

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Funcionalização de moléculas orgânicas através da  
polimerização por abertura de anel do L-lactídeo:  
Sínteses e aplicação na terapia do cancro**

Adhan de Souza Pilon

**Mestrado em Química Tecnológica**

Dissertação orientada por:

Doutora Andreia Marques Valente

Doutor Luís Gonçalo Alves

2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Funcionalização de moléculas orgânicas através da  
polimerização por abertura de anel do L-lactídeo:  
Sínteses e aplicação na terapia do cancro**

Adhan de Souza Pilon

**Mestrado em Química Tecnológica**

Dissertação orientada por:

Doutora Andreia Marques Valente (FCUL)

Doutor Luís Gonçalo Alves (IST)

2016

## **Agradecimentos**

Primeiramente queria agradecer todos aqueles que me ajudaram e me apoiaram nessa longa caminhada que foi e tem sido a minha vida.

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus orientadores Doutora Andreia Marques Valente e ao Doutor Luís Gonçalo Alves que tiveram uma paciência do tamanho do universo para comigo, que me ajudaram, orientaram, ensinaram, apoiaram, me abriram os olhos e deram na minha cabeça quando era preciso.

Embora a Andreia não tenha estado perto a maior parte do tempo (no mesmo laboratório), me ajudou e lembrou sempre que embora tenha muitas ideias, é preciso manter o pé no chão quando eu me empolgava com novas ideias.

Ao Luis por me ter aturado no laboratório ao longo de todo o percurso até aqui, ter tido uma paciência de monge por vezes, incentivando e abrindo os meus horizontes para além daquilo que já tinha aprendido na minha vida académica.

À Professora Doutora Maria Helena Garcia, que abriu as portas do laboratório a partir do momento em que me aceitou no grupo da FCUL enquanto ainda estava na licenciatura.

À Professora Doutora Ana Margarida Martins, que abriu as portas do seu laboratório e me recebeu com o maior gosto.

À Doutora Fernanda Marques do Instituto Tecnológico Nuclear pela colaboração com os ensaios de citotoxicidade com os meus compostos.

À Doutora Maria João Ferreira e ao Professor José Ascenso pela ajuda e colaboração com os DOESY.

Aos meus amigos e colegas de laboratório da FCUL, David, Francisco, Bebiana, Anabela, Tiago, Guilherme, Ricardo, Tânia, Leonor e Maria Ines, que estiveram comigo no laboratório e aturavam a minha falação e gargalhadas altas.

Aos novos amigos e colegas do laboratório do IST, Felipe, Tiago, Patricia, Anaum, Rita, Miguel, Krishnamoorthy, Cláudia, Joana, Sónia e Clara. Obrigado pelos momentos e risadas que foram proporcionados por vocês ao longo de “longo” ano, e que esta não tenha sido apenas mais uma nova experiência, mas sim que possa ficar marcado, na memória ou nas bancadas e *Schlenks* e linhas do laboratório. E não podia esquecer de agradecer por me aturarem a da minha falação, nas risadas e gargalhadas (altas) e das *bad words* (hahaha), muito obrigado.

Aos meus amigos e pessoas especiais na minha vida fora da vida académica, que me apoiaram sempre, me deram força e tiveram ao meu lado independentemente da hora ou momento.

À minha família, que me atura, que me ajuda, que me aconselha. Não só os que estão aqui, mas também os meus familiares que se encontram no Brasil e nunca deixaram de me apoiar e acreditar em mim.

Um muito obrigado a todos aqueles que me ajudaram chegar até aqui, e contribuíram de alguma forma para a formação do meu carácter, da pessoa que sou e que me tornei.

O meu mais sincero MUITO OBRIGADO!

## Resumo

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo sendo imperativo que se desenvolvam novos fármacos capazes de combater esta doença. Um dos compostos mais utilizados mundialmente para tratar o cancro, até à data, tem sido a cisplatina (*cis*-[Pt(Cl)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]). Outros complexos metálicos têm revelado propriedades citotóxicas bastante relevantes fazendo com que o estudo e pesquisa de novas moléculas biologicamente ativas se tenha tornado numa área com muito desenvolvimento.

É neste contexto que se enquadra o trabalho aqui descrito, pela síntese e funcionalização de moléculas orgânicas, nomeadamente ciclamas e fosfano, através da polimerização por abertura de anel do L-lactídeo e posterior coordenação a iões metálicos de ferro e cobre. Desta forma pretendeu-se sintetizar compostos que reúnem numa mesma molécula o potencial que os ligandos exibem em termos de atividade biológica, um macroligando biodegradável e biocompatível que confere ao composto final uma maior selectividade para os tumores e, nalguns casos, um fragmento metálico com conhecida atividade citotóxica.

Foram sintetizadas e caracterizados sete novas ciclamas, entre as quais cinco macrociclamas, 4 novos compostos de coordenação de ferro(II) e cobre(II) contendo (macro)ciclamas e um novo composto organometálico de ferro(II) contendo um macrofosfano.

A caracterização dos compostos obtidos foi feita recorrendo às técnicas espectroscópicas de RMN, FTIR e UV-Vis bem como análise elementar e quando possível, por difração de raios-X em cristal único.

O potencial citotóxico dos novos compostos sintetizados foi avaliado na linha celular do adenocarcinoma da mama humano (MDA-MB-231), a qual se destaca por ser uma linha muito agressiva e sem cura atualmente. Verificou-se que a maioria dos compostos usados neste estudo revelou ter propriedades citotóxicas para a referida linha tumoral, sendo que na sua maioria apresentaram valores de citotoxicidade na gama de concentrações micromolar e semelhantes à citotoxicidade da cisplatina (metalofármaco em uso clínico) nas mesmas condições experimentais. O composto de cobre(II) destacou-se por ter um valor de citotoxicidade cerca de duas vezes melhor que o da cisplatina.

## Palavras-chave

Terapia do cancro; Complexos Metálicos; Ciclamas; Fosfanos; Polilactídeo.

## Abstract

Cancer is one of the main causes of death worldwide, being imperative continuous research in this field. Up to date, cisplatin (*cis*-[Pt(Cl)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) has been one of the mostly used drugs to treat this disease worldwide. Other metallodrugs have been revealing important cytotoxic properties, fueling the research in this area.

The work described in this Master dissertation is placed within this subject through the functionalization of organic molecules, namely cyclams and phosphanes, using them to the ring opening polymerization of L-lactide and further coordination to iron and copper metal ions. Thus, the final goal was the synthesis of new compounds merging into a single molecule the potential that the organic molecules exhibit in terms of biological activity, a biodegradable and biocompatible macroligand that confers a higher tumor selectivity and, in some cases, a metallic fragment with known cytotoxic activity.

There have been synthesized seven new cyclams (between them five are macrocyclams), four new iron(II) and copper(II) coordination compounds bearing (macro)cyclams as ligands and a new organometallic iron(II) compound bearing a macrophosphane ligand.

Compounds characterization has been done by the spectroscopic RMN, FTIR and UV-Vis techniques, as well as single crystal X-ray diffraction whenever possible and elemental analyses.

The cytotoxic potential of the new compounds was evaluated in the human breast adenocarcinoma cell line (MDA-MB-231) that is known to be highly aggressive and without cure yet. Most of the compounds were cytotoxic towards this cell line, presenting cytotoxicities in the micromolar range and similar to those observed for cisplatin in the same experimental conditions. The copper(II) complex was the one presenting the best cytotoxicity, twice better than cisplatin.

## Keywords

Cancer therapy; metallic complexes; cyclams; phosphanes; polylactide

## Índice

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Cancro e principais tratamentos .....	1
1.2. Metalofármacos como potenciais agentes quimioterapêuticos. Quais as alternativas à platina?.....	3
1.2.1. Compostos de cobre como potenciais agentes anticancerígenos.....	5
1.2.2. Compostos de ferro como potenciais agentes anticancerígenos.....	6
1.3. Complexos de metal-polímero: rumo à terapia dirigida.....	7
1.4. Polímeros biodegradáveis: poliésteres e polilactídeo .....	9
1.4.1. Polilactídeo: Mercado atual, indústria e aplicações.....	10
1.4.2. Polimerização por abertura de anel via organocatálise .....	12
1.4 Enquadramento do Trabalho .....	13
CAPÍTULO 2: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
2.1. Síntese e caracterização de ciclamas e derivados .....	14
2.2 Síntese e caracterização de complexos de Fe(II) e Cu(II) contendo (macro)ciclamas .....	22
2.3 Síntese e caracterização de fosfanos macromoleculares .....	24
2.4 Síntese e caracterização de complexos de Fe(II) contendo fosfanos macromoleculares .....	26
2.5 Síntese e caracterização de macrociclamas contendo fosfanos terminais .....	29
CAPÍTULO 3: ESTUDOS BIOLÓGICOS .....	31
3.1. Estudos de viabilidade celular em linhas celulares tumorais humanas .....	31
CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
4.1.Solventes e reagentes.....	33
4.2.Técnicas Usadas .....	33
Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	33
Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	34
Análise Elementar C, H, N .....	34
Espectroscopia de Ultravioleta e Visível (UV-Vis) .....	34
Difração de raios-X de cristal único .....	34
Estudos de viabilidade celular .....	34
4.3.Parte Experimental .....	35
4.3.1Sínteses e caracterização de compostos orgânicos .....	35
4.3.2. Sínteses e caracterização dos complexos metálicos .....	43

5 - EXECUÇÃO FINANCEIRA, REGRAS DE SEGURANÇA E CUIDADOS AMBIENTAIS .....	46
5.1. Execução Financeira.....	46
5.2. Regras de segurança .....	47
5.3. Cuidados Ambientais.....	47
6 - CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	48
BIBLIOGRAFIA .....	50

## Índice de Figuras

Figura 1 - Complexos de platina em uso clínico: Cisplatina (A), Carboplatina (B), Oxaliplatina (C).....	3
Figura 2 - Complexos de ruténio: NAMI-A e KP1019. ....	4
Figura 3 - Complexos de cobre com ciclama (a) e complexo de cobre com ciclama suportado em PAA (b) <sup>18</sup> .....	5
Figura 4 - Complexos de Cu(II) contendo ligandos tridentados heteroaromáticos. ....	5
Figura 5 - Complexos de Cu <sup>I</sup> contendo diferentes fosfanos e heterocíclonitrogenados. <sup>20</sup> .....	6
Figura 6 - Estrutura do Tamoxifeno e Ferrocifeno.....	6
Figura 7 - Complexos de ferro, [Fe( $\eta^5$ -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> )(dppe)(L)][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ] .....	7
Figura 8 - Família de complexos Fe <sup>x</sup> ( <i>salophen</i> ).....	7
Figura 9 - A) TM34 [Ru( $\eta^5$ -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> )(PPh <sub>3</sub> )(2,2'-bipiridina)][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ] e B) RuPMC [Ru( $\eta^5$ -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> )(PPh <sub>3</sub> )(mHBL)][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ] (mHBL= Bipiridil funcionalizado com PLA contendo glucose terminal).....	9
Figura 10 – Estruturas dos complexos [Fe( $\eta^5$ -C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> )(CO)(L)(PPh <sub>2</sub> Ph- $\rho$ -CO-PLLA-Adn)][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ] <sup>33</sup> .....	9
Figura 11 - Espectro de RMN protão de um composto secundário na síntese de L5a, em Clorofórmio deuterado. ....	16
Figura 12 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H em clorofórmio deuterado, do composto L7.....	17
Figura 13 - Representação Mercury dos compostos L7(A) e L7.2HBF <sub>4</sub> .(B) As linhas a tracejado representam pontes de hidrogénio. ....	18
Figura 14 - Espectro de FTIR do composto L7 no estado sólido suportado em KBr. ....	19
Figura 15 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H em clorofórmio deuterado do composto L8a.....	19
Figura 16 - Espectro de FTIR do composto L8a no estado sólido suportado em KBr. ...	21
Figura 17 - Espectro de FTIR do composto C5 no estado sólido suportado em KBr. ....	23
Figura 18 - Complexo C6. ....	23
Figura 19 - Espectro de FTIR estado sólido em KBr do complexo C6.....	24
Figura 20 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H em clorofórmio deuterado do composto L9. ....	24
Figura 21 - Espectros de RMN de protão do composto L9 e do complexo C2, em clorofórmio deuterado; (L9 vermelho); (C2 azul).....	27
Figura 22 - Espectro de FTIR estado sólido em KBr do complexo C2.....	28
Figura 23 – Espectro de UV-Vis do complexo C2 em acetonitrilo à temperatura ambiente. ....	28
Figura 24 - Esquema reacional para obtenção de compostos macromoleculares com fosfanos terminais.....	29
Figura 25 - Espectro de FTIR do composto L6 no estado sólido suportado em KBr. ....	III
Figura 26 - Representação ORTEP do composto L7 apresentando elipsóides com 35% de probabilidade. Os átomos de hidrogénio foram seletivamente excluídos de modo a clarificar a estrutura. As linhas a tracejado representam pontes de hidrogénio. ....	III
Figura 27 - Espectro de FTIR do composto L9 no estado sólido suportado em KBr. ....	III
Figura 28 - Espectro de FTIR do complexo C1 no estado sólido suportado em KBr.....	IV
Figura 29 - Espectro de FTIR do composto C3a no estado sólido suportado em KBr. ...	IV



## Índice de Esquemas

Esquema 1 – Proposta de mecanismo de polimerização do LA com DMAP e álcool como iniciador, via monómero ativado. <sup>42</sup> .....	12
Esquema 2 - Esquema reacional da síntese dos compostos L1 a L4.....	14
Esquema 3 - Reação de polimerização do L-Lactídeo usando como ativador a DMAP e iniciador o L4. ....	15
Esquema 4 – Esquema reacional de funcionalização do composto L4. ....	16
Esquema 5 - Sínteses de complexos metálicos de ferro com o composto L7. ....	22
Esquema 6 - Esquema reacional de formação do complexo C2.....	26

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Potenciais de substituição de alguns polímeros de origem fóssil por biopolímeros. <sup>37</sup> .....	10
Tabela 2 - Dados espectroscópicos de UV-Vis do complexo C2 em acetonitrilo à temperatura ambiente. ....	29
Tabela 3 - Tabela simplificada com as diferentes tentativas de reações de esterificação. ....	30
Tabela 4 - Resultados de viabilidade celular expressos em valor de IC <sub>50</sub> . ....	31
Tabela 5- Procedimento de secagem dos solventes. <sup>51</sup> .....	33
Tabela 6 - Tabela de gastos do Mestrado em Química Tecnológica.....	46

## Abreviaturas

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico

**COSY** - *Correlation Spectroscopy*

**Cp** – Ciclopentadienilo

**d** - dubleto

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DMAP** - 4-dimetilaminopiridina

**DP** - Grau de Polimerização (*Degree of Polymerization*)

**EPI** - Equipamento de Proteção Individual

**EPR** – *Enhanced Permeability and Retention*

**E.U.A.** – Estados Unidos da América

**FDA** – *Food and Drugs Administration*

**FTIR** – Fourier Transform InfraRed (*Infravermelho por transformada de Fourier*)

**GPC** – Cromatografia por Permeação em Gel (*Gel Permeation Chromatography*)

**HMBC** – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**HMQC** – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

**IC<sub>50</sub>** – *Half maximal inhibitory concentration* (concentração que induz morte celular em 50% das células)

**I&D** – Investigação e Desenvolvimento

**KP1019** – indazólio[trans-Ru<sup>III</sup>Cl<sub>4</sub>(indazole)<sub>2</sub>]

**LMCT** – *Ligand-Metal-Charge-Transfer*

**MLCT** – *Metal-Ligand-Charge-Transfer*

**m** – Multiplete

**M** – Molar (moles por litro)

**mL** – Mililitro

**µL** – Microlitro

**NAMI-A** – imidazólio[trans-Ru<sup>III</sup>Cl<sub>4</sub>(imidazole)(dmsO)]

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**Ph** – Fenilo

**PLA** - Polilactídeo

**ppm** – Partes por milhão

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**<sup>13</sup>C RMN** – Ressonância Magnética Nuclear de carbono

**<sup>1</sup>H RMN** – Ressonância Magnética Nuclear de próton

**<sup>31</sup>P RMN** – Ressonância Magnética Nuclear de fósforo

**<sup>19</sup>F RMN** – Ressonância Magnética Nuclear de flúor

**ROP** – *Ring-Opening Polymerization*

**s** – Singleto

**t** – Tripleto

**TEA** – Trietilamina

**THF** - Tetrahydrofurano

**TMS** – Tetrametilsilano

**UV-Vis** – Espectroscopia de Ultravioleta e Visível

**δ/ppm** – Desvio químico em partes por milhão

# **CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO**

## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

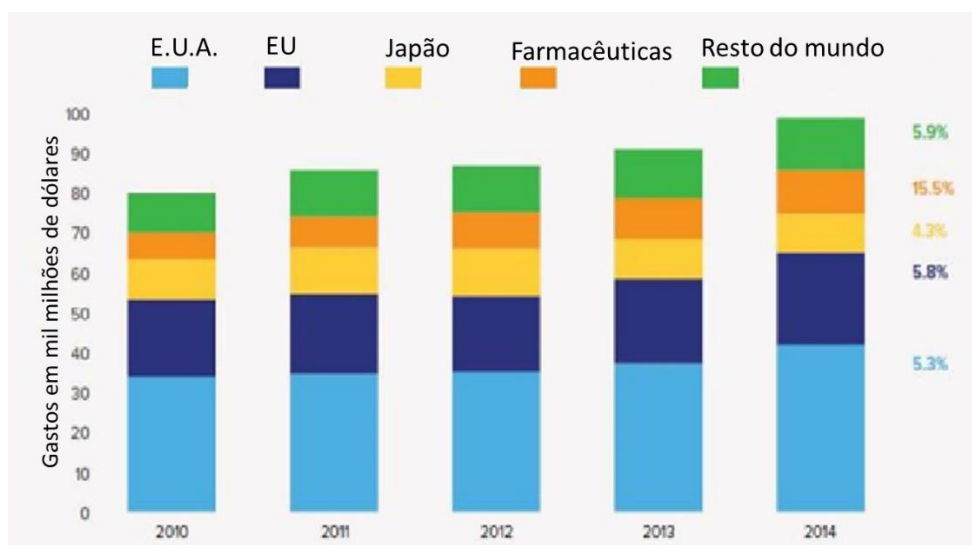
### 1.1 Cancro e principais tratamentos

Cancro é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Outros termos utilizados são tumores malignos e neoplasias. Uma característica desta doença é o crescimento descontrolado das células, que podem invadir e proliferar por todo o corpo, e caso se espalhe para outros órgãos, este passa a ser referido como metástase. As metástases são, na realidade, a principal causa de letalidade do cancro, que é uma das principais causas de morte anualmente em todo o mundo.<sup>1</sup>

O cancro pode ser causado por fatores externos como o tabaco, produtos químicos, radiação e organismos infecciosos, mas também por fatores internos hereditários como mutações, hormonas, condições imunológicas e de mutações que ocorrem a partir do próprio metabolismo. Estes fatores casuais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogénese.<sup>2</sup>

Os tipos de cancro mais comuns nos homens são de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado, enquanto nas mulheres são os de mama, colorretal, pulmão, colo do útero e estômago. Mais de 30 % das mortes por cancro poderiam ser evitadas se fossem alterados ou evitados fatores de risco externos, especialmente o uso do tabaco. A deteção precoce, diagnóstico preciso e tratamento eficaz, fazem com que a taxa de sobrevivência ao cancro tenha aumentado de forma significativa nos últimos anos.<sup>2</sup>

Segundo a *Quintiles IMS*, só os E.U.A. gastaram em medicamentos cerca de 373,9 mil milhões de dólares no ano de 2014, sendo que em oncologia foram gastos 100 mil milhões de dólares em todo o mundo.<sup>3</sup> No **Gráfico 1** é possível verificar que os gastos em oncologia têm crescido, não só nos EUA, mas também no resto do mundo.



**Gráfico 1 - Gastos mundiais em mil milhões de dólares em tratamentos e I&D do cancro, gráfico adaptado.<sup>3</sup>**

As formas mais comuns de se tratar os diferentes tipos de cancro, hoje em dia, são: **Cirurgia, Quimioterapia, Radioterapia e Imunoterapia.**<sup>4</sup> Estas abordagens podem ser utilizadas individualmente ou em conjunto, dependendo do tipo de cancro e do estágio em que se encontra.

A remoção **cirúrgica** foi uma das primeiras técnicas a ser utilizada, e até nos dias atuais é recorrida quando o cancro é detetado numa fase precoce e, se possível, como é o caso para a maioria dos cancros sólidos e isolados sendo removida a região tumoral e, em alguns casos, os nódulos linfáticos na área.<sup>5</sup> Para alguns tipos de cancro isto é suficiente para o eliminar. Porém face a alguns tipos de cancros e estágios de desenvolvimento, a remoção cirúrgica torna-se ineficaz sendo necessário criar novas formas de combater a doença.

A **radioterapia** envolve o uso de radiação ionizante numa tentativa de curar ou melhorar os sintomas da doença. O intuito é danificar o ADN do tecido canceroso, matando as células tumorais, mas poupando os tecidos normais (por exemplo, pele ou órgãos pelos quais a radiação tem de passar para tratar o tumor). Os feixes de radiação através de múltiplos ângulos de exposição intersectam o tumor proporcionando uma dose muito maior do que no tecido circundante que está saudável. Tal como acontece com a quimioterapia, os cancros podem variar na sua resposta à terapia de radiação.<sup>6</sup>

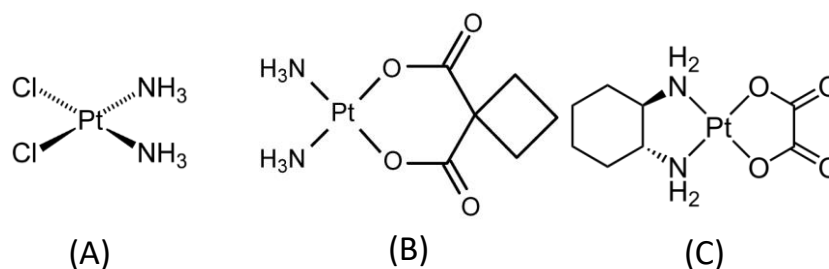
Por outro lado, a **imunoterapia** é o tratamento que utiliza o próprio sistema imunológico para ajudar a combater o cancro.<sup>7</sup> Entrou em uso por volta de 1997 e uma das suas abordagens incluem utilização de anticorpos. Porém não é o tratamento mais indicado, principalmente pelo facto de ser o corpo a combater a doença, e o tempo por vezes é crucial para combater alguns tipos de cancros, sendo que não têm muito êxito quando comparados aos diferentes tipos de tratamentos oncológicos.

A **quimioterapia** recorre ao uso de um fármaco ou medicamento para o tratamento de uma doença. Mas, para a maioria das pessoas, a palavra quimioterapia é associada ao tratamento do cancro. A vantagem da quimioterapia relativamente ao uso conjunto da remoção cirúrgica e à radioterapia, é que permite atuar em todo o corpo, enquanto que as anteriores atuam apenas numa

determinada área. Isto significa que a quimioterapia pode matar células tumorais que se espalharam por outras partes do corpo (metástase), estando ou não, distanciadadas do tumor original (primário).<sup>8</sup> O tratamento quimioterapêutico pode ter em geral três objetivos que podem ser a cura, o controle ou a palição.

Existem vários agentes quimioterapêuticos em uso clínico. No entanto, ainda hoje o composto mais utilizado mundialmente para tratar o cancro é a cisplatina *cis*-[Pt(Cl)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**Figura 1A**) e outros compostos à base de platina. Na realidade, a atividade tumoral deste composto foi descoberta em 1965 por Rosenberg, e foi o primeiro metalofármaco utilizado para a terapia do cancro. Este fármaco, usado individualmente ou em combinação com outros é ainda hoje usado em cerca de 50-70 % de todos os cancros. No entanto, este complexo apresenta uma elevada toxicidade levando a severos efeitos secundários, para além de apresentar resistência adquirida para algumas linhas celulares tumorais.<sup>9</sup> Desta forma, para tentar melhorar o perfil de toxicidade da cisplatina foram desenvolvidos outros complexos de platina, a carboplatina (**Figura 1B**) e a oxaliplatina (**Figura 1C**), que estão no mercado e são utilizados para o tratamento de cancro, porém não apresentam uma grande melhoria das propriedades quando comparadas às da cisplatina.

Torna-se por isso evidente que a investigação nesta área é urgente e vital tendo-se apostado ultimamente no desenvolvimento de novos complexos metálicos com maior diversidade estrutural, e dando grande importância à necessidade de se encontrar novos fármacos mais eficientes e seletivos.<sup>10</sup>



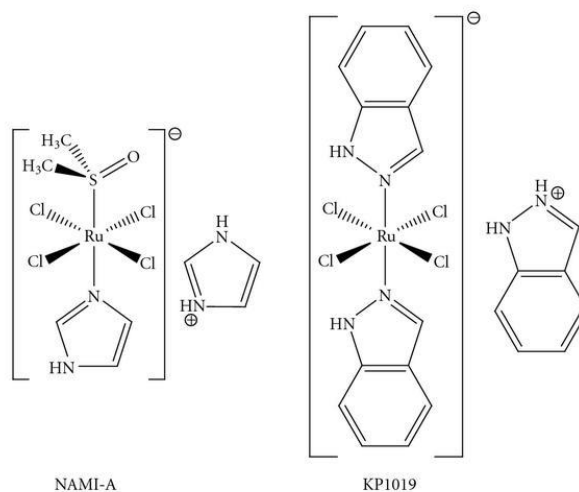
**Figura 1 - Complexos de platina em uso clínico: Cisplatina (A), Carboplatina (B), Oxaliplatina (C).**

## 1.2. Metalofármacos como potenciais agentes quimioterapêuticos. Quais as alternativas à platina?

Existem muitos iões metálicos que foram e estão a ser estudados para substituir a platina devido às limitações que os complexos deste metal apresentam, como já foi referido anteriormente. Neste âmbito, o ruténio tem sido um dos metais mais estudados uma vez que, para além da baixa toxicidade, também tem vários estados de oxidação acessíveis em meio fisiológico (Ru<sup>II</sup>, Ru<sup>III</sup> e Ru<sup>IV</sup>). Existem dois complexos de Ru<sup>III</sup> que passaram a primeira fase de estudos pré-clínicos. O primeiro foi o NAMI-A (**Figura 2**),<sup>11</sup> que é um complexo aniónico octaédrico que não possui atividade sobre tumores primários, porém apresenta grande atividade antimetastática. Esta propriedade do NAMI-A é muito importante porque são, na maioria das vezes, as metástases secundárias que causam a morte e que representam, portanto, um importante desafio clínico. O segundo composto é o KP1019 (**Figura 2**),<sup>12</sup> que apesar da semelhança estrutural com o NAMI-



A, apresenta um modo de ação completamente diferente. O KP1019 atua e demonstra bons resultados para tumores primários.



**Figura 2 - Complexos de rutênio: NAMI-A e KP1019.**

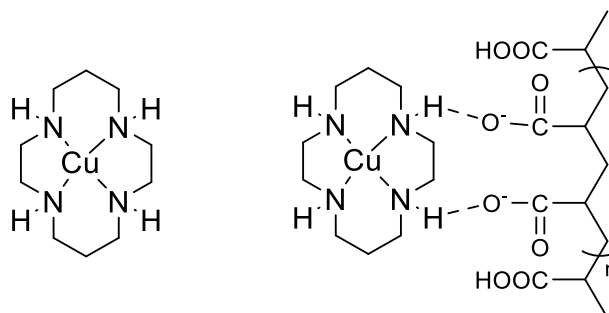
Relativamente aos complexos organometálicos de rutênio, existem já vários estudos promissores para compostos de  $Ru^{II}$ . Estes compostos têm, em geral, uma estrutura em “banco de piano” contendo ligandos  $\eta^6$ -areno a ocupar três posições de coordenação. O primeiro a desenvolver este tipo de composto para esta aplicação foi Sadler.<sup>13</sup> Muitos dos complexos desenvolvidos são solúveis e estáveis em água e tão potentes como os fármacos de platina para algumas linhas de células primárias e apresentam também atividade *in vivo*.<sup>13</sup> A segunda classe de rutênio- $(\eta^6$ -areno) são os “RAPTAS”. Apesar da semelhança estrutural com os compostos de Sadler, estes apresentam uma toxicidade muito mais baixa para linhas celulares de cancro.<sup>[14]</sup> Porém, estudos *in vivo* com ratos, demonstrou que são menos tóxicos, o que permitiria aplicar uma dose superior.<sup>14</sup>

O cobre e o ferro podem também ser duas boas alternativas à platina no que diz respeito a metais de transição aplicados à terapia do cancro. Ambos são metais essenciais e não tóxicos que participam numa grande variedade de funções vitais. O cobre é um metal encontrado em todos os organismos vivos, e é um elemento vestigial necessário para a química redox, principalmente no que diz respeito ao crescimento e desenvolvimento,<sup>15</sup> para funções fisiológicas como: enzimáticas e proteicas, na respiração mitocondrial, eliminação de radicais livres, absorção de ferro e a síntese do ADN. A sua ausência ou alteração dos seus níveis pode estar diretamente relacionado a doenças como a artrite reumatoide, úlceras gastrointestinais, epilepsia, diabetes e cancro.<sup>15</sup> Em condições fisiológicas é facilmente encontrado na forma de iões  $Cu^I$  e  $Cu^{II}$ ,<sup>16</sup> e tem uma grande afinidade para se ligar a heteroátomos como N, O e S, o que é uma mais-valia para a síntese e desenvolvimento de complexos.<sup>16</sup> Por outro lado, o ferro é um metal biocompatível e essencial para a vida humana sendo um elemento abundante e crucial que está presente em várias proteínas metabolicamente importantes tais como a hemoglobina e mioglobina no transporte de oxigénio no corpo humano. Em solução aquosa tem dois estados de oxidação acessíveis,  $Fe^{II}$  e  $Fe^{III}$  sendo devido a estes estados de oxidação que participa em vários ciclos metabólicos e em processos redox essenciais à vida humana.<sup>17</sup>

Relativamente à utilização destes metais para o desenvolvimento de novos compostos anticancerígenos, há já algum trabalho na literatura com resultados promissores e que serão discutidos seguidamente.

### 1.2.1. Compostos de cobre como potenciais agentes anticancerígenos

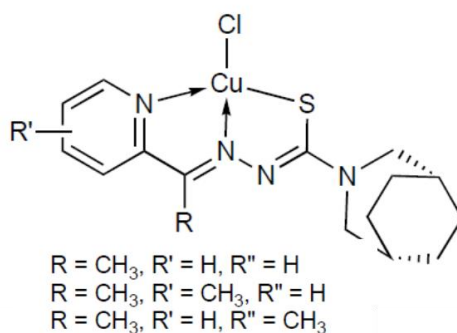
Existem vários complexos de cobre que apresentam atividade anti-tumoral. Entre eles, alguns complexos de cobre ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) coordenados a ciclamas e suportados em ácido poliacrílico (PAA) (**Figura 3**) exibem atividade anti-tumoral *in vitro* para células humanas HeLa (carcinoma cervical).<sup>18</sup> Verificou-se que o complexo suportado era mais ativo relativamente ao complexo não suportado.<sup>18</sup>



a) Complexo de  $\text{Cu}(\text{II})$  ciclama    b) Complexo a suportado em PAA

### Figura 3 - Complexos de cobre com ciclama (a) e complexo de cobre com ciclama suportado em PAA (b)<sup>18</sup>

Alguns complexos de cobre ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) contendo ligandos nitrogenados (**Figura 4**), exibem bons resultados, com valores de  $\text{IC}_{50}$ <sup>1</sup> na ordem dos nanomolar para algumas linhas cancerígenas, como por exemplo, a CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda;  $\text{IC}_{50} = 0.05\text{-}0.77 \mu\text{M}$ ) e HT-29 (adenocarcinoma do cólon;  $\text{IC}_{50} = 0.011\text{-}2.22 \mu\text{M}$ ).<sup>15</sup> Além disso, atualmente os compostos de cobre são também relevantes do ponto de vista da medicina nuclear, pois apresentam propriedades que são interessantes para a radioterapia e imagiologia.<sup>15,19</sup>

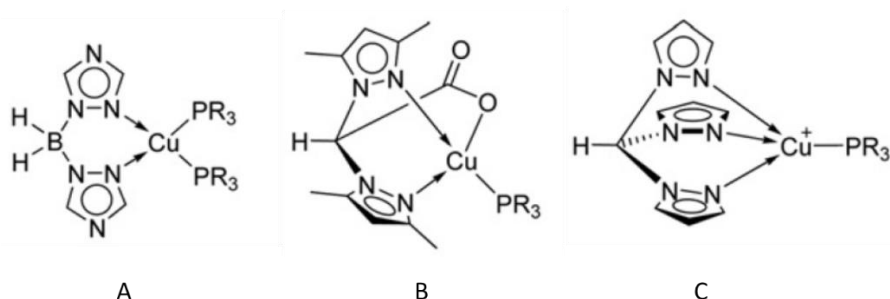


### Figura 4 - Complexos de $\text{Cu}(\text{II})$ contendo ligandos tridentados heteroaromáticos.

Uma outra família de complexos de coordenação de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  contendo dois fosfanos diferentes e vários ligandos heterocíclicos (**Figura 5 A, B e C**) foram estudados em linhas celulares de tumores cancro humanos como: MCF-7 (mama), A431 (cervical), HCT-15 e LoVo (cólon), A549 (pulmão), HL60 (leucemia) e A375 (melanoma).<sup>20</sup> Verificou-se através de vários estudos que

<sup>1</sup>  $\text{IC}_{50}$ : concentração que induz morte celular em 50% das células.<sup>12</sup>

muitos destes complexos de cobre apresentam baixos valores de IC<sub>50</sub> para determinadas linhas, sendo todos da ordem dos micromolares e muitos inferiores ao da cisplatina. Verificou-se que a alteração da denticidade dos ligandos nitrogenados juntamente com o caráter lipofílico se correlacionavam com a citotoxicidade dos compostos.<sup>20</sup>



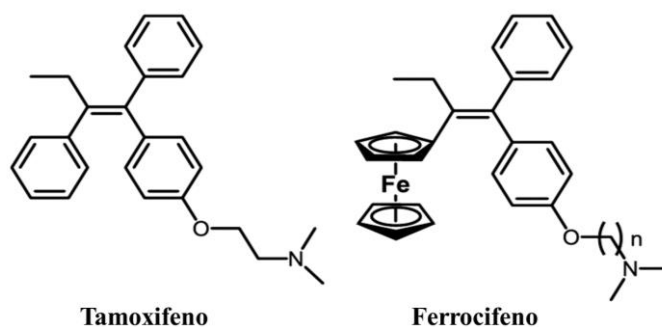
**Figura 5 - Complexos de Cu<sup>I</sup> contendo diferentes fosfanos e heterocíclonitrogenados.**<sup>20</sup>

Através da análise dos resultados obtidos para estes complexos de cobre, é possível verificar que existem algumas tendências. Em todos os casos se verificou que o cobre metálico é capaz de fazer ligações estáveis com ligandos contendo heteroátomos, e portanto, todos os compostos que apresentam ligandos nitrogenados, para além de serem estáveis apresentaram atividade biológica relevante.

### 1.2.2. Compostos de ferro como potenciais agentes anticancerígenos

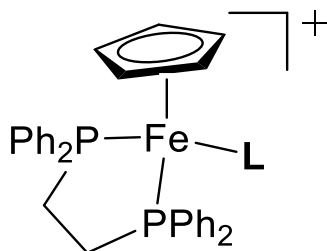
Relativamente à utilização do ferro para a síntese de compostos com potencial aplicação na terapia do cancro, podemos dividi-los em duas classes de compostos: organometálicos e de coordenação.

Existem vários complexos organometálicos baseados no ferroceno direcionados à terapia do cancro. Entre eles, destaca-se o ferrocifeno, um complexo organometálico baseado no tamoxifeno (medicamento utilizado no tratamento do cancro da mama; **Figura 6**) e que é muito ativo contra células do cancro da mama.<sup>21</sup> Neste composto o ferroceno pode ser facilmente oxidado na célula, obtendo-se o ferricínio, que pode causar, conseqüentemente, danos oxidativos.<sup>22</sup> No entanto, a baixa biodisponibilidade impede a sua entrada em estudos clínicos.



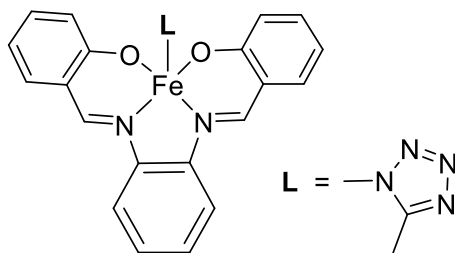
**Figura 6 - Estrutura do Tamoxifeno e Ferrocifeno.**

Ao longo dos últimos anos tem sido desenvolvida uma nova família de compostos organometálicos de ferro contendo o fragmento 'Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)' ou 'FeCp' pelo Grupo de Química Organometálica da FCUL. Entre eles, uma família de complexos de ferro catiónicos onde variam apenas os substituintes heteroaromáticos **L** (L = ligandos imidazóis<sup>10,21</sup> ou nitrilos)<sup>23</sup> com a fórmula geral [Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(dppe)(L)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] (**Figura 7**).<sup>21</sup> Estes compostos apresentam diferentes atividades e valores de IC<sub>50</sub> entre os 0,2-10  $\mu$ M para várias linhas cancerígenas humanas como A2780 (ovário), MCF7 (mama), HeLa (cervical) e HL-60 (leucemia)<sup>21,23</sup> sendo que em algumas delas certos compostos revelaram-se cerca de 10-20 vezes mais citotóxicos que a cisplatina.



**Figura 7 - Complexos de ferro, [Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(dppe)(L)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]**

Tendo como base o analgésico comercializado pela Bayer *Salophen* (ou *acetaminosalol*),<sup>[27]</sup> foram sintetizados seis complexos de ferro baseados em Fe<sup>x</sup>(*salophen*) (**Figura 8**). Estes compostos de Fe<sup>II</sup> ou Fe<sup>III</sup> contêm na sua esfera de coordenação, para além do *salophen*, outros ligandos à base de imidazóis substituídos que se apresentam coordenaram-se pelos átomos de nitrogénio.<sup>24,25,26</sup> Foram testados em diferentes linhas cancerígenas humanas tais como, HOS (osteosarcoma), MCF7 (adenocarcinoma da mama), A549 (adenocarcinoma hepático), HeLa (carcinoma cervical), A2780 (carcinoma do ovário) e G-361 (melanoma maligno). Dos seis complexos testados nas várias linhas celulares verificou-se que todos exibem boa atividade anticancerígena, sendo o melhor cerca de 200 vezes mais citotóxico que a cisplatina, com valores de IC<sub>50</sub> na ordem dos nanomolar.<sup>24</sup>



**Figura 8 - Família de complexos Fe<sup>x</sup>(*salophen*).**

### 1.3. Complexos de metal-polímero: rumo à terapia dirigida

A tecnologia permite a produção sob medida de fármacos e medicamentos biotecnológicos. No entanto, muitos deles requerem tecnologias especiais de formulação para superar os problemas associados aos fármacos comuns. Alguns dos desafios a superar são: a baixa solubilidade, estabilidade química limitada *in vitro* e *in vivo* após administração, a biodisponibilidade e efeitos secundários agressivos para o organismo.<sup>27</sup> Durante as últimas décadas, a tecnologia de entrega de fármacos, tem avançado de forma significativa, conduzindo assim ao desenvolvimento de

várias formulações clínicas para melhorar a entrega de fármacos e a cinética de liberação desejada durante longos períodos de tempo que podem variar entre um dia e um ano.<sup>28</sup>

O termo "administração de fármaco ao alvo" ou "*targeted drug delivery*" é usado na entrega de fármacos, e é diferente de "terapia-alvo" (terapia dirigida) ou "*targeted therapy*". A entrega de fármacos a um local específico refere-se à acumulação do fármaco predominantemente dentro de uma zona-alvo, que é independente do modo e via de administração do mesmo.<sup>29</sup> Para que o fármaco possa ser entregue ao alvo, necessita por vezes de veículos que podem ser partículas ou nanopartículas poliméricas.

As estratégias de *targeted drug delivery* são divididas nas categorias "passivas" ou "ativas".<sup>30</sup> No âmbito do cancro, os mecanismos "passivos" são baseados na acumulação de fármacos nas áreas em torno dos tumores que é o caso do "efeito de Permeação e Retenção Melhorada" (*Enhanced Permeation and Retention, EPR*), o qual pode ser virtualmente aplicado a todas as macromoléculas. Este efeito consiste num aumento considerável da seletividade para os tumores por parte das macromoléculas, que resulta da existência de uma estrutura vascular defeituosa nos vasos sanguíneos dos tumores, fazendo com que a concentração do fármaco no tecido tumoral seja 100 vezes superior à do sangue e, conseqüentemente, a toxicidade para as células saudáveis diminui, minimizando os efeitos secundários.<sup>30,31</sup>

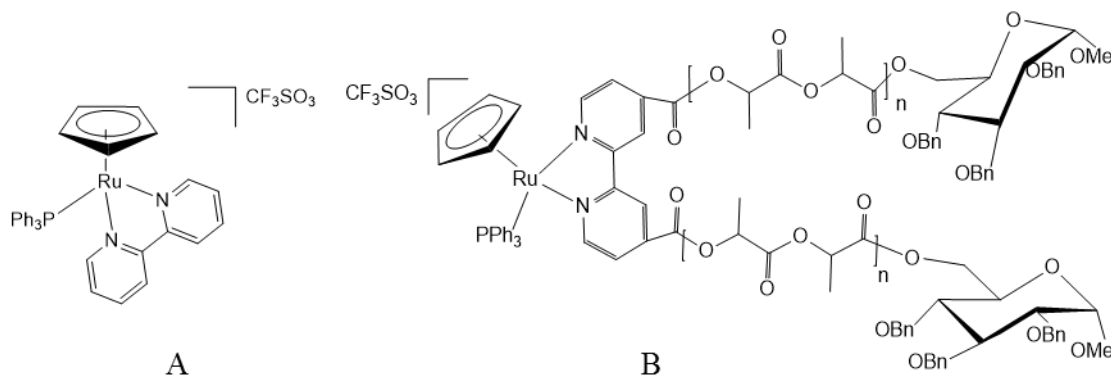
O direcionamento "ativo" é utilizado para descrever as interações específicas entre o transportador do fármaco e as células-alvo, geralmente por meio de interações ou ligações com os recetores específicos.<sup>30</sup>

A literatura nesta área é muito vasta e principalmente dedicada a fármacos de platina.<sup>32</sup> Os resultados até agora obtidos são promissores, mas não existe ainda nenhum complexo de platina-polímero em uso clínico.<sup>32</sup>

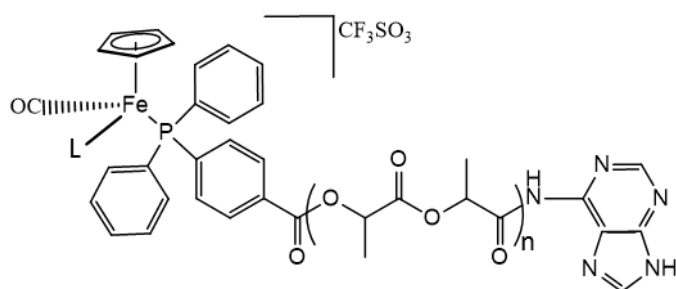
Como alternativa têm surgido alguns complexos de ruténio-polímero, de forma a tentar ultrapassar algumas das limitações da platina, como já foi referido na **seção 1.2**. Em particular, para melhorar a performance *in vivo* de compostos contendo o fragmento 'Ru( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(2,2'-bipiridina)',<sup>10</sup> foram acopladas duas cadeias de polilactídeo à bipiridina originando o RuPMC (**Figura 9B**).<sup>10,31</sup> O grupo terminal pode ser ainda funcionalizado para incluir várias moléculas de interesse biológico, como é o caso da glucose neste exemplo. Comparativamente com o seu complexo parental de baixo peso molecular, TM34 (**Figura 9A**), o RuPMC (**Figura 9B**) apresenta valores de IC<sub>50</sub> similares para as linhas cancerígenas do ovário (A2780) e mama (MCF7 e MDA-MB-231).<sup>10</sup> Para além disso, a introdução das cadeias poliméricas proporcionou um aumento significativo da captação celular indicando que as macromoléculas podem potenciar um diferente mecanismo de internalização celular, no entanto, sem afetar a citotoxicidade dos compostos.<sup>10</sup>

Tendo por base estes resultados, foram desenvolvidos três complexos de 'Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)' (**Figura 10**) de alto peso molecular.<sup>33</sup> Verificou-se que mesmo com estruturas poliméricas e uma grande massa molecular estes complexos apresentam baixos valores de IC<sub>50</sub>, sendo dois deles muito mais

citotóxicos que a cisplatina ( $\gg 10$ ) para a linha A375 (células do melanoma humano) e também para a linha MDA-MB-231 (células do adenocarcinoma da mama).<sup>[10]</sup>



**Figura 9 - A) TM34 [Ru( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(PPh<sub>3</sub>)(2,2'-bipiridina)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] e B) RuPMC [Ru( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(PPh<sub>3</sub>)(mHBL)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] (mHBL= Bipiridil funcionalizado com PLA contendo glucose terminal)**



**Figura 10 – Estruturas dos complexos [Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(CO)(L)(PPh<sub>2</sub>Ph- $\rho$ -CO-PLLA-Adn)][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>33</sup>**

Ambas as famílias de compostos que foram apresentadas são compostos poliméricos à base de polilactídeo (PLA). Este é um polímero biocompatível e não tóxico e aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*). Neste sentido, a síntese de novos compostos organometálicos ligados as estruturas poliméricas biocompatíveis reveste-se de uma enorme importância no desenvolvimento de uma nova classe de fármacos para o combate do cancro de forma seletiva.

Como foi referido anteriormente, a taxa de mortalidade devido ao cancro, tem aumentado de ano para ano.<sup>1</sup> Estes números são uma forte motivação para que haja cada vez mais investigação nesta área, principalmente no que diz respeito aos tratamentos quimioterapêuticos que são utilizados e os efeitos secundários que afetam os utentes. Uma alternativa seria a utilização de metais não tóxicos para o organismo e tirar vantagem do efeito EPR, com compostos de alto peso molecular utilizando polímeros biocompatíveis e biodegradáveis para aumentar a seletividade.

#### 1.4. Polímeros biodegradáveis: poliésteres e polilactídeo

Com o uso dos plásticos tem aumentado muito em todo o mundo, atingindo mais de 100 milhões de ton/ano de plásticos produzidos,<sup>34</sup> será grande a quantidade destes resíduos descartados no meio ambiente. Nos últimos anos, têm sido criados cada vez mais regulamentos para haver um maior rigor em termos de proteção ambiental no mundo. Isto tem forçado os países a repensar as suas estratégias de proteção ambiental. Deste modo, surgiu a necessidade de desenvolver polímeros **biodegradáveis**, ou seja, polímeros que ao serem descartados no meio ambiente não

demorem dezenas de anos para se decompor completamente. Os polímeros biodegradáveis podem ser degradados por microorganismos como fungos, bactérias e também algumas algas, de forma a dar origem a dióxido de carbono, água, gás natural e biomassa.<sup>35</sup>

Com a necessidade crescente de evitar o uso do petróleo, que é uma fonte de energia não renovável, tem-se recorrido ao uso de **biopolímeros**, que são polímeros produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, girassol, entre outras.<sup>35</sup> Alguns exemplos de biopolímeros são o amido, o polihidroxibutirato (PHB), o polihidroxibutirato-*co*-polihidroxihexanoato (PHBHx) e o **polilactídeo** (que será referido como **PLA**). Os polímeros provenientes da indústria petroquímica não são, na sua maioria, polímeros biodegradáveis.<sup>36</sup> Mas há que referir que um polímero biodegradável não é necessariamente um biopolímero, a degradação do primeiro dá-se mais rapidamente, e o biopolímero é proveniente de fontes renováveis, que é o caso da biomassa.

Através de estudos verificou-se que é possível substituir no dia-a-dia os polímeros provenientes do petróleo, por biopolímeros, sendo que alguns deles têm um grande potencial, como é possível verificar na **Tabela 1**.<sup>37</sup>

**Tabela 1 - Potenciais de substituição de alguns polímeros de origem fóssil por biopolímeros**<sup>37</sup>

Polímero	PVC	PEAD	PEBD	PP	PS	PMMA	PA	PET	PC
Amido	-	+	+	+	+	-	-	-	-
PLA	-	+	-	+	+	-	+	+	-
PHB	-	+	-	++	+	-	-	-	-
PHBHx	+	++	++	++	+	-	-	+	-

++ substituição completa; + substituição parcial; - não substitui.

Porém ainda há muito para fazer porque, juntamente com o problema da implantação dos biopolímeros, coexistem fatores socioeconómicos e climáticos, pois nem todos os países apresentam condições climáticas para a criação de culturas sustentáveis para a produção de biomassa, e uma vez que esse tipo de polímero é mais caro do que os provenientes da indústria petroquímica, iria requerer um grande investimento financeiro que não está acessível em muitos países subdesenvolvidos.

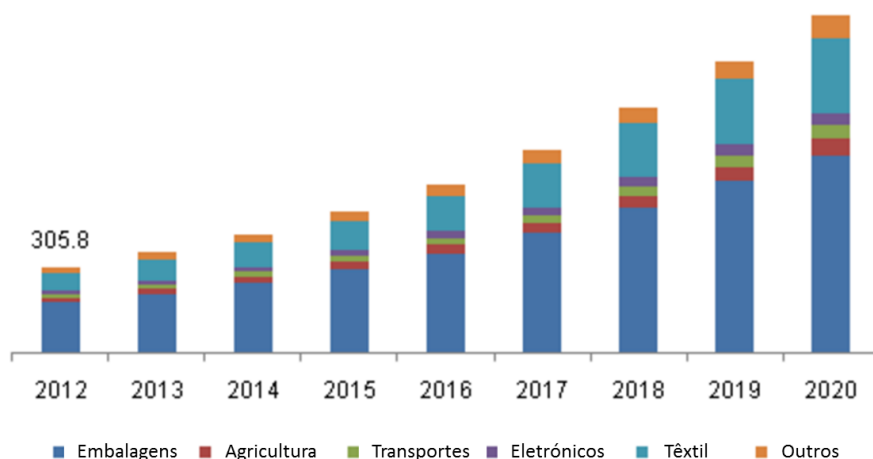
O **polilactídeo**, em particular, é um poliéster alifático, termoplástico, semicristalino ou amorfo, biocompatível, biodegradável e não tóxico, que é sintetizado a partir do ácido láctico proveniente de fontes naturais renováveis contendo amido ou açúcar como o milho, o trigo, a cana-de-açúcar, a beterraba ou a batata.<sup>37</sup> Porém, a produção de maior tonelagem do PLA é feita a partir de outro monómero, o **lactídeo**. Na realidade, este composto é um dímero do ácido láctico apresentando-se na forma de um diéster cíclico e quiral que pode existir como três estereoisómeros, o **D-lactídeo** {(3R, 6R)-3,6-Dimetil-1,4-dioxan-2,5-diona} (ou **R-Lactídeo**), o **L-lactídeo** {(3S, 6S)-3,6-Dimetil-1,4-dioxan-2,5-diona} (ou **S-Lactídeo**) e o monómero óticamente não ativo **D,L-lactídeo** {(3R, 6S)-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona} (ou **meso-Lactídeo**).<sup>38</sup>

#### 1.4.1. Polilactídeo: Mercado atual, indústria e aplicações

É esperado que a crescente consciência e procura de produtos de embalagem verde ambiental impulse a procura de PLA ao longo dos próximos anos. Outro fator que poderá impulsionar o

mercado do PLA é o aumento dos preços do petróleo bruto, uma vez que há uma necessidade de reduzir a dependência de produtos à base de petróleo tradicionais. Também é esperado o aumento da adoção de bioplásticos tendo em conta a evolução das preferências dos consumidores e a necessidade de produtos sustentáveis para causar um impacto positivo sobre o mercado mundial nos próximos anos.<sup>39</sup> O mercado global de PLA foi estimado em 360.8 toneladas em 2013, e deve chegar a 1.2 mil toneladas em 2020, crescendo a uma taxa anual média de 18.8% de 2014 a 2020. Em termos de receita, o mercado foi avaliado em 793.9 milhões de dólares em 2013, e é esperado chegar a 2.2 mil milhões de dólares em 2020, crescendo a uma taxa anual média de 15.8% de 2014 a 2020.<sup>39</sup>

## Mercado Global das aplicações do PLA, 2012-2020 (Toneladas)



**Gráfico 2 - Estimativa do crescimento nas aplicações do PLA, 2012-2020<sup>39</sup>**

À escala industrial, o PLA é sintetizado maioritariamente a partir do lactídeo com o auxílio dum catalisador, o octonoato de estanho  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ , através da polimerização viva<sup>2</sup> por abertura de anel (*ROP – Ring Opening Polymerization*), proporcionando a síntese de polímeros de elevado peso molecular.<sup>40</sup> Este método apresenta como grande desvantagem, no âmbito de aplicações medicinais, a impossibilidade de separar totalmente o metal do polímero. Sendo o estanho um metal tóxico faz com que o polímero embora biodegradável não seja biocompatível.

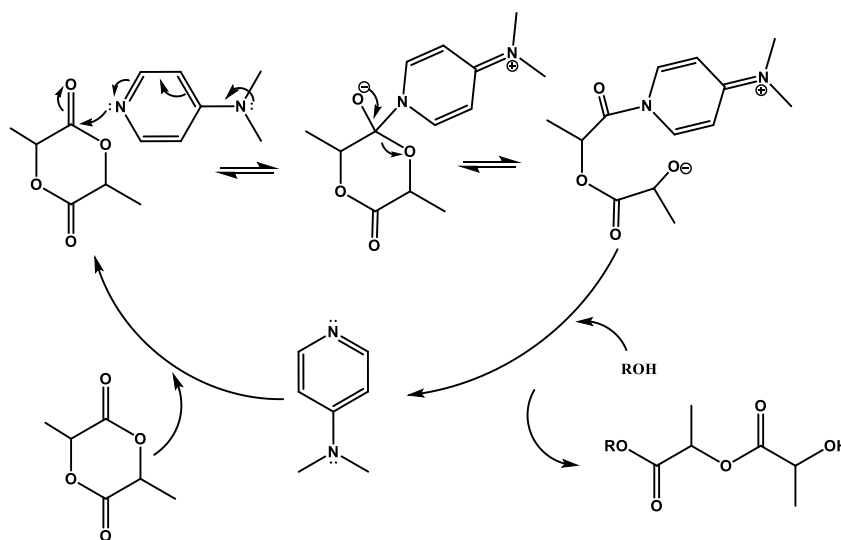
O PLA tem vindo a ganhar cada vez mais espaço no mercado, principalmente em relação a aplicações medicinais. Este é um dos polímeros aprovados pela FDA,<sup>41</sup> não tóxico e que em meio aquoso se hidrolisa originando ácido láctico, que também não é tóxico, e quando metabolizado pelo organismo dá origem a  $\text{CO}_2$  que é facilmente eliminado pelo sistema respiratório. Tendo em conta que a aplicação que se pretende dar ao polímero no âmbito desta tese, é para fins medicinais, é necessário que a síntese do PLA seja reprodutível e que o produto seja extremamente puro, a nível de produtos secundários ou contaminantes como catalisadores metálicos e/ou solventes.

<sup>2</sup> Polimerização viva é um processo de crescimento de cadeia onde não ocorrem reações de terminação.



#### 1.4.2. Polimerização por abertura de anel via organocatálise

Uma alternativa ao uso de catalisadores metálicos é o uso de catalisadores orgânicos, uma forma biocompatível (não tóxica) e menos poluente de produzir polímeros. A polimerização do L-Lactídeo via ROP pode acontecer por diferentes mecanismos, como aniônica, catiônica, enzimática ou bifuncional.<sup>42</sup> Os mecanismos de polimerização dependem os catalisadores/ativadores utilizados na mesma. No caso concreto desta dissertação de Mestrado iremos centrar-nos nas polimerizações catalisadas pela dimetilaminopiridina (DMAP) utilizando como iniciador álcoois. Neste caso, o mecanismo de polimerização do L-Lactídeo utilizando a DMAP como catalisador/ativador, é o de monómero ativado como apresentado no **Esquema 1**.<sup>42</sup> Segundo o mecanismo proposto há um ataque nucleofílico da DMAP ao carbonilo do monómero para gerar um zwitterião piridínio/alcóxido, fazendo com que haja a abertura do anel (ROP), de seguida o intermediário zwitteriônico é “desfeito” por um subsequente ataque nucleofílico por conta do iniciador (ROH), que acontece na ligação carbonilo da ligação amida do intermediário (DMAP-LA), onde há libertação de DMAP e consequentemente uma transferência de um próton ( $H^+$ ) do iniciador, fazendo com que o alcóxido terminal do monómero se transforme num álcool secundário (RO-LA-H), e desta forma haverá a propagação da polimerização até que se acabe o monómero ou se extinga a polimerização. A DMAP é eficaz para a abertura de anel de LA na presença quer de um álcool primário quer de um álcool secundário. A espécie resultante de propagação, um álcool secundário, no entanto, só está ativa para o monómero LA e não a cadeia de polímero, minimizando as reações de transesterificação indesejáveis.<sup>42</sup>



**Esquema 1 – Proposta de mecanismo de polimerização do LA com DMAP e álcool como iniciador, via monómero ativado.**<sup>42</sup>

Nas polimerizações do LA, podem ocorrer como referido anteriormente reações de transesterificação<sup>42</sup> que podem levar à quebra da cadeia, ramificações do polímero e até cicloadições, levando a um aumento da dispersividade  $\mathbf{D}$  (razão entre a massa molar média em peso e a massa molar média em número,  $\mathbf{D} = M_w/M_n$ )<sup>43</sup> do polímero. Quando se diz que um polímero têm uma boa dispersividade, quer dizer que há uma grande homogeneidade do tamanho das cadeias poliméricas e nesse caso verifica-se que  $\mathbf{D} \approx 1$ . Para a polimerização viva do PLA existe uma correlação linear entre o peso molecular e a conversão do monómero, que resultam  $\mathbf{D}$  estreitas e pesos moleculares previstos com base na razão entre monómero e iniciador.<sup>42</sup>

## 1.4 Enquadramento do Trabalho

Têm sido feitos grandes progressos na procura de novas opções terapêuticas para o combate ao cancro fazendo uma sinergia entre a química de coordenação aliada à polimerização controlada para a síntese de novos complexos de metal-polímero (PMCs). Neste contexto, esta dissertação de Mestrado pretende combinar as mais-valias destas duas áreas para atingir o objetivo final de síntese de um novo composto anticancerígeno macromolecular de um metal essencial. Para atingir esse fim, este trabalho teve os seguintes objetivos específicos: (i) síntese de novas ciclamas; (ii) polimerização do L-lactídeo ativado pela DMAP e utilizando como iniciadores o tris-hidroximetilfosfano e ciclamas derivatizadas; (iii) síntese de novos PMCs de ferro e cobre; (iv) síntese dos análogos de baixo peso molecular dos PMCs sintetizados em (iii); (v) caracterização química dos novos compostos sintetizados em (i)-(iv); e, finalmente, (vi) avaliação das potencialidades antitumorais dos novos compostos através de estudos de viabilidade celular em linhas tumorais humanas.

A escolha do tris-hidroximetilfosfano e de derivados da ciclama como iniciadores da polimerização não foi aleatória. O primeiro, é um fosfano com três álcoois primários abrindo a possibilidade de termos a formação de três cadeias poliméricas em crescimento simultâneo, para a mesma quantidade de catalisador havendo portanto uma economia de átomos. Para além disso, os fosfanos em geral coordenam-se facilmente a iões metálicos, nomeadamente ao ferro. Por outro lado, as ciclamas são tetraminas cíclicas com capacidade de coordenar a catiões metálicos, nomeadamente metais de transição,<sup>44</sup> e apresentam atividade anti-bacteriana<sup>45</sup> e anti-viral.<sup>46</sup>

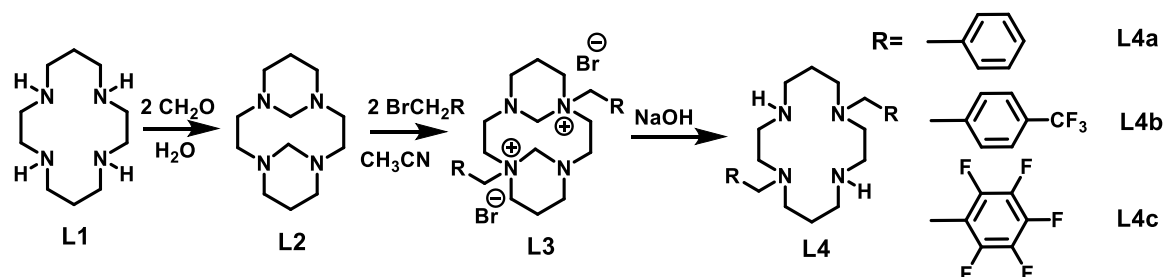
## **CAPÍTULO 2: RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## CAPÍTULO 2: RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1. Síntese e caracterização de ciclamas e derivados

A ciclama **L1**, foi sintetizada de acordo com o descrito na literatura.<sup>47</sup> A síntese e caracterização deste composto encontra-se muito bem documentada e por isso não será aqui discutida. No entanto, a pureza do produto obtido foi avaliada por RMN de próton e análise elementar. Partindo da ciclama **L1**, foram sintetizados os seus derivados, **L4a-c**, tal como apresentado no

#### Esquema 2.



#### Esquema 2 - Esquema reacional da síntese dos compostos L1 a L4.

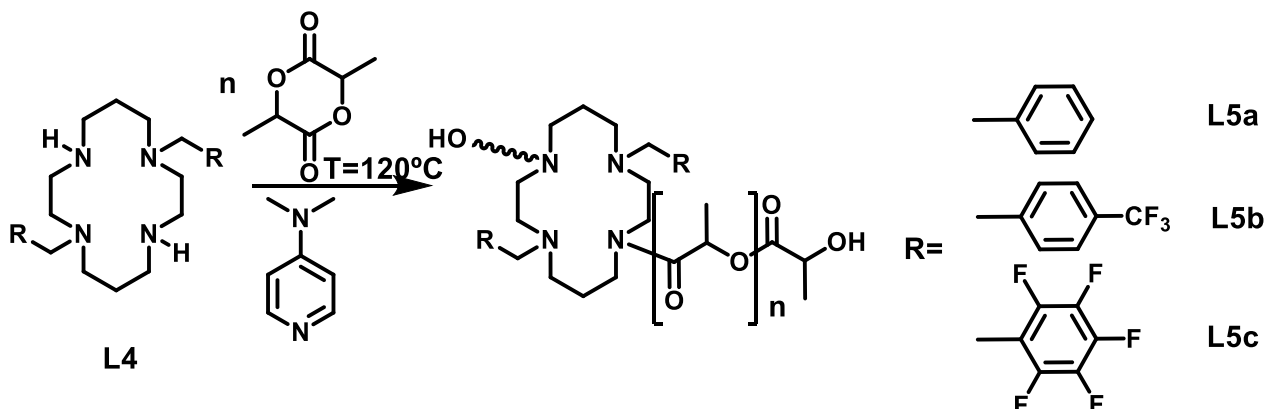
Uma vez que se pretendia para este trabalho obter apenas a disssubstituição da ciclama e não a mono, tri ou tetrassubstituição, a síntese destes derivados foi feita através da reação do composto **L2** com dois equivalentes do halogeneto de alquilo ou arilo (**RX**) apropriado (ver

**Esquema 2**). O composto **L2**, que resulta da reação da ciclama com dois equivalentes de formaldeído, apresenta um par de nitrogénios *trans* com a carga localizada mais negativa e com a pré-conformação adequada para que a disssubstituição ocorra seletivamente. Da reação de **L2** com o respetivo halogeneto de alquilo ou arilo, formaram-se os sais de amónio quaternários **L3a**, **L3b** e **L3c**, os quais deram origem respetivamente aos compostos **L4a**, **L4b** e **L4c**, após hidrólise em meio muito básico. Esta funcionalização permitiu que os outros nitrogénios em posição *trans* pudessem ficar disponíveis para serem usados como iniciadores da polimerização do L-lactídeo.

Uma das abordagens utilizadas para a funcionalização dos derivados de ciclama, **L4a**, com PLA foi usar complexos de zircónio suportados neste tipo de ligandos, uma vez que se sabe que esses complexos são capazes de fazer crescer cadeias poliméricas de ésters cíclicos por introdução do monómero na ligação Zr-N<sub>amido</sub>.<sup>48</sup> Porém, o complexo estudado [Zr(**L4a**)Cl<sub>2</sub>] não apresentou qualquer atividade catalítica para a polimerização do L-Lactídeo tanto em *bulk* a 135 °C, como em solução usando diclorometano à temperatura ambiente ou ortodichlorobenzeno a 80 °C. Em todos os casos verificou-se apenas a presença de ligando livre e monómero do L-lactídeo e por vezes até a degradação do complexo.

Uma outra abordagem, e até mais “amiga do ambiente”, é a polimerização do L-Lactídeo com auxílio da 4-dimetilaminopiridina (DMAP) que atua com ativador do monómero. Através deste método sintetizaram-se novos compostos macromoleculares derivados da ciclama **L5a-c**, tal como apresentado no **Esquema 3**. A reação de polimerização deu-se em *bulk* a 120 °C com o crescimento de duas cadeias de PLA, isto é, as aminas secundárias dos compostos **L4a**, **L4b** e **L4c**, funcionaram como iniciadoras da polimerização. Variando a razão do monómero/iniciador

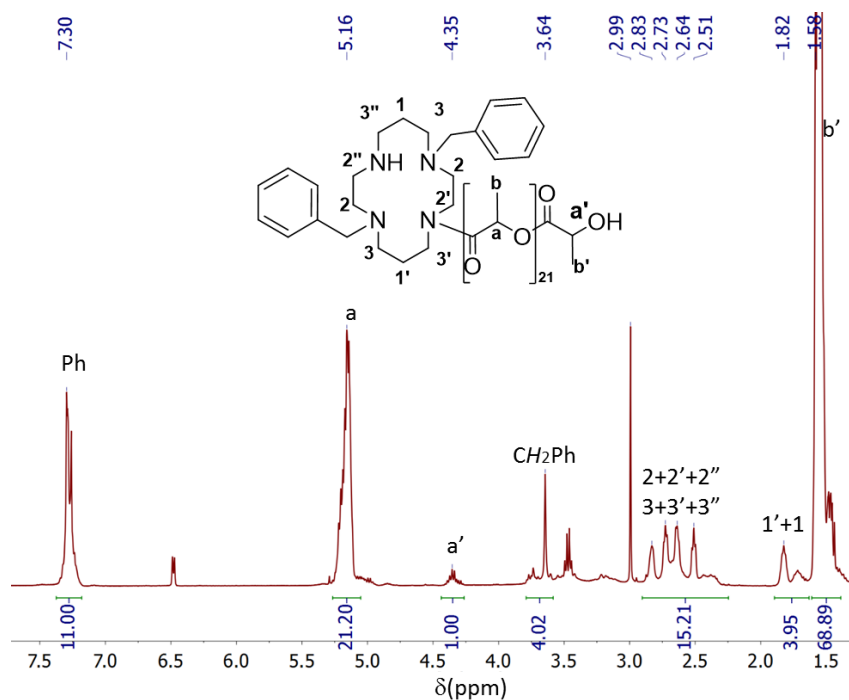
utilizados obtiveram-se compostos com diferentes tamanhos de cadeias poliméricas **L5a**, **L5b** e **L5c**.



**Esquema 3** - Reação de polimerização do L-Lactídeo usando como ativador a DMAP e iniciador o **L4**.

A polimerização por abertura de anel do L-lactídeo com a utilização da DMAP para ativar o monómero já era conhecida no que se diz respeito a álcoois primários. Neste caso, provou-se também que uma amina secundária inserida num macrociclo é capaz de iniciar a polimerização dando origem a compostos macromoleculares de ciclamas funcionalizados com PLA. Tanto quanto sabemos é o primeiro exemplo até hoje descrito de uma polimerização do L-lactídeo catalisada pela DMAP utilizando aminas secundárias como iniciadoras da mesma.

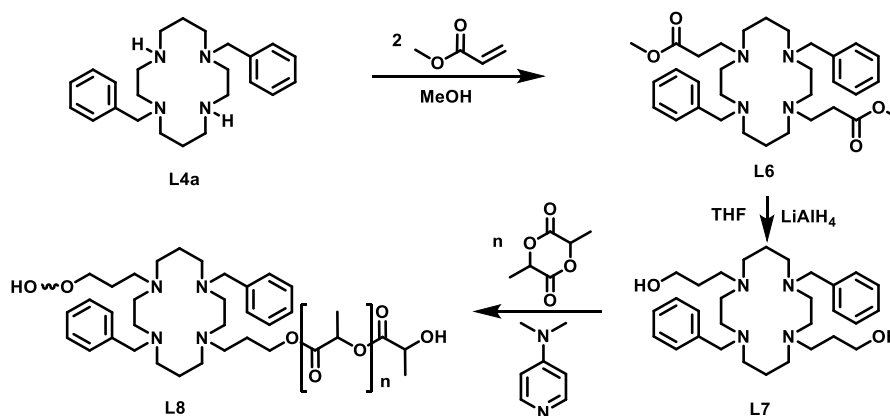
Estas ciclamas de alto peso molecular (**L5a-L5c**) contendo dois braços de PLA e dois benzilos em posição *trans*, foram caracterizadas através de espectroscopia de RMN. Porém, após comparação entre as integrações dos sinais dos grupos terminais do PLA ( $\text{H}_a$ ) e os sinais correspondentes à ciclama, observou-se que os compostos não apresentavam uma homogeneidade de cadeias poliméricas, isto é, quando se tentou caracterizar e integrar a áreas dos picos no espectro de próton para verificar se houve o crescimento das duas cadeias de polímeros, verificou-se que esta não era uma realidade. Através do RMN foi possível ver que por vezes havia o crescimento de apenas uma cadeia polimérica ao passo que noutros casos existiam duas cadeias de PLA mas nem sempre do mesmo tamanho, como é possível verificar na **Figura 11**, onde se representou composto **L5a** e seu espectro de próton. Neste espectro observa-se apenas um *CH* terminal da cadeia polimérica que integra para uma molécula de ciclama. Da mesma forma que neste espectro se verifica apenas uma cadeia polimérica por ciclama, quando é feito o espectro de  $^{19}\text{F}$  para os compostos **L5b** e **L5c**, é possível verificar muito mais sinais de flúor do que os esperados, pois há formação de uma mistura de compostos e há uma diminuição da simetria, devido ao crescimento de apenas uma cadeia polimérica e não duas em posições *trans*.



**Figura 11 - Espectro de RMN próton de um composto secundário na síntese de L5a, em Clorofórmio deuterado.**

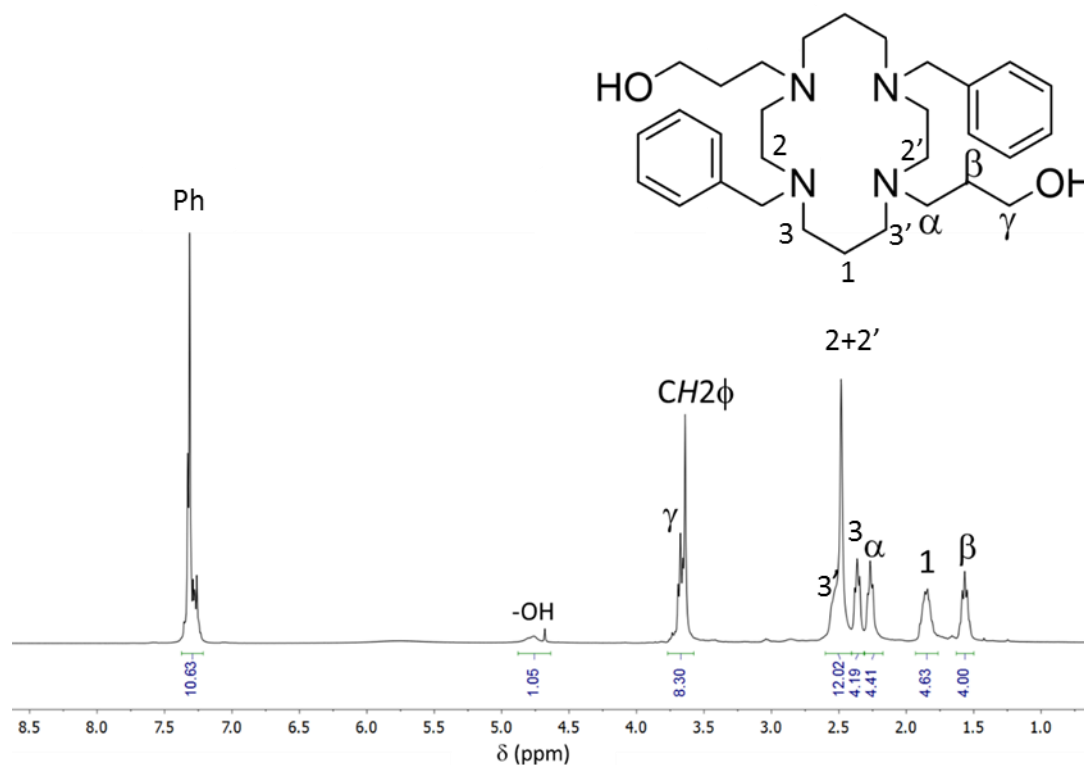
Na caracterização dos compostos macromoleculares **L5a**, **L5b** e **L5c** verificou-se que estes se degradam muito rapidamente. Uma razão pode ser a quebra da ligação amida entre a ciclama e o PLA por hidrólise promovendo assim a quebra da cadeia polimérica. Mediante esta situação, e tendo em consideração que a aplicação que se pretende dar a estes compostos como agentes antitumorais obriga a que os mesmos sejam estáveis em soluções aquosas, decidiu-se introduzir um espaçador entre as aminas secundárias da ciclama e o PLA de modo a não existir a ligação amida. Escolheu-se assim um espaçador contendo um álcool primário que pudesse atuar como iniciador da polimerização formando uma ligação éster ao PLA após reação com o monómero.

A estratégia de síntese deste novo derivado da ciclama iniciou-se fazendo reagir **L4a** com excesso de acrilato de metilo originando o composto **L6** que contém dois grupos  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$  ligados ao segundo par de nitrogénios *trans*, tal como apresentado no **Esquema 4**. Após purificação e caracterização, este produto foi reduzido com  $\text{LiAlH}_4$  dando origem ao composto **L7** que contém dois espaçadores com a função álcool primário terminal.



**Esquema 4 – Esquema reacional de funcionalização do composto L4.**

A caracterização do intermediário **L6** e do composto **L7**, foi feita por RMN, FTIR e análise elementar. Os espectros de RMN de próton e carbono dos compostos **L6** e **L7** apresentam sinais de prótons e carbonos equivalentes revelando uma simetria  $C_{2v}$  em ambos os casos. Na **Figura 12** apresenta-se, o espectro de RMN de próton do composto **L7**, como exemplo.

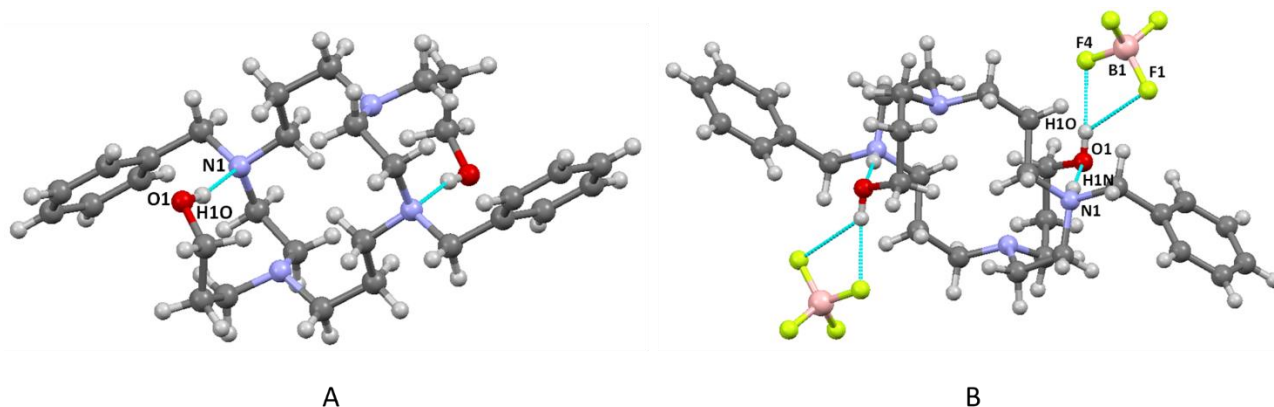


**Figura 12 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em clorofórmio deuterado, do composto **L7**.**

Para cada molécula é possível verificar que existe um par de sinais de próton e carbono equivalentes correspondentes aos prótons e **1**, **2**, **2'**, **3** e **3'** do macrociclo. Apenas os prótons e o carbono central (**1**) parte cíclica da ciclama que apresenta 3 carbonos, originam um único sinal a campo alto devido à sua vizinhança ser igual. Os prótons do grupo  $\text{CH}_2$  do substituinte benzilo apresentam-se como um singleto a 3.76 ppm atestando a livre rotação em torno da amina. Os grupos  $\text{CH}_2$  do espaçador aparecem aos desvios químicos esperados e com multiplicidade correspondente a uma cadeia  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ . Devido à semelhança magnética dos prótons e carbonos dos grupos  $\text{NCH}_2$  do braço benzilo e do espaçador, os respectivos sinais estão sobrepostos a cerca de 3.76 ppm no espectro de próton.

Foi também possível obter a estrutura de estado sólido por difração de raios-X de cristal único para **L7** (**Figura 13A**). Esta estrutura mostra, para além do anel de catorze membros da ciclama, dois anéis de nove membros originados pela presença de pontes de hidrogénio entre os átomos  $\text{H}_{10}$  e  $\text{N}_1$  ( $d_{\text{OH-N}} = 2.105 \text{ \AA}$ ) (ver **Figura 26** em anexo). Nesta estrutura é possível verificar que a molécula está bastante trancada, ou seja, os substituintes  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  não estão a rodar livremente uma vez que se encontram a fazer ligações por pontes de hidrogénio com as aminas  $\text{N}_1$  da ciclama.

Foi também possível obter a estrutura de estado sólido do composto **L7** sob a forma de sal contendo o anião tetrafluoroborato (**L7.2HBF<sub>4</sub>**). As representações Mercury destes compostos obtidas por difração de raios-X de cristal único encontram-se na **Figura 13**.



**Figura 13 - Representação Mercury dos compostos L7(A) e L7.2HBF<sub>4</sub>(B) As linhas a tracejado representam pontes de hidrogénio.**

A estrutura molecular de **L7.2HBF<sub>4</sub>** é muito semelhante à do seu precursor neutro mostrando, para além do anel de catorze membros da ciclama, dois anéis de nove membros originados pela presença de pontes de hidrogénio entre os átomos H1O e N1 ( $d_{\text{OH-N}} = 1.958 \text{ \AA}$ ) (ver **Figura 13A** ou **Figura 26B**). Esta distância é ligeiramente menor do que a encontrada em **L7** muito provavelmente devido ao átomo de oxigénio se encontrar mais eletronegativo devido ao facto do próton H1O se encontrar também a estabelecer pontes de hidrogénio com o anião BF<sub>4</sub><sup>-</sup>. Estes contra-íões encontram-se ligados por pontes de hidrogénio entre os átomos F1 e F4 e o átomo H1O com distâncias de 2.501 e 1.966 Å, respetivamente.

Os dados cristalográficos e detalhes experimentais da determinação estrutural dos compostos **L7** e **L7.2HBF<sub>4</sub>** encontram-se em Anexo.

Os compostos **L6** (ver **Figura 25** em anexo) e **L7** foram também caracterizado em estado sólido por FTIR usando pastilhas de KBr como suporte. No espetro obtido por esta técnica espectroscópica vêem-se nitidamente as bandas vibracionais de ligações características do composto, como por exemplo dos grupos funcionais O-H (3250 cm<sup>-1</sup>), C-H<sub>aromáticos</sub> (3000-2800 cm<sup>-1</sup>), e algo que é bastante vulgar e notável nesse tipo de compostos - a quantidade de bandas vibracionais de entre os 1500-900 cm<sup>-1</sup>. Isto acontece devido à fluxionalidade da ciclama, isto é, as ligações podem vibrar e rodar em vários ângulos, o que origina um número muito grande de vibrações assimétricas e permitidas.



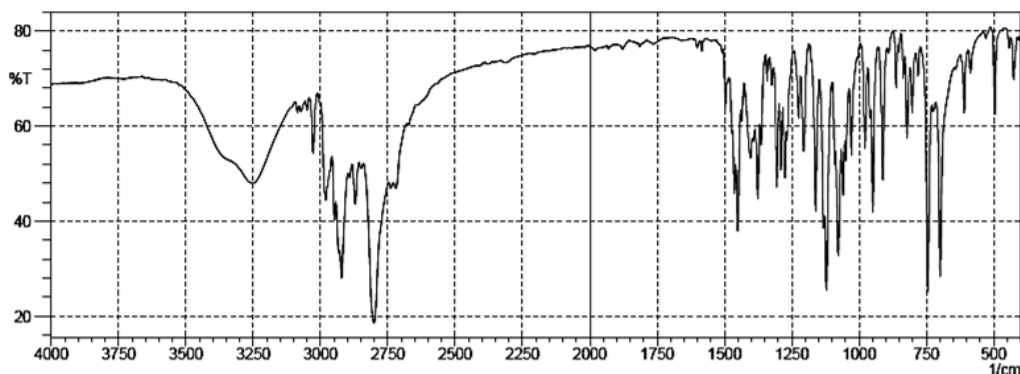


Figura 14 - Espectro de FTIR do composto L7 no estado sólido suportado em KBr.

A partir do composto L7 fizeram-se dois compostos macromoleculares, L8a e L8b, de acordo com o Esquema 4. Estes compostos têm como principal diferença o tamanho da cadeia polimérica pois, enquanto que o composto L8a tem oito unidades de repetição, L8b apresenta dezasseis unidades de repetição em cada cadeia polimérica. Tal como verificado para os compostos de ciclama do tipo L4, a reação do composto L7 com o L-lactídeo em *bulk* a 120 °C na presença de DMAP originou o crescimento de duas cadeias *trans* de PLA. Porém, nesta família de compostos não se verificou qualquer degradação do polímero após o final da reação tal como observado anteriormente, uma vez que a ligação entre a ciclama e o PLA é agora uma ligação éster e não amida.

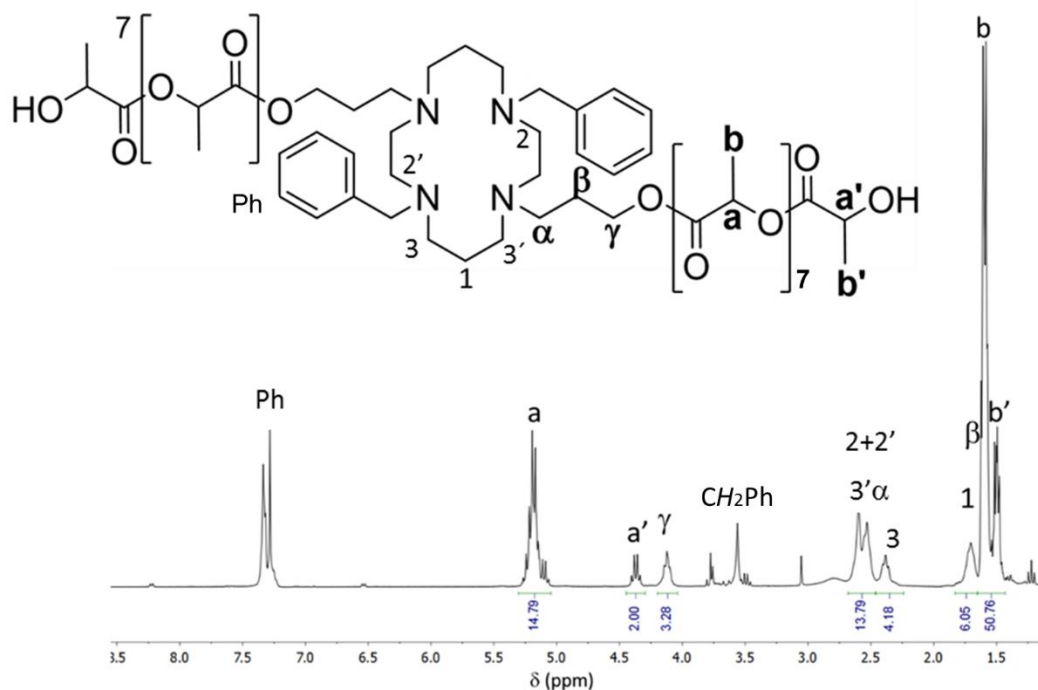


Figura 15 - Espectro de RMN de 1H em clorofórmio deuterado do composto L8a

Nos espectros de RMN de próton e carbono do composto **L8a** é possível verificar todos os sinais do macroligando, os quais indicam um composto de simetria  $C_{2v}$  tal como apresentado pelo seu precursor **L7** (ver **Figura 15**). Esta simetria indica que a ciclama apresenta, para além dos braços benzilo em posição *trans*, um par de cadeias poliméricas ligadas aos espaçadores que ocupam as outras duas posições. Caso contrário, isto é, se tivesse ocorrido a polimerização apenas num espaçador, a simetria seria menor -  $C_1$ . Além disso, a integração dos prótons *CH* terminais da cadeia polimérica indica que existem dois grupos PLA para uma ciclama. No geral, os espectros de ambas as espécies são bastante semelhantes sendo que há uma ligeira desblindagem dos prótons centrais do grupo  $CH_2(\beta)$  do espaçador devido à alteração do grupo terminal que passa de álcool a éster. Mais significativo é o desvio para campo baixo do sinal dos prótons terminais do grupo  $CH_2(\gamma)$ , cerca de 1 ppm, do espaçador que é uma forma de comprovar que a reação de polimerização se deu. A cadeia polimérica foi também identificada pelo aparecimento dos sinais dos prótons característicos do polímero, que são os *CH* terminais a 4.35 ppm e os *CH* e  $CH_3$  que se repetem ao longo da cadeia e que aparecem a cerca de 5.28 ppm e entre 1.6-1.4 ppm, respetivamente.

Também pela técnica de RMN foi possível verificar o crescimento das cadeias poliméricas, e determinar o grau de polimerização (DP - *degree of polymerization*), que é basicamente o tamanho da cadeia polimérica em unidades de repetição. Para estes compostos contendo PLA (**L8a** e **L8b**) o número de unidades de repetição é também o número de monómeros que reagiram, porque o monómero têm duas unidades de repetição, mas há uma particularidade que é o crescimento de duas cadeias em simultâneo. Desta forma, é também possível calcular o rendimento da polimerização, pois é possível verificar a quantidade de monómeros que reagiram.

O cálculo do DP (equação 2.1) é relativamente simples, sendo calculado dividindo as áreas dos sinais dos prótons  $a(PLA)$  e  $a'(PLA)$  pela área do sinal do próton terminal  $CH_t(PLA)$  da cadeia polimérica.

$$(2.1) \quad DP = \frac{[a(PLA)+a'(PLA)]}{a_t(PLA)}$$

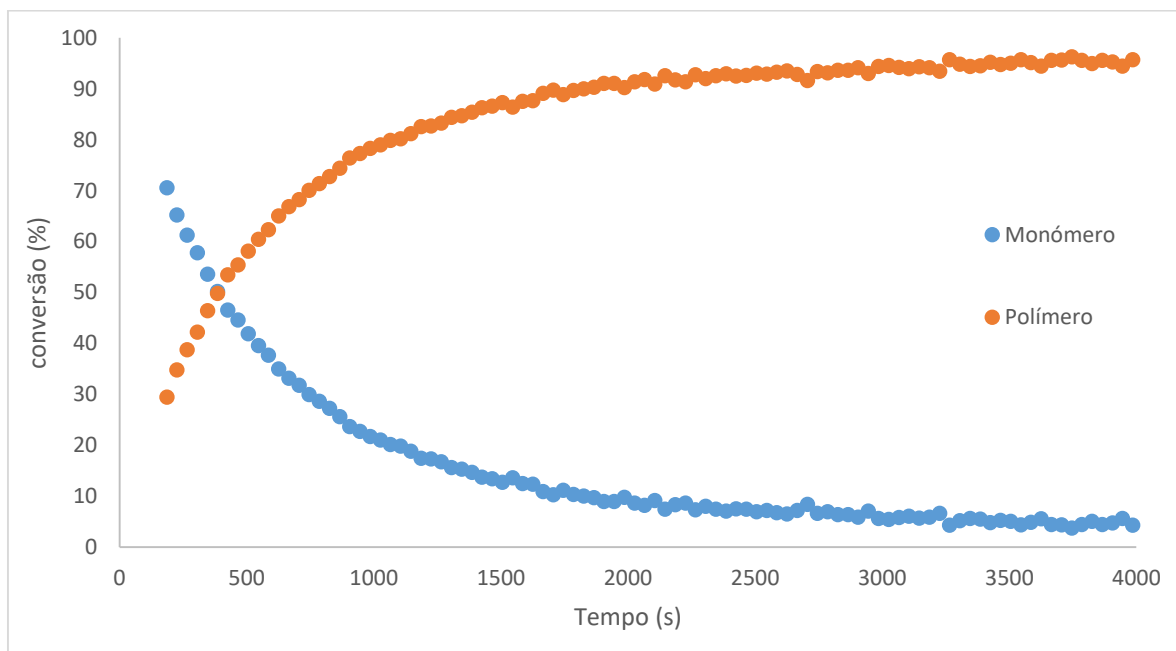
O cálculo da massa molecular (equação 2.2) também é muito simples, no caso dos compostos ciclama com PLA, é feito pela soma da massa molecular do iniciador  $M_{(iniciador)}$  com o produto do DP pela massa molecular do monómero  $M_{(monómero)}$ .

$$(2.2) \quad MM = [M_{(iniciador)} + 2(DP \times \frac{M_{(monómero)}}{2})]$$

De modo a determinar o raio hidrodinâmico do composto **L8b** recorreu-se à técnica de DOSY, a qual permitiu obter o valor do coeficiente de difusão de  $D = 1.010 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ . Dada a impossibilidade de realizar o estudo em água, esta determinação foi feita em DMSO a 37 °C de modo a mimetizar o melhor possível as condições fisiológicas. Recorrendo à equação de Stokes-Einstein foi possível obter, nestas condições, o valor de 13.6 Å para o raio hidrodinâmico de **L8b**.

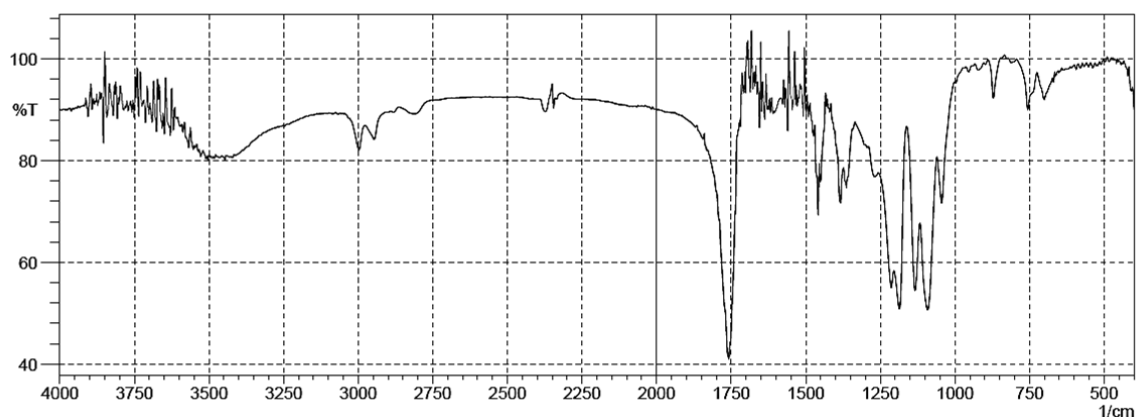
Foi feito um estudo cinético da reação de polimerização do L-lactideo com o composto **L7** por RMN de próton em bromobenzeno deuterado à temperatura de 110 °C e usando DMAP como ativador do monómero. Tal como apresentado no **Gráfico 3** é possível verificar que 50% dos monómeros do meio reacional foram consumidos em apenas 6'30''. Embora a polimerização em solução e sem agitação seja muito mais lenta do que em *bulk*, é possível verificar que a cinética de polimerização é muito rápida. Também se fez um estudo de polimerização à temperatura

ambiente seguindo a reação por RMN de próton e verificou-se que nas mesmas condições do estudo cinético, após 24 horas havia sido polimerizado metade do monômero. Este resultado é de certa forma interessante, pois a reação também se dá à temperatura ambiente e sem agitação, porém muito mais lentamente, tal como seria de esperar.



**Gráfico 3 - Estudo cinético da polimerização do L-lactídeo por RMN de  $^1\text{H}$  usando a DMAP como catalisador e o L7 como iniciador, em bromobenzeno deuterado a 110 °C.**

O espectro de FTIR do composto **L8a** apresentado na **Figura 16** mostra duas grandes diferenças quando comparado ao espectro do composto **L7**. A primeira delas é o aparecimento da banda vibracional característica do grupo carbonilo (C=O) do PLA, uma banda muito intensa que aparece por volta dos 1750  $\text{cm}^{-1}$ , e a outra grande diferença é a diminuição da fluxionalidade da ciclama devido à presença do polímero.



**Figura 16 - Espectro de FTIR do composto L8a no estado sólido suportado em KBr.**

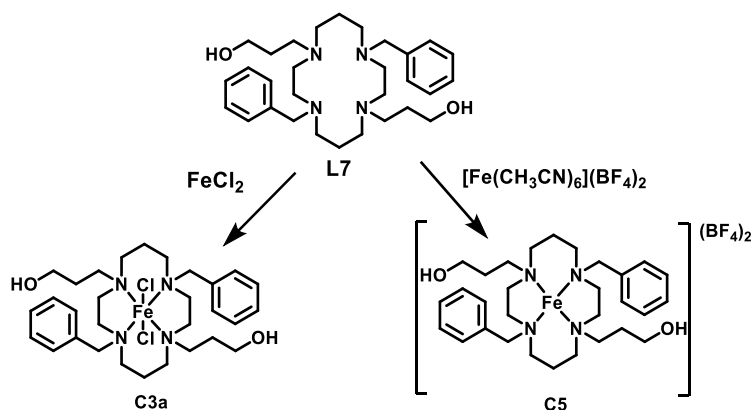
## 2.2 Síntese e caracterização de complexos de Fe(II) e Cu(II) contendo (macro)ciclamas

### 2.2.1. Complexos de Fe(II)

Após a síntese das ciclamas e dos seus derivados descritos no subcapítulo anterior foram sintetizados novos complexos de Fe(II) usando diferentes precursores.

Começou por se preparar um dos precursores de ferro(II), o  $[\text{Fe}(\text{CH}_3\text{CN})_6](\text{BF}_4)_2$  ou **C4**, como descrito na literatura<sup>49</sup>. Após a sua síntese e purificação, foi caracterizado por análise elementar e FTIR. Uma particularidade destes complexos de ferro(II) é o facto de serem paramagnéticos, o que impede a sua caracterização pelas técnicas de RMN.

As reações do composto **L7** em metanol, com  $\text{FeCl}_2$  e  $[\text{Fe}(\text{CH}_3\text{CN})_6](\text{BF}_4)_2$ , deram origem aos complexos **C3a** e **C5**, respetivamente, tal como apresentado no **Esquema 5**, com rendimentos de 81 e 73%, respetivamente. Ao passo que a reação de **L7** com  $\text{FeCl}_2$  em metanol sob refluxo deu origem a **C3a**, o mesmo não foi possível para a reação de **L8a** com  $\text{FeCl}_2$ . Nestas condições verificou-se a transesterificação do polímero levando à degradação do composto macromolecular. Em clorofórmio também não se deu a reação mas em THF foi possível obter o composto **C3b**. Ambos os compostos foram recristalizados por difusão lenta de solventes, onde o solvente da reação era o solvente da recristalização e o co-solvente para todos foi o *n*-hexano. Os compostos foram de seguida caracterizados pelas técnicas de FTIR e análise elementar, sendo impossível a caracterização através da técnica de RMN devido ao seu caráter paramagnético.

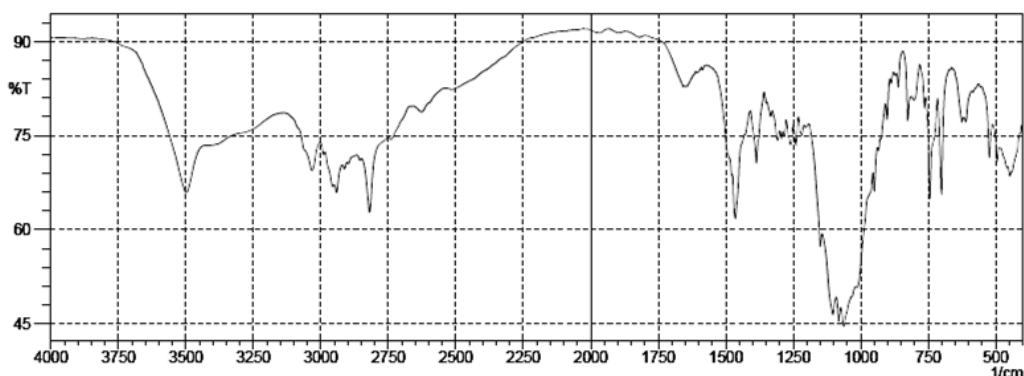


**Esquema 5** - Sínteses de complexos metálicos de ferro com o composto **L7**.

O espectro de FTIR do complexo **C3a** (**Figura 29** em anexo) é semelhante com o do **L7**, como seria expectável, apresentando as bandas vibracionais já atrás mencionados para **L7**. No entanto, o aspeto geral do espectro é mais simples, principalmente entre os  $1500\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ . Isto é indicativo da coordenação de **L7** ao centro metálico, uma vez que há uma diminuição dos graus de liberdade da molécula, e juntamente com isso, já não há tanta fluxionalidade no estado sólido, para **C3a**.

O complexo **C5** (**Figura 17**) apresenta um espectro muito semelhante ao do complexo anterior, porém a sua grande diferença é a presença das bandas vibracionais do contra-íão,  $\text{BF}_4^-$ , entre  $950\text{-}$

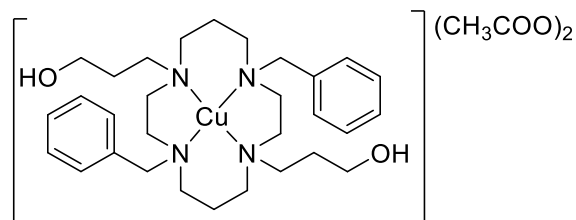
1150  $\text{cm}^{-1}$ . De resto as diferenças significantes são a diminuição das vibrações da ciclama pelo facto de ter um ião metálico coordenado, fazendo com que a ciclama perca modos de liberdade.



**Figura 17 - Espectro de FTIR do composto C5 no estado sólido suportado em KBr.**

### 2.2.2. Complexos de Cu(II)

O complexo **C6** (**Figura 18**) foi sintetizado a partir da reação do composto **L7** com o acetato de cobre(II) em acetonitrilo à sua temperatura de refluxo. No final da reação foi filtrado e recristalizado numa mistura de solventes acetonitrilo/ *n*-hexano, tendo-se obtido um pó azul com um rendimento de 67%. O composto foi caracterizado por análise elementar e FTIR.



**Figura 18 - Complexo C6.**

Na **Figura 19** é possível verificar o espectro de FTIR do complexo **C6**. A única grande diferença relativamente ao **C3a**, é a presença das bandas vibracionais intensas dos carbonilos presentes no contra-ião acetato, entre 1400-1600  $\text{cm}^{-1}$ . Os valores experimentais da análise elementar para este complexo foram muito semelhantes aos valores previstos, confirmando a formulação desta espécie. Este composto tinha uma cor azul, diferente dos outros que por vezes tinham cores ligeiramente acastanhadas. Estas duas técnicas foram as únicas utilizadas para caracterizar **C6** devido ao seu caráter paramagnético. As várias tentativas de cristalização não foram, infelizmente, bem-sucedidas.

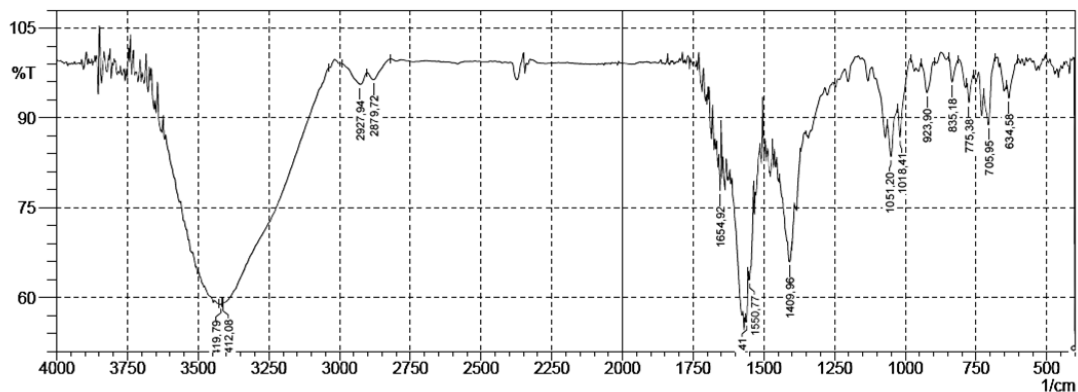


Figura 19 - Espectro de FTIR estado sólido em KBr do complexo C6.

### 2.3 Síntese e caracterização de fosfanos macromoleculares

Uma outra abordagem para a síntese de macroligandos foi através da utilização do tris(hidroximetil)fosfano,  $P(CH_2OH)_3$ , como iniciador da polimerização do L-lactídeo tendo como catalisador a DMAP resultando na síntese de **L9**. Este produto foi caracterizado após purificação, através das técnicas de RMN, análise elementar e FTIR. No espectro de RMN de próton (**Figura 20**) é possível verificar que o fosfano promoveu a polimerização pela ligeira desblindagem do grupo  $CH_2$  relativamente a fosfano sem polímero (4.55 vs. 4.75 ppm).

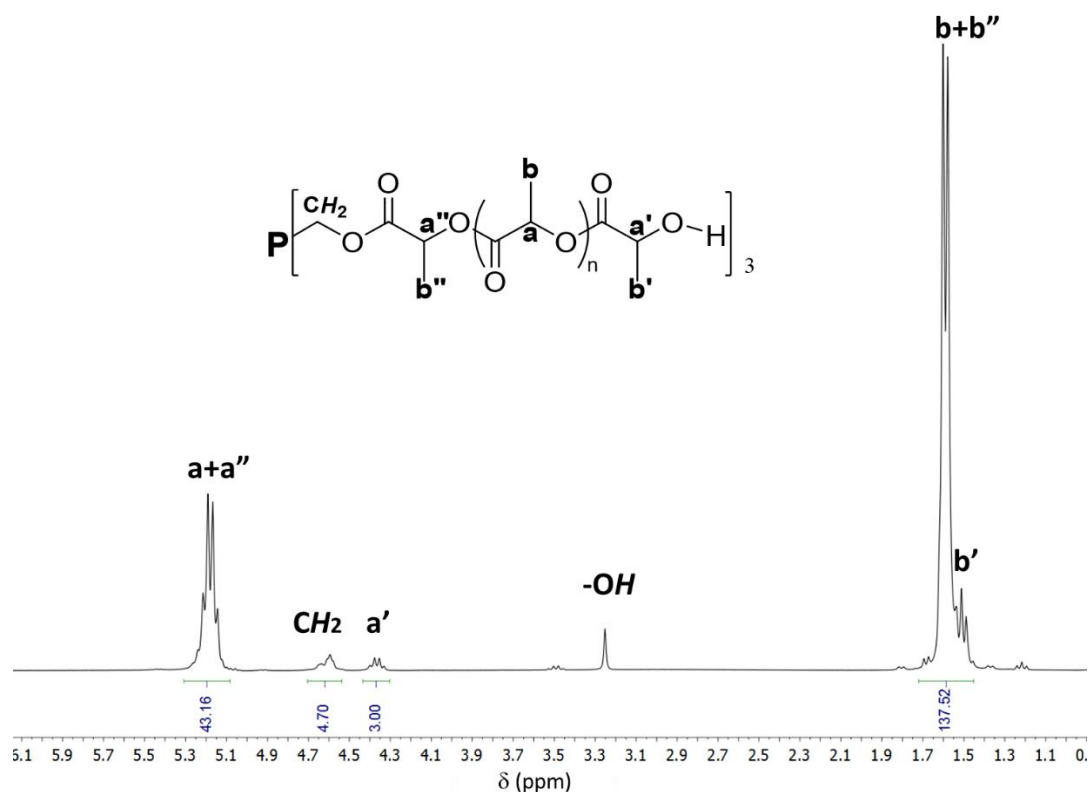
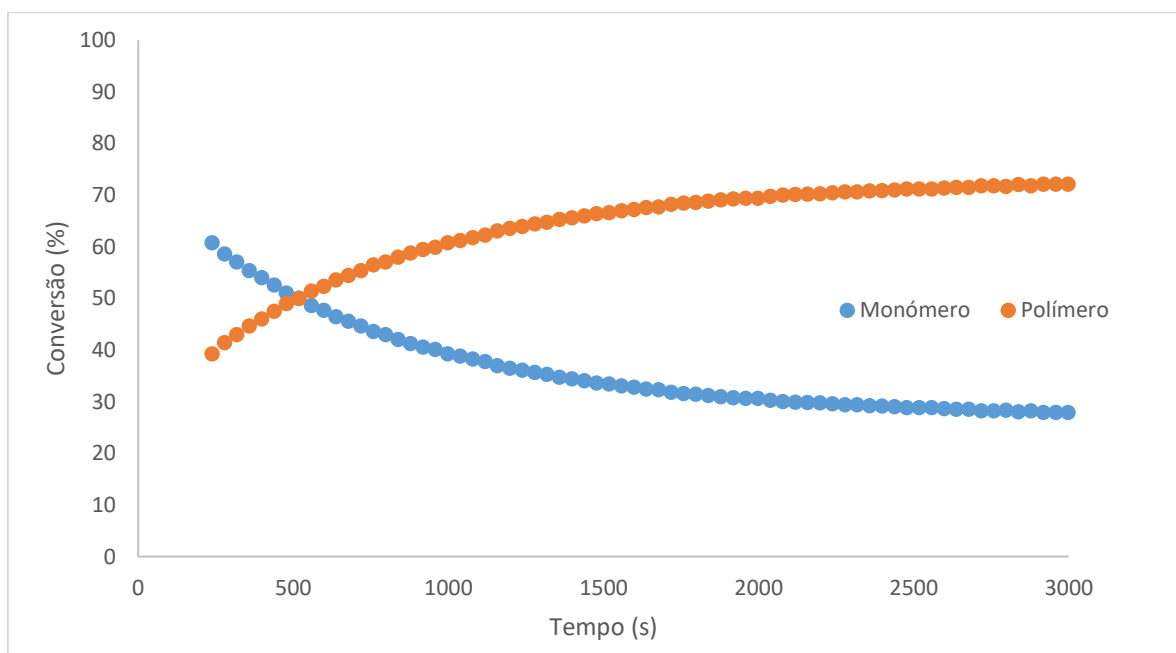


Figura 20 - Espectro de RMN  $^1H$  em clorofórmio deuterado do composto L9.

Tal como nos exemplos dos macroligandos anteriores, os prótons **a'** do PLA aparecem a 4.35 ppm. Também o cálculo do DP de cada cadeia polimérica ligada ao fosfano é igual ao descrito anteriormente, porém o cálculo da massa molecular é ligeiramente diferente, (equação 2.3) pois ao invés de duas cadeias em crescimento, neste caso há o crescimento de três cadeias em simultâneo. Desta forma, a massa molecular é dada pela seguinte fórmula:

$$(2.3) \quad MM = [M(\text{iniciador}) + 3(DP \times \frac{M(\text{monómero})}{2})]$$

Foi feito também um estudo cinético, por RMN de  $^1\text{H}$ , (**Gráfico 4**) da polimerização do L-Lactídeo utilizando o tris(hidroximetil)fosfano como iniciador da polimerização, com a razão de iniciador:catalisador:monómero de 1:1.5:30 em *bulk* a 110 °C. No caso desta polimerização têm-se três cadeias a crescer ao mesmo tempo. Devido a isto, há um agravante que é a difusão molecular e que dificulta a polimerização e para além disso a falta de agitação. Por causa do tamanho da cadeia ser ainda maior uma vez que se utilizou uma razão de monómero de 1:30, o processo de difusão no meio é ainda mais lento e dificultado, traduzindo-se numa curva menos acentuada e cujo limite tende para um rendimento final de aproximadamente 70%.



**Gráfico 4 - Estudo cinético por RMN  $^1\text{H}$  em bromobenzeno a 110 °C, da polimerização do composto L9.**

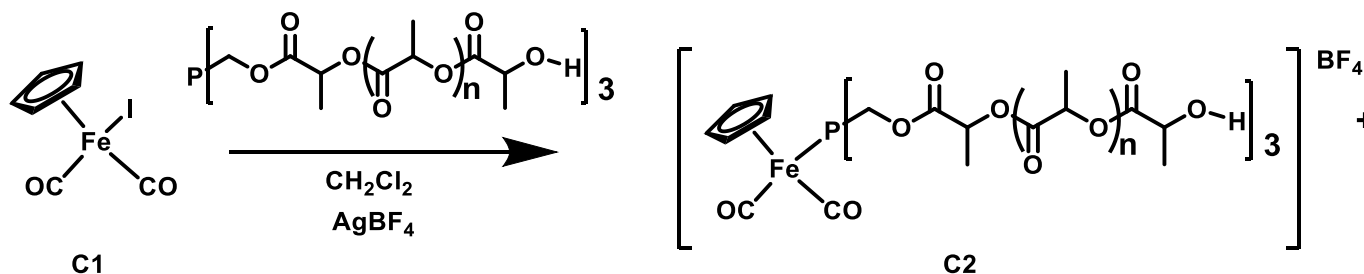
No espectro FTIR do composto **L9**, apresentado na **Figura 27** em anexo, é possível verificar a presença de muitas bandas características do composto, nomeadamente uma banda muito intensa característica do grupo carbonilo (C=O) do PLA a  $\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ .

## 2.4 Síntese e caracterização de complexos de Fe(II) contendo fosfanos macromoleculares

Após a síntese dos fosfanos macromoleculares procedeu-se à sua reação com precursores de ferro(II) de modo a obter complexos contendo este metal.

A primeira tentativa de síntese envolveu a reação do complexo **C1**,  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{CO})_2\text{I}]$ , com o composto **L9** em diclorometano sob irradiação por uma lâmpada de ultravioleta, a qual irradia comprimentos de ondas que favorece quebra da ligação Fe-CO. No entanto, esta reação não foi bem-sucedida. Em vez da esperada substituição de um ligando carbonilo pelo fosfano pensa-se que o polímero se tenha degradado.

Optou-se portanto pela abstração do ligando iodeto usando  $\text{AgBF}_4$ . Assim, fez-se a reação do composto **L9** com  $[\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{CO})_2\text{I}]$  na presença do respetivo sal de prata. Desta reação resultou um precipitado de  $\text{AgI}$ , que foi muito simples de separar da solução de diclorometano de cor avermelhada onde se encontrava o complexo formado **C2** (ver **Esquema 6**).

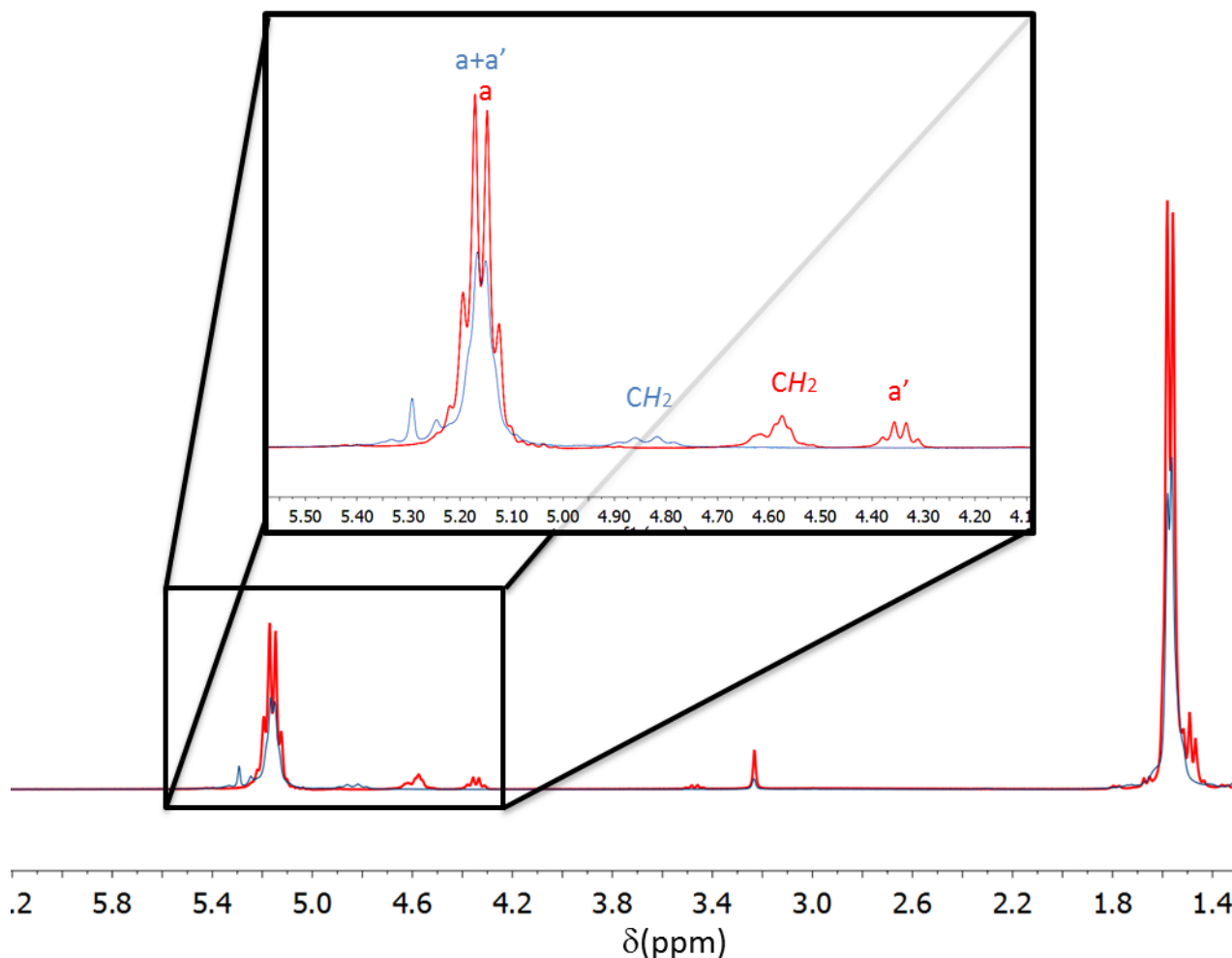


Esquema 6 - Esquema reacional de formação do complexo **C2**.

Após purificação, este complexo organometálico foi completamente caracterizado pelas técnicas de análise elementar, FTIR e RMN. Na **Figura 21**, pode-se observar o espectro de RMN de próton do ligando **L9** e do complexo **C2** em clorofórmio. Verifica-se que o sinal típico do  $\text{CH}$  terminal ( $\text{H}_a$ ) do PLA é desblindado e passa a encontrar-se ao mesmo desvio químico do  $\text{CH}$  que se repete ao longo da cadeia polimérica ( $\text{H}_b$ ). Isto prova que houve de facto coordenação do fosfano ao centro metálico. A desblindagem é devida a dois fatores. Por um lado, o fósforo é um bom doador sigma, tem a densidade eletrónica sendo deslocalizada para o centro metálico. Por outro lado, o ferro está no estado de oxidação +2 e o complexo é catiónico, fazendo assim com que vá buscar densidade eletrónica ao ligando fosfano. Verifica-se também uma desblindagem dos prótons do grupo  $\text{CH}_2$  do ligando **L9** coordenado (+0.3 ppm) No espectro de  $^{31}\text{P}$ , verifica-se uma desblindagem, passando o desvio químico de -30.0 ppm no ligando **L9** para -3.8 ppm no complexo **C2**. Surpreendentemente, o espectro de  $^{19}\text{F}$  mostra dois tipos de flúor com desvios químicos de -145.3 e -148.6 ppm. Do mesmo modo, o espectro de  $^{11}\text{B}$  revela sinais a 0.2 e -0.8 ppm. Estes dois espectros são reveladores da presença de dois tipos de grupos  $\text{BF}_4^-$  sendo possível atribuir as suas ressonâncias a uma espécie  $\text{BF}_4^-$  em contra-íão e outra que poderá estar coordenada ao metal através de um átomo de flúor ( $[\text{Fe}]\leftarrow\text{F}-\text{BF}_3$ ).<sup>50</sup> Porém, a integração dos sinais desta última espécie mostra que a sua quantidade é residual. A presença deste composto pode ser atribuída à formação de um complexo  $[\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{CO})_2(\mu\text{-F}-\text{BF}_3)]$  após a adição de  $\text{AgBF}_4$  a **C1** que posteriormente reage com o ligando **L9** para originar o composto **C2**. Como o ligando **L9** tem uma distribuição de pesos moleculares, o cálculo da massa molecular média pode originar

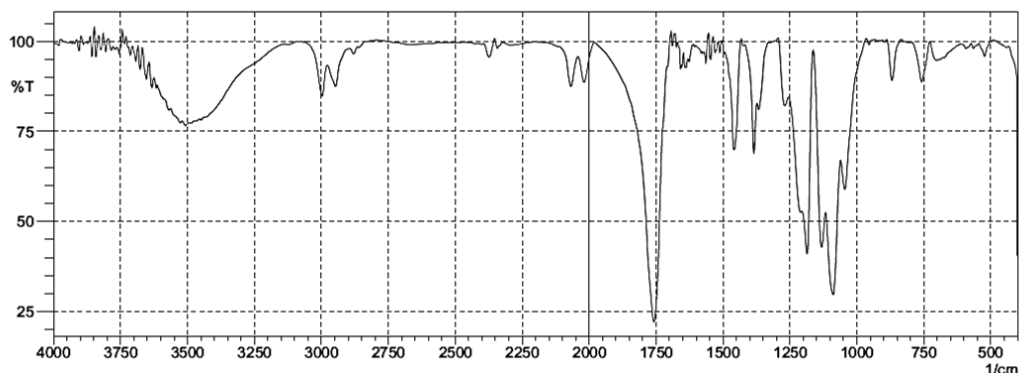


pequenos desvios na estequiometria da reação, o que provavelmente colocou este reagente em déficit face ao  $[\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{CO})_2\text{I}]$ .



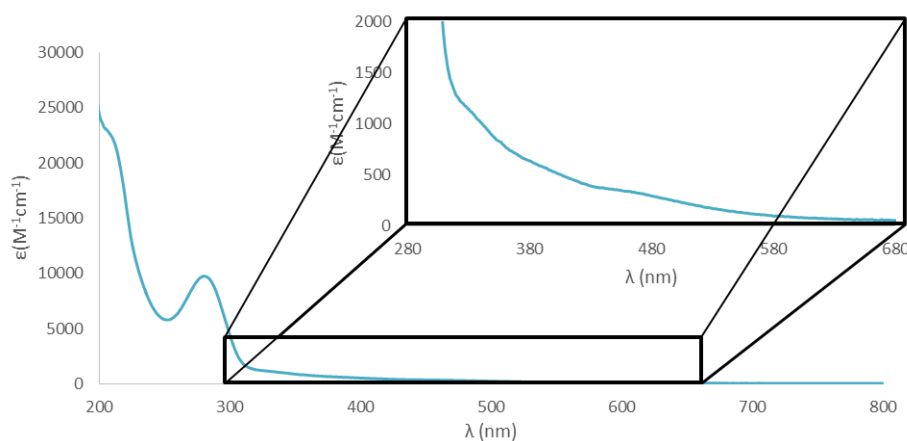
**Figura 21 - Espectros de RMN de próton do composto L9 e do complexo C2, em clorofórmio deuterado; (L9 vermelho); (C2 azul).**

Através da técnica de FTIR (**Figura 22**) foi possível verificar a presença das bandas vibracionais dos dois ligandos carbonilo coordenados ao ferro que aparecem no complexo **C2** a 2067 e 2017  $\text{cm}^{-1}$ , e no precursor (**C1**) a 2032 e 1973  $\text{cm}^{-1}$  (**Figura 28**), comprovando que deixa de haver tanta retrodoação  $\pi$  para estes ligandos. Como verificado nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$  os grupos  $\text{CH}_2$  do fosfano e o próprio sinal do fósforo, sofreram uma desblindagem relativamente aos sinais do fosfano livre, o que é indicativo que houve coordenação. Adicionalmente verificou-se o aparecimento das vibrações dos carbonilos presentes no PLA entre 1700-1900  $\text{cm}^{-1}$  no espectro de FTIR (**Figura 22**). Também é possível verificar uma variação negativa das bandas de vibração dos  $\text{CH}_{(\text{aromáticos})}$  do Cp que se apresentavam a 3115  $\text{cm}^{-1}$  em **C1** (**Figura 28**) e que após a coordenação do fosfano aparecem a 3000  $\text{cm}^{-1}$  (**Figura 22**), indicando que o centro metálico desloca a densidade eletrônica não só do ligando fosfano mas também do Cp, consequência do complexo passar a ser catiónico.



**Figura 22 - Espectro de FTIR estado sólido em KBr do complexo C2.**

Tentou-se também caracterizar este composto por espectroscopia de UV-Visível, porém verificou-se que, quando em solução e exposto à radiação emitida pelo próprio aparelho ao longo do tempo de caracterização, se degrada. Mesmo com a degradação em diferentes solventes, foi possível caracterizar o complexo C2 em acetonitrilo, como está representado no espectro da **Figura 23**. Na **Tabela 2** apresentam-se os valores do coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) máximo das várias bandas obtidos a partir de uma solução de **C2** com concentração  $7.3 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ . Neste espectro é possível verificar bandas intensas na região entre 205 e 330 nm. As bandas a 205 e 280 nm poderão ser atribuídas às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos ligandos coordenados, enquanto que a banda a 330 nm é provavelmente do fragmento metálico  $\{\text{Fe}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\}^+$ , uma vez que também está presente no UV-Vis do composto parental  $[\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{CO})_2\text{I}]$  (dados do Grupo). As bandas entre 389 e 447 nm poderão ter várias origens. Por um lado a banda a 447 nm, que apresenta valores de absorvidade molar bastante baixos, poderá eventualmente ser uma transição essencialmente  $d \rightarrow d$  a nível do centro metálico. A banda a cerca de 389 nm poderá estar relacionada transferências de carga dos ligandos para o metal (LMCT) ou do metal para os ligandos (MLCT) uma vez que, por um lado, os ligandos Cp e fosfano revelam uma forte doação  $\pi$  ao metal tal como verificado nos espectros de RMN e FTIR e, por outro lado, pelo FTIR verificase que há retrodoação  $\pi$  do metal para os carbonilos  $^{31}\text{P}$ . Na impossibilidade de realizar espectros do complexo noutros solventes não foi possível atribuir com clareza a origem destas bandas de transferência de carga.



**Figura 23 – Espectro de UV-Vis do complexo C2 em acetonitrilo à temperatura ambiente.**

Na impossibilidade de realizar espectros do complexo em outros solventes não foi possível atribuir com clareza a origem destas bandas de transferência de carga e conseqüentemente a distinção inequívoca entre um processo LMCT e MLCT.

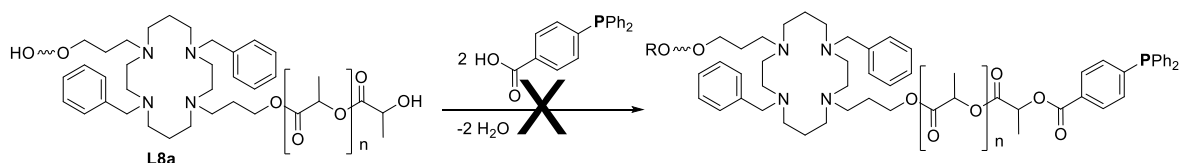
**Tabela 2 - Dados espectroscópicos de UV-Vis do complexo C2 em acetonitrilo à temperatura ambiente.**

$\lambda_{\max}$ (nm)	( $\epsilon$ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
205	23000 (sh)
280	9750
330	1000 (sh)
389	655 (sh)
447	383 (sh)

*sh* - ombro

### 2.5 Síntese e caracterização de macrociclamas contendo fosfanos terminais

A última abordagem para a síntese de macroligandos pretendia incluir numa única molécula uma macrociclama à base de polilactídeo, contendo fosfanos na extremidade das cadeias poliméricas. Desta forma poder-se-ia utilizar quer os grupos terminais, quer o macrociclo para a introdução do centro metálico, sintetizando-se complexos com dois ou três centros metálicos. Foram feitas várias tentativas de funcionalizações da ponta terminal do polímero, através de reações de esterificação entre o grupo terminal do PLA (álcoois secundários) e fosfanos contendo grupos carbox como exemplificado na **Figura 24**.



**Figura 24 - Esquema reacional para obtenção de compostos macromoleculares com fosfanos terminais.**

As condições experimentais usadas nas várias tentativas para a realização desta funcionalização com os fosfanos encontram-se resumidas na

### Tabela 3.

**Tabela 3** - Tabela simplificada com as diferentes tentativas de reações de esterificação.

R-COOH	R'-OH	TEA	Solvente	Temp. (°C)	Peneiros Moleculares	Soxhlet	Resultado
1,0	1,0	1,5	THF	66	X	X	X
1,0	1,0	1,5	THF	66	√	X	X
1,1	1,0	1,5	THF	66	√	√	X
1,0	1,0	1,5	tolueno	110	X	X	X
1,0	1,0	1,5	tolueno	110	√	√	X

Como já é sabido, em reações de esterificações entre um álcool e um ácido há sempre libertação de moléculas de água, porém a presença de água a temperaturas elevadas faz com que o polímero se degrade, podendo levar, por um lado a reações de transesterificação e, por outro lado, à reversão da reação. Mediante a isso foram utilizadas várias técnicas para a remoção de água do meio reacional, como a utilização de um *Dean-Stark* para a recolha do solvente juntamente com a água, a utilização de peneiros moleculares 4Å no meio reacional dentro do *Schlenk* ou dentro do extrator de *soxhlet*. Mesmo com a utilização destes diferentes meios para retirar a água do meio reacional, não se verificou a formação do éster após a reação, de forma que esta estratégia foi deixada de lado e os estudos e novas sínteses foram feitos.

Como as tentativas anteriormente descritas não deram resultados, também se tentou a reação partindo de um fosfano coordenado a um centro metálico, contendo um grupo ácido que poderia esterificar com o álcool terminal da cadeia polimérica, uma vez que essa abordagem já tinha sido bem-sucedida no âmbito de outra tese de Mestrado<sup>33</sup>. No entanto, no caso concreto desta reação houve degradação do complexo e portanto a síntese não foi bem-sucedida.

## **CAPÍTULO 3: ESTUDOS BIOLÓGICOS**

## CAPÍTULO 3: ESTUDOS BIOLÓGICOS

### 3.1. Estudos de viabilidade celular em linhas celulares tumorais humanas

A atividade citotóxica dos complexos **C2**, **C3a**, **C3b**, **C5** e **C6** e dos ligandos **L7**, **L8b** e **L9** foi testada através da determinação dos valores de  $IC_{50}$  na linha celular tumoral humana **MDA-MB-231** (adenocarcinoma da mama) que é uma linha tumoral muito agressiva e metastática. O efeito dos complexos na viabilidade celular destas células foi avaliado após 48 horas de exposição como apresentado na **Tabela 4** e **Gráfico 5**.

Relativamente aos complexos metálicos, verificou-se que os compostos **C3a**, **C5** e **C6** foram aqueles que apresentaram melhores valores de citotoxicidade. Comparando os dois compostos de ferro, **C3a** e **C5**, pode constatar-se que a alteração de contra-íão não interfere na citotoxicidade dos compostos. Para além disso, ambos apresentam valores de citotoxicidade semelhantes aos da cisplatina. O composto de cobre **C6**, foi que apresentou melhores resultados em termos de viabilidade celular, sendo quase duas vezes mais citotóxico que a cisplatina e que os seus homólogos de ferro, tendo um  $IC_{50}$  de  $\sim 20 \mu M$ . Este é, de facto, um resultado muito interessante, pois a alteração do íão metálico juntamente com o contra-íão tornou este composto quase duas vezes mais citotóxico.

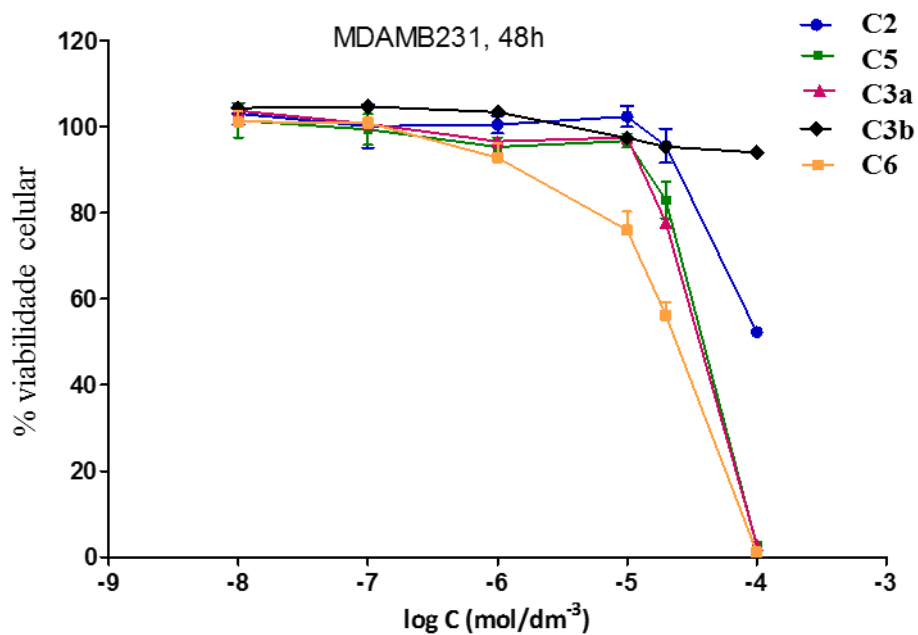
Relativamente aos complexos de metal-polímero, estes foram aqueles que apresentaram piores valores de  $IC_{50}$ . O complexo **C3b** não apresentou citotoxicidade nas condições utilizadas e o **C2** que apresentou um alto valor de  $IC_{50}$ . Este resultado é um pouco surpreendente tendo em consideração os resultados obtidos no passado no Grupo de Química Organometálica<sup>33</sup>, onde se tem observado que a introdução de ligandos poliméricos mantém a citotoxicidade dos compostos. No entanto, pensa-se que o motivo da inexistência de citotoxicidade nas condições testadas possa estar relacionado com o diferente, e mais lento, mecanismo de captação celular que é esperado que aconteça no caso de macromoléculas, a endocitose, *versus* difusão passiva no caso dos compostos de baixo peso molecular. Desta forma, de futuro prevêem-se fazer estudos com tempos de incubação maiores.

**Tabela 4 - Resultados de viabilidade celular expressos em valor de  $IC_{50}$ .**

<b>MDA-MB-231, 48h: <math>IC_{50}</math> (<math>\mu M</math>)</b>	
<b>C2</b>	140 $\pm$ 41.5
<b>C5</b>	40.2 $\pm$ 21.3
<b>C3a</b>	40.0 $\pm$ 19.0
<b>C3b</b>	Não citotóxico
<b>C6</b>	21.8 $\pm$ 6.0
<b>L7</b>	37.1 $\pm$ 10.4
<b>L8b</b>	Não citotóxico
<b>L9</b>	Não citotóxico
<b>Cisplatina</b>	40.0

Também foram efetuados estudos de viabilidade dos ligandos. Verificou-se que nenhum deles apresentou qualquer citotoxicidade nas condições testadas, com exceção do ligando **L7** onde para

a mesma linha celular, apresentou um valor de  $IC_{50}$  inferior a da cisplatina, um resultado muito bom quando comparados aos complexos da literatura.<sup>18</sup>



**Gráfico 5 – Percentagem da viabilidade celular em função do logaritmo da concentração para a linha tumoral do adenocarcinoma da mama.**

## **CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS**



## CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Solventes e reagentes

Os solventes utilizados nas diversas sínteses foram previamente secos e/ou destilados em atmosfera inerte de azoto, de acordo com os métodos publicados na literatura<sup>51</sup> e, que se encontram na **Tabela 5**.

**Tabela 5- Procedimento de secagem dos solventes.**<sup>51</sup>

Solvente	Ponto de ebulição	Pré-secagem	Refluxo-Destilação
Acetonitrilo	81,6°C	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Diclorometano	40°C	Peneiros moleculares	CaH <sub>2</sub>
Metanol	64.7°C	CaSO <sub>4</sub>	-
<i>n</i> -Hexano	68.7°C	Peneiros moleculares	Fio de sódio
Tolueno	110.6°C	CaH <sub>2</sub>	Fio de sódio/ benzofenona
Tetrahidrofurano	66°C	Peneiros moleculares	Fio de sódio/ benzofenona

Os solventes deuterados acetona-d<sub>6</sub> (99.8%), acetonitrilo-d<sub>3</sub> (99.8%) e clorofórmio-d<sub>1</sub> (99.9%), foram secos com peneiros moleculares 4 Å e desgaseificados através de ciclos de vácuo/nitrogénio alternando em ciclos de congelamento/descongelamento. Os desvios químicos são dados em partes por milhão (ppm) usando como padrão interno o TMS (0.00 ppm) a 0.03%.

Todos os reagentes foram usados tal como recebidos pelo fornecedor, com pureza analítica, sem necessidade de purificação prévia, com exceção do L-lactídeo que foi recristalizado três vezes em tolueno seco e deixado a secar durante a noite sob vácuo, tendo sido conservado no frio sobre atmosfera de nitrogénio. A DMAP foi deixada a secar durante uma noite sob vácuo e conservada no frio sobre atmosfera de nitrogénio. Após a síntese dos compostos, todos eles foram guardados em *Schlenks* adequados sob atmosfera de nitrogénio.

### 4.2. Técnicas Usadas

#### Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e <sup>31</sup>P foram efetuados num espectrómetro Bruker Avance II de 300MHz ou 400 MHz, a 25°C, exceto os estudos cinéticos que decorreram à temperatura de 110°C. Quando necessário recorreram-se a técnicas de RMN bidimensionais como HSQC, HMBC e COSY para a correta atribuição de prótons e carbonos.

### **Espetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros de infravermelho dos compostos sintetizados foram obtidos num espectrofotómetro Shimadzu IRAffinity-1 FTIR suportados em pastilhas de KBr (feitas ao ar) não tendo sido realizada qualquer calibração adicional.

### **Análise Elementar C, H, N**

As determinações das percentagens dos elementos C, H e N nos compostos foram realizadas no equipamento Fisons Instruments, modelo EA1108, por serviços adquiridos ao Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico.

### **Espetroscopia de Ultravioleta e Visível (UV-Vis)**

Os espectros eletrónicos dos compostos foram realizados ao ar e à temperatura ambiente, em células de quartzo de 1 cm de largura, usando como solvente acetona, acetonitrilo, clorofórmio, DMSO, THF e água, sem desarejamento prévio da solução, num espectrofotómetro Jasco V-660 de feixe duplo.

### **Difração de raios-X de cristal único**

Os cristais foram cobertos e selecionados em óleo Fomblin, montados numa ansa e os dados cristalográficos foram recolhidos usando uma radiação monocromática de Mo-K $\alpha$  ( $\lambda = 0.71073$  Å) num difratómetro Bruker AXS-KAPPA APEX II equipado com um sistema de arrefecimento de nitrogénio Oxford Cryosystem. Os parâmetros da célula unitária foram adquiridos usando o programa Bruker SMART e refinados utilizando o Bruker SAINT em todas as reflexões observadas. As correções de absorção foram aplicadas utilizando SADABS. As estruturas foram resolvidas por métodos diretos usando SIR97, e o refinamento foi feito usando SHELXL-97. Estes programas fazem parte do programa WinGX versão 1.80.05. Os átomos de hidrogénio dos grupos NH e OH foram localizados no mapa de densidade eletrónica. Todos os outros átomos de hidrogénio foram inseridos em posições fixas e refinados sobre o átomo de carbono correspondente. As ilustrações das estruturas moleculares foram feitas no programa Mercury 3.0 para *Windows*.

### **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 MDA-MB-231 procedendo do seguinte modo para cada composto em ensaio:

As culturas das linhas celulares de carcinoma humano da mama (**MDA-MB-231**; ATCC) foram efetuadas em meio DMEM (Gibco) contendo GlutaMax I (**MDA-MB-231**) e foram completados com 10% de FBS e 1% de penicilina-estreptomicina e mantidas a 37 °C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

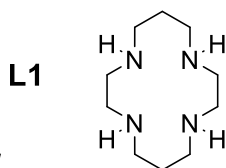
A cultura de células foi feita em frascos contendo o meio próprio à proliferação celular e que permite a adesão das células.

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  $\mu$ l de meio

celular completo em placas de 96 poços. A densidade celular foi de  $2 \times 10^4$  células (MDA-MB-231) viáveis por poço. As células ficaram a aderir durante 24 h, seguindo-se a adição das várias diluições em meio (200  $\mu$ l) do composto em ensaio. O composto em ensaio foi primeiramente solubilizado em DMSO (compostos **C2**, **C3a**, **C3b**, **C5**, **C6**, **L7**, **L8b** e **L9**) e depois no meio celular e adicionado às células em concentrações 1-100  $\mu$ M. As concentrações finais de DMSO no meio foram inferiores a 0.5 %. Após AS 48 h de incubação, 37 °C/5% CO<sub>2</sub>, o meio foi substituído por 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l). A viabilidade celular foi avaliada medindo a absorvância a 570 nm, usando o espectrofotômetro de placas. A citotoxicidade do composto em ensaio foi quantificada calculando a concentração de droga que inibe o crescimento de 50 % das células (IC<sub>50</sub>) (GraphPad Prism software).

### 4.3. Parte Experimental

#### 4.3.1 Sínteses e caracterização de compostos orgânicos

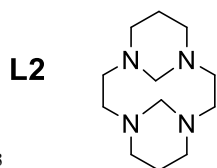


#### Síntese do composto L1<sup>47</sup>

Num balão de 1L dissolveu-se 54.6 g (0.15 mol) de Ni(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O em 400 mL de água destilada. Após dissolução, adicionou-se 27.4 mL de 1,5,8,12-tetrazadodecano. A solução adquiriu uma cor vermelho-acastanhada e deixou-se em agitação durante 15 minutos. Colocou-se o balão num banho de gelo a 5°C, tendo sido posteriormente adicionado 22 mL (0.2 mol) de uma solução aquosa de glicoxal a 40%. Depois de terminada a adição, removeu-se o banho de gelo e deixou-se reagir durante 16 horas. Colocou-se a mistura reacional a 5°C, num banho de gelo, e adicionou-se lentamente 11 g de NaBH<sub>4</sub>. Removeu-se o banho de gelo e refluxou-se a solução a 90°C, por forma a dissolver todo o produto e filtrou-se a quente. A um balão de 1L contendo 29.1 g de NaCN, adicionou-se o filtrado e deixou-se refluxar durante 2 horas. Deixou-se a solução em agitação até atingir a temperatura ambiente e adicionou-se 15 g de NaOH. Evaporou-se o solvente e removeu-se o sólido para um filtro. Adicionou-se 100 mL de CHCl<sub>3</sub>, mexeu-se vigorosamente para promover a extração e filtrou-se. Separou-se a fase aquosa e extraiu-se com 300 mL de CHCl<sub>3</sub>. Juntaram-se todos os extratos de clorofórmio e adicionou-se Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Filtrou-se a solução e evaporou-se o solvente à secura. Dissolveu-se o sólido num volume mínimo de clorobenzeno e refluxou-se durante 20 minutos. Arrefeceu-se a solução para obrigar a precipitar o produto. Filtrou-se e lavou-se o sólido resultante com Et<sub>2</sub>O. O rendimento global da reação foi de 70%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K):  $\delta$  (ppm) 1.69 (m, 4H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 2.48 (b, 4H, NH), 2.64 (s, 8H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 2.71 (t, 8H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>).

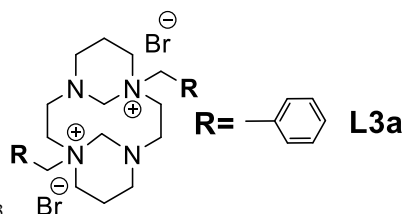
**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3267 e 3184 ( $\nu_{N-H}$ ).



### Síntese do composto L2<sup>52,53</sup>

Dissolveu-se 1.67 g (8.33 mmol) de ciclama, **L1**, em 90 mL de água destilada. Colocou-se a mistura num banho de gelo a 0°C e adicionou-se rapidamente 1.25 mL (2 equiv.) de uma solução aquosa de formaldeído a 37%. Após 2 minutos formou-se um precipitado branco e deixou-se a reagir durante 2 horas. Após filtração, o sólido foi lavado com água destilada. Secou-se em vácuo e obteve-se o composto com um rendimento de 90%.

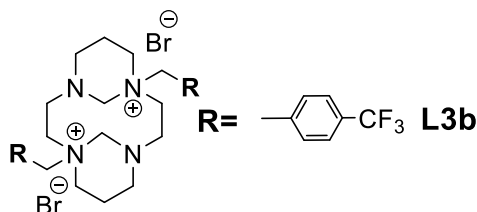
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 1.14 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 2.20 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 2.34 (s, 4H, α-CH<sub>2</sub>), 2.59 (td, 4H, α-CH<sub>2</sub>), 2.70 (m, 4H, α-CH<sub>2</sub>), 3.11 (m, 4H, α-CH<sub>2</sub>), 2.86 (d, 2H, N-CH<sub>2</sub>-N), 5.40 (d, 2H, N-CH<sub>2</sub>-N).



### Síntese do composto L3a<sup>52,53</sup>

A 1.5 g (6.7 mmol) de **L2**, adicionaram-se 45 mL de CH<sub>3</sub>CN e deixou-se a solução sob agitação. Adicionou-se rapidamente 1.6 mL (2 equiv.) de brometo de benzilo. Após uns minutos formou-se um precipitado branco. Deixou-se a solução sob agitação durante 24 horas. Filtrou-se e lavou-se o sólido com CH<sub>3</sub>CN. Secou-se e obteve-se o composto sob a forma de um sólido branco com um rendimento de 88 %.

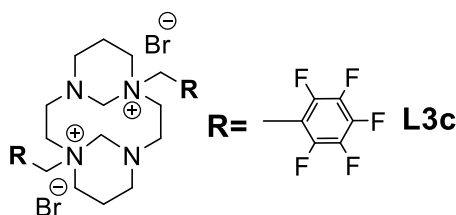
**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 1.85 (d, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 2.41 (m, 2H, α-CH<sub>2</sub>), 2.56 (d, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 2.91-3.41 (14H, α-CH<sub>2</sub>), 4.42 (t, 2H, N-CH<sub>2</sub>-N), 5.51 (t, 2H, N-CH<sub>2</sub>-N), 7.53 (b, 10H, *Ph*), sendo que os prótons benzílicos não são observados devido a estarem sobrepostos com o sinal do solvente.



### Síntese do composto L3b<sup>53,54</sup>

A 2.57g (11.5 mmol) de **L2**, adicionaram-se 80 mL de CH<sub>3</sub>CN e deixou-se a solução sob agitação. Adicionou-se rapidamente 5.77 g (24.1mmol, 2 equiv.) brometo de 4-(trifluorometil)benzilo. Após uns minutos formou-se um precipitado branco. Deixou-se a solução sob agitação durante 24 horas. Filtrou-se e lavou-se o sólido com CH<sub>3</sub>CN. Secou-se e obteve-se o composto sob a forma de um sólido branco com um rendimento de 35 %.

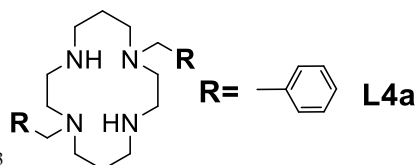
**Análise calculada** para  $C_{28}H_{36}Br_2F_6N_4$ : C, 47.88; H, 5.17; N, 7.98. **Experimental:** C, 47.60; H, 5.18; N, 7.99.



#### Síntese do composto L3c<sup>54</sup>

A 2.15 g (9.58 mmol) de **L2**, adicionaram-se 80 mL de  $CH_3CN$  e deixou-se a solução sob agitação. Adicionou-se rapidamente 5 g (19.2 mmol, 2 equiv.) de brometo de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzilo. Após uns minutos formou-se um precipitado branco. Deixou-se a solução sob agitação durante 24 horas. Filtrou-se e lavou-se o sólido com  $CH_3CN$ . Secou-se e obteve-se o composto sob a forma de um sólido branco com um rendimento de 14%.

**Análise calculada** para  $C_{26}H_{28}Br_2F_{10}N_4 \cdot (H_2O)_2$ : C, 41.84; H, 3.78; N, 7.51. **Experimental:** C, 39.78; H, 3.68; N, 7.62.

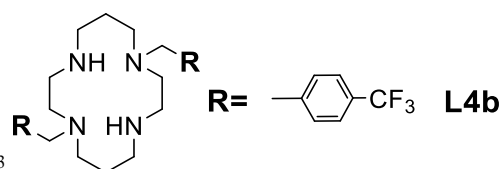


#### Síntese do composto L4a<sup>52,53</sup>

Dissolveu-se 1.0 g (1.8 mmol) de **L3a** no volume mínimo de água destilada. Preparou-se uma solução aquosa de NaOH de modo a que depois de realizada a adição à solução de **L3a** ficasse com uma concentração 3 M num volume final de 600 mL. Deixou-se sob agitação durante 3 horas. Extraíu-se com  $CHCl_3$  e adicionou-se, ao extrato,  $MgSO_4$  anidro. Filtrou-se a solução e evaporou-se o solvente à secura. O óleo obtido depois de tratado em azoto líquido originou o produto sob a forma de um sólido branco. O rendimento desta reação foi quantitativo.

**RMN  $^1H$**  ( $CDCl_3$ , 300.1 MHz, 296 K):  $\delta$  (ppm) 1.87 (m, 4H,  $\beta-CH_2$ ), 2.52-2.80 (16H,  $\alpha-CH_2$ ), 3.63 (s, 4H,  $PhCH_2$ ), 5.36 (b, 2H,  $NH$ ), 7.26 (b, 10H,  $Ph$ ) **RMN  $^{13}C\{^1H\}$**  ( $CDCl_3$ , 300.1 MHz, 296 K):  $\delta$  (ppm) 24.6 ( $\beta-CH_2$ ), 47.7, 48.3, 50.6 e 51.2 ( $\alpha-CH_2$ ), 59.2 ( $PhCH_2$ ), 127.4, 128.3, 129.5 e 137.5 ( $C$  aromáticos)

**FTIR** (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3240 ( $\nu_{N-H}$ ), 2900-3100 ( $\nu_{C-H}$ , aromático).



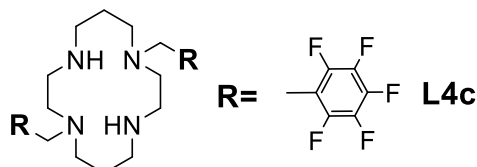
#### Síntese do composto L4b<sup>52,53</sup>

Dissolveu-se 7.30 g (10.39 mmol) de **L3a** no volume mínimo de água destilada. Preparou-se uma solução aquosa de NaOH de modo a que depois de realizada a adição à solução de **L3a** ficasse com uma concentração 3 M num volume final de 600 mL. Deixou-se sob agitação durante 3 horas. Extraíu-se com  $CHCl_3$  e adicionou-se, ao extrato,  $MgSO_4$  anidro. Filtrou-se a solução e evaporou-se o solvente à secura. O óleo obtido depois de tratado em azoto líquido originou o produto sob a forma de um sólido branco. O rendimento desta reação foi de 41%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 7.50 (d, 4H, *m-Ph*) 7.39(d, 4H, *o-Ph*), 3.71 (s, 4H, PhCH<sub>2</sub>N), 2.80 (bossa, 2H, NH), 2.73-2.68 (sobreposição, 8H total, 4H, [C3]CH<sub>2</sub>N, 4H, [C2]CH<sub>2</sub>N), 2.57 (m, 4H, [C2]CH<sub>2</sub>N), 2.51 (M, 4H, , [C3]CH<sub>2</sub>N), 1.82 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

**Análise calculada** para C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>F<sub>6</sub>: C, 60.45; H, 6.63; N, 10.85. **Experimental:** C, 59.69; H, 6.62; N, 10.67.

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3316 (ν<sub>O-H</sub>), 1321 (ν<sub>C-F</sub>).



### Síntese do composto L4c<sup>52,53</sup>

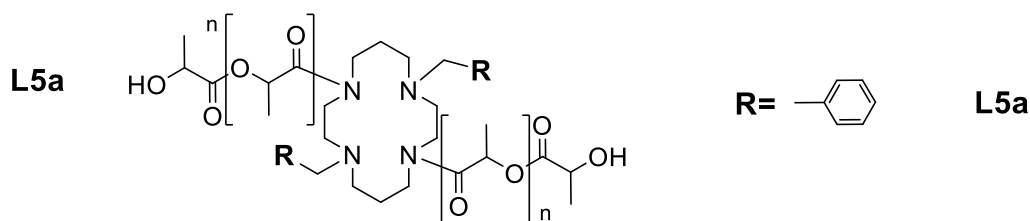
Dissolveu-se 1.40 g (1.86 mmol) de **L3a** no volume mínimo de água destilada. Preparou-se uma solução aquosa de NaOH de modo a que depois de realizada a adição à solução de **L3a** ficasse com uma concentração 3 M num volume final de 600 mL. Deixou-se sob agitação durante 3 horas. Extraiu-se com CHCl<sub>3</sub> e adicionou-se, ao extrato, MgSO<sub>4</sub> anidro. Filtrou-se a solução e evaporou-se o solvente à secura. O óleo obtido depois de tratado em azoto líquido originou o produto sob a forma de um sólido branco. Com um rendimento de 82%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 3.82 (s, 4H, PhCH<sub>2</sub>N), 2.71 (m, 4H, [C3]CH<sub>2</sub>N), 2.66 (m, 4H, [C2]CH<sub>2</sub>N), 2.57 e 2.44 (sobreposição, 10H total, 4H, [C3]CH<sub>2</sub>N, 4H, [C2]CH<sub>2</sub>N e 2H, NH), 1.83 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz, 296 K): δ (ppm) 144.2 (m, PhCH<sub>2</sub>N), 141.6 (m, PhCH<sub>2</sub>N), 139.1 (m, PhCH<sub>2</sub>N), 110.0 (t, *i-Ph*CH<sub>2</sub>N), 53.8 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2] CH<sub>2</sub>N), 52.0 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 50.1 ([C3]CH<sub>2</sub>N), 47.7 ([C2] CH<sub>2</sub>N), 44.6 (PhCH<sub>2</sub>N), 26.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

**Análise calculada** para C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>F<sub>10</sub>: C, 51.43; H, 4.68; N, 10.00. **Experimental:** C, 51.39; H, 4.88; N, 9.90.

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3316 (ν<sub>N-H</sub>).

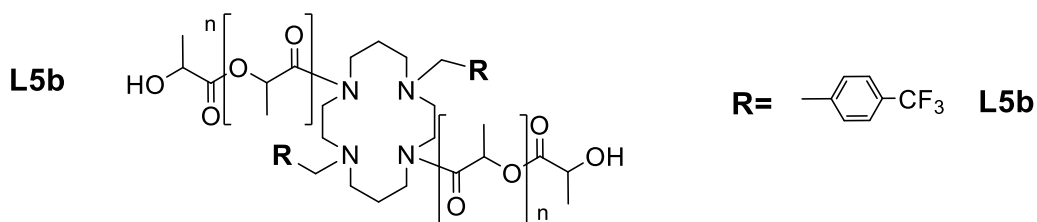
### Síntese do composto L5a



Pesou-se 264 mg (7x10<sup>-4</sup> mol) de **L4a**, 85.6 mg (7x10<sup>-4</sup> mol) de DMAP e 1 g (7x10<sup>-3</sup> mol) de L-lactídeo para um *Schlenk*. Aqueceu-se a mistura reacional a 120 °C em agitação, por 30 minutos. Ao fim desse tempo parou-se a reação com adição de 40 mL de uma mistura de água e metanol (1:1) (v:v). O composto foi transferido para um balão, sob agitação, contendo a mesma mistura com o auxílio de diclorometano para o solubilizar. A seguir foi evaporado o solvente na totalidade, e o composto foi lavado sucessivas vezes com éter dietílico frio para remoção de impurezas e/ou reagentes.

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300-3600 (ν<sub>O-H</sub>, PLA); 2900-3100 (ν<sub>C-H</sub>, aromático); 1700-1900 (ν<sub>C=O</sub>, PLA).

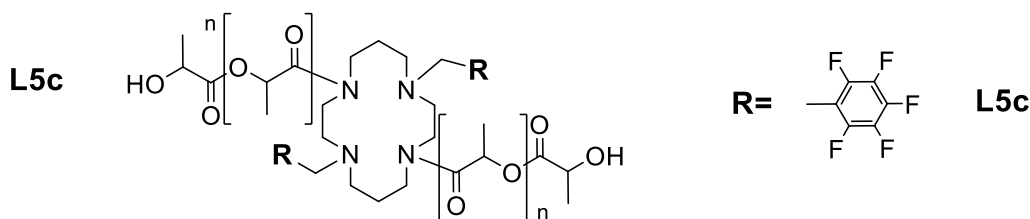
### Síntese do composto L5b



Pesou-se 361 mg ( $3.5 \times 10^{-4}$  mol) de **L4b**, 85.6 mg ( $7 \times 10^{-4}$  mol) de DMAP e 1 g ( $7 \times 10^{-3}$  mol) de L-lactídeo. Aqueceu-se a mistura reacional a  $120^\circ\text{C}$  em agitação, por 30 minutos. Ao fim desse tempo parou-se a reação com adição de 40 mL de uma mistura de água e metanol (1:1) (v:v). O composto foi transferido para um balão, sob agitação, contendo a mesma mistura com o auxílio de diclorometano para o solubilizar. A seguir foi evaporado o solvente na totalidade, e o composto foi lavado sucessivas vezes com éter dietílico frio para remoção de impurezas e/ou reagentes.

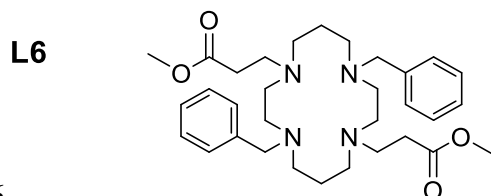
**FTIR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300-3600 ( $\nu_{\text{O-H}}$ , PLA); 2900-3100 ( $\nu_{\text{C-H}}$ , aromático); 1700-1900 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , PLA).

### Síntese do composto L5c



Pesou-se 393 mg ( $7 \times 10^{-4}$  mol) de **L4c**, 85.6 mg ( $7 \times 10^{-4}$  mol) de DMAP e 1 grama ( $7 \times 10^{-3}$  mol) de L-lactídeo. Aqueceu-se a mistura reacional a  $120^\circ\text{C}$  em agitação, por 30 minutos. Ao fim desse tempo parou-se a reação com adição de 40 mL de uma mistura de água e metanol (1:1) (v:v). O composto foi transferido para um balão, sob agitação, contendo a mesma mistura com o auxílio de diclorometano para o solubilizar. A seguir foi evaporado o solvente na totalidade, e o composto foi lavado sucessivas vezes com éter dietílico frio para remoção de impurezas e/ou reagentes.

**FTIR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300-3600 ( $\nu_{\text{O-H}}$ , PLA); 1700-1900 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , PLA).



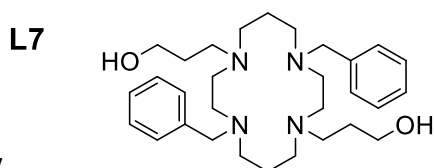
### Síntese do composto L6

Foram colocados 3 g (7.9 mmol) de **L4a** num balão de 500 mL contendo 150 mL de metanol. Seguidamente, adicionou-se 2.15 mL (23.7 mmol) de acrilato de metilo e refluxou-se durante 4 horas. Ao fim desse tempo, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e colocou-se no frigorífico para que o produto precipitasse. Por fim filtrou-se o produto e lavou-se com metanol frio. Após a lavagem do produto, secou-se em vácuo num *Schlenk*. O rendimento da reação foi de 75%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 7.33-7.24 (sobreposição, 10H total, *Ph*), 3.57 (s, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 3.47 (sobreposição, 8H total, 4H, α-CH<sub>2</sub> e 4H, β-CH<sub>2</sub>), 2.68 (m, 4H, [C2]CH<sub>2</sub>N), 2.60 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 2.53-2.48 (sobreposição, 8H total, 2x[C3]CH<sub>2</sub>N), 2.39 (m, 4H, [C2]CH<sub>2</sub>N), 1.69 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 173.2 (CO), 129.3 (*o*-Ph ou *m*-Ph), 128.3 (*i*-Ph e *o*-Ph ou *m*-Ph), 127.2 (*p*-Ph), 59.6 (CH<sub>2</sub>Ph), 51.5 ([C3]CH<sub>2</sub>N), 51.4 ([C3]CH<sub>2</sub>N), 50.9 (α-CH<sub>2</sub> e β-CH<sub>2</sub>), 50.7 (OCH<sub>3</sub>), 50.2 ([C2]CH<sub>2</sub>N), 32.2 ([C2]CH<sub>2</sub>N), 23.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>):

**Análise calculada** para C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: C, 69.53; H, 8.75; N, 10.14. **Experimental**: C, 69.45; H, 9.08; N, 10.16.



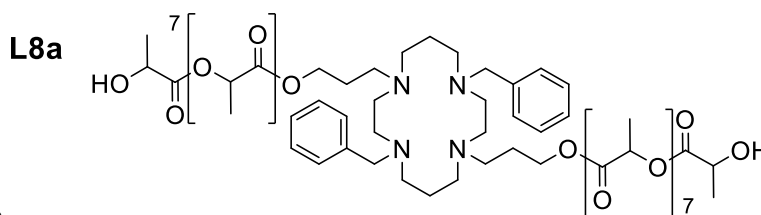
### Síntese do composto L7

Pesou-se 3 g (5.8 mmol) de **L6** num balão de 500 mL e dissolveu-se em 150 mL THF. Seguidamente, adicionou-se gota-a-gota, uma solução de THF contendo 1.22 g (32 mmol) de LiAlH<sub>4</sub> e refluxou-se durante a noite. No dia seguinte, após retirar do refluxo, destruiu-se o excesso de LiAlH<sub>4</sub> que não reagiu com uma solução de 10% tartarato de sódio e 5% de hidróxido de sódio, gota-a-gota. Extraiu-se com éter dietílico e adicionou-se sulfato de magnésio anidro. Após filtrar, a solução contendo o composto foi levada ao evaporador rotativo para se retirar o máximo de solvente e posteriormente seca em vácuo. O produto foi obtido com um rendimento de 77%

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 7.33-7.26 (sobreposição, 10H total, *Ph*), 4.76 (s, 2H, OH), 3.69-3.64 (sobreposição, 8H total, 4H, γ-CH<sub>2</sub> e 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 2.55-2.48 (sobreposição, 12H total, 4H, [C3]CH<sub>2</sub>N e 8H, 2x[C2]CH<sub>2</sub>N), 2.36 (m, 4H, [C3]CH<sub>2</sub>N), 2.27 (t, *J* = 5 Hz, 4H, α-CH<sub>2</sub>), 1.85 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.57 (m, *J* = 5 Hz, 4H, β-CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 136.6 (*i*-Ph), 130.3 (*o*-Ph ou *m*-Ph), 128.3 (*o*-Ph ou *m*-Ph), 127.4 (*p*-Ph), 60.1 (γ-CH<sub>2</sub>), 59.2 (CH<sub>2</sub>Ph), 52.0 ([C3]CH<sub>2</sub>N), 50.3 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 49.6 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 49.2 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 48.3 (α-CH<sub>2</sub>), 28.2 (β-CH<sub>2</sub>), 24.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

**Análise calculada** para C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: C, 72.54; H, 9.74; N, 11.28. **Experimental**: C, 71.45; H, 10.12; N, 11.15.

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300-3600 (ν<sub>O-H</sub>); 2900-3100 (ν<sub>C-H</sub>, aromático); 1700-1900.



### Síntese do composto L8a

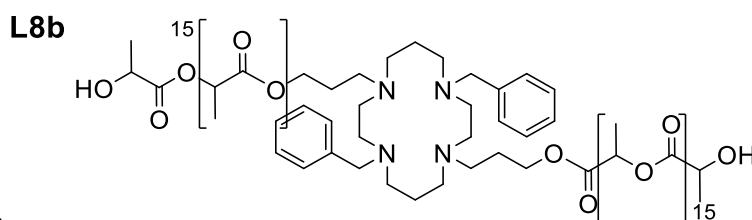
Pesou-se 345 mg (7.00x10<sup>-4</sup> mol) de **L7**, 86 mg (7.00x10<sup>-4</sup> mol) de DMAP e 1.00 g (7.00x10<sup>-3</sup> mol) de L-lactídeo. Aqueceu-se a mistura reacional a 120 °C em agitação, por 30 minutos. Ao fim



desse tempo parou-se a reação com adição de 40 mL de uma mistura de água e metanol (1:1) (v:v). O composto foi transferido para um balão, sob agitação, contendo a mesma mistura com o auxílio de diclorometano para o solubilizar. A seguir foi evaporado o solvente na totalidade, e o composto foi lavado sucessivas vezes com éter dietílico frio para remoção de impurezas e/ou reagentes. O rendimento da reação foi de 80%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 7.31-7.26 (sobreposição, 10H total, *Ph*), 5.22-5.10 (m, 14H total, 12H, *a-CH* e 2H, *a''-CH*), 4.35 (m, 2H, *a'-CH*), 4.10 (m, 4H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 3.54 (s, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 2.58-2.37 (sobreposição, 20H total, 8H, [C3]CH<sub>2</sub>N, 8H, [C2]CH<sub>2</sub>N e 4H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 1.68-1.46 (sobreposição, 54H total, 4H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>, 36H, *b-CH*<sub>3</sub>, 6H, *b'-CH*<sub>3</sub>, 6H, *b''-CH*<sub>3</sub> e 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 175.3 (CO), 170.1 (CO), 169.7 (CO), 139.8 (*i-Ph*), 129.1 (*o-Ph* ou *m-Ph*), 128.3 (*o-Ph* ou *m-Ph*), 127.1 (*p-Ph*), 69.4 (*a''-CH*), 69.2 (*a-CH*), 66.8 (*a'-CH*), 64.1 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 59.8 (CH<sub>2</sub>Ph), 51.5 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 51.5 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 51.2 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 51.0 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 50.6 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 26.4 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 23.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 20.7 (*b'-CH*<sub>3</sub>), 16.9 (*b''-CH*<sub>3</sub>), 16.8 (*b-CH*<sub>3</sub>).

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300-3600 ( $\nu_{O-H,PLA}$ ); 2900-3100 ( $\nu_{C-H}$ , aromático); 1700-1900 ( $\nu_{C=O}$ , PLA).



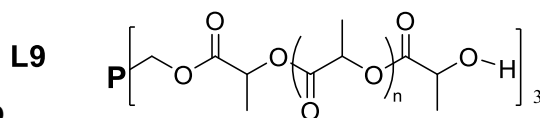
#### Síntese do composto L8b

Pesou-se 345 mg ( $7.00 \times 10^{-4}$  mol) de **L7**, 86 mg ( $7.00 \times 10^{-4}$  mol) de DMAP e 2.00 g ( $3.50 \times 10^{-2}$  mol) de L-lactídeo. Aqueceu-se a mistura reacional a 120°C em agitação, por 30 minutos. Ao fim desse tempo parou-se a reação com adição de 40 mL de uma mistura de água e metanol (1:1) (v:v). O composto foi transferido para um balão, sob agitação, contendo a mesma mistura com o auxílio de diclorometano para o solubilizar. A seguir foi evaporado o solvente na totalidade, e o composto foi lavado sucessivas vezes com éter dietílico frio para remoção de impurezas e/ou reagentes. O rendimento da reação foi de 80%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 7.31-7.26 (sobreposição, 10H total, *Ph*), 5.19-5.05 (m, 34H total, 32H, *a-CH* e 2H, *a''-CH*), 4.35 (m, 2H, *a'-CH*), 4.10 (m,  $J = 4$  Hz, 4H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 3.52 (s, 4H, CH<sub>2</sub>Ph), 2.55-2.32 (sobreposição, 20H total, 8H, [C3]CH<sub>2</sub>N, 8H, [C2]CH<sub>2</sub>N e 4H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 1.66-1.45 (sobreposição, 116H total, 4H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>, 96H, *b-CH*<sub>3</sub>, 6H, *b'-CH*<sub>3</sub>, 6H, *b''-CH*<sub>3</sub> e 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 175.3 (CO), 170.1 (CO), 169.7 (CO), 139.8 (*i-Ph*), 129.0 (*o-Ph* ou *m-Ph*), 128.3 (*o-Ph* ou *m-Ph*), 127.0 (*p-Ph*), 69.4 (*a''-CH*), 69.1 (*a-CH*), 66.8 (*a'-CH*), 64.2 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 59.9 (CH<sub>2</sub>Ph), 51.6 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 51.5 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 51.4 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 51.2 ([C3]CH<sub>2</sub>N ou [C2]CH<sub>2</sub>N), 50.8 ( $\alpha$ -CH<sub>2</sub>), 26.6 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 23.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 20.7 (*b'-CH*<sub>3</sub>), 16.9 (*b''-CH*<sub>3</sub>), 16.8 (*b-CH*<sub>3</sub>).

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300-3600 ( $\nu_{O-H,PLA}$ ); 2900-3100 ( $\nu_{C-H}$ , aromático); 1700-1900 ( $\nu_{C=O}$ , PLA).

**Análise calculada** para C<sub>138</sub>H<sub>192</sub>N<sub>4</sub>O<sub>74</sub>: C, 53.62; H, 6.26; N, 1.81. **Experimental**: C, 53.06; H, 1.97; N, 6.26.



### Síntese do composto L9

Colocou-se 43.4 mg ( $3.50 \times 10^{-5}$  mol) do fosfano **P(CH<sub>2</sub>OH)**<sub>3</sub> num *Schlenk*, de seguida adicionou-se mais 1.50g ( $10,5 \times 10^{-4}$  mol) de L-lactídeo e por ultimo adicionou-se 42.8 mg ( $3.50 \times 10^{-3}$  mol) do catalisador DMAP. Misturou-se ao máximo para ficar o mais homogénio possível e deixou-se a reagir a 120°C durante 25 minutos. Ao fim desse tempo, retirou-se o aquecimento e parou-se a reação com cerca de 40 mL de uma mistura de água e metanol (1:1) (v:v). O composto obtido foi transferido para um balão, sob agitação, contendo a mesma mistura de solventes com o auxílio de diclorometano para solubilizar o produto. O solvente foi evaporado na totalidade e o composto foi lavado sucessivas vezes com éter dietílico para remoção de impurezas e/ou reagentes. O rendimento da reação foi de 80%.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 5.21-5.10 (m, 39H total, 36H, a-CH e 3H, a''-CH), 4.61-4.47 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 4.35 (m, 3H, a'-CH), 1.68-1.46 (sobreposição, 126H total, 115H, b'-CH<sub>3</sub>, 9H, b''-CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) 175.3 (CO), 169.7 (CO), 69.2 (a''-CH), 66.2 (a-CH), 66.9 (a'-CH), 59.8 (CH<sub>2</sub>), 20.7 (b'-CH<sub>3</sub>), 16.9 (b''-CH<sub>3</sub>), 16.8 (b-CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>31</sup>P** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K): δ (ppm) -30.0.

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300-3600 (ν<sub>O-H</sub>, PLA); 2900-3100 (ν<sub>C-H</sub>, aromático); 1700-1900 (ν<sub>C=O</sub>, PLA).

**Análise calculada** para C<sub>273</sub>H<sub>369</sub>O<sub>183</sub>P: C, 49.61; H, 5.63. **Experimental:** C, 49.11; H, 5.73.

### 4.3.2. Sínteses e caracterização dos complexos metálicos

#### Síntese do complexo C1 [Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(CO)<sub>2</sub>I]<sup>55</sup>

Dissolveu-se 1.58 g ( $4.24 \times 10^{-3}$  mol) de [Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(CO)<sub>2</sub>I]<sub>2</sub> em 50 mL de clorofórmio. A esta solução adicionou-se 1.5 g de iodo metálico e deixou-se a refluxar durante 50 minutos. Após retirar o refluxo foi feita uma extração líquido-líquido com uma solução de 100 mL de tiosulfato de sódio 1.3 M. Após a evaporação da fase orgânica o produto foi lavado cinco vezes com *n*-hexano e por fim recristalizado com uma mistura CHCl<sub>3</sub>/*n*-heptano. O rendimento foi de 75%.

**RMN <sup>1</sup>H** (Acetona-d<sub>6</sub>, 300.1 MHz, 296 K):  $\delta$  (ppm) 5.28 (s, 5H, ( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)).

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 2900-3100 ( $\nu_{C-H}$ , aromático); 1900-2100 ( $\nu_{C=O}$ ).

#### Síntese do complexo C2 [Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(CO)<sub>2</sub>(L9)][BF<sub>4</sub>]

Pesou-se 303.9 mg ( $2 \times 10^{-4}$  mol) de [Fe( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)(CO)<sub>2</sub>I] e dissolveu-se em 30 mL de clorofórmio. Adicionou-se à solução 650 mg ( $2 \times 10^{-4}$  mol) de L9 e 77.6 mg ( $4 \times 10^{-4}$  mol) de AgBF<sub>4</sub>. Deixou-se a agitar no escuro durante toda a noite e no dia seguinte a solução que estava avermelhada foi filtrada duas vezes. Evaporou-se o solvente e o produto resultante foi recristalizado mais duas vezes com uma mistura CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/*n*-hexano. Depois de cada recristalização o produto foi filtrado e seco sob vácuo.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K):  $\delta$  (ppm) 5.31-5.10 (sobreposição, 53H total, 45H, a-CH e 3H, a''-CH, 5H, ( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)), 4.98-4.80 (m, 6H, P-CH<sub>2</sub>), 1.75-1.40 (sobreposição, 144H total, 135H, b'-CH<sub>3</sub>, 9H, b''-CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K):  $\delta$  (ppm) 209.1 (Fe-CO), 17.0 (a''-CO(PLA)), 169.8 (a'-CO(PLA)), 169.4 (a-CO(PLA)), 85.0 ( $\eta^5$ -C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>), 57.7 (CH<sub>2</sub>), 17.0 (b'-CH<sub>3</sub>, b-CH<sub>3</sub>), 16.1 (b''-CH<sub>3</sub>). **RMN <sup>31</sup>P** (CDCl<sub>3</sub>, 300.1 MHz, 296 K):  $\delta$  (ppm) -3.85 (d-d, P-CH<sub>2</sub>).

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300-3600 ( $\nu_{O-H, PLA}$ ); 2900-3100 ( $\nu_{C-H}$ , aromático); 2000-2100 ( $\nu_{C=O}$ ); 1700-1850 ( $\nu_{C=O}$ , PLA); 1000-1200 ( $\nu_{B-F}$ ).

**Análise calculada** para C<sub>154</sub>H<sub>206</sub>O<sub>101</sub>FeBF<sub>4</sub>P: C, 4.51; H, 5.24. **Experimental**: C, 46.58; H, 5.44.

#### Síntese do complexo C3a [FeCl<sub>2</sub>(L7)]

Colocou-se a reagir 63 mg (0.5 mol) de FeCl<sub>2</sub> com 248 mg (0.5 mol) do composto L7 em metanol em refluxo durante toda a noite. No dia seguinte a solução tinha uma cor ligeiramente amarelada. Filtrou-se a solução, lavou-se com *n*-hexano e depois colocou-se o produto obtido a recristalizar em metanol num cristizador em forma de U. O sólido obtido, foi filtrado e seco sob vácuo.

**Análise calculada** para C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>Fe: C, 53.84; H, 8.16; N, 8.10. **Experimental**: C, 53.77; H, 8.13; N, 8.15.

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300-3600 ( $\nu_{O-H}$ ); 2900-3100 ( $\nu_{C-H}$ , aromático).

### Síntese do complexo C3b [FeCl<sub>2</sub>(L8b)]

Colocou-se a reagir 20.5 mg ( $1.64 \times 10^{-4}$  mol) de FeCl<sub>2</sub> com 500 mg ( $1.64 \times 10^{-4}$  mol) do composto L7 em THF sob refluxo durante toda noite. No dia seguinte filtrou-se a solução, lavou-se o produto obtido com *n*-hexano e deixou-se a secar sob vácuo.

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300-3600 (ν<sub>O-H</sub>, PLA); 2900-3100 (ν<sub>C-H</sub>, aromático); 2000-2100 (ν<sub>C=O</sub>); 1700-1850 (ν<sub>C=O</sub>, PLA).

**Análise calculada** para C<sub>138</sub>H<sub>192</sub>N<sub>4</sub>O<sub>74</sub>Cl<sub>2</sub>Fe: C, 50.94; H, 6.07; N, 1.72. **Experimental**: C, 50.25; H, 6.11; N, 1.67.

### Síntese do complexo C4 [Fe(CH<sub>3</sub>CN)<sub>6</sub>][BF<sub>4</sub>]<sub>2</sub><sup>49</sup>

Colocou-se a reagir 255 mg (4.32 mmol) de ferro metálico com 1 g de NOBF<sub>4</sub> (8.64 mmol) em 50 ml de acetonitrilo, à temperatura ambiente. Durante a reação foram feitos alguns ciclos de vácuo/nitrogénio e deixou-se o *Schlenk* sob vácuo estático para deslocar o equilíbrio da reação uma vez que há libertação de NO. Deixou-se a reagir durante a noite e no dia seguinte filtrou-se a solução. Evaporou-se para concentrar a solução e forçou-se a formação de sólido por recristalização usando a técnica de dupla camada por difusão lenta de solvente utilizando para tal acetonitrilo como solvente e o éter dietílico como co-solvente. Deixou-se no frigorífico a -20°C até a formar um precipitado, que foi filtrado, lavado com éter dietílico frio e seco em vácuo.

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300-3600 (ν<sub>O-H</sub>, PLA); 2900-3100 (ν<sub>C-H</sub>, aromático); 2000-2100 (ν<sub>C=O</sub>); 1700-1850 (ν<sub>C=O</sub>, PLA); 1000-1200 (ν<sub>B-F</sub>).

### Síntese do complexo C5 [Fe(L7)](BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

A síntese deste complexo foi feita a partir de 238 mg (0.5 mmol) do complexo [Fe(CH<sub>3</sub>CN)<sub>6</sub>](BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e de 248 mg (0.5 mmol) do composto L7 em metanol sob refluxo durante toda a noite. No dia seguinte houve uma ligeira alteração da cor da solução. Após arrefecimento, a solução foi filtrada, o solvente evaporado e o produto obtido lavado com *n*-hexano. O composto foi dissolvido em metanol e colocado a recristalizar à -20 °C. O precipitado foi filtrado e seco sob vácuo.

**FTIR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3300-3600 (ν<sub>O-H</sub>, PLA); 2900-3100 (ν<sub>C-H</sub>, aromático); 1000-1200 (ν<sub>B-F</sub>).

**Análise calculada** para C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>B<sub>2</sub>F<sub>8</sub>Fe: C, 47.84; H, 6.82; N, 7.44. **Experimental**: C, 47.92; H, 6.95; N, 7.44.

### Síntese do complexo C6 [Cu(L7)](CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>

Dissolveu-se 135.6 mg (0.2 mmol) de Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O em metanol, sob agitação, e a seguir adicionou-se 99.2 (0.2 mmol) de L7. A mistura reacional foi refluxada durante toda a noite. No dia seguinte, retirou-se a agitação, filtrou-se o composto e evaporou-se o solvente à secura. O produto foi lavado sucessivas vezes com *n*-hexano e após secar, foi recristalizado com uma mistura metanol/*n*-hexano. O produto foi filtrado novamente e seco sob vácuo.

**FTIR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300-3600 ( $\nu_{\text{O-H}}$ , PLA); 2900-3100 ( $\nu_{\text{C-H}}$ , aromático); 2000-2100 ( $\nu_{\text{C}\equiv\text{O}}$ ); 1700-1850 ( $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ , PLA); 1500-1700 ( $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ , acetato); 1300-1400 ( $\nu_{\text{C-O}}$ , acetato).

**Análise calculada** para  $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_6\text{Cu}$ : C, 59.74; H, 8.75; N, 8.10. **Experimental**: C, 59.04; H, 8.76; N, 8.15.

**CAPÍTULO 5: EXECUÇÃO FINANCEIRA,  
REGRAS DE SEGURANÇA E CUIDADOS  
AMBIENTAIS**

## 5 - EXECUÇÃO FINANCEIRA, REGRAS DE SEGURANÇA E CUIDADOS AMBIENTAIS

### 5.1. Execução Financeira

De forma a apresentar todos os custos envolvidos na tese do mestrado em Química Tecnológica, apresenta-se resumidamente na tabela seguinte os gastos relacionados com a execução do trabalho laboratorial, solventes, análises, etc.

Tabela 6 - Tabela de gastos do Mestrado em Química Tecnológica

<b>Solventes</b>	<b>Qt.</b>	<b>Valor (€)</b>	<b>Qt. Utilizada</b>	<b>Custo PT (€)</b>
Acetonitrilo. Sigma. 99.5%	2.5 L	152	1 L	60.8
Dietil Éter. Sigma. 99.8%	2.5 L	101	1 L	40.4
Diclorometano. Sigma. 99.9%	2.5 L	52.2	1 L	20.9
Clorofórmio. Sigma. 99.5%	2.5 L	105	1 L	42
Tolueno. Sigma. 99.8%	1 L	99	0.2 L	20
<i>n</i> -Hexano. Sigma. 99.0%	2.5 L	46.5	1 L	46.5
Acetona-d <sub>6</sub> . CIL. 99.8%	25 g	117	10 g	46.8
Clorofórmio-d <sub>1</sub> . CIL. 99.8%	50 g	22	30 g	13.2
<b>Reagentes</b>	<b>Qt.</b>	<b>Valor (€)</b>	<b>Qt. Utilizada</b>	<b>Custo PT (€)</b>
Cloreto de ferro (II). Sigma 98%	25 g	90.1	2 g	7.2
Iodeto de dicarbonilo ciclopentadienilferro. Sigma 97%	5 g	124	2 g	49.6
Tetrafluoroborato de prata. Sigma. 98%	1 g	30.6	0.4 g	12.24
L-lactídeo. Sigma	25 g	54.6	20 g	43.68
Perclorato de Níquel(II) hexahidratado. Sigma	500 g	230	60 g	27.6
1,5,8,12-tetrazadodecano. Sigma . 94%	100 mL	19.8	30 mL	5.94
Hidróxido de sódio. Sigma	500 g	53.1	250 g	26.55
Brometo de benzilo. Sigma 98%	25 g	20.8	12 g	9.98
Boro-hidreto de sódio. Sigma 99%	100 g	171	11 g	18.11
Sulfato de magnésio anidro. Sigma 99.5%	500 g	54.7	200 g	21.88
Acrilato de metilo. Siga 99%	1 L	37.4	15 mL	0.57
DMAP. TCI. 99%	25 g	35.8	1 g	1.4
<b>Análises</b>	<b>Qt.</b>	<b>Valor (€)</b>	<b>Qt. Utilizada</b>	<b>Custo PT (€)</b>
RMN	1 h	5	50 h	250
Análise Elementar	1	15	14	210
<b>Preço sem IVA</b>				975.35
<b>IVA (23%)</b>				224.33
<b>Total</b>				1199.68

Ao custo total não foram contabilizados nem os gastos relativos ao material corrente de laboratório (ex. *Schlenks*, goblés, balança, caixa de luvas, linha de vácuo, etc), nem os gastos relativos à luz, água, nitrogénio líquido e canalizado, tratamento dos resíduos, e os gastos dos estudos celulares.

## **5.2. Regras de segurança**

Durante todo o trabalho foram sempre utilizados os EPIs (Equipamento de Proteção Individual) necessários e adequados ao trabalho realizado no laboratório.

Todos os reagentes (solventes, materiais de partida, produtos intermédios e produtos finais) considerados perigosos/tóxicos foram sempre manuseados dentro de uma *hotte* e sempre com o auxílio dos equipamentos de proteção individual (EPI's) necessários tais como bata, luvas, óculos de proteção e calçado adequado. Em alguns casos, o uso de solventes como o clorofórmio, metanol, diclorometano e éter (que são considerados muito perigosos tanto ao organismo como para o ambiente) foi necessário, visto não haver nenhum outro solvente adequado para substituí-los nas situações onde foram utilizados.

Além disso, uma vez dentro do laboratório, as regras de segurança presentes no Manual de Segurança em laboratórios foram sempre seguidas através da utilização de bata e óculos de proteção, mesmo quando não se estavam a manipular reagentes perigosos.

## **5.3. Cuidados Ambientais**

São produzidos vários resíduos químicos num laboratório diariamente, é portanto necessário que haja consciencialização para os perigos dos mesmos para o meio ambiente. Ao longo deste projeto, todos os resíduos químicos foram adequadamente separados em frascos de recolha próprios, e devidamente rotulados como *Resíduo Hospitalar Líquido Perigoso* (RHLP) de acordo com a Lista Europeia de Resíduos e de acordo com os seguintes grupos de resíduos:

- Solventes orgânicos não-halogenados (álcoois, hidrocarbonetos);
- Solventes orgânicos halogenados (cloretos, brometos, iodetos orgânicos líquidos e/ou em solução);
- Soluções contendo metais.

Além dos resíduos líquidos, também os resíduos sólidos, englobados no grupo IV dos *Resíduos Hospitalares – Resíduos Hospitalares Específicos* (segundo o despacho N° 242/96 do ministério da saúde), foram separados no respetivo contentor vermelho (possuindo um saco vermelho), incluindo qualquer resíduo sólido contaminado com substâncias químicas.



## **CAPÍTULO 6 : CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**

## 6 - CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A quantidade de plásticos que é produzida e desperdiçada no dia-a-dia tem motivado cada vez mais investigadores a utilizarem novas matérias-primas provenientes de fontes renováveis em detrimento do petróleo. De acordo com os dados da literatura, com as estimativas de mercado e com o desenvolvimento de novos métodos e processos de produção na indústria química, pensa-se que até 2020 muito irá mudar no que diz respeito à indústria dos plásticos. O grande “boom” do mercado dos biopolímeros já se iniciou e este mercado, que até há pouco tempo era um nicho, já não é.

O Polilactídeo (PLA) é visto como um potencial substituto de alguns dos plásticos provenientes do petróleo. Para além de poder ser produzido a partir de fontes renováveis, é biodegradável e biocompatível. Mas ainda há muito para mudar, pois a sua grande produção à escala industrial é feita a partir de catalisadores metálicos. Neste âmbito, a literatura descrevendo a organocatálise do Lactídeo (LA) já é vasta, no entanto ainda não existe aplicação industrial. Desta forma, um dos objetivos desta dissertação de Mestrado foi realizar a organocatálise do LA usando a DMAP como catalisador/ativador. Na área das aplicações biomédicas este pode ser um passo determinante, uma vez que eliminamos assim qualquer vestígio de contaminantes metálicos da formulação final.

Com este trabalho foi possível verificar que a DMAP é capaz de polimerizar de forma quantitativa em cerca de 30 minutos o LA usando como iniciador álcoois primários e aminas secundárias. No primeiro caso, verificou-se que utilizando o tris(hidroximetil)fosfano como iniciador, se obtém o PLA funcionalizado com o fosfano para posterior coordenação ao centro metálico. Através do cálculo de DP, verificou-se que todos os –OH do fosfano originaram uma cadeia de polímero. Em termos de catálise, isto é vantajoso, uma vez que se tem o crescimento simultâneo de três cadeias de polímero, havendo por isso uma economia de catalisador. De futuro, é pertinente verificar se esta polimerização é “viva” através da introdução de mais monómero do final da reação e/ou adição de um novo monómero para se formar um copolímero. Verificou-se também que aminas secundárias podem apresentar um grande potencial como iniciadoras da polimerização do LA. No entanto, a amida terciária que se obtém após a polimerização é facilmente hidrolisável, como se observou no caso dos compostos **L5a-c**. Por outro lado, tanto quanto temos conhecimento este é o primeiro caso descrito de uma polimerização catalisada pela DMAP usando uma amina secundária como iniciadora. Desta forma, propõe-se que de futuro se faça um estudo mais completo, utilizando aminas menos impedidas estereoquimicamente e que permitam uma ligação ao polímero mais estável.

As ciclamas apresentadas neste trabalho foram, na sua grande maioria, apresentadas aqui pela primeira vez. Foram sintetizados sete novos derivados da ciclama, sendo que cinco deles são macrociclamas. Todos estes compostos foram caracterizadas por RMN, FTIR e análise elementar. Para **L7**, obteve-se também a estrutura cristalina por difração de raios-X em cristal único, tendo-se observado que cristaliza no sistema cristalino triclinico e grupo espacial  $P\bar{1}$ . Para além do seu potencial como iniciadoras da polimerização, apresentam também um grande potencial para aplicação como agentes quimioterapêuticos, como foi verificado para a espécie de ciclama **L7**. Neste sentido sugere-se que sejam testadas em linhas tumorais todos os derivados da ciclama usados neste trabalho e a síntese dos análogos de **L7** com os substituintes (Bn- $\rho$ -CF<sub>3</sub>) e (BnF<sub>5</sub>). Na realidade, **L4b** apresenta atividade antibacteriana,<sup>56</sup> fazendo prever que poderá ter interesse também no âmbito do cancro.

Foram também sintetizados cinco novos complexos metálicos, um de cobre(II) (**C6**) e quatro de ferro(II) (**C2**, **C3a**, **C3b** e **C5**). Todos eles foram caracterizados por FTIR e análise elementar. Devido a instabilidade do complexo **C2** à luz e numa grande gama de solventes impossibilitou a sua caracterização completa.

De futuro, prevê-se que a caracterização dos complexos e ligandos seja completada com UV-Vis e voltametria cíclica. Para os compostos macromoleculares deve-se recorrer ainda a MALDI-TOF (para confirmar a ausência de espécies cíclicas, por exemplo) e GPC (para determinar a dispersividade). Finalmente, para os compostos paramagnéticos seria ainda interessante determinar a suscetibilidade paramagnética utilizando o Método de Evans (para obter informação acerca da estrutura do complexo) ou realizar espectroscopia de Mössbauer (identificação de espécies químicas usando radiação gama).

Relativamente aos resultados de atividade biológica para a linha celular do carcinoma humano da mama (**MDA-MB-231**), obtiveram-se resultados diversificados. Por um lado, os compostos de alto peso molecular (**L8b** e **C3b**) não apresentaram atividade biológica nas condições testadas. Este resultado, mesmo sendo um pouco surpreendente tendo em consideração os resultados anteriores do Grupo de Química Organometálica, poderá estar relacionado com os mecanismos de internalização celular como já foi discutido no **Capítulo 3.1**. Desta forma, de futuro pretende-se avaliar a citotoxicidade a tempos mais longos e noutras linhas celulares. Por outro lado, a ciclama **L7** apresentou citotoxicidade bastante relevante para a linha celular testada ( $IC_{50} = 37 \mu M$ ; semelhante ao  $IC_{50}$  encontrado para a cisplatina). Os compostos **C3a**, **C5** e **C6**, que continham a ciclama **L7** na sua composição, revelaram ser todos ativos nesta linha celular. O composto de cobre (**C6**), foi o que apresentou melhores resultados, sendo duas vezes mais ativo que a cisplatina nas mesmas condições experimentais.

Em conclusão, os resultados aqui apresentados são muito promissores, uma vez que a linha celular **MDA-MB-231** é muito agressiva e metastática. Não existe atualmente ainda cura para este tipo de tumores. Contudo, este trabalho exploratório permitiu iniciar uma nova colaboração entre o Grupo de Química Organometálica e Catálise do IST, e o Grupo de Química Organometálica da FCUL com o surgimento de uma nova classe de compostos anticancerígenos, para além da utilização de aminas secundárias como iniciadoras da polimerização do LA catalisada pela DMAP.

Como nota final, este projeto de Mestrado teve um custo aproximado de € 1200 e permitiu criar uma nova classe de compostos para aplicação medicinal através da sinergia entre a polimerização e a química de coordenação e organometálica.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> acessado em 9/8/2016 11:55.
- [2] <http://www.who.int/cancer/en/> acessado em 9/8/2016 14:42 .
- [3] <http://www.usnews.com/news/blogs/data-mine/2015/05/05/global-cancer-spending-reaches-100b> acessado em 9/8/2016 15:00.
- [4] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/> acessado em 9/8/2016 12.35.
- [5] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/surgery/special-surgical-techniques> acessado em 9/8/2016 16:16.
- [6] C.K. Bomford, I.H. Kunkler, J. Walter. Walter and Miller's Textbook of Radiotherapy: Radiation Physics, Therapy and Oncology, (6<sup>a</sup> Ed), 2012.
- [7] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/index> acessado em 9/8/2016 17:16.
- [8] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/how-is-chemotherapy-used-to-treat-cancer> acessado em 9/8/2016 16:36.
- [9] Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N. Organometálica Anticancer compostos. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011, 54:3-25.
- [10] T.S. Morais, A.M. Valente, A.I. Tomaz, F. Marques, M.H. Garcia,. Tracking antitumor metallodrugs: Promising agents with the Ru(II)- and Fe(II)-cyclopentadienyl scaffolds; *Future Med Chem*. 2016, 8:527-44.
- [11] a) E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, G. Sava. *Curr. Top. Med. Chem*. 2004,4:1525; b) E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, G. Sava. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery; *Metal Ions Biol. Sys*. 2004, 42:323.
- [12] C. G. Hartinger, S. Zorbas-Selfried, M. A. Jakupiec, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler.; A novel ruthenium(II) arene based intercalator with potent anticancer activity; *J. Inorg. Biochem*. 2006, 100, 891.
- [13] Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler.; Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes; *Chem. Commun*. 2005.
- [14] W. H. Ang, P. J. Dyson. *Eur. J. Inorg. Chem*; Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy; *J. Inorg. Chem*. 2006.
- [15] Marzano C1, Gandin V, Pelli M, Colavito D, Papini G, Lobbia GG, Del Giudice E, Porchia M, Tisato F, Santini C. In vitro antitumor activity of the water soluble copper(I) complexes bearing the tris(hydroxymethyl)phosphine ligand. *J Med Chem*. 2008,51:798-808.
- [16] Kitajima, N.; Moro-oka, Y. Copper-Dioxygen Complexes. *Inorganic and bioinorganic perspectives*. *Chem. Rev*. 1994, 94:737-757.
- [17] R. Crichton. *Iron Metabolism: from Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*. John Wiley and Sons; 2009, 17–58.

- [18] M. Demirbilek, E. Pişkin. Effects of Copper-Cyclam and Copper-Cyclam/PolymerComplexes on HeLa Cells. *Hacetupe J. Biol. & Chem.* 2008, 36:263-271.
- [19] P. Szymański, T. Frączek, M. Markowicz, E. Mikiciuk-Olasik. Development of copper based drugs, radiopharmaceuticals and medical materials. *Biometals.* 2012, 25:1089-112.
- [20] M. Porchiaa, A. Dolmella, V. Gandin, C. Marzano, M. Pellei, V. Peruzzoa F. Refoscoa. Neutral and charged phosphine/scorpionate copper(I) complexes: Effects of ligand assembly on their antiproliferative activity. *Eur J Med Chem.* 2013, 59:218-26.
- [21] A.C. Gonçalvesa, T.S. Moraisa, M. P. Robalob, F. Marques, F. Avecilla, C. P. Matosa, I. Santos, A. I. Tomaz, M. H. Garciaa, Important cytotoxicity of novel iron(II) cyclopentadienyl complexes with imidazole based ligands. 2013, 129:1-8
- [22] A. Vessiéres, S. Top, W. Beck, E. Hillard, G. Jaouen. Metal complex SERMs (selective oestrogen receptor modulators). The influence of different metal units on breast cancer cell antiproliferative effects. *Dalton Trans.* 2006, 529.
- [23] A. Valente, Ana Margarida Santosa, L. Côte-Real, M. P. Robalob, V. Moreno, M. Font-Bardiaa, Teresa Calvete, f, Julia Lorenzoga, M. H. Garcia New iron (II) cyclopentadienyl derivative complexes: synthesis and antitumor activiti against human leucemia cancer cells. *Journal of Organometallic Chemistry.* 2014, 756:52-60.
- [24] J. Vančo, Z. Šindelář, Z. Dvořák, Z. Trávníček. Iron-salophen complexes involving azole-derived ligands: A new group of compounds with high-level and broad-spectrum in vitro antitumor activity. *J Inorg Biochem.* 2015, 142:92-100.
- [25] R. Gust, D. Posselt, Metal salophen complexes for prevention and treatment of cancer, 2008. (WO 2008090081).
- [26] R. Gust, D. Posselt, Metal salophen complexes use in prevention and treatment of cancer, 2008. (EP 1949899).
- [27] R. Muller, C.M. Keck. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J Biotechnol.* 2004, 113:151-70.
- [28] A.S. Hoffman. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *J Control Release.* 2008, 132:153–163.
- [29] V.P. Torchilin, Drug targeting, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000, 11:81–91.
- [30] Y.H. Bae, K. Park. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *J Control Release.* 2011, 153:198-205.
- [31] A. Valente, M. H. Garcia, F. Marques, Y. Miao, Cyril Rousseau d, Philippe Zinck c First polymer “ruthenium-cyclopentadienyl” complex as potential anticancer agente. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2013, 127: 79–81.
- [32] Andreia Valente, Philippe Zinck, “Polymer-Metal Complexes (PMC) for Cancer Therapy”, *Recent Research Developments in Polymer Science*, 2012, 11:99-128.
- [33] G. M. Nogueira. Functionalization of biocompatible polyesters with substrates of biological interest via organocatalyzed ring-opening polymerization: application in cancer therapy. 2015 Mestrado em Química Tecnológica.

- [34] C.S. Reddy, R. Ghai, V.C. Kalia. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour. Technol.* 2003, 87:137-146.
- [35] Norma ABNT NBR 15448-1. Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis. Parte 1: Terminologia. 2008, 1548:1
- [36] D.S. Rosa, N.T. Lotto, C.G. Guedes. Compostable Polymer Materials. *Polym. Test.* 2004, 23: 3.
- [37] G. F. Brito, P. Agrawal, E. M. Araújo, T. J. A. Mélo; “Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes”; UFCG, *Rev. Eletr. Mater. Proc.*, 2011, 127-139
- [38] S.M. Davachi, Kaffashi, B. Poly Lactic Acid in Medicine. *Polym. Plast. Technol. Eng.* 2015, 54:944-967.
- [39] Lactic Acid and Poly Lactic Acid (PLA) Market Analysis by Application (Packaging, Agriculture, Transport, Electronics, Textiles) And Segment Forecasts To 2020. *MarketsandMarkets*, 2015.
- [40] L. I. Costa, F. Tancini, S. Hofmann, F. Codari, U. Trommsdorff. 1 From Laboratory to Industrial Continuous Production of Polylactic Acid with Low Residual Monomer. *Polymer Reaction Engineering.* 2016, 360:40-48.
- [41] A. J. R. Lasprilla, G. R. Martinez, B. H. Lunelli, A. L. Jardini, R. M. Filho, Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. *Biotechnol.* 2012, 30:321-328.
- [42] N. E. Kamber, et al. Organocatalytic ring-opening polymerization. *Chem. Rev.* 2007, 107:5813–5840.
- [43] R. G. Giubert, M. Hess, A. D. Jenkins, R. G. Jones, DISPERSITY IN POLYMER SCIENCE (IUPAC Recommendations 2009). *Pure Appl. Chem.* 2009, 81:351–353.
- [44] Lactic Acid and Poly Lactic Acid (PLA) Market Analysis by Application (Packaging, Agriculture, Transport, Electronics, Textiles) And Segment Forecasts To 2020. *MarketsandMarkets*, 2015.
- [45] Nontoxic Metal–Cyclam Complexes, a New Class of Compounds with Potency against Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*
- [46] G. J. Bridger, R. T. Skerlj, D. Thornton. Synthesis and Structure - Activity Relations hips of P hen y lenebis (me t h y lene) - Linked Bis-Tetraazamacrocycles That Inhibit HIV Replication. Effects of Macrocyclic Ring Size and Substituents on the Aromatic Linker. *J. Med. Chem.* 1995, 38:366–378.
- [47] E.K Barefield., F. Wagner. Structure-Distribution Relationships for Metal-Labeled Myocardial Imaging Agents: Comparison of a Series of Cationic Gallium(III) Complexes with Hexadentate Bis(salicylaldimine) Ligands. *Inorg Synthesis.* 1976, 16,220-225.
- [48] L. G. Alves, F. Hild, b R. F. Munhá, L. F. Veiros, S. Dagorne, A. M. Martins. Synthesis and structural characterization of novel cyclam-based zirconium complexes and their use in the controlled ROP of rac-lactide: access to cyclam-functionalized polylactide materials. *Dalton Trans.* 2012, 41:14288–14298.
- [49] J. Wiley & Sons, Inc *Inorganic Synthesis*, 2002, 33:76-77.

- [50] K.Sunkel, G. Urban, W. Beck; J. Organomet. Chem. 1987, 1:1-319.
- [51] W.L.F. Armarego, D.D.Perrin. Purification of Laboratory Chemicals; 4th ed.; Reed Educational and Professional Publishing Ltd; 1996.
- [52] G. Royal, V. Dahaoui-Gindrey, S. Dahaoui, Tabard, R. Guillard. New Synthesis of trans-Disubstituted Cyclam Macrocycles - Elucidation of the Disubstitution Mechanism on the Basis of X-ray Data and Molecular Modeling European J.Organic Chemistry, 1998,1971-1975.
- [53] L. G. Alves, M. T. Duarte, A. M. Martins, Structural features of neutral and cationic cyclams. Journal Chem. Structure, 2015, 1098:277-288.
- [54] L. G. Alves, M.A. Antunes, I. Matos, R.F. Munha, M.T. Duarte, A.C. Fernandes, M.M. Marques, A.M. Martins. Nickel(II) and palladium(II) complexes as aluminium-free catalysts for olefin polymerisation. Inorg. Chim. Acta. 2010, 363:1823-1830.
- [55] RB King, FG Stone, Cyclopentadienyl Metal Carbonyls. Inorg. Syn. 1963,7: 99-115.
- [56] L. G. Alves, P. Pinheiro, J. R. Feliciano, D. P. Dâmaso, Jorge H. Leitão, A. M. Martins: "Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity of cyclam derivatives"; Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2016,

# **ANEXOS**



## ANEXOS

**Tabela A1** – Dados cristalográficos e detalhes experimentais da determinação estrutural de **L7**

Fórmula Empírica	C30 H48 N4 O2
Peso Molecular	496.72
Temperatura (K)	150(2)
Comprimento de Onda (Å)	0.71073
Sistema Cristalino, Grupo Espacial	Triclínico, P-1
Dimensões da Célula Unitária	a (Å) = 6.8652(7)      α (°) = 76.378(6)
	b (Å) = 8.8368(9)      β (°) = 88.181(7)
	c (Å) = 12.3823(12)    γ (°) = 75.088(6)
Volume (Å <sup>3</sup> )	705.14(12)
Z	1
Densidade Calculada (g.cm <sup>-3</sup> )	1.170
Coefficiente de Absorção (mm <sup>-1</sup> )	0.074
<i>F</i> (000)	272
Tamanho do Cristal (mm)	0.06 x 0.18 x 0.20
Intervalo de θ recolhido (°)	3.29 – 25.34
Limites dos Índices de Miller	-7 ≤ h ≤ 8, -9 ≤ k ≤ 10, -14 ≤ l ≤ 14
Reflexões Recolhidas/Únicas	6969 / 2398 [R <sub>int</sub> = 0.0251]
% de θ	93.0
Correção da Absorção	Multi-scan
Método de Refinamento	Full-matrix least-squares on <i>F</i> <sup>2</sup>
Dados / Restrições / Parâmetros	2398 / 0 / 167
Qualidade do ajuste em <i>F</i> <sup>2</sup>	1.092
Índices <i>R</i> finais [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0376, ω <i>R</i> <sub>2</sub> = 0.0897
Índices <i>R</i> (todos os dados)	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0526, ω <i>R</i> <sub>2</sub> = 0.0946
Maior diferença de Densidade Eletrónica Residual (eÅ <sup>-3</sup> )	0.144 e -0.158

$$R_1 = \frac{\sum ||F_0| - |F_c||}{\sum |F_0|}$$

$$\omega R_2 = \left[ \frac{\sum \omega (F_0^2 - F_c^2)^2}{\sum \omega (F_0^2)^2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

**Tabela A2** – Dados cristalográficos e detalhes experimentais da determinação estrutural de **L7.2HBF<sub>4</sub>**

Fórmula Empírica	C30 H50 B2 F8 N4 O2
Peso Molecular	672.36
Temperatura (K)	150(2)
Comprimento de Onda (Å)	0.71073
Sistema Cristalino, Grupo Espacial	Monoclínico, P2(1)/c
Dimensões da Célula Unitária	a (Å) = 10.845(2)      α (°) = 90
	b (Å) = 9.986(2)      β (°) = 92.221(7)
	c (Å) = 15.406(3)      γ (°) = 90
Volume (Å <sup>3</sup> )	1667.2(6)
Z	2
Densidade Calculada (g.cm <sup>-3</sup> )	1.339
Coefficiente de Absorção (mm <sup>-1</sup> )	0.113
<i>F</i> (000)	712
Tamanho do Cristal (mm)	0.08 x 0.14 x 0.14
Intervalo de θ recolhido (°)	3.04 – 25.33
Limites dos Índices de Miller	-13 ≤ h ≤ 13, -12 ≤ k ≤ 12, -18 ≤ l ≤ 17
Reflexões Recolhidas/Únicas	9417 / 3031 [R <sub>int</sub> = 0.0574]
% de θ	99.5
Correção da Absorção	Multi-scan
Método de Refinamento	Full-matrix least-squares on <i>F</i> <sup>2</sup>
Dados / Restrições / Parâmetros	3031 / 0 / 216
Qualidade do ajuste em <i>F</i> <sup>2</sup>	0.961
Índices <i>R</i> finais [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0522, ω <i>R</i> <sub>2</sub> = 0.1365
Índices <i>R</i> (todos os dados)	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.1009, ω <i>R</i> <sub>2</sub> = 0.1585
Maior diferença de Densidade Eletrónica Residual (eÅ <sup>-3</sup> )	0.353 e -0.190

$$R_1 = \frac{\sum ||F_0| - |F_c||}{\sum |F_0|}$$

$$\omega R_2 = \left[ \frac{\sum \omega (F_0^2 - F_c^2)^2}{\sum \omega (F_0^2)^2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

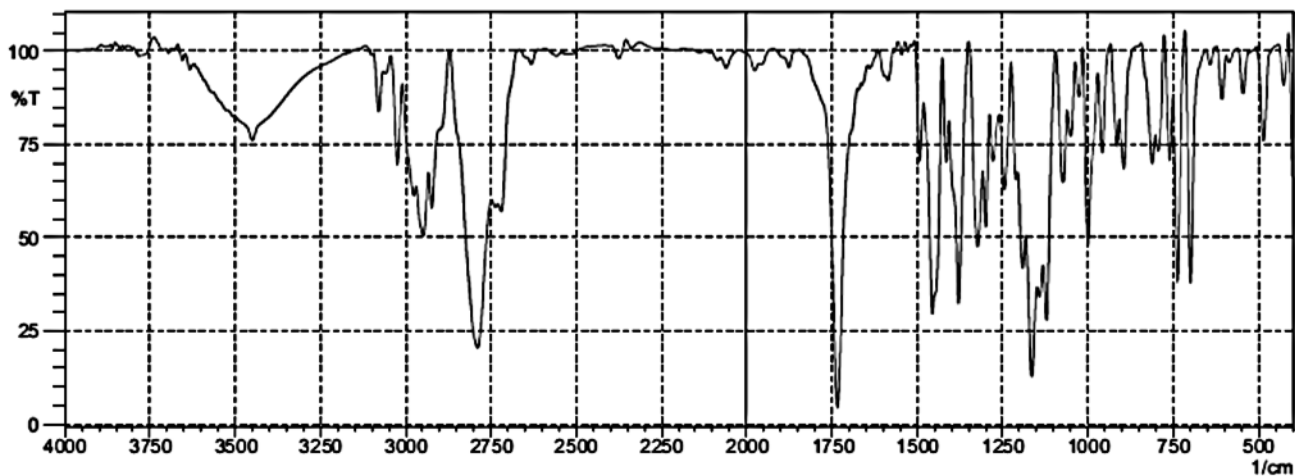


Figura 25 - Espectro de FTIR do composto L6 no estado sólido suportado em KBr.

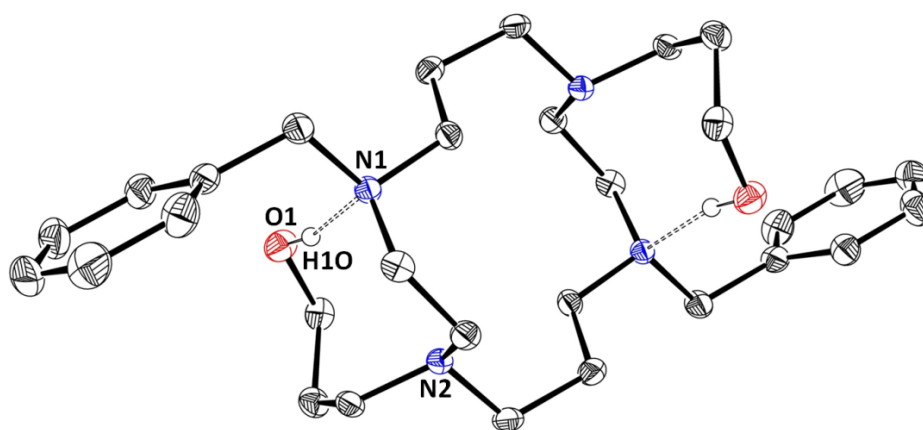


Figura 26 - Representação ORTEP do composto L7 apresentando elipsóides com 35% de probabilidade. Os átomos de hidrogénio foram seletivamente excluídos de modo a clarificar a estrutura. As linhas a tracejado representam pontes de hidrogénio.

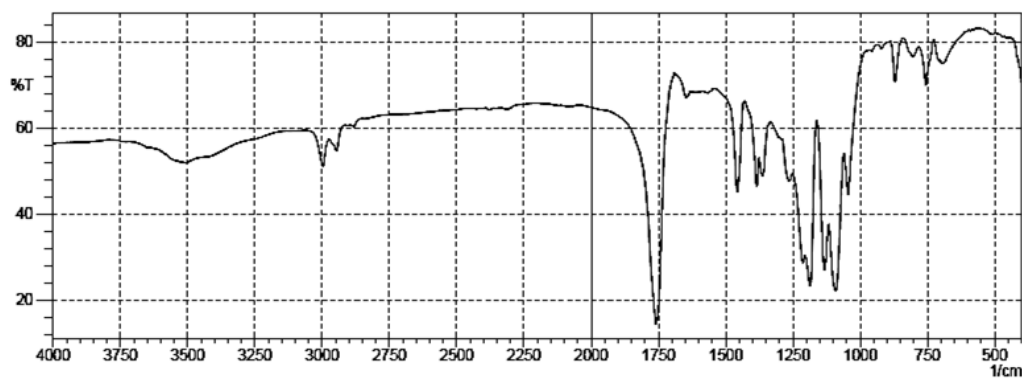


Figura 27 - Espectro de FTIR do composto L9 no estado sólido suportado em KBr.

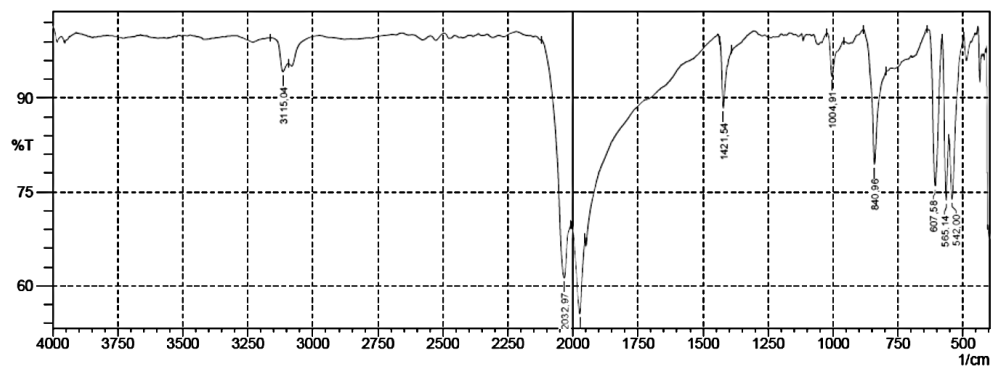


Figura 28 - Espectro de FTIR do complexo C1 no estado sólido suportado em KBr.

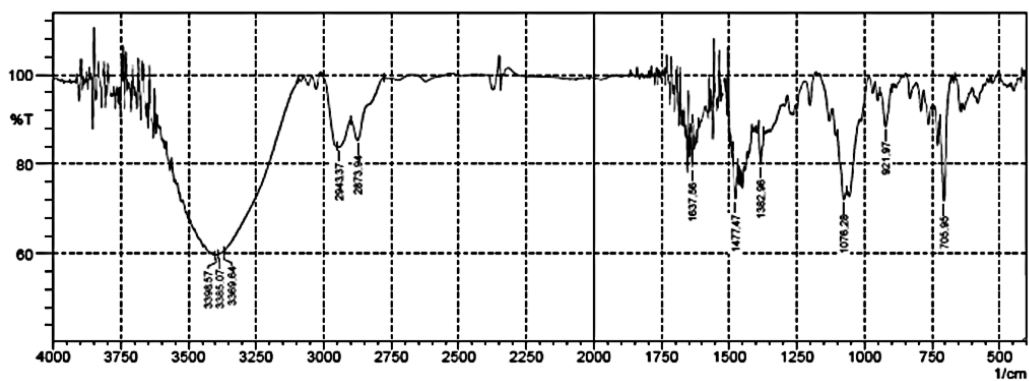
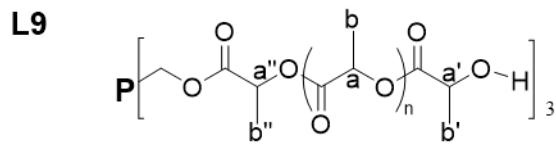
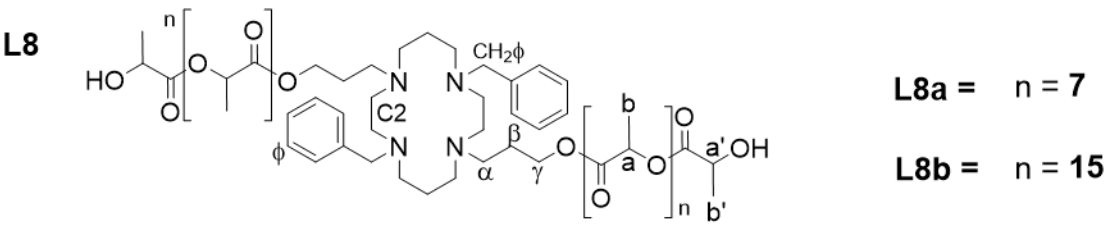
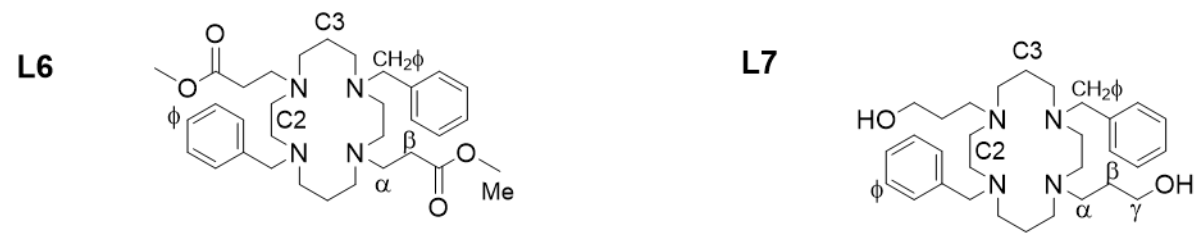
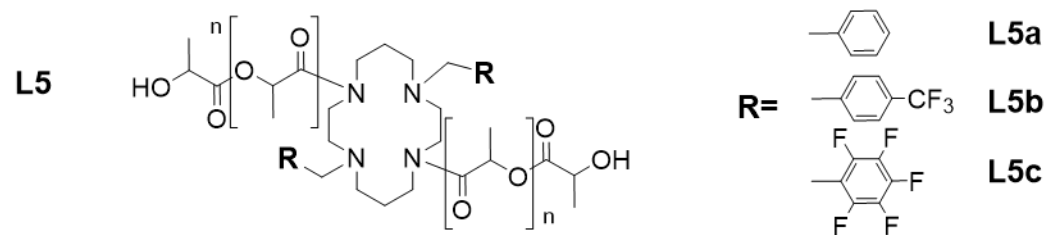
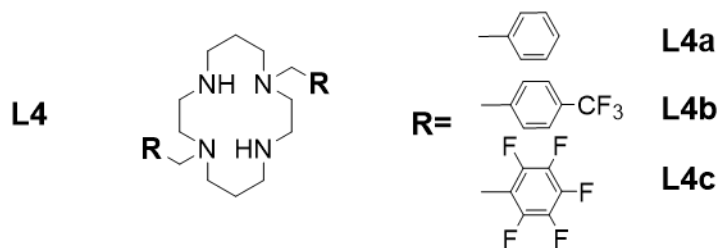
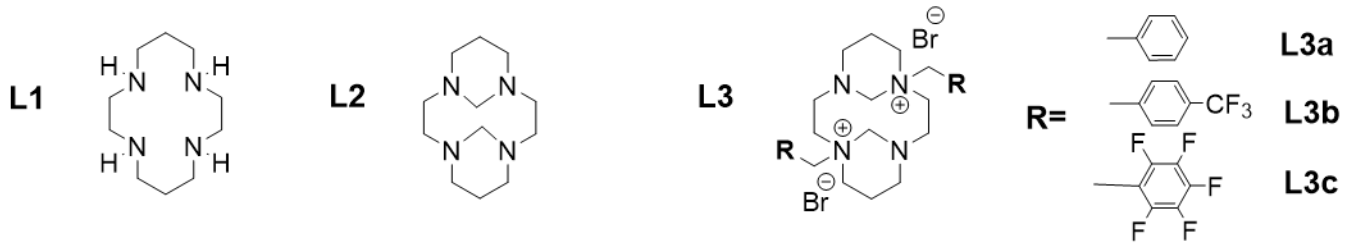


Figura 29 - Espectro de FTIR do composto C3a no estado sólido suportado em KBr.

# Compostos Orgânicos



# Complexos Metálicos

