grafite*) e secou-se sob refluxo de azoto. Utilizou-se aproximadamente 50 μL de “amostra”.

6.2.6. Estudos de viabilidade celular

Os estudos biológicos foram realizados no Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C²TN) do Instituto Superior Técnico – Pólo de Loures da Universidade de Lisboa, pela Doutora Fernanda Marques.

A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada em células de carcinoma da mama humanas MDAMB231 procedendo do seguinte modo para cada composto em ensaio:

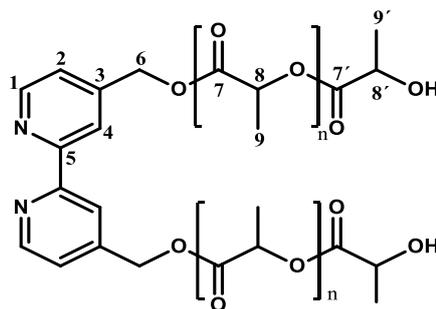
As culturas das linhas celulares de carcinoma humano da mama (MDAMB231; ATCC) foram efetuadas em meio DMEM (Gibco) contendo GlutaMax I (MDAMB231) e foram completados com 10% de PBS e 1% de penicilina-estreptomicina e mantidas a 37 °C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂.

A cultura de células foi feita em frascos contendo o meio próprio à proliferação celular e que permite a adesão das células.

Quando as células atingiram a confluência necessária, foram dissociadas através da adição de uma solução de tripsina-EDTA a 0,05% (Gibco). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT que mede a redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a azul de formazano pelas células viáveis. Para isso, as células foram semeadas em 200 µL de meio celular completo em placas de 96 poços. A densidade celular foi de 2×10^4 células (MDAMB231) viáveis por poço. As células ficaram a aderir durante 24 h, seguindo-se a adição das várias diluições em meio (200 µL) do composto em ensaio. O composto em ensaio foi primeiramente solubilizado em DMSO (compostos **1a-3a** e **1b-3b**) ou em água (composições micelares) e depois no meio celular e adicionado às células em concentrações 1-100 µM. As concentrações finais de DMSO no meio foram inferiores a 0,5 %. Após as 24 h e 48 h de incubação, 37 °C/5% CO₂, o meio foi substituído por 200 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em tampão fosfatos-PBS). Após 3-4 h de incubação, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazano formados pelas células viáveis foram dissolvidos em DMSO (200 µL). A viabilidade celular foi avaliada medindo a absorvância a 570 nm, usando o espectrofotómetro de placas. A citotoxicidade do composto em ensaio foi quantificada calculando a concentração de fármaco que inibe o crescimento de 50 % das células (IC₅₀) (GraphPad Prism software).

6.3. Síntese e caracterização de co(polímeros) e macroligandos poliméricos

6.3.1. Ligando L1



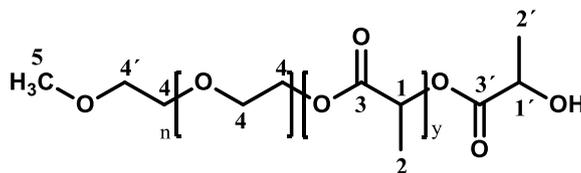
Para a síntese deste ligando utilizou-se 4,4'-bis(hidroxi metil)-2,2'-bipiridina (0,08 g; 0,37 mmol) como iniciador, D,L- Lactídeo (0,51 g; 3,5 mmol) como monómero e o DMAP (0,04 g; 0,33 mmol) como catalisador. A mistura foi colocada num banho de óleo a 135 °C durante 5 minutos. Ao fim deste tempo, adicionaram-se algumas gotas de uma mistura metanol:água para fazer o *quench* da reação. Seguidamente dissolveu-se a mistura em diclorometano e transferiu-se para um balão de fundo redondo contendo uma mistura de metanol e água (1:1 v/v). Os solventes foram evaporados até à *secura* conduzindo à precipitação do polímero. De seguida, este foi lavado duas vezes com éter etílico para retirar o excesso de DMAP. Por fim, secou-se sob vácuo.

Rendimento: 56%

¹H-RMN ((CD₃)₂CO, Me₄Si, δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 8,67 (d; 2; H1; ³J_{HH}= 4 Hz); 8,35 (s; 2; H4); 7,50 (s, 2, H2); 5,16 (s; 38; H6+H8); 4,36 (m; 2; H8'); 1,56 (m; 107; H9); 1,48 (m; 6; H9').

FTIR [KBr] (cm⁻¹): 3487 (estiramento O-H), 2962 (estiramento C-H aromático), 1753 (estiramento C=O da cadeia polimérica).

6.3.2. Ligando L2



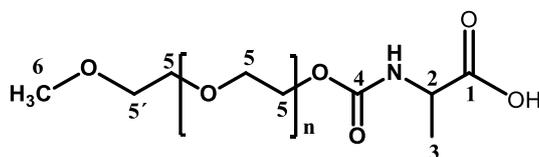
Para a síntese deste ligando utilizou-se PEG (2,8 g; 1,4 mmol) como iniciador, D,L- Lactídeo (1 g; 6,94 mmol) como monómero e DMAP (0,05 g; 0,41 mmol) como catalisador. A mistura foi colocada num banho de óleo a 135 °C durante 30 minutos. Findo o tempo reacional, adicionaram-se algumas gotas de acetona para fazer o *quench*

da reação. Dissolveu-se a mistura em diclorometano e transferiu-se para um balão de fundo redondo. Evaporou-se o solvente até à precipitação do copolímero. Por fim, o polímero foi lavado duas vezes com éter etílico e seco sob vácuo.

¹H-RMN (CDCl₃, Me₄Si, δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 5,11 (s; 9; H1); 4,28 (m; 3; H1'+H4'); 3,57 (s; 183; H4); 3,31 (s; 3; H5); 1,51 (s; 30; H2); 1,42 (s; 2; H2').

FTIR [KBr] (cm⁻¹): 3425 (estiramento O-H), 2885 (estiramento C-H alifático da cadeia polimérica), 1757 (estiramento C=O da cadeia polimérica).

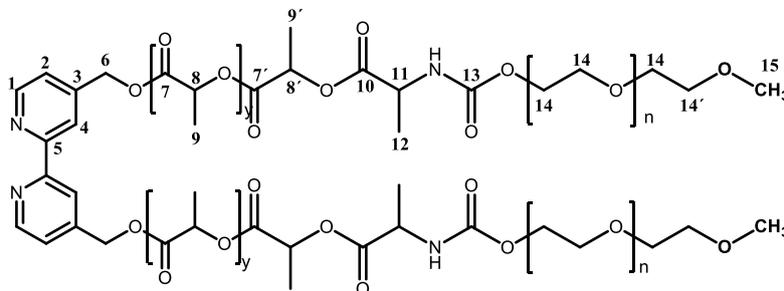
6.3.3. Intermediário L3



Colocou-se cerca de 20 ml de THF num balão de fundo redondo de 50 mL. Adicionou-se 1,1'-carbonildiimidazole (CDI) (0,17g; 1,05 mmol). Posteriormente adicionou-se PEG (1 g; 0,5 mmol). A mistura ficou a agitar durante 24 horas sob atmosfera de azoto. Filtrou-se a mistura para outro balão e evaporou-se o filtrado. Ao mesmo balão adicionaram-se 20 mL de solução tampão^c. Seguidamente adicionou-se D,L-Alanina (0,03 g; 0,3 mmol). Deixou-se agitar sob atmosfera de azoto e em banho de gelo, aproximadamente durante 24 horas. Findo o tempo reacional, o produto foi lavado duas vezes com metanol e secou-se sob vácuo.

¹H-RMN (CDCl₃, Me₄Si, δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 3,63 (s;111, H5), 3,37 (s; 3; H5).

6.3.4. Ligando L4



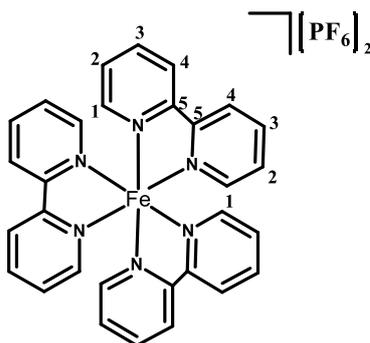
^cSolução de 0.1 M de carbonato de sódio com 100 mL de água destilada.

Este ligando anfifílico foi obtido a partir de uma reação de esterificação entre o ligando **L1** e o intermediário **L3**. Colocou-se num *Schlenk* **L1** (0,23 g; 0,13 mmol). Seguidamente adicionou-se 50 ml de THF, 44 μ L (0,31 mmol) de trietilamina (TEA) e seis espátulas de peneiros moleculares em pó. A mistura ficou a agitar sob atmosfera de azoto durante 40 minutos e à temperatura ambiente para desprotonar o álcool da cadeia terminal de **L1**. Findo o tempo reacional foi adicionado **L3** (0,57 g; 0,27 mmol) à mistura. Esta ficou sob agitação e refluxo durante seis horas. Deixou-se repousar, filtrou-se e evaporou-se o solvente. De seguida, o produto foi lavado duas vezes com água destilada e seco sob vácuo.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , Me_4Si , δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 8,67 (d; 1; H1; $^3J_{\text{HH}}=4$ Hz); 8,36 (s; 1; H4); 7,11 (s; 1; H2); 5,16 (s; 14; H6+H8); 4,36 (m; 3; H8'+H14'); 3,64 (s; 89; H14); 3,37 (s; 1; H15); 2,61 (s; 2; H12); 1,56 (m; 37; H9); 1,49 (m; 4; H9').

6.4. Síntese e caracterização de complexos

6.4.1. Síntese do complexo $[\text{Fe}(\text{bipy})_3][\text{PF}_6]_2$ (**1a**)



A síntese deste composto foi realizada de acordo com o procedimento descrito por *McAlvin et al.*⁵⁶

Colocou-se cerca de 225 mL de metanol num balão de 500 mL. Adicionou-se à solução $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,57 g; 1,45 mmol) e 2,2'-bipiridina (0,71 g; 4,55 mmol). A solução vermelha escura ficou sob agitação e à temperatura ambiente durante 3 horas. Findo o tempo reacional adicionou-se NH_4PF_6 (2,84 g; 17,42 mmol) e deixou-se a agitar também à temperatura ambiente durante trinta minutos. Seguidamente a solução foi filtrada e o produto foi lavado com água (2 x 10 mL), metanol (2 x 10 mL) e por fim éter etílico (2 x 10 mL). O produto obtido foi seco sob vácuo.

Rendimento: 65%

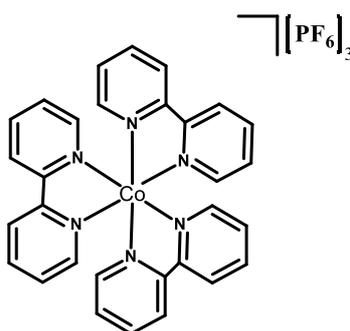
$^1\text{H-RMN}$ (MeOD , Me_4Si , δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 8,75 (d; 6; H1; $^3J_{\text{HH}}=8$ Hz); 8,19 (t; 7; H3; $^3J_{\text{HH}}=8$ Hz); 7,50 (s; 13; H2+H4).

FTIR [KBr] (cm^{-1}): 3089 (estiramento C-N aromático), 1606 (estiramento C=C aromático), 835 (estiramento P-F) e 557 (estiramento P-F).

UV-Vis [DMSO, $\lambda_{\text{máx}}$ / nm (ϵ / $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 292 (33832), 360 (sh), 491 (sh) e 534 (4553).

Análise Elementar experimental (calculada para $[\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{F}_{12}\text{FeN}_6\text{P}_2]$): C 43,1 (44,0), H 2,9 (3,3) e N 10,2 (10,1).

6.4.2. Síntese do complexo $[\text{Co}(\text{bipy})_3][\text{PF}_6]_3$ (2a)



A síntese deste composto foi realizada de acordo com o procedimento descrito por *Klahr et al.*⁵⁷

Colocou-se num *Schlenk* $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g; 1,05 mmol), dissolveu-se em 20 mL de metanol e desarejou-se. A solução apresentou uma cor roxa. Adicionou-se posteriormente 3 equivalentes de 2,2'-bipiridina (0,52 g; 3,29 mmol). Verificou-se que a solução passou de roxa para laranja-avermelhado. A solução foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas sob atmosfera de azoto. Seguidamente, colocou-se NH_4PF_6 em excesso (0,39 g; 2,39 mmol), deixou-se a agitar durante 30 minutos, tendo precipitado um composto amarelo que foi filtrado. Este foi lavado com etanol, metanol e éter etílico. Por fim recristalizou-se em diclorometano:*n*-hexano. O produto resultante amarelo foi seco sob vácuo durante a noite.

Rendimento: 74%

^1H -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, Me_4Si , δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 9,06 (d; 6; H1; $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz); 8,66 (t; 6; H3; $^3J_{\text{HH}} = 6$ Hz); 7,93 (t; 6; H2; $^3J_{\text{HH}} = 6$ Hz); 7,88 (d; 6; H4; $^3J_{\text{HH}} = 4$ Hz).

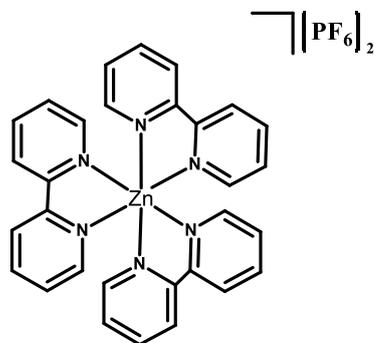
^{31}P -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, δ/ppm): -144,54 [septupletto, PF_6^-].

FTIR [KBr] (cm^{-1}): 3103 (estiramento C-N aromático), 1600 (estiramento C=C aromático), 837 (estiramento P-F) e 557 (estiramento P-F).

UV-Vis [DMSO, $\lambda_{\text{máx}}$ / nm (ϵ / $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 288 (12977).

Análise Elementar experimental (calculada para $[C_{31}H_{27}CoF_{18}N_6P_3]$): C 44,2 (38,1), H 2,8 (2,8) e N 10,3 (8,6).

6.4.3. Síntese do complexo $[Zn(bipy)_3][PF_6]_2$ (3a)



A síntese deste composto foi realizada de acordo com o procedimento descrito por *Yadav et al.*⁵⁸

Colocou-se num *Schlenk* $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ (0,09 g; 0,41 mmol) e dissolveu-se em 20 mL de metanol. Adicionou-se à solução incolor 2,2'-bipiridina (0,25 g; 1,6 mmol). A reação decorreu sob refluxo e sob atmosfera de azoto durante 24 horas. Depois das 24 horas de refluxo, deixou-se arrefecer a solução até à temperatura ambiente e adicionou-se NH_4PF_6 (0,95 g; 5,8 mmol). A suspensão branca foi novamente levada a refluxo durante mais 24 horas sob atmosfera de azoto. Findo o tempo reacional, deixou-se arrefecer e repousar até precipitar um produto branco. Seguidamente separaram-se as duas fases e evaporou-se o solvente até ao limite da precipitação. Posteriormente adicionou-se 20 mL de água e a solução foi guardada a 4 °C durante uma hora. O produto foi obtido por evaporação lenta obtendo-se cristais cor-de-rosa. Por fim o produto foi seco sob vácuo.

Rendimento: 97%

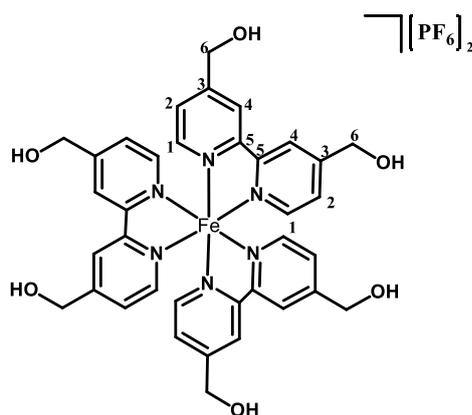
1H -RMN (MeOD, Me_4Si , δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 8,78 (d; 6; H1; $^3J_{HH} = 8$ Hz); 8,48 (d; 6; H4; $^3J_{HH} = 8$ Hz); 8,27 (t; 6; H3; $^3J_{HH} = 6$ Hz); 7,74 (m; 6; H2; $^3J_{HH} = 6$ Hz).

^{31}P -RMN (MeOD, δ/ppm): -144,61 [septupletto, PF_6^-].

FTIR [KBr] (cm^{-1}): 3116 (estiramento C-H aromático), 1608 (estiramento C=C aromático), 831 (estiramento P-F) e 557 (estiramento P-F).

UV-Vis [DMSO, $\lambda_{m\acute{a}x}/nm$ ($\epsilon / M^{-1}cm^{-1}$): 287 (10429).

6.4.4. Síntese do complexo [Fe(bipy-CH₂OH)₃][PF₆]₂ (1b)



Dissolveu-se (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O (0,31 g; 0,79 mmol) em 22,5 mL de metanol. Adicionou-se à solução 4,4'-bis(hidroxiometil)-2,2'-bipiridina (0,49 g; 2,27 mmol). A mistura ficou a agitar durante três horas sob atmosfera de azoto. Findo o tempo reacional adicionou-se NH₄PF₆ (1,42 g; 8,71 mmol) e deixou-se agitar durante trinta minutos. Seguidamente o produto foi filtrado e lavado duas vezes em diclorometano seco. Por fim o produto foi recristalizado em metanol:éter etílico e seco sob vácuo.

Rendimento: 48%

¹H-RMN ((CD₃)₂CO), Me₄Si, δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 8,77 (s; 6; H4); 7,65 (d; 6; H1; ³J_{HH}= 4 Hz); 7,54 (d; 6; H2; ³J_{HH}= 4 Hz); 4,92 (s; 12; H6).

³¹P-RMN ((CD₃)₂CO), δ/ppm): -143,69 [septupeto, PF₆⁻].

¹³C-RMN [Acetona-*d*6, δ/ppm (atribuição)]: 62,83 (C6); 121,81 (C4); 125,65 (C2); 154,46 (C1); 156,34 (C3); 160,01 (C5).

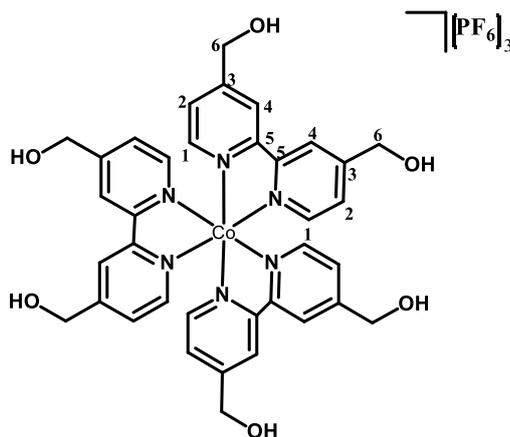
FTIR [KBr] (cm⁻¹): 3290 (estiramento O-H), 1618 (estiramento C=C aromático), 842 (estiramento P-F) e 559 (estiramento P-F).

UV-Vis [DMSO, λ_{máx}/ nm (ε / M⁻¹cm⁻¹): 295 (37831); 360 (sh); 488 (sh); 537 (4608).

[MeOH, λ_{máx}/ nm (ε / M⁻¹cm⁻¹): 300 (53072); 357 (sh); 490 (sh); 531 (8646).

Análise Elementar: experimental (calculada para [C₃₆H₃₆F₁₂FeN₆O₆P₂]): C 39,0 (43,5), H 3,6 (3,6) e N 8,4 (8,5).

6.4.5. Síntese do complexo [Co(bipy-CH₂OH)₃][PF₆]₃ (2b)



Dissolveu-se CoCl₂.6H₂O (0,18 g; 0,76 mmol) em 20 mL de metanol. Aquando da adição, a solução apresentou uma cor roxa. Foram adicionados à solução metanólica 3 equivalentes de 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina (0,41 g; 1,9 mmol). A solução amarela alaranjada resultante foi agitada sob atmosfera de azoto durante 2 horas. Findo o tempo reacional, foi adicionado um excesso de NH₄PF₆ (0,23 g; 1,4 mmol) tendo precipitado um composto amarelo. Após 30 min. de agitação deixou-se repousar durante breves minutos e o produto formado foi filtrado e lavado duas vezes com metanol, sendo que entre as lavagens o *Schlenk* foi colocado no frio para ajudar a precipitação do composto. O produto formado foi seco sob vácuo.

Rendimento: 43%

¹H-RMN (DMSO-*d*₆, Me₄Si, δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 8,94 (s; 6; H4); 7,70 (d; 6; H2; ³J_{HH}= 4 Hz); 7,42 (s; 5; H1; ³J_{HH}= 4 Hz); 4,85 (d; 11; H6; ³J_{HH}= 4 Hz).

³¹P-RMN (DMSO, δ/ppm): -144,33 [septupletto, PF₆⁻].

¹³C-RMN [DMSO-*d*₆, δ/ppm (atribuição)]: 60,96 (C6); 123,65 (C4); 127,91 (C1); 150,38 (C2); 154,74 (C5); 160,60 (C6).

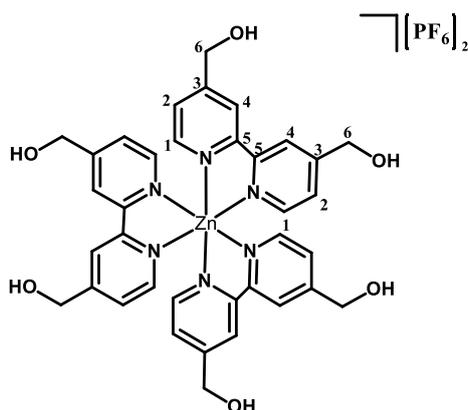
FTIR [KBr] (cm⁻¹): 3410 (estiramento O-H), 1620 (estiramento C=C aromático), 844 (estiramento P-F) e 557 (estiramento P-F).

UV-Vis [DMSO, λ_{máx}/ nm (ε / M⁻¹cm⁻¹): 287 (25677); 317 (23696); 468 (54).

[MeOH, λ_{máx}/ nm (ε / M⁻¹cm⁻¹): 250 (sh) e 306 (25579).

Análise Elementar: experimental (calculada para [C₃₆H₃₆CoF₁₈N₆O₆P₃]): C 35,7 (37,8), H 3,8 (3,2) e N 9,1 (7,4).

6.4.6. Síntese do complexo [Zn(bipy-CH₂OH)₃][PF₆]₂ (3b)



A síntese deste composto foi realizada de acordo com o procedimento descrito por *Yadav et al.*⁵⁸

Colocou-se num *Schlenk* Zn(CH₃COO)₂.2H₂O (0,08 g; 0,36 mmol) e dissolveu-se em 20 mL de metanol. Adicionou-se à solução 4,4'-bis(hidroximetil)-2,2'-bipiridina (0,26 g; 1,20 mmol). Deixou-se a solução em refluxo durante 24 horas. Após este tempo reacional, a solução límpida foi arrefecida à temperatura ambiente e adicionou-se NH₄PF₆ (0,95 g; 5,8 mmol). A suspensão branca foi novamente aquecida a refluxo durante mais 24 horas sob atmosfera de azoto. Findo o tempo reacional, deixou-se arrefecer e repousar até precipitar o produto branco formado. Seguidamente separam-se as duas fases e evaporou-se o solvente até ao limite da precipitação. Posteriormente adicionou-se 20 mL de água e a solução foi guardada no frio durante aproximadamente uma hora. Por fim, o produto foi obtido por evaporação lenta obtendo-se um sólido cor-de-rosa, que foi posteriormente seco sob vácuo.

Rendimento: 58%

¹H-RMN (MeOD, Me₄Si, δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 8,63 (s; 6; H4); 7,99 (d; 5; H1; ³J_{HH}= 4 Hz); 7,64 (d; 6; H2; ³J_{HH}= 4 Hz); 4,93 (s; 60; H6).

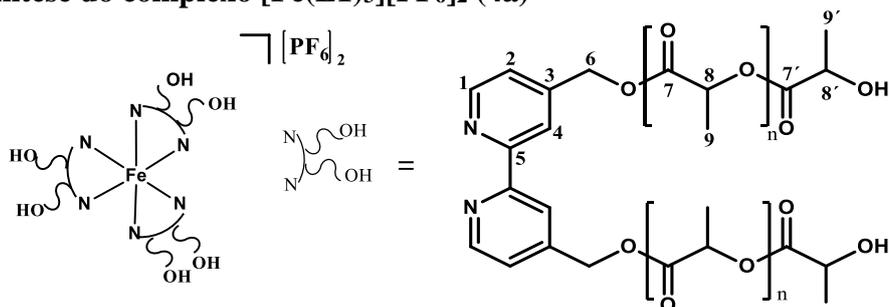
³¹P-RMN (MeOD, δ/ppm): -144,61 [septupletto, PF₆⁻].

¹³C-RMN [MeOD, δ/ppm (atribuição)]: 63,05 (C6); 121,38 (C4); 125,65 (C2); 148,71 (C1); 150,66 (C5); 159,40 (C3).

FTIR [KBr] (cm⁻¹): 3398 (estiramento O-H), 2906 (estiramento C-H aromático), 1618 (estiramento C=C aromático), 846 (estiramento P-F) e 559 (estiramento P-F).

UV-Vis [DMSO, λ_{máx}/ nm (ε / M⁻¹cm⁻¹): 288 (17986).

6.4.7. Síntese do complexo [Fe(L1)₃][PF₆]₂ (4a)



Dissolveu-se o ligando **L1** (0,24 g; 0,15 mmol) em 22,5 mL de metanol. Adicionou-se à mistura (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O (0,03 g; 0,08 mmol). A solução vermelha escura resultante ficou a agitar durante três horas sob atmosfera de azoto. Findo o tempo reacional adicionou-se NH₄PF₆ (0,12 g; 0,74 mmol). Deixou-se a solução a agitar mais 30 minutos. Seguidamente o solvente foi evaporado e lavado três vezes com n-hexano. Por fim o sólido vermelho escuro obtido foi seco sob vácuo.

Rendimento: 32 %

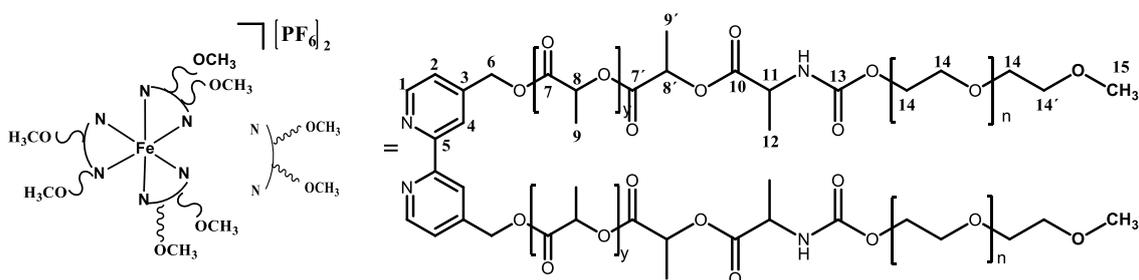
¹H-RMN ((CD₃)₂CO), Me₄Si, δ/ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 8,41 (s; 2; H1); 7,41 (s; 2; H2+H4); 5,16 (s; 16; H6+H8); 4,34 (s; 1; H8'); 1,54 (m; 51; H9+H9').

³¹P-RMN ((CD₃)₂CO), δ/ppm): -144,33 [septupeto, PF₆⁻].

FTIR [KBr] (cm⁻¹): 3417 (estiramento O-H), 2997 (estiramento C-H aromático), 1620 (estiramento C=O da cadeia polimérica), 846 (estiramento P-F) e 559 (estiramento P-F).

UV-Vis [DMSO, λ_{máx}/ nm (ε / M⁻¹cm⁻¹): 315 (6925), 361 (sh), 541 (2853).

6.4.8. Síntese do complexo [Fe(L4)₃][PF₆]₂ (4b)



Dissolveu-se o ligando **L4** (0,16 g; 0,019 mmol) em 2 mL de clorofórmio num *Schlenk*. Após a dissolução do copolímero na sua totalidade, adicionou-se mais 18 mL de clorofórmio e (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O (0,09 g; 0,23 mmol). A reação decorreu durante 96 horas sob agitação e atmosfera inerte. A reação foi seguida por TLC usando como eluente

uma mistura diclorometano:metanol (4 mL:200 μ L). Findo o tempo reacional o solvente foi evaporado e o produto formado foi lavado duas vezes com água destilada.

^1H -RMN ((CDCl_3), Me_4Si , δ /ppm) (multiplicidade, integração, atribuição): 8,68 (s; 1; H1); 8,37 (s; 1; H4); 5,18 (s; 12; H6+H8); 4,36 (m; 4; H8'+H14'); 3,64 (s; 77; H14); 3,38 (s; 1; H15); 1,56 (m; 33; H9); 1,26 (m; 1; H9').

^{31}P -RMN ((CD_3) $_2\text{CO}$), δ /ppm): -144,33 [septupletto, PF_6^-].

6.5. Preparação das micelas poliméricas

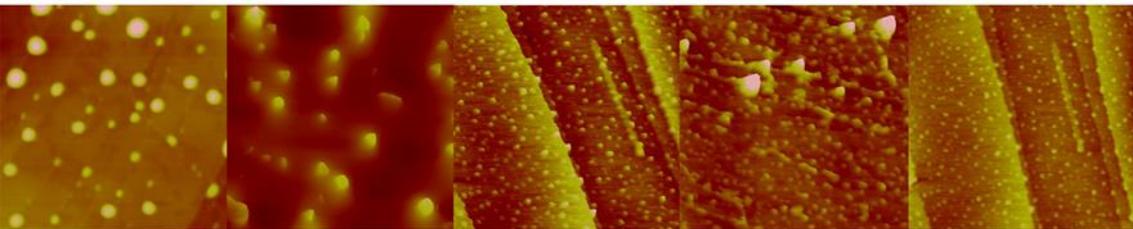
6.5.1. Método evaporação do co-solvente

As micelas poliméricas foram preparadas segundo o procedimento descrito por *Yang et al.*⁶¹

Dissolveu-se o complexo **1a** (0,004 g; 0,03 mmol) em 4 mL de diclorometano. Após este estar completamente dissolvido, adicionou-se à solução cor-de-rosa resultante **L2** (0,40 g; 0,12 mmol). Posteriormente adicionou-se 6 mL de água destilada. Colocou-se a mistura num equipamento de ultrassons por breves minutos de modo a criar uma emulsão. Por fim, deixou-se a agitar durante a noite para a evaporação do co-solvente. No dia seguinte foi caracterizado por microscopia de força atômica (AFM). O mesmo procedimento foi utilizado para a preparação das nanopartículas dos complexos **2a** e **3a**.

6.5.2. Método de dissolução direta

Dissolveu-se o composto **4b** (0,0021 g) em 2 mL de THF. Posteriormente colocou-se a mistura num equipamento de ultrassons durante 15 min. De seguida adicionou-se cerca de 2 mL de água. Finalmente evaporou-se o solvente orgânico no rotavapor. Nesse mesmo dia as nanopartículas foram caracterizadas por microscopia de força atômica (AFM).



Referências Bibliográficas

- [1] Pelengaris, S. & M. Khan, *The Molecular Biology of Cancer*, University of Warwick, **2007**.
- [2] Kamangar, F., Dores, G.M., Anderson W.F., Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J. Clin. Oncol.* 24 (**2006**) 50-2137.
- [3] Organization, W.H., *World Health Statistics*. WHO Press. **2007**, Geneva.
- [4] Rodzinski, A.; Guduru ,R.; Liang, P.; Hadjikhani, A.; Stewart. T *et al* Targeted and controlled anticancer drug delivery and release with magnetoelectric nanoparticles, *Scientific Reports*127 (**2010**) 2893–2917.
- [5]<http://www.cancronafamilia.com/pt/biologia-do-cancro/numeros-da-doenca/cancro-no-mundo/> data de acesso: 09/05/2016
- [6] Hanhan, D. & Weinberg, Robert A.; The Hallmarks of cancer *Front. Physiol.* 100 (2000) 57-70.
- [7] McCarroll, J.; Teo, J., Boyer, C., Goldstein , D., Kavallaris, M. , Phillips, P.A., Potential applications of nanotechnology for the diagnosis and treatment of pancreatic cancer, *Front. Physiol.* 5 (**2014**) 1–10.
- [8] Feng S.S., Chemotherapeutic engineering: Concept, feasibility, safety and prospect-a tribute to shu chien's 80th birthday, *Cell. Mol. Bioeng.* 4 (**2011**) 708–716.
- [9] Kushwaha, S., A. Rai, Rastogi, Singh S., Carbon nanotubes as a novel drug delivery system for anticancer drug: A Review, *Brazilian J. Pharm. Scien.* 4 (**2012**) 542–553.
- [10] Bergamo, A. & G. Sava, G., Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases, *Chem. Soc. Rev.* 44 (**2015**) 8818–8835.
- [11] Trudu, F., Amato, F., Vañhara, P. , Pivetta, T. , Peña-Méndez, E.M. , J. Havel, Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives, *J. Appl. Biomed.* 13 (**2015**) 79–103.
- [12] Dasari. S. & Tchounwou, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (**2014**) 364–378.
- [13] Guerra, W. , Silva, H., De Almeida, M.V., Fontes, A.P.S., Síntese e caracterização de um novo complexo de platina (IV) a partir de seu análogo de platina (II) utilizando iodo molecular como agente oxidante: Uma rota sintética interessante para obtenção de novos complexos de platina, *Quim. Nova.* 30 (**2007**) 56–58.

- [14] Norton de Matos, M., Complexos Metálicos na terapêutica do Cancro, *Soc. Port. Química.* (2001) 61–68.
- [15] Duncan, R. & Gaspar, R. , Nanomedicine(s) under the microscope, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 2101–2141.
- [16] Couvreur, P., Tulkenst, P., Roland, M., Trouet, A., Speiser, P., Nanocapsules: A new type of lysosomotropic carrier, *FEBS Lett.* 84 (1977) 323–326.
- [17] Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices.,*J. Control. Release.* 70 (2001) 1–20.
- [18] Gaucher, G., Dufresne, M.-H., Sant, V.P., Kang, N., D. Maysinger, D., J.-C. Leroux, J.-C., Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery., *J. Control. release.* 109 (2005) 169–188.
- [19] Bader, H., Ringsdorf, H., Schmidt, B., Watersoluble polymers in medicine, *Die Angew. Makromol. Chemie.* 124 (1984) 457–485.
- [20] Joshi, J. a Y.R. & Patel, R.P., Role of biodegradable polymers in drug delivery, *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 4 (2012) 74–81.
- [21] Barbanti, S.H., Zavaglia, C.A.C., Duek, E.A.R., Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos, *Ciência e Tecnol.* 15 (2005) 13–21.
- [22] Valente, A. & Garcia, M.Helena. Syntheses of Macromolecular Ruthenium Compounds: A New Approach for the Search of Anticancer Drugs, *J. Inorganics* 2 (2014) 96–114.
- [23] Li, C.J., Miyamoto, Y., Kojima, Y., Maeda, H., Augmentation of tumour delivery of macromolecular drugs with reduced bone marrow delivery by elevating blood pressure, *Br. J. Cancer* 67 (1993) 975-980.
- [24] Valente, A., Garcia, M.Helena., Marques, F., Miao, Y., Rousseau, C., Zinck, P., First polymer «ruthenium-cyclopentadienyl» complex as potential anticancer agent, *J. Inorg. Biochem.* 127 (2013) 79–81.
- [25] Tomaz, A.I., Jakusch, T., Morais ,T.S., F. Marques, F., De Almeida, R.F.M., Mendes, F. Enyedy, E., Santos, I., Pessoa, J.C., Kiss, Tamás., Garcia, M.Helena, Cytotoxic activity and interaction with human serum albumin, *J. Inorg. Biochem.* 117 (2012) 261–269.
- [26] Mendes, N., Tortosa, F., Valente, A., Marques, F. Matos, A., Morais, T. S., Tomaz, A.I., Gärtner, F., Garcia, M. Helena., In vivo Performance of a Ruthenium-

Cyclopentadienyl Compound in a Orthotopic Triple Negative Breast Cancer Model, *Anti-cancer End. in Med. Chem.* **2016**

[27] T. S. Ferreira Morais in Síntese de novos complexos bioorganometálicos de Ruténio e avaliação das duas propriedades antitumorais, Tese de Doutoramento em Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, **2013**

[28] Garcia, M. Helena., Valente, A., Morais, T.S., A. Tomaz, A.I., Macromolecular Transition Metal Complexes For Treatment Of Cancer And Process For Their Preparation, PCT/IB2015/002312

[29] G. M. Magalhães Nogueira in Functionalization of biocompatible polyesters with substrates of biological interest via organocatalyzed ring-opening polymerization: application in cancer therapy, Tese de Mestrado em Química Tecnológica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, **2015**.

[30] Jahanshahi, M. & Babaei, Z., Protein nanoparticle : A unique system as drug delivery vehicles, *J. Biotechnol.* 7 (**2008**) 4926–4934.

[31] L.M. Martins Rico in Sistemas Nanoparticulados e a vetorização de fármacos no tratamento do cancro, Dissertação de Mestrado Intergrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade do Algarve, **2013**.

[32] C.I. Correia Crucho in Synthesis of Polymeric Nanoparticles for biomedical delivery applications, Tese de Doutoramento em Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, **2015**.

[33] Speiser, P.P., Non-liposomal nanocapsules, methodology and application, *Front. Biol.* 48 (**1979**) 653-668.

[34] Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P.M., Radovic-Moreno, A.F., Farokhzad, O.C., Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation., *Chem. Soc. Rev.* 41 (**2012**) 2971–3010.

[35] Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z., Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (**2008**) 1650–1662.

[36] Palombo, M., Deshmukh, M., Myers, D., Gao, J., Szekely, Z., Sinko, P.J., Pharmaceutical and Toxicological Properties of Engineered Nanomaterials for Drug Delivery, *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54 (**2014**) 581-598.

[37] Le Garrec, D., Ranger, M., Leroux, J.C., Micelles in Anticancer Drug Delivery, *Am. J. Drug Deliv.* 2 (**2004**) 15–42.

- [38] Pitto-Barry, A. & Barry, N.P.E. , Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances, *Polym. Chem.* 5 (2014) 3291–3297.
- [39] V.L.Domingues Silva in Micelas Poliméricas e Nanopartículas de Lípidos Sólidos, Contendo Paclitaxel, para Terapêutica de Cancro da Mama, Tese de Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, 2013.
- [40] Frank, A., Pridgen, E., Molnar, L. K., Farokhzad, O.C., Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, 5 (2008), 15-505.
- [41] Biswas, S., Kumari, P., Lakhani, P.M., Ghosh, B., Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery, *European J. of Pharm. Scienc.* 83 (2016) 184–202.
- [42] Attwood, D. & Booth, C., Solubilization of a Poorly Soluble Aromatic Drug by Micellar Solutions of Amphiphilic Block Copoly(oxyalkylene)s, *Colloid Stab. Appl. Pharm.* 3 (2011) 61–78.
- [43] Nie, S., Xing, Y., Kim, G.J., Simons, J.W., Nanotechnology Applications in Cancer, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9 (2007) 88-257.
- [44] Cavalcante, I., Introdução- Copolímeros em Blocos, Programa Pós-Graduação em Química da UFC. (2011) 16–91.
- [45] Kumar, R.S., Riyasdeen, A., Dinesh, M., Paul, C.P., Srinag, S., Krishnamurthy, H., Cytotoxic Property of Surfactant – Cobalt (III) Complexes on a Human Breast Cancer Cell Line, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 344 (2011) 422–430.
- [46] Devereux, M., Shea, D.O., Mccann, M., Geraghty, M., Sullivan, L.O., Insights into the mode of action of the anti-candida activity of 1,10-Phenanthtoline and its metal chelates, *Metal Based Drugs*, 4 (2000) 185–193.
- [47] He, W., Y. Feng, Y., Li, X., Wei, Y., Yang, X., Availability and toxicity of Fe (II) and Fe (III) in Caco-2 cells *, *J. Zhejiang Univ. Sci B* 9 (2008) 707–712.
- [48] Wai, K., Ling, H., Shen, F., Cheah, S., Hee, C., Soo, K., et al., Towards a selective cytotoxic agent for prostate cancer: Interaction of zinc complexes of polyhydroxybenzaldehyde thiosemicarbazones with topoisomerase I, *Polyhedron.* 38 (2012) 275–284.
- [49] Polym, J., Gupta , A . P . & Kumar , V . New emerging trends in synthetic biodegradable polymers Polylactide : a critique . Eur . New emerging trends in synthetic biodegradable, 43 (2007) 4053-4074.

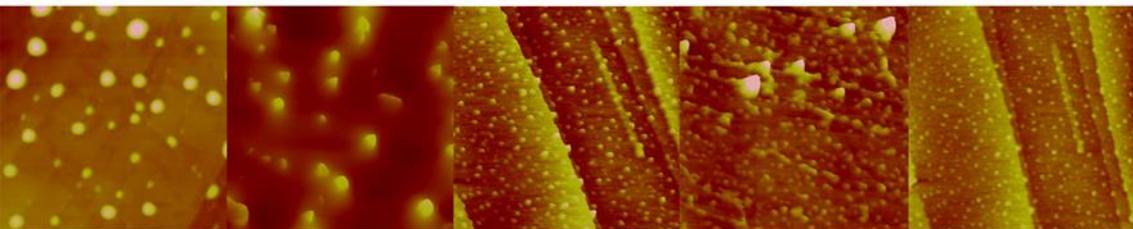
- [50] Albertsson, A. & Varma, I.K., Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications, *Biomacromolecules* 4 (2003) 1466–1486.
- [51] Lu, S. & Anseth, K.S., Release Behavior of High Molecular Weight Solutes from Poly (ethylene glycol) -Based Degradable Networks, *Macromolecules* 33 (2000) 2509–2515.
- [52] J.U. Izunobi, C.L. Higginbotham, Polymer Molecular Weight Analysis by ¹H NMR Spectroscopy, *J. Chem. Educ.* 88 (2011) 1098–1104.
- [53] Shahabadi, N. & Mahdavi, M. DNA Interaction Studies of a Cobalt (II) Mixed-Ligand Complex Containing Two Intercalating Ligands: 4,7-Dimethyl-1, 10-Phenanthroline and Dipyrido [3,2- α :2',3'-c] phenazine, *ISRN- Inorganic Chem.* 2013 (2013) 1–8.
- [54] Munteanu, C.R., & Sutharalingam K., Advances in Cobalt complexes as Anticancer Agents, *Dalton Transactions- Royal Society of Chem.*, (2015) 1-19
- [55] Osinsky, S., Levitin, I., Bubnovskaya, L., Sigan, A., Ganusevich, I., Selectivity of effects of redox-active cobalt (III) complexes on tumor tissue, , 26 (2004) 140–144.
- [56] Mcalvin, J.E., Scott, S.B., Fraser, C.L., Synthesis of Thermo-chromic Iron (II) Tris (bipyridine) -Centered Star-Shaped Polyoxazolines and Their Bipyridine-Centered Macroligand Counterparts, *Macromolecules*, 33 (2000) 6953–6964.
- [57] Klahr, B.M. & Hamann, T.W., Performance Enhancement and Limitations of Cobalt Bipyridyl Redox Shuttles in Dye-Sensitized Solar Cells, *J. Phys. Chem. C.* 113 (2009) 14040–14045.
- [58] Yadav, Y.J., Mastropietro, T.F., Szerb, I., Talarico, A.M., Pirillo, S., Pucci, D., substituents on the crystalline solid state properties, *New J. Chem.*, 37 (2013) 1486–1493.
- [59] Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75 (2010) 1–18.
- [60] Souto, E.B., Severino, P., Santana, Maria Helena A., Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de polímeros pré-formados- Parte II, *Polímeros*, vol.22, 1 (2012) 101–106.
- [61] Yang., Y.G., Du, L.I.U., Yu, X.I.A. Yan-hui, Z., Xue-yun, Z., Jie, L.I.U., Development of NAMI-A-loaded PLGA-mPEG Nanoparticles: Physicochemical Characterization , in vitro Drug Release and in vivo Antitumor Efficacy, *Chem. Res. Chinese Univer.* 27 (3) (2011) 345–349.

[62] Gaumet, M. , Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., Nanoparticles for drug delivery : The need for precision in reporting particle size parameters, *European J. Pharm. and Biopharm.* 69 (2008) 1–9.

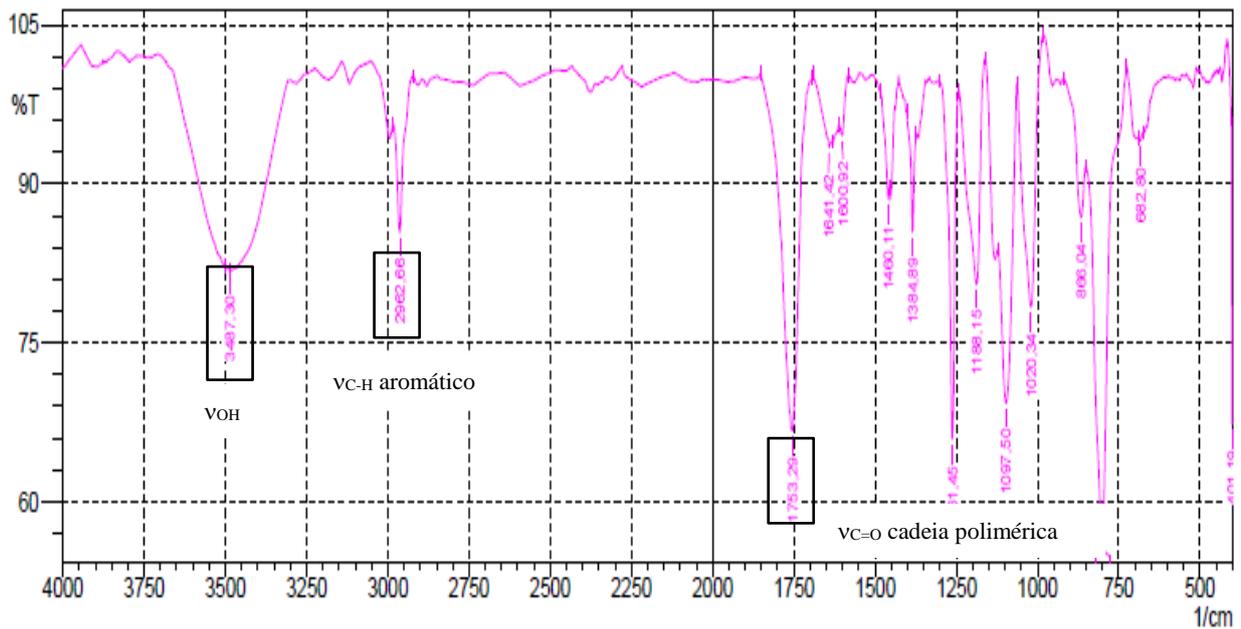
[63] Gratton, S.E.A., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E., The effect of particle design on cellular internalization pathways, *California Institute of Technology, Cell Biology*, 105 (2008) 11613-11618.

[64] Bajaj, S., Singla, D., Sakhuja, N., Stability Testing of Pharmaceutical Products, *J. of Applied Pharma. Science* 02 (03) (2012) 129–138.

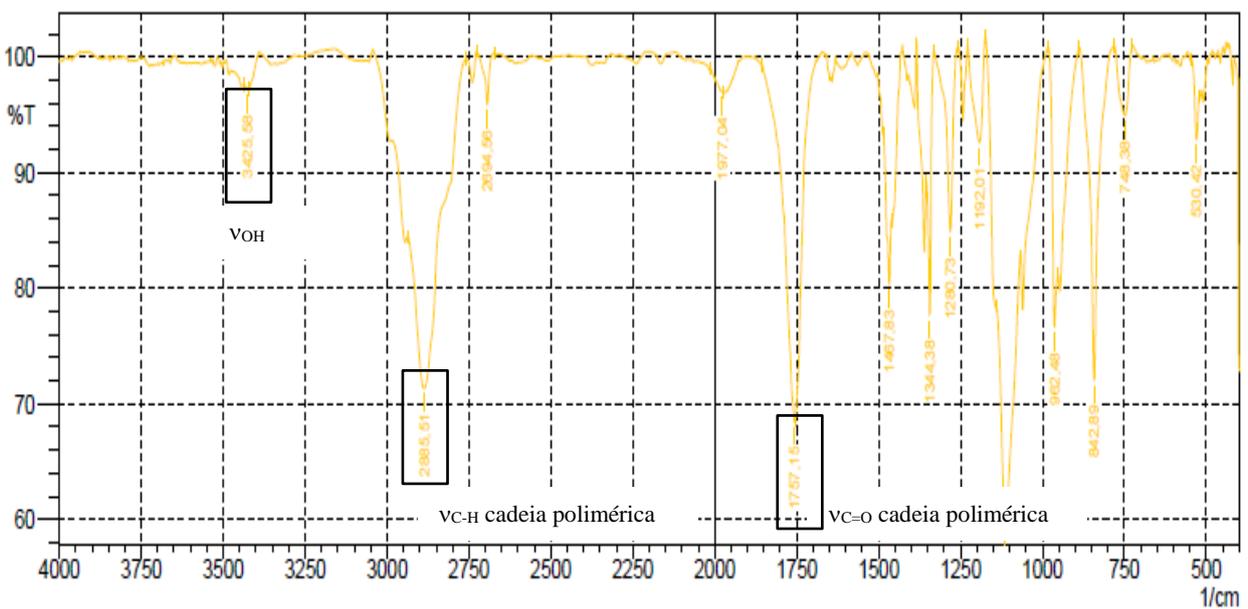
[65] Armarego, W.L.F. & Perrin, D.D., Purification of Laboratory Chemicals, Butterworth Heinemann, Fourth Edition, **1980**.



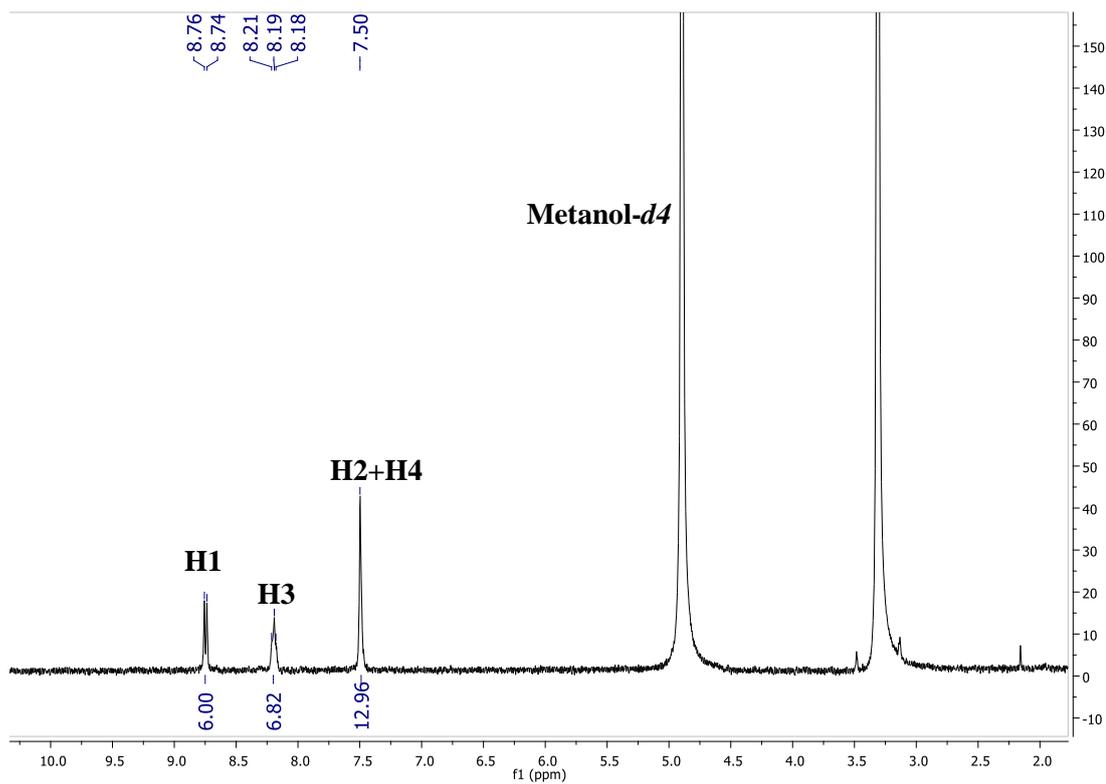
Anexos



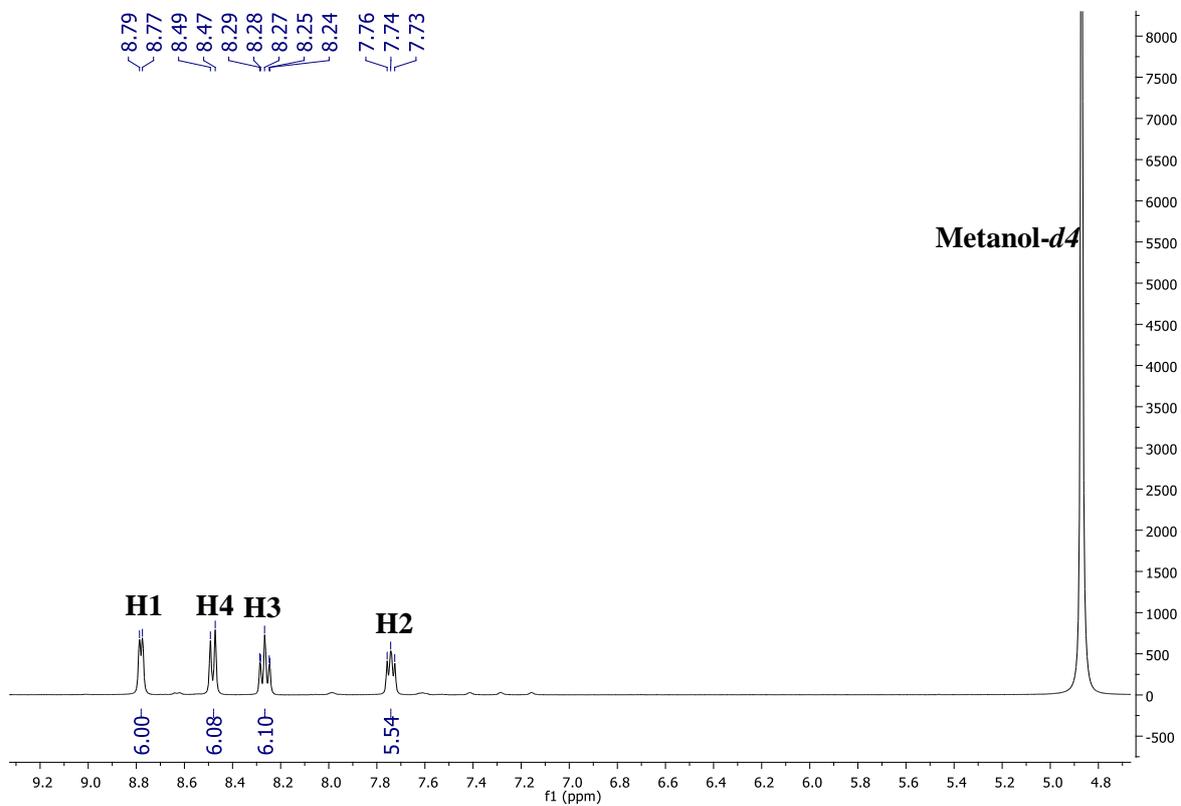
Anexo 1. Espectro de FTIR do ligando L1.



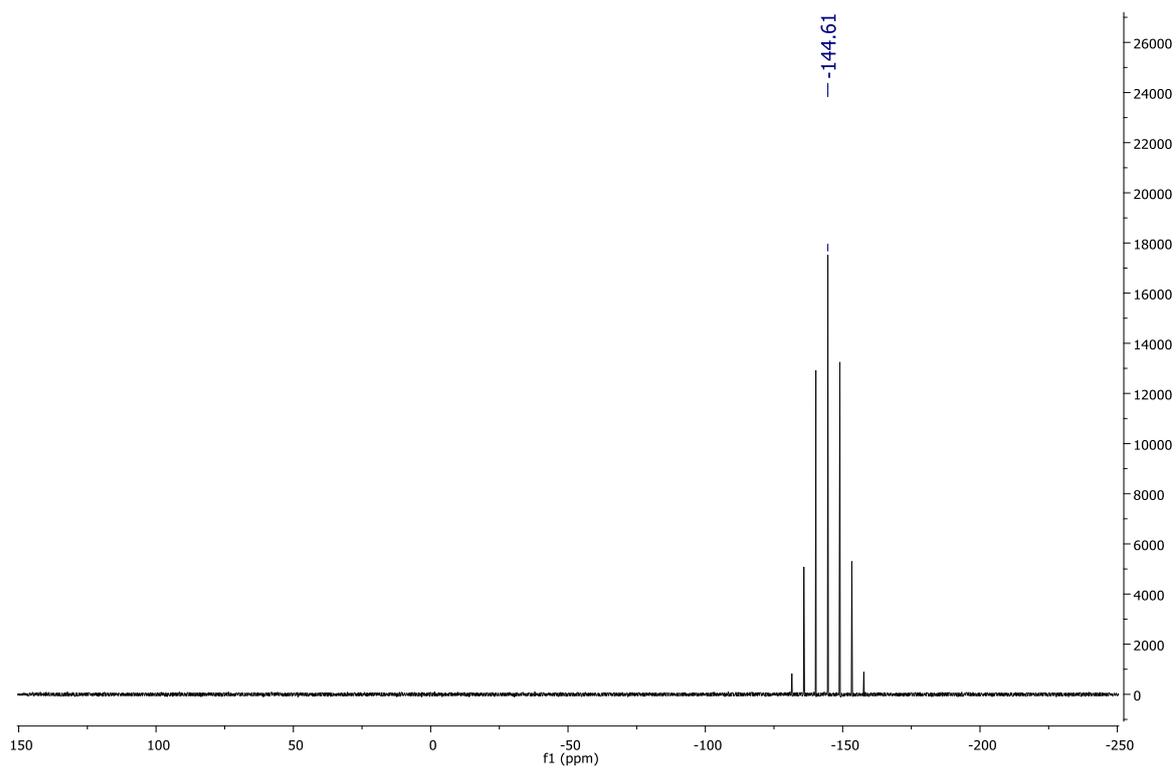
Anexo 2. Espectro de FTIR do ligando L2.



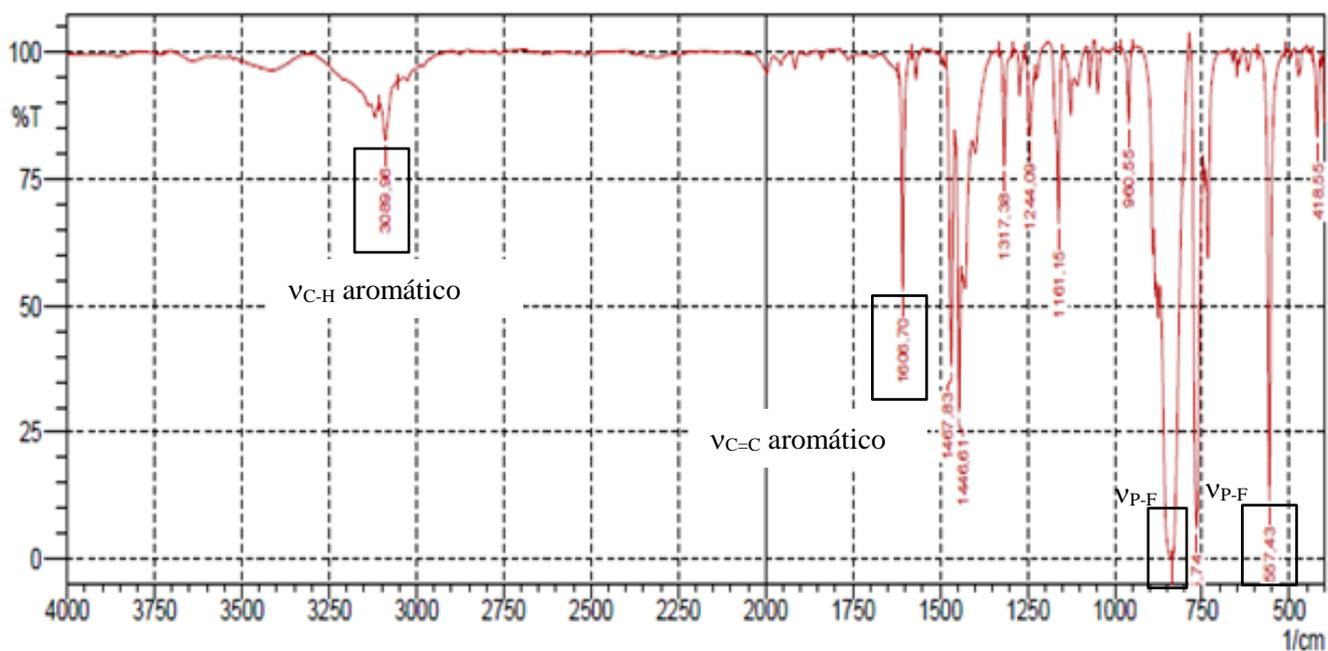
Anexo 3. Espectro de ¹H-RMN do composto **1a** em metanol-*d*₄.



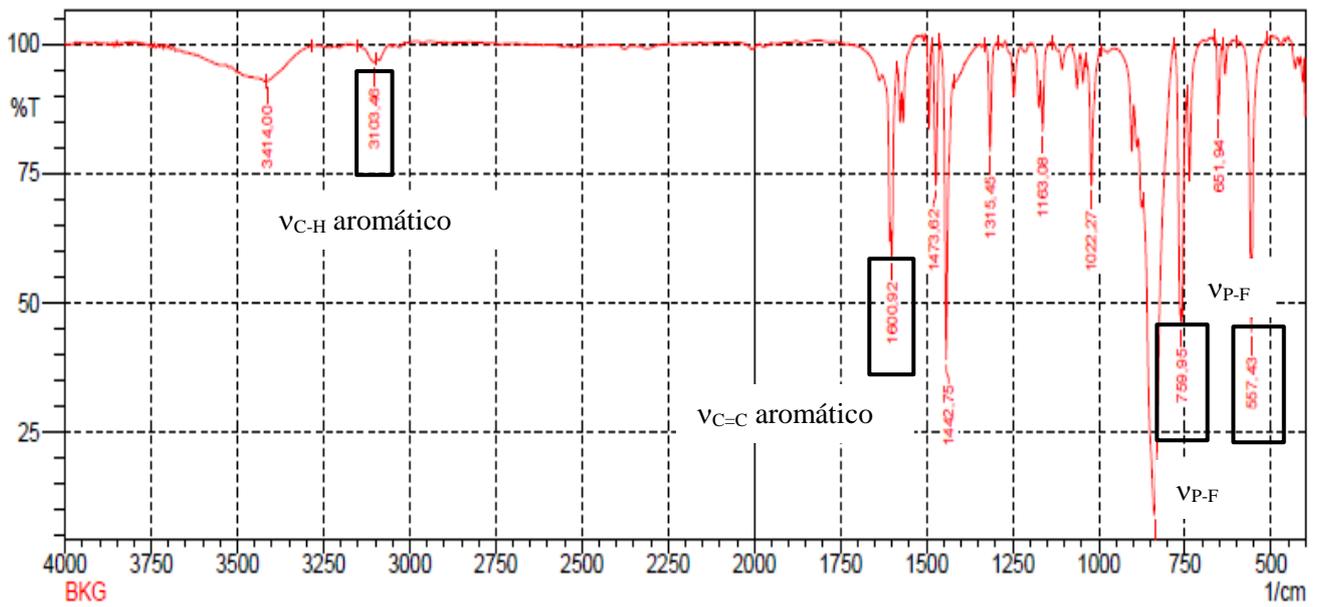
Anexo 4. Espectro de ¹H-RMN do composto **3a** em metanol-*d*₄.



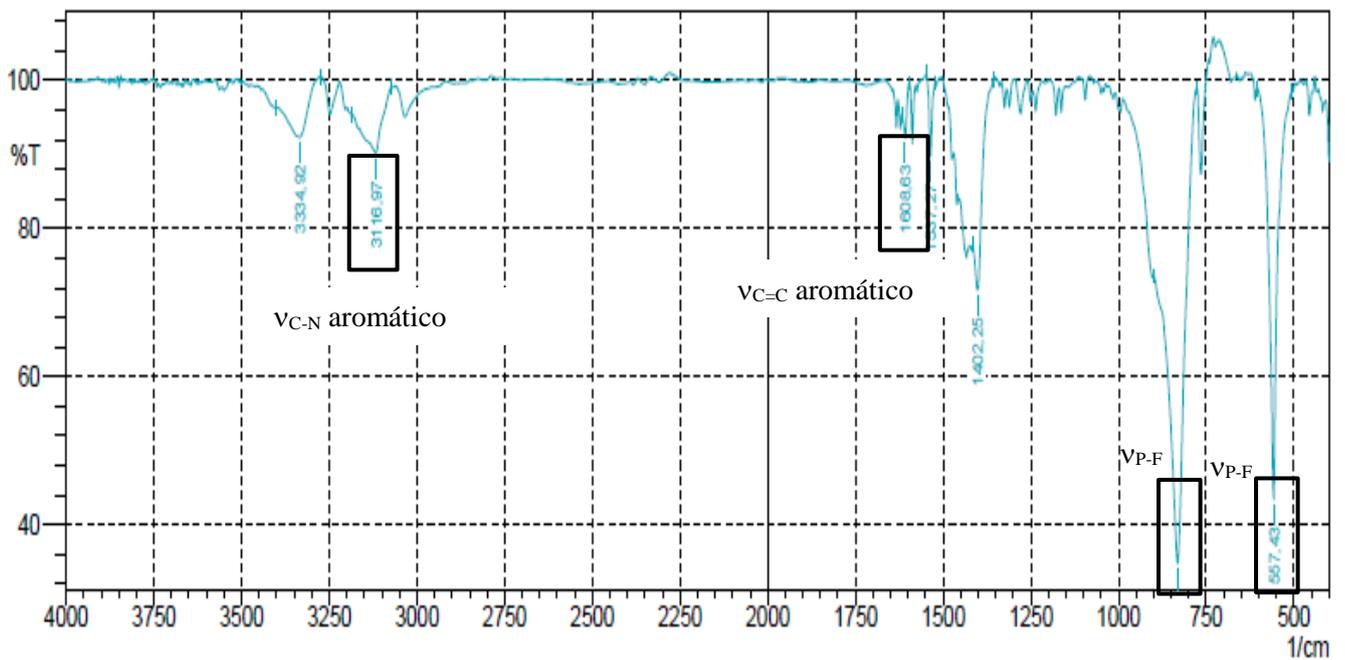
Anexo 5. Espectro de ^{31}P -RMN do composto **3a** em metanol- d_4 .



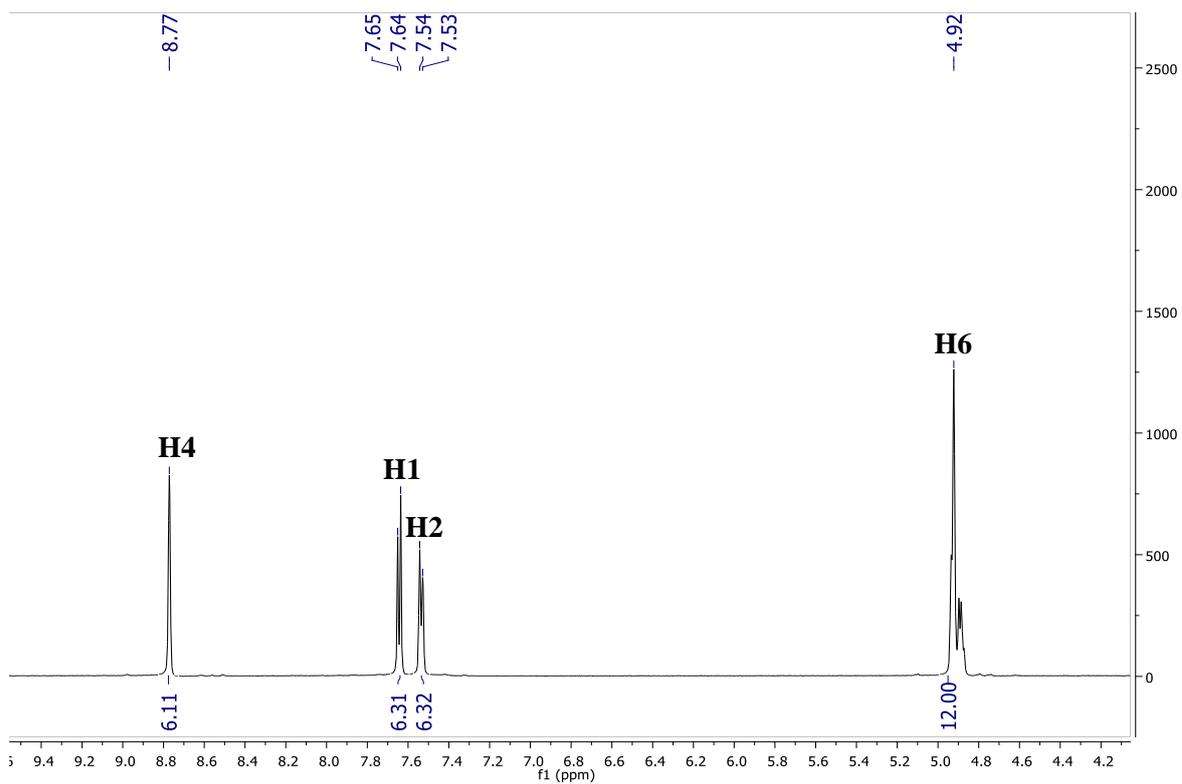
Anexo 6. Espectro de FTIR do composto **1a**.



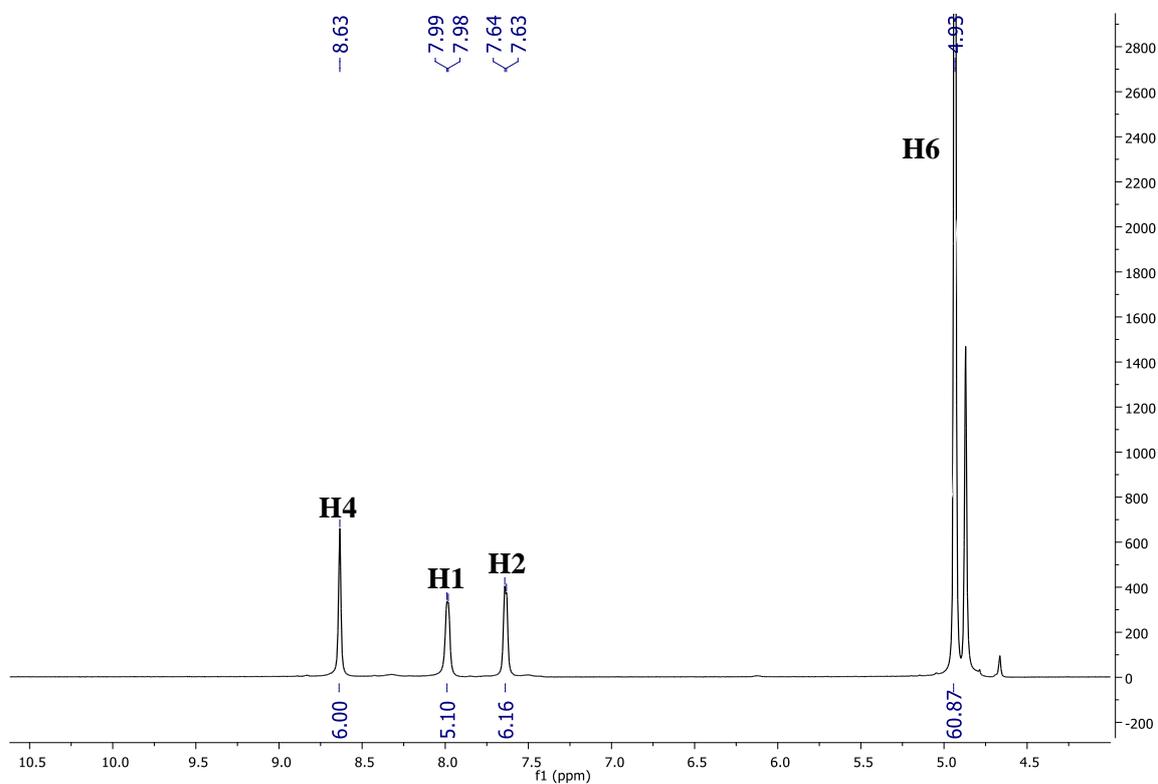
Anexo 7. Espectro de FTIR do composto 2a.



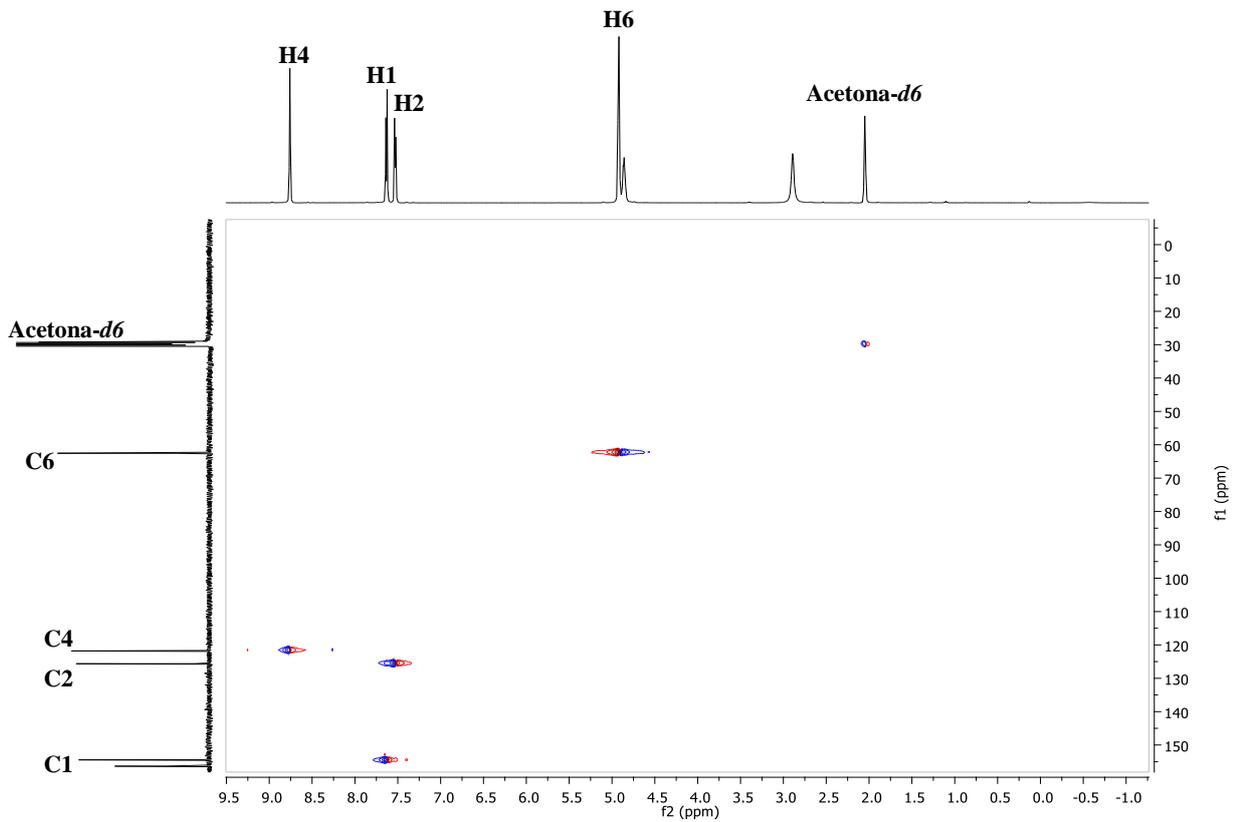
Anexo 8. Espectro de FTIR do composto 3a.



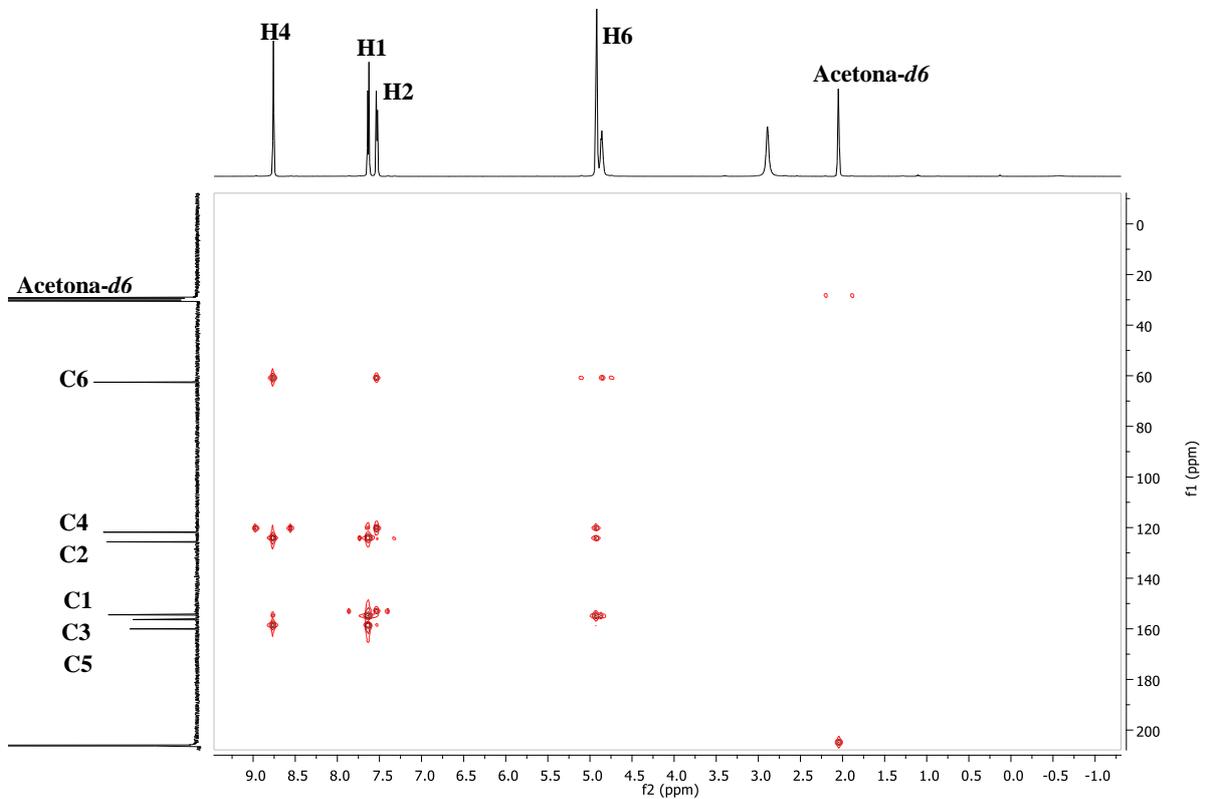
Anexo 9. Espectro de ¹H-RMN do composto **1b** em acetona-*d*₆.



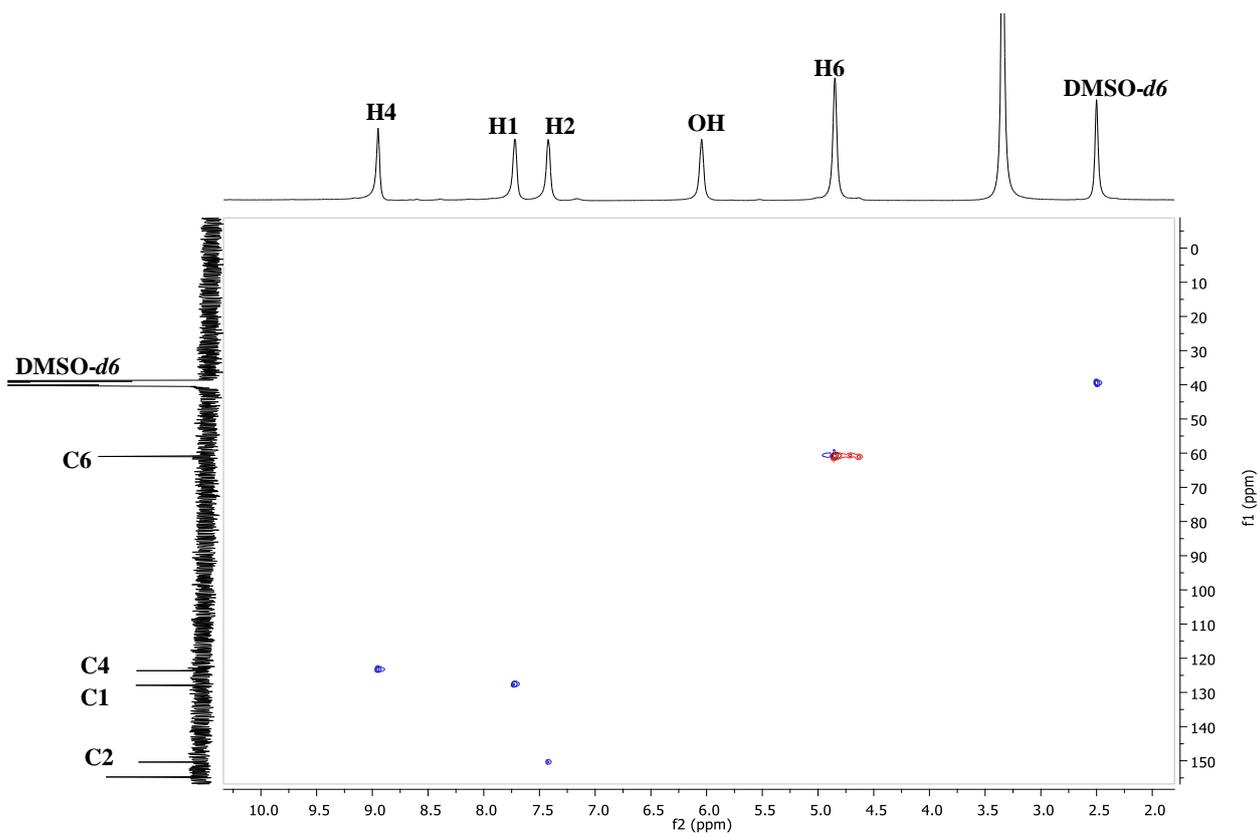
Anexo 10. Espectro de ¹H-RMN do composto **3b** em metanol-*d*₄.



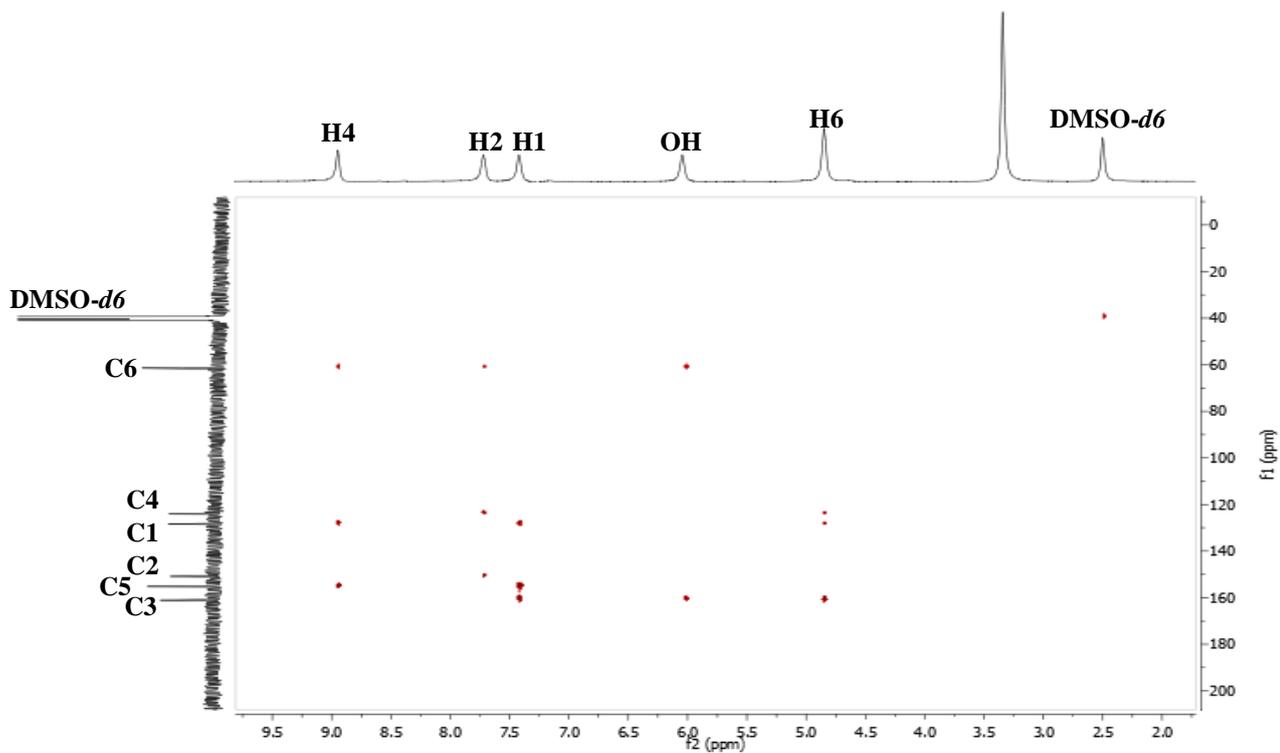
Anexo 11. Espectro de HSQC do composto **1b** em acetona-*d*₆.



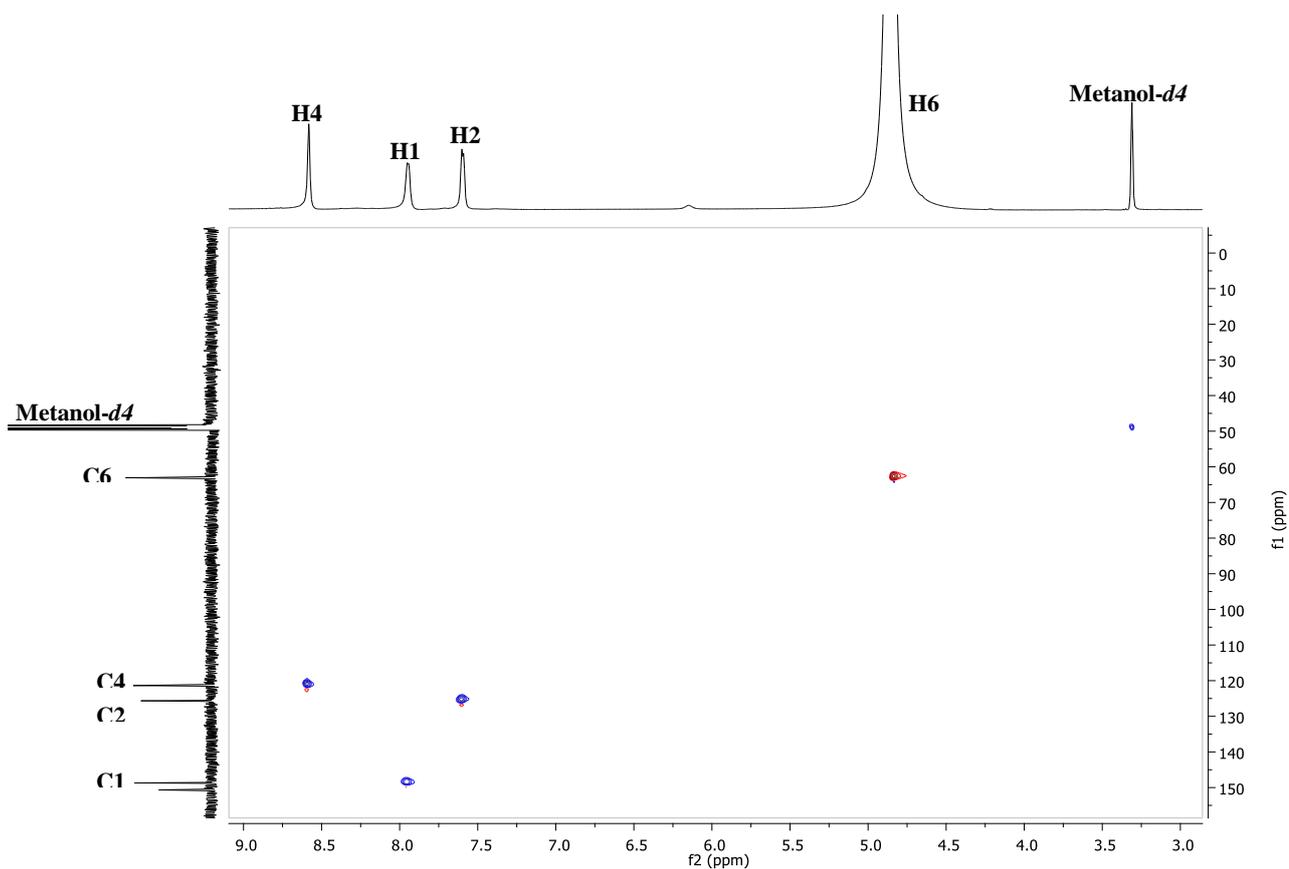
Anexo 12. Espectro de HMBC do composto **1b** em acetona-*d*₆.



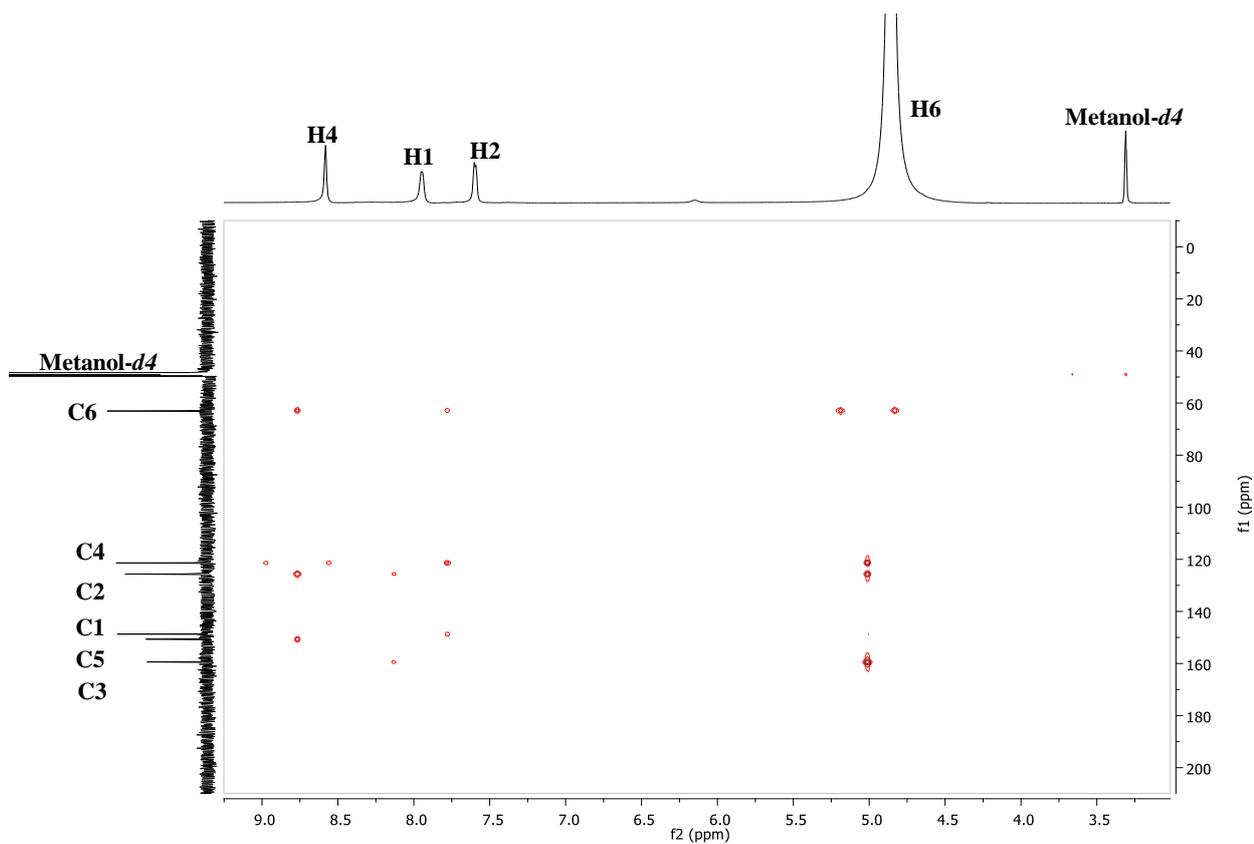
Anexo 13. Espectro de HSQC do composto **2b** em DMSO-*d*₆.



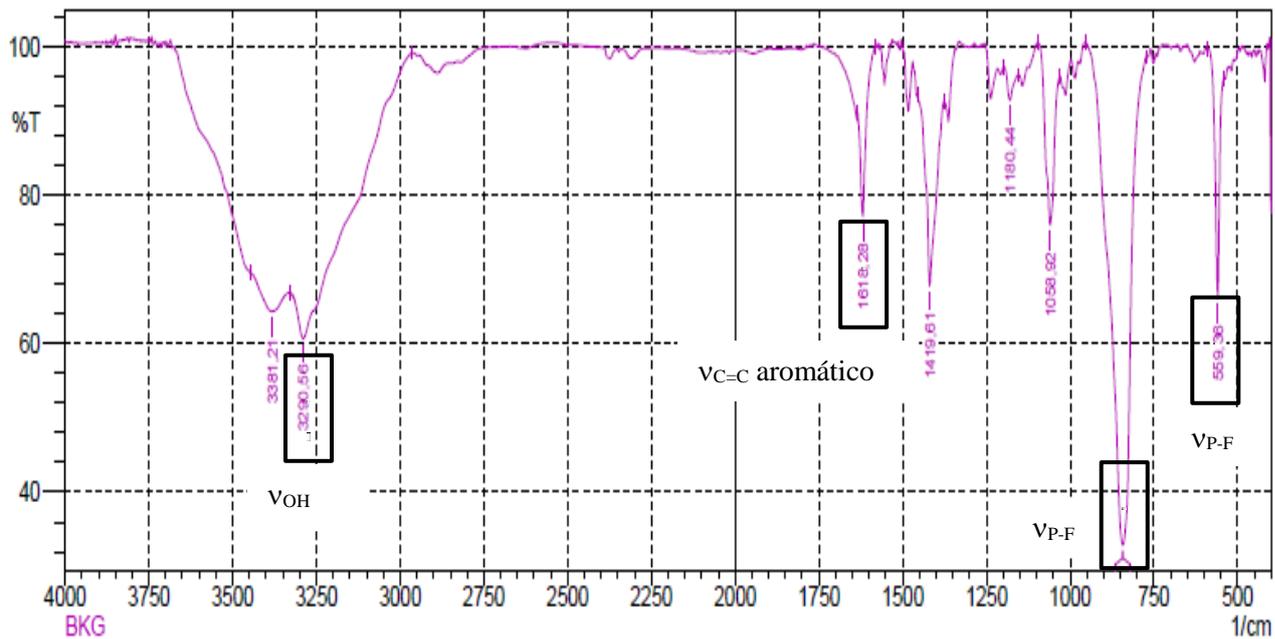
Anexo 14. Espectro de HMBC do composto **2b** em DMSO-*d*₆.



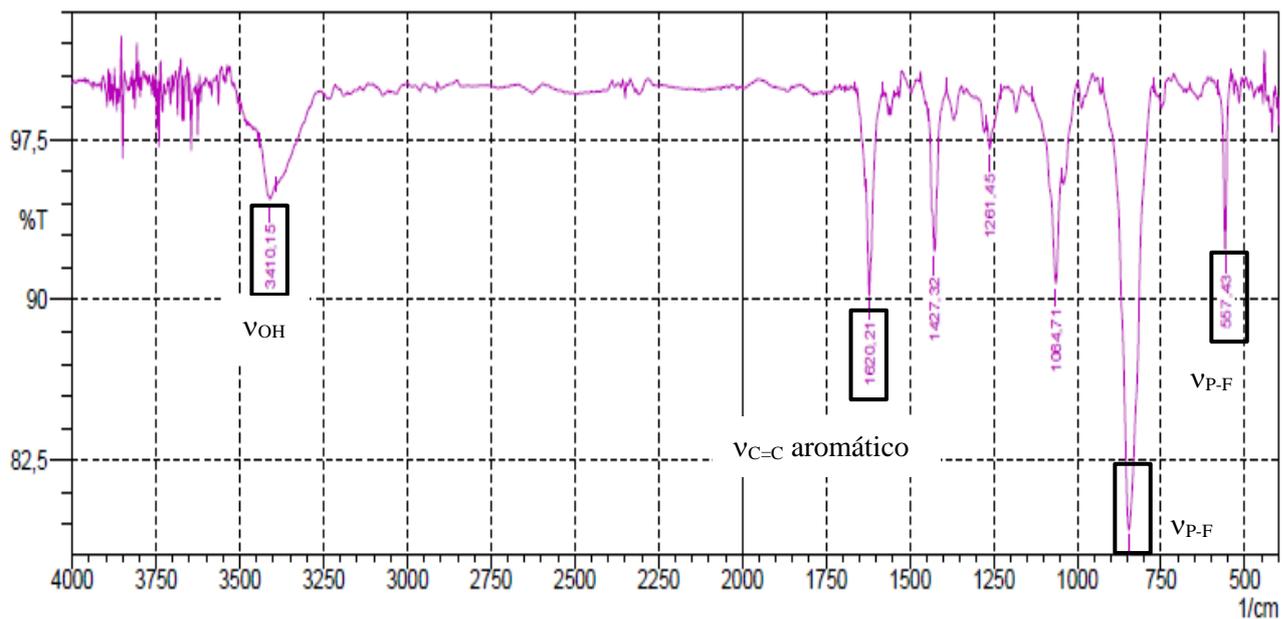
Anexo 15. Espectro de HSQC do composto **3b** em metanol-*d*₄.



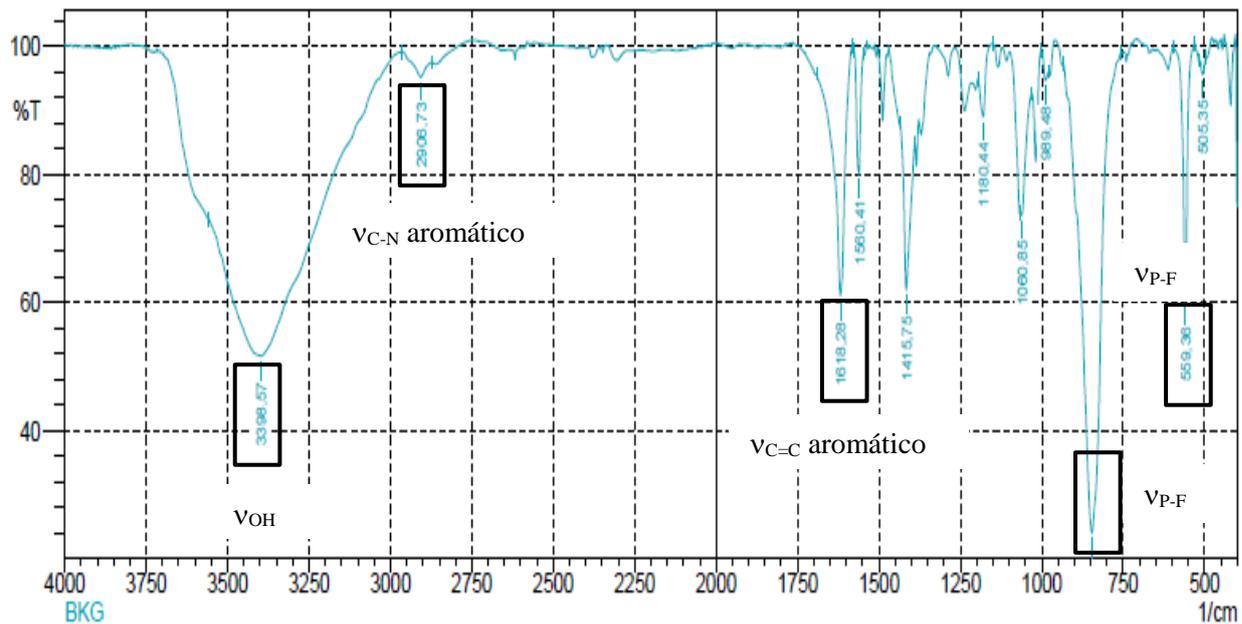
Anexo 16. Espectro de HMBC do composto **3b** em metanol-*d*₄.



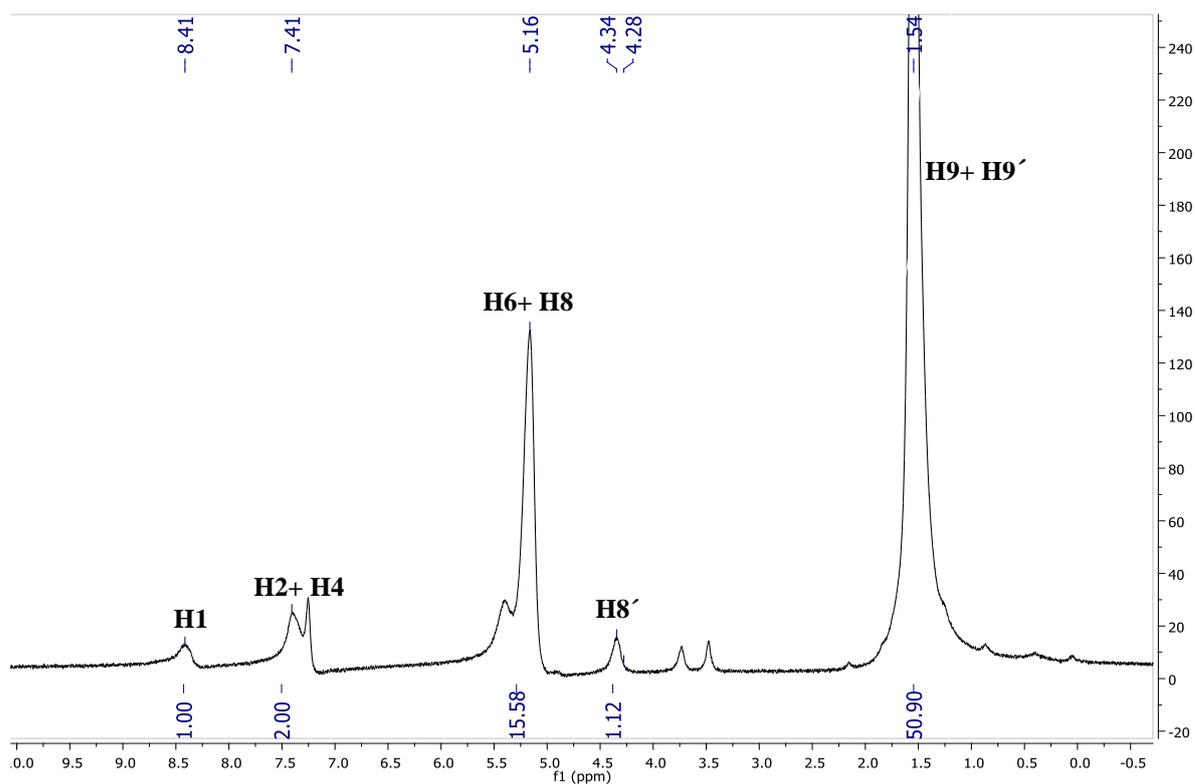
Anexo 17. Espectro de FTIR do composto **1b**.



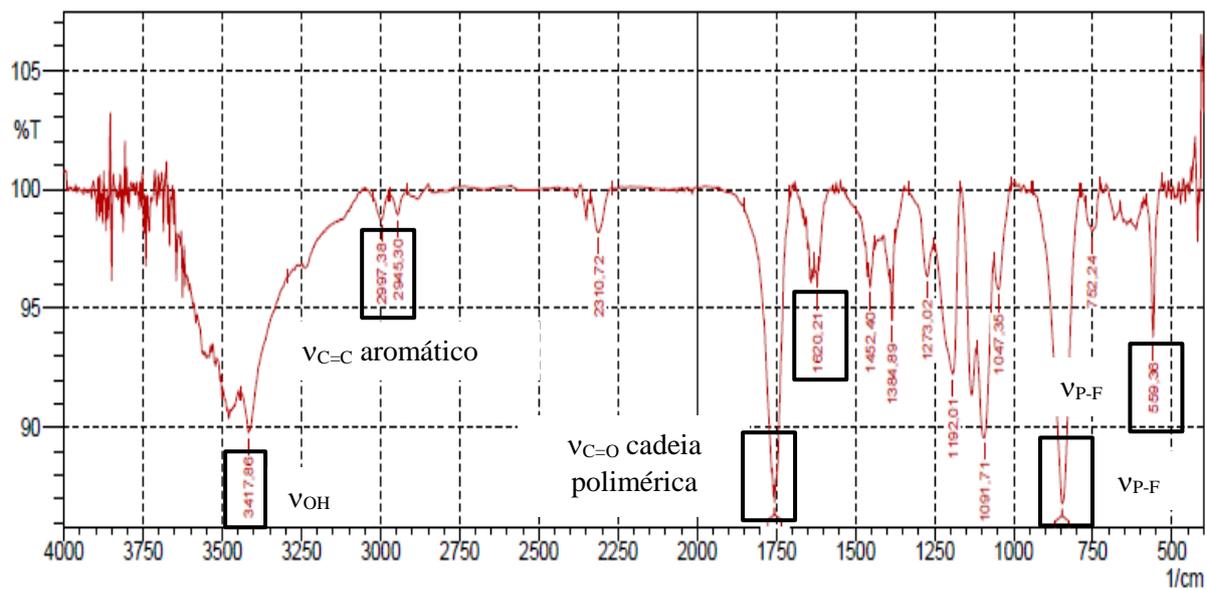
Anexo 18. Espectro de FTIR do composto **2b**.



Anexo 19. Espectro de FTIR do composto 3b.



Anexo 20. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ do composto 4a em CDCl_3 .



Anexo 21. Espectro de FTIR do composto 4a.