

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE, NANOENCAPSULAMENTO E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE COMPOSTOS TRIAZENOS.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Augusto Gonzaga Oliveira de Freitas**

**Santa Maria, RS, Brasil**



# **SÍNTESE, NANOENCAPSULAMENTO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS TRIAZENOS**

**Augusto Gonzaga Oliveira de Freitas**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Química na área de concentração em Química Inorgânica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química.**

**Orientador: Cristiano Giacomelli**

**Santa Maria, RS, BRASIL**

**2012**



**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Curso de Pós-Graduação em Química**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação  
de Mestrado**

**SÍNTESE, NANOENCAPSULAMENTO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
COMPOSTOS TRIAZENOS**

elaborada por:  
**Augusto Gonzaga Oliveira de Freitas**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Química**

**Comissão Examinadora:**

---

**Prof. Dr. Cristiano Giacomelli**  
Departamento de Química – UFSM

---

**Prof. Dr. Davi Fernando Back**  
Departamento de Química – UFSM

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Schmidt Giacomelli**  
Departamento de Química – UFSM

Santa Maria, 01 de fevereiro de 2012



Dedico este trabalho aos meus pais Edson e Deolinda, ao meu irmão Geferson e a minha noiva Marluse, os quais caminharam junto a mim no decorrer desta jornada.





*O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.  
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas  
admiráveis.*

*José de Alencar*



## **Agradecimentos**

Primeiramente, acima de tudo, agradeço a Deus pelas maravilhas a cada dia concedidas. Alheio a sua vontade, com certeza não iria a lugar algum;

Tenho muito a agradecer aos meus pais, os quais me apóiam incondicionalmente e me incentivam aos estudos desde os meus cinco anos de idade.

A minha noiva, amada e companheira Marluse pelo apoio, carinho, companheirismo e afeto nesta importante etapa da minha vida;

Aos meus familiares em geral, que de uma forma ou de outra contribuíram para essa conquista;

Ao professor Cristiano Giacomelli pela exímia orientação e pelo amplo compartilhamento de conhecimento;

Ao professor Manfredo Hörner pela co-orientação, suporte e pleno compartilhamento de conhecimentos;

Aos colegas do LPC e a prof<sup>a</sup> Vanessa Schmidt Giacomelli pelas ajudas, trocas de conhecimentos e amizades;

Ao meu amigo Paulo Muraro, pela amizade imensurável, troca de conhecimentos e ultimamente, pelos trabalhos de “office boy”.

Ao meu amigo Giancarlo Belmonte pela tamanha amizade, ajuda e companheirismo no decorrer deste trabalho;

Aos colegas do LMI pela amizade e ajudas, em especial a Rúbia, Juliano e César;

Aos amigos e colegas do NiTriCo, em especial a Aline Locatelli e Gustavo Parginski pela participação e auxílio neste trabalho;

Aos colegas do laboratório da professora Rosmari Hörner, em especial a Claudia Kempfer e Maíza Tizotti pela participação direta nas análises biológicas.

A professora Fátima Squizani pela amizade, companheirismo e troca de conhecimentos;

A Maria de Fátima e Rosângela pela amizade e pelo gentil acolhimento na hora do cafezinho.

Aos professores Davi Back e Cristiane de Bona pelas importantes contribuições no exame de qualificação deste trabalho.



## Resumo

**Título: Síntese, Nanoencapsulamento e Atividade Biológica de compostos Triazenos.**

**Autor: Augusto Gonzaga Oliveira de Freitas**

**Orientador: Prof. Dr. Cristiano Giacomelli**

**Co-Orientador: Manfredo Hörner**

Os compostos contendo unidades triazenídicas constituem uma classe versátil de moléculas para a preparação de novos complexos inorgânicos, cujas aplicações potenciais são amplas e incluem o tratamento de vários tipos de câncer, tal como a leucemia. Quando ligados a centro metálicos de ouro, complexos triazenídicos possuem reconhecida versatilidade na química bioinorgânica e na medicina, e, por isso, vem sendo vastamente estudados atualmente como base para compostos anticancerígenos. Entretanto, à exemplo de outros sistemas, estratégias para redução dos efeitos citotóxicos não específicos oriundos da administração de quimioterápicos diretamente no plasma sanguíneo se fazem necessárias. Neste sentido a utilização de nanopartículas poliméricas permite não somente reduzir os efeitos indesejados, mas também promover a entrega em locais específicos e a liberação controlada. Neste trabalho, um novo sistema de nanopartículas poliméricas contendo compostos triazenídicos, que associou os fatores acima, foi desenvolvido, e sua aplicação para terapia de células leucêmicas foi investigada.

Primeiramente, o pré-ligante 1-(4-acetilfenil)-3-(4-amidofenil)triazeno **(1)** e o complexo [1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazenido]-(trifenilfosfina)ouro(I) **(2)** foram sintetizados e devidamente caracterizados por técnicas espectroscopias e difração de raios-X em monocristal. Em seguida os compostos foram avaliados quanto a seus potenciais antibacterianos e antileucêmicos. Os estudos *in vitro* indicaram potencialidade antibacteriana e antileucêmica ao triazenido complexo, ao passo que o ligante livre não apresentou atividade biológica.

Na seqüência, o pré-ligante **(1)** e o complexo **(2)** foram encapsulados em nanopartículas (15 – 200 nm) poliméricas, com morfologia micelar núcleo-corona, esféricas, formadas por copolímeros em bloco. Para tais compostos, o método de encapsulamento mais eficiente é por pré-filme, o qual permite atingir capacidades de encapsulamento de até  $10\% \frac{m_{\text{composto}}}{m_{\text{polímero}}}$  para sistemas com núcleo hidrofóbico

de poli[metacrilato de 2-(dialquilamino)etila] ou poliestireno. Posteriormente foram desenvolvidos estudos de nanoencapsulamento, cinética e mecanismos de carregamento dos compostos, usando os copolímeros PEO-*b*-PG2MA-*b*-PDPA e PS-*b*-PAA.

## Abstract

**Title: Synthesis, Nanoencapsulation and Biological Activity of Triazenes Compounds.**

**Author: Augusto Gonzaga Oliveira de Freitas**

**Academic Advisor: Prof. Dr. Cristiano Giacomelli**

**Co-Advisor: Prof. Dr. Manfredo Hörner**

Compounds featuring triazenidic units constitute a versatile class of molecules for the preparation of new inorganic complexes with broad applications that include cancer therapy such as leukemia treatment. Gold-triazenide complexes exhibit recognized versatility in bioinorganic chemistry and medicine, which prompted their development as a basis for anticancer compounds. However, strategies to reduce non-specific cytotoxic effects from the administration of chemotherapy directly into the blood plasma are necessary, as for many other systems. In this regard, the use of polymeric nanoparticles allows not only reduction of side-effects, but also to promote site-specific delivery and controlled release. In this work, the aspects mentioned above have been incorporated into a new polymeric nanoparticles system containing triazenide compounds, and its application to leukemia therapy was investigated.

First, the pre-ligand 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetilphenyl)triazene (**1**) and the complex 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetilphenyl)triazenide-(triphenilphosphine)gold(I) (**2**) were synthesized and fully characterized by spectroscopic techniques and X-ray diffraction in crystal. Then the compounds were evaluated for their potential antibacterial and antileukemic activities. *In vitro* studies indicated good antibacterial and antileukemic potential to triazenide complex, while the free ligand showed no biological activity.

Subsequently, the pre-ligand (**1**) and complex (**2**) were encapsulated in polymeric nanoparticles (15-200 nm) with spherical core-shell micelar morphology, formed by block copolymers. For such compounds, the most efficient encapsulation method is by pre-film, with which encapsulation capabilities of up to 10%  $m_{\text{compound}} / m_{\text{polymer}}$  can be achieved for systems featuring poly[methacrylate 2-(dialkylamino) ethyl] or polystyrene cores. Afterwards, nanoencapsulation, loading and release kinetics studies were carried out using PEO-*b*-PG2MA-*b*-PDPA and PS-*b*-PAA copolymers.





## Sumário

Agradecimentos .....	11
Resumo .....	13
Abstract.....	15
Lista de Figuras .....	21
Lista de Tabelas .....	25
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	27
<b>1 Introdução.....</b>	<b>27</b>
1.1 Objetivos .....	30
<b>2 Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>31</b>
2.1 Tipos de Copolímeros .....	31
2.2 Auto-organização e Nanoestruturas .....	32
2.2.1 Nanoestruturas.....	33
2.3 Auto-organização de copolímeros em bloco em meio aquoso .....	34
2.4 Características físico-químicas das nanopartículas .....	37
2.4.1 Potencial Zeta ( $\zeta$ ) .....	40
2.5 Métodos de preparação: Dissolução direta e indireta e Nanoprecipitação ..	42
2.5.1 Dissolução Direta .....	42
2.5.2 Dissolução Indireta .....	43
2.5.3 Nanoprecipitação .....	44
2.6 Copolímeros para aplicações biológicas .....	45
2.7 Mecanismos de liberação de princípios ativos .....	47
2.7.1 Liberação Controlada por Difusão.....	48
2.7.2 Liberação Acionada .....	49
2.7.3 Biodistribuição por Efeito EPR.....	50
2.8 Triazenos: propriedades estruturais, físico-químicas e atividade biológica..	52
2.8.1 Pré-ligantes Triazenos .....	52

2.8.2	Histórico de atividade biológica de compostos Triazenos .....	54
2.8.3	Propriedades fotofísicas dos Triazenos .....	55
2.8.4	Estruturas de pré-ligantes e complexos com ouro .....	56
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>61</b>
3.1	Reagentes e Solventes .....	61
3.2	Espectroscopia de infravermelho .....	61
3.3	Espectroscopia eletrônica de UV-Vis.....	61
3.4	Ponto de fusão.....	61
3.5	Difração de raios-X de monocristal .....	62
3.6	Espalhamento de Luz.....	63
3.6.1	Espalhamento de Luz Dinâmico.....	66
3.7	Procedimento Experimental .....	68
3.7.1	Síntese do pré-ligante 1-(4- amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazeno (1) .....	68
3.7.2	Síntese do composto [1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazenido]- (trifenilfosfina)ouro(I) (2) .....	69
3.7.3	Métodos de preparação e manipulação das micelas.....	69
3.8	Atividade Biológica.....	72
3.8.1	Atividade antibacteriana dos composto 1 e 2.....	72
3.8.2	Análise da citotoxicidade <i>in vitro</i> frente a células leucêmicas dos compostos 1 e 2 .....	73
<b>4</b>	<b>Discussão dos Resultados .....</b>	<b>75</b>
4.1	Discussão da estrutura cristalina do composto 1-(4-acetilfenil)-3-(4- amidofenil)triazeno (1).....	75
4.1.1	Supramolecularidade.....	77
4.2	Análise estrutural do complexo de ouro 1-(4-acetilfenil)-3-(4- amidofenil)triazenido-(trifenilfosfina)ouro(I) (2) .....	79
4.2.1	Supramolecularidade.....	80
4.3	Estudos do desvio médio da planaridade .....	85

4.4	Discussão da espectroscopia de infravermelho dos compostos 1 e 2 .....	86
4.5	Discussão da espectroscopia de UV/Vis dos compostos 1 e 2 .....	90
4.6	Sistemas auto-organizados .....	95
4.6.1	Encapsulamento de triazenos nas nanopartículas .....	98
4.6.2	Evidências de não-interação triazeno-polímero .....	107
4.6.3	Propriedades das Nanopartículas .....	112
4.6.4	Cinética de carregamento do composto 1 .....	115
4.6.5	Cinética de carregamento do composto 2 .....	116
4.6.6	Mecanismos de carregamento .....	118
4.7	Estudos de Atividade Biológica .....	122
4.7.1	Avaliação da Atividade Antibacteriana dos compostos 1 e 2 .....	122
4.7.2	Avaliação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i> dos compostos 1 e 2 .....	123
<b>5</b>	<b>Conclusões e Perspectivas.....</b>	<b>127</b>
<b>6</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>129</b>



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Estrutura genérica de uma nanopartícula polimérica. ....	27
<b>Figura 2.1.</b> Estruturas de auto-organização de copolímeros em bloco e surfactantes. ....	34
<b>Figura 2.2.</b> Micelização de um copolímero anfifílico dibloco levando a formação de micelas esféricas núcleo-casca. <sup>20</sup> .....	35
<b>Figura 2.3.</b> Estudo de atividade antitumoral <i>in vivo</i> , em função do volume de tumores de camundongos expostos ao tratamento com micelas carregadas com PTX. ....	37
<b>Figura 2.4.</b> Distribuições de RH para o copolímero dissolvido em etanol 4.0 mg.mL <sup>-1</sup> (o) e respectivas micelas preparadas por nanoprecipitação 0.25 mg.mL <sup>-1</sup> ( $\Delta$ ). ....	38
<b>Figura 2.5.</b> Perfis de liberação de droga de micelas do copolímero PEO113-b-PG2MA30-b-PDPA50 carregadas de PTX, am pH 5.0 (o) e 7.4 ( $\square$ ). <sup>30</sup> .....	39
<b>Figura 2.6.</b> Disposição de cargas ao redor da nanopartícula (esquerda) e potencial zeta (direita) .....	41
<b>Figura 2.7.</b> Preparação de micelas carregadas com droga, por Dissolução Direta. .	43
<b>Figura 2.8.</b> Representação esquemática do método de Dissolução Indireta. (A) solução orgânica - polímero e droga, solubilizados em um bom solvente para ambos; (B) adição de água sob a solução orgânica; (C) auto-organização em ambiente aquoso. ....	44
<b>Figura 2.9.</b> Representação esquemática do método de preparação de nanopartículas por nanoprecipitação.....	45
<b>Figura 2.10.</b> Mecanismos de liberação de droga: difusão controlada vs. acionado. 48	
<b>Figura 2.11.</b> Entrega de droga mediada por micelas dentro da célula por endocitose e transdução, como proposto por Hubbell. <sup>39</sup> .....	50
<b>Figura 2.12.</b> Representação esquemática do efeito EPR em tecidos tumorais. ....	52
<b>Figura 2.13.</b> Representação estrutural genérica de um triazeno simétrico (a) e assimétrico (b). ....	53
<b>Figura 2.14.</b> Representação estrutural genérica de um triazeno biscatenado. ....	53
<b>Figura 2.15.</b> Representação da estrutura molecular do 1,3-bis(fenil)triazeno. ....	53
<b>Figura 2.16.</b> Representação dos principais modos de coordenação dos triazenos. 54	
<b>Figura 2.17.</b> Representação da estrutura molecular da Dacarbazina®.....	55

<b>Figura 2.18.</b> Representação da estrutura molecular do triazenido complexo tetranuclear. ....	58
<b>Figura 2.19.</b> Representação da estrutura molecular do [1,3-bis(4-nitrofenil)triazenido]-(trifenilfosfina)ouro(I) com elipsóides térmicos em 50% de probabilidade. <sup>73</sup> .....	58
<b>Figura 2.20.</b> Estrutura molecular do único complexo triazenido dimérico com Au(I). Elipsóides térmicos em 50% de probabilidade. ....	59
<b>Figura 3.1.</b> Representação esquemática básica para um experimento de espalhamento de luz, adaptado de Giacomelli. ....	64
<b>Figura 3.2.</b> Relação entre o vetor de espalhamento e partículas em observação. ...	65
<b>Figura 3.3.</b> Representação do método de carregamento de micelas por diálise, adaptado de Vyhalkova et al. <sup>29</sup> .....	71
<b>Figura 4.1.</b> Projeção da estrutura molecular da fórmula mínima do composto 1 com elipsóides térmicos em nível de probabilidade de 50%. Representação dos átomos de H com raio arbitrário. ....	75
<b>Figura 4.2.</b> Projeção parcial da cela unitária de 1 com representação dos elementos de simetria pertencentes a cela monoclinica $P2_1/n$ . Moléculas escuras acima do plano de projeção e claras abaixo do plano. ....	77
<b>Figura 4.3.</b> Projeção da cela unitária do composto 1, destacando as ligações de hidrogênio no plano de rede (103). ....	78
<b>Figura 4.4.</b> Projeção da estrutura molecular do complexo 2 com elipsóides térmicos em nível de probabilidade 50%. Representação dos átomos de H com raio arbitrário. ....	79
<b>Figura 4.5.</b> Pictograma do grupo espacial $P(-1)$ (a) e cela unitária do complexo 2 no plano cristalográfico $ac$ , com elementos de simetria pertencentes a cela triclinica $P(-1)$ em (b). Os hidrogênios das fenilas e fenilenos foram omitidos para melhor visualização. ....	80
<b>Figura 4.6.</b> Projeção do arranjo supramolecular 1-D do complexo 2 no eixo cristalográfico $b$ em função das ligações de hidrogênio clássicas centrossimétricas $N2-H1A \cdots O2'$ e $N2-H1B \cdots O1''$ . [Códigos de simetria ('): $2-x, -y, -z$ ("): $-1+x, -1+y, -1-z$ ]. ....	81
<b>Figura 4.7.</b> Projeção do arranjo supramolecular 2-D do complexo 2 no eixo cristalográfico $a$ em função da cadeia de dímeros centrossimétricos que se	

reproduzem em uma cadeia infinita na direção cristalográfica [1 1 1]. [Código de simetria (""): 2-x, -y, 1-z].	83
<b>Figura 4.8.</b> Projeção do arranjo supramolecular 2-D do complexo 2 na direção cristalográfica [1 1 0] apresentando conteúdo parcial de cela unitária.	84
<b>Figura 4.9.</b> Fragmentos genéricos de 1 e 2, onde X = H para o composto 1 e PPh <sub>3</sub> para o 2.	85
<b>Figura 4.10.</b> Representação dos desvios da planaridade dos composto 1 e 2. Na parte superior o composto 1 e ao centro e a baixo o composto 2.	86
<b>Figura 4.11.</b> Sobreposição comparativa dos espectros vibracionais de IV dos compostos 1 e 2.	89
<b>Figura 4.12.</b> Espectro eletrônico de absorção molecular na região do UV-Vis do pré-ligante 1, em MeOH.	92
<b>Figura 4.13.</b> Espectro eletrônico de absorção molecular na região do UV-Vis do complexo 2, em MeOH.	93
<b>Figura 4.14.</b> Espectros eletrônicos de absorção molecular na região do UV-Vis, com concentração normalizada, dos compostos 1, 2 e o precursor de ouro Au(PPh <sub>3</sub> )Cl.	94
<b>Figura 4.15.</b> Espectros eletrônicos de absorção molecular na região do UV-Vis do composto 2 em EtOH.	95
<b>Figura 4.16.</b> Estrutura molecular dos copolímeros tribloco PEO <sub>113</sub> - <i>b</i> -PG2MA <sub>30</sub> - <i>b</i> -PDPA <sub>50</sub> (a) e dibloco PS <sub>60</sub> - <i>b</i> -PAA <sub>30</sub> (b).	96
<b>Figura 4.17.</b> Curva analítica para o composto 1, em acetona.	99
<b>Figura 4.18.</b> Curva analítica do composto 1 em EtOH.	101
<b>Figura 4.19.</b> Espectros de UV-Vis em meio hidro-alcoólico de uma alíquota (0,2 mL) de micelas (1,67 mg/mL) dos copolímeros PEO <sub>113</sub> - <i>b</i> -PG2MA <sub>30</sub> - <i>b</i> -PDPA <sub>50</sub> (esquerda) e PS <sub>60</sub> - <i>b</i> -PAA <sub>30</sub> (direita) em EtOH (3,0 mL).	103
<b>Figura 4.20.</b> Curva analítica do composto 2, construída em EtOH.	104
<b>Figura 4.21.</b> Espectro UV-Vis em meio hidro-alcoólico de uma alíquota (0,2 mL) de micelas de PEO <sub>113</sub> - <i>b</i> -PG2MA <sub>30</sub> - <i>b</i> -PDPA <sub>50</sub> (1,67 mg/mL) carregadas com o composto 1 (0,90 mg/mL) diluídas em EtOH (3,0 mL), após sucessivas adições de alíquotas (conforme indicado) de uma solução estoque de triazeno puro em EtOH. Nota: nas condições experimentais em que estes espectros foram registrados ocorre a desmicelização parcial do sistema, a qual é induzida pela solubilidade do copolímero tribloco PEO <sub>113</sub> - <i>b</i> -PG2MA <sub>30</sub> - <i>b</i> -PDPA <sub>50</sub> em etanol.	108

<b>Figura 4.22.</b> Espectro de UV-Vis em meio hidro-alcoólico de uma alíquota (0,2 mL) de micelas (1,67 mg/mL) do copolímero dibloco PEO- <i>b</i> -PDPA carregadas com o composto 1 diluídas em EtOH (3,0 mL). .....	109
<b>Figura 4.23.</b> Espectro de UV-Vis em meio hidro-alcoólico de uma alíquota (0,2 mL) de micelas (1,67 mg/mL) do copolímero tribloco PPO- <i>b</i> -PEO- <i>b</i> -PPO carregadas com o composto 1 diluídas em EtOH (3,0 mL). .....	110
<b>Figura 4.24.</b> Espectros de UV-Vis do composto 1 em função da adição de K(CH <sub>3</sub> O) em quantidades que produzem as frações molares indicadas de espécies protonadas. ....	111
<b>Figura 4.25.</b> Espectros de UV-Vis de soluções hidro-alcoólicas contendo o composto 1 encapsulado por nanopartículas constituídas de diferentes copolímeros. ....	112
<b>Figura 4.26.</b> Curva de auto-correlação (acima) e respectiva distribuição dos tempos de relaxação (abaixo) para solução referente ao experimento 11. ....	114
<b>Figura 4.27.</b> Cinética de carregamento do composto 1, em micelas do copolímero tribloco PEO <sub>113</sub> - <i>b</i> -PG2MA <sub>30</sub> - <i>b</i> -PDPA <sub>50</sub> .....	116
<b>Figura 4.28.</b> Cinética de carregamento do composto 2 em micelas do copolímero tribloco PEO <sub>113</sub> - <i>b</i> -PG2MA <sub>30</sub> - <i>b</i> -PDPA <sub>50</sub> .....	117
<b>Figura 4.29.</b> Comparação dos espectros de UV-Vis da solução de micelas filtradas e centrifugadas após o estudo de cinética de carregamento. ....	118
<b>Figura 4.30.</b> Representação esquemática do mecanismo de carregamento de micelas pelo método de pré-filme, adaptado de Vyhnanekova et al. <sup>29</sup> .....	119
<b>Figura 4.31.</b> Espectros de UV-Vis do composto 1 para o estudo de cinética de carregamento.....	120
<b>Figura 4.32.</b> Espectros de UV-Vis das micelas do composto 2, usados no estudo da cinética de carregamento (superior) e destaque na banda do triazeno (inferior). ...	121
<b>Figura 4.33.</b> Curvas de resposta a concentração de células viáveis, para o composto 1.....	124
<b>Figura 4.34.</b> Curvas de resposta a concentração de células viáveis, para o composto 2.....	125



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 2.1.</b> Representação genérica dos tipos de copolímeros. ....	32
<b>Tabela 2.2.</b> Dados referentes à revisão de literatura de pré-ligantes triazenos monocatenados. ....	56
<b>Tabela 2.3.</b> Dados relevantes da estrutura do complexo binuclear de ouro. ....	59
<b>Tabela 3.1.</b> Parâmetros básicos de refinamento dos compostos 1 e 2. ....	63
<b>Tabela 4.1.</b> Condições de reflexão observadas e elementos de simetria correspondentes ao grupo espacial $P2_1/n$ . ....	76
<b>Tabela 4.2.</b> Ligações de hidrogênio com $H \cdots A < r(A) + 2.000$ (Å) e ângulo DHA maior que $110^\circ$ . ....	78
<b>Tabela 4.3.</b> Parâmetros geométricos selecionados do composto 1 (Å, °). ....	79
<b>Tabela 4.4.</b> Comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) relacionados às interações intermoleculares existentes na estrutura cristalina do complexo 2. ....	82
<b>Tabela 4.5.</b> Parâmetros geométricos selecionados do composto 2. ....	82
<b>Tabela 4.6.</b> Valores de rms (Å) para os fragmentos (b) e (d) dos compostos 1 e 2. ....	85
<b>Tabela 4.7.</b> Valores das distâncias interplanares dos compostos 1 e 2. ....	85
<b>Tabela 4.8.</b> Principais bandas dos espectros de IV do pré-ligante 1 e complexo 2. ....	90
<b>Tabela 4.9.</b> Propriedades físico-químicas dos polímeros utilizados neste trabalho. ....	97
<b>Tabela 4.10.</b> Dados referentes aos cálculos de EE e CE dos sistemas nanoparticulados preparados usando-se o polímero PEO <sub>113</sub> - <i>b</i> -PG2MA <sub>30</sub> - <i>b</i> -PDPA <sub>50</sub> e diferentes condições experimentais. ....	100
<b>Tabela 4.11.</b> Dados referentes ao encapsulamento de 1 pelos métodos de diálise e pré-filme. ....	102
<b>Tabela 4.12.</b> Resultados dos estudos de encapsulamento do composto 2, pelo método de pré-filme. ....	105
<b>Tabela 4.13.</b> Valores de diâmetros das micelas carregadas com o composto 1, obtidos por medidas de DLS. ....	115
<b>Tabela 4.14.</b> Valores de CIM de 1 e 2 nas respectivas bactérias estudadas. ....	122
<b>Tabela 4.15.</b> Dados (%) dos ensaios citotóxicos <i>in vitro</i> do composto 1 em 7 diferentes células. ....	124
<b>Tabela 4.16.</b> Dados (%) dos ensaios citotóxicos <i>in vitro</i> do composto 2 em 7 diferentes células. ....	125



## Lista de Siglas e Abreviaturas

ATRP: Atom Transfer Radical Polymerization

Ph: grupamento fenila

C. S. D.: Cambridge Structural Database

$v$ : estiramento axial

$\delta$ : deformação angular

Ac. Acetona

MeOH: metanol

EtOH: etanol

py: piridina

DMSO: dimetilsulfóxido

THF: tetrahidrofurano

DMF: dimetilformamida

I.V.: infravermelho

UV-Vis: Ultravioleta e Visível

$\tau$ : parâmetro tau de geometria molecular (cristalografia); tempo de relaxação (polímeros)

Goof: goodness-of-fit (parâmetro de correlação)

$V$ : volume da cela unitária

$Z$ : número de fórmulas elementares por cela unitária

$\rho_{\text{calc}}$ : densidade calculada

$\mu$ : coeficiente de absorção

$T_{\text{min}}$ : transmissão mínima

$T_{\text{max}}$ : transmissão máxima

$R_{\text{int}}$ ,  $R_1$  e  $wR_2$ : Índices de discordância

$I$ : intensidade das reflexões coletadas

**1**: 1-(4-acetilfenil)-3-(4-amidofenil)-triazeno

**2**: 1-(4-acetilfenil)-3-(4-amidofenil)-triazeno

Db: copolímero dibloco PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub>

Tb: copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>

2-D; 3-D: Bi e Tridimensional, respectivamente

SLC: sistema de liberação controlada

GPC: Cromatografia de permeação em gel

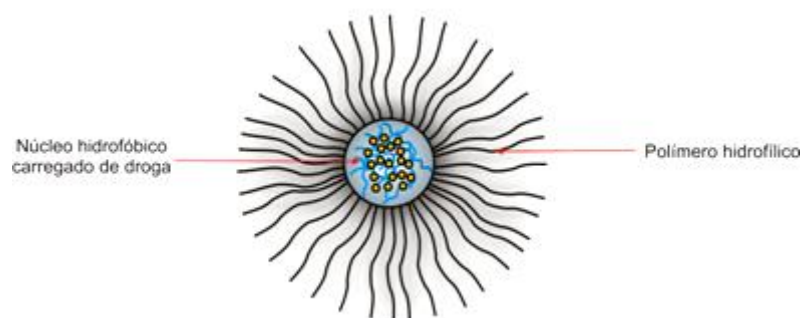
DRX: Difração de raios-X  
 $\chi$ : parâmetro de interação Flory-Huggins  
 $\phi$ : fração de volume  
 $\eta_0$ : índice de refração do solvente  
K1: vetor de onda da radiação incidente  
Ke: vetor de onda da radiação espalhada  
 $K_B$ : Constante de Boltzmann  
 $q$ : vetor espalhamento  
 $\theta$ : ângulo de espalhamento  
 $\Gamma$ : constante de correlação ou de relaxação  
CAC: concentração de água crítica  
 $D$ : coeficiente de difusão  
DLS: espalhamento de luz dinâmico  
SLS: espalhamento de luz estático  
QLS: espalhamento de luz quase elástico  
EE: Eficiência de encapsulação  
CE: Capacidade de encapsulação  
 $M_n$ : Massa molecular média numérica  
 $M_w$ : Massa molecular média por peso  
 $M_w / M_n$ : Dispersidade  
 $N_{aag}$ : Número de agregação  
PAA: Poli(ácido acrílico)  
PCL: Poli(caprolactona)  
PDPA: Poly[2-(diisopropilamino)etil metacrilato]  
PEO: Poli(óxido de etileno)  
PG2MA: Poli(glicerol monometacrilato)  
PPO: Poli(óxido de propileno)  
PS: Poli(estireno)  
PTX: Paclitaxel  
 $R_H$ : Raio hidrodinâmico  
TCMTB : Tiocianometiltiobenzotiazol  
u. a.: unidades arbitrárias  
Tg: Temperatura de transição vítrea

## 1 Introdução

Colóides têm sido amplamente utilizados desde os primórdios das civilizações sob diversas formas, incluindo géis de produtos naturais em alimentos, dispersões de argilas para fabricação de utensílios de cerâmica e dispersões para decoração das paredes de cavernas, entre outras. Atualmente destacam-se aplicações destes sistemas no desenvolvimento de produtos com grande relevância sócio-econômica, como por exemplo, cosméticos, alimentos,<sup>1</sup> revestimentos, tintas, aglutinantes,<sup>2</sup> nanoreatores<sup>3</sup> e medicamentos, remoção de poluentes, catálise, etc.<sup>4</sup> Sistemas coloidais ocupam uma posição de destaque na ciência moderna devido, em particular, às habilidades de síntese de materiais nanoparticulados desenvolvidas recentemente.

A classificação e constituição de sistemas coloidais é ampla e contempla compostos orgânicos, inorgânicos e híbridos. Uma classe importante, e de interesse imediato neste trabalho, são as nanopartículas resultantes da dispersão de macromoléculas anfifílicas em um solvente seletivo.<sup>5</sup> Conforme se constata em processos de auto-organização de copolímeros em bloco em solvente termodinamicamente bom para um bloco e mau para outro. Esta habilidade é, atualmente, bem documentada na literatura<sup>6,7</sup> e constitui um tópico de expressivo interesse na pesquisa contemporânea de polímeros.

Micelas de copolímeros em bloco têm, por exemplo, a capacidade de encapsular/solubilizar substâncias hidrofóbicas<sup>7</sup> que, de outro modo, seriam insolúveis em meio aquoso. Portanto, nos nanocarreadores micelares (Figura 1.1) o núcleo (hidrofóbico) serve como um reservatório para acomodar fármacos pouco solúveis via interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou mesmo conjugação química. A corona (hidrofílica) proporciona uma interface protetora entre o núcleo e o meio externo.



**Figura 1.1.** Estrutura genérica de uma nanopartícula polimérica.

Utilizando esse enfoque, novos sistemas de transporte, solubilização e liberação de drogas estão sendo desenvolvidos com ênfase para partículas estimuláveis mediante estímulos externos, tais como pH<sup>8</sup> e temperatura<sup>9</sup>. Para tais carreadores, a biocompatibilidade e biodegradabilidade dos blocos de construção poliméricos são de essencial importância.<sup>10</sup> Além da liberação controlada e/ou prolongada das substâncias nelas encapsuladas, as vantagens da utilização de nanopartículas incluem ainda a redução de efeitos adversos associados à substância, a proteção de compostos da inativação antes de atingirem o local de ação, o aumento da penetração intracelular e o aumento da atividade farmacológica.<sup>11</sup>

Compostos triazenos ou diazoaminas, compreendem uma classe de substâncias que apresentam uma seqüência de três átomos de nitrogênio conectados entre si em um arranjo acíclico, ou seja, R-N=N-NH-R,<sup>12</sup> que atuam geralmente como bases de Lewis. Dentre as várias aplicações, o que torna os triazenos uma classe de compostos muito versáteis, destaca-se a sua atividade biológica. De fato, vários fármacos com reconhecida atividade biológica são comercializados, a exemplo da Dacarbazina<sup>®</sup>, 5-(3,3-dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida, um agente antineoplásico de referência para o tratamento de melanoma metastático, Temozolamida<sup>®</sup>, 3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazol[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carboxamida, um antineoplásico derivado da Dacarbazina<sup>®</sup>, que é empregado no tratamento de tumores cerebrais e o Berenil<sup>®</sup>, 4,4'-(1-triazeno-1,3-diil)dibenzamina-bis(*N*-acetilglicinato), que é um agente antiprotozoário e antitripanossômico, também empregado na quimioterapia veterinária.

As duas formas geralmente empregadas na síntese de triazenos são o acoplamento de um sal de diazônio aromático à uma amina<sup>13</sup> ou a adição de reagentes organometálicos (RMgX, RLi, etc.) à alquil azidas.<sup>14</sup> Portanto, a versatilidade na síntese destes compostos está relacionada à possibilidade de troca dos substituintes nos anéis aromáticos das aminas precursoras, o que permite explorar mudanças químicas, físico-químicas e estruturais dos triazenos.

Alguns fatores podem, entretanto, fazer com que novos triazenos sintéticos não cheguem a percorrer toda a marcha de testes até se tornarem um fármaco, sendo a sua aplicação descartada ainda em estágios iniciais. Em outros casos tornam-se menos interessantes em comparação com drogas já consolidadas devido

aos efeitos colaterais oriundos da sua administração. Isto decorre, por exemplo, da oxidação metabólica que diminui a concentração da droga ativa no plasma e, por conseguinte, a sua atividade, da geração de fragmentos tóxicos e não ativos<sup>15</sup>, da foto-decomposição sob luz ultravioleta durante a manipulação,<sup>16</sup> e, principalmente, da falta de seletividade no modo de ação.

Em contraponto, a arquitetura de sistemas de nanopartículas poliméricas permite reduzir os problemas supracitados através da proteção e vetorização seletiva dos fármacos anticancerígenos e antibióticos, principalmente em casos de administração parenteral, aumentando, conseqüentemente, o índice terapêutico.

No que diz respeito a química do ouro, relatos apontam que este metal, em uma variedade de formas, tem sido utilizado na medicina ao longo da história da civilização. No século XX complexos de ouro foram introduzidos para o tratamento de artrite reumatóide, culminando com a introdução do fármaco oral Auranoquina em 1985.<sup>17</sup> Impulsionados por vários relatos na literatura sobre potencialidades apresentadas por compostos a base de ouro, tais como, anti-HIV, anti-tumoral, anti-malárico, anti-microbiano e anti-cancerígeno, estudos são desenvolvidos buscando a compreensão dos mecanismos de ação dessas drogas, bem como a investigação das potencialidades de compostos inéditos.<sup>18</sup>

Neste estudo a síntese e caracterização estrutural de um pré-ligante triazeno e do respectivo complexo com Au(I), avaliação da atividade biológica e o desenvolvimento de sistemas coloidais nanoparticulados carregados com os compostos triazenos sintetizados foram investigados.

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos principais, além desta seção introdutória e objetivos, revisão bibliográfica, parte experimental, resultados e discussão, conclusão e referências bibliográficas. No capítulo II serão apresentados alguns conceitos básicos e uma revisão detalhada da literatura sobre tipos de copolímeros, capacidade e estruturas de auto-organização, encapsulação de fármacos, aplicações biológicas, síntese, caracterização e propriedades biológicas de triazenos e triazenidos complexos. O capítulo III descreve os procedimentos experimentais adotados para o desenvolvimento deste trabalho. O capítulo VI reúne os resultados obtidos neste estudo, bem como, a discussão dos mesmos. Este último será dividido em duas partes principais que dizem respeito aos estudos de síntese e caracterização estrutural dos compostos triazenos, na primeira parte, e, na

parte final, o desenvolvimento dos nanocarreadores, avaliações da capacidade e eficiência de encapsulação, bem como, os estudos de atividade biológica, envolvendo ensaios de atividade antimicrobiana e antileucêmica.

## 1.1 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de sistemas coloidais contendo trizenos e complexos trizenídicos para controle da atividade biológica desta classe de compostos.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

I – Sintetizar um novo ligante trizeno e usá-lo para produzir um novo complexo trizenídico de Au(I);

II – Determinar a estrutura e propriedades fotofísicas dos compostos produzidos;

III – Definir os polímeros em bloco adequados para encapsulação dos referidos compostos, com base em avaliações da relação entre a estrutura química do polímero e a capacidade de encapsulação;

IV – Investigar os parâmetros que governam o processo de encapsulação, solubilização e transporte, especificamente: efeito das concentrações, solventes e métodos de preparo;

V – Estudo comparativo da atividade biológica (atividade antibacteriana e citotóxica frente a células leucêmicas) dos compostos livres (ligante e complexo) e dos respectivos sistemas coloidais.



## 2 Revisão Bibliográfica

Nas seções que seguem apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre os principais tópicos deste trabalho, tais como: tipos de copolímeros, capacidade de auto-organização, estruturas poliméricas (micelas, vesículas, cilindros etc.), encapsulação, copolímeros para aplicações biológicas, química supramolecular, ligações de hidrogênio, propriedades químicas e atividade biológica de compostos triazenos, métodos de síntese, estruturas e propriedades já investigadas, propriedades estruturais de complexos triazenídicos com ouro, e para finalizar, serão apresentados as principais propriedades fotofísicas (espectros de UV-Vis e principais bandas de IR) descritos na literatura.

### 2.1 Tipos de Copolímeros

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)<sup>19</sup> um copolímero é um derivado de duas ou mais espécies de monômeros. Copolímeros obtidos através de polimerização de duas espécies monoméricas são por vezes denominados bipolímeros, aqueles obtidos de três espécies monoméricas terpolímeros, etc. Os copolímeros são classificados como: alternados, periódicos, estatísticos, enxertados, aleatórios e em bloco (Tabela 2.1).

Um copolímero constituído de macromoléculas com duas espécies de unidades de monômeros em seqüência alternada é conhecido como *copolímero alternado*. Da mesma forma, um copolímero constituído de macromoléculas com mais de duas espécies de unidades de monômeros em seqüência regular é conhecido como *copolímero periódico*. Às vezes, porém, a distribuição seqüencial das unidades de monômeros obedecem as leis estatísticas conhecidas, este é denominado *copolímero estatístico*. Um exemplo de um copolímero estatístico é um constituído de macromoléculas na qual a distribuição seqüencial de unidades monoméricas segue as estatísticas de Markovian. Por sua vez, um copolímero constituído de macromoléculas na qual a probabilidade de achar uma determinada unidade de monômero em qualquer local na cadeia é independente da natureza da unidade adjacente, trata-se de um *copolímero aleatório*. Neste, a distribuição seqüencial de unidades de monômeros segue a estatística de Bernoullian.<sup>19</sup>

Os *copolímero enxertado* caracterizam-se pela presença de blocos adjacentes ligados à cadeia principal, formando uma cadeia lateral, que podem ter composição e topologia diferentes.

Por fim, os *copolímeros em bloco*, compreendem uma macromolécula formada por dois polímeros distintos unidos por uma ligação química primária. Os segmentos são constitucionalmente diferentes, ou seja, cada um deles blocos inclui unidades constitucionais derivadas de monômeros com características diferentes, ou da mesma espécie mas com composição ou distribuição de seqüências de unidades diferentes. Os copolímeros em bloco são classificados de acordo com o número de blocos que apresentam e como os mesmo estão organizados. Por exemplo, copolímeros com dois blocos são chamados de diblocos, com três, triblocos e com mais de três, multiblocos.<sup>19</sup> Em geral, a importância de copolímeros em bloco se justifica em função de sua ampla gama de propriedades, provenientes da união química de dois segmentos que, por definição, apresentam um determinado grau de incompatibilidade. Essas propriedades (exemplo: auto-organização) são obtidas a partir da combinação de diferentes polímeros em seqüência alternada. A variação no número de blocos, no grau de polimerização, na natureza química e na arquitetura dos blocos, torna possível a construção de novos copolímeros com características desejáveis a uma determinada aplicação.<sup>19</sup>

**Tabela 2.1.** Representação genérica dos tipos de copolímeros.

<i>Copolímero alternado</i>	A-B-A-B-A-B-A-B
<i>Copolímero periódico</i>	A-B-A-B-B-A-A-A-A-B-B-B
<i>Copolímero estatístico/aleatório</i>	A-B-B-B-A-B-A-B-A-A
<i>Copolímero enxertado</i>	A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A      B-B-B  B-B-B
<i>Copolímero em bloco</i>	A-A-A-B-B-B

## 2.2 Auto-organização e Nanoestruturas

Em um copolímero em bloco de arquitetura simples, um dibloco AB, a seqüência de  $N_A$  monômeros são ligados covalentemente a uma seqüência de  $N_B$

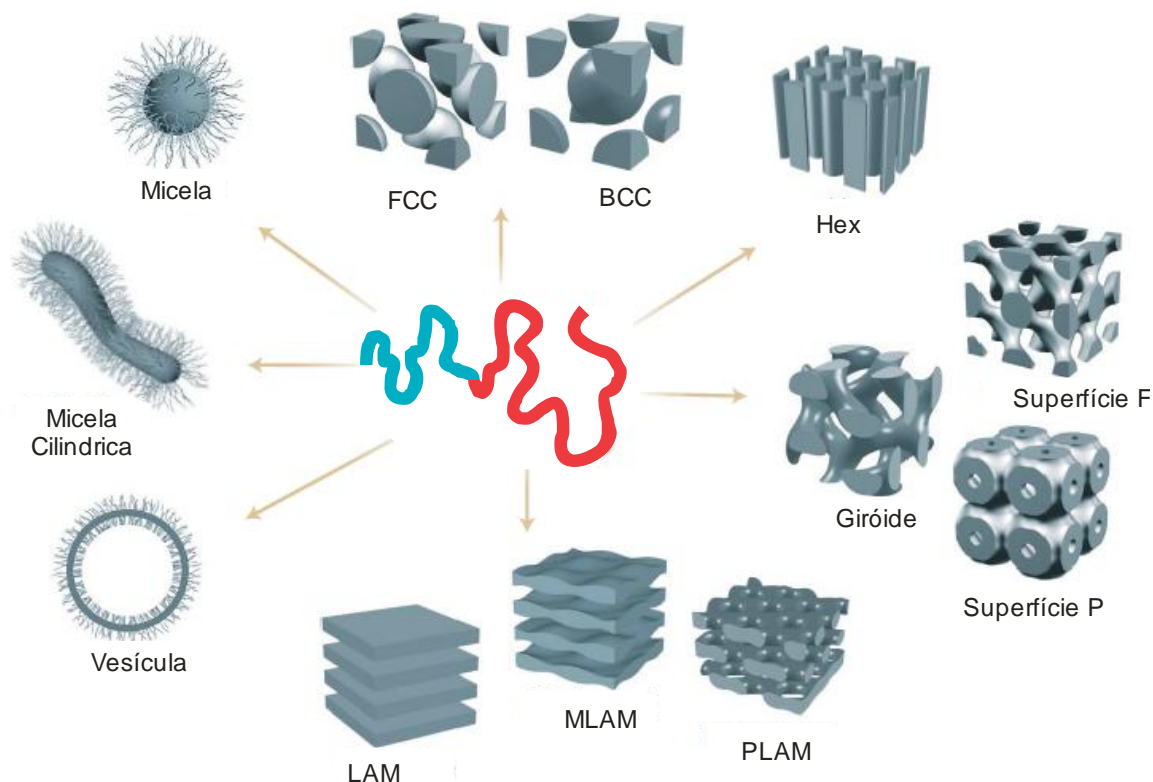
monômeros, com uma composição global  $f = N_A/N$ , onde  $N = N_A + N_B$ . Devido a uma entropia de mistura caracteristicamente pequena ( $\sim 1/N$ ) e uma entalpia de mistura positivo ( $\sim \chi_{AB}$ , o parâmetro de interação Flory-Huggins) a maioria dos pares de polímeros AB são imiscíveis e conseqüentemente termodinamicamente instáveis.<sup>20</sup>

Em contraponto, copolímeros em bloco oferecem uma rota atrativa para superar este problema, em que a ligação covalente entre os blocos suprime a separação de fases. Ao invés disso, eles podem sofrer separação de microfases no estado sólido, ou o processo de automontagem em solução. Como resultado, cada bloco irá residir na sua própria fase, levando a formação de domínios ordenados, como um resultado das forças atrativas de curto alcance e repulsivas de longo alcance, co-existentes.<sup>21,22</sup>

### 2.2.1 Nanoestruturas.

As interações não covalentes fracas das unidades de monômeros ao longo de uma cadeia polimérica tendem a unir-se cooperativamente amplificando os efeitos supramoleculares. Esta tendência é amplamente explorada no caso de copolímeros em bloco, os quais freqüentemente formam estruturas com microfases separadas como micelas e vesículas, com dimensões na escala de nanômetros.<sup>23</sup>

O comportamento de fases dos copolímeros dibloco é impulsionado pela imiscibilidade dos dois blocos. Em conseqüência disso, uma variedade de arquiteturas podem ser produzidas através da manipulação da relação entre volumes dos dois blocos e do grau de imiscibilidade entre eles. As estruturas produzidas desta forma consistem de esferas, cilindros e lamelas, em solução, o que, no estado sólido, pode formar arranjos 3D cúbicos, hexagonais e em camadas, respectivamente. Na Figura 2.1 estão representadas esquematicamente, de forma global, as estruturas mais comuns formadas por copolímeros dibloco, conforme apresentado por Förster e Platenberg<sup>24</sup> são elas micelas esféricas e cilíndricas, vesículas, esferas cheias (FCC, BCC), cilindros cheios hexagonais (HEX), várias superfícies mínimas (giróide, superfície F, superfície P), Lamelas simples (LAM), Lamelas moduladas e perfuradas (MLAM, PLAM).

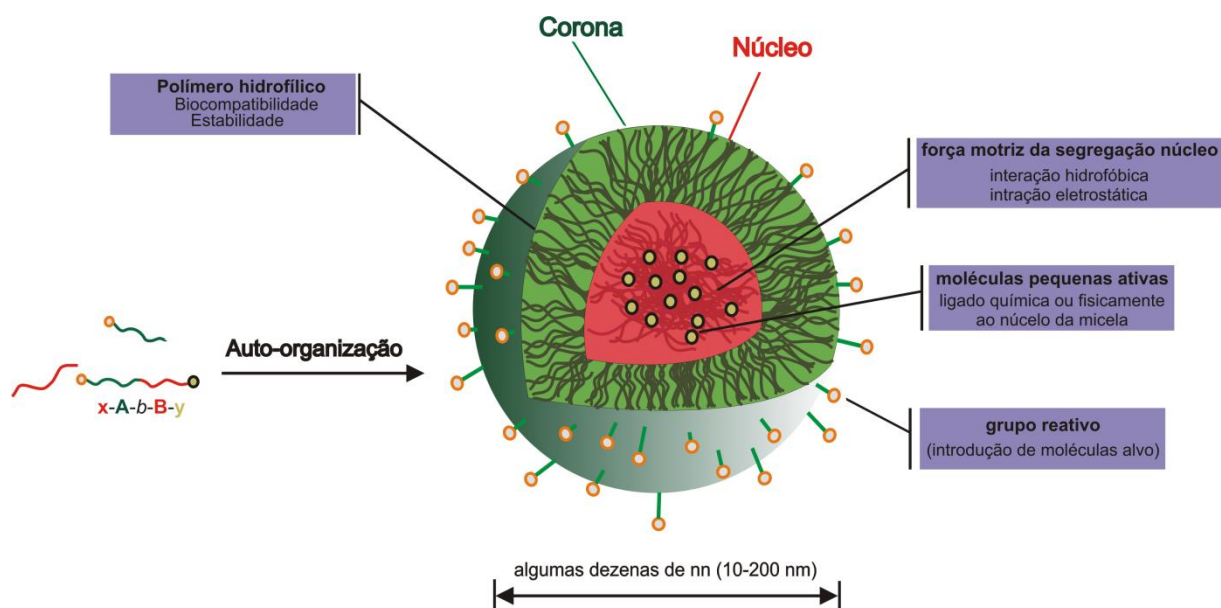


**Figura 2.1.** Estruturas de auto-organização de copolímeros em bloco e surfactantes.

### 2.3 Auto-organização de copolímeros em bloco em meio aquoso

A auto-organização de copolímeros em bloco não ocorre apenas em materiais sólidos puros, mas também em solução diluída, especialmente quando o solvente é um bom solvente para apenas um dos blocos. Esta propriedade permite a criação de objetos discretos como esferas ocas e cilindros.<sup>23</sup>

O processo de micelização leva a formação de estruturas ordenadas em que o contato entre o bloco insolúvel e o solvente é minimizado. O bloco solúvel é então orientado para a fase contínua do solvente e torna-se a “corona” da micela formada, enquanto que a parte insolúvel será protegida do solvente no “núcleo” da estrutura e, portanto, protegida do ambiente externo.<sup>20</sup> Na Figura 2.2 está apresentada a estrutura de uma micela formada pela auto-associação de copolímeros em bloco e aspectos importantes de entrega de droga mediada por micelas.<sup>20</sup>



**Figura 2.2.** Micelização de um copolímero anfifílico dibloco levando a formação de micelas esféricas núcleo-casca.<sup>20</sup>

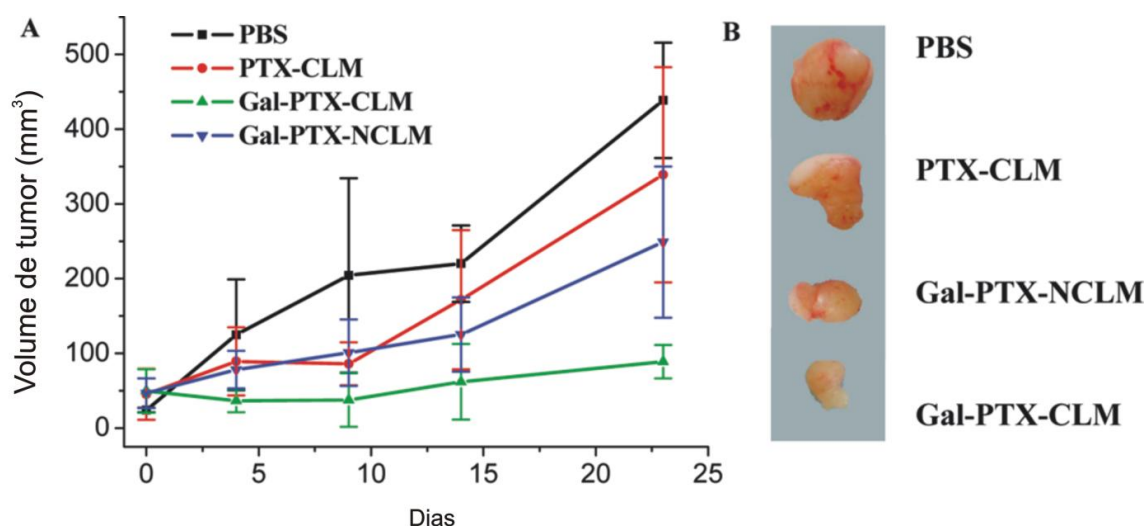
Duas forças opostas são as principais responsáveis por essa separação das cadeias de polímero. A primeira força é uma atração entre os blocos insolúveis, que induz a agregação. A segunda força é uma repulsão entre os blocos solúveis, levando a uma limitação no tamanho dos agregados.<sup>25</sup> O balanço entre essas duas forças é geralmente definido pelo alongamento das cadeias do polímero no núcleo, a tensão superficial na interface núcleo-corona, as interações entre as cadeias que formam a corona micelar, a força de interação entre os blocos (representado pelo parâmetro de interação Flory-Huggins,  $\chi$ ) e a fração de volume ( $\phi$ ) de cada segmento constituinte.<sup>26</sup>

Estes parâmetros físico-químicos podem ser finamente ajustados através de engenharia macromolecular e estratégias de manipulação inteligentes. Dependendo do equilíbrio entre as forças supracitadas durante e depois do processo de micelização de copolímeros em bloco, micelas com tamanhos variados, morfologia e organização estrutural podem ser obtidas.<sup>20</sup> Estruturas de esferas (incluindo estrelas, *crew-cut* e micelas compostas grandes), objetos elípticos leves, cilindros e cilindros micrométricos, vesículas, vesículas compostas grandes, discos, camadas bicontínuas e tubos já foram observados em auto-montagem macromolecular. Dentre essas morfologias as três mais comuns são micelas núcleo-corona, cilindros e vesículas.<sup>27</sup>

Um trabalho de alta relevância foi publicado recentemente por Yang et al.<sup>28</sup> Neste estudo os autores reportaram o encapsulamento do anticancerígeno PTX em micelas de copolímero tribloco foto-reticulável poli(etileno glicol)-b-poli(acrilóil carbonato)-b-poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PEG-PAC-PCL) e o copolímero dibloco com galactose conjugada PEG-PCL (Gal-PEG-PCL) seguido de irradiação UV-Vis para reticular o bloco PAC formador da camada intermediária das micelas. As micelas foram avaliadas quanto a eficiência como nanocarreadores do antitumoral PTX *in vitro* e *in vivo*.

A eficácia antitumoral das micelas carregadas de PTX foi avaliada usando camundongos com carcinoma hepatocelular humano (SMMC – 7721) implantado. Os camundongos foram tratados conforme protocolos aprovados pela Soochow University Laboratory Animal Center. Os camundongos, de 18 a 22 g, tiveram o 0,2 mL de suspensão celular contendo  $5 \times 10^6$  células de SMMC-7721, injetado por via subcutânea na axila do membro posterior direito. Os tratamentos foram iniciados após 2 semanas, quando o tumor atingiu um volume de 27-50 mm<sup>3</sup>, e este dia foi designado como dia 0. Para isso, os camundongos foram pesados e divididos aleatoriamente em 4 grupos: i) PBS (controle em branco), ii) micelas reticuladas (CLM) carregadas com PTX (PTX-CLM), iii) micelas não reticuladas (NCLM) decoradas com galactose e carregadas com PTX (Gal-PTX-NCLM) e iv) micelas reticuladas decoradas com galactose e carregadas com PTX (Gal-PTX-CLM).

Uma única dose de micelas carregadas com PTX em 0,2 mL de PBS ou 0,2 mL somente de PBS foram administrados nos dias 0 e 7. O efeito foi avaliado através da medida do tamanho do tumor. No dia 23 todos os ratos foram sacrificados por deslocamento da vértebra cervical e os tumores foram separados e pesados. Na Figura 2.3 está ilustrado graficamente o comportamento dos tumores (tratados com diferentes micelas e o branco em PBS) em função do tempo. Em (A) estão representadas as mudanças do volume do tumor nos camundongos, após uma única injeção das micelas carregadas com PTX nos dias 0 e 7 e em (B) as fotografias de tumores dos camundongos sacrificados no dia 23.



**Figura 2.3.** Estudo de atividade antitumoral *in vivo*, em função do volume de tumores de camundongos expostos ao tratamento com micelas carregadas com PTX.

Como se pode observar claramente, as micelas decoradas com galactose, tanto reticuladas como não, mostraram-se mais efetivas que as micelas não decoradas, suportando o fato de que o PTX é entregue nas células através de um mecanismo mediado por receptores. Estes resultados mostraram ainda que a reticulação interfacial pode melhorar em grande parte a estabilidade da micela e pode efetivamente impedir uma liberação prematura da droga após a injeção intravenosa. Já a eficácia antitumoral inferior das micelas não decoradas (PTX-CLM) se deu provavelmente devido à sua má aceitação pelas células SMMC-7721, demonstrando com isso, a importância da introdução de um ligante direcionador nas superfícies das micelas.

## 2.4 Características físico-químicas das nanopartículas

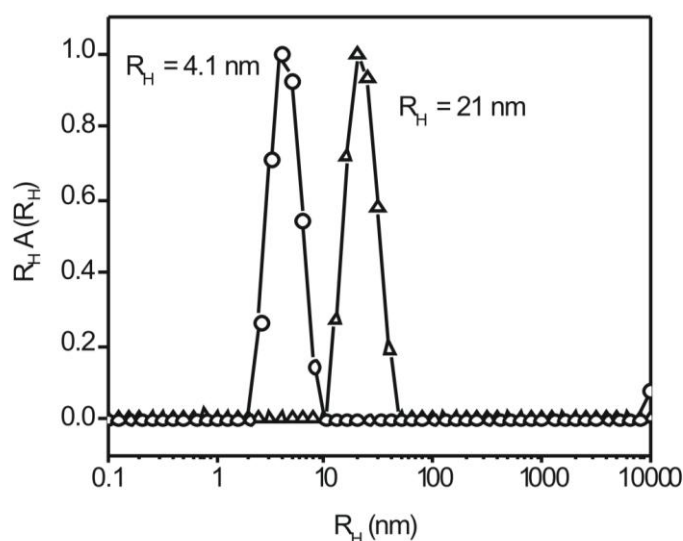
Na arquitetura de sistemas poliméricos voltados a aplicações medicinais o conhecimento e controle das propriedades físico-químicas das partículas são de fundamental importância. Dentre as propriedades físico-químicas mais importantes em um nanocarreador polimérico destacam-se o tamanho, dispersão e a carga.

Estas informações envolvendo ambos os copolímeros usados neste trabalho já existem relatadas na literatura,<sup>29,30</sup> possibilitando com isso a comparação direta com os resultados aqui descritos.

Em um trabalho recente Giacomelli et al.<sup>30</sup> relataram a preparação, carregamento e caracterização de nanopartículas do copolímero tribloco anfifílico

PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>. As micelas com e sem droga no núcleo foram preparadas através de nanoprecipitação e suas caracterizações foram apresentadas. O carregamento das micelas envolveu a droga hidrofóbica anticancerígena paclitaxel (PTX). Medidas de DLS foram realizadas para explorar o raio hidrodinâmico das micelas. A intensidade medida das funções de correlação  $g_2(t)$  foram analisadas usando o algoritmo REPES, resultando nas distribuições dos tempos de relaxação  $A(\tau)$ . O  $R_H$  foi calculado a partir da distribuição resultante dos tempos de relaxação usando a relação de Stokes-Einstein.

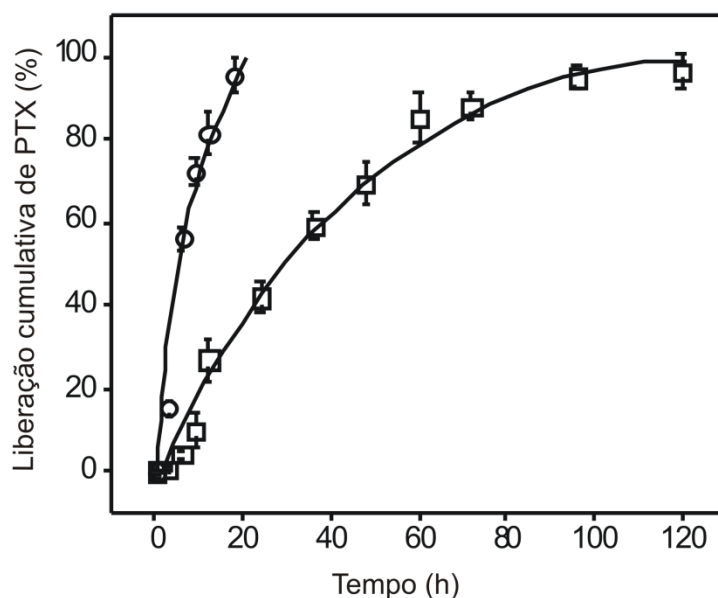
Os valores de  $R_H$ , conforme Figura 2.4, foram obtidos para cadeias poliméricas dissolvidas em etanol, e para micelas preparadas por nanoprecipitação usando um tampão fosfato PBS foram de 4.1 e 21 nm respectivamente. O tamanho médio das micelas ( $2R_H = 42$  nm) é bastante apropriado para aplicações medicinais, uma vez que, micelas deste tamanho não são detectadas como corpos estranhos pelo sistema fagocitário e conseqüente excreção renal, garantindo um tempo de circulação no sangue prolongado. Esse tamanho também propicia a aplicação como nanocarreadores baseado no efeito EPR já que, geralmente, está abaixo do tamanho de corte dos poros de tumores típicos. A dispersidade das micelas poliméricas, calculada através da análise cumulante é muito baixa:  $\mu_2/\Gamma^2 = 0.108 \pm 0.009$ .



**Figura 2.4.** Distribuições de  $R_H$  para o copolímero dissolvido em etanol  $4.0 \text{ mg.mL}^{-1}$  (o) e respectivas micelas preparadas por nanoprecipitação  $0.25 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $\Delta$ ).



A presença do segmento PDPA passivo de protonação do grupo amina terciário é um dos principais fatores que levaram à escolha deste para este trabalho, pois, como já mencionado, esta propriedade é de relevante importância para sistemas carreadores de drogas, pois responde a variações de pH. No mesmo trabalho<sup>30</sup> foi realizado o estudo do perfil de liberação da droga PTX variando-se o pH, conforme Figura 2.5. Dois valores de pH foram explorados, ou seja, 5.0 (para simular condições ácidas citosólicas ou endossomais em células tumorais) e 7.4 (para simular as condições durante o transporte no sangue e nos tecidos normais saudáveis), e plotado gráfico do pH versus percentual cumulativo de PTX liberado.



**Figura 2.5.** Perfis de liberação de droga de micelas do copolímero PEO113-b-PG2MA30-b-PDPA50 carregadas de PTX, am pH 5.0 (o) e 7.4 (□).<sup>30</sup>

Estes resultados sugerem que em  $\text{pH} < \text{pKa}$  (PDPA) as micelas de copolímero em bloco são ativadas e, conseqüentemente, são fisicamente desestabilizadas (ativação-dissociação ativado por pH), acelerando a liberação da droga anticâncer.

Quanto às propriedades físico-químicas das micelas formadas pelo copolímero em bloco anfifílico PS-*b*-PAA, amplas informações são obtidas no trabalho publicado por Vyhnanekova et al.,<sup>29</sup> no qual o biocida

tiocianometiltiobenzotiazol (TCMTB) foi encapsulado através do método de filme. A cinética de carregamento e perfis de liberação foram investigados, assim como o tamanho e morfologia das partículas.

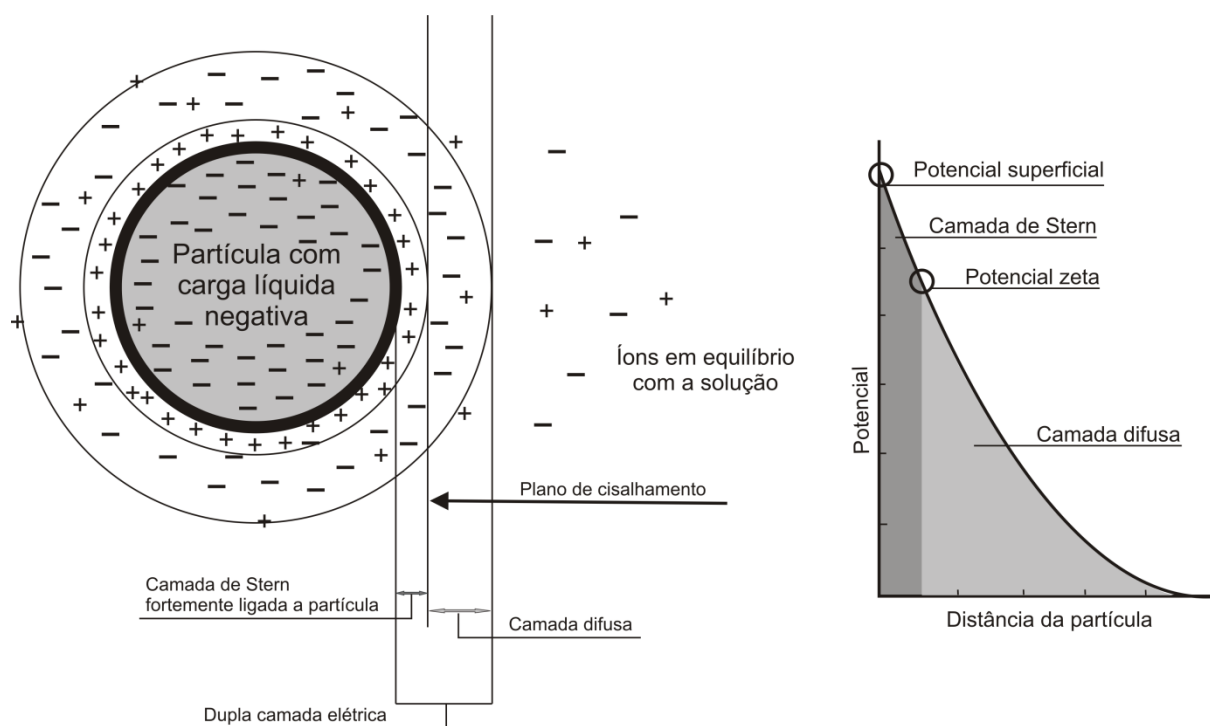
O tamanho das micelas não carregadas foi averiguado por TEM e DLS. O diâmetro medido por TEM foi de  $26 \pm 3$  nm, já o medido por DLS foi de  $50 \pm 5$  nm. Essa diferença, segundo os autores, é explicada pelo fato de que na TEM a corona da micela permanece colapsada/estática e no DLS a corona é expandida. O estudo da cinética de carregamento das micelas com o biocida TCMTB revelou que a concentração máxima de biocida no núcleo da micela foi de  $\sim 32\%$  (w/w), atingida após 60 minutos de vigorosa agitação da solução (maiores informações sobre esse método de carregamento serão relatadas adiante). O perfil cinético de liberação do biocida revelou um tempo muito maior que o tempo de carregamento, sendo que o nível máximo de liberação é atingido após 30h. Porém, nem todas as moléculas do biocida puderam ser liberadas, restando uma carga de  $\sim 5\%$  (w/w), que é causada pelo aumento da  $T_g$  no núcleo da micela em função da liberação do biocida.<sup>29</sup>

#### 2.4.1 Potencial Zeta ( $\zeta$ )

O potencial zeta, simbolizado pela grega  $\zeta$ , representado na Figura 2.6, pode ser entendido da seguinte forma: A maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso irá adquirir uma carga superficial, principalmente, por ionização de grupos superficiais, ou adsorção de espécies carregadas. Estas cargas superficiais modificam a distribuição de íons circundantes, aumentando a concentração de contraíons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Essa dupla camada divide-se em duas regiões: uma região interna que inclui íons fortemente ligados à superfície e uma região exterior onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. Em um campo elétrico, como em microeletroforese, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado potencial zeta.

Quando uma camada de macromoléculas é adsorvida na superfície da partícula, ela move o plano de cisalhamento para longe da superfície e altera o potencial zeta. Dessa forma, o potencial zeta é função da carga superficial da

partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Em outras palavras o potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária de fluido ligada às partículas dispersas. Esse potencial pode ser determinado experimentalmente por meio da aplicação de um campo elétrico através da dispersão. Partículas dentro da dispersão com um potencial zeta irão migrar para o eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional à magnitude do potencial zeta. Como ele reflete a carga efetiva nas partículas, ele se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. Quanto maior o potencial zeta (positivo ou negativo) mais provável que a suspensão seja estável, pois, as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação.



**Figura 2.6.** Disposição de cargas ao redor da nanopartícula (esquerda) e potencial zeta (direita)

A partícula negativa e sua atmosfera carregada negativamente produzem um potencial elétrico relativo a solução. Este tem um valor máximo na superfície e diminui gradativamente com a distância, aproximando-se de zero fora da camada difusa. A queda do potencial e a distância desde a partícula é um indicador da força repulsiva entre as partículas em função da distância nas quais estas forças passam ser ativas.

Um ponto de particular interesse é o potencial onde se unem a camada de Stern e a camada difusa. Este potencial trata-se do potencial zeta.

Para as micelas do copolímero tribloco o potencial  $\zeta$  encontrado foi de  $-2.1 \pm 8.0$  mV. Portanto, a camada exterior composta de PEO proporciona um potencial  $\zeta$  quase neutro. Esse comportamento não é surpreendente, uma vez que a camada externa da micela do copolímero em bloco não apresenta grupos ionizáveis.<sup>30</sup>

## **2.5 Métodos de preparação: Dissolução direta e indireta e Nanoprecipitação**

A metodologia aplicada na preparação de sistemas poliméricos é um parâmetro chave no controle cinético e termodinâmico do mecanismo do processo de auto-montagem de copolímeros em bloco, pois define a coordenada de interação polímero-solvente. Frequentemente a preparação de estruturas auto-montadas bem definidas requer estudos de otimização bem detalhados, bem como, a criatividade de químicos e físicos.<sup>31</sup> Ou seja, dispor as cadeias poliméricas anfifílicas em um microambiente adequado para a auto-organização tenha lugar de forma ordenada, levando à formação de sistemas uniformes em termos de tamanho e morfologia.

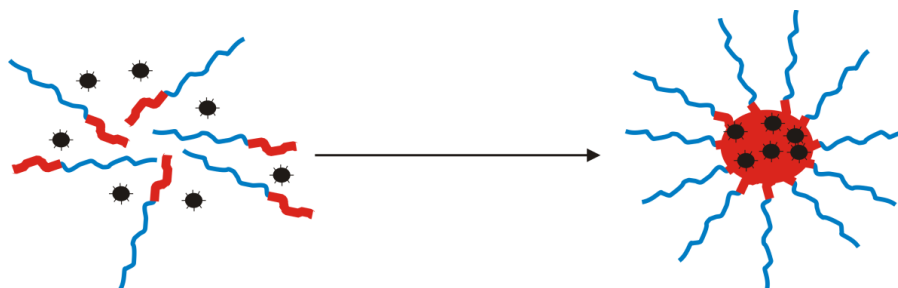
Dentre os métodos de preparo já consolidados e amplamente relatados, destacam-se a Dissolução Direta (DD), Dissolução Indireta (DI) e Nanoprecipitação (Np).

### **2.5.1 Dissolução Direta**

O método de dissolução direta consiste simplesmente em dissolver uma determinada quantidade de copolímero em bloco anfifílico e da droga em um solvente aquoso no qual pelo menos um dos segmentos é ligeiramente solúvel, conforme ilustrado na Figura 2.7.<sup>31,32</sup> Em geral, a auto-montagem ocorre progressivamente sob agitação até que o equilíbrio termodinâmico seja atingido, dentro de um período de tempo que pode variar de minutos a semanas. A cinética de auto-organização não depende apenas de parâmetros experimentais, como temperatura, solvente, presença de aditivos, etc, mas também de propriedades macromoleculares intrínsecas, como o peso molecular, relação da fração de volume entre os segmentos solvofílicos e solvofóbicos e da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ).

A manipulação de copolímeros em bloco anfifílicos em meio aquoso é intrinsecamente difícil e a dissolução direta tem sido considerada adequada para esse fim, somente, para micelas na forma de estrelas ( $R_{\text{corona}} \gg R_{\text{núcleo}}$ ) de sistemas exibindo blocos formadores da corona maiores que os blocos formadores do núcleo. Ou seja, sistemas com baixa fração de volume do bloco hidrofóbico. Ainda assim, a preparação de nanopartículas micelares em água frequentemente requer que a temperatura da solução durante o protocolo de preparação seja superior à  $T_g$  dos blocos constituintes, a fim de dar mobilidade às cadeias individuais.<sup>31</sup>

Portanto, esta técnica, utilizada principalmente para polímeros e drogas moderadamente hidrofóbicos, depende do aquecimento da solução para promover a micelização. O mecanismo pelo qual a micelização ocorre como resultado do aquecimento é um provável resultado da desidratação do núcleo hidrofóbico. Drogas altamente hidrofóbicas geralmente não podem ser incorporadas em micelas por este método porque a solubilidade da droga em água é muito baixa, portanto, não há droga suficiente disponível em solução para saturar o núcleo da micela sob micelização.



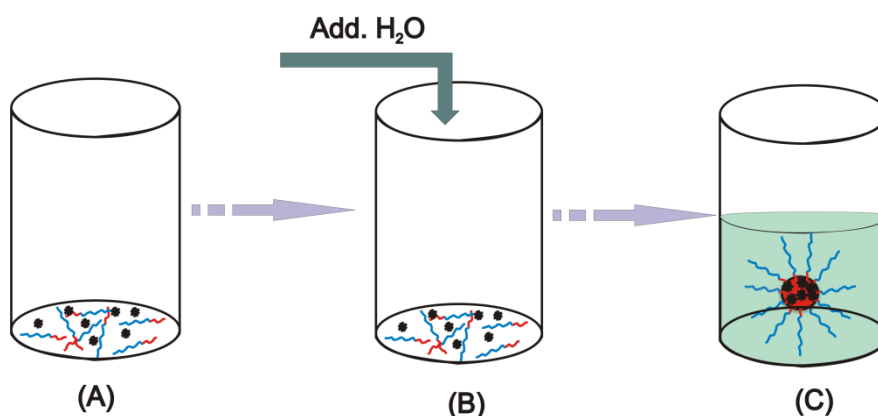
Dissolve-se copolímero e droga em um solvente aquoso.

**Figura 2.7.** Preparação de micelas carregadas com droga, por Dissolução Direta.

### 2.5.2 Dissolução Indireta

No método de dissolução indireta o copolímero em bloco é dissolvido em um solvente orgânico comum (isto é, termodinamicamente bom para ambos os blocos) que seja miscível com água, tal como, *N,N*-Dimetilformamida (DMF), THF e Ac. (Figura 2.8 A). Subseqüentemente adiciona-se água, em taxa e quantidade controlada, à fase orgânica contendo as cadeias dissolvidas molecularmente (Figura 2.8 B). A qualidade do solvente para cada bloco muda gradualmente, ou seja, fica

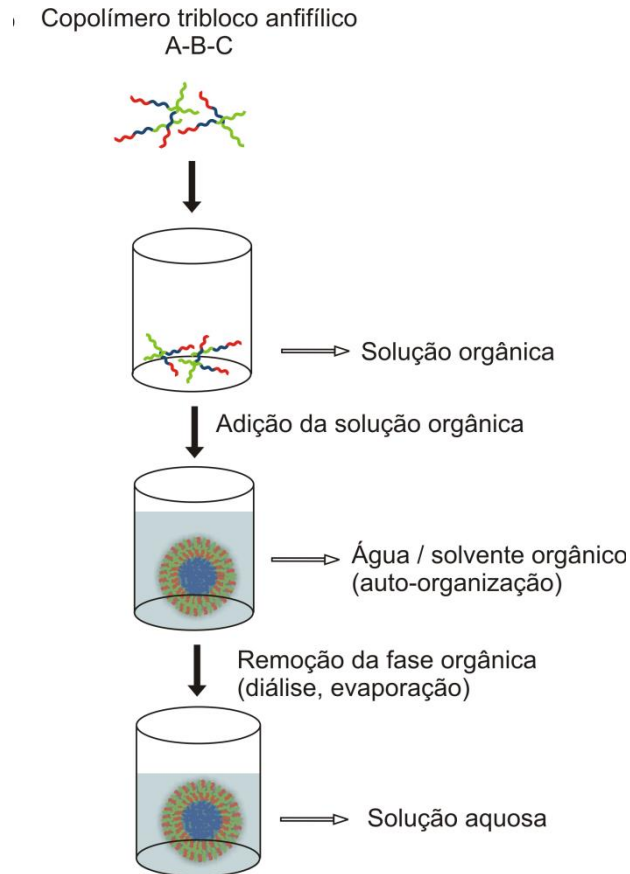
cada vez melhor para um bloco e menos solúvel para outro. A micelização ocorre quando a Concentração de Água Crítica (CAC) é atingida (Figura 2.8 C), a fim de minimizar o contato entre o bloco solvofóbico e o solvente.<sup>20</sup> Em ambos os métodos a fração orgânica (em geral de 2 a 50% v/v) pode ser retirada da solução por evaporação natural, rota-evaporação a pressão reduzida ou diálise.



**Figura 2.8.** Representação esquemática do método de Dissolução Indireta. (A) solução orgânica - polímero e droga, solubilizados em um bom solvente para ambos; (B) adição de água sob a solução orgânica; (C) auto-organização em ambiente aquoso.

### 2.5.3 Nanoprecipitação

O método de nanoprecipitação consiste basicamente na formação de nanopartículas por precipitação de um polímero insolúvel em água a partir de uma solução orgânica miscível com água onde o mesmo encontra-se dissolvido, conforme ilustrado na Figura 2.9. Desta forma, dois líquidos são direcionados um contra o outro. O primeiro consiste do solvente orgânico contendo o polímero anfifílico e, se for o caso, a droga a ser encapsulada, bem como, o polímero anfifílico. O segundo líquido é água pura. Quando os dois líquidos entram em contato, a droga e os segmentos hidrofóbicos do polímero precipitam para fora da solução, numa tentativa de minimizar o contato desfavorável com as moléculas de água. Com isso, o polímero se auto-organiza formando um revestimento; os segmentos hidrofóbicos ocupam o núcleo da nanopartícula e a parte hidrofílica estende-se para o seio da solução.



**Figura 2.9.** Representação esquemática do método de preparação de nanopartículas por nanoprecipitação.

## 2.6 Copolímeros para aplicações biológicas

Sistema de liberação controlada (SLC) obtém-se quando um polímero, natural ou sintético, é combinado com um ou mais fármacos, em um sistema geralmente de dimensão nanométrica ou micrométrica, apresentando uma liberação que pode ser constante ou cíclica, por um longo período, podendo ser ativado pelo ambiente ou por outro estímulo externo. Portanto, estudos são focados na engenharia de sistemas poliméricos que apresentem a capacidade de liberação controlada, com o objetivo de manter constante o nível de droga no organismo, ou seja, entre o máximo e o mínimo desejado da concentração terapêutica.

Em um SLC a droga é administrada para alcançar o sítio de ação específico, com dose baixa, comparada aos sistemas convencionais, necessária para atingir o efeito terapêutico, e para minimizar (ou não apresentar os efeitos secundários) e inconveniência ao paciente. Frequentemente, na medicação oral, como comprimidos ou cápsulas, um excesso grande de droga é administrado para assegurar o efeito

terapêutico, ocasionando uma liberação imprevisível ou descontrolada. Nos SLC o aumento da eficácia e a redução da toxicidade da droga são atingidos através do controle da liberação no sítio de ação e, conseqüentemente, o controle da droga na absorção, nível sanguíneo, metabolismo e distribuição em células específicas.<sup>33</sup>

O SLC ideal deve ser inerte, biocompatível, mecanicamente forte, confortável para o paciente, proteger a liberação acidental do fármaco, simples de administrar e remover e fácil de fabricar e esterilizar. Estes são alguns dos fatores que fazem com que o desenvolvimento destes sistemas sejam tão complexos quanto o desenvolvimento da própria droga. Todavia, na engenharia destes sistemas carreadores de drogas, geralmente micelares, constituídos de copolímero em bloco, a biocompatibilidade, bem como a biodegradabilidade dos blocos formadores do polímero é de essencial importância.<sup>34</sup>

Para que um polímero seja caracterizado como biomaterial ele não deve ser causador de resposta inflamatória ou reações tóxicas no local de aplicação, deve apresentar uma meia-vida adequada, o seu tempo de degradação deve ser compatível como o processo de cicatrização ou regeneração, deve apresentar propriedades mecânicas adequadas à aplicação desejada, seus produtos de degradação não devem ser tóxicos, devem ser capazes de serem metabolizados e eliminados do organismo, e devem apresentar permeabilidade apropriada à aplicação desejada.<sup>35</sup>

No entanto, os fatores que afetam a biodegradação dos polímeros são: estrutura e composição química; distribuição das unidades repetidas em monômeros; presenças de grupo iônico; presença de unidades inesperadas ou defeitos da cadeia; configuração da estrutura; peso molecular e distribuição do peso molecular, morfologia; condições do processo: local do implante; fatores físico-químicos e mecanismo de hidrólise. Polímeros biodegradáveis de origem natural ou sistemática são degradados *in vivo*, por hidrólise enzimática ou não enzimática ou ambos processos, produzindo biocompatibilidade e metabólitos que serão eliminados pelas vias normais.<sup>36,37</sup> Por tanto, fatores como pH e a temperatura devem ser avaliados durante o desenvolvimento dos sistemas, uma vez que estes fatores podem promover um aumento ou redução na velocidade de degradação.

Os polímeros naturais podem ser considerados como os primeiros biomateriais utilizados clinicamente. No entanto, apesar de apresentarem algumas



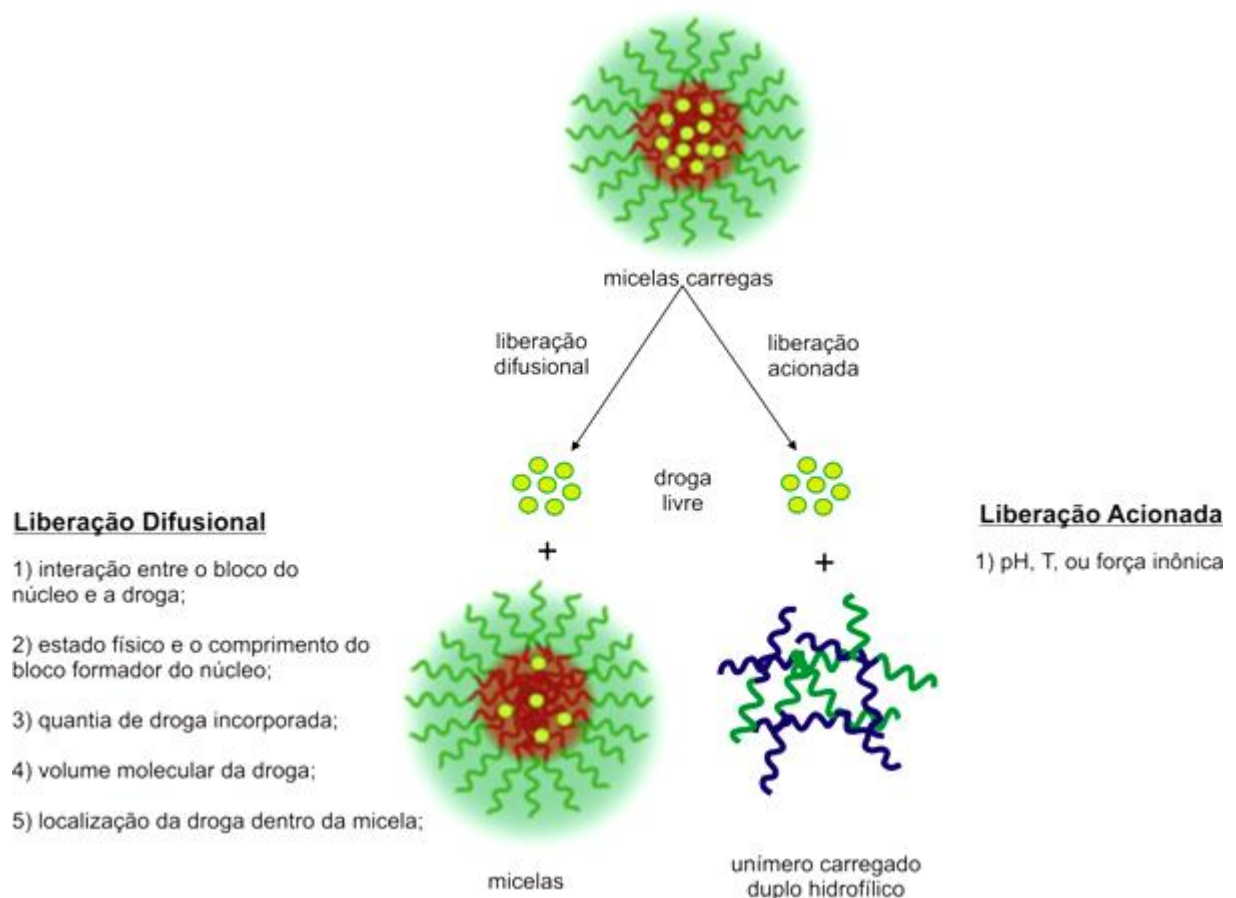
vantagens, eles podem promover uma atividade antigênica, a qual está associada ao seu processo de purificação, e também podem transmitir doenças. Como exemplo de polímeros naturais, destacam-se aqueles à base de proteínas como as albuminas bovina e humana, o colágeno e a gelatina. Os polímeros sintéticos, geralmente, são biologicamente inertes, apresentam propriedades mais previsíveis, maior uniformidade lote a lote, além de outros fatores. Eles são representados pelas poliamidas, pelos poliaminoácidos, pelos polialquícianacrilatos, pelos poliésteres, pelos poli (ortoésteres), pelos poliuretanos e pelas poliacrilamidas.<sup>35</sup>

A natureza dos polímeros empregados em sistemas de liberação de fármacos influencia significativamente no tamanho e no perfil de liberação do sistema. Crescente interesse tem se apresentado pelos polímeros biodegradáveis sintéticos na aplicação como sistemas de liberação, uma vez que os naturais apresentam, em geral, uma rápida liberação do fármaco. Frente a isso, os principais critérios na seleção de um polímero são, a biodisponibilidade, a biocompatibilidade e a sua velocidade de degradação.<sup>38</sup>

O perfil e o mecanismo de liberação da droga dependem, como já mencionado, da natureza do polímero e também das propriedades físico-químicas da substância nele incorporada. Alguns polímeros são menos sensíveis às condições empregadas nos processos de preparação, o que pode ser devido à sua composição química, à sua massa molar e à sua cristalinidade.<sup>38</sup>

## **2.7 Mecanismos de liberação de princípios ativos**

A liberação de princípios ativos encapsulados em micelas pode ocorrer por meio de dois mecanismos principais, que são difusional ou acionado, conforme representado na Figura 2.10. O mecanismo controlado por difusão ocorre para quase todos os sistemas em condições em que há um gradiente de concentração favorável (*"sink conditions"*) estáveis (Fig. 2.4, esquerda). O mecanismo acionado, por outro lado, depende da resposta a um estímulo externo. Portanto, somente sistemas que apresentam mudanças abruptas nas propriedades físico-químicas (em particular, solubilidade) em função de modificações no ambiente das vizinhanças que consistem geralmente em variações no pH, temperatura ou força iônica.<sup>20</sup>



**Figura 2.10.** Mecanismos de liberação de droga: difusão controlada vs. acionado.

### 2.7.1 Liberação Controlada por Difusão

Conforme representado no esquema da Figura 2.10 (esquerda), a liberação controlada por difusão pode ser influenciada por vários fatores. Assumindo que partícula é estável no meio em que se encontra, apresentando baixa taxa de biodegradação, e que a micela não se dissocia, então sob condições muito diluídas (“*sink conditions*”), a liberação da droga é influenciada por *i*) o estado físico e o comprimento do bloco formador do núcleo; *ii*) a quantidade de droga incorporada; *iii*) volume molecular da droga *iv*) localização da droga na micela (ex., no núcleo, ou na interface do núcleo e da corona, ou na própria corona), e principalmente *iv*) compatibilidade/interação entre o bloco formador do núcleo e a droga, o que é quantificado pelo parâmetro de interação  $\chi$ .<sup>20,26</sup>

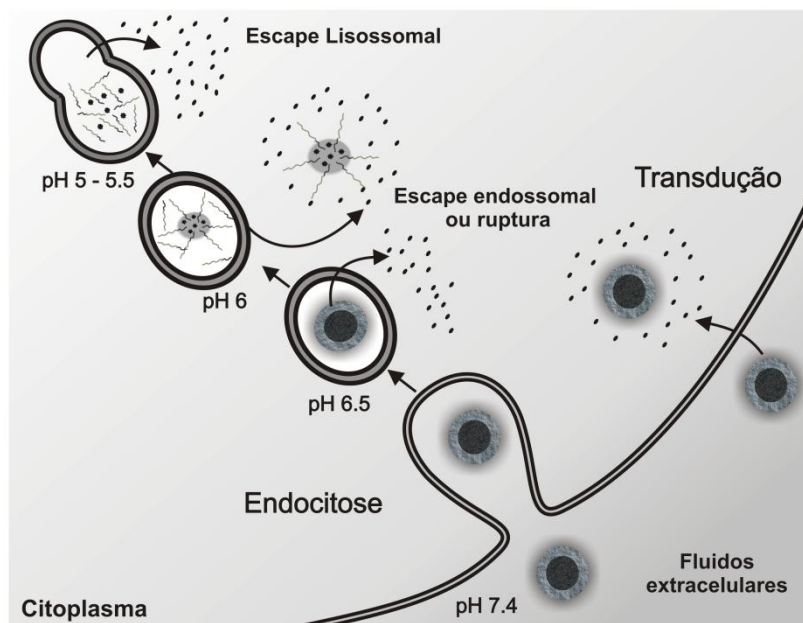
Nos casos extremos em que a taxa de biodegradação é rápida e as forças intermoleculares atrativas entre a droga e o polímero são fortes, a primeira governa a taxa de liberação e o processo difusional não é mais relevante.<sup>20,26</sup> Nos sistemas

em que a droga está covalentemente ligada à cadeia polimérica, a liberação pode ser governada pela taxa de quebra da ligação polímero-princípio ativo, a qual pode ser planejada para ser sensível ao pH, radiação eletromagnética, temperatura, etc.

### **2.7.2 Liberação Acionada**

A liberação acionada é baseada nas nítidas respostas do sistema mediante variações na conformação das macromoléculas frente às mudanças (estímulos) em um certo parâmetro do ambiente externo, tais como pH, temperatura, força iônica etc. Na maioria dos casos, tais estímulos tornam as cadeias de copolímeros duplamente hidrofílicas, e, portanto, preferencialmente solúvel em um meio. Em tais condições, a desmicelização (isto é, a dissociação da micela e conseqüente presença de cadeias poliméricas livres em solução) ocorre e quaisquer compostos ativos encapsulados na nanopartícula são conseqüentemente liberados para o meio.

Como mencionado anteriormente, a liberação acionada por pH é um mecanismo extremamente importante para o tratamento de áreas patológicas, em particular o câncer, que são em geral caracterizadas por acidose local. O pH dentro dessas áreas pode chegar a 5.0. Em princípio a maneira mais fácil para alcançar a liberação da droga acionada por pH em um sítio específico dentro da célula é por injeção intravenosa, assumindo que os carreadores são estáveis em pH fisiológico (pH = 7.2 – 7.4), mas liberam sua carga via liberação acionada, uma vez que uma área patológica ácida é encontrada (pH em torno 5.0 – 5.5), como ilustrado na Figura 2.11.<sup>20,33,39</sup>



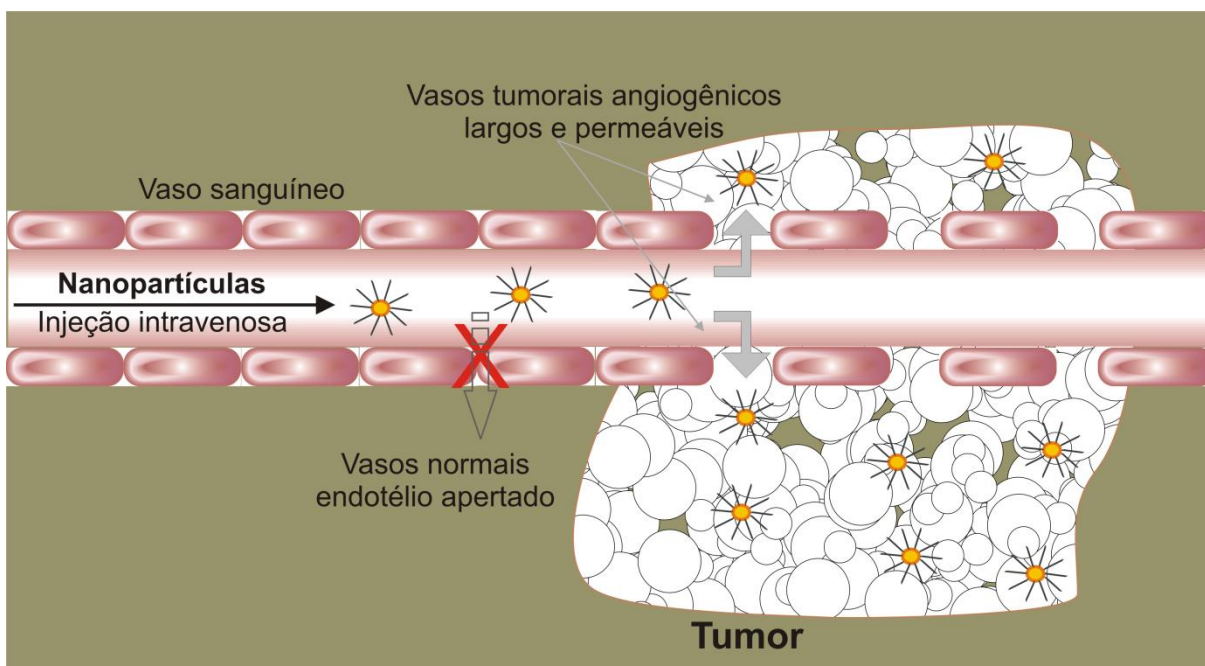
**Figura 2.11.** Entrega de droga mediada por micelas dentro da célula por endocitose e transdução, como proposto por Hubbell.<sup>39</sup>

### 2.7.3 Biodistribuição por Efeito EPR

Quando as células tumorais se multiplicam e se agrupam, atingindo um tamanho de 2-3 mm, a angiogênese é induzida, para atender a demanda cada vez maior de nutrição e oxigênio do tumor em crescimento. O fenômeno da angiogênese é o processo pelo qual os tumores desenvolvem novos vasos capilares sanguíneos. O processo é condição para que a progressão do tumor e está intimamente relacionado com a formação de metástases. Essa neovascularização tem arquitetura anatômica muito diferente daquelas de tecidos normais. Por exemplo, os vasos sanguíneos no tumor possuem formas irregulares, dilatadas, com vazamento ou defeito, e as células endoteliais são mal alinhadas ou desorganizadas, com fenestrações (fendas/espacos) grandes. Além disso, as células perivasculars e da membrana basal, ou a camada de músculo liso, são freqüentemente ausente ou anormal na parede vascular. Vasos tumorais têm um lúmen amplo, enquanto que tecidos tumorais têm drenagem linfática pobres. Estes defeitos anatômicos, juntamente com anormalidades funcionais, resultam em extenso vazamento de componentes do plasma sanguíneo, tais como macromoléculas, nanopartículas e partículas lipídicas, no tecido tumoral.<sup>40,41,42</sup>

O retorno venoso lento no tecido tumoral e a depuração linfática pobre significam que macromoléculas são retidas no tumor, enquanto o extravasamento nos interstícios do tumor continua. Esse fenômeno é conhecido como efeito EPR, do inglês *Enhanced Permeability and Retention*, ou seja, permeabilidade e retenção aumentada. Desta forma, é possível conseguir altas concentrações locais de princípios ativos encapsulados em sistemas poliméricos no local do tumor, em concentrações 10-50 vezes maior do que em tecidos normais, dentro de 1-2 dias. Diversos sistemas recentes fazem uso de conjugados poliméricos (princípio ativo modificado por cadeias poliméricas penderes), drogas micelares ou vesiculares de agentes anticancerígenos e os conjugados de anticorpos são baseados nesse mecanismo. De fato o efeito EPR tem sido considerado amplamente no processo de desenvolvimento de novas terapias.

O efeito EPR não se aplica a moléculas com baixo peso molecular, por causa de sua rápida difusão para a circulação sanguínea e conseqüente depuração renal. Na Figura 2.12 é ilustrada a dinâmica do efeito EPR. Nota-se que na região do tecido sadio não há, ou é muito estreito, o espaço no endotélio, para o atravessamento de partículas para a parte externa do vaso sanguíneo. Já no tecido tumoral, motivado, entre outras, pela ausência da camada de músculo liso que mantém o volume e fluxo de sangue constante, existe espaço apropriado para o fluxo de partículas.<sup>40,41</sup>



**Figura 2.12.** Representação esquemática do efeito EPR em tecidos tumorais.

Portanto, esse efeito é baseado no fato de que a vasculatura patológica, ao contrário da vascularização dos tecidos normais, é vazada, ou seja, penetrável de moléculas grandes e até mesmo pequenas partículas – que permita o seu extravasamento e acúmulo nos espaços intersticiais do tumor. Tal acumulação é adicionalmente facilitada pela ausência de um sistema linfático em muitos tumores, o qual, em tecidos normais, é responsável pela drenagem de macromoléculas.<sup>42</sup>

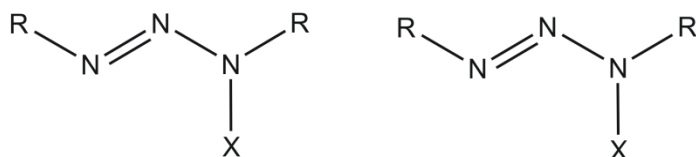
## 2.8 Trizenos: propriedades estruturais, físico-químicas e atividade biológica

Nesta seção, uma abordagem dos aspectos históricos, propriedades estruturais, fotofísicas e atividade biológica de compostos trizenos será desenvolvida. Algumas estruturas de compostos com similaridade aos desenvolvidos neste trabalho, ou seja, pré-ligantes apresentando grupos funcionais amido e acetil, serão apresentadas.

### 2.8.1 Pré-ligantes Trizenos

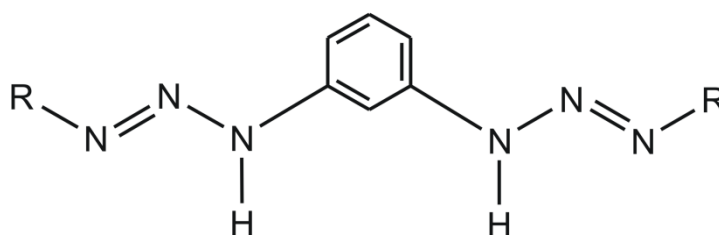
Os pré-ligantes trizenos são compostos orgânicos que apresentam uma cadeia de três átomos de nitrogênio em seqüência, formando um grupo diazoamínico, conforme a representação genérica na Figura 2.13.<sup>12</sup> Podem apresentar R ou R' como sendo grupamentos aril, alquil ou heteroátomos e X sendo

formado por H, OH ou alquila.<sup>12,43</sup> Este tipo de pré-ligantes formam complexos com inúmeros centros metálicos, originando estruturas com arranjos supramoleculares que despertam interesse de vários grupos de pesquisa.



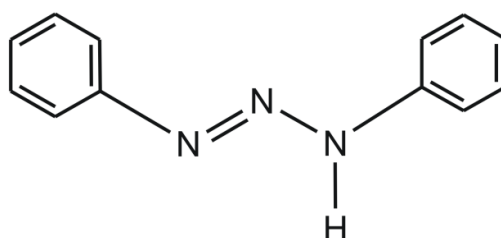
**Figura 2.13.** Representação estrutural genérica de um triazeno simétrico (a) e assimétrico (b).

Na literatura também são descritos os compostos chamados biscatenados, Figura 2.14, os quais são constituídos de duas cadeias diazoamínicas ligadas a um anel aromático central.<sup>44</sup>



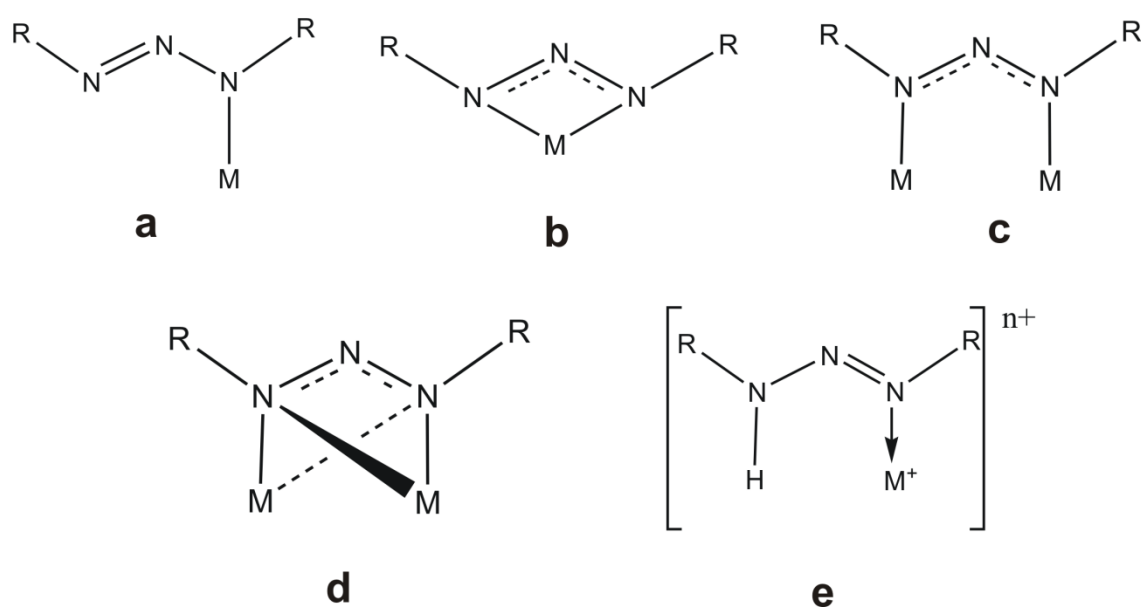
**Figura 2.14.** Representação estrutural genérica de um triazeno biscatenado.

O primeiro triazeno simétrico descrito na literatura<sup>45</sup>, o 1,3-*bis*(fenil)triazeno, é datado de 1859, relatado por Griess. A Figura 2.15 ilustra a estrutura molecular do composto. Já o primeiro complexo derivado do 1,3-*bis*(fenil)triazeno foi um complexo com centro metálico de cobalto(II), o  $\text{Co}(\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NNNC}_6\text{H}_4\text{NO}_2)_2$  descrito em 1887 por Meldola.<sup>46</sup>



**Figura 2.15.** Representação da estrutura molecular do 1,3-*bis*(fenil)triazeno.

Mediante a versatilidade dos trizenos coordenarem-se a centros metálicos, vários são os modos de coordenação destes ligantes, elucidados por difração de raios-X, relatados na literatura.<sup>12,47</sup> na Figura 2.16 são demonstrados os diferentes modos de coordenação destes complexos no estado sólido. Em (a) está representado o modo de coordenação monodentada aniônica, em (b) tem-se a representação da forma quelante bidentada, em (c) e (d) as coordenações em ponte, e em (e) a coordenação monodentada terminal neutra.

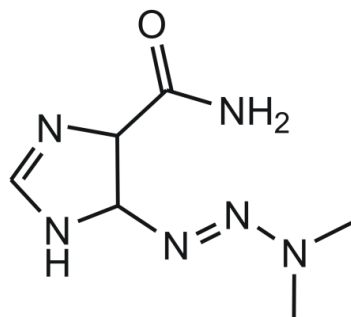


**Figura 2.16.** Representação dos principais modos de coordenação dos trizenos.

### 2.8.2 Histórico de atividade biológica de compostos Trizenos

O primeiro triazeno a apresentar atividade antitumoral foi a Dacarbazina<sup>®</sup>, 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxiamida, também conhecida pela abreviatura DTIC, Figura 2.17, relatado em 1962, por Shealy e colaboradores.<sup>48</sup> O composto apresentou-se ativo contra o sarcoma 180 (S180), o adenocarcinoma 755 (Ca755) e a leucemia linfóide L1210 em ratos.<sup>49</sup>





**Figura 2.17.** Representação da estrutura molecular da Dacarbazina®.

A partir destas descobertas, vários estudos envolvendo síntese e avaliação da atividade biológica *in vivo*,<sup>50,51,52,53</sup> mutagenicidade<sup>54</sup> e carcinogenicidade<sup>55</sup> de compostos triazenos substituídos foram relatados. Além disso, estudos clínicos sobre a Dacarbazina®,<sup>56</sup> seu metabolismo<sup>57</sup> e sua farmacocinética<sup>58</sup> também são relatados. Portanto, na clínica a Dacarbazina® foi o primeiro composto triazeno utilizado no tratamento de pacientes com câncer, sendo atualmente considerada como a droga de referência no tratamento do melanoma maligno metastático.<sup>59</sup>

Desta forma, frente às descobertas promissoras, vários estudos buscando compostos mais ativos e menos citotóxicos vêm sendo desenvolvidos, o que levou a descoberta de outros compostos triazenos biologicamente ativos, a exemplo da Temozolomida®,<sup>60</sup> 3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazol[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carboxamida, e o Berenil®,<sup>61</sup> 4,4'-(1-triazeno-1,3-diil)dibenzamina-bis(*N*-acetilglicinato).

### 2.8.3 Propriedades fotofísicas dos Triazenos

Técnicas espectroscópicas, bem como, outras que usam fótons de energia (absorção, espalhamento, difração), são importantes ferramentas para estudos e investigações nos campos da química, física, entre outros. Os triazenos apresentam propriedades fotofísicas bastante apropriadas para este tipo de análise, sendo geralmente estudados por espectroscopia de infravermelho (IV), Raman, Ultravioleta e Visível (UV-Vis) e difração de raios-X (DRX).

Em geral em estudos por IR, especial atenção é dada às bandas de estiramento das ligações N=N e N-N, da cadeia nitrogenada, observando que a dupla ligação absorve em uma frequência ligeiramente maior por possuir uma ordem de ligação maior. Já os estiramentos da ligação N-H permitem a verificação da

abstração do próton, indicando, com isso, a possível ocorrência da coordenação do pré-ligante ao centro metálico.<sup>62,63,64,65</sup> Já o uso de espectroscopia Raman fornece informações ricas sobre a natureza de transições eletrônicas em moléculas complexas. Nos trizenos uma questão importante diz respeito à redistribuição de cargas na espécie aniônica de sistemas altamente conjugados contendo hidrogênio ácido.<sup>66</sup>

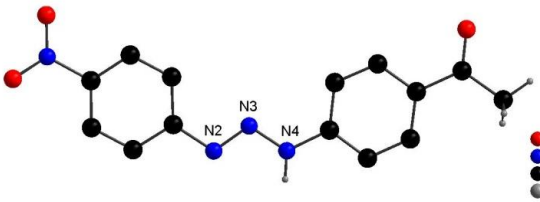
Desta forma são encontrados na literatura<sup>66,67</sup> relatos do uso de espectroscopia Raman focado ao entendimento da natureza das transições eletrônicas em trizenos simétricos, nos estados neutro e coordenado como espécies triazenido ( $N_3^-$ ) o que permite um entendimento mais claro de tais transições, possibilitando, desta forma, identificar (ou corroborar) a qual cromóforo corresponde a respectiva banda no espectro de UV-Vis.<sup>66</sup>

A espectroscopia de absorção na região do ultra-violeta e visível, assim como as supracitadas, é amplamente empregada na caracterização de compostos, além de ser bastante útil em estudos de cinética e mecanismos de reações. Esta técnica baseia-se, sumariamente, na presença de um grupo cromóforo que seja responsável pela absorção da radiação. Para os trizenos a absorção característica do cromóforo N=N aparece na região entre 330 e 420 nm.<sup>48,62,63,66,68,69,70</sup>

#### 2.8.4 Estruturas de pré-ligantes e complexos com ouro

Neste tópico serão apresentadas algumas estruturas e aspectos relevantes, que se assemelham com os compostos deste trabalho. Na tabela 2.2 apresentam-se principais dados estruturais de alguns pré-ligantes trizenos e o único triazenido complexo com centro metálico de ouro contendo trifenilfosfina como segundo ligante.

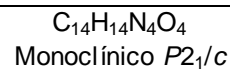
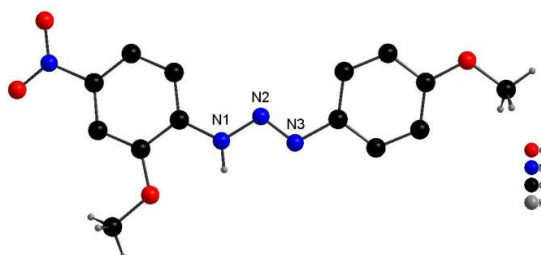
**Tabela 2.2.** Dados referentes à revisão de literatura de pré-ligantes trizenos monocatenados.

Ano <sup>Ref.</sup>	Representação Estrutural	Considerações Importantes
2004 <sup>71</sup>		$C_{14}H_{12}N_4O_3$ Monoclínico C2/c $a = 14,357(6) \text{ \AA}$ $b = 7,196(1) \text{ \AA}$ $\beta = 100,35(4)^\circ$ $c = 26,779(5) \text{ \AA}$ $V = 2721,75(19) \text{ \AA}^3$ $N3-N4 = 1,322 \text{ \AA}$ $N2-N3 = 1,267 \text{ \AA}$

---

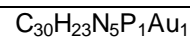
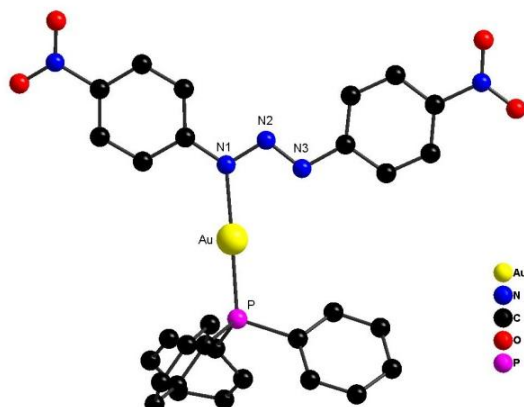
$$N2-N3-N4 = 111,752(19)^\circ$$

---

2005<sup>72</sup>

$$a = 7,280(5) \text{ \AA}$$
$$b = 9,312(6) \text{ \AA} \quad \beta = 98,83^\circ$$
$$c = 20,750(10) \text{ \AA}$$
$$V = 1390(16) \text{ \AA}^3$$
$$N1-N2 = 1,352 \text{ \AA}$$
$$N2-N3 = 1,263 \text{ \AA}$$
$$N1-N2-N3 = 110,680(44)^\circ$$

---

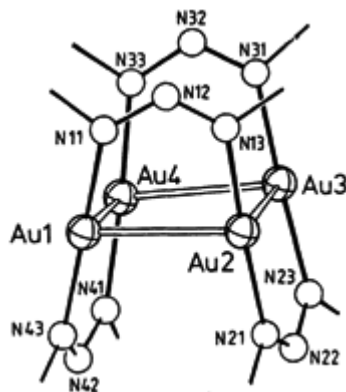
2003<sup>73</sup>Triclínico -  $P(-1)$ 

$$a = 10,2034(4) \text{ \AA} \quad \alpha = 93,987(2)^\circ$$
$$b = 10,7550(2) \text{ \AA} \quad \beta = 102,148(2)^\circ$$
$$c = 14,0941(5) \text{ \AA} \quad \gamma = 103,930(2)^\circ$$
$$V = 1455,73(8) \text{ \AA}^3$$
$$Au-N1 = 2,108 \text{ \AA}$$
$$Au-P = 2,252 \text{ \AA}$$
$$N11-N12-N13 = 110,358(3)^\circ$$

Geometria linear

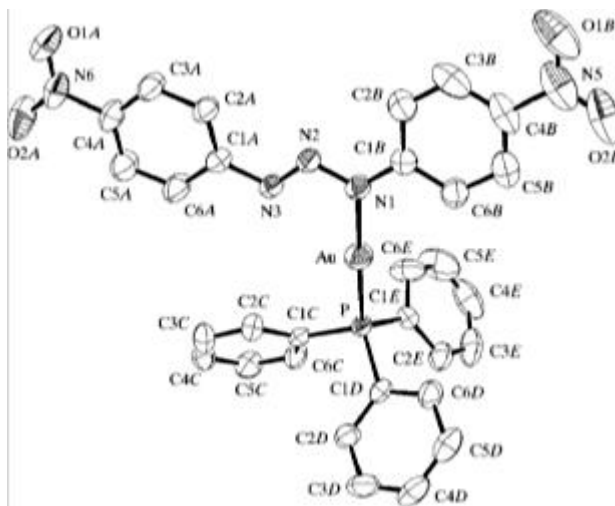
---

No que diz respeito aos complexos contendo centros metálicos de ouro com ligantes trizenos coordenados, uma busca na literatura por revela que este tipo de composto é raro, havendo somente três trabalhos relatados nesse sentido. O primeiro complexo com ouro envolvendo ligantes trizenos foi publicado por Beck e Strähle em 1986. O composto apresenta uma estrutura tetranuclear, conforme Figura 2.18, com quatro centros metálicos de ouro com ligantes trizenos coordenados em ponte.<sup>74</sup>



**Figura 2.18.** Representação da estrutura molecular do triazenido complexo tetranuclear.

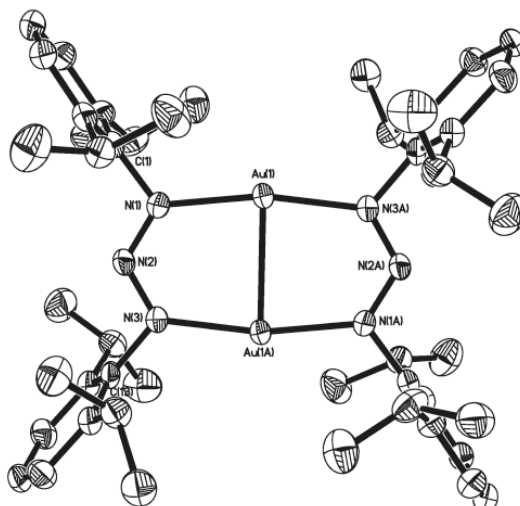
Em 2003 Hörner e colaboradores<sup>73</sup> relataram a síntese e estrutura cristalina do [1,3-bis(4-nitrofenil)triazenido]-(trifenilfosfina)ouro(I). A estrutura do composto está representada na Figura 2.19 e os dados cristalográficos estão resumidos na tabela 2.



**Figura 2.19.** Representação da estrutura molecular do [1,3-bis(4-nitrofenil)triazenido]-(trifenilfosfina)ouro(I) com elipsóides térmicos em 50% de probabilidade.<sup>73</sup>

Esse composto é o único triazenido complexo com ligante trifenilfosfina descrito na literatura.

O terceiro complexo triazenido com ouro foi relato em 2009 por Johnson e colaboradores<sup>75</sup>. A estrutura molecular do complexo dimérico (Figura 2.20) é constituída de dois ligantes triazenos e dois centros metálicos de ouro. Os ligantes coordenam-se aos íons Au(I) na forma de ponte, conferindo-se, com isso, a formação da respectiva estrutura binuclear do composto.

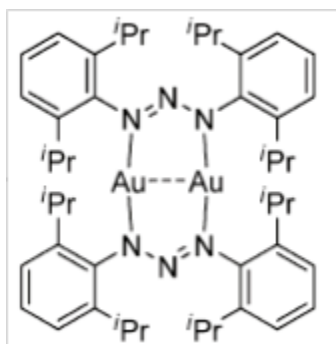


**Figura 2.20.** Estrutura molecular do único complexo triazenido dimérico com Au(I). Elipsóides térmicos em 50% de probabilidade.

Algumas informações relevantes da estrutura do complexo binuclear de ouro estão resumidas na tabela 2.2.

**Tabela 2.3.** Dados relevantes da estrutura do complexo binuclear de ouro.

$[\text{Au}_2(\text{L})_2] \cdot 2\text{Tol}$	Informações importantes	
	$\text{C}_{48}\text{H}_{68}\text{Au}_2\text{N}_6 \cdot 2(\text{C}_7\text{H}_8)$	
	Sistema cristalino: monoclinico	
	Grupo espacial: $P2_1/c$	
	$a/\text{Å}$ : 12.9430(2)	$\beta/^\circ$ : 102.6100(10)
	$b/\text{Å}$ : 10.0730(2)	$V/\text{Å}^3$ : 2865.98(10)
	$c/\text{Å}$ : 22.5260(5)	Z: 2
	$d_{(\text{M} \cdots \text{M})}$ (Å): 2.6762(4)	
	$\text{Au}(1)\text{-Au}(1\text{A})$ : 2.6762(4) Å	$\text{N}(1)\text{-N}(2)$ : 1.308(2) Å
	$\text{Au}(1)\text{-N}(1)$ : 2.046(5) Å	$\text{N}(2)\text{-N}(3)$ : 1.297(7) Å
	$\text{Au}(1)\text{-N}(3\text{A})$ : 2.042(5) Å	
	$\text{N}(1)\text{-Au}(1)\text{-N}(3\text{A})$ : 168.0(2)°	$\text{N}(1)\text{-N}(2)\text{-N}(3)$ : 119.5(5)°





### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Reagentes e Solventes

Todos os reagentes e solventes utilizados nas sínteses deste trabalho foram adquiridos comercialmente das empresas Vetec<sup>®</sup> e Aldrich<sup>®</sup>, com exceção do cloreto de trifenilfosfina de ouro (I), o qual foi sintetizada conforme técnica disposta no Anexo A. Os solventes eram de grau PA ou espectroscópico e foram utilizados como recebidos, sem tratamento prévio.

#### 3.2 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados utilizando-se um espectrofotômetro Bruker Tensor 27 que abrange uma janela espectral de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram registrados confeccionando-se pastilhas sólidas com os compostos macerados em brometo de potássio em uma proporção aproximada de 1:50 (2 mg/100 mg) composto/KBr. O espectro do pré-ligante foi realizado com amostra na forma de pó e do complexo triazenido na forma de cristais.

#### 3.3 Espectroscopia eletrônica de UV-Vis

Os espectros eletrônicos nas regiões do visível e ultravioleta foram registrados utilizando-se um Espectrofotômetro UV-Vis 1650 PC Shimadzu. Para as leituras em solução foram utilizadas cubetas de quartzo de caminho óptico de 1 cm, utilizando-se solventes de grau espectroscópico para cada amostra.

#### 3.4 Ponto de fusão

As análises de ponto de fusão foram realizadas utilizando-se um equipamento da marca *MEL-TEMP II*, pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

### 3.5 Difração de raios-X de monocristal

Os cristais foram selecionados manualmente usando-se uma lupa e colados na extremidade de um fio de vidro de diâmetro aproximado de 0,1 mm, o qual foi fixado em uma cabeça de goniômetro e centralizado óticamente.

A coleta dos dados de difração de raios-X foi realizada em um difratômetro automático de quatro ciclos com detector de área, Bruker X8 Kappa APEX-II CCD com fonte de radiação Mo-K $\alpha$  ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ) com monocromador de monocristal de grafite. A determinação dos parâmetros da cela cristalina e retículo de Bravais preliminar dos compostos foi realizada usando-se a suíte de programas APEX2 (versão 2) A.

Com uso do *SHELXS* do suíte WinGX<sup>76</sup> foi determinada a solução inicial por métodos diretos. Exceto o hidrogênio, os demais átomos foram localizados no mapa da diferença de Fourier e incluídos no refinamento com parâmetros de deslocamento isotrópicos. Ciclos seguintes de refinamento foram feitos usando parâmetros de deslocamento térmico anisotrópicos para os átomos não hidrogenóides. Finalmente, os átomos de hidrogênio foram observados no mapa de diferença de Fourier e sucessivos ciclos finais de refinamento foram feitos até que mudanças significantes dos parâmetros não fossem observadas. A projeção das estruturas cristalinas obtidas por difração de raios-X em monocristal foi realizada com uso do programa *Diamond*.<sup>77</sup> Os parâmetros básicos de refinamento da estrutura cristalina de **1** e **2** encontram-se listados na tabela 3.1.



**Tabela 3.1.** Parâmetros básicos de refinamento dos compostos **1** e **2**.

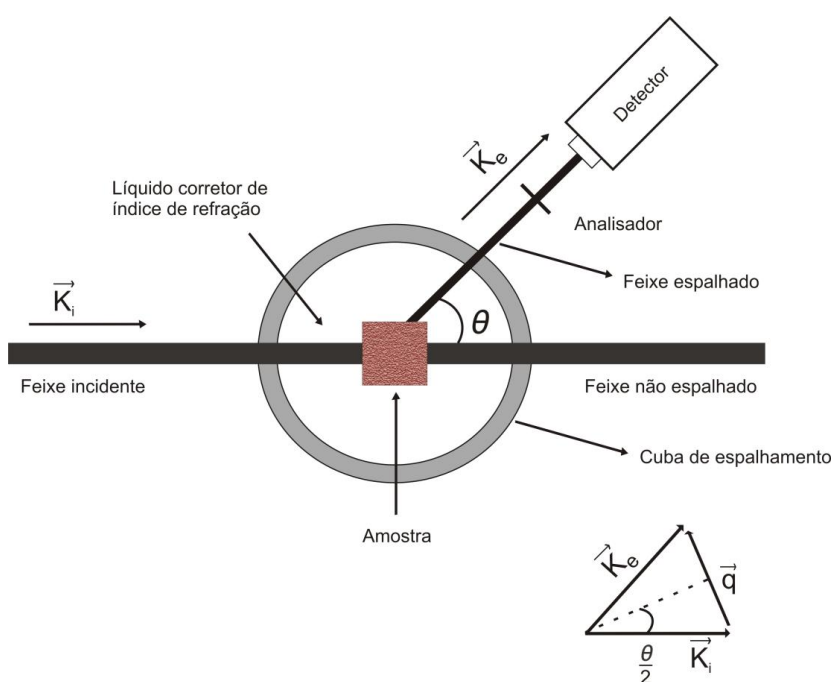
<b>Composto</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Fórmula molecular	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>33</sub> H <sub>28</sub> AuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> P
Massa molecular (g·mol <sup>-1</sup> )	282,30	740,53
Dimensões do cristal (mm <sup>3</sup> )	0,41 x 0,24 x 0,16	0,20 x 0,14 x 0,12
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	<i>P2<sub>1</sub>/n</i>	<i>P</i> $\bar{1}$
<i>a</i> /Å	7,2645(4)	12,175
<i>b</i> /Å	17,2890(7)	12,374
<i>c</i> /Å	11,6891(5)	14,227
<i>α</i> /°	90	109,54
<i>β</i> /°	95,833(2)	112,49
<i>γ</i> /°	90	98,16
<i>V</i> /Å <sup>3</sup>	1460,50(12)	1774,4
<i>Z</i>	4	2
T(K)	296(2)	296(2)
$\rho_{\text{calc}}$ (mg·m <sup>-3</sup> )	1,284	1,386
Coefficiente linear de absorção $\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0,089	4,221
Região de varredura angular $\theta$ (°)	2,11–28,38	1,71–27,91
Índices de varredura <i>h, k, l</i>	-9 ≤ <i>h</i> ≤ 5, -23 ≤ <i>k</i> ≤ 21, -15 ≤ <i>l</i> ≤ 15	-16 ≤ <i>h</i> ≤ 16, -15 ≤ <i>k</i> ≤ 16, -17 ≤ <i>l</i> ≤ 18
Refl. Coletadas	25958	30480
Refl. Independentes	3645	8463
<i>R</i> <sub>int</sub>	0,0316	0,0414
<i>R</i> <sub>sig</sub>	0,0218	0,0467
Crítério de observação	[ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]	[ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )]
Número de parâmetros	122	370
Correção de absorção	Multi-scan	Multi-scan
<i>T</i> <sub>min</sub>	0,9645	0,4856
<i>T</i> <sub>max</sub>	0,9859	0,6313
<i>F</i> (000)	592	728
Goodness-of-fit ( <i>F</i> <sup>2</sup> )	1,020	1,121
Índices de discordância finais	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0,0445 <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0,1327	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0,0450 <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0,1637
Densidade eletrônica residual ( $\rho_{\text{máx}}$ $\rho_{\text{mín}}$ ) [e·Å <sup>-3</sup> ]	0,197 e -0,182	0,1825 e -0,645

### 3.6 Espalhamento de Luz

Quando uma radiação eletromagnética interage com um sistema qualquer, o campo elétrico da radiação energiza os elétrons das moléculas constituintes do sistema e induz uma polarização que oscila no tempo com a mesma frequência da

radiação. Essas moléculas, com átomos vibrando mais rapidamente, portanto, mais energizadas, passam a ser fonte de radiação secundária e, por conseguinte irradiam a radiação incidente. Essa radiação é chamada radiação espalhada. A intensidade da radiação espalhada, as mudanças de frequência, a polarização e a distribuição angular dependem do tamanho, forma e das interações dentro do sistema irradiado. Portanto, a partir das características da radiação espalhada do sistema, é possível obter informações sobre a estrutura e a dinâmica molecular do meio espalhador.

Na técnica de espalhamento de luz, a amostra que está contida dentro de uma pequena célula de vidro, a qual está inserida em uma cuba, também de vidro, é irradiada por um feixe de luz monocromático. A onda eletromagnética ao interagir com a amostra é desviada para todas as direções. A cuba aonde a célula contendo a amostra está inserida é preenchida com solvente de índice de refração similar ao do vidro (tolueno  $n_0 = 1,497$  ou decalina,  $n_0 = 1,469$ ), a fim de minimizar eventuais reflexões originárias da célula porta-amostra. Nestas técnicas, a luz empregada é geralmente uma fonte de laser de He-Ne ou de  $Ar^+$ , com potência variável entre 15 e 100 mW. A pequena quantidade de luz espalhada é detectada em uma fotomultiplicadora que se encontra perpendicular ao ângulo de espalhamento  $\theta$  em relação ao feixe de radiação incidente, conforme ilustrado na Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Representação esquemática básica para um experimento de espalhamento de luz, adaptado de Giacomelli.<sup>78</sup>

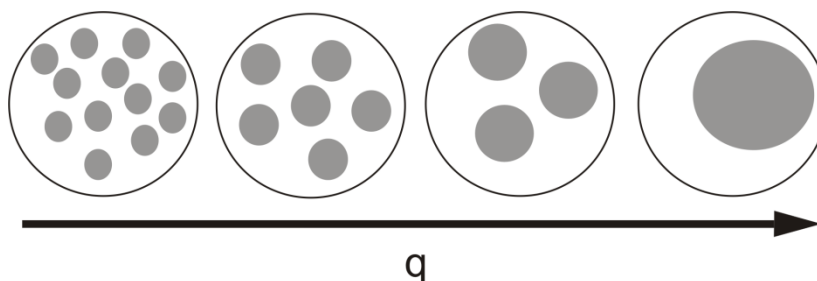
As informações exploradas através da técnica de espalhamento de luz estão contidas no parâmetro conhecido como vetor espalhamento  $|\vec{q}|$ , cujo módulo denominaremos simplesmente  $q$ , o qual é simplesmente a diferença vetorial entre o vetor  $|\vec{K}_i|$  que é o vetor de onda da radiação incidente, cuja magnitude é de  $2\pi/\lambda$  e o vetor de onda da radiação espalhada  $|\vec{K}_e|$ . Essa radiação espalhada corresponde ao que se conhece por espalhamento Rayleigh, desde que a dimensão da partícula sob análise seja bem menor do que  $\lambda$ . Toda via, o valor de  $\theta$  e o índice de refração do solvente onde as partículas estão imersas ( $n_0$ ) devem ser levados em conta, uma vez que este último muda o comprimento de onda da luz incidente comparado com o valor no ar.

Aplicando-se a equação 3.1 é possível a determinação do valor de  $q$ :

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \text{sen} \left( \frac{\theta}{2} \right) \quad (3.1)$$

que permite a observação dos objetos, os quais, no nosso caso, são nanopartículas micelares.

Na Figura 3.2 está representado o significado físico de  $q$ . Quanto menor for o valor de  $q$  (menor ângulo de observação), menor será a magnificação da estrutura observada. Diz-se também, que a técnica de espalhamento de luz funciona como um microscópio ao inverso, pois  $q$  possui dimensão inversamente proporcional ao tamanho da partícula em observação.<sup>78</sup>



**Figura 3.2.** Relação entre o vetor de espalhamento e partículas em observação.

### 3.6.1 Espalhamento de Luz Dinâmico

O espalhamento de luz dinâmico é descrito pela sigla DLS, a qual tem origem nas iniciais do nome em inglês “Dynamic Light Scattering”. O DLS algumas vezes é também descrito como espalhamento de luz quase-elástico QLS (quasielastic light scattering).<sup>79</sup>

O fundamento principal da técnica de DLS, ou espectroscopia de correlação de fótons, está centrado na determinação das flutuações na intensidade da luz espalhada pelo sistema irradiado (partículas), em função do tempo, bem como, no cálculo da respectiva função de autocorrelação. Esta técnica apresenta uma vantagem comparada ao espalhamento de luz estático por permitir a determinação da distribuição do diâmetro das partículas e não apenas um valor médio de diâmetro. Outra importante vantagem que se obtém com o emprego do DLS é a obtenção de informações sobre a composição superficial das partículas, uma vez que, o método é sensível ao diâmetro hidrodinâmico efetivo, que equivale ao raio da partícula somado ao raio da camada de solvatação.<sup>78,79,80,81,82</sup>

Sabe-se que partículas em um meio líquido movem-se, ao acaso, aleatoriamente, o que se conhece como movimento Browniano, devido a colisões com as moléculas do meio de dispersão.<sup>78,79,81,82</sup> Portanto, a técnica do DLS é eficaz para detectar flutuações temporais na intensidade de luz espalhada devido a flutuações de concentração e densidade na amostra, causadas pelo movimento Browniano. Por meio de um correlador digital, o número de fótons que entra no detector é gravado e analisado, sendo o sinal da radiação assim adquirido na forma de uma função de correlação temporal.<sup>78,79</sup>

Estas flutuações são provindas das variações no índice de refração dentro do volume de espalhamento, devido ao movimento Browniano das partículas. Desta forma, as flutuações locais dentro do volume de espalhamento estão relacionadas com o coeficiente de difusão aparente e o vetor de onda do espalhamento, segundo a equação 3.2.

$$\Gamma = D \cdot q^2 \quad (3.2)$$

onde,  $\Gamma$  é a constante de correlação ou de relaxação,  $D$  é o coeficiente de difusão aparente e  $q$  é o vetor de onda do espalhamento.

O experimento de DLS consiste, portanto, em obter a flutuação do sinal de intensidade de luz espalhada com o tempo, realizar o cálculo da correlação desses valores e, por transformada de Fourier, obter o espectro de freqüências de flutuação. Ajustando-se esse espectro por uma curva Lorentziana, conforme equação 3.3, e utilizando-se o valor da meia altura à meia largura da curva, obtém-se a respectiva constante de correlação,  $G(\tau)$ , ou constante de relaxação.

$$G(\tau) = A + B \exp(-2Dq^2\tau) \quad (3.3)$$

onde  $A$  é o valor da linha base e  $B$  é o fator pré-exponencial contendo constantes ópticas do equipamento e da amostra.<sup>79</sup>

Essa equação pode ser também escrita como uma transformada inversa de La Place conforme equação 3.4.<sup>20,27,78</sup>

$$g_2(t) - 1 = \beta \left[ \int A(\tau) \exp(-t/\tau) d\tau \right]^2 \quad (3.4)$$

onde  $t$  é o de retardo das funções de correlação. A função resultante  $A(\tau)$  é uma distribuição dos tempos de relaxação.

Essa transformação normalmente é efetuada com uso do programa CONTIN<sup>83</sup> ou do algoritmo REPES, ambos integrantes do pacote de programas comerciais GENDIST.

O valor do coeficiente de difusão é, então, calculado por meio da equação 3.2.

Uma vez que o coeficiente de difusão aparente pode conter contribuições tanto do movimento rotacional como do translacional, é necessário extrapolar o coeficiente de difusão aparente ao vetor de onda puro ( $D_0$ ) para se obter o coeficiente de difusão translacional. O raio hidrodinâmico das partículas ( $R_H$ ) é obtido de  $D_0$ , aplicando-se a equação de Stokes-Einstein (3.5).<sup>20,27,78,79</sup>

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D_0} \quad (3.5)$$

onde  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta e  $\eta$  é a viscosidade do solvente.

A investigação do tamanho das partículas formadoras da solução coloidal foi realizada através de espalhamento de luz dinâmico (DLS). As análises preliminares foram realizadas em um goniômetro ALV, que consiste de um laser He-Ne polarizado linear, operando em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 632,8 nm e um correlador digital multi  $\tau$  ALV-5000/EPP, com tempo de amostragem inicial de 125 ns. Os dados foram registrados usando um software de controle correlador ALV.

Soluções das micelas foram mantidas em temperatura constante de  $25.0 \pm 0.1$  °C em todos experimentos. As soluções foram colocadas em células de vidro de 10 mm de diâmetro. O volume mínimo de amostra requerido para experimentos de espalhamento de luz foi 1.0 mL. Os ângulos de espalhamento acessíveis variaram de 15° a 150°, correspondentes aos vetores de onda ( $q$ ) entre  $3.63 \times 10^{-3}$  e  $2.68 \times 10^{-2}$  nm<sup>-1</sup> para meio orgânico e  $3.45 \times 10^{-3}$  e  $2.55 \times 10^{-2}$  nm<sup>-1</sup> meio aquoso, conforme equação 3.1

As distribuições dos tempos de relaxação  $A(\tau)$  foram obtidas usando o programa comercial CONTIN<sup>83</sup>, através de análise da função de auto-correlação  $C(q, \tau)$ . O coeficiente de difusão aparente ( $D_{app}$ ) foi calculado a partir da variação da frequência de relaxação ( $\Gamma$ ) como uma função de  $q^2$  através da equação 3.2,

O coeficiente de difusão translacional em diluição infinita ( $D_0$ ) foi então calculado de  $D = D_0(1 + k_d C_p)$  onde  $k_d$  é o coeficiente de concentração virial. Os raios hidrodinâmicos ( $R_H$ ) foram obtidos através da equação (3.5) de Stokes-Einstein.

Todo aparato utilizado para as análises de DLS são pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal do ABC de Santo André, São Paulo.

### 3.7 Procedimento Experimental

#### 3.7.1 Síntese do pré-ligante 1-(4- amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazeno (1)

Para a síntese do pré-ligante 1 usou-se a rota descrita por Hartman<sup>84</sup>, a qual consiste na reação de um sal de diazônio e uma amina aromática em pH ácido e baixa temperatura.

Solubilizou-se inicialmente a 4-aminobenzamida (1,362 g, 10 mmols) em 30 ml de uma solução 2:1 v:v de H<sub>2</sub>O/HCl. Com a temperatura em 0°C adicionou-se

lentamente nitrito de sódio (0,73 g, 10 mmols + 5% em excesso), sob constante agitação e temperatura controlada, para a formação do respectivo sal de diazônio. Após 15 minutos adicionou-se lentamente a 4-aminoacetofenona previamente dissolvida em acetona, deixando-se a reação sob vigorosa agitação por mais 30 minutos. Em seguida a solução foi neutralizada lentamente adicionando-se uma solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ao longo de 2h, o que resultou na formação de um precipitado amarelo. A solução foi deixada em repouso por 12h sob uma temperatura de aproximadamente 5 °C. Esta etapa aumentou consideravelmente a formação do precipitado. Posteriormente filtrou-se a solução e o precipitado foi lavado com água e seco sob vácuo. Rendimento com base na 4-aminobenzamida: 87,2% (2,3747 g, 8,72 mmols) . Ponto de fusão 218 °C. Cristais amarelos de **1**, do tipo bloco, apropriados à difração de raios-X foram obtidos através da dissolução do mesmo em acetona, seguido da evaporação lenta do solvente.

### **3.7.2 Síntese do composto [1-(4-amidofenil)-3-(4-acetilfenil)triazenido]-(trifenilfosfina)ouro(I) (2)**

Em um béquer de 100 ml dissolveu-se 100 mg (0,367 mmols) de **1** numa mistura 1:1 (v:v) de etanol/piridina, deixando a solução sob agitação por 15 minutos. Em seguida o composto **1** é desprotonado com uma solução de KOH, passando a apresentar uma coloração amarelo tijolo. Por fim adicionou-se 182,65 mg (0,367 mmols) de cloreto de trifenilfosfina ouro(I) Au(PPh<sub>3</sub>)Cl em pó, passando a solução a apresentar coloração levemente amarelada nas extremidades do frasco. A reação ficou sob agitação por aproximadamente 12 horas para total complexação. Posteriormente filtrou-se a solução, deixando-se o precipitado secar a temperatura ambiente, protegido da luz. Rendimento com base em **1**: 241,21 mg (0,324 mmols) (88%). Ponto de fusão 190 °C. Cristais amarelos de **2**, do tipo bloco, aptos à difração de raios-X foram obtidos através da dissolução do mesmo em uma mistura 1:1 (v:v) de etanol/piridina, seguido da evaporação lenta dos solventes em ambiente refrigerado.

### **3.7.3 Métodos de preparação e manipulação das micelas**

Os sistemas coloidais formados por nanopartículas auto-organizáveis foram desenvolvidos inicialmente pelos métodos de nanoprecipitação (Np) e dissolução

indireta (DI), usando-se Ac.(acetona), EtOH e THF e os copolímeros tribloco poli(óxido de etileno)-*b*- poli(glicerol monometacrilato)-*b*-poli(metacrilato de 2-(diisopropil-amino)etila) PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> sintetizado anteriormente<sup>20</sup> e dibloco poli(estireno)-*b*-poli(ácido acrílico) PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub> adquirido comercialmente. Posteriormente estudos foram desenvolvidos explorando-se os métodos de carregamento por diálise e pré-filme com base no trabalho relatado por Vyhnalkova et al.,<sup>29</sup> usando-se os copolímeros PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> e PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub>.

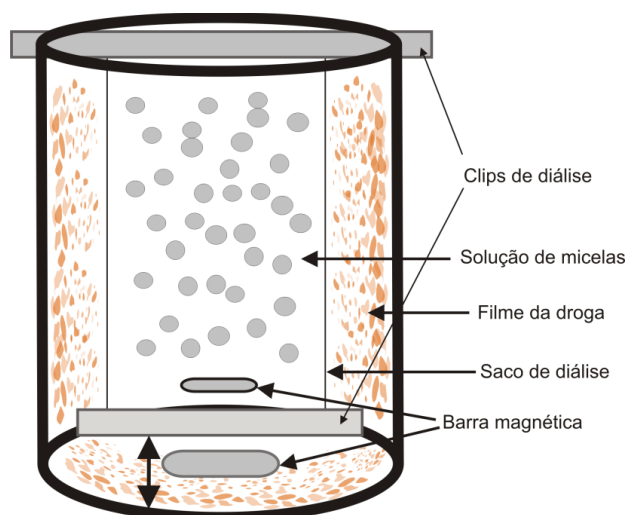
No método de Np, também chamado de método de deslocamento do solvente, a fase orgânica contendo a droga e o polímero dissolvidos em um solvente de polaridade intermediária e miscível com água, por exemplo, Ac., EtOH e THF, é vertida, sob agitação, sobre uma fase aquosa. Nanoesferas formam-se instantaneamente, como resultado da separação de fases líquido-líquido, com rápida difusão do solvente e agregação do polímero em gotas individuais. As nanoesferas preparadas pelo método de Np formam-se quase que instantaneamente, pois a força dirigente é a separação de fases. Portanto, esse método aplica-se a encapsulações de substâncias pouco solúveis em água, sendo que os parâmetros mais críticos para a formação instantânea da dispersão coloidal é a concentração de polímero na fase orgânica e a razão de volume entre as duas fases.

Conforme já mencionado, na DI a micelização ocorre a partir do momento que uma concentração de água crítica é atingida. Assim que esta CAC é atingida tem-se o início da micelização e, toda via, a droga pode ser encapsulada mais eficientemente se ocorrer uma interação favorável com o polímero e apresentar uma solubilidade equivalente. Desta forma, se a droga for muito mais solúvel, ela precipitará quando as partículas já estão formadas, e, assim, a encapsulação não será eficiente. Por outro lado, se ela for muito hidrofóbica, acabará precipitando muito antes da partícula começar a se formar, o que resultará também em uma ineficiência no processo de encapsulação. Esse equilíbrio entre as fases mostra-se, portanto, muito sutil, não havendo até o momento uma teoria que explique os fenômenos envolvidos nesses processos.

O método de diálise consiste na formação de um filme da droga na parede de um frasco de vidro, formado pela dissolução da droga em Ac. seguido da evaporação lenta do solvente. Ao frasco com o filme adiciona-se água. As micelas são preparadas por Np e removido o solvente por diálise. Após a remoção do



solvente o saco de diálise com a solução de micelas é imerso na água do frasco contendo o filme da droga e agitado lentamente por 48hs. A Figura 3.3 representa o procedimento de carregamento de micelas por diálise.



**Figura 3.3.** Representação do método de carregamento de micelas por diálise, adaptado de Vyhalkova et al.<sup>29</sup>

O método de pré-filme é similar ao da diálise, pois também envolve a formação do filme na parede de um frasco, porém, o carregamento se dá por meio de contato direto da solução de micelas com o filme, ou seja, a solução de micelas, após a remoção do solvente, é vertida no frasco contendo o filme da droga e agitada vigorosamente.

As nanopartículas preparadas neste trabalho apresentaram boas capacidade e eficiência de encapsulação, mediante os métodos de investigação aplicados. A concentração de polímero ( $C_p$ ) de 1,67 mg/mL foi determinada em função do equilíbrio de solubilidade entre a droga e o polímero, ou seja, concentrações de polímero foram variadas para se determinar a melhor razão a ser adotada. Essa concentração também foi determinada em função da possibilidade de comparação com outros trabalhos que usaram estes mesmos valores.

A eficiência de encapsulação (Eq. 3.6), nos dá uma informação, em percentual (%), da razão entre a concentração real na solução de trabalho e a concentração teórica na solução de trabalho. A EE deve ser maximizada, ou seja,

EE→100, pois é inversamente relacionada à quantidade de substância não encapsulada é perdida na maioria das vezes.

$$EE = \frac{\text{massa de droga nas micelas (g)}}{\text{massa de droga usada (g)}} .100 \quad (3.6)$$

A capacidade de encapsulação (Eq. 3.7) expressa a razão entre a massa da droga na CR, em gramas, pela massa de polímero em gramas.

$$CE = \frac{\text{massa de droga nas micelas (g)}}{\text{massa das micelas (g)}} .100 \quad (3.7)$$

### 3.8 Atividade Biológica.

Os estudos de atividade biológica foram realizados em colaboração com laboratório da Professora Dr<sup>a</sup> Rosmari Hörner, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM. Os ensaios envolvendo os dois compostos sintetizados neste trabalho consistem na avaliação da *Atividade Citotóxica* e *Atividade Antibacteriana*.

#### 3.8.1 Atividade antibacteriana dos composto 1 e 2

Testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados pelo método de microdiluição em caldo utilizando caldo Mueller Hinton suplementado por cátion (Difco, Detroit, MI), de acordo com o protocolo do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).<sup>85</sup>

Suspensões de inóculo foram preparadas diluindo-se o caldo de cultura sobrenadante com salina estéril com densidade de 0,5 (padrão McFarland) utilizando um espectrofotômetro Bausch & Lomb Spectronic 20.

Todos os compostos foram testados em concentrações variando de 0,125-128 mg/mL e dissolvido em 20% de etanol. As placas foram incubadas sem agitação a 35 ± 2 °C por 24 h. A técnica é baseada no crescimento dos organismos de teste (inóculo + compostos) em relação ao controle positivo (bactérias sem composto), com adição, após 24 h, de 10 mL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC ) 2%. O

TTC é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido. Microorganismos vivos reduzem o TTC por ação enzimática, originando o formazan mantido dentro de grânulos nas células, que se tornam vermelhos. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) foram definidos como a menor concentração de compostos triazeno que inibiu o crescimento visível dos microrganismos. Todos os testes foram feitos três vezes.

### **3.8.2 Análise da citotoxicidade *in vitro* frente a células leucêmicas dos compostos 1 e 2**

Os estudos de atividade citotóxica *in vitro* de ambos os compostos, na sua forma natural (não encapsulados), foram desenvolvidos usando-se amostras de medula óssea excedentes das rotinas de diagnóstico, as quais foram coletadas de pacientes que procuraram o Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), com sintomas clínicos de leucemia. Cabe ressaltar que no momento da coleta estes pacientes ainda não haviam sido submetidos a tratamento antineoplásico, e aguardavam o diagnóstico citogenético a fim de confirmar a suspeita clínica da doença.

Depois de identificadas (Paciente 1 a 7), as amostras foram processadas e submetidas ao teste de citotoxicidade desenvolvidos com base no método de redução do {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (MTT) descrito por Mossmann.<sup>86</sup> As concentrações do composto **1** utilizadas foram 12,5 µmol/ mL, 50 µmol/mL, 100 µmol/mL. Após a realização da técnica o percentual de sobrevivência celular na presença do composto foi calculado.

O MTT foi dissolvido em tampão fosfato salino (PBS) a 5 mg.mL<sup>-1</sup> e filtrado para esterilizar e remover uma pequena quantidade de resíduo insolúvel. Azul de tripano (1% em suspensão de água destilada) e uma suspensão de células foram misturados em quantidades de 01:06 (50 mL de células + 10 mL de azul de tripano). A quantidade de células foi estimada por homocitometria e células de coloração azul foram marcadas como mortas. As doses da droga (**1** e **2**) variaram de 12,5, 50 e 100 µM. Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), o qual não pode exceder a 0,25% na cultura de células. Culturas controles foram realizadas com células sem os compostos testados. Após 20 horas a solução de MTT foi adicionada a todos os poços e as placas foram incubadas a 37 °C por 4 horas. No final do

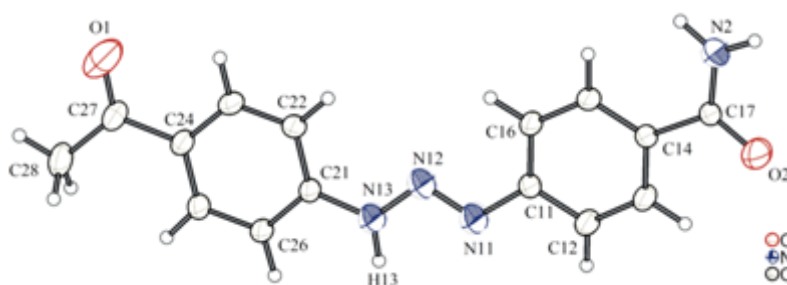
período de incubação o produto formazan foi dissolvido em 100 mL de DMSO. A densidade óptica (OD) de cada poço foi medida usando um leitor Fischer Bio-Tek BT 2000 MicroKinetics ( $\lambda = 570$  nm). Cada ensaio foi realizado três vezes. A fração de sobrevivência celular foi calculada pela seguinte equação:

Sobrevivência da célula = (OD dos poços tratados / média do OD dos poços controles) x 100%.

## 4 Discussão dos Resultados

### 4.1 Discussão da estrutura cristalina do composto 1-(4-acetilfenil)-3-(4-amidofenil)triazeno (1)

Cristais do composto **1** (ligante) foram obtidos através da sua dissolução em acetona e subsequente evaporação lenta do solvente, formando cristais amarelos com hábito prismático, aptos à difração de raios-X. A Figura 4.1 ilustra a estrutura molecular de **1**.



**Figura 4.1.** Projeção da estrutura molecular da fórmula mínima do composto **1** com elipsóides térmicos em nível de probabilidade de 50%. Representação dos átomos de H com raio arbitrário.

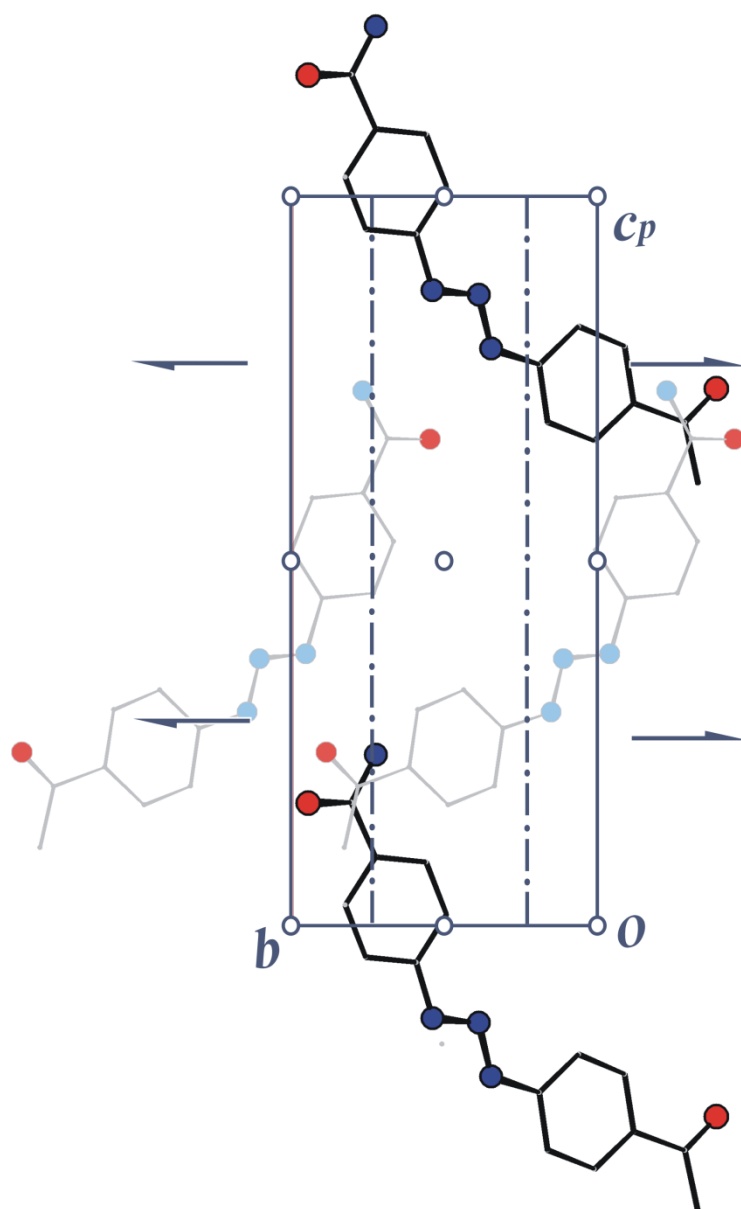
O composto **1** cristaliza no sistema cristalino monoclinico e teve sua estrutura cristalina determinada no grupo espacial  $P2_1/n$  (N°14).<sup>87</sup> Este grupo espacial apresenta uma simetria de Laue  $2/m$ . Analisando-se as reflexões coletadas verificou-se a ausência de uma sistemática nas condições de reflexão da classe integral

Após análise das reflexões coletadas, uma sistemática nas condições de reflexão da classe integral ( $hkl$ ) não foi encontrada, o que indica se tratar de uma rede com cela unitária do tipo Bravais  $P$ . A Tabela 4.1 resume as condições de reflexão observadas nas classes: integral ( $hkl$ ), zonal ( $h0l$ ) e serial ( $0k0$ ), vinculadas ao tipo de Bravais e aos operadores de simetria  $2_1$  e  $n$ .

**Tabela 4.1.** Condições de reflexão observadas e elementos de simetria correspondentes ao grupo espacial  $P2_1/n$ .

<b>Classe</b>	<b>Reflexão</b>	<b>Condição de extinção</b>	<b>Informação Obtida</b>
Integral	$hkl$	-	Tipo de Bravais – $P$
Zonal	$h0l$	$h + l = 2n + 1$	Oper. de Simetria – $n$
Serial	$0k0$	$k = 2n + 1$	Oper. de Simetria – $2_1$

A unidade assimétrica de **1** é composta por uma molécula do composto 1-(4-acetilfenil)-3-(4-amidofenil)triazeno. A fórmula mínima é equivalente a unidade assimétrica. A cela unitária de **1**, é constituída de quatro fórmulas mínimas. Cada fórmula mínima é reproduzida no espaço 3D aplicando-se os operadores de simetria  $2_1$  e  $n$  paralelos ao eixo cristalográfico  $a$ , o qual se projeta perpendicular ao plano do papel. A representação da Figura 4.2, ilustra as moléculas em escuro, no plano de projeção (papel) e as claras  $\frac{1}{2}$  abaixo ou acima do plano do papel.

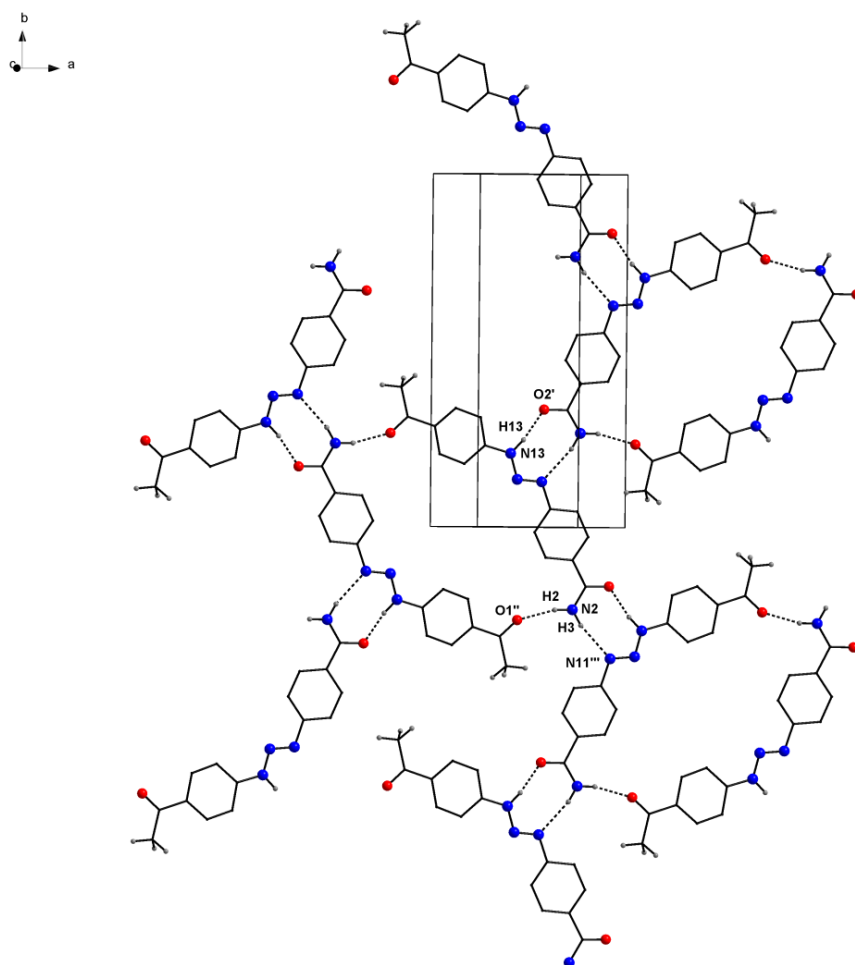


**Figura 4.2.** Projeção parcial da célula unitária de **1** com representação dos elementos de simetria pertencentes a célula monoclinica  $P2_1/n$ . Moléculas escuras acima do plano de projeção e claras abaixo do plano.

#### 4.1.1 Supramolecularidade

A análise cristalográfica revelou que a molécula estabelece um arranjo supramolecular 2-D, no qual dímeros centrossimétricos se relacionam através de um eixo axial de rotação-translação  $2_1$  paralelo à direção cristalográfica [010]. O arranjo bidimensional se concentra no plano de rede (103) e é descrito pelos vetores-base [010] e [301]. A Figura 4.3 ressalta a projeção da rede 2-D levemente inclinada em

relação à direção [001], destacando a orientação do plano (103) coincidindo com o plano do papel.



**Figura 4.3.** Projeção da cela unitária do composto 1, destacando as ligações de hidrogênio no plano de rede (103).

A Tabela 4.2 apresenta os dados geométricos das ligações de hidrogênio envolvidas na molécula que são responsáveis pela expansão da rede cristalina 2-D. Os comprimentos e ângulos de ligação selecionados encontram-se na Tabela 4.3.

**Tabela 4.2.** Ligações de hidrogênio com  $H \cdots A < r(A) + 2.000$  (Å) e ângulo DHA maior que  $110^\circ$ .

D – H...A	d(D – H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle D-H \cdots A$	Cód. de simetria
N13–H13...O2'	0,931	1,857	2,779	170,30	[ -x+3/2, y+1/2, -z+1/2 ]
N2–H2...O1''	0,955	2,026	2,960	165,45	[ -x, -y, -z+1 ]
N2–H3...N11'''	0,907	2,255	3,147	167,50	[ -x+3/2, y-1/2, -z+1/2 ]

D = átomo doador; A = átomo receptor

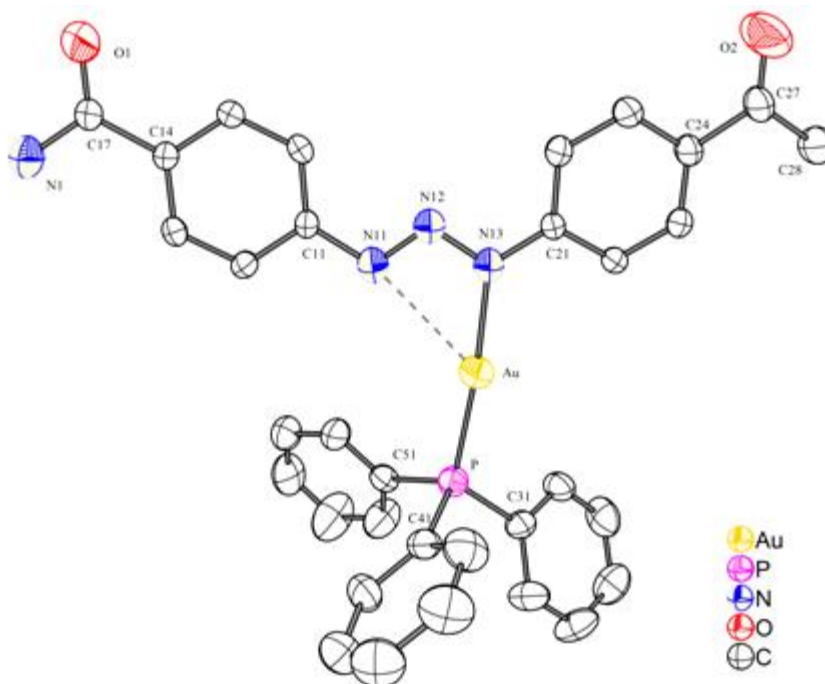


**Tabela 4.3.** Parâmetros geométricos selecionados do composto 1 (Å, °).

N11 – N12	1.2720(16)	C27 – O1	1.2418(17)
N12 – N13	1.3252(17)	C27 – C28	1.491(3)
N11 – C11	1.4125(18)	C14 – C17	1.4927(19)
N13 – C21	1.3873(17)	C17 – O2	1.215(2)
C24 – C27	1.482(2)	C17 – N2	
<hr/>			
N11 – N12 – N13			110.80(12)

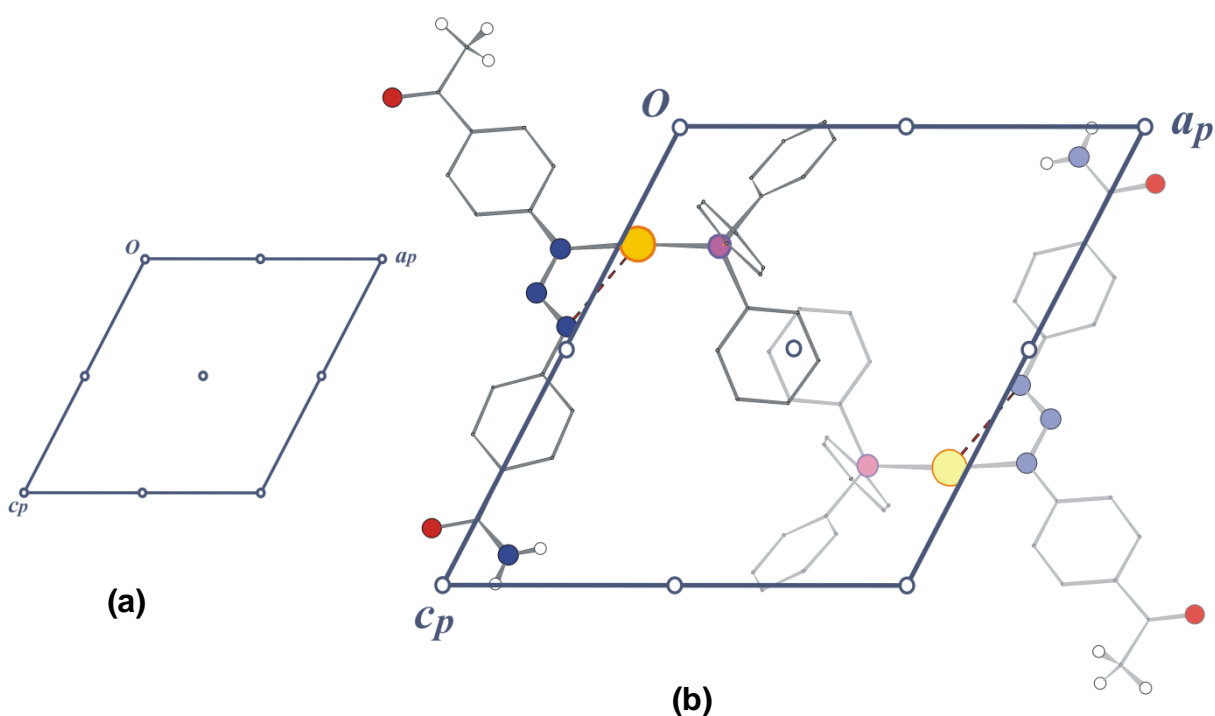
## 4.2 Análise estrutural do complexo de ouro 1-(4-acetilfenil)-3-(4-amidofenil)triazenido-(trifenilfosfina)ouro(I) (2)

Cristais do composto **2**, de coloração amarela, na forma de bloco, foram obtidos através da sua dissolução em uma mistura de solventes 1:1 v/v de etanol/piridina, seguido da evaporação lenta dos solventes. O composto **2**, conforme estrutura molecular representada na Figura 4.4, cristaliza no sistema cristalino triclinico e teve sua estrutura cristalina determinada no grupo espacial P 1 (Nº 2).<sup>87</sup>



**Figura 4.4.** Projeção da estrutura molecular do complexo 2 com elipsóides térmicos em nível de probabilidade 50%. Representação dos átomos de H com raio arbitrário.

A unidade assimétrica do composto **2** é composta de uma molécula do complexo 1-(4-acetilfenil)-3-(4-amidofenil)triazenido-(trifenilfosfina)ouro(I), sendo que a fórmula mínima completa corresponde à unidade assimétrica. A cela de **2** é composta por duas fórmulas mínimas, conforme é possível verificar na Figura 4.5, na qual, para aumentar a clareza da projeção, apresenta-se o pictograma do sistema cristalino triclinico, o qual consiste somente de centros de inversões como elementos de simetria que reproduzem conteúdo de cela.



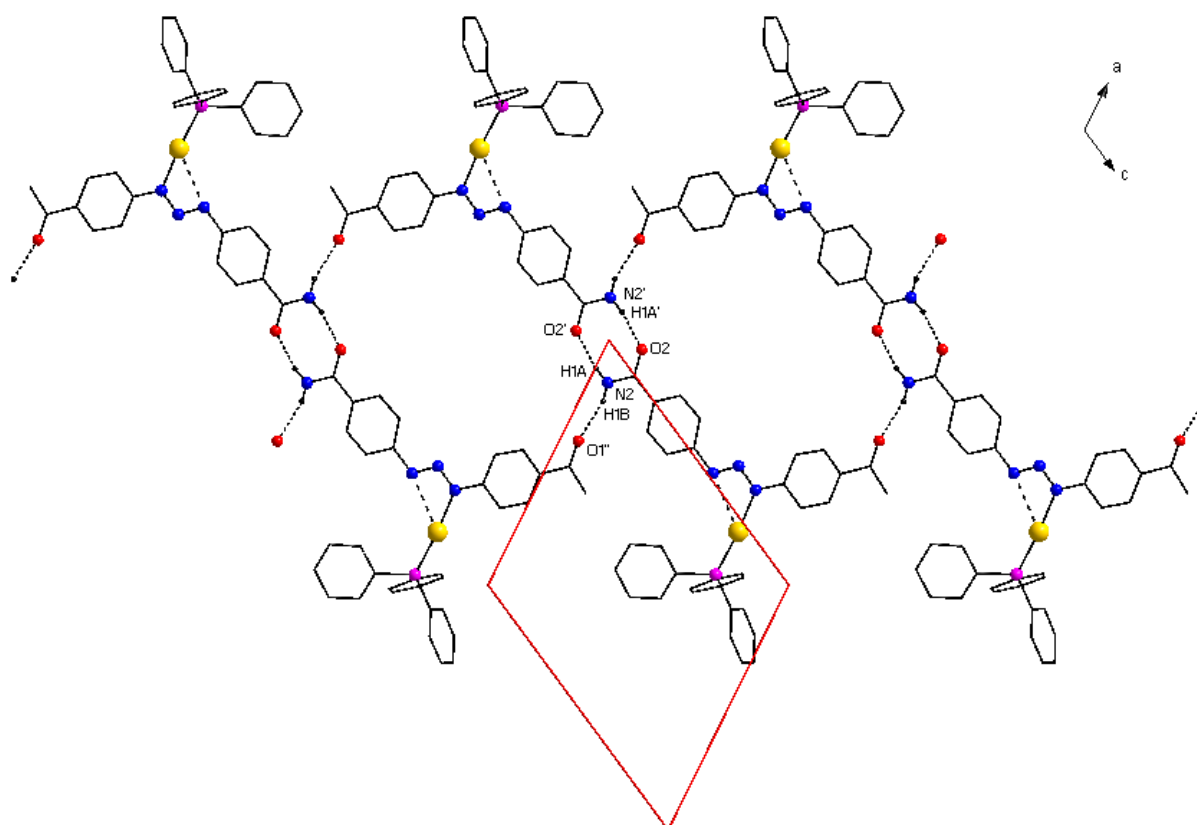
**Figura 4.5.** Pictograma do grupo espacial  $P(-1)$  (a) e cela unitária do complexo **2** no plano cristalográfico  $ac$ , com elementos de simetria pertencentes a cela triclinica  $P(-1)$  em (b). Os hidrogênios das fenilas e fenilenos foram omitidos para melhor visualização.

#### 4.2.1 Supramolecularidade

Todas as ligações de hidrogênio discutidas para o complexo apresentado estão baseadas em modelos já descritos na literatura, sendo que estas ligações foram parametrizadas conforme o programa *Mercury*,<sup>88</sup> da Cambridge Crystallographic Data Centre.

No complexo **2** existe a presença de ligações de hidrogênio clássicas centrossimétricas  $N-H\cdots O$  e ligações de hidrogênio não-clássicas centrossimétricas

C-H...O, as quais formam um arranjo supramolecular bidimensional. Na estrutura cristalina do complexo **2** podemos observar a formação de dímeros centrossimétricos que se expandem na direção cristalográfica [1 1 1] via ligações de hidrogênio clássicas centrossimétricas N1-H1A...O1' [N1...O1' = 2,9552 Å; N1-H1A...O1' = 164,19 °] e N1-H1B...O2'' [N1...O2'' = 2,9733; N1-H1B...O2'' = 161,39], conforme descrito na Figura 4.6 [Códigos de simetria ('): 2-x, -y, -z; (''): -1+x, -1+y, -1-z].



**Figura 4.6.** Projeção do arranjo supramolecular 1-D do complexo **2** no eixo cristalográfico *b* em função das ligações de hidrogênio clássicas centrossimétricas N2-H1A...O2' e N2-H1B...O1'. [Códigos de simetria ('): 2-x, -y, -z; (''): -1+x, -1+y, -1-z].

As ligações de hidrogênio não-clássicas centrossimétricas C44-H44...O2''' [3,4491 Å ; 139,33°] reproduzem essa cadeia de dímeros centrossimétricos formando cadeias que crescem na direção cristalográfica [1 1 0]. Desta forma tem-se a formação de um arranjo supramolecular 2-D que se reproduz nas direções cristalográficas [1 1 1] e [1 1 0] conforme Figura 4.7 e Figura 4.8 [Código de simetria (''''): 2-x, -y, 1-z]. Os comprimentos (Å) e os ângulos (°) das interações de hidrogênio intermoleculares responsáveis pela expansão da rede 2-D são resumidos na Tabela

4.4. Os comprimentos e ângulos de ligação selecionados encontram-se na Tabela 4.5.

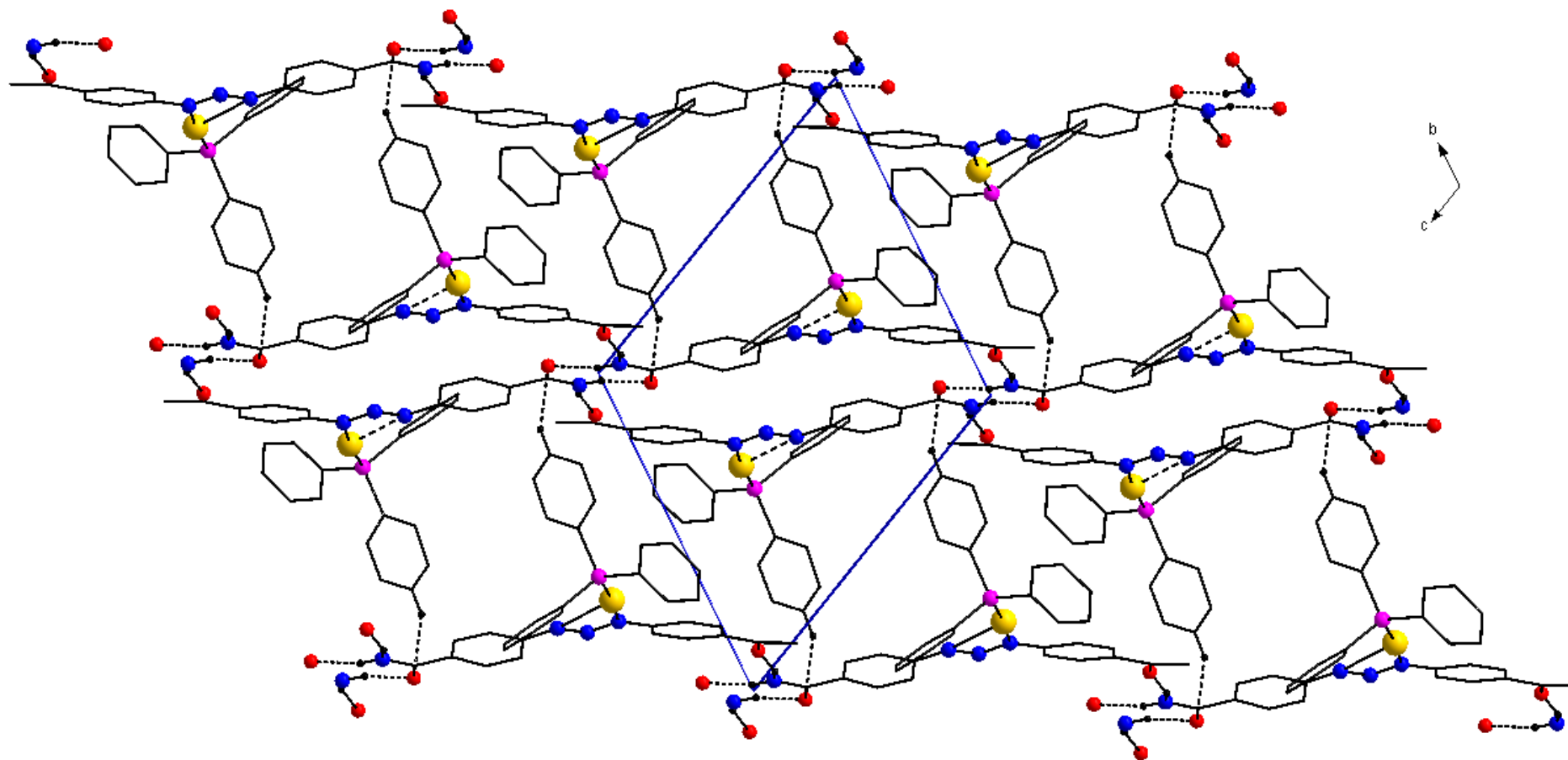
**Tabela 4.4.** Comprimentos (Å) e ângulos de ligação (°) relacionados às interações intermoleculares existentes na estrutura cristalina do complexo 2.

D – H...A	d(D – H)	d(H...A)	d(D...A)	∠D-H...A	Cód. de simetria
N2–H1A...O2'	0.86	2,1185	2,9552	164,19	[2-x, -y, -z]
N2–H1B...O1''	0.86	2,1456	2,9733	161,39	[-1+x, -1+y, -1-z]
C44–H44...O2'''	0.93	2,6901	3,4491	139,33	[2-x, -y, 1-z]

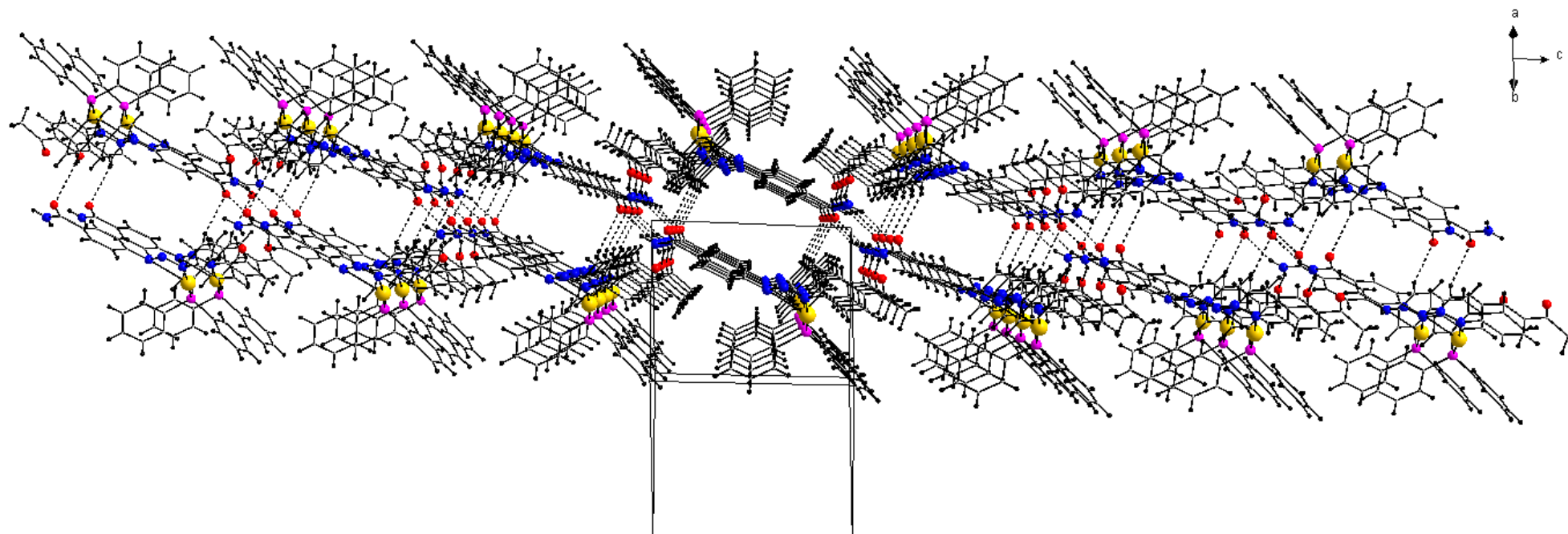
D = átomo doador; A = átomo receptor

**Tabela 4.5.** Parâmetros geométricos selecionados do composto 2.

Au – N13	2.062(6)	N11 – C11	1.421(8)
Au – N11	2.824(6)	N13 – C21	1.380(8)
Au – P	2.224(19)	C24 – C27	1.489(10)
N11 – N12	1.274(8)	C27 – O2	1.202(11)
N12 – N13	1.320(8)	C27 – C28	1.552(13)
P – C31	1.821(8)	C14 – C17	1.487(9)
P – C41	1.823(8)	C17 – O1	1.235(9)
P – C51	1.820(8)	C17 – N1	1.343(9)
N11 – N12 – N13	111.80(6)	N13 – Au – P	174.48(15)



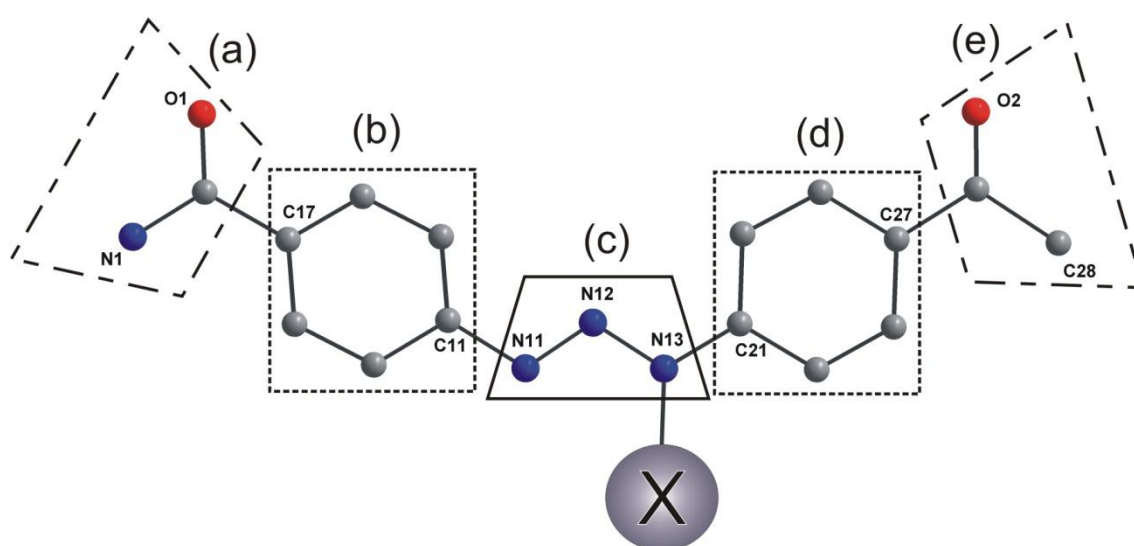
**Figura 4.7.** Projeção do arranjo supramolecular 2-D do complexo **2** no eixo cristalográfico **a** em função da cadeia de dímeros centrossimétricos que se reproduzem em uma cadeia infinita na direção cristalográfica [1 1 1]. [Código de simetria (""): 2-x, -y, 1-z].



**Figura 4.8.** Projeção do arranjo supramolecular 2-D do complexo **2** na direção cristalográfica  $[1\ 1\ 0]$  apresentando conteúdo parcial de célula unitária.

### 4.3 Estudos do desvio médio da planaridade

Para verificar as variações na planaridade dos compostos **1** e **2**, um estudo em função dos valores de desvio médio quadrático rms (*root-mean-square*) e distâncias interplanares foi desenvolvido. Na Figura 4.9 estão projetados simultaneamente os fragmentos (a) C(O)NH<sub>2</sub>; (b) C11-C16; (c) N=N-N(H); (d) C21-C26; (e) C(O)CH<sub>3</sub> para **1** e **2**. Na Tabela 4.6 estão listados os valores de rms e na Tabela 4.7 encontram-se os valores dos ângulos interplanares entre os fragmentos dos compostos **1** e **2**.



**Figura 4.9.** Fragmentos genéricos de **1** e **2**, onde X = H para o composto **1** e PPh<sub>3</sub> para o **2**.

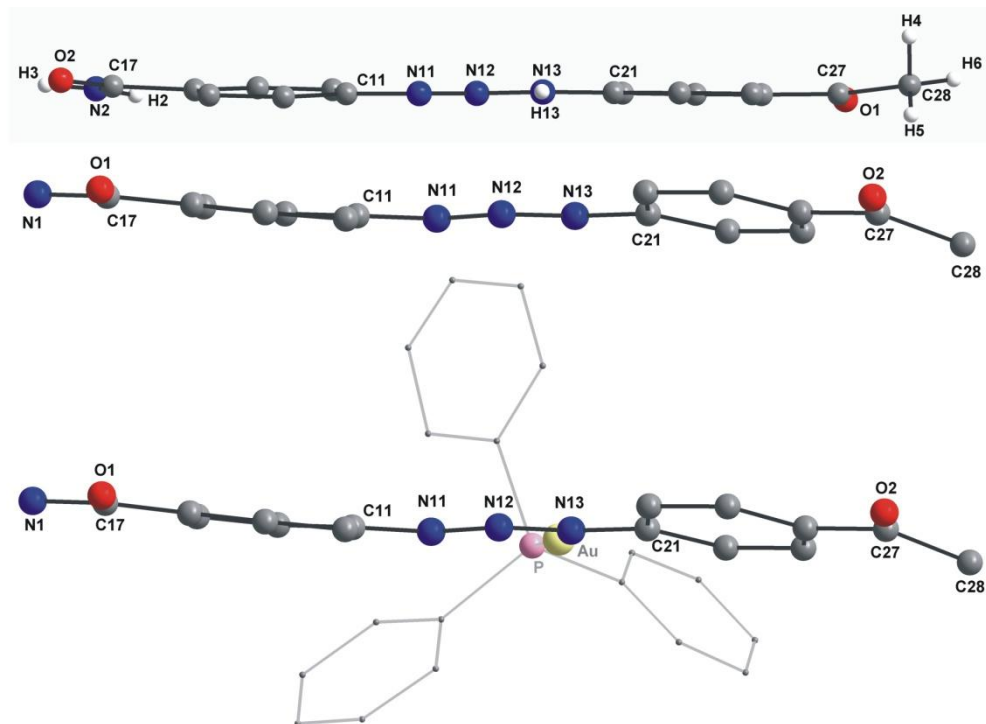
**Tabela 4.6.** Valores de rms (Å) para os fragmentos (b) e (d) dos compostos **1** e **2**.

	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
<b>1</b>	#	0.0050	#	0.0014	#
<b>2</b>	#	0.0213	#	0.0091	#

Analisando os dados da tabela acima verifica-se variações pequenas e pouco significantes nos valor rms, indicando uma considerável planaridade nos dois compostos, o que pode ser melhor verificado na Figura 4.10.

**Tabela 4.7.** Valores das distâncias interplanares dos compostos **1** e **2**.

	(a) / (b)	(b) / (c)	(c) / (d)	(d) / (e)	(b) / (d)
<b>1</b>	7,20(0,17)	4,19(0,15)	1,40(0,15)	6,27(0,28)	3,79(0,09)
<b>2</b>	4,72(1,07)	6,82(0,90)	12,00(0,72)	8,00(1,54)	13,21(0,44)



**Figura 4.10.** Representação dos desvios da planaridade dos composto **1** e **2**. Na parte superior o composto **1** e ao centro e a baixo o composto **2**.

Como mostra esta figura, e é possível verificar nos dados da Tabela 4.7, o composto **1** é plenamente plano, o que é reduzido em pequena dimensão quando da formação do complexo **2**.

Este estudo foi realizado para determinar a influência da planaridade dos compostos nas suas respectivas citotoxicidades, em função de um possível mecanismo de intercalação e posterior clivagem do DNA, o qual poderia ser desfavorecido pelo desvio na planaridade dos compostos. No entanto, essa idéia não foi confirmada, quando os compostos praticamente não apresentaram desvios em sua planaridade e, conforme apresentado adiante, uma significativa diferença em suas citotoxicidades foi observada. Portanto, com base nestes estudos no estado sólido, pode-se dizer que a diferença na citotoxicidade de **1** e **2** parece não ter relação com suas planaridades.

#### 4.4 Discussão da espectroscopia de infravermelho dos compostos **1** e **2**

Os espectros de infravermelho de **1** e **2** foram registrados entre 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , e a seguir serão apresentadas e discutidas as principais bandas de absorção observadas, com as respectivas correlações existentes segundo a



literatura.<sup>89,90,91,92,93</sup> A Tabela 4.8 apresenta as principais freqüências no infravermelho observadas para os compostos **1** e **2**.

No trabalho com compostos triazenos atenção especial dedica-se para as freqüências de absorção das ligações N=N, N-N e N-H. Estas absorções forneceram informações importantes sobre a formação da molécula do ligante (**1**), bem como, do complexo **2**, haja visto que a abstração do próton da molécula de **1** resulta no desaparecimento das freqüências de absorções referentes às ligações N=N, N-N e N-H e, por conseguinte, o surgimento de uma absorção de freqüência intermediária a estas, indicando a formação do estado ressonante, ou seja, deslocalização eletrônica na cadeia diazoamínica.

As principais bandas evidenciadas no espectro de **1** foram tratadas como ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3405  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  H-N-H do grupamento amida), 3212  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  N-H), 2746  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  N-H $\cdots$ O, N-H $\cdots$ N), 1661  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O), 1597  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=C de anel aromático), 1545  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-C, anel *para*-substituído), 1509  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  N-H). Um caso especial é evidenciado na banda localizada em 1430  $\text{cm}^{-1}$ , a qual corresponde ao estiramento da ligação ( $\nu$  C-H de anel aromático), bem como, ao estiramento da ligação N=N. Este fato pode ser verificado quando da diminuição desta banda no espectro do composto **2**, indicando a complexação do ligante ao íon metálico, não existindo portanto, a absorção da ligação N=N, sendo esta banda atribuída somente a absorção referente ao estiramento da ligação C-H.

A banda de média intensidade localizada na região 1392  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação C-N do grupamento amida. Na região de 1265  $\text{cm}^{-1}$  observa-se uma banda aguda de forte intensidade que corresponde ao estiramento da ligação C(Ph)-N.

Segundo a literatura<sup>90</sup> na região em torno de 1200  $\text{cm}^{-1}$  ocorre uma banda de intensidade média a forte como resultado da interação da vibração de deformação da ligação C-H com o estiramento da ligação C-C de anel aromático. No entanto, essa banda poderá variar sua posição em função de dois efeitos – interação no plano, acima de 1200  $\text{cm}^{-1}$ , em que o carbono (movendo-se tangencialmente) e seu hidrogênio movem-se em direções opostas – interação no plano, abaixo de 1200  $\text{cm}^{-1}$ , o carbono e seu hidrogênio geralmente movem-se na mesma direção. Esta variação é evidenciada nos espectros dos compostos **1** e **2**, quando para o

composto **1** a banda aparece em  $1212\text{ cm}^{-1}$  e no composto **2** a mesma banda é deslocada para a região de  $1189\text{ cm}^{-1}$ .

A banda localizada na região  $956\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação ( $\delta$  C–H aromático, no plano). Em  $836\text{ cm}^{-1}$  tem-se ( $\nu$  C–N),  $775\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta$  C–H aromático, fora do plano) e  $710\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta$  C=C aromático, fora do plano).<sup>89</sup>

Para análise do composto **2** é importante corroborar que quando um pré-ligante triazeno é desprotonado ocorre sumariamente o desaparecimento da banda ( $\nu$  N–H), indicando a formação do íon triazenido. Em consequência da complexação verifica-se o desaparecimento das bandas características N–N e N=N devido ao enfraquecimento destas e deslocalização eletrônica na cadeia diazoamínica originando uma banda referente ao modo vibracional  $\nu_{\text{as}}$  (N–N–N), geralmente com frequência intermediária aos valores de absorção das ligações N–N e N=N. Portanto, a banda referente ao estiramento ( $\nu$  N–H) no espectro do pré-ligante desaparecerá quando este coordenar-se a íons metálicos, indicando a desprotonação do grupo diazoamínico.<sup>93</sup>

No espectro do composto **2**, verifica-se a banda referente ao modo vibracional  $\nu_{\text{as}}$ (N–N–N) em torno de  $1298\text{ cm}^{-1}$ . Além desta, as principais evidências da complexação do ligante ao centro metálico são atribuídas ao desaparecimento da banda em  $2746\text{ cm}^{-1}$ , referente às interações de hidrogênio clássicas formadas entre N–H $\cdots$ O, N–H $\cdots$ N da cadeia triazenídica, e da banda em  $1509\text{ cm}^{-1}$  referente a ( $\delta$  N–H), bem como, às novas bandas registradas no espectro de **2**, duas em  $1502$  e  $1481\text{ cm}^{-1}$  e uma na região de  $750\text{ cm}^{-1}$ , que são originárias das absorções referentes as vibrações das ligações P–Ph.

Na Figura 4.11 é possível verificar a comparação dos espectros dos compostos **1** e **2** por sobreposição. Na região entre  $1400$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  verifica-se pequenas alterações no espectro comparado com as absorções e frequências do espectro do composto **1**, fato que, de certo modo, dificulta a identificação de novos modos vibracionais.

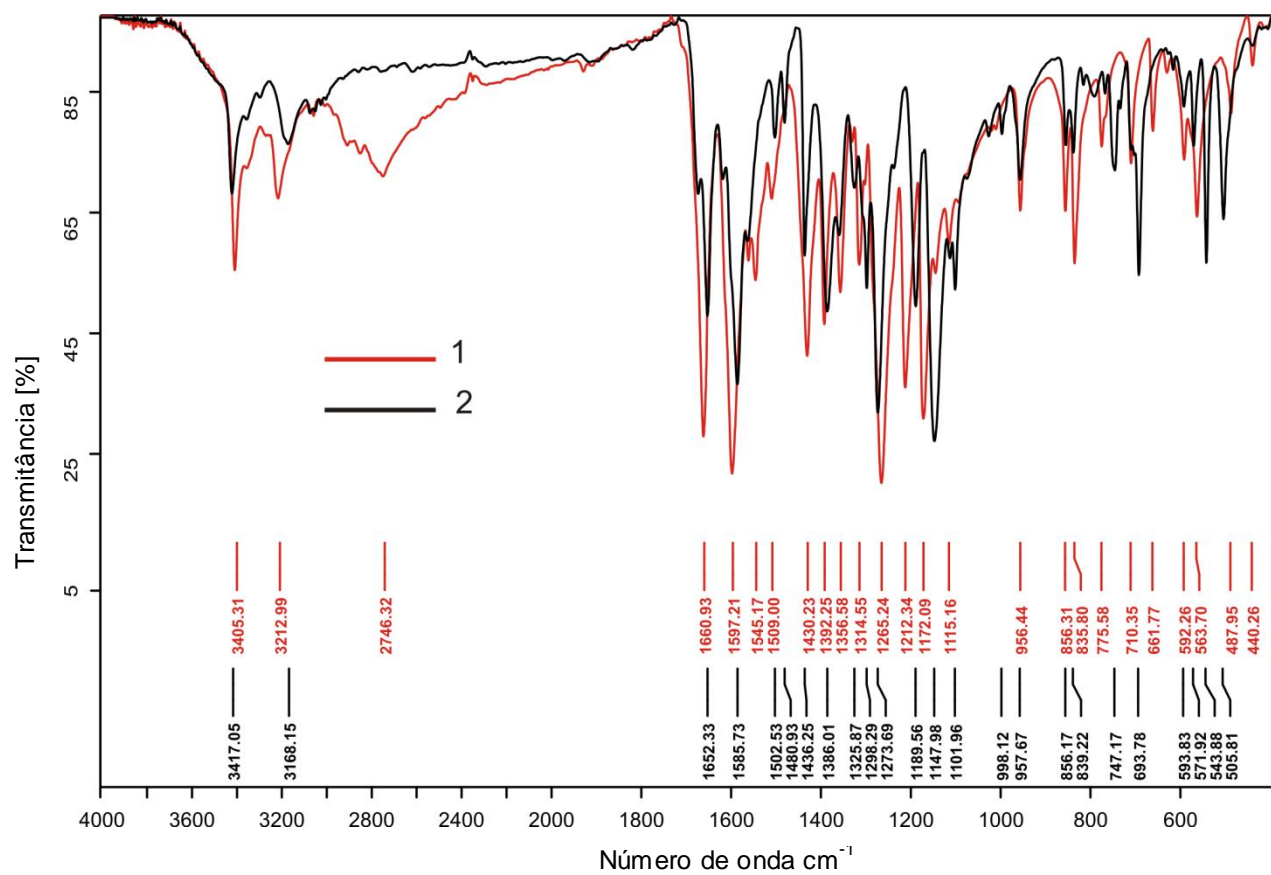


Figura 4.11. Sobreposição comparativa dos espectros vibracionais de IV dos compostos 1 e 2.

**Tabela 4.8.** Principais bandas dos espectros de IV do pré-ligante **1** e complexo **2**.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )			
1	Atribuição	2	Atribuição
3405 f	$\delta$ H-N-H	3418 f	$\delta$ H-N-H
3213 f	$\nu$ N-H	3169 f	$\nu$ N-H
2746 f	$\nu$ N-H...O, N-H...N	1653 m	$\nu$ C=O
1660 F	$\nu$ C=O	1586 F	$\nu$ C=C(Ph), $\delta$ C-H(Ph), $\nu$ C-N-H*
1597 F	$\nu$ C=C(Ph), $\delta$ C-H(Ph), $\nu$ C-N-H*	1502 f	$\nu$ P-Ph
1545 f	$\nu$ C-C (anel <i>para</i> -substituído)	1480 f	$\delta$ P-Ph
1509 f	$\delta$ N-H, $\nu$ C-C, $\delta$ C-H	1436 m	$\nu$ C(Ph)-H
1430 m	$\nu$ N=N, $\nu$ C(Ph)-H	1386 m	$\nu$ C-N**
1392 m	$\nu$ C-N**, $\nu$ N=N	1298 m	$\nu$ N-N-N
1356 f	$\delta$ C-H <sub>3</sub>	1274 F	$\nu$ C(Ph)-N
1314 f	$\nu$ C-N	1190 m	$\nu$ C-H e C=C (aromático, no plano)
1265 F	$\nu$ C(Ph)-N	1148 F	$\delta$ C(Ph)-H e $\nu$ P-Ph
1212 m	$\nu$ C-H e C=C (aromático, no plano)	958 f	$\delta$ C-H (aromático)
1172 F	$\nu$ N-N e $\delta$ C(Ph)-H	856 f	(wag) C-H (anel <i>para</i> -substituído)
956 f	$\delta$ C-H (aromático)	839 f	$\nu$ C-N
856 f	(wag) C-H (anel <i>para</i> -substituído)	747 f	$\nu$ P-Ph e $\delta_{out}$ C(Ph)-H
836 m	$\nu$ C-N	694 m	$\delta_{out}$ C=C (aromático)
775 f	$\delta_{out}$ C(Ph)-H	544 m	$\delta_{out}$ C(Ph)****
710 f	$\delta_{out}$ C=C (aromático)	506 m	$\delta_{out}$ C(Ph)***
662 f	$\nu$ C-H, C=C e C-C (anel <i>para</i> -substituído no plano)		
564 m	$\nu$ N-N		
488 f	$\delta_{out}$ C(Ph)***		

\* absorção oriunda da vibração de encurtamento da ligação N-H e alongamento da C-N do grupamento amida.<sup>90,91</sup> \*\* absorção resultante do estiramento da ligação C-N do grupamento amida.<sup>90</sup> \*\*\* deformação angular dos dois carbonos *para* substituídos do anel, que se movem na mesma direção.<sup>90</sup> \*\*\*\* deformação angular dos carbonos 1 e 4 do anel monosubstituído (P-Ph) juntamente com o hidrogênio do carbono 4 que se movem na mesma direção.<sup>90</sup>

#### 4.5 Discussão da espectroscopia de UV/Vis dos compostos 1 e 2

A espectroscopia de UV-Visível baseia-se na absorção de energia, por átomos e moléculas, na região de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 190 a 800 nm, gerando-se, por tanto, transições eletrônicas do estado fundamental a estados excitados. A absorção da radiação está diretamente ligada ao fato de as moléculas terem elétrons que podem ser promovidos a níveis de energia mais elevados por

decorrência da absorção da radiação. Desta forma cada transição eletrônica que ocorrer resultará em uma absorção específica e característica.

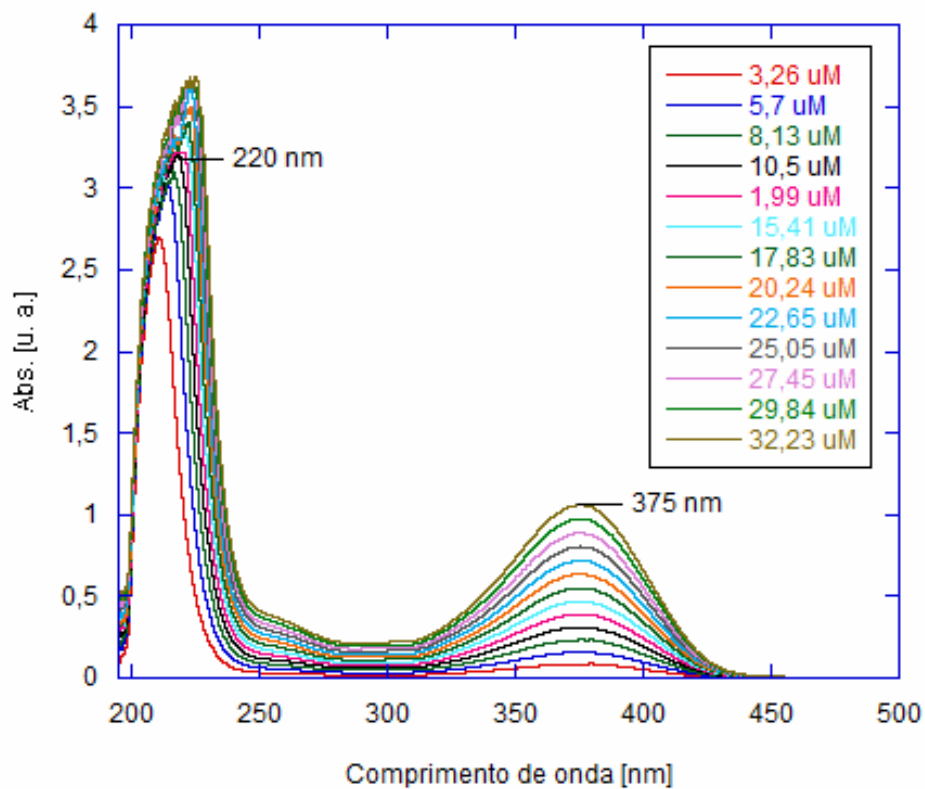
A aparição de uma banda no espectro de UV-Vis está diretamente vinculada à presença de um grupo cromóforo no composto em questão. Um grupo cromóforo, por tanto, é um grupo funcional que possui elétrons capazes de absorver energia UV-Vis e passar a um estado energético excitado. Quando da perda deste excedente de energia, os elétrons retornam ao seu estado fundamental, emitindo um fóton de luz equivalente a banda no respectivo espectro.

Por conta de restrições envolvendo simetria, que controlam a intensidade das transições eletrônicas, somente quatro transições são observadas e permitidas, sendo elas: elétrons de orbitais ligantes para orbitais antiligantes de mesma simetria ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) e de elétrons não ligados, ou seja, elétrons de orbitais atômicos, para orbitais moleculares antiligantes ( $n \rightarrow \sigma^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ ).<sup>94</sup>

Um amplo trabalho voltado ao estudo do comportamento solvatocrômico de compostos derivados do 1-3-diariltriazeno foi desenvolvido por Masoud, M.S. e colaboradores,<sup>68</sup> os quais constataram que tanto a natureza do solvente como dos substituintes, são responsáveis pela deslocização da banda de absorção características de trizenos. Efeitos como a formação de dipolos e ligação de hidrogênio são apontados como alguns dos responsáveis pela mudança do local de absorção dos grupos cromóforos.

Os espectros de UV/Vis dos compostos **1** e **2**, Figura 4.12 e Figura 4.13, respectivamente, foram registrados usando-se metanol como solvente e uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. Para o acompanhamento dos procedimentos de preparação das nanopartículas construiu-se uma curva analítica de ambos os compostos, conforme Anexo B.

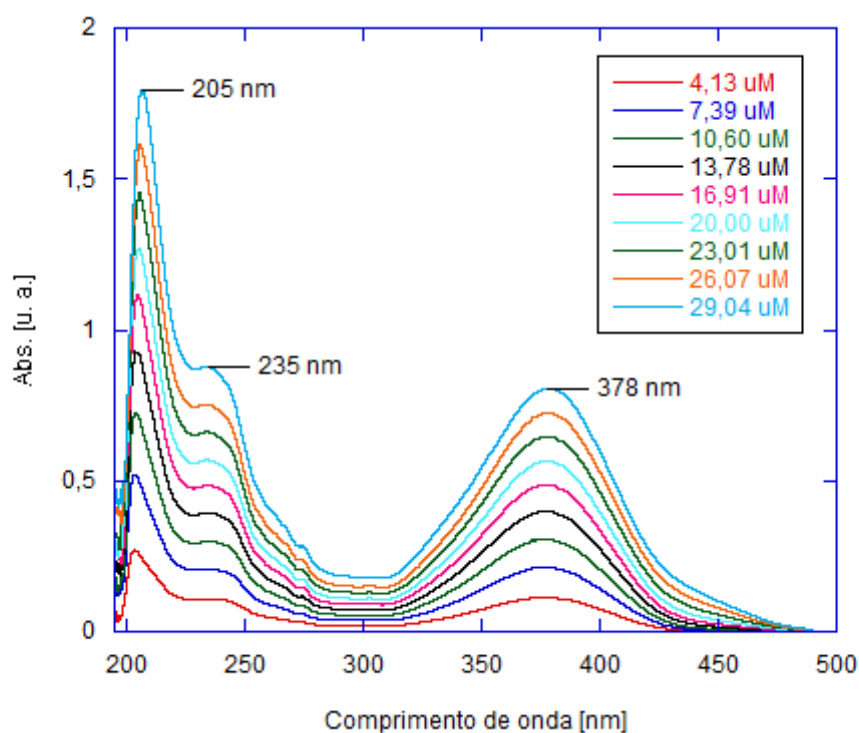
Teoricamente a região no espectro de UV/Vis que fornece primordial informação sobre a presença do grupamento triazeno em um determinado composto, está localizada na região entre 330 e 420 nm.<sup>66,68</sup> Nos espectros registrados para os compostos **1** e **2** os máximos de absorção referentes a transição  $n \rightarrow \pi^*$  do cromóforo N=N aparecem nas regiões de 375 nm e 378 nm respectivamente, de acordo com dados relatados na literatura.<sup>48,62,63,66,68,69,70,95</sup>



Banda – $\lambda$ (nm)	Atribuição/Transição	Grupo
375	$n \rightarrow \pi^*$	N=N
220	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C

**Figura 4.12.** Espectro eletrônico de absorção molecular na região do UV-Vis do pré-ligante **1**, em MeOH.

O coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ), dado em  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ , calculado para o composto **1**, foi 30.552, plenamente de acordo com valores relatados na literatura.<sup>62,70</sup>



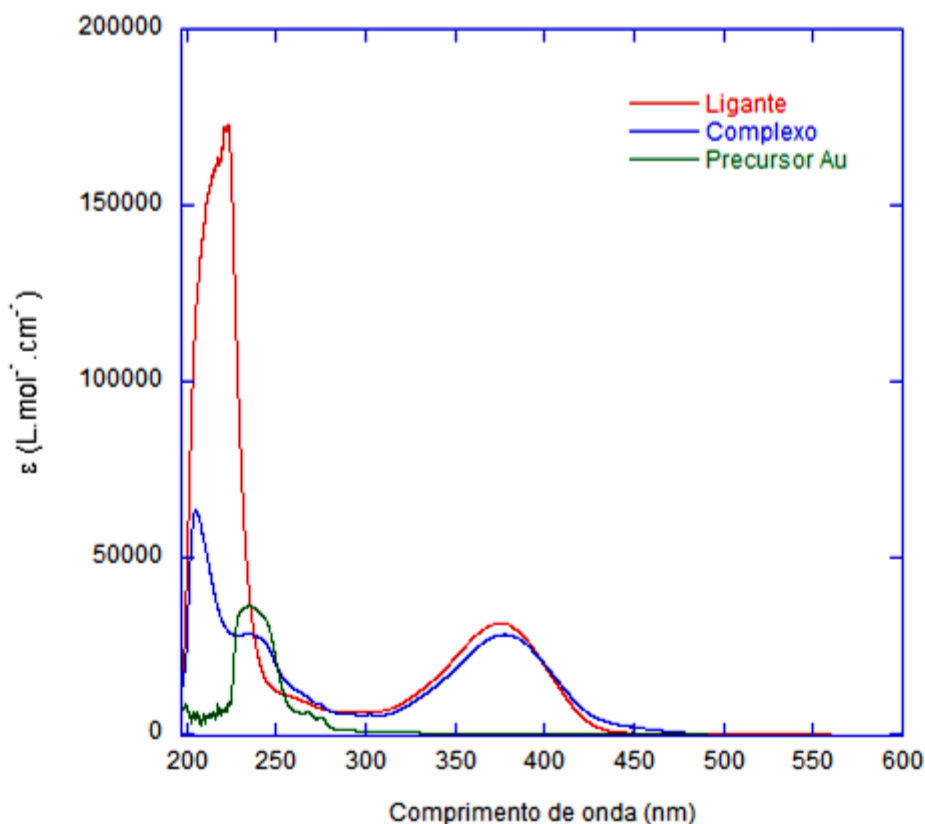
Banda – $\lambda$ (nm)	Atribuição/Transição	Grupo
378	$n \rightarrow \pi^*$	N=N
235	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C (PPh <sub>3</sub> )
205	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C (R-N <sub>3</sub> )

**Figura 4.13.** Espectro eletrônico de absorção molecular na região do UV-Vis do complexo **2**, em MeOH.

O coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ), calculado para o composto **2**, foi  $28.253 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Este valor está de acordo com valores relatados na literatura.<sup>62,70</sup>

No gráfico disposto na Figura 4.14 encontram-se os espectros obtidos através da plotagem das respectivas constantes de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) *versus* comprimento de onda em nm, dos compostos **1** e **2** e do precursor cloreto de trifenilfosfina de ouro(I) Au(PPh<sub>3</sub>)Cl, o que possibilita a identificação da contribuição molar de cada um dos compostos **1** e Au(PPh<sub>3</sub>)Cl no espectro de absorção do complexo **2**. Desta forma, fica claro que o ombro intermediário no espectro de **2** (230 nm) deve ser atribuído a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  da ligação C=C dos anéis fenila da

trifenilfosfina, uma vez que, não espera-se transição do centro metálico de ouro, por este ter configuração *d*-10.



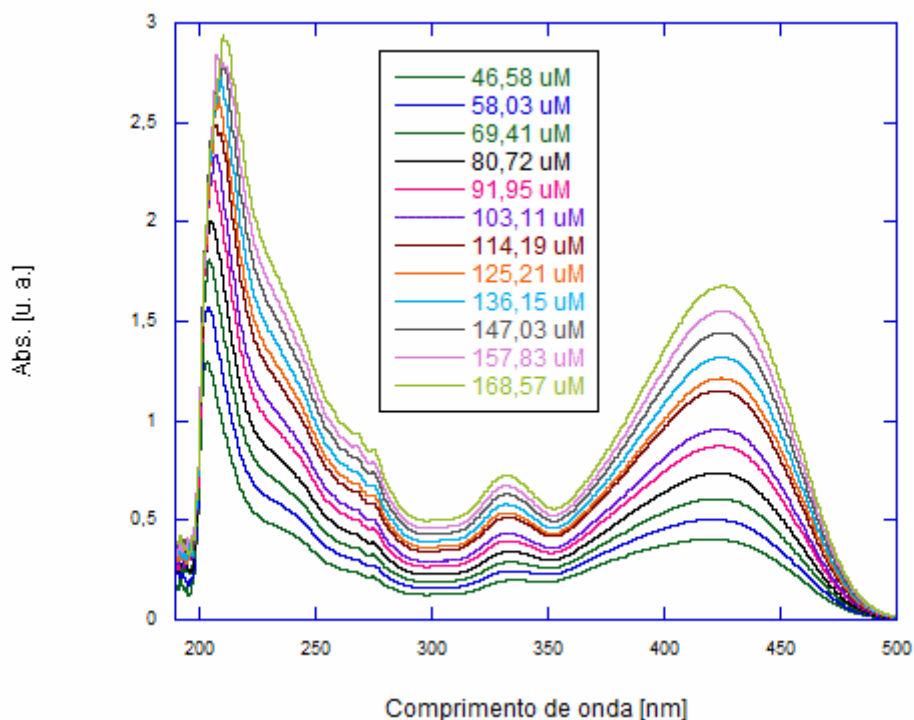
**Figura 4.14.** Espectros eletrônicos de absorção molecular na região do UV-Vis, com concentração normalizada, dos compostos **1**, **2** e o precursor de ouro Au(PPh<sub>3</sub>)Cl.

A banda evidenciada na região próxima ao visível para o composto **2** ( $\lambda = 378$  nm em MeOH) apresenta um forte efeito de solvatocromismo, conforme se pode verificar junto a Figura 4.15. A mudança do solvente de MeOH para EtOH provoca um deslocamento acentuado de 378 nm (MeOH) para 425 nm (EtOH). Este comportamento é característico de bandas de transferência de carga metal-ligante (MLTC) ou ligante-metal (LMTC). Bandas MLTC são tipicamente observadas quando o metal tem baixo estado de oxidação, e os ligantes tem orbitais receptores com baixa energia. De fato, o valor de  $\epsilon$  (absorptividade molar) está de acordo com bandas do tipo TC ( $\epsilon > 10^3$  L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

Bruce et al.<sup>96</sup> reportaram que bandas desta natureza em complexos mononucleares de Au com ligações P–Au–S são relativas a processo LMTC de S→Au. De forma análoga, tal absorção do composto **2** é, portanto, relativa a um



processo LMTC envolvendo transição de elétrons no sentido  $N \rightarrow Au$ . Os autores supracitados observaram que a diminuição da polaridade diminui a energia da transição, de forma similar a este trabalho. A diminuição da polaridade do solvente passando de MeOH para EtOH, embora não muito pronunciada), causou uma diminuição na energia necessária para tal transição. Por fim, a banda em 330 nm observada em EtOH é atribuída a transição  $n-\pi^*$  do cromóforo presente no ligante.

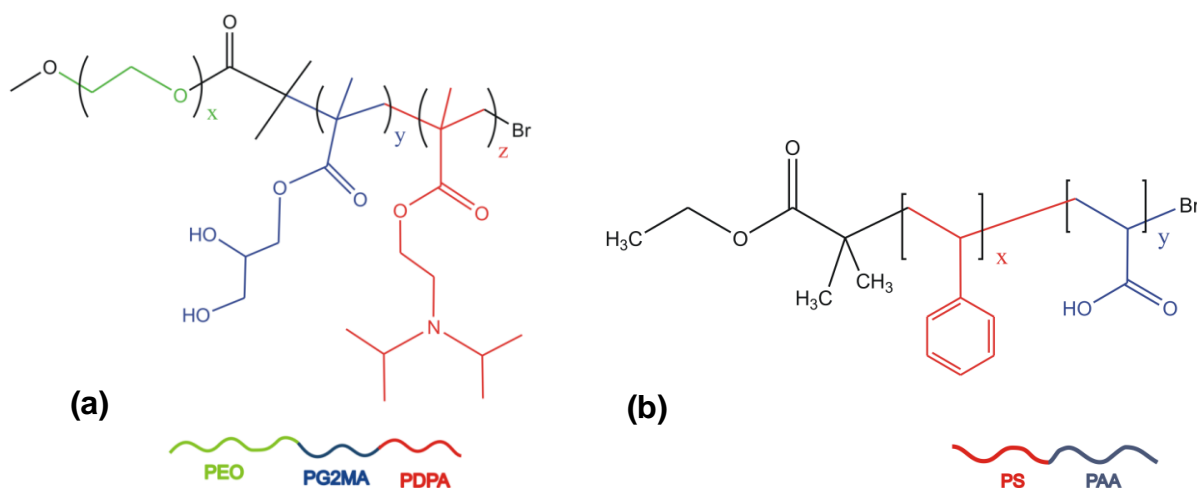


**Figura 4.15.** Espectros eletrônicos de absorção molecular na região do UV-Vis do composto **2** em EtOH.

#### 4.6 Sistemas auto-organizados

Várias são as metodologias exploradas no desenvolvimento de sistemas auto-organizados, na grande maioria das vezes aplicados na solubilização, transporte e entrega específica de princípio ativos. Sendo assim, dependendo das características físico-químicas dos princípios ativos e das propriedades que o sistema deverá apresentar para que seja aplicável, a engenharia de polímeros é fundamental nestes processos. Portanto, as características físico-químicas de cada monômero, o grau de polimerização e suas disposições na cadeia polimérica refletem diretamente nas propriedades físico-químicas dos sistemas arquitetados.

Neste trabalho foram utilizados o copolímero tribloco anfifílico poli(óxido de etileno)-*b*- poli(glicerol monometacrilato)-*b*-poli(metacrilato de 2-(diisopropil-amino)etila) simplificado por PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>, apresentado na Figura 4.16a, e o copolímero dibloco poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) simplificado por PS-*b*-PAA, Figura 4.16b. Os subscritos indicam o grau de polimerização médio.



**Figura 4.16.** Estrutura molecular dos copolímeros tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> (a) e dibloco PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub> (b).

Este copolímero tribloco anfifílico do tipo ABC pode ser sintetizado através de técnicas de adição seqüencial de monômeros utilizando protocolos de ATRP (*atom transfer radical polymerization*).<sup>20,97</sup>

A escolha do copolímero tribloco anfifílico PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> para uso neste trabalho foi determinada perante testes preliminares com outros dois polímeros, o poli(óxido de etileno)-*b*-poli(caprolactona) PEO-*b*-PCL e poli(óxido de etileno)-*b*-poli(óxido de propileno)-*b*-poli(óxido de etileno) PEO-*b*-PPO-*b*-PEO (ou F-127). Estes dois polímeros se apresentaram menos eficientes na encapsulação dos compostos, sendo possível essa conclusão com base no maior volume de precipitado formado nas soluções testes (inspeção visual).

Estudos envolvendo cromatografia de permeação em gel (GPC) demonstram uma boa relação entre a estrutura macromolecular e micelar do copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>. A razão entre a massa molar média em peso (Mw) e a massa molar média numérica (Mn) é definida como dispersidade (D). Neste caso, o valor de D calculado para o copolímero tribloco foi de 1.30 (Tabela 4.9), indicando relativamente uma estreita distribuição de peso molecular. Essa é uma característica

muito importante para obtenção de sistemas poliméricos auto-organizados bem definidos, tanto em solução quanto no estado sólido, uma vez que, a polidispersidade da cadeia é conhecida por afetar não somente o tamanho, mas também a morfologia das nanopartículas.<sup>81</sup>

**Tabela 4.9.** Propriedades físico-químicas dos polímeros utilizados neste trabalho.

<b>Copolímero em bloco<sup>a</sup></b>	<b><math>M_n</math> (g/mol)</b>	<b><math>M_w/M_n</math></b>	<b><math>\phi^a</math></b>
PEO <sub>113</sub> - <i>b</i> -PG2MA <sub>30</sub> - <i>b</i> -PDPA <sub>50</sub>	20500	1,30	0.24 - 0.24 - 0.52
PS <sub>60</sub> - <i>b</i> -PAA <sub>30</sub>	8400	1,10	0.73 - 0.27
PEO <sub>113</sub> - <i>b</i> -PCL <sub>44</sub>	27200	1,24	0,18-0,82
PPO <sub>100</sub> - <i>b</i> -PEO <sub>65</sub> - <i>b</i> -PPO <sub>100</sub>	12600	1,07	

<sup>a</sup> Fração de volume de cada bloco na seqüência, assumindo que a densidade do polímero é igual 1,0 mg/mL.

A versatilidade deste copolímero tribloco, em parte, pode ser atribuída à presença do segmento PDPA o qual é sensível a variações de pH. Isto pode ser atribuído a possibilidade de protonação do grupo amina terciário (pKa ~ 6.0). A presença dos grupos hidroxilas do segmento PG2MA também oferece oportunidades interessantes para modificações pós-polimerização, caso se deseje. Com efeito, cinco diferentes tipo de estruturas auto-organizadas podem ser obtidas através do copolímero anfifílico PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>, em meio aquoso ou orgânico. São elas: (1) micelas reversas esféricas, contendo núcleo de PG2MA o e cadeias de PEO e PDPA entrelaçadas formando a corona, com grupos amina que podem ser modificados (ex.: quaterinizados); (2) micelas reversas, contendo núcleo reticulado, não dissociável em meio orgânico, derivadas de (1); (3) micelas esféricas em multicamadas em meio aquoso, constituídas de núcleo com base PDPA sensível a variações de pH, camada intermediária de PG2MA e uma corona biocompatível e quimicamente inerte de PEO; (4) micelas não dissociáveis em meio aquoso, com camada intermediária PG2MA reticulada, derivada de (3); e (5) micelas cilíndricas uniformes em meio aquoso.<sup>97</sup>

O segundo copolímero avaliado nesse trabalho, PS-*b*-PAA, com estrutura representada na Figura 4.16 é constituído de dois grupos com polaridades bastante distintas. O bloco formado por poliestireno (PS) de baixa polaridade e sem grupamentos que interajam com a água, confere ao copolímero um segmento extremamente hidrofóbico, já o bloco formado por poli(ácido acrílico) (PAA) é um bloco bastante hidrofílico, o que é resultado da presença de átomos passíveis de interação com a água, ou seja, O-H e C=O, através de interações de hidrogênio clássicas.

O polímero PS, por ser um grupo bastante inerte, não é biocompatível e nem é degradado bioquimicamente, o que impossibilita a sua aplicação para fins medicinais. Entretanto, do ponto de vista físico-químico fundamental, a caracterização estrutural de sistemas contendo um núcleo hidrofóbico de PS é de particular interesse, uma vez que este se conserva cineticamente “congelado” após o processo de micelização a temperatura ambiente, pois a temperatura de transição vítrea é superior à temperatura ambiente. Isto significa que a cinética de micelização cessa, desaparecendo o equilíbrio unímero ↔ micela.

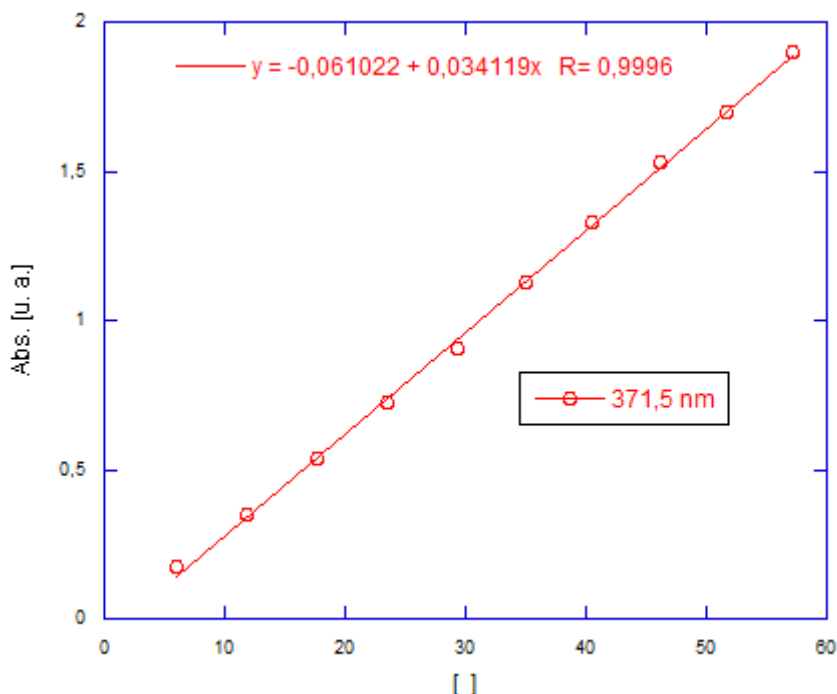
Ao contrário do PS o PAA é um polímero que responde a mudanças de pH, o que lhe garante também o status de polieletrólito aniônico biocompatível, solúvel em meio aquoso quando pH > 4,8 (ou seja, grupos ácido carboxílicos parcialmente desprotonados). Portanto, as micelas preparadas com o copolímero dibloco anfifílico PS-*b*-PAA consistem de um núcleo hidrofóbico de PS e uma corona hidrofílica de PAA que protege o núcleo, no qual a carga da droga hidrofóbica estará alojada via interações hidrofóbicas. Desta forma, este copolímero (PS-*b*-PAA) tem atraído a atenção de vários pesquisadores, os quais usam este como modelo/referência para compreender os mecanismos de carregamento e liberação de drogas hidrofóbicas em micelas de copolímero em bloco.<sup>98,99</sup>

#### **4.6.1 Encapsulamento de triazenos nas nanopartículas**

Os principais fatores que influenciam tanto na eficiência como na capacidade de encapsulamento de micelas formadas por copolímero em bloco são: a natureza do soluto (droga), natureza do bloco central de formação, comprimento do bloco central, a massa molecular total do copolímero, concentração de soluto e, em menor grau, o comprimento e a natureza do bloco formador da corona da micela. Muitos

estudos indicam que o principal fator é a compatibilidade entre o soluto e o bloco formador do núcleo.<sup>26</sup>

Para determinar a EE e CE, as concentrações reais dos compostos **1** e **2** na solução de trabalho foram usadas as curvas analíticas construídas através de sucessivas medidas do espectro de UV-Vis, variando-se a concentração da solução. No entanto, a curva é obtida plotando-se as concentrações *vs* as respectivas absorvâncias no comprimento de onda máximo da banda característica do triazeno. A curva analítica de **1**, para a primeira etapa do trabalho (estudos de Np e DI) foi construída em acetona e está ilustrada na Figura 4.17. Os espectros de UV-Vis estão apresentados no Anexo B. A respectiva absorvância no comprimento de onda máximo da banda do triazeno no espectro de absorção é usada para o cálculo da concentração da droga nas micelas através da equação da reta calculada para cada composto. Em todas as análises das soluções preparadas pelos métodos de diálise e pré-filme, etanol foi utilizado como solvente. Os valores de concentração [ ] em  $\mu\text{M}$  e absorvância em unidades arbitrárias (u. a.) estão listados a baixo da respectiva curva.



**Figura 4.17.** Curva analítica para o composto **1**, em acetona.

[ $\mu\text{M}$ ] 5,97 11,88 17,73 23,53 29,27 34,95 40,58 46,15 51,67 57,14

Abs. 0,17 0,35 0,54 0,72 0,91 1,13 1,33 1,53 1,70 1,90

Na Tabela 4.10 estão resumidos os resultados observados inicialmente, envolvendo os sistemas coloidais formados por nanopartículas do copolímero anfifílico PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> carregadas com o composto 1, por Np e DI. Neste caso Cp indica concentração de polímero, CT1 concentração teórica da droga na solução de trabalho, ou seja, o quanto de droga (teoricamente) deve haver na solução ao final do encapsulamento, CR concentração real da droga na solução de trabalho, ou seja, a concentração da droga determinada experimentalmente, EE: eficiência de encapsulamento; CE: capacidade de encapsulamento.

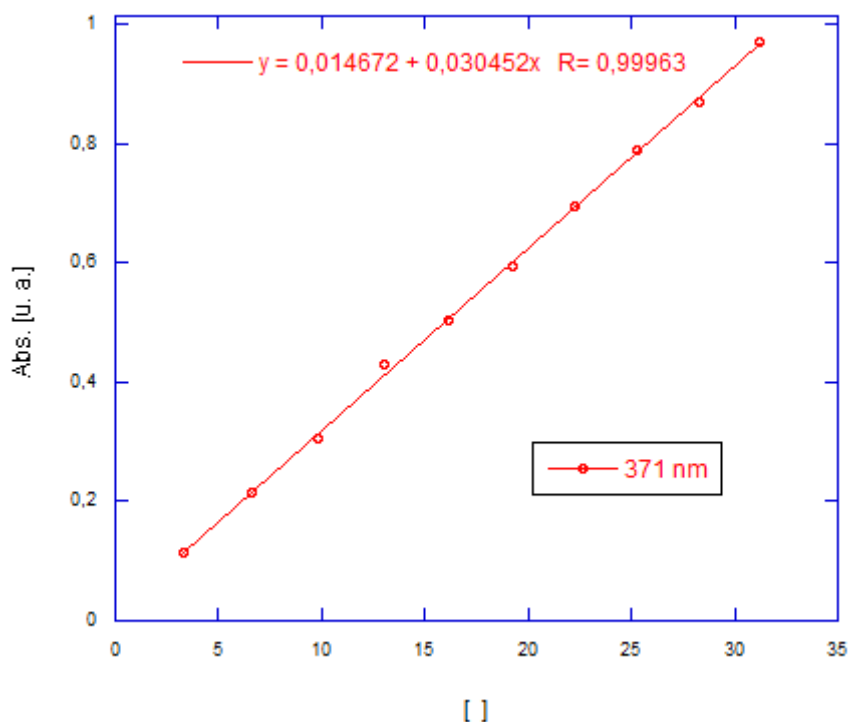
**Tabela 4.10.** Dados referentes aos cálculos de EE e CE dos sistemas nanoparticulados preparados usando-se o polímero PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> e diferentes condições experimentais.

Exp	Método	Cp (mg/ml)	Solvente	CT (uM)	CR (uM)	EE (%)	CE (% mdroga/mpol)
01	Np	1,67	EtOH	262,2	83,90	32,0	1,4
02	DI	1,67	EtOH	262,2	13,40	5,1	0,2
03	Np	1,67	THF	918,0	375,14	40,9	6,1
04	DI	1,67	THF	918,0	820,15	89,3	13,4
05	Np	1,67	EtOH	262,2	120,69	46,0	2,0
06	DI	1,67	EtOH	262,2	49,65	18,9	0,8
07	Np	1,67	Acetona	459,0	186,72	40,7	3,0
08	DI	1,67	Acetona	459,0	200,65	43,7	3,3
09	Np	1,67	EtOH	#	#	#	#

Analisando os dados da tabela acima, quanto à capacidade de encapsulamento, pode-se afirmar que os experimentos 03 e 04 apresentaram boa e excelente CE respectivamente, porém, como já relatado, as micelas formadas usando-se THF têm diâmetro muito acima do ideal para esse fim (medicinal), resultando na agregação das micelas. O tamanho elevado das partículas favorece sua deposição por ação da gravidade (decantação). Embora a morfologia de tais partículas não fora determinada, especula-se que as mesmas apresentem a estrutura de micelas compostas, ou seja, agregados contendo microdomínios hidrofílicos e hidrofóbicos. Para os demais casos os valores de CE podem ser considerados baixos, visto que, relatos da literatura apontam bons valores a partir de 6.0 (%) em massa.<sup>28,30,100</sup> Não obstante, esta é a faixa adequada para viabilização

de novos medicamentos que incorporam nanopartículas para administração intravenosa.

Com o intuito de avançar neste aspecto e aumentar o conteúdo do princípio ativo encapsulado, realizaram-se estudos com métodos mais elaborados, porém maior possibilidade de sucesso. Os métodos de diálise e de pré-filme foram então avaliados para partículas formadas pelo copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> e para copolímero dibloco PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub> no carregamento de micelas com o composto **1**. Para esta etapa, nova curva analítica do composto foi construída em EtOH, conforme apresentado na Figura 4.18. Todas as micelas foram preparadas por Np e todos os filmes usando-se Ac.



**Figura 4.18.** Curva analítica do composto **1** em EtOH.

[μM]	3,31	6,58	9,80	12,99	16,13	19,23	22,29	25,32	28,30	31,25
Abs.	0,11	0,21	0,31	0,43	0,50	0,59	0,69	0,79	0,87	0,97

A Tabela 4.11 apresenta os resultados obtidos. A EE não figura neste caso, pois EE = CE (%), já que ambos os cálculos são efetuados com base na massa total de droga utilizada.

**Tabela 4.11.** Dados referentes ao encapsulamento de **1** pelos métodos de diálise e pré-filme.

Exp	Método	Cp (mg/ml)	Polímero <sup>a</sup>	Solvente	m micelas (mg)	m droga (mg)	mdroga na micela (mg)	CE (% mdroga/mpol)
10	Filme	1,67	Tb	Dioxano	10	10	0,90	9,7
11	Filme	1,67	Tb	EtOH	10	10	0,71	7,7
12	Diálise	1,67	Tb	Dioxano	10	10	0,17	1,7
13	Diálise	1,67	Tb	EtOH	10	10	0,18	1,7
14	Filme	1,67	Db	Dioxano	10	10	0,47	5,0
15	Diálise	1,67	Db	Dioxano	10	10	0,21	2,1
16	Np	1,67	Db	Dioxano	10	10	#	#
17	Np	1,67	Tb	Dioxano	10	10	#	#

<sup>a</sup> Tb = copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>; Db = copolímero dibloco PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub>.

Na tabela acima tem-se quatro pares de experimentos, aonde 10 e 11 trata-se do carregamento de micelas pelo método de pré-filme (obtido pela dissolução de **1** em Ac. seguida de evaporação do solvente), alternando os solventes dioxano e EtOH na Np (preparação das micelas). Em ambos os casos ótimos valores de CE foram obtidos, sendo que no exp. 10, com dioxano, o valor foi mais expressivo.

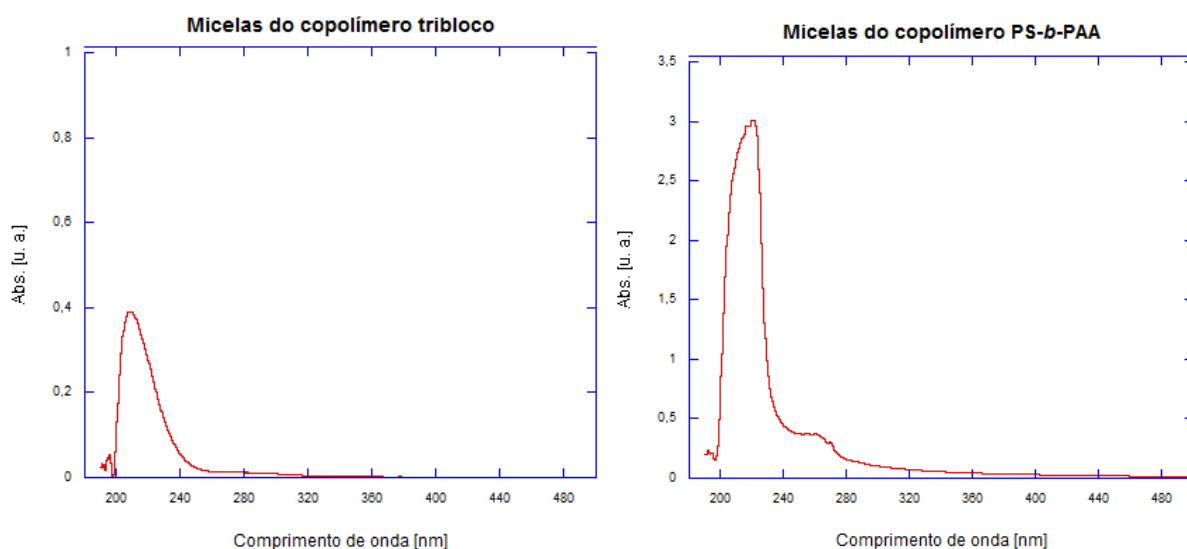
Os exp. 12 e 13 consistem no método de diálise, da mesma forma alternando os solventes dioxano e EtOH na Np. Nota-se que em ambos os casos pequenos, e praticamente equivalentes, valores de CE foram obtidos, indicando uma não dependência do solvente.

No par 14 e 15 passou-se a estudar o copolímero PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub>, variando-se os métodos – diálise e pré-filme, usando-se em ambos os casos dioxano na Np para formação das micelas. Da mesma forma que nos experimentos anteriores, o método de pré-filme se mostrou bem mais eficiente que o de diálise. Neste caso um valor razoável, de 5,0 (% m/m), foi obtido. Já o método de diálise novamente resultou em um baixo valor de CE. Nesse método as micelas são carregadas com a droga por difusão através do solvente e saco de diálise. Pelo fato dos baixos valores de CE e do maior tempo de carregamento esse método torna-se menos interessante comparado com o método de pré-filme.

Os exp. 16 e 17 foram realizados aplicando-se o método de Np com dioxano, variando-se os copolímeros. As micelas foram avaliadas por DLS e UV-Vis. Na Figura 4.19 estão apresentados os respectivos espectros de UV-Vis de cada experimento. Neste caso, uma solução micelar aquosa foi diluída em etanol (~ 1:15

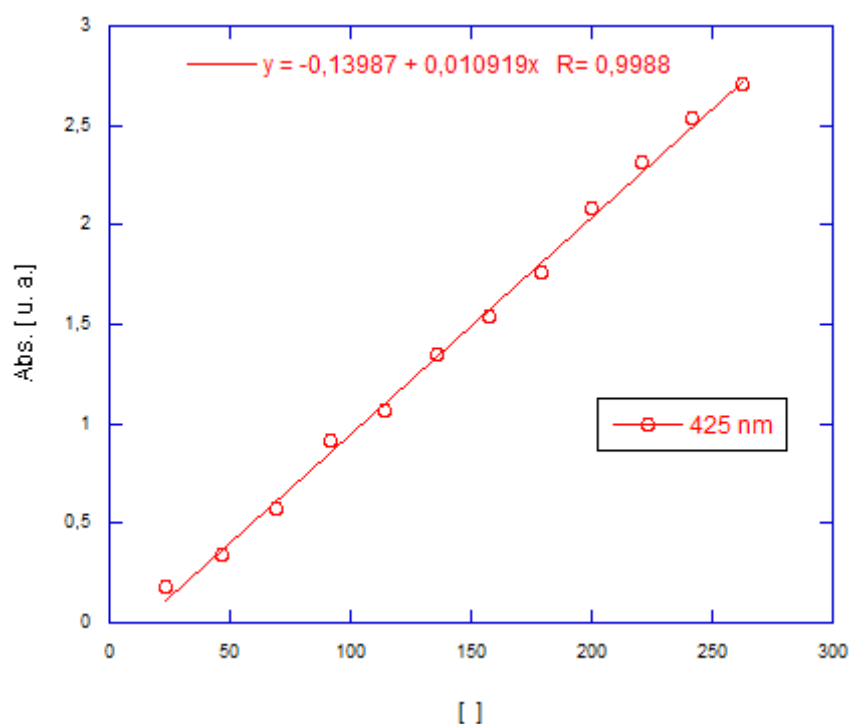


micelas:etanol) para o registro do espectro UV-Vis. Neste procedimento, a desmicelização é parcialmente induzida no caso do polímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>, uma vez que o mesmo é solúvel em etanol. De qualquer forma, a característica mais importante evidente nesta figura é a ausência de absorção pelos polímeros na região típica de compostos triazenídicos (~ 375 nm).



**Figura 4.19.** Espectros de UV-Vis em meio hidro-alcoólico de uma alíquota (0,2 mL) de micelas (1,67 mg/mL) dos copolímeros PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> (esquerda) e PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub> (direita) em EtOH (3,0 mL).

Portanto, para a quantificação das quantidades encapsuladas, assim como para o composto **1**, construiu-se uma curva analítica em EtOH, ilustrada na Figura 4.20, usando-se os valores de absorbância medidos das soluções carregadas, para determinar a concentração da droga no interior das micelas. Os valores de concentração [ ] em  $\mu\text{M}$  e absorbância em (u. a.), na região de 425 nm estão listados a baixo.



**Figura 4.20.** Curva analítica do composto **2**, construída em EtOH.

[μM]	23,50	46,60	69,40	92,00	114,20	136,10	157,80	179,20	200,40	221,30
Abs.	0,18	0,34	0,58	0,91	1,07	1,35	1,54	1,76	2,08	2,31

Na Tabela 4.12 estão listados os resultados obtidos para o encapsulamento do triazenido complexo com ouro (composto **2**) em micelas de copolímero anfifílico (PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub> e PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>), desenvolvido somente pelo método de pré-filme. Nesta etapa testou-se inicialmente (exp. 18, não apresentado na tabela) a nanoprecipitação com THF como solvente, para comparação com resultados já verificados para o composto **1**. Da mesma forma, bons resultados foram obtidos, sendo os valores de EE 75,6 (%) e CE 7,6 (% m/m), porém, as mesmas propriedades das micelas de **1** obtidas por Np e THF foram verificadas, ocorrendo, portanto, a breve agregação e precipitação das micelas. Em decorrência disto, o trabalho foi direcionado totalmente ao carregamento de micelas pelo método de pré-filme, o qual é mais eficaz de acordo com resultados mostrados anteriormente.

**Tabela 4.12.** Resultados dos estudos de encapsulamento do composto **2**, pelo método de pré-filme.

Exp	Cp (mg/ml)	Polímero <sup>a</sup>	Solvente	m micelas (mg)	m droga (mg)	mdroga na micela (mg)	CE (% mdroga/mpol)
19	1,67	Tb	Dioxano	10	10	0,50	5,0
20	1,67	Tb	EtOH	10	10	0,47	4,7
21	1,67	Db	Dioxano	10	10	0,50	5,0
22	1,67	Db	Dioxano	10	10	0,55	5,5
23	1,67	Tb	Dioxano	10	10	0,57	5,7

<sup>a</sup> Tb = copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>; Db = copolímero dibloco PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub>.

Os valores apresentados na tabela acima são referentes ao resumo do que se avaliou pelo método de pré-filme envolvendo o composto **2**. O método de diálise também foi investigado, mas, assim como para o composto **1**, apresentou resultados poucos satisfatórios, por conta disso não é aqui relatado. A construção do pré-filme também foi investigada usando-se THF como solvente, porém, devido a cristalização de parte do composto na parede do frasco, este solvente não se mostrou aplicável para tal fim.

De primeira vista nos cinco experimentos apresentados na Tabela 4.12 percebe-se a repetição dos dois últimos, porém, estes dois se diferenciam dos exp. 19 e 21 pelo fato de que o pré-filme foi obtido pela retirada do solvente usando vácuo. Uma considerável melhora no filme foi alcançada com essa metodologia, obtendo-se um filme mais uniforme e com aspecto menos cristalino do que pela evaporação natural do solvente.

Os três primeiros experimentos expressam as possibilidades que existiam, empregando-se o método de pré-filme, para encapsular o composto **2**. Nos dois primeiros experimentos envolvendo o copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> variou-se o solvente na Np, novamente dioxano mostrando um melhor desempenho. O mesmo resultado foi obtido usando-se dioxano na Np com ambos os copolímeros PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub> e PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> (exp. 19 e 21), demonstrando uma equivalência na CE entre os copolímeros e uma superioridade do dioxano para com EtOH no preparo das micelas. Já nos exp. 21 e 22 um expressivo aumento na CE foi alcançado, o que acredita-se estar diretamente ligado a qualidade do pré-filme obtido por evaporação da Ac. com vácuo. Além de o método render pré-filmes melhores, o tempo de obtenção dos mesmos é muito

menor que no outro caso em que o solvente evapora naturalmente, a pressão e temperatura ambiente.

Todos os valores relatados foram obtidos aplicando-se um tempo de 60 minutos de agitação das micelas em contato com o filme. A eficiência deste método está relacionada ao contato direto das partículas com o filme. Moléculas contidas no filme podem, portanto, migrar diretamente para a corona e núcleo da micela sem envolver a difusão de espécies dissolvidas em meio aquoso em baixa concentração (equilíbrio de solubilidade). O efeito do tempo de contato na capacidade de encapsulamento foi avaliada, e será relatada na seção da cinética de carregamento.

Com base nos resultados anteriores descritos na literatura,<sup>28,30,100</sup> os valores de CE obtidos neste trabalho tanto no encapsulamento do composto **2** como do composto **1** por meio do método de pré-filme podem ser classificados entre razoáveis e bons, com micelas preparadas por Np empregando-se EtOH ou dioxano.

Para comparação, é importante mencionar o trabalho recente de Wang et al.<sup>101</sup>, em que o anticancerígeno PTX foi encapsulado em micelas do copolímero tribloco poli(etil etileno fosfato)-*b*-poli( $\epsilon$ -caprolactona)-*b*-poli(etil etileno fosfato) PEEP-*b*-PCL-*b*-PEEP, o qual teve o comprimento (e conseqüentemente a massa) dos blocos variado para verificar a relação mais adequada no encapsulamento da droga. Neste trabalho os valores de CE variaram de  $0,56 \pm 0,03$  a  $3,16 \pm 0,33$ . Estes valores foram considerados baixos pelos autores, porém, os mesmos destacam que, mesmo com baixos valores de CE, os copolímeros são apropriados para entrega de drogas hidrofóbicas. Baseado nestes relatos e considerando a elevada hidrofobicidade dos compostos triazenos estudados, é possível afirmar que os valores de CE obtidos são plenamente satisfatórios e estão de acordo com o que se tem produzido atualmente.<sup>28,30,100,101</sup>

No trabalho de Yang et al.<sup>28</sup> os valores de CE (% m) variaram de 5,9 a 7,5, reforçando que os valores alcançados no decorrer deste mestrado e aqui relatados são plenamente condizentes com valores de estudos de ponta. Entende-se, contudo, que o sistema aplicado aos triazenos é similar ao PTX-CLM. Portanto, estudos biomédicos poderão indicar que partículas mais complexas devam ser desenvolvidas para aumentar a eficiência dos princípios ativos a base de triazenos.

#### 4.6.2 Evidências de não-interação triazeno-polímero

A espectroscopia eletrônica de UV-Vis foi um dos métodos analíticos mais importantes neste trabalho, plenamente explorado desde a caracterização dos dois compostos sintetizados, acompanhamento das propriedades espectroscópicas das soluções estudadas, até a quantificação das quantidades de droga encapsulada. Na etapa intermediária do estudo, quando passou-se a trabalhar com o método de pré-filmes para encapsular o composto **1**, uma adversidade no perfil do espectro das micelas carregas foi verificado. Especificamente, uma segunda banda na região do comprimento de onda de 320 nm passou a aparecer, além da banda típica do triazeno na região de 375 nm. Sabe-se, no entanto, que nesta região somente o triazeno apresenta absorções, como pode ser visto na Figura 4.19, aonde estão ilustrados os espectros eletrônicos das micelas de ambos os copolímeros usados.

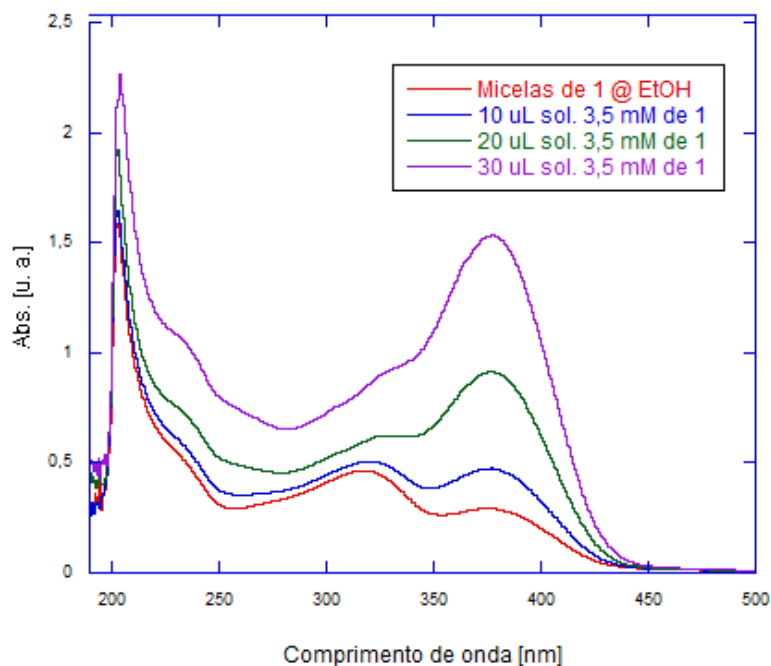
Este fato inesperado, inicialmente não possibilitaria a quantificação da carga nas micelas como vinha sendo feito, sem antes elucidar o evento que da origem ao desdobramento das bandas, e com isso descobrir se os valores das absorbâncias em cada banda poderiam ser somados, para determinar a concentração da droga no núcleo da micela, com uso da curva analítica, como para os casos anteriores.

Primeiramente se imaginou que estaria ocorrendo uma interação ácido-base entre o triazeno e o grupo amina do bloco PDPA que forma o núcleo das micelas, o que resultaria na desprotonação do nitrogênio do triazeno e na protonação da amina terciária do polímero. Este fato estaria em consonância com a ausência desta banda adicional para o composto **2** (complexo) cuja ligação N-H fora substituída por uma ligação N-Au.

Além disso, a interação ácido-base é plausível com base nos grupos funcionais presentes nas entidades envolvidas. Uma análise mais detelhada necessita do conhecimento do valor de  $pK_a$  do pré-ligante triazeno (ou de análogos), mas esta propriedades físico-química ainda não foi reportada na literatura para esta classe de compostos, presumivelmente devido à dificuldades experimentais (precipitação do composto em meio aquoso e/ou decomposição em meio ácido).

Não obstante, investigaram-se as variações espectrais em função da estequiometria triazeno-amina. Mudanças nesta relação provocariam variações nas frações molares de triazeno protonado (sem interação) e desprotonado (com interação), as quais originariam as duas bandas no espectro. Para verificar essa

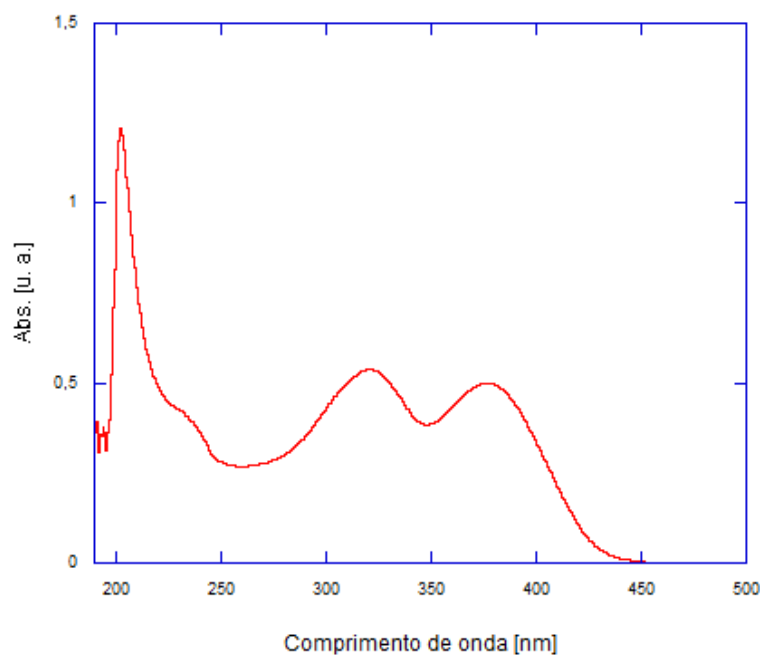
possibilidade primeiramente registrou-se o espectro da solução de micelas apresentando as duas bandas e em seguida, sem retirar a solução da cubeta, sucessivas alíquotas de uma solução do triazeno puro (protonado) em EtOH foi adicionada e registrados os respectivos espectros como ilustrado na Figura 4.21. Os resultados evidenciam que somente a banda clássica do triazeno (protonado) aumentou a absorção. Embora a deconvolução da curva não fora realizada, o prolongamento da banda original em 375 nm é o principal responsável pelo aumento da banda em 320 nm. É importante salientar, ainda, que o número de grupos amino é bastante superior ao número de moléculas de triazeno. Caso a interação prevista tivesse lugar, o ligante deveria participar desta interação e a banda em 320 nm deveria aumentar preferencialmente.



**Figura 4.21.** Espectro UV-Vis em meio hidro-alcoólico de uma alíquota (0,2 mL) de micelas de PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> (1,67 mg/mL) carregadas com o composto **1** (0,90 mg/mL) diluídas em EtOH (3,0 mL), após sucessivas adições de alíquotas (conforme indicado) de uma solução estoque de triazeno puro em EtOH. Nota: nas condições experimentais em que estes espectros foram registrados ocorre a desmicelização parcial do sistema, a qual é induzida pela solubilidade do copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub> em etanol.

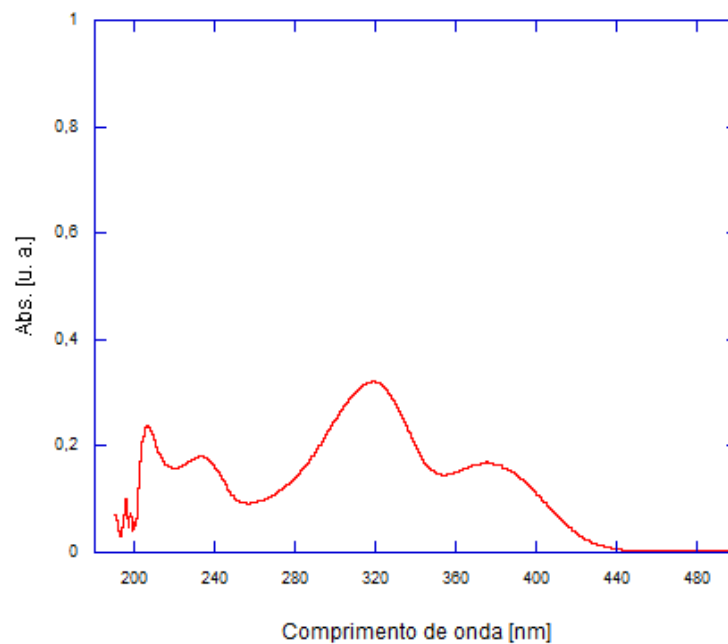
Com base nestes resultados, não é possível ainda descartar a interação ácido-base entre triazeno e polímero, pois a mesma poderia restringir-se ao núcleo da micela que, mesmo em etanol, permaneceria estável.

Posteriormente foi realizado o encapsulamento de **1** usando-se o copolímero dibloco PEO-*b*-PDPA, o que também resultou na presença da segunda banda no espectro, como pode ser verificado na Figura 4.22. O resultado obtido já era esperado em função da presença do bloco PDPA no copolímero passivo de protonação, e descarta a influência do bloco intermediário de PG2MA (com unidades glicérol). Este, portanto, não tem efeito sobre esta banda.



**Figura 4.22.** Espectro de UV-Vis em meio hidro-alcoólico de uma alíquota (0,2 mL) de micelas (1,67 mg/mL) do copolímero dibloco PEO-*b*-PDPA carregadas com o composto **1** diluídas em EtOH (3,0 mL).

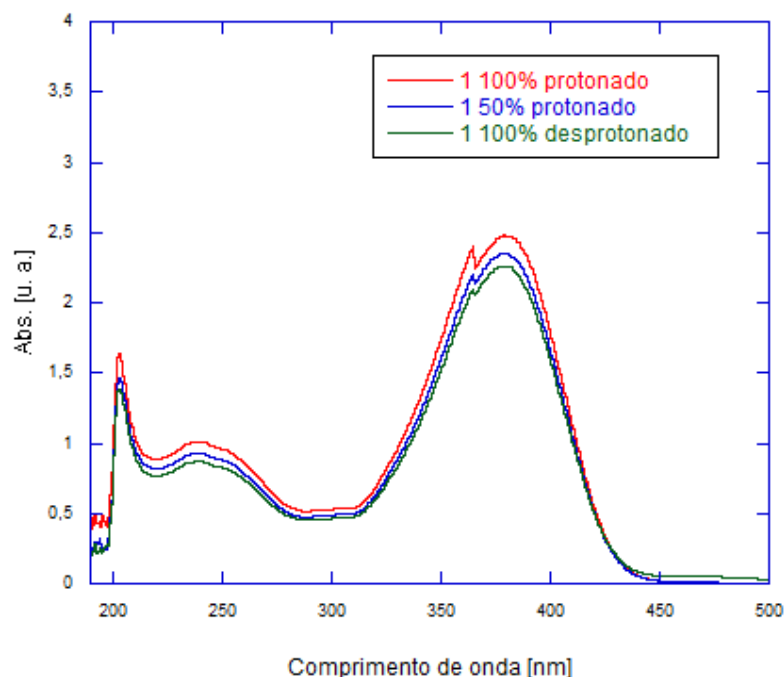
Desta forma, restou a confirmação do que se esperava, a qual foi realizada usando-se no encapsulamento, um copolímero que não tivesse nenhum grupo passivo de protonação na sua estrutura. Para tal, o copolímero poli(óxido de propileno)-*b*-poli(óxido de etileno)-*b*-poli(óxido de propileno) PPO-*b*-PEO-*b*-PPO (comercialmente conhecido por F127) foi escolhido. Surpreendentemente a mesma anormalidade no espectro da solução foi verificada, conforme Figura 4.23, o que indica que o aparecimento da banda em questão não pode ser atribuído à interação ácido-base.



**Figura 4.23.** Espectro de UV-Vis em meio hidro-alcoólico de uma alíquota (0,2 mL) de micelas (1,67 mg/mL) do copolímero tribloco PPO-*b*-PEO-*b*-PPO carregadas com o composto **1** diluídas em EtOH (3,0 mL).

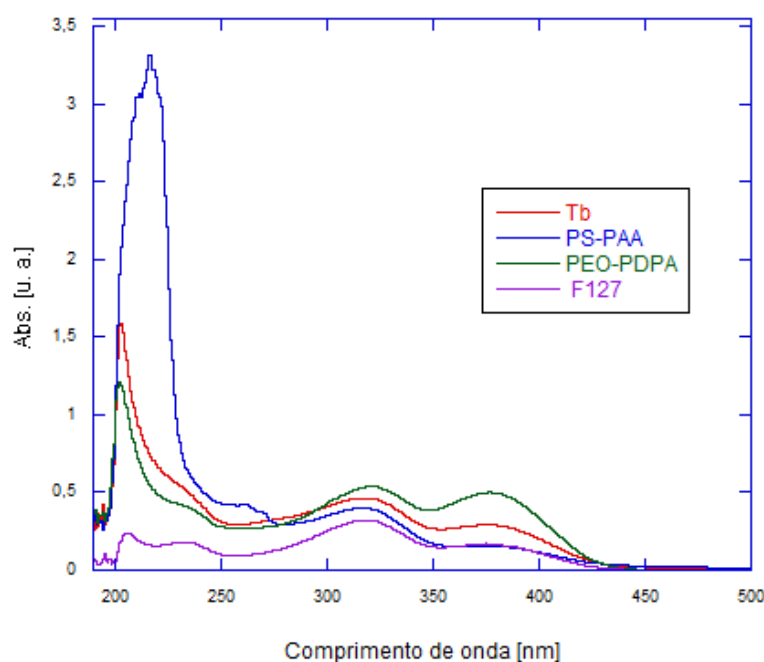
Para obter mais informações a cerca do comportamento espectroscópico do triazeno protonado e desprotonado, três espectros do composto **1** foram obtidos – o primeiro com o triazeno 100% protonado, o segundo 50% e o terceiro 100% desprotonado, conforme Figura 4.24.





**Figura 4.24.** Espectros de UV-Vis do composto **1** em função da adição de  $K(CH_3O)$  em quantidades que produzem as frações molares indicadas de espécies protonadas.

Como é possível verificar na figura acima, pouca mudança espectroscópica foi evidenciada com a desprotonação do triazeno (*nota*: uma das etapas de síntese deste pré-ligante consiste na adição de ácido para induzir a precipitação do produto final da reação; a precipitação é desfavorável em meio hidro-alcoólico). Com isso o que se pode concluir é que o aparecimento da banda em 320 nm no espectro de todas as micelas de diferentes copolímeros, carregadas com o composto **1** pelo método de pré-filme, não passa por um mecanismo baseado em interação ácido-base. Na Figura 4.25 estão apresentados todos os espectros de UV-Vis das micelas formadas por diferentes copolímeros, aonde Tb significa o copolímero tribloco  $PEO_{113}\text{-}b\text{-}PG2MA_{30}\text{-}b\text{-}PDPA_{50}$ .



**Figura 4.25.** Espectros de UV-Vis de soluções hidro-alcoólicas contendo o composto **1** encapsulado por nanopartículas constituídas de diferentes copolímeros.

Esta figura (acima) deixa claro que a presença da banda em 320 nm não depende do copolímero empregado na formação das micelas, o que nos remete a hipótese de que este fenômeno está ligado a interações entre as moléculas do triazeno, as quais provocariam um desdobramento da banda clássica em 375 nm. Sendo assim, para os cálculos de EE e CE as absorbâncias nas duas bandas foram somadas. Esse fenômeno também impede a quantificação por HPLC da carga de droga nas micelas, uma vez que a curva de calibração do triazeno seria baseada no comprimento de onda de 375 nm e as amostras apresentam duas bandas referentes ao composto, inclusive em acetonitrila (um eluente clássico nas análises de HPLC para determinação de CE).

#### 4.6.3 Propriedades das Nanopartículas

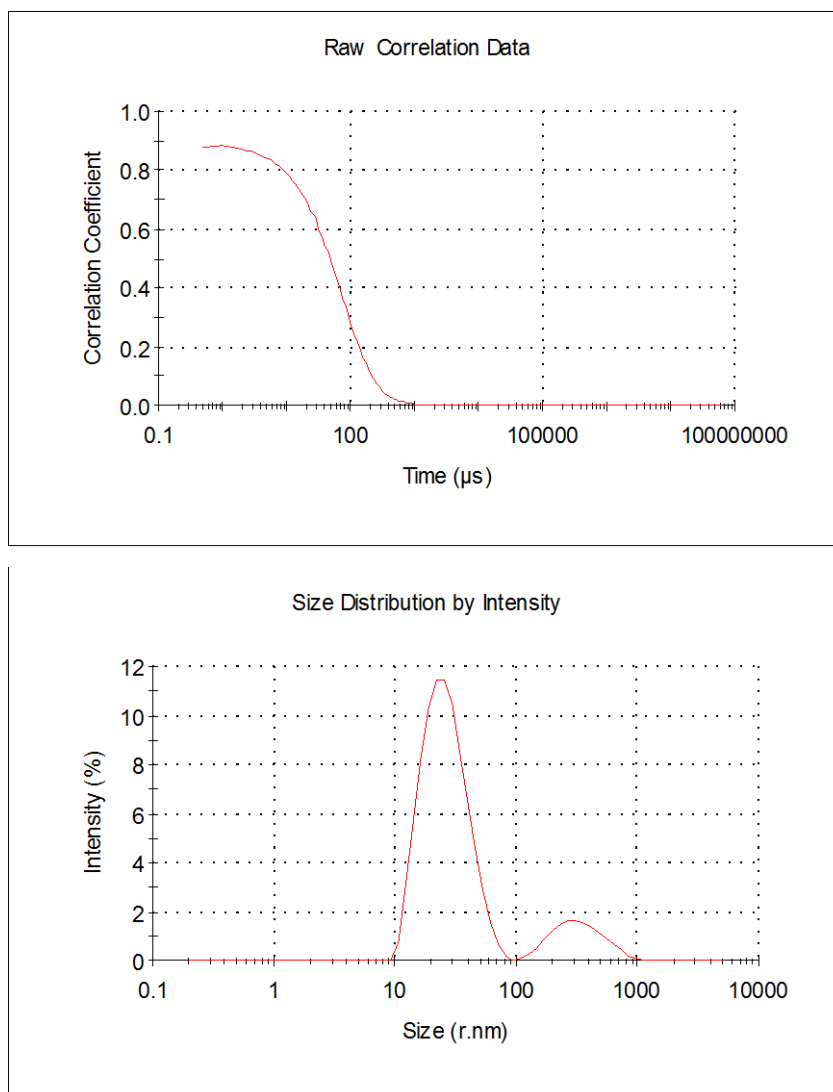
Dentre as técnicas utilizadas em investigações das propriedades de sistemas coloidais formados por nanopartículas poliméricas, destaque se dá para a espectroscopia, microscopia e espalhamento de luz. Essas técnicas, geralmente aplicadas em conjunto, possibilitam avaliações como tamanho e morfologia das partículas, dispersibilidade, composição e estrutura química do núcleo, camadas

intermediárias e corona, capacidade de carga, estabilidade das nanopartículas entre outras.<sup>20,78,79,80,81</sup>

Neste trabalho, o tamanho das partículas foi investigado por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS). As medidas de DLS foram realizadas para amostras desenvolvidas no método de Np ou DI, variando o tipo de solvente utilizado, isto é, Ac., EtOH e THF, e para amostras de micelas de copolímero obtidas por Np usando EtOH e dioxano como solvente. Sistemas contendo os compostos triazenídicos e preparados pelo método de pré-filme ou diálise também foram caracterizados. Todas as curvas de auto-correlação estão ilustradas no Anexo C.

As variações do solvente foram realizadas levando-se em consideração que uma mudança no solvente empregado terá um efeito em três dos seis parâmetros de interação envolvidos no sistema. Estes seis parâmetros de interação são: polímero A – polímero B, solvente – polímero A, solvente – polímero B, solvente – droga, droga – polímero A e droga – polímero B. A mudança nos parâmetros de interação resulta em mudanças nas dimensões da micela, mas geralmente de forma diferenciada para a corona e blocos centrais. A Escolha dos solventes (Ac., EtOH, THF e dioxano) foi baseada nas propriedades destes como a solubilidade dos segmentos poliméricos, polaridade, miscibilidade com água e propriedades ópticas.<sup>26</sup>

A Figura 4.26 mostra a curva de auto-correlação e a respectiva distribuição dos tempos de relaxação (transformados para valores de diâmetros pela equação de Stokes-Einstein) para um sistema representativo do comportamento geralmente observado neste trabalho (exp. 11). De um modo geral, as curvas mostram a existência de dois processos de relaxação que estão associados a duas populações distintas de nanopartículas. No presente caso, objetos uniformes bem definidos com diâmetro de 30 nm estão presentes na solução, além um uma população de agregados dinâmicos (formam-se novamente após ultracentrifugação ou ultrafiltração) com tamanho superior em torno de 300 nm. Tendo em vista as propriedades ópticas de colóides, a razão em termos de número de partículas é de aproximadamente pequenas:grandes  $10^6:1$ . Portanto, pode-se considerar que tais sistemas são uniformes.



**Figura 4.26.** Curva de auto-correlação (acima) e respectiva distribuição dos tempos de relaxação (abaixo) para solução referente ao experimento 11.

Os valores dos diâmetros de sistemas micelares representativos que foram estudados por DLS estão relatados na Tabela 4.13. Como se pode verificar, o tamanho medido das micelas no exp. 4, aproximadamente 750 nm, estão acima do limite ideal para as aplicações desejadas, uma vez que, o tamanho das partículas é um parâmetro muito importante para a entrega da droga intracelular, sendo, neste caso, o tamanho ideal  $< 200$  nm. Esse limite no tamanho se deve porque tamanhos pequenos de micelas é benéfico para manter baixos níveis de absorção do sistema retículo endotelial, mínima excreção renal e efeito efetivo de aumento da permeabilidade e retenção no tumor alvo.<sup>102,103</sup>

Este foi o fator principal que levou à exclusão de THF como solvente neste trabalho. Além disso, as micelas foram bastante instáveis, levando a uma rápida

precipitação da droga. Nos demais casos, o tamanho das micelas estão em acordo com as dimensões dos blocos elementares de construção (cadeias poliméricas). O processo de encapsulamento não provoca variações significativas no tamanho médio das partículas.

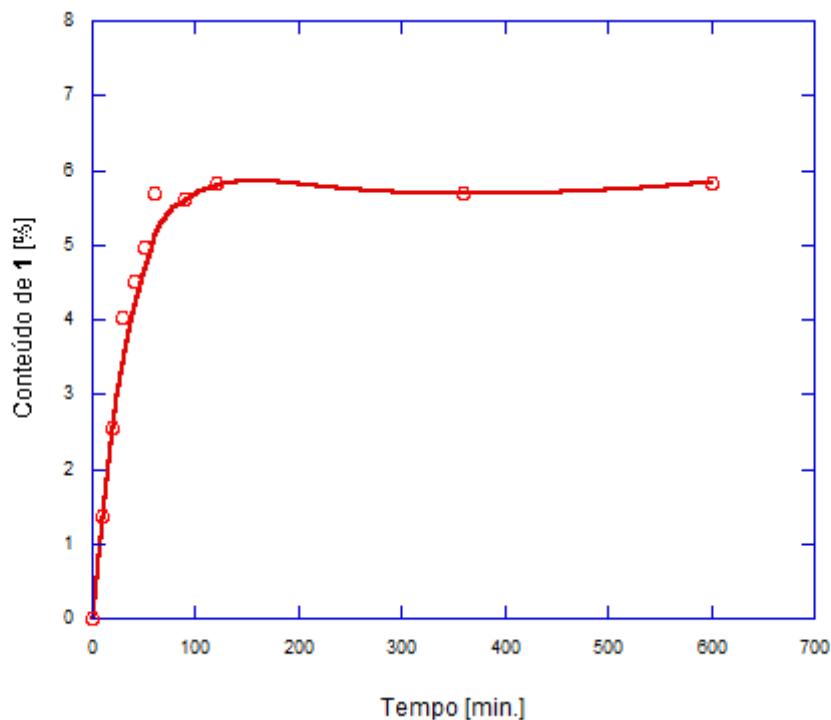
**Tabela 4.13.** Valores de diâmetros das micelas carregadas com o composto **1**, obtidos por medidas de DLS.

Experimento	Método	Polímero <sup>a</sup>	Solvente	Diâmetro (nm)
04	DI	Tb	THF	750
07	Np	Tb	Ac.	100
09	Np	Tb	EtOH	50
10	Filme/Ac.	Tb	Dioxano	25
11	Filme/Ac.	Tb	EtOH	30
12	Diálise/Ac.	Tb	Dioxano	25
13	Diálise/Ac.	Tb	EtOH	15
14	Filme/Ac.	Db	Dioxano	25
15	Diálise/Ac.	Db	Dioxano	20
16	Np	Db	Dioxano	25
17	Np	Tb	Dioxano	25

<sup>a</sup> Tb = copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>; Db = copolímero dibloco PS<sub>60</sub>-*b*-PAA<sub>30</sub>.

#### 4.6.4 Cinética de carregamento do composto 1

Para determinar qual o tempo de agitação da solução das micelas em contato com o pré-filme no carregamento com o composto **1**, um estudo da cinética de carregamento foi desenvolvido utilizando-se a mesma metodologia adotada para a quantificação do encapsulamento, ou seja, através de espectroscopia eletrônica de UV-Vis. Para isso, sucessivas alíquotas da solução em carregamento foram coletadas, filtradas em filtro com poros de 0,45 µm usando uma seringa descartável, e medido o espectro UV-Vis. Com cada absorbância calculou-se a respectiva concentração e plotou-se o gráfico tempo *vs* concentração (%) da droga na micela, conforme ilustrado na Figura 4.27. Verificou-se com isso que o total carregamento das micelas se dá em 120 minutos.



**Figura 4.27.** Cinética de carregamento do composto 1, em micelas do copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>

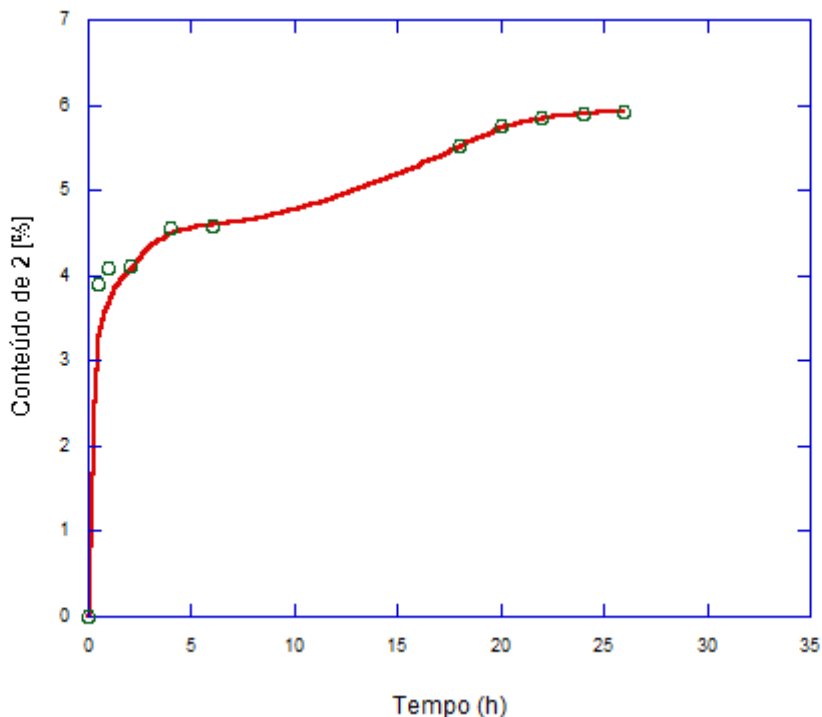
Conteúdo de 1 [%]	1,4	2,6	4,0	4,5	5,0	5,7	5,6	5,8	5,7	5,8
Tempo [min.]	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0	60,0	90,0	120,0	360,0	600,0

Comparando o máximo carregamento atingido  $\sim 6,0$  (%) com valores apresentados dos exp. 10 e 11 de 9,7 e 7,7 (%) respectivamente, verificasse uma diferença entre estes. Acredita-se que este fato se deve à perda de algumas micelas por adsorção ao filtro (antes de medir o espectro), e pela diminuição da solução de micelas em contato com o pré-filme, uma vez que, ao final do estudo aproximadamente metade da solução foi retirada do frasco para análise (não houve reposição após cada retirada de alíquota).

#### 4.6.5 Cinética de carregamento do composto 2

A avaliação do tempo para se atingir o máximo carregamento do composto 2 em micelas do copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>, seguiu a mesma metodologia descrita na seção anterior, para o composto 1. As micelas foram preparadas por Np com dioxano. O perfil cinético obtido no gráfico tempo *vs* concentração (%) da droga na micela, está ilustrado na Figura 4.28. O valor máximo

de carregamento atingido ocorreu em um tempo muito maior do que o que se esperava, que era de ~ 1h. O mecanismo de carregamento será discutido na seção seguinte.

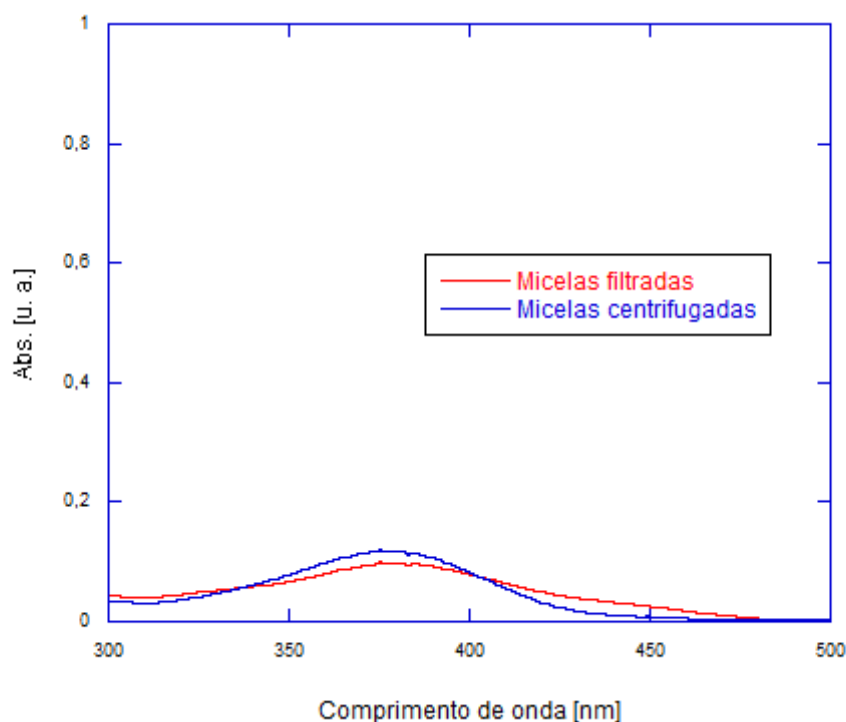


**Figura 4.28.** Cinética de carregamento do composto **2** em micelas do copolímero tribloco PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>.

Conteúdo de <b>1</b> [%]	0,0	3,9	4,1	4,1	4,6	4,6	5,5	5,8	5,9	5,9	5,9
Tempo [ h ]	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	18,0	20,0	22,0	24,0	26,0

Diferentemente do que se verificou para o composto **1**, aqui o valor máximo de carregamento condiz com valores obtidos em outros experimentos (Tabela 4.12) Porém, acredita-se que os mesmos fatos que levaram a um carregamento menor do composto **1** no respectivo estudo cinético, ocorrem neste caso (composto **2**), pois, os valores de ~ 6(%) alcançados nos estudos de carregamento foram obtidos deixando-se as micelas 1 hora em contato com o pré-filme. Já no estudo da cinética de carregamento o valor máximo foi verificado após ~ 24h de contato entre micelas e pré-filme, o que permite a conclusão de que sem a retirada de aproximadamente metade das micelas e separando-se o excedente da droga não encapsulada por meio de centrifugação, ao invés de usar filtração com micro-filtro, um expressivo aumento na CE é alcançado. Esse fato foi confirmado medindo-se o espectro UV-Vis

da solução remanescente do estudo da cinética de carregamento, separando-se o excesso de droga não encapsulada, por centrifugação. O respectivo espectro está ilustrado na Figura 4.29, acompanhado do espectro medido no tempo em que o máximo carregamento foi atingido (micelas filtradas).



**Figura 4.29.** Comparação dos espectros de UV-Vis da solução de micelas filtradas e centrifugadas após o estudo de cinética de carregamento.

#### 4.6.6 Mecanismos de carregamento

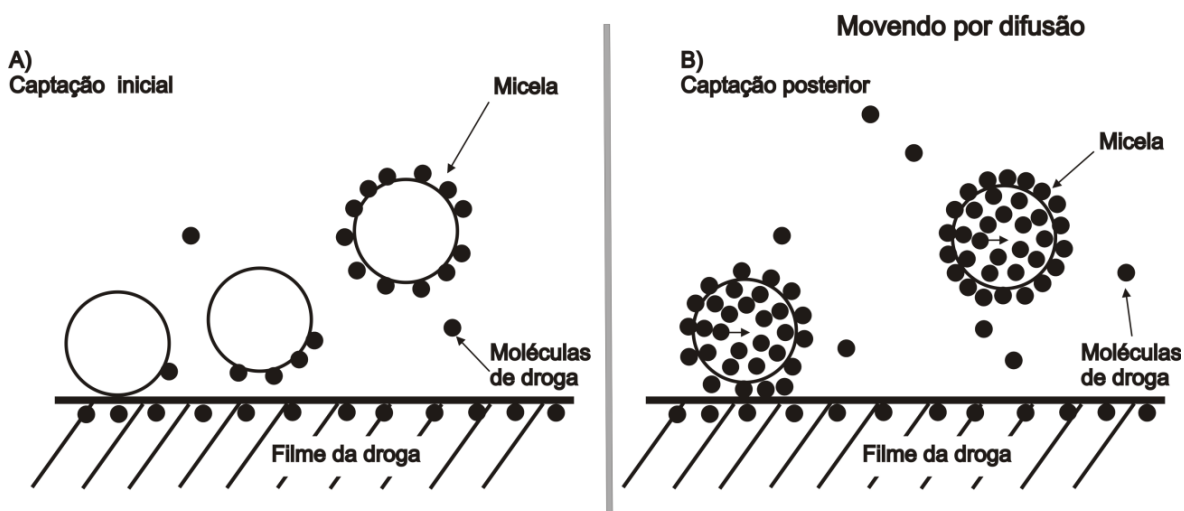
Em ambos os estudos de carregamento (compostos **1** e **2**), verificou-se o mesmo mecanismo, o qual também é condizente com o relatado por Vyhňalkova et al.,<sup>29</sup> conforme discutido a seguir.

##### 4.6.6.1 Mecanismo de transferência da droga do filme para as micelas

O mecanismo de transferência de moléculas da droga para a superfície das micelas ocorre por meio de adsorção, conforme resumido esquematicamente na Figura 4.30, aonde A) representa a captação inicial: transferência de moléculas da droga do filme para a micela durante colisões transitórias e B) representa a etapa de captação posterior: incorporação de moléculas por difusão. Como as micelas entram em contato com o filme da droga, moléculas da droga são adsorvidas na superfície



das micelas. Por causa da agitação da solução, as micelas com moléculas da droga adsorvidas estão continuamente em contato, ou não, com o filme da droga e durante cada contato as moléculas da droga adicionais são transferidas do filme para as micelas. A adsorção da droga na superfície da micela ocorre até que a saturação da superfície das micelas seja alcançada, ou seja, formado uma monocamada, o que ocorre de acordo com a cinética de carga das micelas.

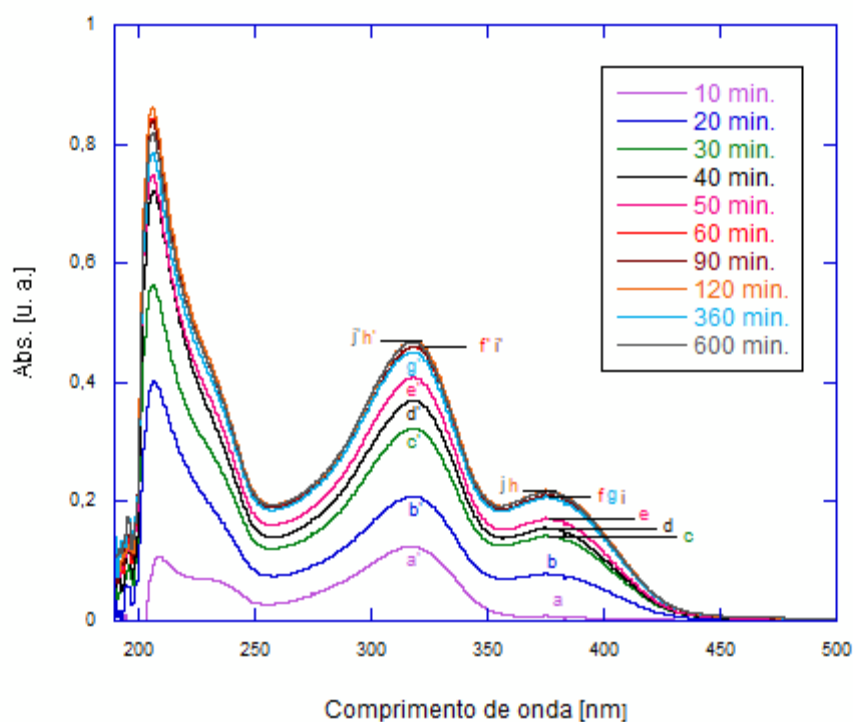


**Figura 4.30.** Representação esquemática do mecanismo de carregamento de micelas pelo método de pré-filme, adaptado de Vyhnalkova et al.<sup>29</sup>

#### 4.6.6.2 Mecanismo de incorporação da droga nas micelas

O mecanismo de incorporação da droga nas micelas é esquematicamente ilustrado na Figura 4.30 B, na qual está representada a fase posterior de absorção de moléculas da droga pelas micelas, principalmente o incorporamento das moléculas da superfície para o núcleo de PDPA. Como é possível verificar nos espectros de UV-Vis das cinéticas de carregamento de **1** e **2**, apresentados nas Figura 4.31 e Figura 4.32 respectivamente, este processo é muito mais lento do que a adsorção das moléculas na superfície das micelas, e, portanto, é a etapa determinante do carregamento da droga.

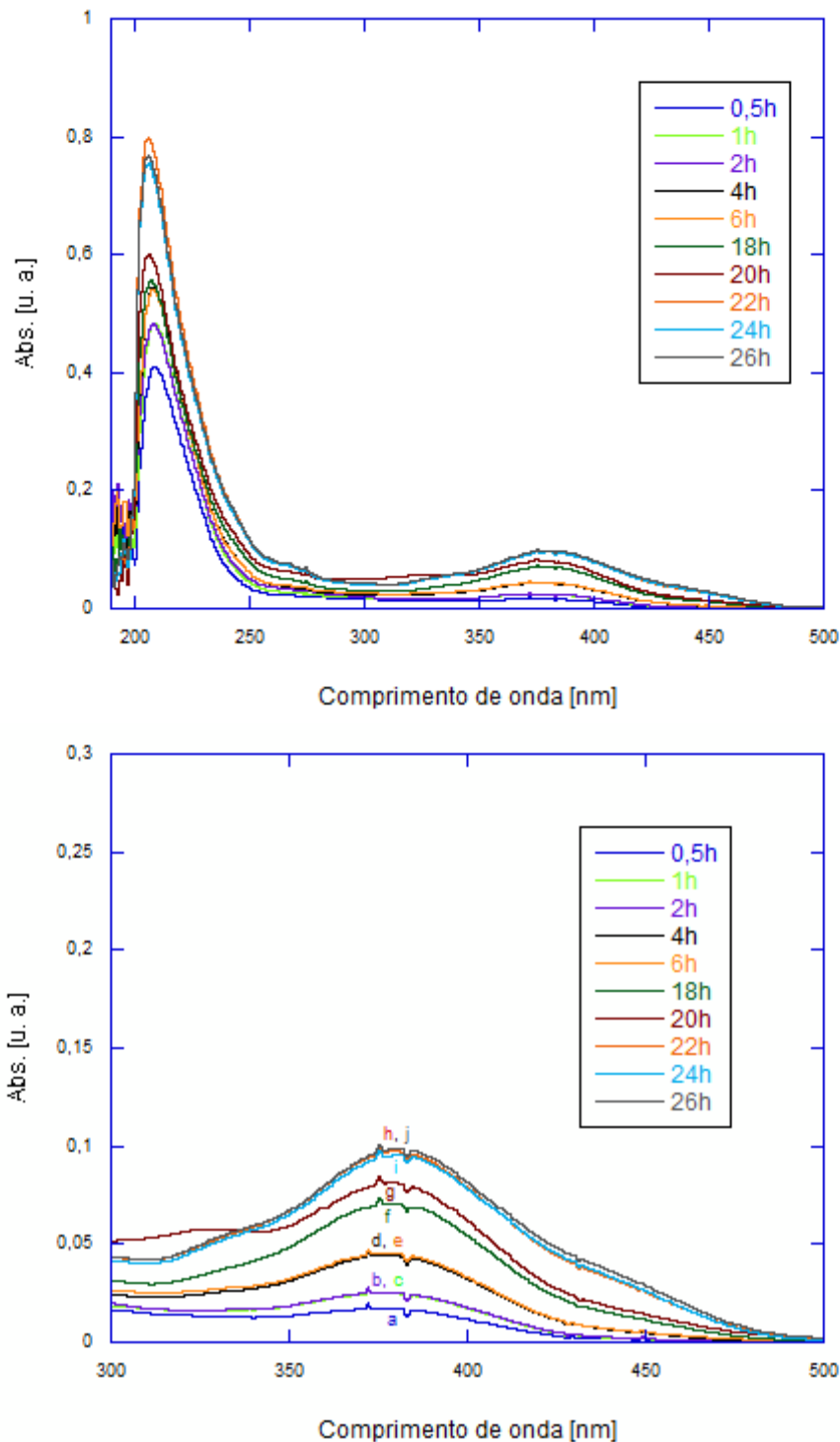
As moléculas da droga são transferidas da superfície para dentro do núcleo por difusão. Este processo continua até que a carga das micelas atinja o equilíbrio termodinâmico. Os espaços vazios na superfície das micelas são reabastecidos a partir do filme da droga pelo mecanismo discutido na seção anterior.



**Figura 4.31.** Espectros de UV-Vis do composto **1** para o estudo de cinética de carregamento.

Na figura acima pode ser identificada as duas etapas do mecanismo de carregamento das micelas. Nas curvas “a” e “b” tem-se a etapa da adsorção das moléculas da droga na superfície das micelas. Formada a monocamada, as moléculas passam a mover-se por difusão para dentro do núcleo, o que se pode atribuir às curvas “c”, “d” e “e”. Já nas curvas “f”, “g”, “h”, “i” e “j” verifica-se a saturação do núcleo das micelas, atingindo com isso o equilíbrio termodinâmico.

Estes mesmos traços são evidenciados quando se analisa os espectros do composto **2** obtidos no estudo da cinética de carregamento deste composto, conforme ilustra a Figura 4.32.



**Figura 4.32.** Espectros de UV-Vis das micelas do composto **2**, usados no estudo da cinética de carregamento (superior) e destaque na banda do triazeno (inferior).

Nesse caso as etapas de adsorção das moléculas de **2** na superfície das micelas é observada até o tempo de 6h, curva “e”. Na curva “f”, após 18h de contato/agitação da solução de micelas com o pré-filme, provavelmente esteja ocorrendo a difusão de moléculas adsorvidas na superfície para o núcleo das

micelas e sucessivo preenchimento dos espaços vazios deixados na superfície, até se atingir o equilíbrio termodinâmico, ou seja, o máximo carregamento, em aproximadamente 24h (curvas “h”, “i” e “j”). Como se pode notar este mecanismo mostrou-se muito mais lento que o mecanismo do composto **1**, o que pode estar relacionado com a estrutura química do composto **2** - um complexo metálico, e com uma possível diferença na hidrofobicidade entre os compostos.

## 4.7 Estudos de Atividade Biológica

Nesta seção serão reportados os resultados dos ensaios de atividade biológica desenvolvidos até o presente momento com os composto **1** e **2** nas formas não encapsuladas.

### 4.7.1 Avaliação da Atividade Antibacteriana dos compostos 1 e 2

Avaliações de atividade antibacteriana de **1** e **2** não encapsulados foram realizadas com bactérias normais e bactérias multi drogas resistentes (MDR). Na Tabela 4.14 estão resumidos os valores de CIM dos dois compostos para cada tipo de bactéria estudado. O pré-ligante triazeno **1** não apresentou potencialidades frente a este tipo de microrganismo, ficando suas CIM todas a cima de 180 µg/ml. Já o triazenido complexo **2** apresentou bons valores de CIM frente à alguns tipos de bactérias, isto é, concentrações de 16 µM.

**Tabela 4.14.** Valores de CIM de **1** e **2** nas respectivas bactérias estudadas.

Bactéria	CIM	
	1	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> n° 16	> 128µg/mL	16 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 35	> 128µg/mL	16 µg/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i> n° 44	> 128µg/mL	> 128 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 45	> 128µg/mL	16 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> n° 57	> 128µg/mL	> 128 µg/mL
<i>Klebsiella oxytoca</i> (MDR n° 112)	> 128µg/mL	16 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR n° 132)	> 128µg/mL	> 128 µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (MDR n°164)	> 128µg/mL	128 µg/mL

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR nº 165)	> 128µg/mL	> 128 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR nº 179)	> 128µg/mL	> 128 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR nº 223) #	> 128µg/mL	> 128 µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (MDR nº 224) #	> 128µg/mL	> 128 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR nº 236) #	> 128µg/mL	128 µg/mL
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (MDR nº 258) #	> 128µg/mL	> 128 µg/mL
<i>Enterobacter brevis</i> (MDR 285) #	> 128µg/mL	> 128 µg/mL
<i>Acinetobacter baumannii</i> (MDR nº 325)	> 128µg/mL	128 µg/mL
<i>Enterobacter brevis</i> (MDR 590) *	> 128µg/mL	128 µg/mL
<i>Acinetobacter baumannii</i> (MDR nº 707)	> 128µg/mL	> 128 µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (MDR nº 806)	> 128µg/mL	64 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR nº 955)	> 128µg/mL	128 µg/mL

\* Sensível apenas a 2 antimicrobianos; # Resistente a todos os antimicrobianos testados.

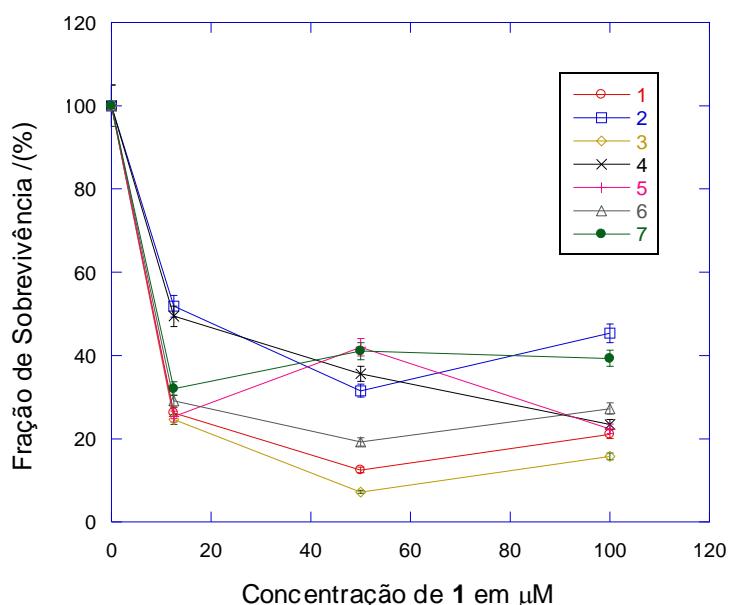
#### 4.7.2 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro* dos compostos 1 e 2

Os ensaios foram realizados baseados no Método de Redução do {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (MTT).<sup>86</sup> O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan. Este produto, por meio de análise colorimétrica, possibilita a identificação de células viáveis.

Nestes estudos 3 concentrações diferentes dos compostos 1 ou 2 foram usadas para cada tipo de célula, ou seja, 12,5µM, 50µM e 100µM. Na tabela 4.7 estão listados os resultados finais nas 3 diferentes concentrações do composto 1 em células leucêmicas de sete pacientes do HUSM. Na Figura 4.33 está ilustrada a curva de resposta a concentração para cada caso estudado envolvendo o composto 1.

**Tabela 4.15.** Dados (%) dos ensaios citotóxicos *in vitro* do composto **1** em 7 diferentes células.

Conc. <b>1</b>	Percentual de células mortas por paciente						
	Paciente <b>1</b>	Paciente <b>2</b>	Paciente <b>3</b>	Paciente <b>4</b>	Paciente <b>5</b>	Paciente <b>6</b>	Paciente <b>7</b>
100 $\mu$ M	21,07	45,33	15,78	23,42	22,37	27,28	39,31
50 $\mu$ M	12,52	31,56	7,22	35,58	41,96	19,25	41,07
12,5 $\mu$ M	26,18	51,82	24,64	49,40	25,31	29,08	32,07



**Figura 4.33.** Curvas de resposta a concentração de células viáveis, para o composto **1**.

Estes dados demonstram consideráveis potencialidades do composto **1** frente a células leucêmicas dos pacientes 2, 4, 5 e 7. Todavia, analisando-se as curvas de respostas a concentração e com base em relatos na literatura,<sup>104</sup> fica claro também que as potencialidades da droga não se relacionam escalaramente com a concentração da mesma, ou seja, a sobrevivência das células não depende da concentração. O que se pode verificar também, com base nos dados da Tabela 4.15 e nas curvas da figura acima, é que para os pacientes 1, 2, 3, 4 e 6 as respostas a concentração seguiram um único perfil, sendo a concentração de 12,5  $\mu$ M a que melhor se apresentou no estudo.

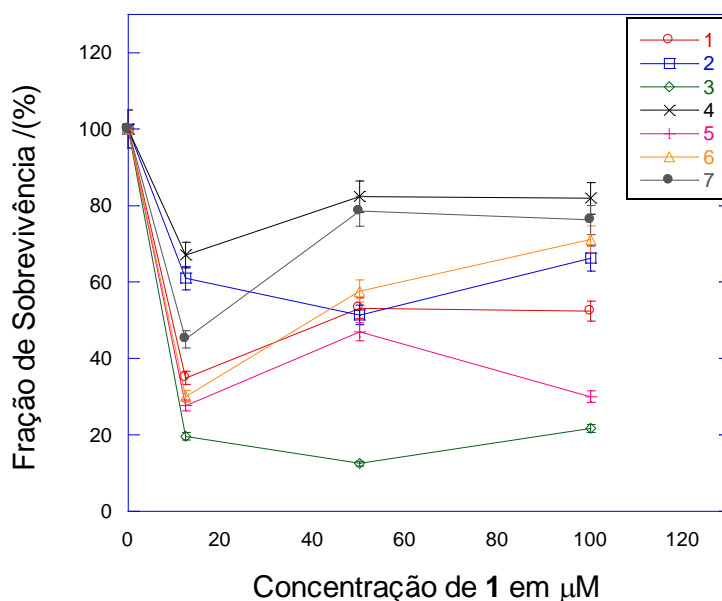
Os dados referentes à avaliação da citotoxicidade do composto **2** estão listados na Tabela 4.16. Um aumento muito expressivo em todos os casos é observado em comparação com os dados do composto **1**. Estes resultados parciais

reforçam o que se esperava para o composto **2** devido a presença do centro metálico de ouro na molécula.

**Tabela 4.16.** Dados (%) dos ensaios citotóxicos *in vitro* do composto **2** em 7 diferentes células.

Conc. 1	Percentual de letalidade celular por paciente						
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Paciente 6	Paciente 7
100µM	52,33	66,17	21,67	81,92	30,05	71,17	76,23
50µM	53,15	51,39	12,51	82,30	46,93	57,61	78,52
12,5µM	34,91	60,93	19,68	67,03	27,73	30,12	45,05

Assim como evidenciado no composto **1**, as curvas de resposta a concentração de **2**, Figura 4.34, não apresentam um dependência quantitativa da concentração da droga.



**Figura 4.34.** Curvas de resposta a concentração de células viáveis, para o composto 2.

Analisando-se os perfis das curvas de resposta a concentração para o composto **2** é possível identificar uma regularidade nos efeitos da concentração da droga nos ensaios com células dos pacientes 1, 4, 5 e 7. A concentração ótima, nestes casos, parece ser a concentração intermediária, isto é, 50 µM, sendo que para os casos de 1, 4 e 7 houve uma pequena variação, a menor, da concentração

de 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , já no caso do paciente 5, uma considerável diferença entre a concentração de 50  $\mu\text{M}$  para 100  $\mu\text{M}$  é verificada.



## 5 Conclusões e Perspectivas

Mediante os objetivos traçados, e com base nos resultados alcançados neste trabalho, as conclusões obtidas encontram-se elencadas abaixo:

- I Um ligante triazeno, identificado neste trabalho por **1**, foi sintetizado e empregado na síntese do complexo envolvendo o centro metálico de Au(I) (composto **2**).
- II Ambos os compostos tiveram suas estruturas cristalinas e moleculares determinadas por difração de raios-X em monocristal, o que possibilitou conhecer as suas propriedades estruturais como: interações intra e intermoleculares, distâncias e ângulos de ligação e arranjo no espaço tridimensional. Técnicas espectroscópicas como IV e UV-Vis, além de ponto de fusão, foram empregadas na caracterização de **1** e **2**, permitindo a verificação da equivalência entre as fases cristalina e pó.
- III Avaliações da atividade antibacteriana e citotóxica *in vitro*, com células leucêmicas, foram realizadas com os compostos livres. Em ambos os testes o composto **2** mostrou-se mais efetivo, sendo que, prósperos resultados de citotoxicidade foram obtidos nos ensaios com células dos pacientes 2, 4, 6 e 7, todos com valores de letalidade celular acima de 60%.
- IV O encapsulamento dos compostos **1** e **2** foi realizado pelos métodos de nanoprecipitação, dissolução indireta, diálise e pré-filme, sendo que este último mostrou-se mais apropriado para este fim. Bons valores de CE (% m/m) foram alcançados utilizando-se o copolímero tribloco anfifílico PEO<sub>113</sub>-*b*-PG2MA<sub>30</sub>-*b*-PDPA<sub>50</sub>, comparado com valores descritos na literatura.

Sendo assim, o composto **2** mostrou-se ser um forte candidato ao tratamento de vários tipos de leucemias, devendo demais estudos a este respeito serem desenvolvidos em trabalho posterior. Da mesma forma, o método de pré-filme mostrou-se eficiente no encapsulamento de triazenos em micelas de copolímero.



## 6 Referências Bibliográficas

- 1 – Jafelicci Jr., M. e Varanda, L. C., *Qnesc*, **1999**, 9, 9-13.
- 2 – Mihara, M.; Cunningham, M. and Jessop, P. *Macromol.* **2011**, 44(8), 2501-2509.
- 3 – Urbani, C. N. and Monteiro M. J., *Macromol.* **2009**, 42, 3884–3886.
- 4 – Griset, A. P.; Walpole, J.; Liu, R.; Gaffey, A.; Colson, Y. L. and Grinstaff, M. W., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 2469–2471.
- 5 – Schaffazick, S. R. e Guterres, S. S., *Quim. Nova*, **2003**, 26, nº. 5, 726-737.
- 6 – Lodge, T. P.; Pudil, B.; Hanley, K. J., *Macromol.* **2002**, 35, 4707-4717.
- 7 – Carpentier, J.; Ajellal, N.; Thomas, C. M.; Aubry, T. and Grohens Y., *New J. Chem.*, **2011**, 35, 876–880.
- 8 – Tsitsilianis, C. and Latridi, Z., *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 5560–5562.
- 9 – Liu, S.Q.; Tong, Y.W.; and Yang, Y. Y., *Biomat.*, **2005**, 26, 50-64.
- 10 – Schubert, U. S.; Sebastianus, N. H.; Staal, B. B. P.; Rasa, M. and Meier, M. A. R., *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, 26, 1918–1924.
- 11 – Teixeira, M.; Alonso, M. J.; Pinto, M. M. M., Barbosa, C. M., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2005**, 59, 491-500.
- 12 – Moore, D. S.; Robinsons, S. D., *Adv. Chem. Radiochem.*, 30: 1-68, **1986**.
- 13 – Hartmann, E.; Strähle, J., *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.*, **1988**, 43b, 818-824.
- 14 – Kirk, K. L. J., *Org. Chem.* **1978**, 43, 4381.
- 15 – Jean-Claude, B. J.; Mustafa, A.; Cetateanu, N. D.; Damian, Z.; De Marte, J.; Yen, R.; Vasilescu, D.; Chan, T. H. and Leyland-Jones, B., *British Journal of Cancer*, **1997**, 76(4), 467-473.
- 16 – Marchesi, F.; Turriziani, M.; Tortorelli, G.; Avvisati, G.; Torino, F. and De Vecchis, L., *Pharmacological research*. **2007**, 56, 257-287.
- 17 – Fricker, S. P., *Gold Bulletin*, **1996**, 29(2), 53-60.
- 18 – Shaw, C. F., III, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2589-2600.
- 19 – IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*. **1996**, 68, 2287-2311.
- 20 – Giacomelli, C. Tese de Doutorado, BORDEAUX 1, **2007**.
- 21 – Klok, H. A.; Lecommandoux, S., *Adv. Mater.* **2001**, 13, (16), 1217-1229.
- 22 – Abetz, V.; Simon, P. F. W., *Adv. Polym. Sci.* **2005**, 189, 125-212.
- 23 – Bucknall, D. G.; Anderson, H. L., *Science*, **2003**, 302, 1904-1905.
- 24 – Förster, S. and Plantenberg, T., *Angew. Chem. Int.*, **2002**, 41, 688- 714.

- 25 – Hamley, I. W., Block Copolymer in Solution: Fundamentals and Applications. Wiley New York, **2005**.
- 26 – Allen, C.; Maysinger, D. and Eisenberg, A., *Coll. and Surf. B: Biointerf.* **1999**, 16 3–27.
- 27 – Pecora, R., Borsali, R. Soft-Matter Characterization, v.1, Springer, New York, **2008**.
- 28 – Yang, R.; Meng, F.; Ma, S.; Huang, F.; Liu, H.; and Zhong, Z. *Biomacromol.*, **2011**, 12, 3047–3055
- 29 – Vyhnanekova, R.; Eisenberg, A. and van de Vem, T. G. M. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112, 8477–8485
- 30 – Giacomelli, F. C.; Stepánek, P.; Giacomelli, C.; Schmidt, V.; Jäger, E.; Jäger, A. and Ulbrich, K. *Soft Matter*, **2011**, 7, 9316-9325
- 31 – Giacomelli, C.; Borsali, R. Disordered Phase and Self-Organization of Block Copolymer Systems. In: Redouane Borsali; Robert Pecora. (Org.). Soft Matter Characterization. Springer , New York:, v. 1, p. 133-183, **2008**.
- 32 – Tyrrell, Z. L.; Shen, Y.; Radosz, M. *Progress in Polymer Science*, **2010**, 35, 1128-1143.
- 33 – Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E., *J. Control. Release*, **2001**, 70, 1-20.
- 34 – Meier, M. A. R.; Aerts, S. N. H.; Staal, B. B. P.; Rasa, M. and Schubert, U. S., *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, 26, 1918–1924.
- 35 – Dos Santos, R. M. M.; Fialho, S. L., *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, **2008**, 37, 52-59.
- 36 – Faisant, N.; Siepmann, J.; Benoit, J. P., *Eur. J. Pharm. Sci*, **2002**, 15, 355-366.
- 37 – Jain, R. A.; Rhodes, C. T.; Railkar, A. M. Malick, A. W.; Shah, N. H., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2000**, 50, 257-262.
- 38 – Rieux, A.; Fievez V.; Garinot M.; Schneider Y. J.; Préat V., *J. Control. Release*, **2006**, 116, 1-27.
- 39 – Hubbell, J. A. *Science*, **2007**, 300, 595-596.
- 40 – Lyer, K. A.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. *Drug Discovery Today*, **2006**, 11, 812-818.
- 41 – Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 64, 136-151.
- 42 – Torchilin, V. P.; *The AAPS Journal*, **2007**, 9(2), article 15.

- 43 – Allen, F. H.; Kennard, O.; Watson, D. G.; Brammer, L. Orpen, A. G.; Taylor, R., *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **1987**, 2, S1-19.
- 44 – Hörner, M.; Pedroso, A. G.; Bordinhão, J.; Beck, J.; Strähle, J., *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **1996**, 622, 1177-1181.
- 45 – Griess, P., *Proc. Roy. Soc. London*, **1859**, 9, 594.
- 46 – Meldola, R.; Streatfield, F. W., *J. Chem. Soc.*, **1887**, 51, 434.
- 47 – Hörner, M.; Oliveira, G. M.; Bresolin, L.; Oliveira, A. B., *Inorg. Acta*, **2006**, 359, 4631-4634.
- 48 – Shealy, Y. F.; Krauth, C. A.; Montgomery, J. A., *J. Org. Chem.*, **1962**, 27, 2150-2154.
- 49 – Shealy, Y. F.; Krauth, C. A., *J. Med. Chem.*, **1966**, 9, 34-38.
- 50 – Shealy, F. Y.; O'dell, C. A., *J. Pharm. Sci.* **1971**, 60(4), 554-560.
- 51 – Giraldi, T.; Nisi, C.; Connors, T. A. and Goddbard, P. M., *J. Med. Chem.*, **1977**, 20(6), 850-853.
- 52 – Lin, A. J.; Loo, T. L., *J. Med. Chem.* **1978**, 21(3), 268-272.
- 53 – Wilman, D. E. V.; Cox, P. J.; Goddard, P. M.; Hart, L. I.; Merai, K. and Newell, D. R., *J. Med. Chem.*, **1984**, 27, 870-874.
- 54 – Hansch, C.; Venger, B. H.; Hatheway, G. J. and Amrein, Y. U., *J. Med. Chem.* **1979**, 22(5), 473-476.
- 55 – Kolar, G. F. *IARC – Scientific Publications.*, **1986**, 78, 111-126.
- 56 – Luce, J. K.; Thurman, W. G.; Isaacs, B. L. and Talley, R. W., *Cancer Chemoth. Rep.*, **1970**, Part 1, 54(2), 119-124.
- 57 – Skibba, J. L.; Ramirez, G.; Beal, D. D. and Bryan, G. T., *Biochem. Pharmacol.*, **1970**, 19, 2043-2051.
- 58 – Breihaupt, H.; Dammann, A.; Aigner, K., *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, **1982**, 9, 103-109.
- 59 – Tentori, L.; Grasiani, G.; Gilberti, S.; Lacal, P. M.; Bonmassar, E. and D'atri, S., *Leukemia.*, **1995**, 9, 1888-1895.
- 60 – Rachid, Z.; Katsouglas, A.; Brahim, F.; Jean-Claude, B. J., *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 3297-3300.
- 61 – Farrel, N.; Vargas, M. D.; Mascareñas, Y. A.; Gambardella, M. T. D., *Inorg. Chem.*, **1987**, 26, 1426-1429.
- 62 – Behm, M. B.; Tese de Doutorado, UFSM, **2010**.

- 63 – Buruiana E. C.; Niculescu, V.; Buruiana, T., *J. Appl. Polym. Sci.*, **2004**, 92, 2599–2605.
- 64 – Jollimore, J. V. and Vaughan, K., *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 210-214.
- 65 – Vaughan, K. and Stevens, M. F. G., *Chem. Soc. Rev.*, **1978**, 7, 377-397.
- 66 – Ando, R. A.; dos Santos, A. P. V.; Hörner, M. and Santos, P. S., *J. Raman Spectrosc.* 2008, 39, 607–610.
- 67 – Cinta S.; Venter M.; Fickert C.; Haiduc I.; Scholz P, Kiefer W., *J. Mol. Struct.* **1998**, 446, 209-214.
- 68 – Masoud, M. S.; Ali, A. E.; Shaker, M. A.; Ghani, M. A., *Spectrochimica Acta Part A*, **2005**, 61, 133-1140.
- 69 – Khramov, D. M. and Bielawski, C. W., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72 (25), 9407-9417.
- 70 – Ono, R. J.; Suzuki, Y.; Khramov, D. M.; Ueda, M.; Sessler, J. L. and Bielawski, C. W., *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 3239–3245.
- 71 – Hörner, M.; Brancher, A. L.; Silva, A.; Bordinhão, J.; Mossmer, C. M., *Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Commun.*, **2004**, 60, 303-304.
- 72 – Saeki, T.; Son, E. C.; Tamao, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2005**, 78, 1654-1658.
- 73 – Hörner, M.; Casagrande, I. C.; Fenner, H.; Daniels, J. and Beck, J., *Acta Cryst.*, **2003**, C59, m424-m426.
- 74 – Beck, J.; Strähle, J., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 95–96.
- 75 – Johnson, A. L.; Willcocks, A. M. and Stephen, P. R., *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 8613–8622.
- 76 – Sheldrick, G. M.; *SHELXS97*, Program of crystal structure refinement-Release 97-2, University of Göttingen, Germany, **1997**.
- 77 – Brandenburg, K., *Diamond*. Release 3.1d. Crystal Impact GbR, Bonn, Germany, **2006**.
- 78 – Giacomelli F. C., Tese de Doutorado, URGs, **2009**.
- 79 – Lucas, E. F.; Soares, B. G. e Monteiro, E. E. Caracterização de Polímeros. Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica. E-papers, Rio de Janeiro, **2001**.
- 80 – Heuts, J. P. A.; Bonilla, A. M.; Ali, S. I.; Campo, A.; García, M. F. and Herk, A. M., *Macromol.*, **2011**, 44, 4282-4290.
- 81 – Pecora, R. “Dynamic Light Scattering-Applications of Photon Correlation Spectroscopy” (1985), Plenum Press, New York, London.
- 82 – Azevedo, M. M. M., Tese de Doutorado, UNICAMP, **2005**.

- 83 – Provencher, S. W., *Comput. Phys. Commun.* **1982**, 27, 229-242.
- 84 – Hartman, W. W.; Dickey, J. B., *Org. Synth; Coll.* **1943**, 2, 163.
- 85 – Clinical and Laboratory Standards Institute; *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. Approved Standard; 6<sup>th</sup> ed.; Wayne: NCCLS, **2003**, (NCCLS document M7-A6).
- 86 – Mosmann, T., *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63.
- 87 – Hahn, T.; *International Tables of Crystallography*, Vol. A, Space Group Symmetry, 2<sup>nd</sup> Ed., The International Union of Crystallography, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, **1987**.
- 88 – Mercury CSD 2.0 - New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures C. F. Macrae, I. J. Bruno, J. A. Chisholm, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek and P. A. Wood, *J. Appl. Cryst.*, **2008**, 41, 466-470.
- 89 – Nakamoto, K.; *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, V. 1 e V. 2, 5<sup>a</sup> Ed., Oxford University Press, Oxford, **1984**.
- 90 – Colthup, N. B.; Daly, L. H. e Wiberley, S. E.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3<sup>a</sup> Ed., Academic Press, San Diego, **1990**.
- 91 – Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, J. D., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Tradução de Ricardo Bicca de Alencastro, 7<sup>a</sup> Ed., LTC, Rio de Janeiro, **2007**.
- 92 – Visentin, L. C., Tese de Doutorado, UFSM, **2006**.
- 93 – Villis, P. C. M., Tese de Doutorado, UFSM, **2007**.
- 94 – Farias, R. F., *Química de Coordenação: Fundamentos e atualidades*, Ed. Átomo, Brasil, **2005**.
- 95 – Giglio, V. F., Dissertação de Mestrado, UFSM, **2006**.
- 96 – Narayanaswamy, R.; Young, M. A.; Parkhurst, E.; Ouellette, M.; Kerr, M. E.; Ho, D. M.; Elder, R. C.; Bruce, A. E. and Bruce, M. R. M. *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 2506-2517.
- 97 – Giacomelli C.; Schmidt, V. and Borsali R., *Langmuir*, **2009**, 25(23), 13361–13367
- 98 – Wilhelm, M.; Zhao, C.-L.; Wang, Y.; Xu, R.; Winnik, M. A.; Mura, J.-L.; Riess, G.; Croucher, M. D. *Macromolecules*, **1991**, 24, 1033-1040
- 99 – Choucair, A.; Eisenberg, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11993-12000

- 100 – Ajellal, N.; Thomas, C. M.; Aubry, T.; Grohensc, Y. and Carpentier, J-F. *New J. Chem.*, **2011**, 35, 876–880.
- 101 – Wang, Y-C; Tang, L-Y.; Sun, T-M; Li, C-H.; Xiong, M-H. and Wang, J. *Biomacromol.* **2008**, 9, 388–395.
- 102 – Schmalenberg, K. E.; Frauchiger, L.; Nikkhoy-Albers, L.; Uhrich, K. E., *Biomacromol.*, **2001**, 2, 851-855.
- 103 – Huang, W.; Yan, D.; Liu, J.; Huang, X.; Meng, L.; Zhu, X. and Zhou, Y., *Biomacromol.*, **2011**, 12, 1567–1577.
- 104 – Domingues, V. O.; Hörner, R.; Reetz, L. G. B.; Kuhn, F.; Coser, V. M.; Rodrigues, J. N.; Bauchspiess, R.; Pereira, W. V.; Paraginski, G. L.; Locatelli, A.; Fank, J. O.; Giglio, V. F.; and Hörner, M., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, 21, n° 12, 2226-2237.

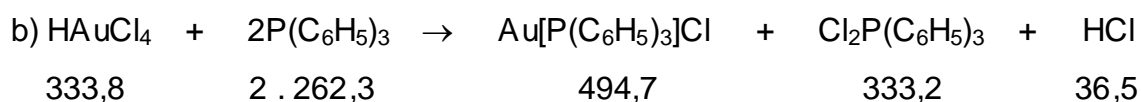
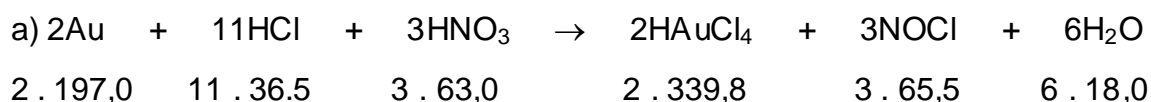


## ANEXOS

### Anexo A

#### SÍNTESE DA TRIFENILFOSFINA DE OURO(I)

Cloro(trifenilfosfina)ouro(I) – AuCl[P(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>]



Dissolvem-se 14,6 g (74,1 mmol) de ouro metálico em 20 mL de água régia contidos em uma cápsula de porcelana de 100 – 200 mL (3 partes de ácido clorídrico concentrado + 1 parte de ácido nítrico concentrado, misturados com muito cuidado na capela e utilizando-se óculos de segurança). Sob aquecimento, procede-se a evaporação da mistura ácida, evitando-se a secura completa. Observa-se a liberação de gás laranja escuro de cloreto de nitrosilo. Repete-se este procedimento, utilizando-se porções de 20 mL de ácido clorídrico concentrado, tantas vezes quantas necessárias, até não mais observar a liberação de gás cloreto de nitrosilo. A massa alaranjada resultante é então dissolvida em 200 mL de etanol. Segue-se a adição de uma solução quente de 39,3 g (0,15 mmol) de trifenilfosfina em aproximadamente 800 mL de etanol. Quase que instantaneamente, forma-se um precipitado branco em uma solução que adquire coloração amarela clara. Agita-se durante ½ hora. Separa-se o precipitado branco por filtração, que é lavado com uma porção de 50 mL de etanol, seguida de uma porção de 50 mL de éter dietílico. Seca-se o produto sob vácuo em dessecador contendo cloreto de cálcio.

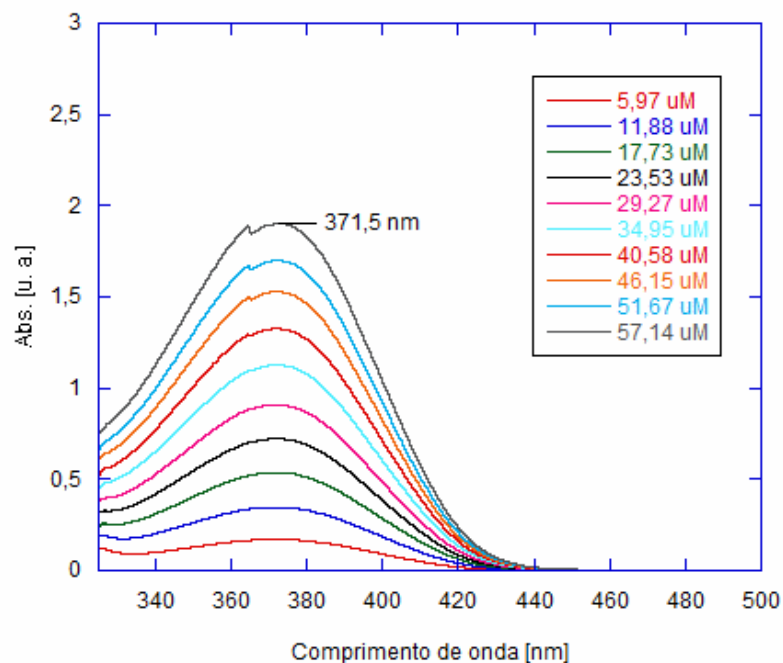
Rendimento: 33,6 g (92% teórico)

Propriedades: Sólido microcristalino branco, sensível à luz e estável ao ar.

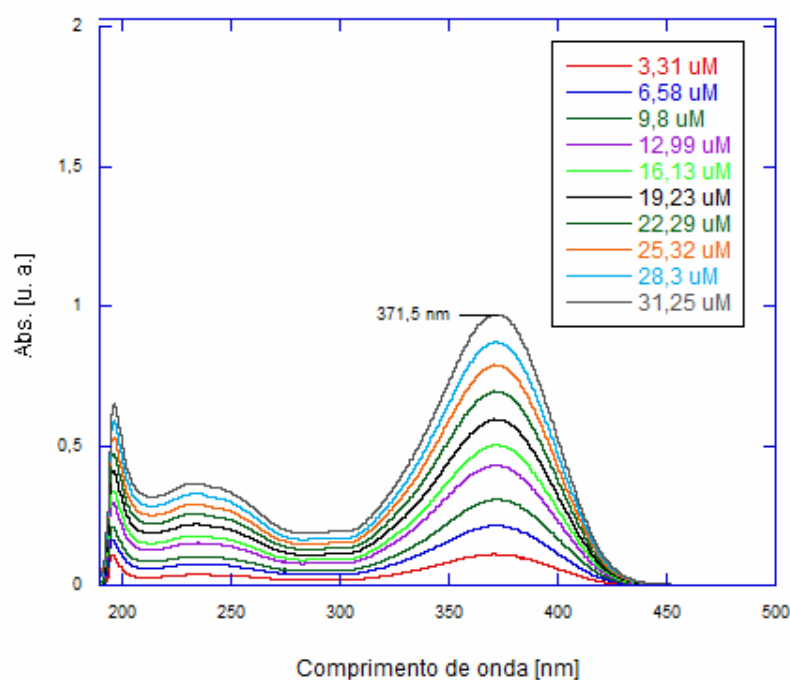
Ponto de fusão: 230 – 240 °C. Recristalizado em uma mistura de 1:1 v/v de benzeno e éter de petróleo, apresenta um ponto de fusão de 248 – 249 °C.

## Anexo B

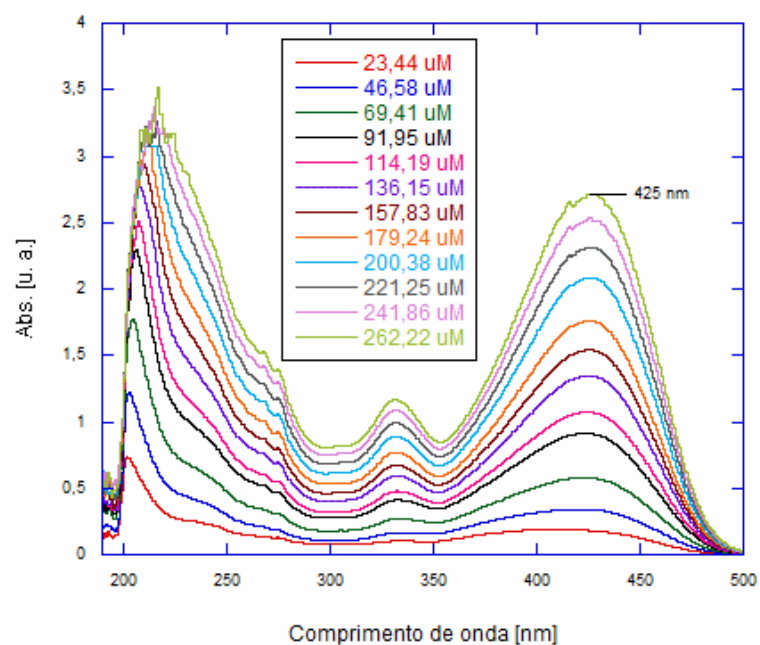
Espectros UV-Vis utilizados na construção das curvas analíticas de 1 e 2.



**Figura B.1.** Espectros de UV\_Vis utilizados para construção da curva analítica do composto 1 em acetona conforme Figura 4.17.



**Figura B.2.** Espectros de UV\_Vis utilizados para construção da curva analítica do composto 1 em etanol conforme Figura 4.18.

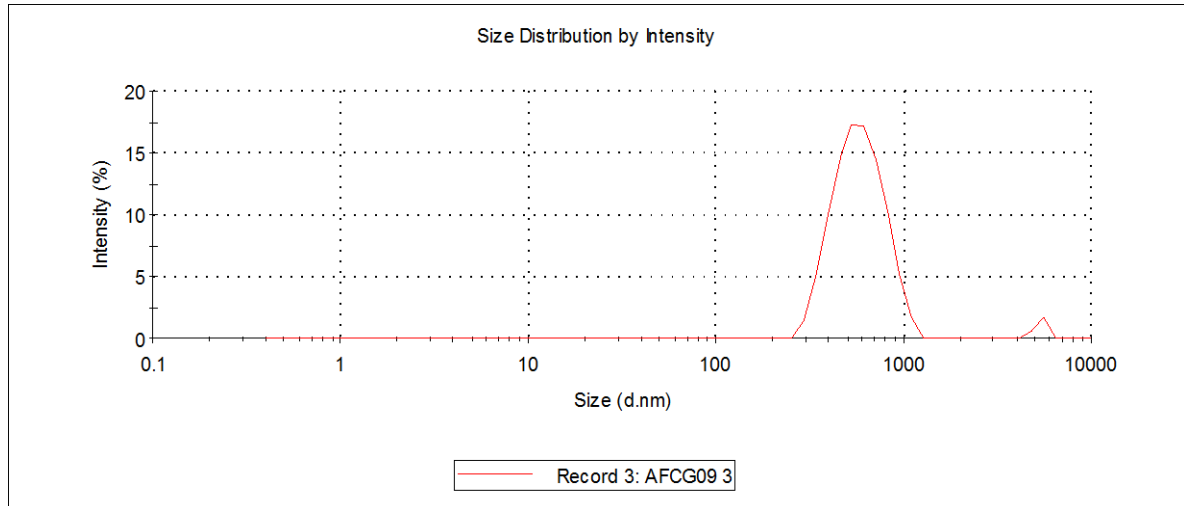


**Figura B.3.** Espectros de UV\_Vis utilizados para construção da curva analítica do composto 2 em etanol conforme Figura 4.20.

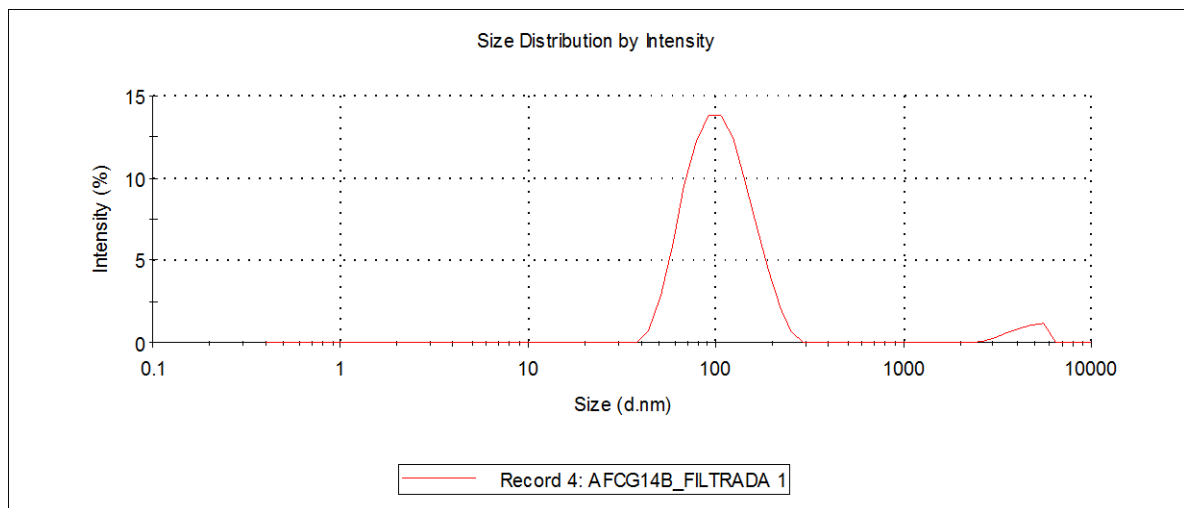
## Anexo C

Curvas de auto-correlação obtidas por DLS.

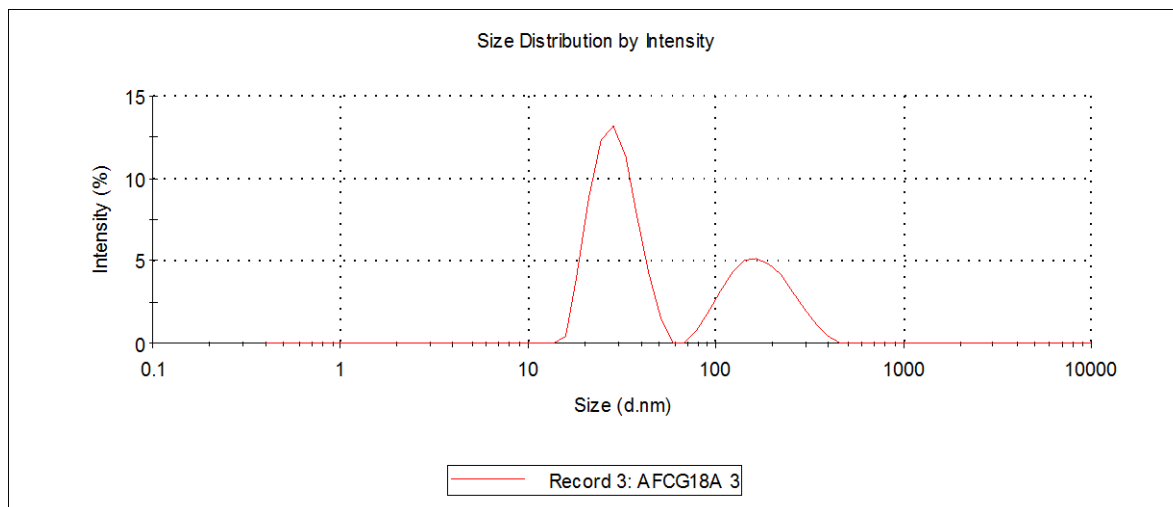
NPs 04



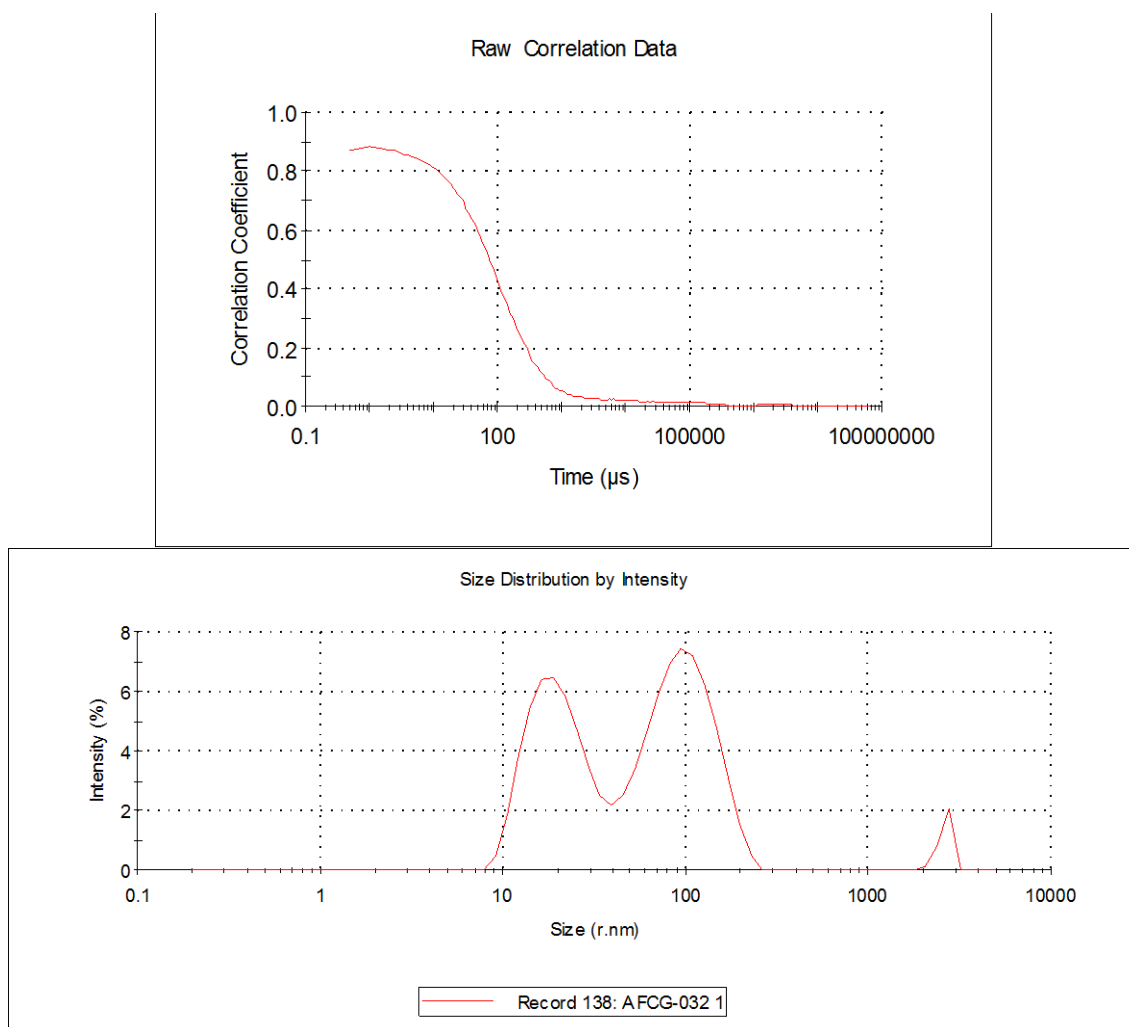
NPs 07



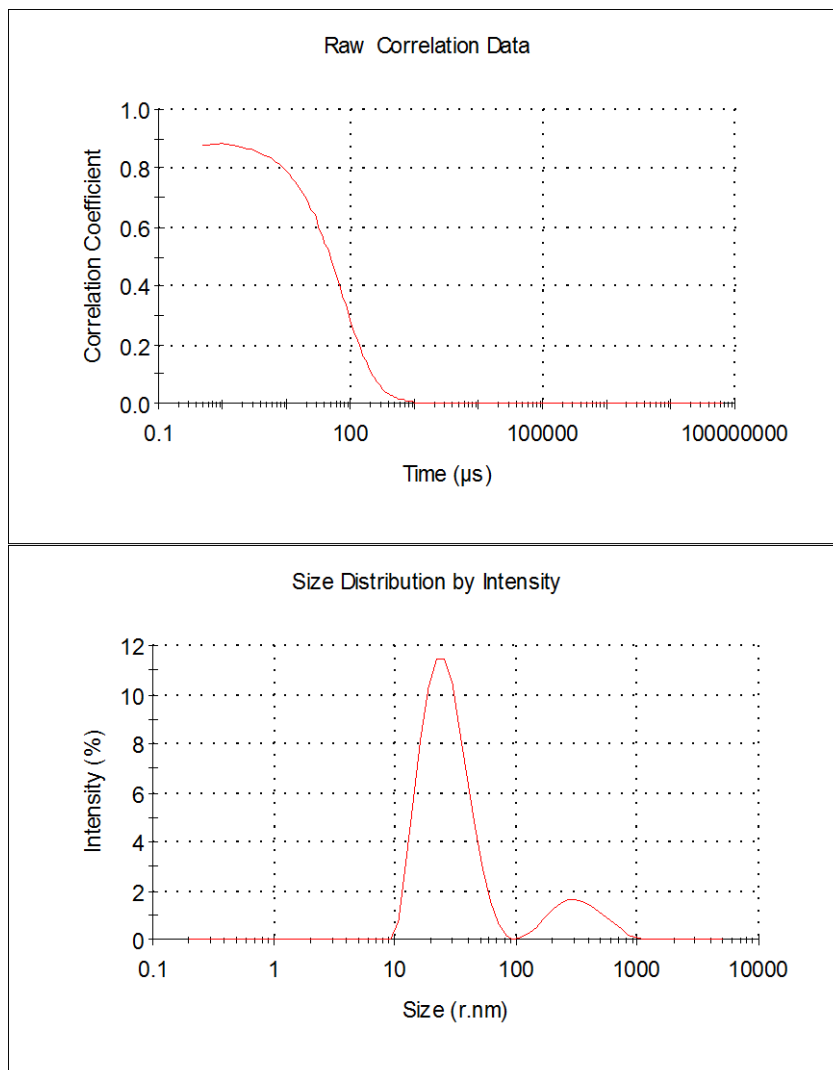
## NPs 09



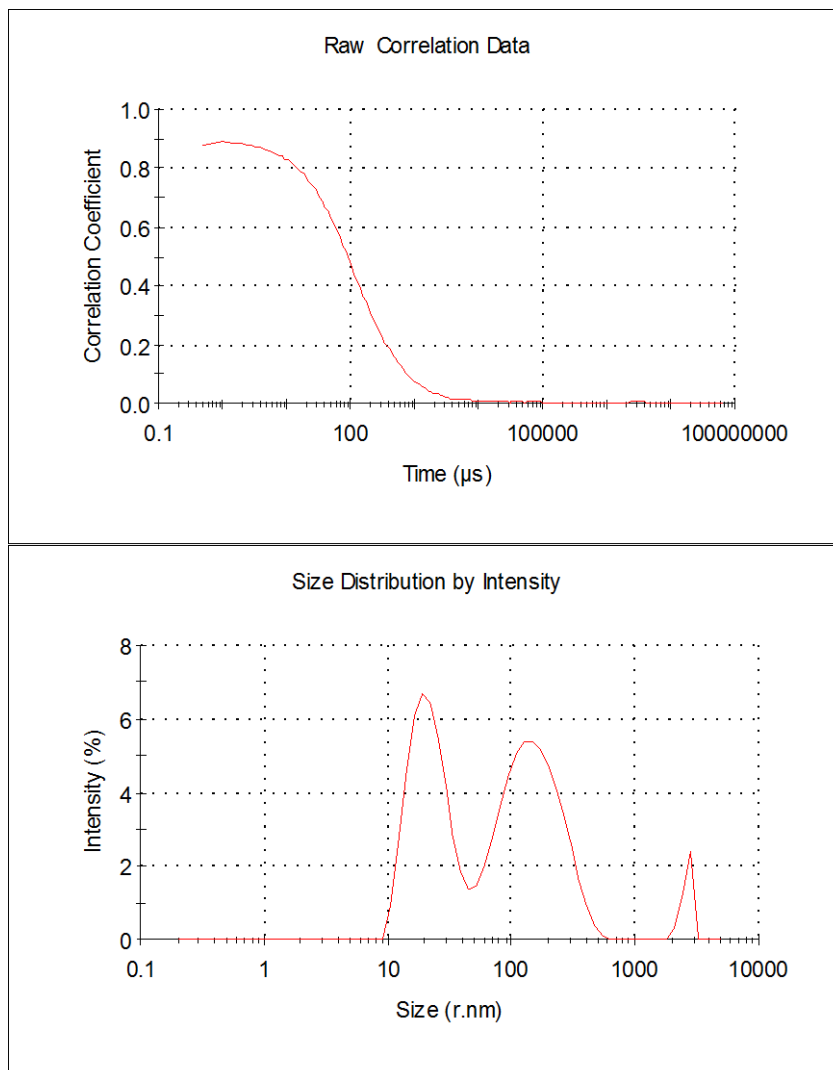
## NPs 10



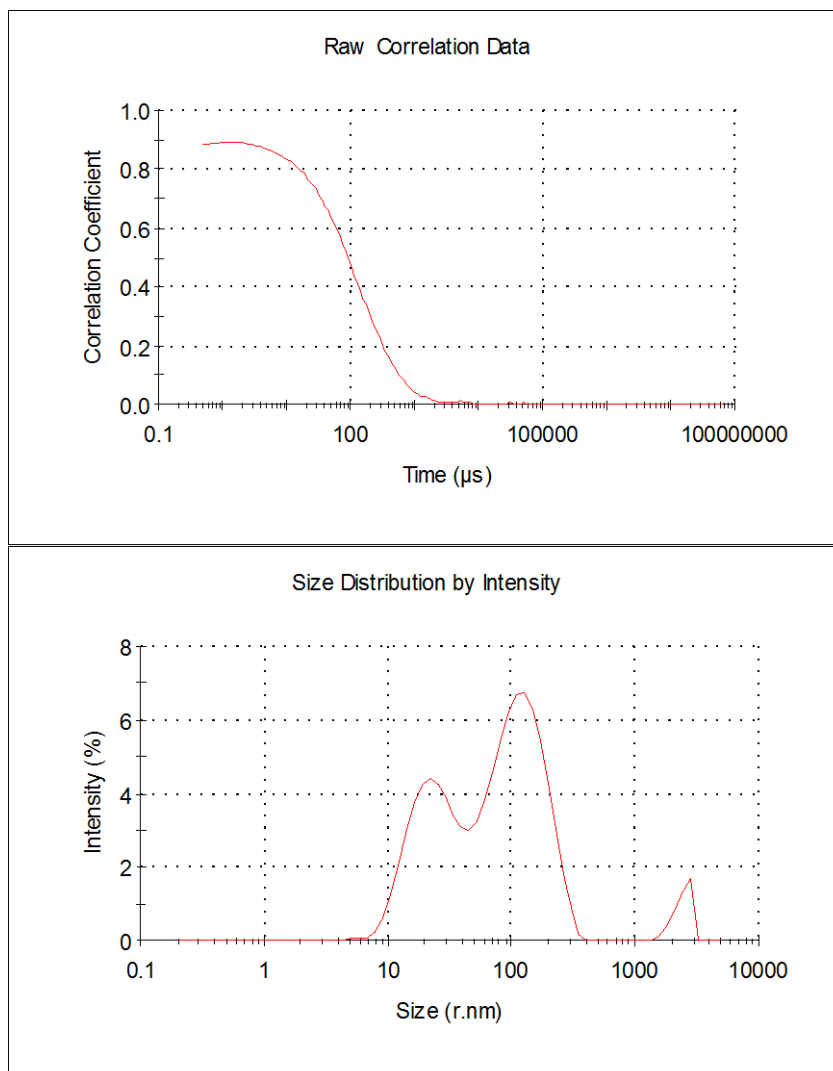
## NPs 11



## NPs 12

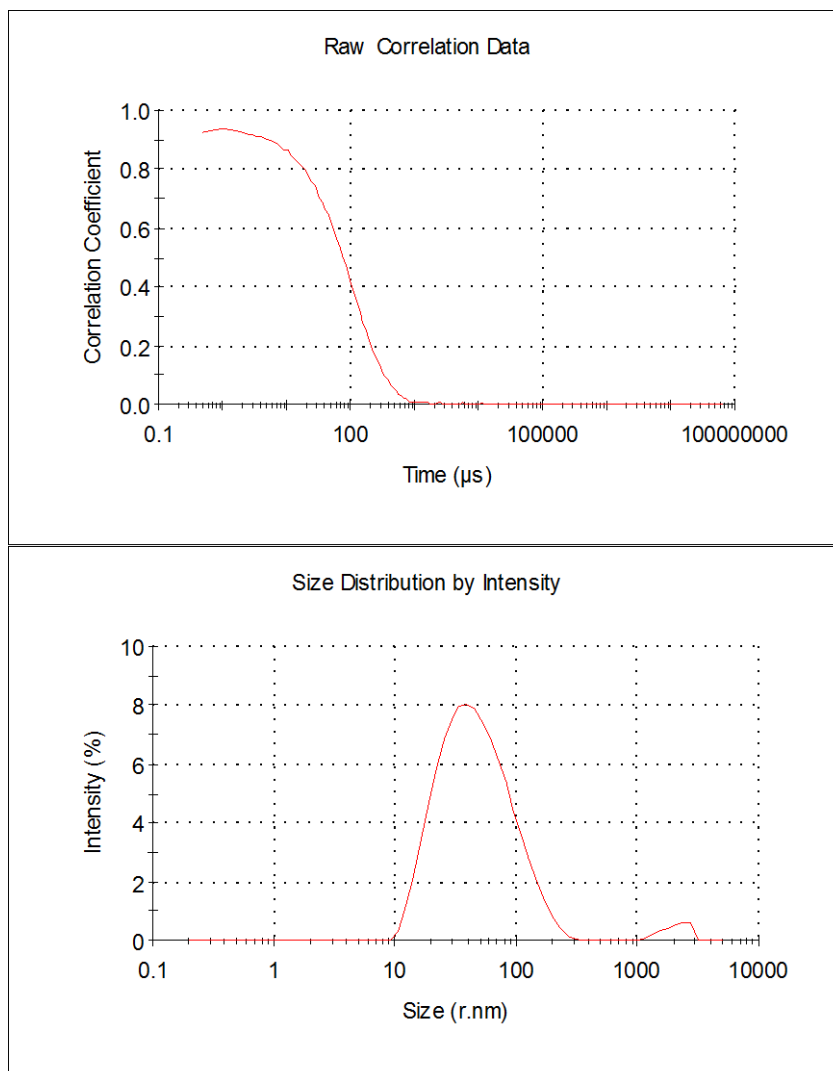


## NPs 13

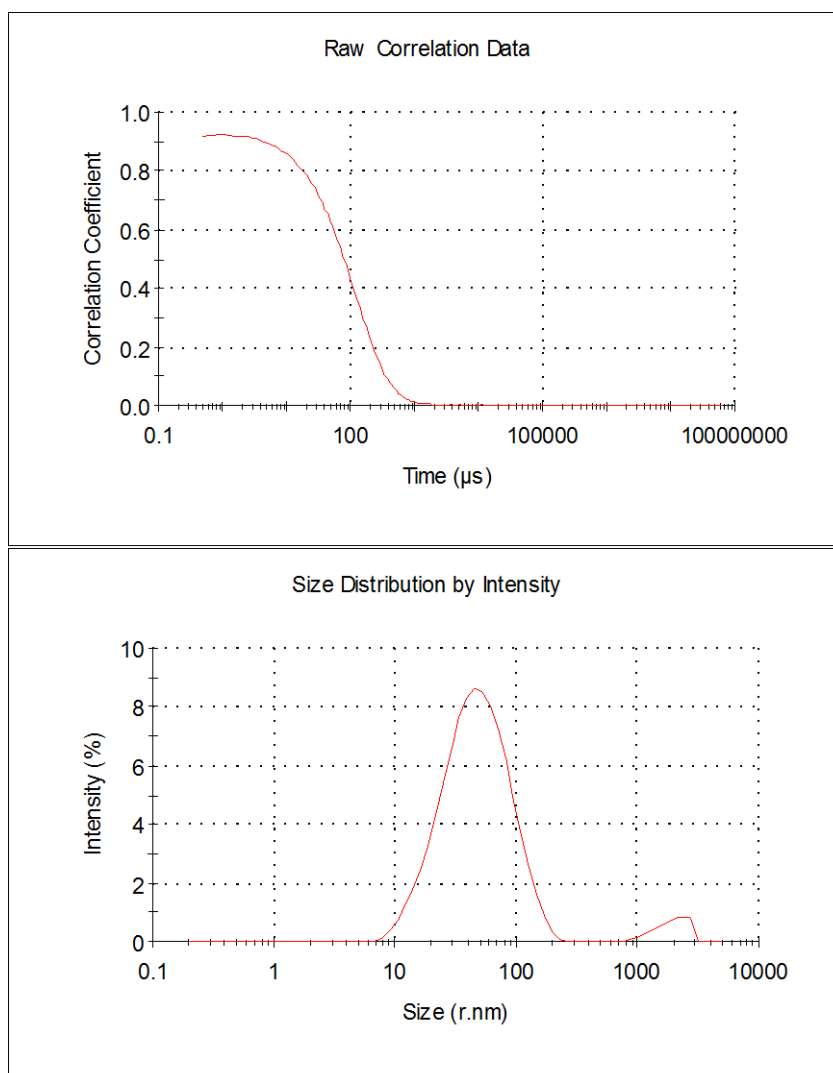




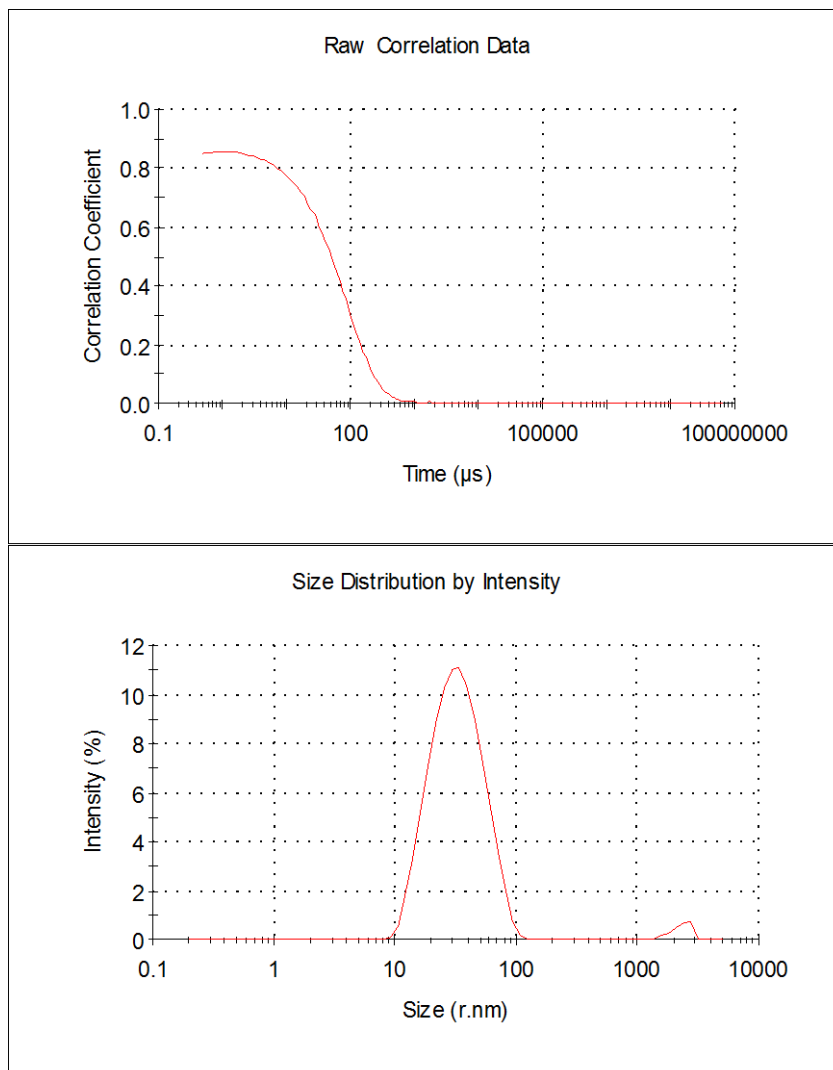
## NPs 14



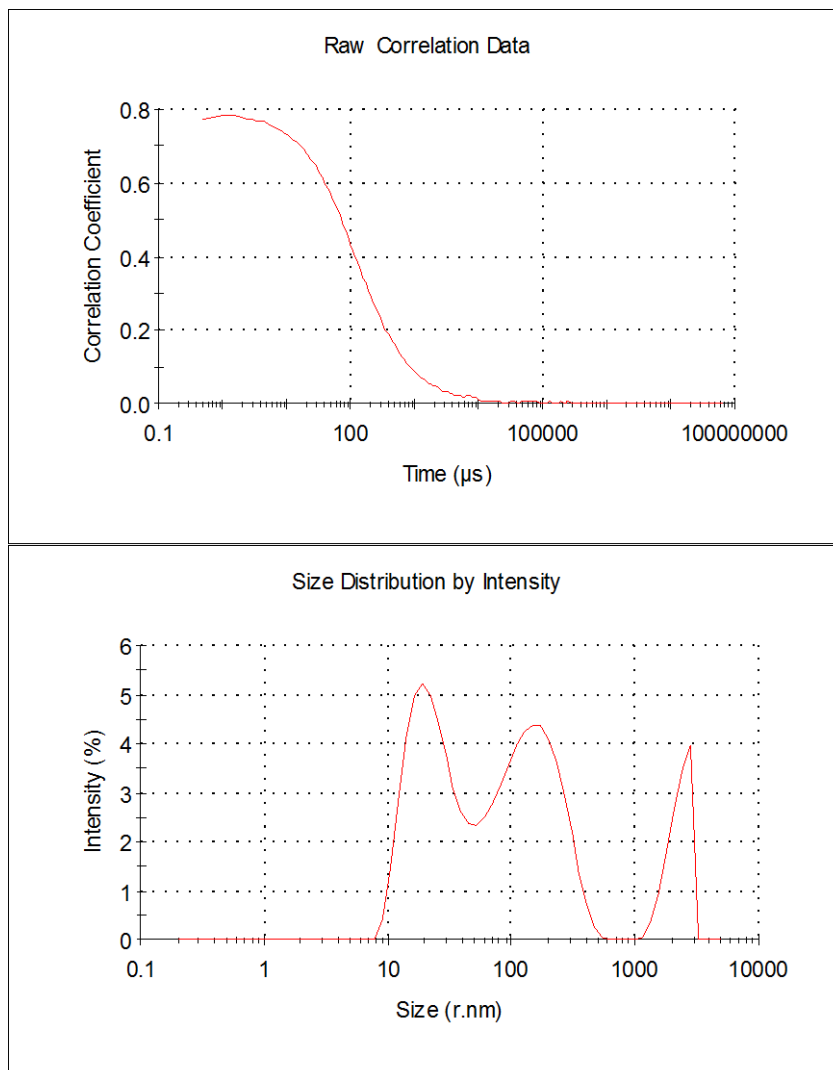
## NPs 15



## NPs 16



## NPs 17



## Anexo D

### Tabelas de parâmetros de refinamento dos compostos.

#### Observações:

\* O parâmetro de deslocamento isotrópico ( $U_{eq}$ ) corresponde a um terço do traço do tensor  $U^{ij}$  ortogonalizado.

\* O fator exponencial de deslocamento termal anisotrópico ( $U^{ij}$ ) é dado pela expressão:  $-2\pi^2[h^2(a^*)^2U^{11} + \dots + 2hk(a^*)(b^*)U^{12}]$ .

\* Os desvios padrão estão entre parênteses.

Tabela D.1. Coordenadas atômicas ( $\times 10^4$ ) e parâmetros de deslocamento termal isotrópicos equivalentes ( $\text{Å}^2 \times 10^3$ ) dos átomos não hidrogenóides do composto **1**.

	x	y	z	$U_{eq}$
O(2)	9507(2)	-1667(1)	1734(1)	60(1)
N(13)	3478(2)	2086(1)	3976(1)	48(1)
N(11)	5410(2)	1286(1)	3376(1)	50(1)
N(12)	3895(2)	1349(1)	3826(1)	46(1)
N(2)	7280(2)	-2333(1)	2497(1)	47(1)
O(1)	-3921(2)	2637(1)	6339(1)	82(1)
C(17)	8099(2)	-1677(1)	2254(1)	44(1)
C(14)	7298(2)	-929(1)	2603(1)	43(1)
C(11)	5947(2)	518(1)	3169(1)	47(1)
C(23)	-900(2)	2052(1)	5312(1)	49(1)
C(25)	97(2)	3357(1)	5096(2)	49(1)
C(16)	4953(2)	-144(1)	3350(2)	56(1)
C(24)	-1195(2)	2839(1)	5458(1)	47(1)
C(21)	1901(2)	2306(1)	4470(1)	42(1)
C(26)	1631(2)	3097(1)	4609(2)	48(1)
C(27)	-2877(2)	3101(1)	5965(2)	57(1)
C(22)	617(2)	1781(1)	4824(1)	47(1)
C(15)	5623(2)	-860(1)	3070(2)	56(1)
C(13)	8293(2)	-266(1)	2444(2)	66(1)
C(12)	7631(3)	448(1)	2720(2)	69(1)
C(28)	-3315(3)	3943(1)	6000(2)	75(1)

Tabela D.2. Parâmetros de deslocamentos termiais anisotrópicos ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) para os átomos não hidrogenóides do composto 1.

	$U^{11}$	$U^{22}$	$U^{33}$	$U^{23}$	$U^{13}$	$U^{12}$
O(2)	60(1)	34(1)	95(1)	-1(1)	43(1)	2(1)
N(13)	46(1)	30(1)	73(1)	-3(1)	26(1)	1(1)
N(11)	49(1)	31(1)	74(1)	-5(1)	25(1)	1(1)
N(12)	48(1)	31(1)	61(1)	-3(1)	17(1)	3(1)
N(2)	50(1)	29(1)	65(1)	-1(1)	24(1)	1(1)
O(1)	60(1)	88(1)	105(1)	4(1)	46(1)	-6(1)
C(17)	46(1)	31(1)	57(1)	0(1)	18(1)	4(1)
C(14)	46(1)	31(1)	55(1)	-1(1)	18(1)	2(1)
C(11)	49(1)	32(1)	62(1)	-3(1)	20(1)	3(1)
C(23)	44(1)	44(1)	63(1)	2(1)	18(1)	-7(1)
C(25)	45(1)	37(1)	68(1)	-4(1)	18(1)	2(1)
C(16)	52(1)	36(1)	86(1)	1(1)	35(1)	2(1)
C(24)	40(1)	49(1)	55(1)	-2(1)	16(1)	1(1)
C(21)	40(1)	34(1)	55(1)	-2(1)	15(1)	2(1)
C(26)	44(1)	34(1)	70(1)	-1(1)	22(1)	-2(1)
C(27)	44(1)	68(1)	61(1)	-6(1)	19(1)	1(1)
C(22)	48(1)	33(1)	64(1)	1(1)	17(1)	-2(1)
C(15)	56(1)	30(1)	86(1)	1(1)	34(1)	-2(1)
C(13)	56(1)	38(1)	111(2)	-6(1)	46(1)	-2(1)
C(12)	63(1)	32(1)	121(2)	-8(1)	50(1)	-6(1)
C(28)	61(1)	69(1)	101(2)	-15(1)	33(1)	12(1)

Tabela D.3. Comprimentos de ligação [Å] e ângulos [°] para o composto 1.

---

O(2)-C(17)	1.2418(17)
N(13)-N(12)	1.3252(17)
N(13)-C(21)	1.3873(17)
N(11)-N(12)	1.2720(16)
N(11)-C(11)	1.4125(18)
N(2)-C(17)	1.3238(19)
O(1)-C(27)	1.215(2)
C(17)-C(14)	1.4927(19)
C(14)-C(13)	1.377(2)
C(14)-C(15)	1.388(2)
C(11)-C(16)	1.381(2)
C(11)-C(12)	1.384(2)
C(23)-C(22)	1.373(2)
C(23)-C(24)	1.391(2)
C(25)-C(26)	1.377(2)
C(25)-C(24)	1.394(2)
C(16)-C(15)	1.381(2)
C(24)-C(27)	1.482(2)
C(21)-C(26)	1.394(2)
C(21)-C(22)	1.394(2)
C(27)-C(28)	1.491(3)
C(13)-C(12)	1.376(2)
N(12)-N(13)-C(21)	121.81(12)
N(12)-N(11)-C(11)	114.64(12)
N(11)-N(12)-N(13)	110.80(12)
O(2)-C(17)-N(2)	121.79(13)
O(2)-C(17)-C(14)	119.03(12)
N(2)-C(17)-C(14)	119.17(13)
C(13)-C(14)-C(15)	118.37(13)
C(13)-C(14)-C(17)	117.32(12)
C(15)-C(14)-C(17)	124.31(13)
C(16)-C(11)-C(12)	118.79(14)
C(16)-C(11)-N(11)	126.53(13)
C(12)-C(11)-N(11)	114.67(13)

C(22)-C(23)-C(24)	121.65(14)
C(26)-C(25)-C(24)	120.90(14)
C(15)-C(16)-C(11)	120.27(14)
C(23)-C(24)-C(25)	118.34(13)
C(23)-C(24)-C(27)	119.52(14)
C(25)-C(24)-C(27)	122.13(15)
N(13)-C(21)-C(26)	116.69(13)
N(13)-C(21)-C(22)	123.49(13)
C(26)-C(21)-C(22)	119.82(13)
C(25)-C(26)-C(21)	119.87(14)
O(1)-C(27)-C(24)	120.76(17)
O(1)-C(27)-C(28)	119.41(16)
C(24)-C(27)-C(28)	119.82(16)
C(23)-C(22)-C(21)	119.42(14)
C(16)-C(15)-C(14)	120.93(14)
C(12)-C(13)-C(14)	120.91(15)
C(13)-C(12)-C(11)	120.71(15)

---

Tabela D.4. Coordenadas atômicas ( $\times 10^4$ ) e parâmetros de deslocamento termais isotrópicos equivalentes ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) dos átomos não hidrogenóides do composto **2**.

	x	y	z	U(eq)
Au	9611(1)	4726(1)	7441(1)	53(1)
P	7820(2)	3946(2)	7396(2)	50(1)
N(13)	11218(5)	5306(5)	7339(4)	50(1)
O(2)	10858(5)	1420(5)	1243(4)	67(2)
C(26)	13410(7)	6400(7)	8089(6)	58(2)
C(31)	7488(8)	4869(8)	8490(7)	59(2)
N(11)	10203(6)	3943(6)	5639(5)	57(2)
C(51)	6531(7)	3635(7)	6051(7)	57(2)
C(14)	9995(6)	1933(6)	2514(5)	49(2)
N(12)	11236(5)	4760(5)	6376(4)	52(1)
O(1)	16521(6)	9301(7)	10632(6)	102(3)



C(17)	9958(7)	1199(6)	1427(5)	51(2)
N(2)	8917(6)	273(6)	661(5)	65(2)
C(25)	14463(8)	7353(7)	8943(6)	65(2)
C(21)	12297(6)	6226(6)	8169(5)	46(2)
C(41)	7703(8)	2490(7)	7461(7)	59(2)
C(12)	11113(7)	3633(7)	4311(6)	56(2)
C(11)	10201(7)	3328(6)	4597(5)	53(2)
C(22)	12286(7)	6998(7)	9137(6)	56(2)
C(23)	13345(7)	7945(7)	9977(6)	60(2)
C(13)	11022(6)	2942(6)	3288(5)	50(2)
C(15)	9056(8)	1674(8)	2777(7)	79(3)
C(46)	6627(10)	1521(8)	6777(8)	75(2)
C(24)	14430(7)	8140(7)	9893(6)	60(2)
C(32)	7907(9)	6096(8)	8881(8)	74(2)
C(45)	6646(14)	432(10)	6932(11)	98(4)
C(42)	8713(10)	2357(10)	8258(9)	87(3)
C(16)	9146(8)	2378(9)	3804(7)	80(3)
C(55)	5730(12)	2960(10)	4058(8)	91(3)
C(56)	6704(10)	3263(9)	5125(7)	77(3)
C(28)	15491(12)	10087(11)	11737(9)	114(5)
C(36)	6790(11)	4361(9)	8907(10)	84(3)
C(52)	5402(11)	3727(13)	5952(10)	107(4)
C(27)	15593(9)	9154(8)	10751(7)	75(3)
C(34)	6940(14)	6263(12)	10106(10)	102(4)
C(44)	7614(13)	357(11)	7676(11)	95(3)
C(35)	6539(14)	5043(12)	9720(11)	101(4)
C(33)	7621(12)	6804(10)	9686(10)	102(4)
C(54)	4603(13)	3052(12)	3970(10)	111(4)
C(43)	8666(13)	1302(12)	8364(12)	97(4)
C(53)	4409(13)	3394(18)	4898(12)	150(7)

---

Tabela D.5. Parâmetros de deslocamentos termiais anisotrópicos ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) para os átomos não hidrogenóides do composto **2**.

	$U^{11}$	$U^{22}$	$U^{33}$	$U^{23}$	$U^{13}$	$U^{12}$
Au	42(1)	57(1)	48(1)	13(1)	22(1)	4(1)
P	43(1)	52(1)	54(1)	21(1)	25(1)	9(1)
N(13)	42(3)	53(3)	36(2)	3(2)	18(2)	2(2)
O(2)	68(4)	59(3)	55(3)	2(2)	38(3)	-3(3)
C(26)	52(4)	57(4)	47(4)	2(3)	25(3)	6(3)
C(31)	58(5)	67(5)	62(4)	28(4)	36(4)	23(4)
N(11)	45(3)	57(3)	42(3)	-1(2)	19(2)	0(3)
C(51)	48(4)	56(4)	60(4)	26(3)	20(3)	10(3)
C(14)	44(4)	47(4)	40(3)	4(3)	21(3)	4(3)
N(12)	43(3)	54(3)	41(3)	3(2)	20(2)	3(3)
O(1)	53(4)	91(5)	92(5)	-17(4)	30(3)	-21(3)
C(17)	53(4)	46(4)	42(3)	8(3)	22(3)	9(3)
N(2)	61(4)	62(4)	43(3)	-5(3)	26(3)	2(3)
C(25)	51(4)	65(5)	56(4)	3(4)	27(3)	-1(4)
C(21)	39(3)	47(3)	37(3)	8(3)	16(3)	4(3)
C(41)	61(5)	58(4)	65(4)	29(4)	36(4)	17(4)
C(12)	43(4)	53(4)	46(3)	3(3)	17(3)	-5(3)
C(11)	45(4)	55(4)	38(3)	1(3)	19(3)	2(3)
C(22)	42(4)	63(4)	44(3)	6(3)	22(3)	1(3)
C(23)	55(4)	61(4)	40(3)	2(3)	24(3)	2(3)
C(13)	42(4)	51(4)	45(3)	9(3)	22(3)	3(3)
C(15)	58(5)	77(5)	50(4)	-18(4)	27(4)	-24(4)
C(46)	80(6)	56(5)	74(5)	22(4)	29(5)	8(4)
C(24)	51(4)	52(4)	49(4)	-1(3)	21(3)	0(3)
C(32)	78(6)	56(5)	84(6)	16(4)	49(5)	11(4)
C(45)	120(10)	64(6)	104(8)	32(6)	57(8)	13(6)
C(42)	59(6)	100(8)	94(7)	49(6)	24(5)	22(5)
C(16)	53(5)	89(6)	55(4)	-13(4)	34(4)	-14(4)
C(55)	100(8)	93(7)	60(5)	27(5)	28(5)	13(6)
C(56)	74(6)	89(6)	54(4)	24(4)	26(4)	10(5)
C(28)	91(8)	102(8)	73(6)	-24(6)	38(6)	-28(6)
C(36)	109(8)	69(6)	116(8)	49(6)	82(7)	35(6)

C(52)	69(7)	172(12)	79(6)	51(8)	32(5)	50(7)
C(27)	57(5)	66(5)	55(4)	-6(4)	18(4)	-8(4)
C(34)	130(10)	116(10)	91(7)	38(7)	77(8)	70(8)
C(44)	110(9)	83(7)	121(9)	65(7)	56(8)	49(7)
C(35)	156(12)	109(9)	116(9)	68(8)	109(9)	73(9)
C(33)	108(9)	67(6)	104(8)	6(6)	50(7)	26(6)
C(54)	93(9)	124(10)	68(6)	35(6)	1(6)	25(7)
C(43)	99(9)	95(8)	127(10)	72(8)	51(8)	50(7)
C(53)	78(8)	260(20)	96(9)	63(12)	22(7)	75(11)

---

Tabela D.6. Comprimentos de ligação [Å] e ângulos [°] para o composto 1.

---

Au-N(13)	2.062(6)
Au-P	2.2242(19)
P-C(51)	1.820(8)
P-C(31)	1.821(8)
P-C(41)	1.823(8)
N(13)-N(12)	1.320(8)
N(13)-C(21)	1.380(8)
O(2)-C(17)	1.235(9)
C(26)-C(25)	1.390(10)
C(26)-C(21)	1.395(10)
C(31)-C(32)	1.369(12)
C(31)-C(36)	1.397(12)
N(11)-N(12)	1.274(8)
N(11)-C(11)	1.421(8)
C(51)-C(56)	1.351(12)
C(51)-C(52)	1.352(14)
C(14)-C(15)	1.362(11)
C(14)-C(13)	1.385(9)
C(14)-C(17)	1.487(9)
O(1)-C(27)	1.202(11)
C(17)-N(2)	1.343(9)
C(25)-C(24)	1.396(10)
C(21)-C(22)	1.395(9)

C(41)-C(46)	1.378(12)
C(41)-C(42)	1.393(13)
C(12)-C(11)	1.368(10)
C(12)-C(13)	1.371(9)
C(11)-C(16)	1.371(10)
C(22)-C(23)	1.386(10)
C(23)-C(24)	1.366(11)
C(15)-C(16)	1.380(10)
C(46)-C(45)	1.438(15)
C(24)-C(27)	1.489(10)
C(32)-C(33)	1.386(14)
C(45)-C(44)	1.289(17)
C(42)-C(43)	1.360(15)
C(55)-C(54)	1.355(18)
C(55)-C(56)	1.403(14)
C(28)-C(27)	1.552(13)
C(36)-C(35)	1.355(14)
C(52)-C(53)	1.392(16)
C(34)-C(35)	1.361(17)
C(34)-C(33)	1.407(18)
C(44)-C(43)	1.347(18)
C(54)-C(53)	1.368(19)
N(13)-Au-P	174.48(15)
C(51)-P-C(31)	107.2(4)
C(51)-P-C(41)	105.0(4)
C(31)-P-C(41)	106.4(4)
C(51)-P-Au	109.1(3)
C(31)-P-Au	116.3(3)
C(41)-P-Au	112.2(3)
N(12)-N(13)-C(21)	115.0(6)
N(12)-N(13)-Au	117.7(4)
C(21)-N(13)-Au	127.4(4)
C(25)-C(26)-C(21)	120.0(6)
C(32)-C(31)-C(36)	119.7(8)
C(32)-C(31)-P	118.2(6)
C(36)-C(31)-P	122.0(7)

N(12)-N(11)-C(11)	113.0(6)
C(56)-C(51)-C(52)	119.6(9)
C(56)-C(51)-P	118.5(7)
C(52)-C(51)-P	121.8(7)
C(15)-C(14)-C(13)	118.3(6)
C(15)-C(14)-C(17)	123.2(6)
C(13)-C(14)-C(17)	118.6(6)
N(11)-N(12)-N(13)	111.8(6)
O(2)-C(17)-N(2)	121.2(6)
O(2)-C(17)-C(14)	121.4(6)
N(2)-C(17)-C(14)	117.5(6)
C(26)-C(25)-C(24)	120.9(7)
N(13)-C(21)-C(26)	122.5(6)
N(13)-C(21)-C(22)	118.9(6)
C(26)-C(21)-C(22)	118.5(6)
C(46)-C(41)-C(42)	118.4(9)
C(46)-C(41)-P	122.2(7)
C(42)-C(41)-P	119.3(7)
C(11)-C(12)-C(13)	120.6(6)
C(12)-C(11)-C(16)	118.5(6)
C(12)-C(11)-N(11)	126.1(6)
C(16)-C(11)-N(11)	115.3(6)
C(23)-C(22)-C(21)	120.5(7)
C(24)-C(23)-C(22)	121.3(7)
C(12)-C(13)-C(14)	120.8(6)
C(14)-C(15)-C(16)	120.7(7)
C(41)-C(46)-C(45)	116.8(10)
C(23)-C(24)-C(25)	118.7(6)
C(23)-C(24)-C(27)	124.2(7)
C(25)-C(24)-C(27)	117.1(7)
C(31)-C(32)-C(33)	118.5(10)
C(44)-C(45)-C(46)	122.1(12)
C(43)-C(42)-C(41)	121.9(11)
C(11)-C(16)-C(15)	120.8(7)
C(54)-C(55)-C(56)	118.6(11)
C(51)-C(56)-C(55)	121.2(10)
C(35)-C(36)-C(31)	122.3(10)

C(51)-C(52)-C(53)	120.3(12)
O(1)-C(27)-C(24)	121.9(7)
O(1)-C(27)-C(28)	121.8(8)
C(24)-C(27)-C(28)	116.0(8)
C(35)-C(34)-C(33)	120.8(10)
C(45)-C(44)-C(43)	121.8(11)
C(36)-C(35)-C(34)	118.3(10)
C(32)-C(33)-C(34)	120.2(10)
C(55)-C(54)-C(53)	120.6(10)
C(44)-C(43)-C(42)	119.0(11)
C(54)-C(53)-C(52)	119.6(13)

---