

Alexandre da Costa Oliveira

# CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPLEXOS DE IÕES LANTANÍDEOS CONJUGADOS COM PIB E SUA INTERAÇÃO COM AGREGADOS A $\beta$ (1-40)

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Fevereiro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Alexandre da Costa Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA  
DE COMPLEXOS DE IÕES LANTANÍDEOS  
CONJUGADOS COM PIB E SUA INTERAÇÃO COM  
AGREGADOS A $\beta$ (1-40)**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química,  
Área de especialização em Química Avançada e Industrial

Orientador: Professor Doutor Carlos F.G.C. Geraldes

Co-orientador: Professor Doutor Hugh D. Burrows

Fevereiro, 2016

Universidade de Coimbra



## **Agradecimentos**

A conclusão do Mestrado marca o final de uma etapa académica importante na minha vida e por isso não posso deixar de agradecer a algumas pessoas que me ajudaram na concretização deste projecto.

Ao Professor Doutor Carlos F.G.C. Geraldès por me proporcionar as condições necessárias à realização deste trabalho, bem como pela sua orientação e delineamento do projecto, dando um apoio crítico na realização de tarefas e discussão de resultados, e pela transmissão de conhecimento que me enriqueceu a nível pessoal, académico e científico.

Ao Professor Doutor Hugh Douglas Burrows por me ter proporcionado a oportunidade de poder ter feito o estudo fotofísico no seu grupo de investigação e por me ter ajudado na discussão de resultados e transmissão de conhecimentos.

À Doutora Telma S. M. Costa pelo seu apoio no laboratório, na realização experimental e na discussão de resultados.

À Doutora Eva Jakab Tóth por me ter recebido no grupo de investigação “Complexos metálicos e IRM para aplicação biomédica” no Centro de Biofísica Molecular do CNRS em Orleães (França) e ao Doutor Jean-François Morfin pelo seu supervisionamento.

Ao Doutor Emeric Wasielewski pela sua disponibilidade e formação que me deu no laboratório de RMN do Centro de Química de Coimbra.

À Doutora Licínia L. G. J. Simões pela disponibilidade para realizar o cálculo computacional.

À Professora Doutora Maria João Moreno por me ter recebido no seu grupo de investigação “Química Biológica” do Centro de Química de Coimbra para poder desenvolver o projecto de Mestrado e pela sua disponibilidade na ajuda de problemas com que me fui deparando.

Ao Doutor André F. Martins pela sua disponibilidade em ajudar-me no projecto mesmo encontrando-se fora do país.

Por fim, tenho agradecer a todos os meus amigos e familiares que sempre me apoiaram nas várias etapas da minha vida, pois sem eles seria impossível de realizar este projecto.



# Índice

Abreviaturas .....	v
Resumo.....	vii
Abstract .....	ix
CAPÍTULO 1 – Introdução “Imagiologia Médica e diagnóstico da doença de Alzheimer” .....	1
1.1    Introdução à Imagiologia Molecular Médica .....	3
1.1.1    A Radiografia .....	6
1.1.2    Tomografia Computadorizada.....	6
1.1.3    Medicina Nuclear: PET e SPECT .....	8
1.1.4    Imagiologia de Ressonância Magnética.....	12
1.2    Agentes de contraste em IRM .....	16
1.2.1    Agentes de contraste negativos .....	17
1.2.2    Agentes de contraste positivo.....	20
1.3    Imagiologia Óptica .....	25
1.3.1    Princípios de Fotofísica e Luminescência.....	25
1.3.2    Sondas para Imagiologia Óptica.....	29
1.4    Imagiologia na doença de Alzheimer .....	30
1.4.1    Doença de Alzheimer de um ponto vista bioquímico.....	30
1.4.2    Métodos de diagnóstico na doença de Alzheimer .....	34
1.5    Objectivos da Tese.....	38
CAPÍTULO 2 - Síntese dos complexos, caracterização dos ligandos e quantificação dos complexos de lantanídeos.....	43
2.1    Síntese dos complexos .....	45
2.2    Teste do alaranjado de xilenol e quantificação de íão livre .....	48
2.3    Método de Evans .....	49
2.4    Caracterização dos ligandos L4 e L5.....	51
2.4.1    Métodos .....	53

2.4.2 Caracterização do ligando L4.....	54
2.4.3 Caracterização do ligando L5.....	54
CAPÍTULO 3 - Caracterização físico-química dos complexos derivados de PiB.....	55
3.1 Introdução.....	57
3.2 Procedimento experimental.....	58
3.2.1 Material e preparação das amostras.....	58
3.2.2 Estudo por espectrofotometria de UV/Vis.....	58
3.2.3 Estudo da fluorescência.....	59
3.2.4 Estudo da fotodegradação.....	60
3.2.5 Tempos de vida de fluorescência.....	60
3.2.6 Estudo da absorção transiente.....	61
3.2.7 Aquisição dos espectros de luminescência e respectivos tempos de vida dos complexos com Eu <sup>3+</sup> e Tb <sup>3+</sup> .....	61
3.2.8 Estudo computacional.....	63
3.2.9 Determinação do coeficiente de partição octanol-água.....	63
3.2.10 Medidas de <sup>1</sup> H NMRD.....	64
3.2.11 Medidas de relaxometria.....	64
3.2.12 Dispersão dinâmica da luz (DLS).....	64
3.3 Resultados e discussão.....	65
3.3.1 Estudo fotofísico do fenil-benzotiazol (PiB) conjugado nos compostos.....	65
3.3.2 Estudo da fotoestabilidade dos ligandos.....	74
3.3.3 Determinação de rendimentos quânticos e tempos de vida de fluorescência.....	75
3.3.4 Estudo do estado tripleto.....	78
3.3.5 Estudo da luminescência dos complexos.....	82
3.3.6 Estudo computacional da geometria conformacional do complexo EuL4.....	94
3.3.7 Determinação da lipofilicidade do complexo GdL5 através do log P.....	97
3.3.8 Medidas relaxométricas, determinação da concentração micelar crítica (CMC) e do tamanho micelar.....	98

3.4 Conclusão.....	104
CAPÍTULO 4 - Estudo <i>in vitro</i> da interacção dos complexos derivados de PiB com a HSA e com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> , e sua influência na agregação do péptido amilóide.....	105
4.1 Introdução .....	107
4.2 Procedimento experimental.....	107
4.2.1 Material e preparação das amostras .....	107
4.2.2 Interacção com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> usando <sup>1</sup> H NMRD.....	107
4.2.3 Determinação da constante de afinidade com a albumina de soro humano .....	108
4.2.4 Medidas de ressonância de plasmão de superfície (SPR) .....	109
4.2.5 Estudo da interacção péptido-ligando por RMN .....	110
4.2.6 Estudo da agregação do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> por fluorescência da Tioflavina T.....	111
4.2.7 Estudo da agregação do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) no UV longínquo .....	111
4.2.8 Estudo da agregação do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> por microscopia de transmissão electrónica (TEM) .....	112
4.3 Resultados e Discussão .....	113
4.3.1 Medidas relaxométricas na determinação da interacção do complexo GdL5 com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> e com a albumina de soro humana .....	113
4.3.2 Estudo de interacção do complexo GdL5 com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> por SPR.....	116
4.3.3 Estudo da interacção dos complexos com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> por espectroscopia de RMN (STD e HSQC) .....	117
4.3.4 Efeito do complexo GdL5 na agregação e estrutura secundária do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> ....	123
4.4 Conclusão.....	127
CAPÍTULO 5 - Conclusões gerais e perspectivas futura .....	129
Referências Bibliográficas .....	135



## Abreviaturas

- AAZTA- Ácido 6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepinetetraacetico
- APP – Amyloid Precursor Protein
- A $\beta$  – Beta Amilóide
- BMS – Bulk Magnetic Susceptibility shift
- BOPTA – Ácido 2,5,8-tris(carboxi-etil)-12-fenil-11-oxa-2,5,8-triazadodecane-1,9-dicarboxílico
- CAI – Coeficiente de Absortividade molar Integrada
- CD – Circular Dichroism
- CR – Congo Red
- DE – Dipolo Eléctrico
- DFT – Density Functional Theory
- DLS – Dynamic Light Scattering
- DM – Dipolo Magnético
- DO – Densidade Óptica
- DO3A – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacetato
- DOTA – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
- DPDP – N,N'-dipiridoxiletilediamine-N,N'-diacetate 5,5'-bis(fosfato)
- DPPFGSE – Double Pulse Field Gradient Spin Echo
- DTPA- Ácido dietilenetriaminepentaacético
- EDC – N-etil-N'-[(dimetilamino) propil]-carbodiimida
- EDTA – Ácido etilendiaminatetraacético
- FDA – Food and Drugs Administration
- FDG – Fluordesoxiglicose
- FRET – Förster Resonance Energy Transfer
- H<sub>5</sub>DOTAGA – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-glutarico-1,4,7-triacético
- HEPES – Ácido 4-(2-hidroxi-etil) piperazina-1-etanesulfónico
- HOMO – Highest Occupied Molecular Orbital
- HOPO – Hidroxipiridinonato
- HSA – Human Serum Albumin
- HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence
- IRM – Imagiologia de Ressonância Magnética
- IS – Inner-Sphere

LUMO – Lowest Unoccupied Molecular Orbital  
NFT – Neurofibril Tangles  
NHS – N-hidroxisuccinimida  
NMRD – Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion  
OS – Outer-Sphere  
PET – Positron Emission Tomography  
PRE – Proton Relaxation Enhancement  
Reagente PiB – Reagente B de Pittsburgh  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
SAP – Square AntiPrismatic  
SDS – Sodium Dodecyl Sulfate  
SPECT – Single-Photon Emission Computed Tomography  
SPIO – Small Particle of Iron Oxide ou Superparamagnetic Particle of Iron Oxide  
SPR – Surface Plasmon Resonance  
STD – Saturation Transfer Difference  
TC – Tomografia Computadorizada  
TCLM – Transferência de Carga do Ligando para o Metal  
TCML – Transferência de Carga do Metal para o Ligando  
TCSPC – Time Correlated Single Photon Counting  
TE – Tempos de Eco  
TEM – Transmission Electronic Microscopy  
ThT – Tioflavina T  
TR – Tempos de Repetição  
TSAP – Twisted Square Antiprismatic  
US – Ultra-sonografia  
USPIO – Ultrasmall Articles of Iron Oxide  
UV – Ultra Violeta  
 $\Delta$ .O. – Variação de Densidade Óptica

## Resumo

A doença de Alzheimer é uma das patologias mais recorrentes no idoso, caracterizada por neuro-degeneração progressiva, provocando perturbações cognitivas devastadoras. O diagnóstico só é possível num estado avançado da doença através da apresentação de um quadro sintomatológico característico da patologia, exceptuando a sua forma familiar, associada a mutações já identificadas e caracterizadas. O diagnóstico definitivo da doença de Alzheimer esporádica é apenas obtido *post mortem*, devido à necessidade de um corte histológico do cérebro para avaliar a presença de placas amilóides, e é daqui que nasce a necessidade de identificar estas placas amilóides durante a vida do doente. Assim, foi desenvolvida uma sonda que contém duas partes: 1) o reagente de Pittsburg B (PiB), que é um fenil-benzotiazol, com comprovada afinidade pelos agregados amilóides, e 2) um derivado de DOTA ou DO3A, para o ligando L4 e L5, respectivamente, que oferece estabilidade termodinâmica e é cineticamente inerte, para a coordenação de um metal específico consoante a modalidade imagiológica a que se destina.

No presente trabalho, estudou-se a possibilidade dos ligandos L4 e L5, com a coordenação do  $\text{Eu}^{3+}$  e do  $\text{Tb}^{3+}$ , poderem ser usados em Imagiologia Óptica e a coordenação do  $\text{Gd}^{3+}$  com o ligando L5 foi investigado para sua utilização como agente de contraste em Imagiologia de Ressonância Magnética (IRM).

Os ligandos possuem na sua constituição um fenil-benzotiazol (PiB), um sistema  $\pi$  conjugado que absorve na zona UV/Vis. Foi realizada uma caracterização fotofísica e estudada a eficiência da transferência de energia nos complexos formados pelos ligandos L4 e L5, pelo chamado efeito antena, para povoar o estado excitado dos iões emissores  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ , uma vez que a sua excitação directa é proibida por simetria (regra de Laporte). Verificou-se que a presença de um ião metálico emissor provoca supressão do estado excitado  $S_1$  e  $T_1$  do cromóforo fenil-benzotiazol, através da redução do rendimento quântico e tempo de vida de fluorescência, bem como a redução do tempo de vida do estado tripleto ( $T_1$ ). Foi realizado o estudo da fotoestabilidade dos ligandos, que é uma das características fundamentais para estas sondas serem usadas em Imagiologia Óptica, e mostrou-se que o ligando L4 é estável, porém o ligando L5 é fotodegradável. A determinação do rendimento quântico de luminescência fornece um dado directo da potencialidade destas sondas funcionarem em Imagiologia Óptica, tendo este estudo sido acompanhado pela determinação do número de hidratação dos complexos, que é uma fonte importante de desactivação do estado excitado do metal. Os valores obtidos do rendimento

quântico de luminescência são relativamente baixos, mostrando que a distância entre o cromóforo e o centro metálico influencia a eficiência de transferência de energia, sendo importante reduzir ao máximo esta distância.

O complexo GdL5 mostrou propriedades físico-químicas promissoras para o seu uso em IRM, tais como ter uma relaxividade elevada. Uma vez que o complexo tem carácter anfífilo, juntamente com a sua hidrofobicidade, visto pelo seu valor de  $\log P$  de  $0.65 \pm 0.028$ , estas propriedades levam-no a formar micelas a baixas concentrações ( $20 \pm 5 \mu\text{M}$ ), que provoca o aumento do seu tempo de correlação rotacional ( $\tau_r$ ) e consequentemente aumento da relaxividade. A interacção do complexo GdL5 com agregados do péptido  $A\beta_{1-40}$  provoca um aumento da relaxividade a campo magnético intermédio, sendo útil em IRM, aumentando o contraste da imagem. A capacidade do complexo GdL5 interagir com a albumina de soro humano permite-lhe ter um maior tempo de vida no plasma sanguíneo, evitando a sua rápida excreção.

O estudo *in vitro* da interacção do complexo GdL5 com o péptido  $A\beta_{1-40}$  demonstrou que o complexo tem uma afinidade moderada pelos agregados  $A\beta$  amilóides ( $K_D = 19.5 \pm 3.0 \mu\text{M}$ ) e que interage com a forma monomérica do péptido, nomeadamente da zona hidrofílica com grande densidade de carga, entre os resíduos F4 e F20. No entanto, a afinidade do complexo GdL5 é maior para os agregados amilóides, sendo uma característica importante uma vez que se pretende usar o complexo para detectar os agregados do péptido e não a sua forma monomérica.

A investigação do efeito do complexo GdL5 na agregação e na estrutura secundária do péptido  $A\beta_{1-40}$  por dicroísmo circular e microscopia de transmissão electrónica mostrou que o complexo tem um efeito promotor da formação de fibrilas com estrutura em folha  $\beta$ , indicando que o complexo GdL5 poderá ter um efeito tóxico *in vivo*, apesar destes estudos terem sido realizados a concentrações de péptido muito superiores ao que se verifica *in vivo*.

Em suma, o estudo dos complexos formados pelos ligandos L4 e L5 dão boas indicações para serem usados em Imagiologia, apesar de algumas propriedades físico-químicas não serem as mais adequadas para esta finalidade, sobretudo *in vivo*, uma vez que se tem verificado dificuldade destes complexos atravessarem a barreira hemato-encefálica. Desta forma, este estudo contribui para um melhor entendimento do *design* racional deste tipo de complexos para detecção precoce da doença de Alzheimer, de modo a permitir no futuro a melhoria das suas propriedades físico-químicas.

## Abstract

Alzheimer's disease is one of the most frequent disorders in elderly individuals, characterized by progressive neural degeneration, causing devastating cognitive disorders. The diagnosis is only possible at an advanced stage of the disease when symptoms characteristic of the disease are observed, except in its familiar form, when mutations have already been identified and characterized. The definitive diagnosis of sporadic Alzheimer's disease is only obtained post-mortem, because of the need for a histological section from the brain to assess the presence of amyloid plaques, and it is here that the need arises to identify these amyloid plaques during the life of the patient. We have developed a probe consisting of two parts 1) the Pittsburgh compound B (PiB), which is a phenyl-benzothiazole, (with proven affinity to the amyloid aggregates), and 2) a derivative of DOTA or DO3A, for ligand L4 and L5, respectively, offering thermodynamic stability and kinetical inertness, for the coordination of a specific metal depending on the imaging modality.

In this work, we studied the possibility of using complexes L4 and L5 ligands with  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Tb}^{3+}$  for Optical Imaging, as well as the  $\text{Gd}^{3+}$  complex with the L5 ligand for use as contrast agent in Magnetic Resonance Imaging (MRI).

The ligands possess in their constitution a phenyl-benzotriazole (PiB) moiety, which is a  $\pi$  conjugated system absorbing in the UV/Vis region. We carried out a photophysical characterization, by investigating the energy transfer efficiency of complexes formed by L4 and L5 ligands, involving then antenna effect, for populating the emitting excited state of ions  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Tb}^{3+}$ , as their direct excitation is prohibited by symmetry (Laporte rule). It has been found that the presence of a metal ion emitter causes quenching of the  $S_1$  and  $T_1$  excited states of the phenyl-benzothiazole chromophore, by reducing its quantum yield and fluorescence lifetime and reducing the lifetime of the triplet state ( $T_1$ ). We conducted a study of the photo-stability of the ligands, which is a fundamental feature for the use of these probes in optical imaging, and show that the L4 ligand is stable, but the L5 ligand is photodegradable. The determination of the luminescence quantum yield provides direct data of the potential of these probes for optical imaging. This study has been accompanied by the determination of the hydration number of the complex, which is an important pathway for deactivating the excited state of the metal complex. The values of the luminescence quantum yield are relatively low, showing that the distance between the chromophore and the metal center affects the energy transfer efficiency, and that it is important to reduce this distance.

The GdL5 complex shows promising physical-chemical properties for use in MRI, because it has a high relaxivity. The complex has amphiphilic behavior, and its hydrophobicity is shown by the log P value of  $0.65 \pm 0.028$ . These properties make it form micelles at low concentrations ( $20 \pm 5 \mu\text{M}$ ), which cause an increase in the rotational correlation time ( $\tau_r$ ) causing an increase in the relaxivity. The interaction of GdL5 with  $\text{A}\beta_{1-40}$  peptide causes an increase in relaxivity at intermediate magnetic field, which is useful in MRI, increasing the image contrast. The GdL5 complex interacts with human serum albumin allowing the complex to have a longer lifetime in blood plasma, preventing its rapid excretion.

The *in vitro* study of the interaction of the complex GdL5 with  $\text{A}\beta_{1-40}$  peptide aggregates showed that the complex has a moderate affinity towards the  $\text{A}\beta$  amyloid aggregates ( $K_D = 19.5 \pm 3.0 \mu\text{M}$ ) and that the complex also interacts with the monomeric form of the peptide, especially in the hydrophilic area with high charge density, between residues F4 and F20 of the peptide. However, the complex GdL5 still binds tighter to the aggregated form of  $\text{A}\beta_{1-40}$ , which is an important property since it is intended to be used to detect the aggregated form of the peptide and not its monomeric form.

The investigation by circular dichroism and transmission electron microscopy of the effect of the GdL5 complex on the aggregation and the secondary structure of the  $\text{A}\beta_{1-40}$  peptide, shows that the complex has a promoting effect in fibril formation in  $\beta$  sheet structures, indicating that the GdL5 complex may be toxic *in vivo*, although these studies have been conducted using peptide concentrations much higher than what is found *in vivo*.

In summary, the study of complexes formed by ligands L4 and L5 gives a good indication of their viability in imaging. However, some physical-chemical properties are not the most suitable for this purpose, especially *in vivo*, since investigations with this kind of complexes revealed their difficulty towards crossing the blood-brain barrier. This study contributes to a better understanding of the rational design of this kind of complexes for early detection of Alzheimer's disease, and will allow improvements in the physical-chemical properties of these complexes.

# CAPÍTULO 1

## **Introdução**

*Imagiologia Médica e  
diagnóstico da Doença  
de Alzheimer*



## 1.1 Introdução à Imagiologia Molecular Médica

O termo Imagiologia Médica pode ser definido como caracterização e medição *in vivo* dos processos biológicos a nível celular ou molecular do corpo humano através de técnicas de imagem não invasivas, tanto em situações normais como patológicas. Esta área de investigação tem sido muito importante no diagnóstico de doenças através da detecção de alterações anatómicas, ou em casos específico, das mudanças fisiológicas que são uma manifestação das alterações moleculares que estão subjacentes à patologia, sendo a ambição futura a detecção e caracterização precoce de patologias, acessibilidade directa e precoce dos efeitos do tratamento e uma melhor compreensão dos processos fisiológicos da patologia. Com os avanços tecnológicos recentes passou a ser possível transitar a realização da Imagiologia Médica do nível dos tecidos para o nível molecular dando origem a um novo campo de investigação, a Imagiologia Molecular<sup>1</sup>.

A Radiografia foi a primeira tecnologia de imagem médica a ser desenvolvida e que surgiu com a descoberta dos raios-X por Roentgen em 1895, o que lhe valeu o prémio Nobel da Física em 1901, sendo o primeiro a receber esta distinção. Roentgen apelidou a descoberta como sendo um novo tipo de raios (do alemão “*Ueber eine neue Art von Strahlen*”) e realizou a primeira Radiografia da sua própria mão (Figura 1.1)<sup>2</sup>. Dos estudos posteriores ficou claro que



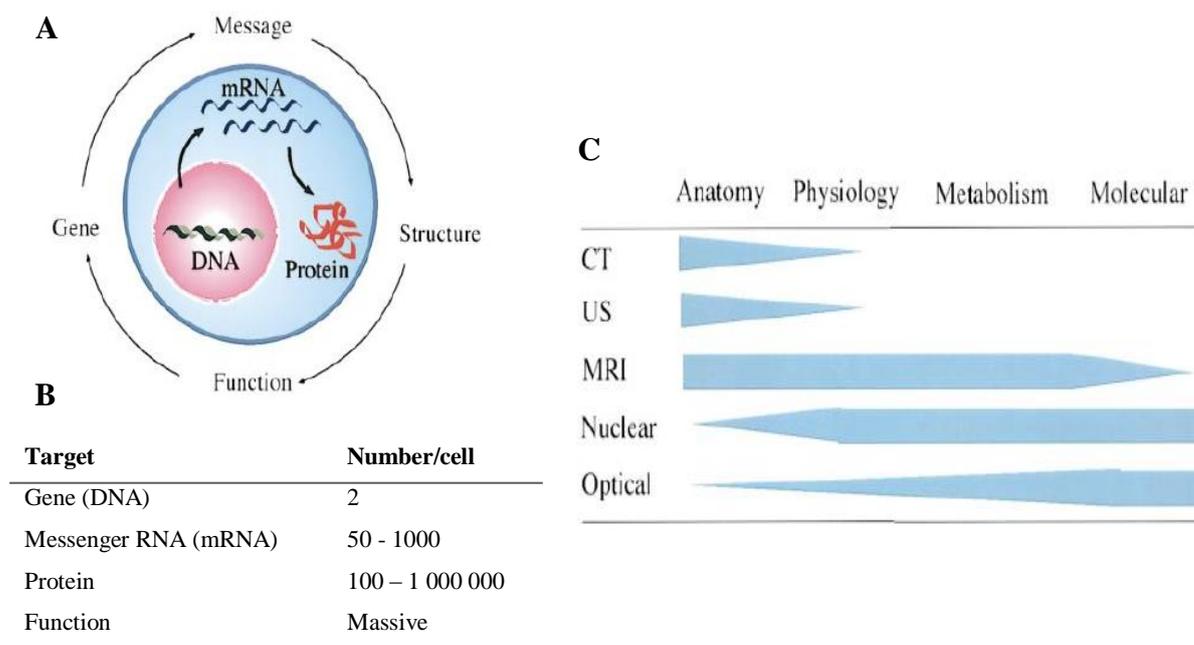
**Figura 1.1** - Primeira Radiografia da anatomia do corpo humano realizado por Roentgen evidenciando a mão do próprio autor mostrando dois anéis (retirado da referência 2).

na realização de Imagiologia Médica do corpo humano é necessário a utilização de radiação com uma energia que seja capaz de penetrar nos tecidos. Assim, a luz visível tem uma capacidade limitada de penetrar nos tecidos, sendo principalmente usada fora dos departamentos de Radiologia, como por exemplo em Dermatologia (fotografia da pele), Gastroenterologia, Obstetrícia (endoscopia) e Patologia (microscopia óptica). Em diagnóstico radiológico é usada uma fonte de raios-X na Mamografia e Tomografia Computadorizada (TC), as radiofrequências na Imagem de Ressonância Magnética (IRM), raios gama em Medicina Nuclear, como na Tomografia Computadorizada de Emissão de Fóton Único (do inglês *Single-Photon Emission Computed Tomography* – SPECT) e na Tomografia por Emissão de Positrões (do inglês *Positron Emission Tomography* – PET), e propriedades acústicas sob forma de ondas de som de alta frequência usada em Ultra-Sonografia (US). Em Medicina Nuclear, ao contrário das outras técnicas, em que a energia usada para penetrar os tecidos humanos tem de sofrer algum tipo de interação com os tecidos (absorção, dispersão), para que quando a energia seja detectada contenha informação da anatomia interna que permita produzir a imagem médica, são injectadas ou ingeridas substâncias radioactivas e é a interacção fisiológica do agente que dá acesso à imagem médica<sup>3</sup>.

Cada uma destas modalidades imagiológicas utiliza tecnologias diferentes, com vantagens e desvantagens, resolução, sensibilidade e aplicações diferentes (Tabela 1.1). Da Tabela 1.1 e da Figura 1.2C podemos verificar que a TC tem uma boa resolução espacial na ordem do milímetro, com resolução temporal na ordem dos 1 ou 2 segundos, no entanto tem baixa sensibilidade, sendo principalmente usada em imagem anatómica. Na IRM temos resolução espacial, temporal, e sensibilidade semelhante à TC, sendo a aplicação da IRM mais ampla que a TC, podendo ser usada tanto em imagem anatómica, como para obtenção de informação fisiológica e metabólica. A US tem boa resolução espacial e temporal, na ordem dos micrómetros e dos milissegundos respectivamente, no entanto com baixa sensibilidade, sendo

**Tabela 1.1-** Modalidades imagiológicas com as respectivas resoluções relativas espaciais, temporais e de sensibilidade (retirado da referência 4).

Modality	Spatial resolution	Time resolution	Sensitivity
Magnetic resonance			
MR imaging	Sub-mm	1–2 s	mM Gd; nM Fe (~10 cells/voxel)
<sup>1</sup> H spectroscopy	>mm	>5 min	>10 μM
Nuclear medicine			
PET	mm	s-min	pM tracer
SPECT	Sub-mm	min	Sub-nM tracer
Optical			
Bioluminescence	mm	min	~100 cells/voxel
Fluorescence	μm	ms	pM
X-ray computed tomography			
Contrast-enhanced	Sub-mm	1–2 s	mM I
Ultrasound			
Micro bubbles	μm	ms	1 bubble



**Figura 1.2-** Esquema demonstrando os alvos moleculares usados nas modalidades imagiológicas e suas aplicações. Diferentes alvos intracelulares e suas funções **A**). Número de alvos moleculares por célula **B**). Aplicações das diferentes modalidades imagiológicas **C**). (adaptado da referência 1)

sobretudo utilizada em imagem anatómica. A Imagiologia Óptica tem boa resolução espacial e temporal, com uma grande sensibilidade. No entanto, devido ao baixo poder de penetração da radiação usada nesta Imagiologia, esta não permite obter imagens anatómicas, sendo a aplicação principal a nível molecular mas limitada ao nível superficial. Por fim, a Medicina Nuclear tem baixa resolução espacial e temporal, mas é a técnica com maior sensibilidade, permitindo estudar processos a nível fisiológico, metabólico e molecular<sup>1,4</sup>.

Com o avanço da Imagiologia Molecular, têm sido desenvolvidos e testadas sondas imagiológicas capazes de detectar *in vivo* processos biológicos específicos a nível molecular, que sejam marcadores de uma determinada patologia, permitindo a detecção precoce de uma doença. Um dos maiores desafios na Imagiologia Molecular é o desenvolvimento das estratégias de amplificação. Como se pode ver na Figura 1.2A e 1.2B, o desenvolvimento de sondas para genes e mRNA, devido à sua limitada quantidade por célula, necessita duma grande amplificação do sinal para poder ser visualizado, sendo a detecção de proteínas mais praticável por estar presente em maiores quantidades<sup>1</sup>.

O desenvolvimento de uma sonda imagiológica específica requer que alguns critérios tenham de ser alcançados: 1) sondas com grande afinidade para com o alvo, 2) que tenham boas propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), especialmente a capacidade destas sondas atravessarem barreiras biológicas (barreira hemato-encefálica, membrana celular, entre outros) e atingirem o alvo com concentração suficiente para permitir

uma amplificação adequada do sinal e durante um tempo suficiente para a sua detecção, 3) e que estas sondas não sejam tóxicas *in vivo*<sup>1</sup>.

Actualmente o interesse tem recaído no desenvolvimento de sondas imagiológicas multi-modais, com capacidade para serem usadas em diferentes modalidades imagiológicas, usando a mesma sonda. No capítulo introdutório serão apresentadas noções teóricas das modalidades imagiológicas usadas em Radiografia, Medicina Nuclear e IRM. Será feita uma abordagem bioquímica da doença de Alzheimer, bem como uma visão geral da investigação que é realizada no sentido de se obter um diagnóstico precoce não invasivo desta patologia.

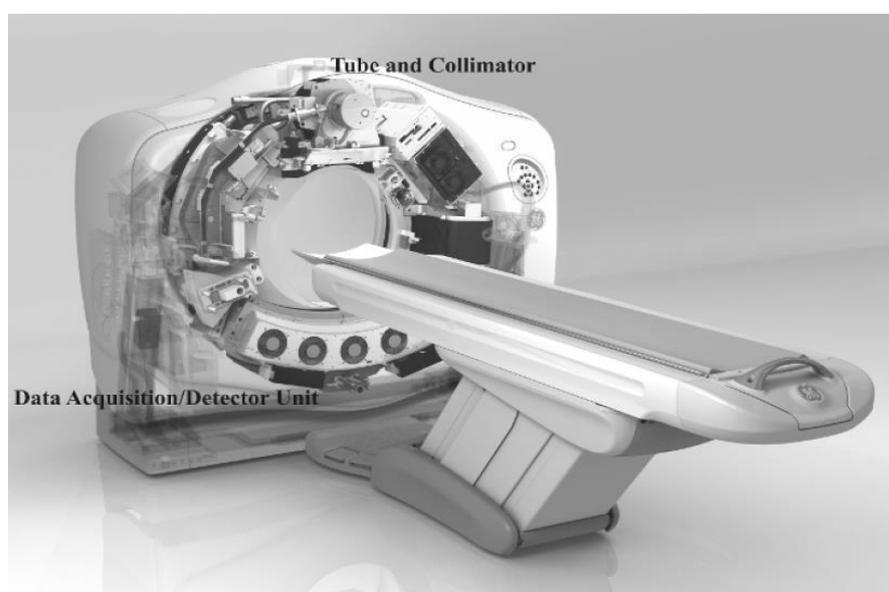
### **1.1.1 A Radiografia**

A Radiografia, como referido, foi a primeira tecnologia de Imagiologia Médica a ser desenvolvida. Esta modalidade imagiológica é realizada com o recurso a uma fonte de raios-X de um lado do paciente e tipicamente um detector plano de raios-X do outro lado. Um curto pulso de raios-X de cerca de meio-segundo é emitido por um tubo de raios-X, tendo em conta que a distribuição dos raios-X que entra no paciente é homogénea, mas após passar pelo paciente o feixe de raios-X que emerge e que é detectado é heterogéneo, permitindo a obtenção da imagem anatómica interna do paciente. Este fenómeno resulta do facto do feixe de raios-X ao atravessar o paciente, encontra tecidos com diferentes propriedades de atenuação, com por exemplo o tecido ósseo, que é o maior atenuador dos raios-X comparativamente aos tecidos moles como a pele. O detector de raios-X pode ser um filme fotográfico ou um sistema de detectores electrónicos. Este tipo de modalidade imagiológica em que a fonte está de um lado e o detector do outro lado do paciente é chamado de Imagiologia de Transmissão<sup>3</sup>. As aplicações remetem para o diagnóstico de ossos partidos, doenças pulmonares, problemas cardiovasculares, entre outros.

### **1.1.2 Tomografia Computadorizada**

A Tomografia Computadorizada (TC) ou Tomografia Axial Computadorizada está disponível desde os anos 70 do século passado e foi a primeira modalidade imagiológica que utilizou o computador para processamento das imagens. A TC é baseada na obtenção de imagens a diferentes ângulos do corpo humano a partir de medidas de atenuação de raios-X. A

instrumentação básica da TC compreende um tubo de uma fonte única de raios-X com um colimador para direccionamento estreito e eficaz da radiação e no lado oposto, contem um arranjo de detectores de raios-X que recolhe os dados da projecção transmitida (Figura 1.3). Numa TC, o paciente é mantido estacionário mas o tubo de raios-X e a unidade de detecção são rodadas ao mesmo tempo à volta do paciente. Desta forma são recolhidos dados para um número fixo de posições da fonte e do detector, obtendo-se em cada posição uma leitura por cada um dos detectores. Todas as leituras dos detectores podem ser representadas por um sinograma, sendo a intensidade proporcional aos integrais de linha dos coeficientes de atenuação de raios-X entre as posições correspondentes da fonte e do detector. Através destes cálculos e das técnicas de reconstrução de imagem obtêm-se imagens tridimensionais. Como cada tipo diferente de tecido tem coeficiente de atenuação de raios-X diferente, podem ser distinguidos diferentes tipos de tecidos, como tumores, aneurismas, ruptura de discos e hematomas subdurais, entre outras patologias. A TC é principalmente usada como imagem anatómica, contudo a utilização de agentes de contraste à base de iodo permite a obtenção de informação funcional de vários órgãos. A TC é uma das técnicas imagiológicas mais utilizadas actualmente devido à sua alta qualidade imagiológica e rapidez de aquisição<sup>3,5</sup>.

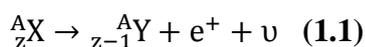


**Figura 1.3-** Aparelho usado em tomografia computadorizada evidenciado o tubo (a fonte de raio-x) e o colimador bem como a unidade de detecção em oposição (retirado da referência 5).

### 1.1.3 Medicina Nuclear: PET e SPECT

Na área da Medicina Nuclear temos duas técnicas imagiológicas não-invasivas amplamente usadas – PET e SPECT – que permitem a obtenção de imagens em 3D reconstruídas através da distribuição de um radiofármaco no corpo. Estas técnicas são extremamente sensíveis (Tabela 1.1), necessitando de pequenas doses para obter imagens da distribuição do radiofármaco. A diferença entre estas duas técnicas está relacionada com o fenómeno físico em que se baseiam, necessitando de instrumentação e radioisótopos diferentes, resultando em resolução espacial, sensibilidade, tempo de resolução e especificidade diferente. A técnica de PET é pelo menos 10 vezes mais sensível que a SPECT.

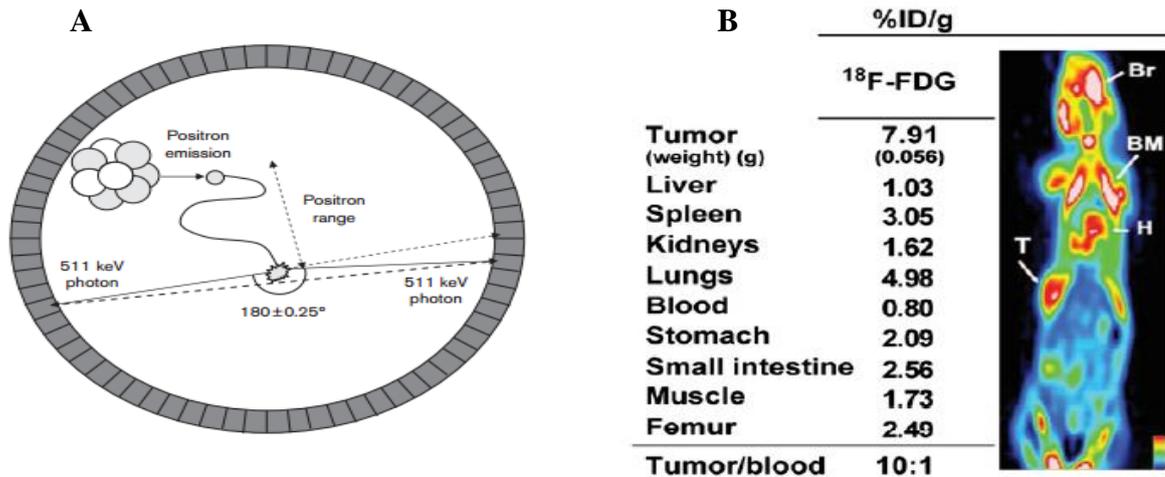
A técnica PET é baseada na utilização de radiofármacos que combinam uma molécula que reconhece o alvo com um isótopo emissor de positrões, sendo o mais vulgar o F-18 que tem um maior tempo de vida que os restantes isótopos apresentados na Tabela 1.2. Os curtos tempo de vida de O-15, N-13, Rb-82, Cu-62 e C-11 tornam a sua aplicação bastante difícil<sup>6</sup>. Como evidenciado na Tabela 1.2, a maior parte dos isótopos são produzidos num ciclotrão (acelerador de partículas carregadas que promove a colisão com um alvo produzindo o isótopo radioactivo)<sup>7</sup> mas alguns são produzidos num gerador (aparelho usado para separar e extrair o radioisótopo através do decaimento de um isótopo pai para um isótopo filho)<sup>8</sup>. O fenómeno físico subjacente à técnica de PET baseia-se na detecção de raios gama. Como o núcleo destes radioisótopos é instável devido à deficiência em neutrões (baixa razão massa/carga, N/Z), ocorre o decaimento de um protão para um neutrão, com um determinado tempo de vida definido para cada isótopo, com emissão simultânea de um neutrino e de um positrão (decaimento  $\beta^+$ ):



O positrão emitido irá eventualmente colidir com um electrão vizinho, aniquilando-se mutuamente, convertendo a massa de ambos em pura energia seguindo a famosa equação de Einstein ( $E = mc^2$ , em que E é a energia, m a massa e c a constante da velocidade da luz),

**Tabela 1.2-** Radioisótopos mais usados em PET com indicação dos tempos de meia-vida e a forma de obtenção (retirado da referência 6).

	O-15	N-13	C-11	F-18	Rb-82	Ga-68	Cu-62
Half-life	2 min	11 min	20 min	110 min	75 s	68 min	9.7 min
Availability	On-site cyclotron	On-site cyclotron	On-site cyclotron	Cyclotron, regional distribution	Generator Sr-82/Rb-82	Generator Ge-68/Ga-68	Generator Zn-62/Cu-62



**Figura 1.4-** Representação esquemática da emissão de um positrão por um radioisótopo com a consequente aniquilação com um electrão vizinho produzindo dois raios gama de 511 KeV A) (retirado da referência 10). Corte coronal e biodistribuição de <sup>18</sup>F-FDG num murganho portador de cancro subcutâneo LS174T do lado esquerdo por PET para pequenos animais. Biodistribuição expressa em percentagem de dose injectada por grama (%ID/g) dos órgãos removidos após a conclusão da sessão imagiológica B). BR - Cérebro (do inglês *Brain*), BM - Medula óssea (do inglês *Bone Marrow*), H - coração (do inglês *Heart*), K - Rim (do inglês *Kidney*), T – Tumor (retirado da referência 13).

provocando a emissão de dois raios gama com um ângulo relativo de praticamente 180°, em que cada raio tem uma energia de 511 KeV. Esta energia emitida é independente do isótopo usado (Figura 1.4A) <sup>9,10</sup>.

A utilização de PET como técnica imagiológica de diagnóstico não foi imediata, tendo passado por um processo que levou tempo para que passasse de ferramenta de investigação para uma técnica de diagnóstico clínico. É uma técnica que melhorou com os anos, com o aumento progressivo da sensibilidade.

Os problemas iniciais desta técnica era a necessidade de utilização de um radioisótopo que estivesse disponível para utilização diária e a produção de um composto, com este radioisótopo, durante o seu tempo de meia-vida. Nos primórdios da técnica era considerado essencial que nas instalações do PET estivesse o seu próprio ciclotrão para produção dos radioisótopos. Actualmente, a utilização de radioisótopos com tempos de meia-vida suficientemente longos, mas que sejam suficientemente curtos para limitar a exposição do paciente à radiação, permitiu a distribuição de radioisótopos a nível regional. O fluor-18 preenche este requisito, com tempo de meia-vida de 110 minutos, sendo amplamente usado na marcação da glicose (fluordesoxiglicose – FDG), usada na detecção de cancro.

Durante muito tempo não se identificou a aplicabilidade do PET que outras técnicas, como a IRM e a TC, já não tivessem fornecido. Foi em 1979, com Reivich *et al.*, que se obteve o primeiro scan por PET utilizando FDG para estudar o metabolismo glicolítico em cérebro

**Tabela 1.3-** Radioisótopos mais usados em SPECT com indicação dos tempos de meia-vida, o método de obtenção, modo de decaimento e respectivas energias dos fótons emitidos (retirado da referência 3).

Radioisótopo	Tempo de meia-vida ( $T_{1/2}$ )	Principais fótons emitidos KeV (% abundância)	Modo de decaimento	Método de produção
$^{99m}\text{Tc}$	6 h	140 (89%)	Transição isomérica	Gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$
$^{123}\text{I}$	13.2 h	159 (83%)	Captura de electrão	Produção por ciclotrão
$^{201}\text{Tl}$	73 h	69-80(94%)	Captura de electrão	Produção por ciclotrão
$^{67}\text{Ga}$	78.3 h	93 (40%); 184 (20%); 300 (17%); 393 (4%)	Captura de electrão	Produção por ciclotrão
$^{111}\text{In}$	2.83 d	171 (90%); 245 (94%)	Captura de electrão	Produção por ciclotrão
$^{131}\text{I}$	8.0 d	284 (6%); 364 (81%); 637 (7%)	Decaimento $\beta^-$	Fissão nuclear do $^{235}\text{U}$
$^{153}\text{Sm}$	1.93 d	103 (29%)	Decaimento $\beta^-$	Activação por neutrões

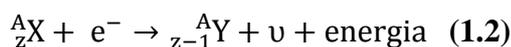
humano<sup>11</sup>, e desta forma identificou-se uma potencial aplicação para PET. Surgiu em 1982, com Dichiro *et al.*, uma correlação entre o aumento do metabolismo glicolítico em tumores cerebrais detectável por PET com FDG e a sua progressão, tendo os autores estudado doentes com glioma<sup>12</sup>, tornando-se a partir daí uma ferramenta importante tanto no diagnóstico como no estudo da eficácia do processo de tratamento do cancro, com a verificação ou não do decréscimo do metabolismo na zona cancerígena (Figura 1.4B)<sup>13</sup>. Com o passar dos anos têm surgido muitos radiofármacos para variadas aplicações.

A instrumentação de PET consiste na utilização de anéis de detectores, baseados em cristais cintilantes que convertem a radiação gama em luz visível que posteriormente é detectada por um fotodetector que a converte em impulso eléctrico, que é capaz de identificar o par de raios  $\gamma$  produzidos durante a aniquilação do positrão. Quando os dois raios  $\gamma$  são detectados por dois detectores é assumido que a aniquilação ocorreu algures na linha recta entre os dois detectores. Esta informação é usada em cálculos matemáticos de forma a providenciar uma distribuição em 3D do agente PET<sup>14</sup>.

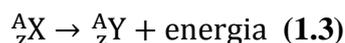
Em Imagiologia de SPECT é detectada a emissão de um único fóton na região dos raios gama emitido pelo radionuclídeo do radiofármaco<sup>15</sup>. Na Tabela 1.3 descrevem-se as principais características físicas dos radioisótopos incluindo o modo de decaimento e as energias dos fótons emitidos com os tempos de meia-vida, sendo ainda referidos os modos de obtenção dos radioisótopos em que novamente é usado o gerador e o ciclotrão. No caso do  $^{131}\text{I}$ , a obtenção é

por fissão nuclear do  $^{235}\text{U}$  por absorção de neutrões num reactor e o  $^{153}\text{Sm}$  obtém-se por activação por neutrões que consiste na captura de neutrões por núcleos estáveis. Como se pode ver na Tabela 1.3, os tempos de vida dos radioisótopos usados em SPECT variam de 6h a alguns dias, permitindo seguir processos moleculares mais longos que em PET. Como cada radioisótopo emite raios  $\gamma$  com diferentes energias, a câmara cintilante tem capacidade de discriminar fotões com diferentes energias podendo ser possível seguir vários processos moleculares com diferentes radiofármacos. Da Tabela 1.3 verifica-se ainda que os raios  $\gamma$  emitidos em SPECT são de mais baixa energia que em PET.

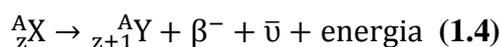
Como foi referido anteriormente, o processo físico subjacente ao SPECT é a detecção de um único fotão na região dos raios  $\gamma$ . No entanto o decaimento do radioisótopo pode variar. No caso do  $^{123}\text{I}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  e  $^{111}\text{In}$ , o decaimento é feito por captura de electrão, em que o radioisótopo deficiente em neutrões captura um electrão com a conversão de um próton em neutrão e a simultânea ejeção de um neutrino e emissão de energia<sup>3</sup>:



No caso do  $^{99m}\text{Tc}$  o decaimento é por transição isomérica, uma vez que na geração de  $^{99m}\text{Tc}$  a partir de molibdénio 99 é formado tecnécio excitado numa forma metaestável (daí aparecer o m em  $^{99m}\text{Tc}$ ). Este decaimento acontece sem emissão ou captura de nenhuma partícula, ocorrendo o decaimento entre estados de energia diferentes, sem alteração da razão N/Z. No caso do  $^{99m}\text{Tc}$  ocorrem dois decaimentos consecutivos com a emissão de dois raios  $\gamma$  com diferentes energias<sup>3</sup>:



Por fim, nos casos do  $^{131}\text{I}$  e do  $^{153}\text{Sm}$  a emissão de raios  $\gamma$  ocorre por decaimento  $\beta^-$  (ou decaimento por electrão), típico de radioisótopos com um número excessivo de neutrões comparativamente ao número de prótons. O decaimento do radioisótopo ocorre pela conversão de um neutrão em próton com a emissão de um electrão ( $\beta^-$ , com a exceção da sua origem ser no núcleo, esta partícula é idêntica ao electrão) de um antineutrino ( $\bar{\nu}$ , partícula subatómica neutra com massa muito menor que a do electrão) e com a simultânea emissão de um fotão. Este decaimento pode ser descrito pela seguinte equação<sup>3</sup>:



De entre os radioisótopos apresentados na Tabela 1.3 o  $^{99m}\text{Tc}$  é o radioisótopo mais usado em radiofármacos para SPECT, sendo de grande aplicabilidade na recolha de informações fisiológicas *in vivo* de diferentes tecidos, citando-se a detecção de inflamações e infecções, tumores, ventilação dos pulmões, entre outros.

A instrumentação de SPECT é baseada em detectores de câmara gama que consiste em um colimador, um cristal cintilante e um fotodetector como por exemplo tubos fotomultiplicadores. De forma semelhante à tomografia computadorizada é detectado em vários ângulos o fóton gama emitido, a partir da rotação à volta do paciente da câmara de raios gama, em que cada projecção adquirida combinada com metodologias matemáticas computacionais obtém-se uma imagem tridimensional da distribuição do radiofármaco no corpo<sup>16</sup>.

Actualmente os novos *scanners* de PET e SPECT são combinados com tomografia computadorizada, uma vez que a informação que se obtém a partir de PET e SPECT é sobretudo de natureza bioquímica e fisiológica com pouca informação anatómica, que é então fornecida por TC (ver secção 1.1.2), demonstrando a poderosa eficácia das técnicas híbridas, abrindo novos horizontes no diagnóstico médico<sup>17</sup>.

Uma das grandes vantagens da PET comparativamente à SPECT tem a ver com o facto de que a maioria dos isótopos emissores de positrão poderem substituir átomos de ocorrência natural perturbando menos o sistema bioquímico, o que não se verifica no caso de isótopos emissores de raios gama em SPECT. Por outro lado, em PET os raios gama emitidos têm energias iguais independentemente do isótopo usado, não permitindo seguir diferentes eventos moleculares usando vários radiofármacos com radioisótopos diferentes. Essa situação não se verifica em SPECT, em que os raios gama produzidos pelos radioisótopos têm energias diferentes, tendo o detector SPECT capacidade de discriminar os diferentes raios  $\gamma$ , podendo ser possível seguir diferentes eventos moleculares com vários radiofármacos usando distintos radioisótopos. Outra vantagem de SPECT relativamente ao PET é o maior tempo de vida do radioisótopos podendo ser possível seguir processos moleculares com cinéticas de maior duração<sup>15</sup>.

### **1.1.4 Imagiologia de Ressonância Magnética**

A Imagiologia de Ressonância Magnética (IRM) resulta directamente do fenómeno de Ressonância Magnética Nuclear que é amplamente usado por químicos e bioquímicos na determinação estrutural molecular e por exemplo em estudos de interacção proteína-ligando. Em IRM é normalmente detectado o núcleo atómico de hidrogénio ( $^1\text{H}$ ) da água, sendo uma técnica com grande resolução espacial, com capacidade de discriminar os diferentes tecidos moles, devido à grande abundância de água nesses tipos de tecidos<sup>18</sup>.

Em IRM é possível obter a distribuição espacial da densidade de spin, normalmente do próton da água. Pode-se ainda fazer uso das propriedades de relaxação de spin do núcleo, como o  $T_1$  e  $T_2$ . A localização espacial é conseguida através da aplicação de gradientes lineares de campo magnético sobre o campo magnético principal homogéneo. Estes gradientes são uma variação linear no campo magnético com respeito à posição, estando sobrepostos ao campo magnético estático,  $B_0$ , aplicados durante pequenos intervalos de tempo (pulso) por bobinas de gradiente. Um núcleo sujeito ao campo  $B_0$  sofre um movimento de precessão à volta de  $B_0$  cuja frequência (de Larmor) se encontra na zona das radiofrequências, podendo ser representada pela seguinte equação:

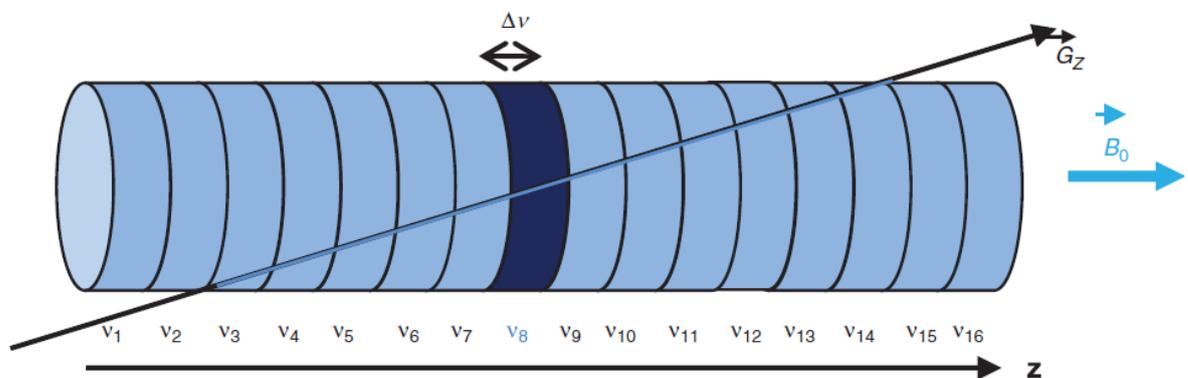
$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (1.5)$$

em que  $\nu$  é a frequência de Larmor,  $\gamma$  é a constante giromagnética específica para cada núcleo e  $B_0$  o campo magnético principal. Em IRM são usados três gradientes perpendiculares entre si para a localização em 3D ( $G_x$ ,  $G_y$ ,  $G_z$ ), que definem o vector  $\vec{G}$ . Sendo a frequência de Larmor para um próton situado segundo o vector  $\vec{u}$  ( $x,y,z$ ) igual a:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} (B_0 + \vec{G} \cdot \vec{u}) \quad (1.6)$$

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} (B_0 + G_x x + G_y y + G_z z) \quad (1.7)$$

Para a localização tridimensional é em primeira instância seleccionada o corte a ser visualizado, combinando simultaneamente um pulso de gradiente com um pulso de excitação selectivo, a partir do qual se obtém a codificação da frequência espacial e a selecção do corte a ser visualizado através da selecção da largura da banda de radiofrequência, respectivamente. Como ilustrado na Figura 1.5, aplicando um pulso selectivo (largura de banda  $\Delta\nu$ ) de frequência  $\nu_8$  simultaneamente com a aplicação do gradiente  $G_z$  apenas os prótons dentro do corte 8 irão contribuir para o sinal.



**Figura 1.5-** O corte a ser visualizado pode ser seleccionado aplicando simultaneamente um pulso de gradiente com um pulso de excitação (retirado da referência 19).

Uma vez seleccionado o corte a ser visualizado é necessário dentro do corte diferenciar cada voxel (nome derivado da combinação da palavra pixel, unidade de imagem digital, com a palavra volume), conhecido como codificação espacial da imagem, o que é possível pela aplicação de dois outros gradientes, de codificação de frequência e de codificação de fase. Se por exemplo um corte for seleccionado na direcção do eixo dos z, o gradiente de codificação de frequência é aplicado no eixo dos x e o gradiente de codificação de fase pode ser aplicado no eixo dos y. Devido ao gradiente de codificação de frequência  $G_x$ , aplicado durante a aquisição de sinal, o spin irá precessar a diferentes frequências consoante a posição no eixo dos x. Relativamente ao gradiente de codificação da fase, a sua aplicação ao longo do eixo do y, simultânea com o gradiente de codificação de frequência, irá fazer com que os spin precessem a diferentes frequências e irão estar desfasados consoante a posição no eixo dos y. Desta forma, cada voxel num corte específico pode ser associado com o sinal adquirido, caracterizado pela dependência da frequência e da fase com a posição (x,y). A imagem médica associada à distribuição de densidade de spins é proporcional à magnetização em x e y, de acordo com os gradientes aplicados nestes eixos. A utilização de uma dupla transformada inversa de Fourier de  $S(k)$  (definido como “espaço k”, que contem dados de aquisição associado aos dados provenientes dos gradientes de codificação de frequência e de fase) no espaço temporal k leva à obtenção da distribuição da densidade de spins no espaço físico em 2D<sup>19</sup>.

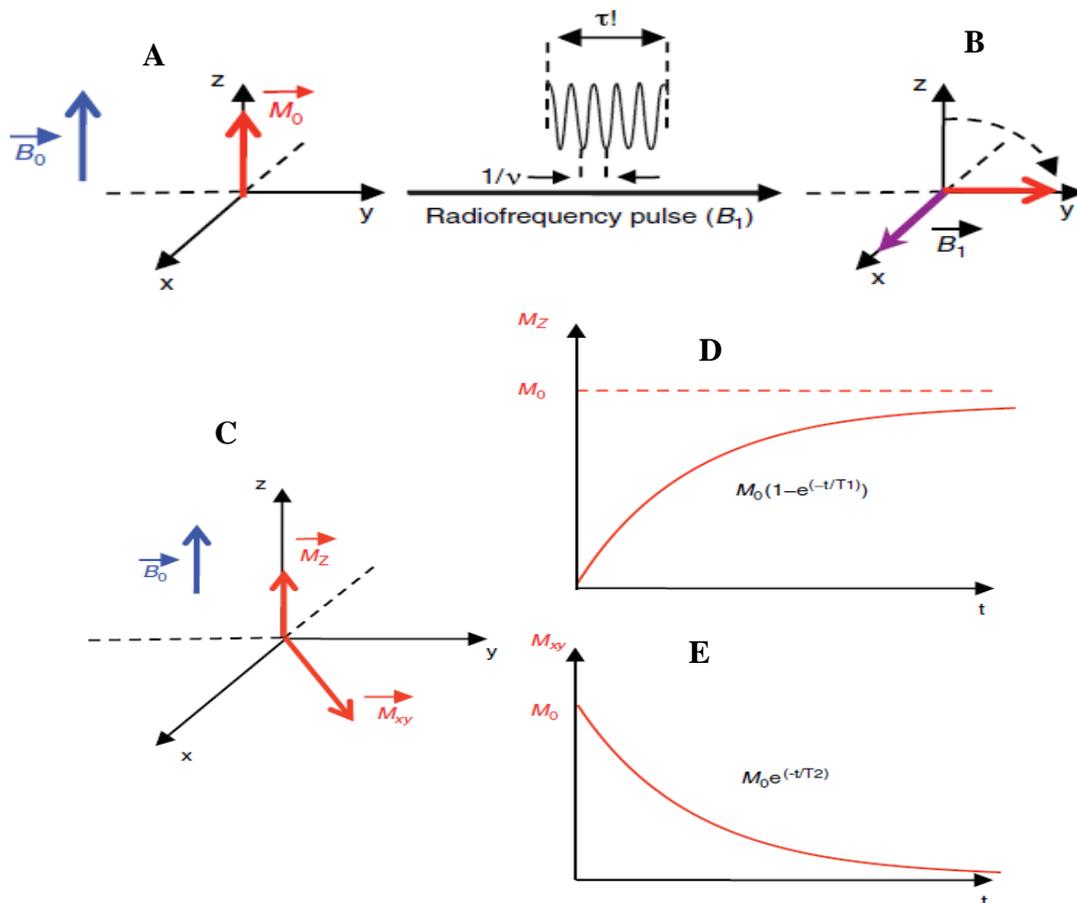
Assim como em RMN o sinal obtido é um FID (do inglês *Free Induced Decay*), em IRM o sinal obtido é um eco, proveniente de dois tipos de sequências de pulsos: o eco de gradientes, para localização espacial do sinal, e o eco de spins, para excitação do spin e selecção do sinal desejado, baseado no fenómeno de RMN<sup>20</sup>. O sinal adquirido é dependente do tempo  $T_1$  (tempo de relaxação longitudinal), que determina a velocidade de recuperação da magnetização  $M_z$  à sua posição de equilíbrio  $M_0$  depois de um pulso de  $90^\circ$ , depende de  $T_2$  (tempo de relaxação transversal), que representa o desaparecimento da magnetização transversal no plano xy ( $M_{xy}$ ) após o pulso de  $90^\circ$  (Figura 1.6), de  $T_2^*$  que é similar a  $T_2$  mas é dependente da heterogeneidade do campo magnético e depende ainda de  $\rho$  (densidade protónica). Alterando-se os tempos de repetição (TR) entre cada eco de spin e os tempos de eco (TE) podemos obter imagens baseadas nestes três parâmetros:

- Imagem baseada em  $T_1$  corresponde a um TR curto e TE curto;
- Imagem baseada em  $T_2$  corresponde a um TR longo e TE longo;
- Imagem baseada em  $\rho$  corresponde a um TR longo e TE curto;

Como se pode ver, tanto na imagem baseada em  $T_1$  como em  $T_2$  não se consegue eliminar por completo a contribuição da densidade protónica, uma vez que um TR longo é característico da imagem baseada em  $T_2$  e um TE curto é característico da imagem baseada em  $T_1$ .

A imagem baseada em  $T_2^*$  obtém-se a partir de uma sequência de gradientes que cria heterogeneidades no campo magnético. Ao contrário das sequências de eco, em que os sinais desfasados devido à heterogeneidade do campo magnético são refocados durante o TE, neste tipo de modalidade não é efectuada a refocagem e quanto mais longo o TE melhor será a imagem baseada em  $T_2^*$ .

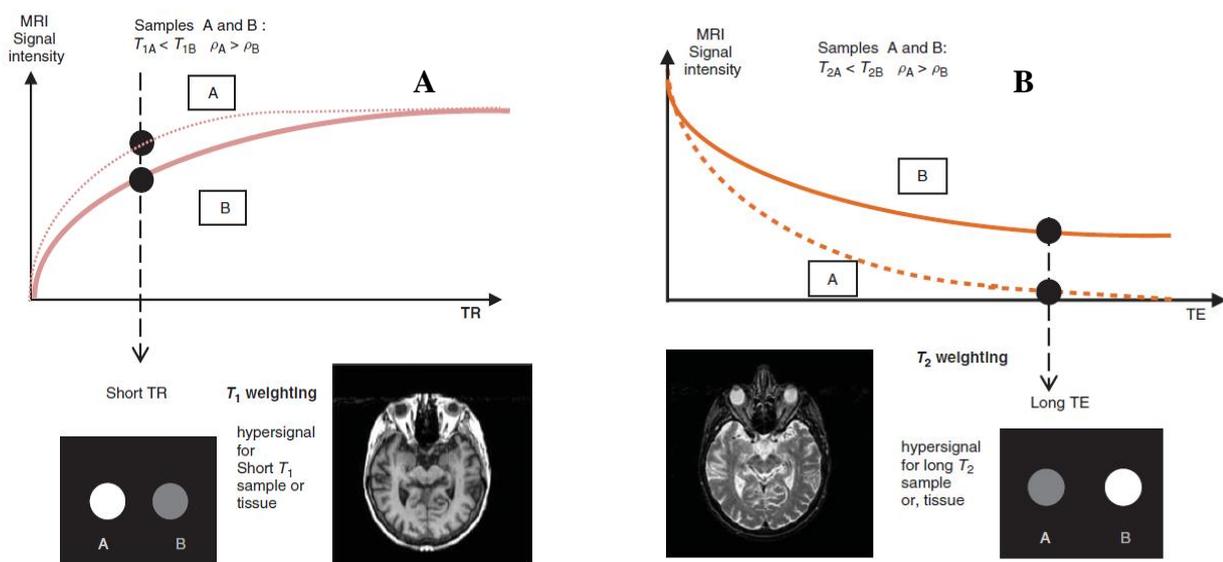
O sinal de IRM é expresso em tons de cinzento entre preto e branco, representando um sinal fraco e intenso, respectivamente, obtendo-se desta forma uma imagem de contraste entre diferentes tecidos criados a partir de diferentes intensidades. A escolha dos parâmetros de IRM



**Figura 1.6-** Ilustração esquemática evidenciando a origem dos tempos  $T_1$  e  $T_2$ . Magnetização  $M_0$  no equilíbrio quando os spins são colocados sob um campo magnético permanente  $B_0$  **A**). Aplicação de um pulso de radiofrequência de  $90^\circ$  provocado por um campo magnético  $B_1$  perpendicular, criando a magnetização no plano xy. A partir deste instante os spins vão relaxando até atingir a magnetização de equilíbrio  $M_0$  precessando à volta do eixo z **B**). Representação da perda de magnetização transversal ( $M_{xy}$ ) e recuperação de magnetização longitudinal ( $M_z$ ) **C**). Retorno ao equilíbrio da magnetização segundo o eixo do z:  $M_z = M_0(1 - e^{-t/T_1})$  **D**). Retorno ao equilíbrio da magnetização no plano xy:  $M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2}$  **E**). (adaptado da referência 19).

permite a variação do contraste da imagem de acordo com os valores dos parâmetros físicos intrínsecos do tecido, como o  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_2^*$  e densidade protónica. Desta forma na imagem baseada em  $T_1$ , que corresponde a um TR curto, o pulso de excitação de radiofrequência é repetido rapidamente de forma que a amostra que tiver menor  $T_1$  irá ter maior sinal IRM e obter-se-á um hipersinal, com tons em branco. Este tipo de imagem produz um efeito de contraste positivo. Na imagem baseada em  $T_2$ , ao aplicar-se um TR longo de forma a remover a contribuição de  $T_1$ , e um TE longo obtém-se uma imagem de contraste baseada na magnetização transversal. Desta forma, quanto menor o  $T_2$  menor o sinal IRM, e será um hiposinal, representado por tons a preto, produzindo um efeito de contraste negativo (Figura 1.7).

Na clinica médica, estas modalidades imagiológicas permitem que sejam utilizadas para imagem anatómica e detecção de diferentes patologias uma vez que os tempos  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_2^*$  e a densidade protónica variam com o tecido e com alterações bioquímicas<sup>19</sup>.



**Figura 1.7-** Imagem baseada em  $T_1$  em que o sinal é obtido com um TR curto, o tecido com menor  $T_1$  tem maior sinal IRM, hipersinal **A**). Imagem baseada em  $T_2$  em que o sinal é obtido com TE longo, o tecido com menor  $T_2$  é o que tem menor sinal IRM, hiposinal **B**). De notar que em ambas as modalidades a contribuição da densidade protónica ( $\rho$ ) não é eliminada por completo (adaptado da referência 19).

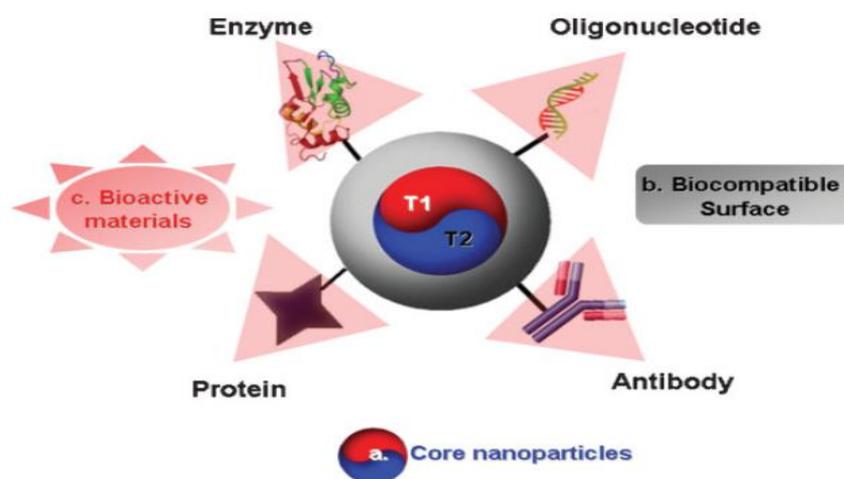
## 1.2 Agentes de contraste em IRM

Ao contrário de outras técnicas, como PET e SPECT, em IRM não é necessária a utilização de agentes de contraste. Quando é utilizado, não é o agente de contraste em si que é detectado mas sim os prótons da água presentes no corpo humano. A utilização de agentes de

contraste advém da necessidade de aumentar o contraste da imagem em IRM. Isto é possível porque os agentes de contraste, baseados em complexos paramagnéticos de íons metálicos como os de gadolínio (III) e manganésio (II), ou agentes de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de ferro, são capazes de reduzir os tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ), respectivamente, dos prótons da água<sup>21</sup>.

### 1.2.1 Agentes de contraste negativos

Os agentes de contraste negativos diminuem o tempo de relaxação  $T_2$  dos prótons da água vizinhos, provocando uma diminuição da intensidade do sinal IRM (hipointenso). Os principais agentes de contraste negativos são baseados em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, nomeadamente nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético (do inglês *Small Particle of Iron Oxide* ou *Superparamagnetic Particle of Iron Oxide*, SPIO) e nanopartículas ultra pequenas de óxido de ferro superparamagnético (do inglês *Ultrasmall Particles of Iron Oxide*, USPIO), que têm sido investigados desde dos anos 80, e que também têm demonstrado capacidade de poderem actuar como agente de contraste positivo reduzindo o tempo  $T_1$ <sup>22</sup>. No entanto, as nanopartículas de óxido ferro não são geralmente aplicadas como agentes de contraste positivos, pelo facto que o processo responsável pela redução do tempo  $T_1$  requer uma interacção próxima entre o agente de contraste e os prótons da água que é dificultado pela espessura das nanopartículas. Por outro lado, a redução do  $T_2$  pelas nanopartículas magnéticas é causado pela grande diferença de susceptibilidade entre as partículas e o meio envolvente resultando em



**Figura 1.8-** Composição de uma nanopartícula usada em IRM como agente de contraste (retirado da referência 24).

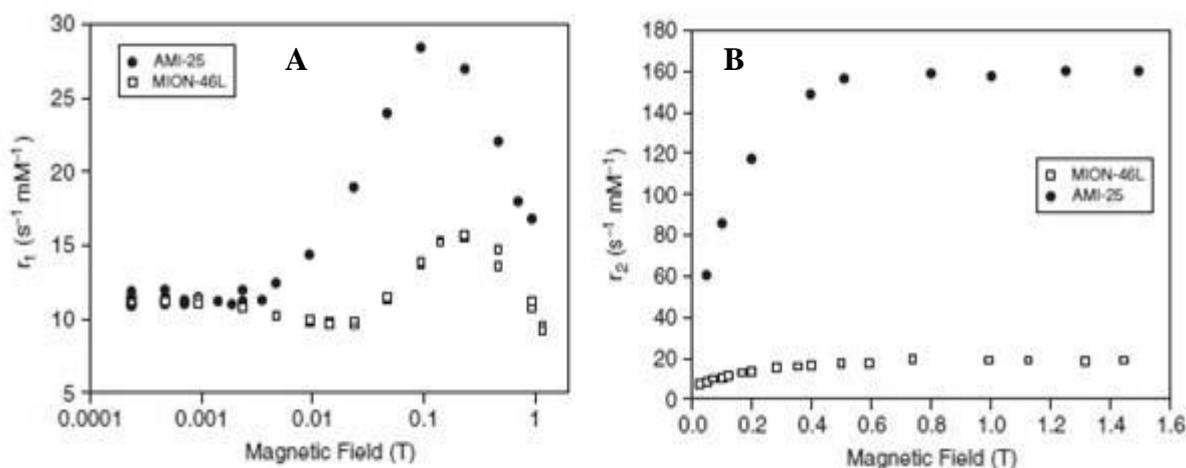
gradientes de campos magnéticos microscópicos que se estendem muito para lá das nanopartículas. A difusão dos prótons junto a essas nanopartículas leva ao desfasamento do momento magnético dos prótons, levando a uma perda da coerência de fase, e isto provoca a diminuição do tempo de relaxação trasnversal<sup>23</sup>.

As aplicações das nanopartículas de óxido de ferro são dependentes do tamanho da partícula e do revestimento, influenciando as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas. A nanopartícula é composta pelo núcleo magnético responsável pelo melhoramento do contraste da imagem, pelo revestimento biocompatível com o sistema biológico, como por exemplo dextrano, silicatos ou outros polímeros não imunogénicos, e pela camada mais externa, que é bioactiva para o alvo desejado (Figura 1.8). Comparativamente a alguns quelatos de gadolínio (III) menos estáveis, as partículas de óxido de ferro apresentam baixa toxicidade *in vivo*<sup>24</sup>.

Ao contrário dos agentes de contraste baseados em quelatos de gadolínio (III), estas nanopartículas contêm milhares de átomos de ferro gerando contraste de imagem várias ordens de magnitude superiores aos agentes de contraste positivos. A relaxividade transversal das nanopartículas aumenta com o campo magnético aplicado, acabando por saturar, como ilustrado pela Figura 1.9B. O aumento da relaxividade transversal é explicado simplesmente pelo facto de que com o aumento do campo magnético aplicado, a magnetização da partícula aumenta de 0 até à saturação, seguindo a função de Langevin,  $L(x)$ , e logicamente a relaxividade da partícula também aumenta:

$$M(B) = M_{\text{sat}}L(X) = M_{\text{sat}} \left( \coth(x) - \frac{1}{x} \right) \quad (1.8)$$

$$\text{com } x = \frac{\mu_{\text{sat}}B}{k_B T}$$



**Figura 1.9-** Evolução de r<sub>1</sub> **A**) e r<sub>2</sub> **B**) em função do campo magnético para nanopartícula de óxido de ferro superparamagnético (AMI-25, Endorem®) e nanopartículas ultra pequenas de óxido de ferro superparamagnético (MION-46L) (retirado da referência 26).

Relativamente à relaxação longitudinal, o perfil de  $r_1$  em função do campo magnético, ilustrado na Figura 1.9A, é mais complexo, dependendo de várias propriedades da partícula, como do tamanho, da temperatura, da relaxação de Néel (refere-se à relaxação global do momento electrónico da nanopartícula superparamagnética, sem incluir a relaxação nuclear dos prótons da água) e da magnetização de saturação, entre outros. No entanto, quando o campo magnético é suficientemente forte, a relaxividade longitudinal cai para zero<sup>25,26</sup>.

Verifica-se ainda que a relaxividade tanto em  $T_1$  como em  $T_2$  dos prótons da água, como seria de esperar, é diferente na presença de SPIO ou USPIO. Mas focando-nos apenas na relaxividade em  $T_2$  dos prótons da água, que é a principal aplicação destas nanopartículas, a relaxividade em  $T_2$  na presença de SPIOs em solução pode ser explicada com base na teoria de mecânica quântica de esfera externa:

$$\frac{1}{T_2} = \left( \frac{256\pi^2\gamma^2}{405} \right) \frac{V^*M_s^2a^2}{D\left(1+\frac{L}{a}\right)} \quad (1.9)$$

onde  $\gamma$  é a constante giromagnética do próton,  $V^*$ ,  $M_s^2$  e  $a$  são a fracção de volume, a magnetização de saturação e o raio do núcleo de óxido de ferro, respectivamente.  $D$  é a constante de auto-difusão da água e  $L$  é a espessura da superfície de revestimento da partícula impermeável à água. Por questões de simplificação apenas o termo secular predominante em campo magnético elevado é mostrado na equação. Esta teoria prevê o aumento da relaxividade com o aumento da magnetização e do tamanho do núcleo de óxido de ferro se  $V^*$  for constante. Esta teoria assume anisotropia uniaxial e que a energia térmica não é suficientemente elevada para ultrapassar a energia anisotrópica. No caso das partículas como as USPIO, por serem muito pequenas são caracterizados por baixa energia de anisotropia, fazendo com que o posicionamento da magnetização da partícula segundo a direcção de anisotropia seja atenuada<sup>25,26</sup>. Têm surgido algumas teorias para explicar a relaxividade em  $T_1$  e  $T_2$  das USPIOs, como modelos propondo ignorar-se a energia de anisotropia, que porém levam a resultados de relaxividade sobrestimados em campo magnético baixo<sup>27</sup>. Um outro modelo utiliza uma teoria quântica completa introduzindo a energia anisotrópica, como um parâmetro quantizado, sendo um modelo que apresenta bons resultados, no entanto a obtenção de uma solução numérica requer tempo computacional<sup>28</sup>.

As nanopartículas de tamanhos grandes, SPIO, são utilizadas como agentes de contraste para o lúmen gastrointestinal, havendo alguns exemplos disponíveis no mercado como o Lumiren<sup>®</sup>, Gastromark<sup>®</sup> e Abdoscan<sup>®</sup>. Partículas de tamanhos não superiores a 300 nm têm sido utilizadas como agentes de contraste para o fígado e baço, como o Endorem<sup>®</sup>, Feridex IV<sup>®</sup> e Resovist<sup>®</sup> (diâmetro médio de 60 nm). Verificou-se que algumas nanopartículas ultra pequenas,

USPIO, de tamanhos entre 20-40 nm de diâmetro conseguem entrar no sistema linfático e detectar nódulos linfáticos metastisados, exemplificado pelo Sinerem<sup>®</sup> e Combidex<sup>®</sup>, que no entanto demonstraram uma grande percentagem de falsos positivos, levando a que a investigação sobre estas nanopartículas parasse. As USPIO têm uma razão  $r_2/r_1$  muito inferior às SPIO (Figura 1.9), podendo ser em princípio usadas como agentes de contraste positivo. Um exemplo dessas USPIO é a Clariscan<sup>®</sup>, de 20 nm de diâmetro, que foram desenvolvidas para Angiografia de Ressonância Magnética, mas que devido a alguns problemas de toxicidade, viram o seu desenvolvimento parar<sup>29-31</sup>.

## 1.2.2 Agentes de contraste positivo

Os agentes de contraste positivos diminuem o tempo de relaxação  $T_1$  dos prótons da água envolventes do tecido, provocando um aumento do sinal IRM (hiperintenso). Em 1978, com Lauterbur *et al.* surgiu a primeira imagem IRM baseada no uso de um agente paramagnético, um sal de  $Mn^{2+}$ , que permitiu a distinção entre diferentes tecidos baseados em diferentes tempos de relaxação<sup>32</sup>. Actualmente os agentes de contraste baseados em complexos de  $Gd^{3+}$  são os mais usados em IRM na prática clínica. Há poucas excepções ao uso exclusivo de complexos de gadolínio como agente de contraste em IRM, como por exemplo os agentes de contraste negativos, baseados em óxido de ferro, havendo alguns exemplos aprovados para a prática clínica, discutidos na secção 1.2.1. Existe ainda um exemplo de agente de contraste baseado num quelato de  $Mg^{2+}$  (Teslascan<sup>®</sup>,  $Mn^{2+}$ -DPDP, DPDP- N,N'-dipiridoxiletilediamine-N,N'-diacetate 5,5'-bis(fosfato)) aprovado para o estudo de lesões do fígado<sup>33</sup>. O  $Mn^{2+}$ -DPDP é um complexo com fraca estabilidade que liberta *in vivo*  $Mg^{2+}$  livre que é acumulado nos hepatócitos. A presença do ligando permite a libertação lenta do ião  $Mn^{2+}$  livre que não seria possível pela simples administração do sal de cloreto de manganésio<sup>34</sup>.

A escolha de  $Gd^{3+}$  como agente de contraste advém do facto de ser um ião metálico estável com grande paramagnetismo ou momento magnético, com 7 electrões desemparelhados nas orbitais 4f formando um estado S com uma simetria esférica, que provoca uma relaxação de spin electrónico lenta, sendo uma propriedade importante na sua eficácia como agente de contraste em IRM<sup>19</sup>.

A utilização de  $Gd^{3+}$  em IRM faz-se sempre sob a forma de quelatos muito estáveis termodinamicamente e com cinéticas de dissociação suficientemente lentas para evitar a libertação de  $Gd^{3+}$  livre durante o tempo que permanece no organismo até à sua excreção. Uma

das razões para a toxicidade do  $Gd^{3+}$  tem a ver com o facto do seu raio atómico ser similar ao ião cálcio divalente, podendo competir em todos os processos biológicos envolvendo o cálcio. Quando o faz, como o gadolínio forma um ião trivalente, tem maior afinidade que o ião cálcio divalente para os seus locais biológicos, levando por exemplo a alterações de processos enzimáticos assim como ao bloqueio de canais de cálcio. Tem sido reportado o desenvolvimento de fibrose sistémica nefrogénica por pacientes com problemas de insuficiência renal após a injeção de um agente de contraste baseado em gadolínio com baixa estabilidade termodinâmica e cinética (exemplo dos complexos formados com ligandos acíclicos como o Gd-DTPA-BMA, ácido dietilenetriaminepentaacético bisamida, Tabela 1.4) provocando a transmetalização com  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , levando à libertação de  $Gd^{3+}$  livre *in vivo*<sup>35-37</sup>.

Actualmente a atenção tem recaído no desenvolvimento de ligandos polidentados, em geral macrocíclicos, com elevada estabilidade termodinâmica e cinética, que minimizem os problemas de toxicidade (Tabela 1.4). No entanto, a utilização de ligandos polidentados diminui a eficácia de relaxação protónica da água pelo gadolínio, por diminuir o número de moléculas de água que podem coordenar com o metal. Os agentes de contraste em IRM que diminuem o tempo de relaxação  $T_1$  são baseados em dois tipos de derivados poliaminocarboxilados, os acíclicos (exemplo: DTPA) e macrocíclos (exemplo: DOTA- ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético, DO3A- 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacetato). Mais exemplos de agentes de contraste baseados em gadolínio são apresentados na Figura 1.10 com as respectivas constantes termodinâmicas e de relaxividade protónica apresentados na Tabela 1.4<sup>38-42</sup>.

Como referido anteriormente, a eficácia de um agente de contraste positivo é medida em termos da relaxividade em  $T_1$  ( $r_1$ ), que representa a relaxação longitudinal induzida paramagneticamente ( $1/T_1$ ) observada para 1 mM de agente de contraste em solução aquosa, e que é dependente da temperatura e do campo magnético aplicado. A teoria geral da relaxação nuclear do solvente na presença de substâncias paramagnéticas foi desenvolvida por Bloembergen, Solomon e outros<sup>43-46</sup>. Um complexo de  $Gd^{3+}$  induz o aumento de ambas as constantes de relaxação longitudinal e transversal dos núcleos do solvente,  $1/T_1$  e  $1/T_2$ , respectivamente. A constante de relaxação observada ( $1/T_{i,obs}$ ) é a soma das constantes de relaxação diamagnética ( $1/T_{i,d}$ ) e paramagnética ( $1/T_{i,p}$ ):

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}}, \text{ onde } i = 1,2 \quad (1.10)$$

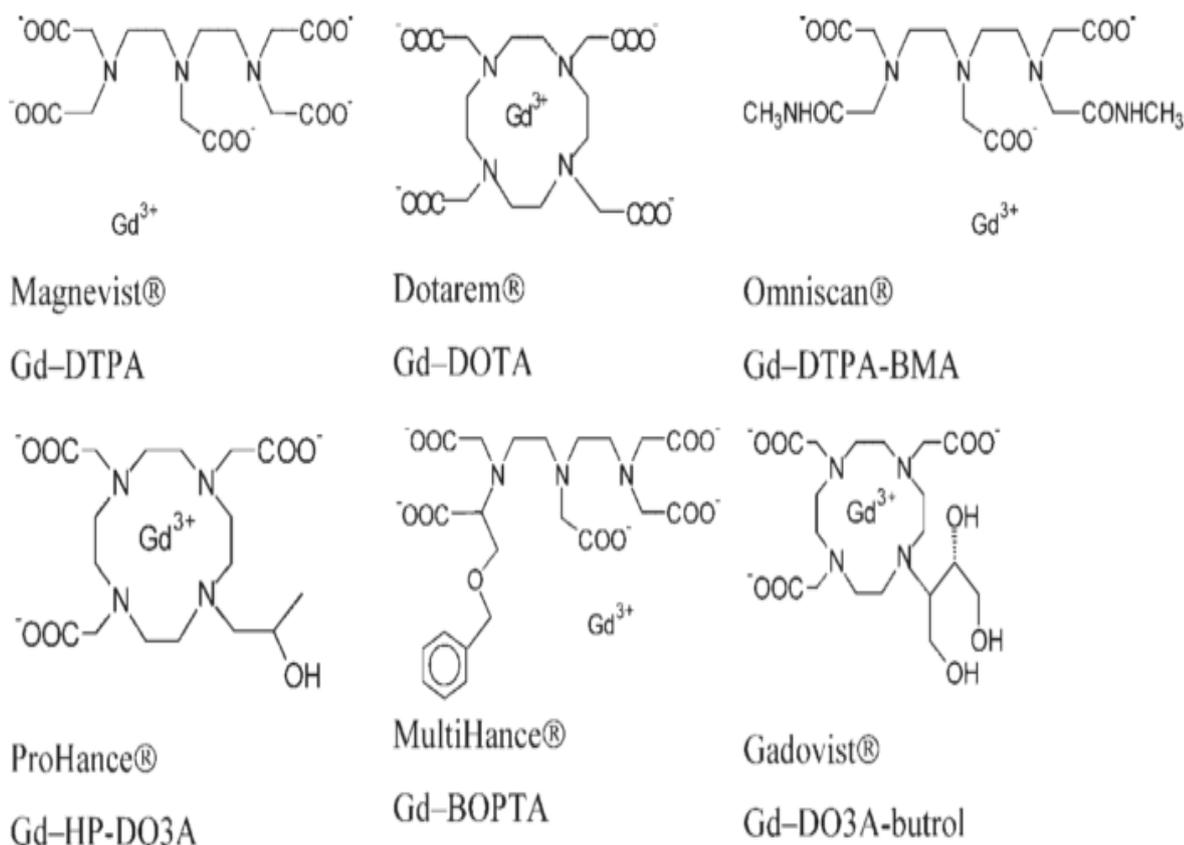
Apesar da equação 1.10 ser amplamente usada como descrição geral, é apenas válida para soluções diluídas de composto paramagnético. O termo diamagnético representa a relaxação do

**Tabela 1.4-** Exemplos de agentes de contraste baseados em gadolínio disponíveis comercialmente com a respectiva indicação da constante de estabilidade e da relaxividade  $r_1$  com a indicação da referência onde se obteve esses valores.

Formula química	Nome comercial	Constante de estabilidade termodinâmica, Log K (constante estabilidade condicional, log K', pH=7.4)	$r_1$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
Gd-DOTA	Dotarem®	25.4 <sup>39</sup> (19.0) <sup>40</sup>	3.5 <sup>38</sup>
Gd-DTPA	Magnevist®	22.1 <sup>39</sup> (17.7) <sup>40</sup>	3.8 <sup>38</sup>
Gd-DTPA-BMA	Omniscan®	16.85 <sup>36</sup> (14.9) <sup>40</sup>	3.8 <sup>38</sup>
Gd-HP-DO3A	ProHance®	22.8 <sup>39</sup> (16.9) <sup>40</sup>	3.6 <sup>38</sup>
Gd-BOPTA	Multi-hance®	22.6 <sup>41</sup> (18.4) <sup>41</sup>	4.8 <sup>38</sup>
Gd-DO3A-butrol	Gadovist®	21.8 <sup>42</sup>	3.7 <sup>38</sup>

a) Relaxividade em água a 20 MHz, 37°C

DOTA- ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7,10-tetraacetico; DTPA- ácido dietilenetriaminepentaacetico; DTPA-BMA- DTPA bisamida; DO3A- 1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-triacetate; HP-DO3A- hidroxipropil DO3A; BOPTA- BOPTA- ácido 2,5,8-tris(carboxi-etil)-12-fenil-11-oxa-2,5,8-triazadodecane-1,9-dicarboxilico; DO3A-butrol- DO3A di-hidroxi-hidroximetilpropil.



**Figura 1.10-** Exemplos de agentes de contraste baseados em gadolínio disponíveis comercialmente (retirado da referência 38).

solvente (água) na ausência de soluto paramagnético e o termo paramagnético representa a constante de relaxação induzida paramagneticamente que é linearmente proporcional à concentração de composto paramagnético:

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + r_i[\text{Gd(III)}]; \text{ onde } i = 1,2 \quad (1.11)$$

A derivada de um gráfico linear da constante de relaxação observada em função da concentração do soluto paramagnético dá a relaxividade,  $r_i$  ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Como estamos interessados em estudar os agentes de contraste em solvente aquoso, o valor da derivada é então referido como relaxividade protónica.

A relaxação protónica induzida paramagneticamente resulta da interacção dipolo-dipolo entre o momento magnético de spin nuclear e o campo magnético resultante do momento magnético de spin dos electrões desemparelhados, que flutua no tempo de acordo com os seus movimentos brownianos em solução. O campo magnético criado à volta do centro paramagnético vai desaparecendo com a distância, e desta forma, processos específicas que trazem as moléculas de água para a proximidade do centro paramagnético são de extrema importância na transmissão dos efeitos paramagnéticos ao solvente. Nos complexos de  $\text{Gd}^{3+}$ , estas interacções específicas correspondem à ligação da água na primeira esfera de coordenação do metal. Esta molécula de água vai trocando com outras moléculas de água do solvente, transmitindo desta forma os efeitos paramagnéticos ao solvente, que corresponde à contribuição na relaxação da esfera interna (do inglês *Inner-Sphere*, IS). Os efeitos paramagnéticos também são sentidos quando há difusão aleatória das moléculas da água na proximidade do centro paramagnético, correspondendo à contribuição na relaxação da esfera externa (do inglês *Outer-Sphere*, OS). Estas duas contribuições são separadas com base nas interacções intra e intermolecular correspondendo à esfera interna e externa, respectivamente. Desta forma a contribuição paramagnética na relaxividade protónica pode ser dado por:

$$\frac{1}{T_{i,p}} = \left(\frac{1}{T_{i,p}}\right)^{IS} + \left(\frac{1}{T_{i,p}}\right)^{OS}$$

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS}; \text{ onde } i = 1, 2 \quad (1.12)$$

Para alguns ligandos, há algumas moléculas de solvente que, apesar não estarem directamente ligados na primeira esfera de coordenação, permanecem próximas do metal paramagnético por meio de pontes de hidrogénio com o ligando, que constitui a contribuição da segunda esfera de hidratação na relaxividade e que pode ser descrita pela mesma teoria que o termo de esfera interna, mesmo se a simetria não for esférica. No entanto este termo é muitas vezes incluído na esfera externa.

Tendo em conta que o termo de esfera interna é o dominante de  $r_1$  e onde se pode otimizar a relaxividade do agente de contraste, só será discutido este termo para simplificação. O termo de relaxividade da esfera interna é linearmente proporcional ao número de hidratação ( $q$ ). No exemplo da Figura 1.11 o complexo é mono hidratado ( $q= 1$ ). Teoricamente quanto maior o número de hidratação, maior será a relaxividade, no entanto, o aumento de  $q$  compromete a estabilidade termodinâmica do complexo. Existem alguns exemplos de complexos de  $Gd^{3+}$  com  $q=2$  com constantes de estabilidade termodinâmica elevadas, tais como como derivados de GdHOPO (hidroxipiridinonato)<sup>47</sup> e GdAAZTA (ácido 6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepinetetraacetico)<sup>48</sup>. Para além do número de hidratação, temos de levar em conta a distância entre o próton da água coordenado na esfera interna e o ião metálico central, a constante de troca de água  $1/\tau_m$ , onde  $\tau_m$  é o tempo de vida da água na esfera interna, o tempo de correlação rotacional  $\tau_R$ , que corresponde à difusão do complexo, e os tempos de relaxação de spin electrónico longitudinal e transversal,  $T_{1e}$  e  $T_{2e}$ . Todos estes três processos modulam o campo magnético flutuante responsável pela relaxação protónica. O termo de esfera interna pode ser escrito como:

$$\frac{1}{T_1^S} = \frac{cq}{55.5} \frac{1}{T_{1m} + \tau_m} \quad (1.13)$$

onde  $c$  é a concentração molal do agente,  $1/T_{1m}$  é a constante de relaxação protónica da água coordenada que compreende os mecanismos escalar (ou de contacto, SC do inglês *Scalar*) e de dipolo-dipolo (DD) em que ambos os termos são dependentes do campo magnético:

$$\frac{1}{\tau_{1m}} = \frac{1}{T_1^{DD}} + \frac{1}{T_1^{SC}} \quad (1.14)$$

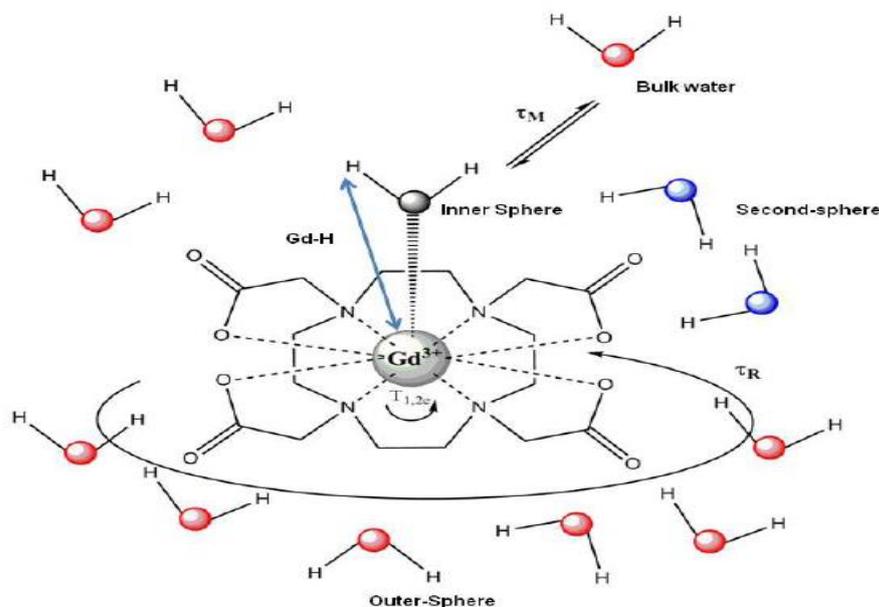
O termo escalar para complexos de  $Gd^{3+}$  é negligenciável, sendo a relaxação protónica da água coordenada determinada pelo mecanismo dipolo-dipolo. Este termo é dependente da reorientação do vector do spin nuclear em função do vector do spin electrónico, pela variação da orientação do spin electrónico e pela constante de troca da molécula de água coordenada:

$$\frac{1}{T_1^{DD}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r_{GdH}^2} S(S+1) \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \left[ 7 \frac{\tau_{c2}}{1+\omega_S^2 \tau_{c2}^2} + 3 \frac{\tau_{c1}}{1+\omega_I^2 \tau_{c1}^2} + 4\tau_{c1} \right] \quad (1.15)$$

onde  $\gamma_I$  é a constante giromagnética nuclear,  $g$  é o factor electrónico,  $\mu_0$  é o magneton de Bohr,  $r_{GdH}$  é distância do próton ao spin electrónico,  $S$  é o número quântico de spin total do ião paramagnético,  $\omega_S$  é a frequência de Larmor electrónica,  $\omega_I$  é a frequência de Larmor nuclear e  $\tau_{ci}$  é o tempo de correlação da interacção dipolar. O tempo de correlação é dependente do tempo de correlação rotacional,  $\tau_R$ , dos tempos de relaxação longitudinal e transversal de spin electrónico,  $T_{1e}$  e  $T_{2e}$ , e da constante de troca de molécula água,  $\tau_m$ :

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{T_R} + \frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{T_{2e}} + \frac{1}{\tau_m}, \text{ onde } i = 1,2 \quad (1.16)$$

Foi aqui descrita nos seus contornos gerais a principal teoria que explica a relaxividade de agentes de contraste baseada em  $Gd^{3+}$  na relaxação longitudinal, tendo sido usado aproximações simples sem entrar em aspectos mais complexos<sup>19,49</sup>.



**Figura 1.11-** Representação esquemática dos parâmetros que influenciam a relaxividade. O exemplo apresentado é um  $Gd^{3+}$ -DOTA em solução aquosa (o oxigênio dessas moléculas está a vermelho) como uma molécula de água coordenada (o oxigênio dessa molécula está a preto), com uma segunda esfera de hidratação (o oxigênio dessas moléculas de água está a azul) (retirado da referência 49).

## 1.3 Imagiologia Óptica

### 1.3.1 Princípios de Fotofísica e Luminescência

A fluorescência é um fenómeno de luminescência molecular em que após a excitação ocorre a emissão de um fóton durante o processo de desactivação do estado excitado para o estado fundamental da mesma multiplicidade spin (normalmente o singlete de menor energia, ( $S_1$ ) para o estado singlete fundamental ( $S_0$ )). Quando a emissão é entre dois estados de multiplicidade de spin diferentes é chamado de fosforescência. Após a absorção de um fóton, o electrão é excitado para um nível electrónico singlete excitado ( $S_N$ ). Depois deste processo, existem processos de relaxação não radiativos (ex: relaxação vibracional ou por conversão interna) que provocam a desactivação do electrão até ao nível excitado singlete de menor energia ( $S_1$ ). A partir deste nível  $S_1$ , o processo de decaimento para o estado fundamental ( $S_0$ ) pode

ocorrer de várias formas que competem entre si, os processos de conversão intersistemas, conversão interna, podendo ainda ocorrer a fluorescência<sup>50</sup>.

O processo de conversão intersistemas ocorre quando a molécula passa de um estado singlete excitado para um estado tripleto devido à mudança de spin do electrão, estando envolvido nos processos de fosforescência, em que há emissão de radiação do estado tripleto ( $T_1$ ) para o estado fundamental ( $S_0$ ). Os processos de relaxação vibracional são referentes à transferência de energia para o solvente, sendo portanto um processo não radiativo. Pode ainda haver um processo não radiativo de conversão interna do estado  $S_1$  para um nível vibracional do estado fundamental  $S_0$ , dado ser uma transição entre dois estados com a mesma multiplicidade que é permitido por spin e por ser entre dois níveis isoenergéticos. Por último, pode ocorrer fluorescência, em que há um decaimento do electrão do nível  $S_1$  para o nível de energia do estado fundamental ( $S_0$ ), acompanhado da emissão de um fóton. Esta radiação tem comprimento de onda superior, ou seja, de menor energia do que a radiação absorvida, decorrentes dos processos de relaxação do nível de energia  $S_N$  para o nível  $S_1$  em que houve perdas de energia e, portanto, o comprimento de onda da radiação emitida será maior. Este desvio no comprimento de onda é chamado de desvio de Stokes. Estes processos de desactivação do estado excitado para o estado fundamental são caracterizados por um tempo de vida ( $\tau$ ) e por uma constante cinética de decaimento ( $k = 1/\tau$ ) em que a eficiência de cada um dos processos de decaimento do estado excitado para o estado fundamental é caracterizado por um rendimento quântico ( $\Phi$ ). Estes processos fotofísicos estão ilustrados no diagrama de Jablonski (Figura 1.12)<sup>50</sup>.

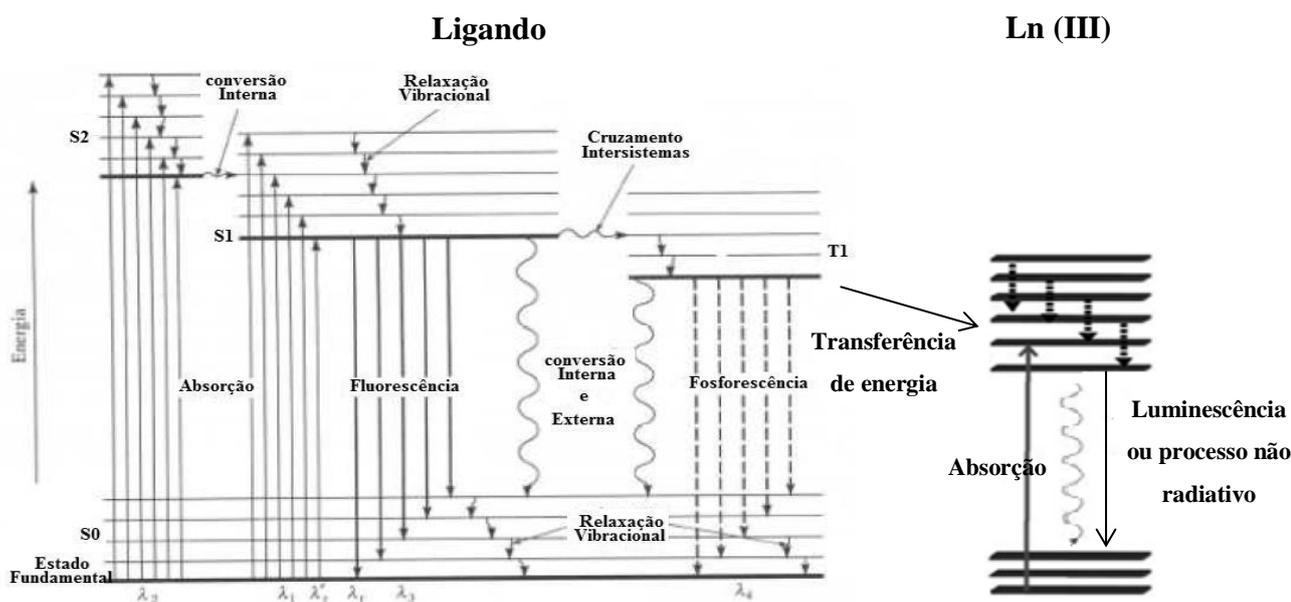
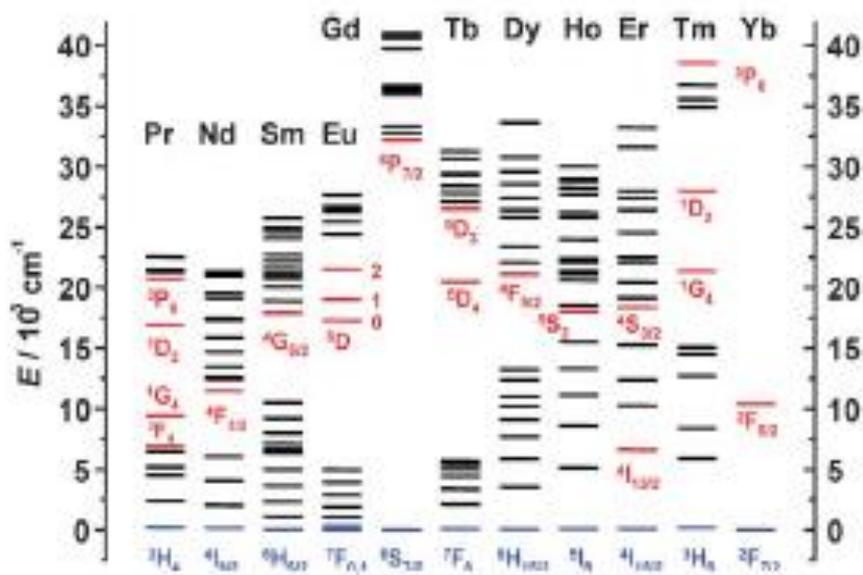


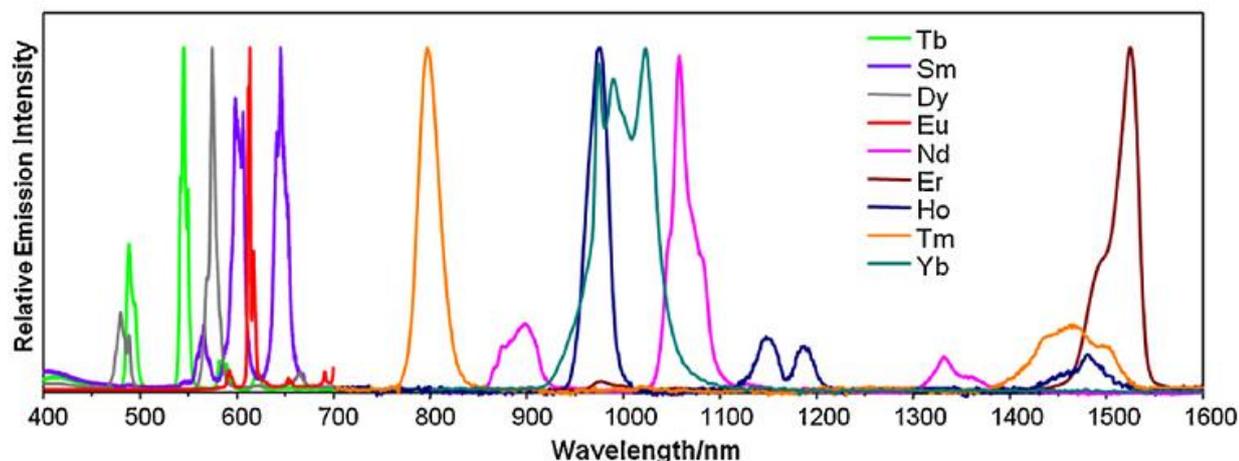
Figura 1.12 – Diagrama de Jablonski ilustrando os vários processos fotofísicos que podem ocorrer.

Experimentalmente a fluorescência pode ser estudada de duas formas: medidas em estado estacionário e em estado resolvido no tempo (estado dinâmico). Quando se está a visualizar a fluorescência com recurso a um fluorímetro, a amostra é iluminada continuamente com um feixe de luz e a intensidade ou espectro de emissão são registados, correspondendo à medição em estado estacionário. No segundo caso, são usados pulsos de luz, ou luz modulada, que permite avaliar tempos de vida de decaimento<sup>50</sup>.

A luminescência dos iões da série dos lantanídeos advém das suas características provenientes da sua configuração electrónica [Xe]4f<sup>n</sup>(n= 0-14) que é responsável por um grande número de estados electrónicos [14!/n!(14-n)!]<sup>51,52</sup> (Figura 1.13). Estes estados electrónicos são caracterizados por 3 números quânticos, o número quântico de acoplamento spin-spin (S), o número quântico de acoplamento orbita-orbita (L) e o número quântico de acoplamento spin-orbita (J), com os níveis de energia bem definidos e com pouca sensibilidade ao ambiente químico, devido à blindagem das orbitais 4f pelas subcamadas 5s<sup>2</sup>4p<sup>6</sup> preenchidas. As transições 4f-4f são proibidas por simetria (regra de Laporte), resultando em picos de fraca intensidade, estreitos e característicos de cada ião Ln<sup>3+</sup>, envolvendo estados excitados com tempos de vida longos, na ordem dos micro aos milissegundos, permitindo a realização de experiências resolvidas no tempo possibilitando uma melhor discriminação da luminescência de fundo, como a fluorescência que tem um tempo de vida na ordem nos nanosegundos. Por exemplo, as transições electrónicas dos iões Eu<sup>3+</sup> e Tb<sup>3+</sup> ocorrem no UV/Vis, enquanto nos iões Er<sup>3+</sup> e Yb<sup>3+</sup>



**Figura 1.13** – Diagrama parcial dos níveis de energia para os iões lantanídeos Ln<sup>3+</sup>. Os níveis luminescentes principais de cada ião metálico estão a vermelho e o nível fundamental indica-se a azul (retirado da referência 52).



**Figura 1.14** – Espectros de emissão normalizados de complexos luminescentes de íons lantanídeos  $\text{Ln}^{3+}$  em solução, ilustrando as bandas de emissão estreitas e a sua sobreposição mínima, cobrindo a região do visível e do infravermelho próximo (retirado da referência 53).

ocorrem no infravermelho próximo (Figura 1.14)<sup>53</sup>. O grande problema da luminescência dos íons lantanídeo ( $\text{Ln}^{3+}$ ) é o facto do rendimento quântico intrínseco de luminescência ser baixo<sup>54</sup>.

Para ultrapassar a baixa luminescência intrínseca dos íons  $\text{Ln}^{3+}$ , é possível complexar estes íons com compostos orgânicos, onde a excitação na região de absorção do ligando orgânico (antena) leva à luminescência do metal. Isto acontece porque parte da energia absorvida pelo ligando orgânico (doador), que irá actuar como antena, é transferida para os níveis excitados do  $\text{Ln}^{3+}$  (aceitador) dando origem à emissão de luminescência a partir dos estados excitados do metal, sendo este efeito denominado de “efeito de antena” (Figura 1.12).

Há dois mecanismos principais de transferência de energia que podem estar envolvidos, com a conseqüente luminescência do metal como a troca simultânea de dois electrões entre o doador e aceitador (mecanismo Dexter) e mecanismos envolvendo dipolo-dipolo ou dipolo-multipolo (mecanismo Förster). O mecanismo comum observado refere-se à absorção do ligando, em que depois ocorre um cruzamento intersistemas levando o ligando para um estado tripleto, e a partir deste nível de energia do ligando à transferência de energia para os níveis excitados do metal (Figura 1.12). Alternativamente outros estados energéticos podem estar envolvidos como transferência de carga intra-complexo do ligando para o metal (TCLM), estados 4f5d ou transferência de carga do metal para o ligando (TCML) de cromóforos contendo metais de transição (com electrões nas orbitais d) como  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Re}^{1+}$ ,  $\text{Os}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Ir}^{3+}$  ou  $\text{Pt}^{2+}$ , sendo estes íons usados principalmente para excitar íons lantanídeos emissores no infravermelho próximo<sup>51</sup>.

Os íons Lantanídeos estão envolvidos essencialmente em três tipos de transições TCLM, 4f-5d, e 4f-4f, sendo os dois primeiros de ocorrência a energias elevadas e portanto só as

transições 4f-4f são relevantes. Alguns iões de Lantanídeos são fluorescentes ( $\Delta S=0$ ), como o itérbio ( $\text{Yb}^{3+}$ ), em que a transição ocorre do estado excitado  $^2F_{5/2}$  para o estado fundamental  $^2F_{7/2}$ , e outros iões são fosforescentes ( $\Delta S>0$ ) como o  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  em que a emissão ocorre a partir do estado excitado  $^5D_0$  e  $^5D_4$ , respectivamente, para os vários níveis do estado fundamental  $^7F_j$  destes metais<sup>55</sup>. A emissão de fotões destes metais é essencialmente devida a dois tipos de transições, transições de dipolo magnético permitida por paridade (DM, regras de selecção:  $\Delta L=0$ ,  $\Delta J=0, \pm 1$  no entanto a transição de  $J=0$  para  $J'=0$  é proibida) e transição de dipolo eléctrico proibida por paridade (DE; regras de selecção:  $\Delta L, \Delta J \leq 6$ , se  $J$  do estado fundamental ou do estado excitado for igual 0 a regra de selecção é  $\Delta L, \Delta J=2,4,6$ , novamente a transição de um  $J=0$  para  $J'=0$  é proibida). No entanto, quando um ião  $\text{Ln}^{3+}$  é colocado num ambiente químico, interacções não centrossimétricas permitem a mistura de estados electrónicos de paridades opostas levando a que as transições DE sejam parcialmente permitidas, sendo chamadas de transições de dipolo eléctrico induzidas (ou forçadas). As intensidades de algumas destas transições são particularmente sensíveis ao ambiente e são apelidadas de “transições hipersensíveis”, como é o caso da transição  $^7F_2 \leftarrow ^5D_0$ , no  $\text{Eu}^{3+}$ . No entanto a maioria das transições electrónicas nos iões metálicos da série dos lantanídeos tem ambas as contribuições, DE e DM<sup>51</sup>.

A eficiência de transferência de energia e a intensidade da subsequente emissão dependem do ligando e do ião metálico em questão. Dependem em particular da diferença de energia entre o estado tripleto do ligando e dos níveis excitados aceitadores do ião, da distância de separação entre o ligando e o ião metálico e da capacidade do ligando de blindar o ião metálico do efeito de supressão pelos osciladores das moléculas de água do solvente na esfera interna<sup>56</sup>.

### 1.3.2 Sondas para Imagiologia Óptica

Como referido na secção 1.1, a Imagiologia Óptica tem uma sensibilidade na ordem do picomolar e, quando combinada com uma técnica de resolução elevada como IRM ou TC, torna-se uma técnica versátil em Imagiologia. No entanto, uma das grandes desvantagens da Imagiologia Óptica tem a ver com o facto da luz utilizada não conseguir penetrar em tecidos mais profundos, tornando a técnica restrita para tecidos mais superficiais.

Os agentes de contraste ópticos podem ser usados em duas modalidades. Uma é baseada em fluorescência, em que é efectuada irradiação contínua a um comprimento de onda específico

e são detectados os fótons emitidos, de energia inferior, provenientes da desactivação do estado excitado. A segunda modalidade é a Imagiologia Luminescente resolvida no tempo, que faz uso da detecção do sinal de por exemplo de iões metálicos luminescentes, com tempos de vida longos, na ordem dos milissegundos, em que com instrumentação adequada, é efectuada a recolha do sinal com um tempo de atraso, evitando a radiação fluorescente de fundo que tem tempo de vida na ordem dos nanosegundos. Como referindo na secção 1.2.1, os iões lantanídeos têm baixo rendimento quântico intrínseco, pelo que se torna necessário conjugar no quelato um cromóforo que consiga estimular a povoação dos estados excitados do ião metálico.

Há muito que são estudados os lantanídeos que emitem no visível como o  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ . No entanto, recentemente os iões lantanídeos emissores no infravermelho próximo, como por exemplo o  $\text{Ib}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$  e  $\text{Pr}^{3+}$ , têm despertado grande interesse, por ser possível desenvolver ligandos orgânicos que absorvam a maiores comprimentos de onda, evitando excitar constituintes biológicos como a hemoglobina, e tornando possível a detecção de sinal em tecidos mais profundos uma vez que dos 650 a 1350 nm (janela terapêutica), os tecidos humanos têm maior transmissão de luz. Uma outra vantagem interessante destas sondas é o facto de se obter melhor resolução pelo facto da radiação infravermelho sofrer menor difracção<sup>57-59</sup>.

## 1.4 Imagiologia na doença de Alzheimer

### 1.4.1 Doença de Alzheimer de um ponto vista bioquímico

A doença de Alzheimer é a maior causa de incapacidade e de morte no idoso e foi pela primeira vez caracterizada há cerca de um século atrás por Alois Alzheimer e Gaetano Persuini<sup>60,61</sup>. A sua prevalência é de 5% aos 65 anos, aumentando gradualmente, atingindo valores aproximados de 30% para idades superiores a 85 anos. A doença de Alzheimer caracteriza-se pela reduzida actividade cognitiva, incluindo debilidade no julgamento, decisão e orientação, falhas na memória, acompanhada de distúrbios comportamentais e debilidade na linguagem, em fases avançadas da doença<sup>62</sup>.

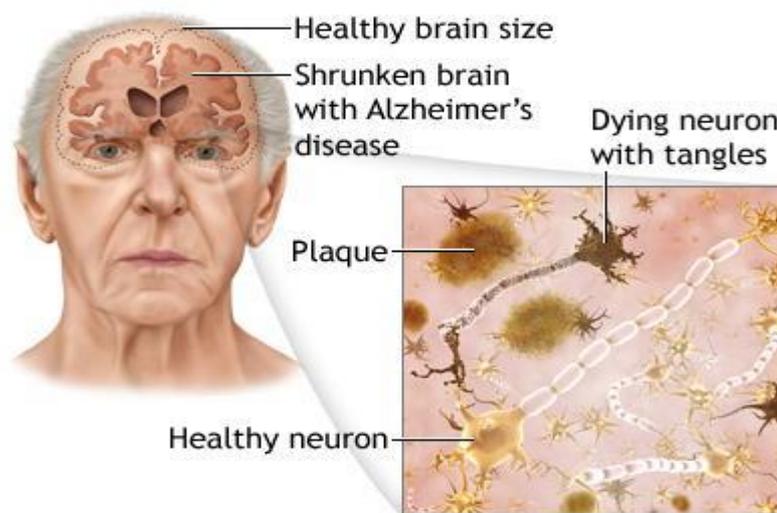
As duas maiores contribuições neuropatológicas na doença de Alzheimer são os emaranhados de neurofibrilas intracelulares (do inglês *Neurofibril Tangles*, NFT) e as placas extracelulares  $\beta$  amilóides ( $\text{A}\beta$ )<sup>63</sup> (Figura 1.15). O termo “amilóide” foi primeiramente usado por Virchow<sup>64</sup> para descrever uma substância agregada encontrado no fígado de um paciente falecido, que era corada com iodo, tendo associado este fenómeno à presença de amido. Apesar

da associação errada, verificado na altura, entre estes agregados e o amido, o termo é ainda usado, e actualmente estão identificadas 27 patologias associadas a depósitos de fibras amilóides de proteínas normalmente solúveis em solução<sup>65,66</sup>.

A hipótese da cascata amilóide que considera as placas A $\beta$  como responsáveis pela morte neuronal, tem sido a ideia dominante na investigação da doença de Alzheimer. Segundo esta hipótese, as placas amilóides surgem cerca de 10 a 20 anos antes do primeiro sintoma clínico da doença de Alzheimer<sup>67</sup>. Esta hipótese tem sido apoiada por evidências de mecanismos citotóxicos provocados pelas placas A $\beta$  como a desregulação da homeostasia do cálcio<sup>68</sup>, processos de inflamação<sup>69</sup> e stresse oxidativo<sup>70</sup>.

Os NFT's são agregados da proteína Tau que na doença de Alzheimer se encontra no estado hiperfosforilado, dando origem a depósitos intracelulares, que surgem cerca de dois anos após o aparecimento das placas A $\beta$ . A proteína Tau é um dos componentes dos microtúbulos celulares<sup>71</sup>.

As placas  $\beta$  amilóides são depósitos extracelulares insolúveis de péptidos que bloqueiam as transmissões nervosas e provocam neurodegeneração, sendo o maior componente destas placas os péptidos A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub>, que provêm da clivagem da proteína precursora amilóide (APP), que na doença de Alzheimer está sobreexpressa. No entanto têm surgido indicações que a toxicidade na doença de Alzheimer seja causada por agregados intermediários tóxicos solúveis, tais como oligómeros e protofibrilhas, e não pelas placas A $\beta$  extracelulares insolúveis. Esta toxicidade dos agregados intermédios é possivelmente devida à sua interacção com a membrana

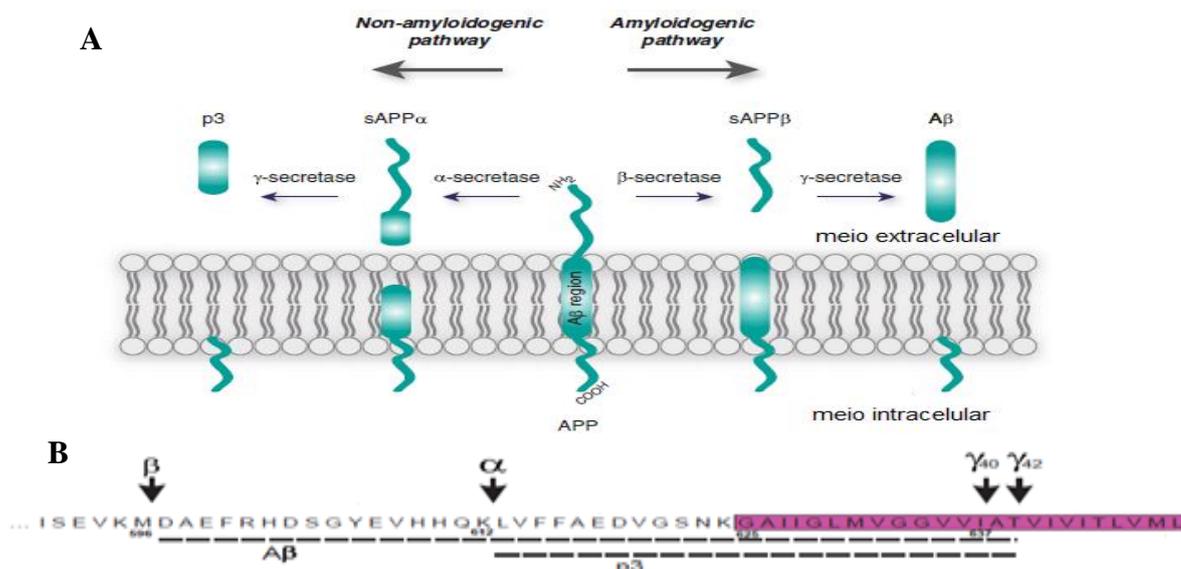


**Figura 1.15-** Esquema ilustrando o encolhimento do cérebro em doentes de Alzheimer evidenciando as duas maiores contribuições neuropatológicas, as placas amilóides e os emaranhados de neurofibrilass intracelulares. (retirado de <https://www.premedhq.com/alzheimers-disease>, 07/05/2015).

biológica, perturbando o seu normal funcionamento. Estes novos dados sugerem uma revisão da hipótese da cascata amilóide<sup>72-74</sup>.

A APP é uma proteína integrada na membrana que tem um grande domínio extracelular, um pequeno domínio intracelular e um domínio transmembranar hidrofóbico<sup>75</sup>. O gene que codifica esta proteína encontra-se no cromossoma 21, tendo sido demonstrada uma conexão entre a Síndrome de Down e o desenvolvimento de uma neuropatologia semelhante à doença de Alzheimer<sup>76</sup>. A APP sofre clivagem proteolítica progressiva começando por ser clivada ou pela enzima  $\alpha$ -secretase, num processo não amiloidogénico, ou pela  $\beta$ -secretase com a consequente formação de péptidos A $\beta$  (Figura 1.16). Numa segunda etapa a clivagem é realizada pela  $\gamma$ -secretase, em ambos os casos. Se a APP é primeiro clivada pela  $\alpha$ -secretase, que cliva no meio da sequência dos resíduos que formam os péptidos A $\beta$ , não irá haver a formação destes péptidos, o que previne a amiloidogénese associada à doença de Alzheimer. Esta clivagem pela  $\alpha$ -secretase forma um fragmento que fica retido na membrana  $\alpha$ -C-terminal ( $\alpha$ -CTFs) e um grande fragmento do ectodomínio N-terminal da APP (sAPP $\alpha$ ) que é libertado para o meio extracelular. O fragmento CTF é subsequentemente clivado pela  $\gamma$ -secretase produzindo um curto fragmento, o p3<sup>77</sup>. A  $\beta$ -secretase cliva a APP no primeiro resíduo do N-terminal dos péptidos A $\beta$  resultando na quebra e na libertação para o meio extracelular de quase todo o ectodomínio (sAPP $\beta$ ) e a geração de um fragmento retido na membrana  $\beta$ -C-terminal ( $\beta$ -CTFs)<sup>78</sup>. A  $\beta$ -secrease neuronal é chamada de enzima de clivagem do sítio  $\beta$  da APP (BACE-1) e é uma enzima do tipo aspartil protease transmembranar<sup>79</sup>. No entanto existe uma segunda enzima  $\beta$ -secretase (BACE-2), que é pouco expressa, mas que cliva a proteína APP no sítio da  $\alpha$ -secretase, evitando desta forma a produção de péptidos A $\beta$ . No entanto é a enzima BACE-1 que está envolvida na doença de Alzheimer sendo a enzima tipicamente apelidada de  $\beta$ -secretase<sup>78</sup>. O segundo evento proteolítico envolve a clivagem pelo complexo enzimático  $\gamma$ -secretase do fragmento intramembranar  $\beta$ -CTFs, da mesma forma que no caso anterior, libertando para o meio extracelular o péptido A $\beta$ . Os principais sítios de clivagem da  $\gamma$ -secretase são nas posições 40 e 42 dos péptidos A $\beta$  (Figura 1.16)<sup>77</sup>. Tem sido considerado que a clivagem pela  $\alpha$ -secretase é o processo fisiológico normal do metabolismo da APP, no entanto, foi descoberto que a produção dos péptidos A $\beta$  também ocorre em condições fisiológicas normais, apesar de em menores concentrações, não sendo um processo exclusivamente patológico<sup>80</sup>.

A doença de Alzheimer é em 95% dos casos, esporádica. No entanto, em 5% dos casos é autossómica dominante<sup>62</sup>. As alterações genéticas que levam à doença familiar da doença de Alzheimer são as mutações nos genes que codificam a proteína APP<sup>81</sup> e nos genes que codificam as proteínas presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2)<sup>82,83</sup>, que são proteínas que fazem parte do complexo



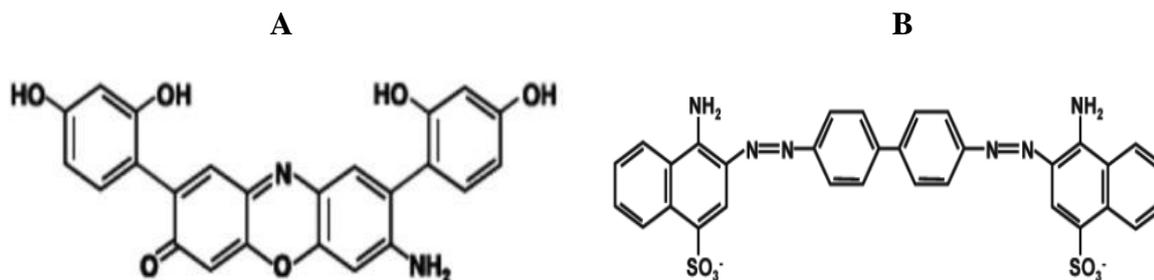
**Figura 1.16** –Metabolismo da proteína APP nos dois processos: amiloidogénico e não amiloidogénico **A**) (retirado da referência 77). Segmento dos resíduos da proteína APP com os sítios de clivagem das várias enzimas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase), com a marcação dos resíduos intramembranares a roxo **B**).

enzimático da  $\gamma$ -secretase<sup>84,85</sup>. No caso da doença de Alzheimer familiar o diagnóstico é facilmente obtido pela verificação das mutações nos cromossomas 1, 14 ou 21, associados aos genes da PS1, PS2 e APP respectivamente. No caso da doença de Alzheimer esporádica, apesar de já se ter identificado biomarcadores válidos para o seu diagnóstico (como é o caso da concentrações elevadas de péptido A $\beta$  e de proteína tau no líquido cerebrospinal, avaliação por IRM da presença de um hipocampo atrofiado, hipometabolismo de glicose avaliado por PET com <sup>18</sup>F-FDG), o diagnóstico definitivo é obtido por confirmação histopatológica, só possível *post mortem*, devido à necessidade de um corte histológico do tecido cerebral, com a utilização de um corante marcador das placas amiloides como o PiB (ver secção 1.4.2, Figura 1.18)<sup>86</sup>.

Na doença de Alzheimer tem sido detectada nas placas amilóides a existência de concentrações elevadas de Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>. Estes metais, sobretudo o Zn<sup>2+</sup>, promovem a agregação dos péptidos A $\beta$ , contudo formando agregados mais amorfos com menos fibras. O Zn<sup>2+</sup> liga-se às formas monoméricas dos péptidos A $\beta$  numa estequiometria de 1:1<sup>87,88</sup>.

O péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> adota uma estrutura compacta, parcialmente dobrada, com um centro hidrofóbico formando uma hélice 3<sub>10</sub>, que parece ser crucial no processo intermédio na fibrinogénese levando à formação de oligómeros, protofibrilas e fibrilas em equilíbrio, que têm sido associados a maior toxicidade na doença de Alzheimer<sup>89</sup>.

Identificar moléculas que inibem a agregação é uma abordagem interessante no desenvolvimento de novas terapias, tendo sido descritas algumas moléculas que inibem a agregação, como o lacmoide (Figura 1.17A) que foi comprovado por Abelein *et al.* que reduz a



**Figura 1.17** – Estrutura química do lacmoide **A**) e do vermelho do Congo **B**).

formação das fibras amilóides<sup>90</sup>. Um outro estudo realizado por Lendel *et al.* demonstrou que o vermelho do Congo (do inglês *Congo Red*, CR) (Figura 1.17B) induz a formação de agregados em folha  $\beta$ . No entanto, ele reduz a toxicidade *in vitro*, sugerindo que esta redução na toxicidade poderia ocorrer por outro mecanismo que aqueles em que inibem a formação de agregados com folha  $\beta$ . Este composto parece induzir a formação de tipos de agregados que são menos tóxicos, solubilizando as formas tóxicas oligoméricas e inibindo a sua interacção com os componentes celulares, tais como membranas<sup>91</sup>.

#### 1.4.2 Métodos de diagnóstico na doença de Alzheimer

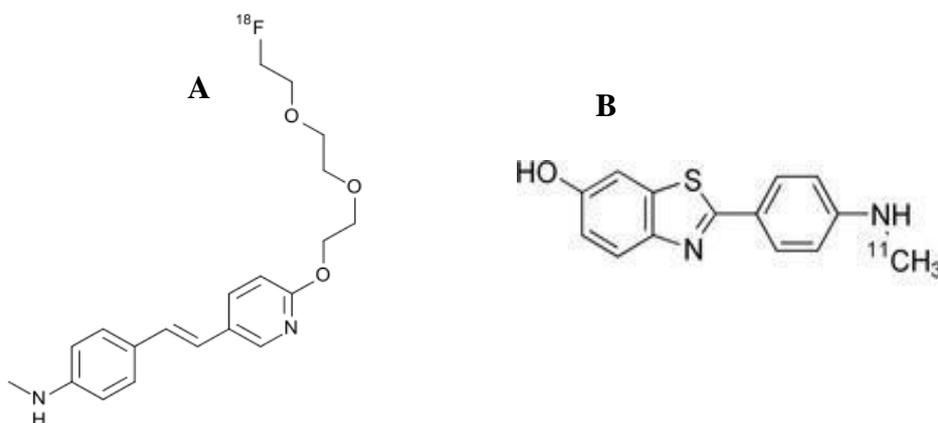
Actualmente o diagnóstico da doença de Alzheimer é principalmente baseado em testes cognitivos, podendo apenas ser detectado em fase avançada da patologia com evidente declínio da actividade cognitiva, sendo o diagnóstico definitivo realizado *post mortem*<sup>86</sup>. O desenvolvimento de agentes imagiológicos para detecção *in vivo* das placas amilóides é um desafio actual, que não só possibilitaria o diagnóstico precoce da doença como também a monitorização de novas estratégias terapêuticas.

O grande problema no desenvolvimento de sondas imagiológicas e de fármacos para actuarem no sistema nervoso central é o facto de estes xenobióticos terem enorme dificuldade em conseguir atravessar a barreira hemato-encefálica. Tem sido descrito que para um composto atravessar a barreira hemato-encefálica em quantidades suficientes tem de ter massa inferior a 500 Da e grande solubilidade lipofílica, experimentalmente medida como Log P que deve ser próximo a 2 ou superior<sup>92</sup>. Estas características enunciadas são uma derivação da regra dos 5, descrita por Lipinski originalmente para descrever fármacos administrados por via oral farmacologicamente activos<sup>93</sup>. Em alguns casos, como em tumores cerebrais, a barreira hemtoencefálica torna-se mais permeável e essas patologias podem ser detectadas por IRM com

o auxílio de agentes de contraste<sup>94</sup>. Artificialmente, a barreira hemaotencefálica pode ser enfraquecida com o recurso a soluções hiperosmóticas com manitol, composto vasoactivo, no entanto esta solução é tóxica. Outras estratégias para aumentar a permeabilidade da barreira hemato-encefálica visam a utilização de poliaminas naturais como putrescina, espermina e espermidina. Estas poliaminas ligadas covalentemente a proteínas como o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub>, demonstram aumentar a permeabilidade à barreira hemato-encefálica. Actualmente tem sido estudada a utilização de ultra-sons e micro-bolhas para abrir a barreira hemato-encefálica. Outras metodologias visam a utilização de agentes lipídicos solúveis, proteínas carregadoras ou ainda a associação de agente de contraste com proteínas que podem ser especificamente transportadas por receptores mediadores de endocitose e mecanismos de transcitose<sup>95</sup>.

Na última década, o maior avanço nesta área tem sido no desenvolvimento de sondas moleculares radiomarcadas para detecção por PET e SPECT, havendo alguns que se encontram em testes clínicos<sup>96-98</sup>. Os derivados de pequenas moléculas orgânicas, como os benzotiazóis, benzoxalatos e estilbenos, marcados com <sup>18</sup>F e <sup>11</sup>C, têm demonstrado boas propriedades ao nível de afinidade para aos agregados amilóides e na passagem da barreira hemato-encefálica, tendo sido extensivamente estudados como potenciais sondas para PET<sup>99-101</sup>. Florbetapir-<sup>18</sup>F foi o primeiro radiofármaco aprovado pela FDA (Food and Drugs Administration), em 2012, para a detecção específica de depósitos amilóides por PET<sup>102</sup>. Um outro radiofármaco muito usado na detecção da patologia é um derivado de tioflavina T marcado com <sup>11</sup>C, o reagente de Pittsburg B, que se encontra actualmente nos teste clínicos de fase III, usado como padrão para comparação com outros potenciais biomarcadores para detecção por PET (Figura 1.18)<sup>103</sup>. A detecção de placas amilóides humanas com o regente de Pittsburg B ([<sup>11</sup>C]PIB) e Florbetapir-<sup>18</sup>F por PET mostrou ser capaz de diferenciar doentes com risco de desenvolver a doença de Alzheimer daqueles que tinham um comprometimento cognitivo leve<sup>104,105</sup>.

Têm sido desenvolvidas algumas sondas marcadas com <sup>99m</sup>Tc para serem usadas em SPECT. A utilização de <sup>99m</sup>Tc traz a vantagem de estar muito mais disponível que <sup>11</sup>C e <sup>18</sup>F gerados por ciclotrão. Alguns exemplos remetem para os derivados de bifenil, benzotiazol anilina, chalcona e outras pequenas moléculas orgânicas com comprovada afinidade para os agregados amilóides e com alguma capacidade de passagem pela barreira hemato-encefálica<sup>104-106</sup>.



**Figura 1.18-** Exemplos dos radiofármacos usados para detecção das placas amilóides por PET, Florbetapir-18F® A) e PiB-11C® B).

O desenvolvimento de sondas para a detecção da doença de Alzheimer por IRM tem sido muito menos bem-sucedida que os radiofármacos para PET. De entre algumas dificuldades no desenvolvimento destes agentes de contraste cita-se o facto de IRM ser uma técnica muito menos sensível que PET e SPECT. No entanto, há algumas vantagens no uso de sondas para IRM que levam a que a investigação siga essa direcção comparativamente aos radiofármacos para PET e SPECT, nomeadamente a não utilização de sondas radioactivas e o facto de ter melhor resolução providenciando informação anatómica que pode ser importante na caracterização da localização precisa dos depósitos amilóides. A melhor resolução de IRM permitiria avaliar os danos provocados pelos depósitos amilóides, o que seria importante no estudo de novas terapêuticas contra a patologia. No entanto, como em IRM não é feita a detecção do agente de contraste e sim o aumento da velocidade de relaxação dos prótons da água na proximidade do ião metálico paramagnético, não é possível correlacionar a concentração local do ião paramagnético com o sinal de IRM em meio biológico, devido à influência dos prótons da água em meio biológico ser diferente dos estudos realizados *in vitro*. No entanto, especialistas na área consideram possível a detecção com 1-10  $\mu\text{M}$  de agente de contraste em cérebro humano por IRM com relaxividades equivalentes aos agentes de contraste comerciais ( $3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Desta forma, a densidade do alvo (placas amilóides) e a relaxividade do agente de contraste influencia a quantidade necessário deste para poder ser detectado. Tendo em conta que a estequiometria, em condições de saturação, entre o péptido A $\beta$  e o agente de contraste é de 1:1 e que a concentração do péptido A $\beta$  no córtex frontal de doentes de Alzheimer é entre 1-3  $\mu\text{M}$ , considerando que relaxividade do agente de contraste quase que duplica quando ligado ao péptido A $\beta$ , devido ao aumento do tempo de correlação rotacional ( $\tau_r$ ), é esperado que o agente de contraste com relaxividades na ordem dos  $10 \pm 5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  tenham grande potencial para detectar agregados amilóides *in vivo* desde que

atinjam o alvo<sup>109</sup>. Na ausência de agente de contraste as placas amilóides podem ser detectadas por IRM *in vivo* numa fase avançada da doença, devido à acumulação de ferro nas placas que provoca um sinal hipointenso devido à redução dos tempos de relaxação transversal  $T_2$  e  $T_2^*$ . Porém para a obtenção destas imagens são necessários campos magnéticos muito intensos (7 T ou mais) e longos períodos de aquisição, tornando esta metodologia impraticável na prática clínica<sup>110</sup>.

Vários agentes de contraste baseados em  $Gd^{3+}$  têm sido descritos para a detecção de agregados amilóides. O complexo  $Gd^{3+}$ -DTPA foi primeiramente conjugado com o péptido  $A\beta_{1-40}$ , conhecido pela sua grande afinidade por agregados amilóides<sup>111</sup>. Outras abordagens com o complexo  $Gd^{3+}$ -DTPA visaram a conjugação com o péptido  $A\beta_{1-40}$  incorporado com putrescina<sup>112</sup>, ou ainda com a conjugação do derivado truncado, o péptido  $A\beta_{1-30}$ <sup>113</sup>, tendo estes sido investigados por injeção intravenosa em ratos transgênicos APP/PS1. A estratégia adoptada pelo nosso grupo de investigação, visa a conjugação de um complexo de  $Gd^{3+}$  termodinamicamente e cineticamente estáveis, como o DOTA ou o DO3A, com o reagente de Pittsburg B, uma molécula pequena com alta afinidade para as placas amilóides. As propriedades físico-químicas desses conjugados, como a relaxividade, lipofilicidade e afinidade às placas amilóides, são modeladas pela variação do espaçador e da carga total do complexo<sup>114-116</sup>. Têm sido reportados na literatura alguns exemplos similares de complexos conjugados com o PiB, tendo todos estes complexos dificuldade em atravessar a barreira hemato-encefálica em concentração suficientemente elevada para a sua detecção *in vivo*<sup>109</sup>. Tem sido também estudada a utilização de nanopartículas de óxido de ferro conjugadas com o péptido  $A\beta_{1-42}$ , que demonstram capacidade de ligação aos agregados amilóides, no entanto apresentam o mesmo problema de fraca permeabilidade à barreira<sup>117</sup>. Até à data, não existe nenhum agente de contraste eficiente para detecção *in vivo* por IRM de depósitos amilóides. Todos os estudos realizados *in vivo* que demonstram a detecção das placas amilóides requerem a co-injeção do agente de contraste com manitol, para abrir momentaneamente a barreira hemato-encefálica, o que impede a sua utilização em humanos por ser um procedimento tóxico e como tal novos agentes de contraste têm de ser desenvolvidos com maior capacidade de permeabilização da barreira.

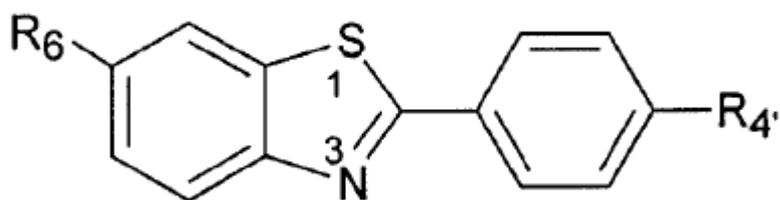
## 1.5 Objectivos da Tese

O trabalho apresentado nesta dissertação de Mestrado é o resultado de um trabalho multidisciplinar, com o objectivo de estudar sondas vectorizados para detecção de agregados amilóides da doença de Alzheimer *in vivo* e de forma não invasiva. Como referido anteriormente, o desenvolvimento destas sondas é de extrema importância na sociedade actual, com o crescimento do número de pessoas diagnosticadas com a patologia associado ao aumento da esperança média de vida. No entanto, há pouca disponibilidade de técnicas que permitem o diagnóstico precoce da doença, não havendo sondas de IRM disponíveis para a visualização *in vivo* das placas amilóides.

O desenvolvimento de sondas imagiológicas multimodais tem revelado ser uma abordagem interessante ao problema, uma vez que, com a escolha adequada do metal, é possível escolher a modalidade imagiológica usando o mesmo ligando, como por exemplo a utilização de  $Gd^{3+}$  para IRM,  $^{111}In^{3+}$  e  $^{67}Ga^{3+}$  para SPECT,  $^{68}Ga^{3+}$  para PET ou  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$  e  $Yb^{3+}$  para Imagiologia Óptica no visível ou no infravermelho próximo.

Com esta ideia foi desenvolvida uma sonda que tivesse capacidade de coordenação com diferentes iões metálicos e que tivesse uma afinidade específica pelas placas amilóides. As sondas desenvolvidas correspondem a derivados de DOTA ou DO3A com capacidade de se coordenar com vários iões metálicos trivalentes, com grande estabilidade termodinâmica e cinética (Tabela 1.4), conjugadas com um análogo de PiB, um fenil-benzotiazol substituído na posição 4 e 6 (Figura 1.19), com comprovada afinidade pelos agregados amilóides, com uma constante de inibição na ordem de  $1\text{ nM}^{118}$ , e por um espaçador a ligar os dois. A escolha dos substituintes na posição 4 e 6 do fenil-benzotiazol (Figura 1.19) foi feita de acordo com estudos efectuados que demonstram quais os substituintes no fenil-benzotiazol que provocam maior permeabilidade à barreira hemato-encefálica<sup>119</sup>. A escolha do espaçador e do macrociclo permite modular propriedades físico-químicas importantes dos complexos como a lipofilicidade, relaxividade e eficiência de transferência de energia do ligando para o ião metálico.

No presente trabalho foram estudadas sondas, usando complexos de dois ligandos, genericamente apelidados de L4 e L5. Com o ligando L4 foi realizado um estudo complementar ao anteriormente publicado<sup>120</sup>, utilizando complexos com os iões trivalentes  $Ln^{3+}$  ( $La^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$  e  $Tb^{3+}$ ), principalmente com possível uso em Imagiologia Óptica. Com o ligando L5 foi realizado um estudo completo dos respectivos complexos de  $Ln^{3+}$  ( $La^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$  e  $Gd^{3+}$ ) ao nível da determinação das propriedades físico-químicas, estudo de interacção com o péptido  $A\beta_{1-40}$  e seu



**Figura 1.19-** Estrutura do fenil-benzotiazol substituído na posição 4 e 6.

uso como sonda em IRM e Imagiologia Óptica. Os resultados obtidos sempre que possível foram comparados com os resultados anteriormente obtidos e publicados usando as sondas desenvolvidas anteriormente pelo grupo de investigação (ligandos L1, L2, L3 e L4)<sup>114-116,120</sup> e comparados ainda com a literatura.

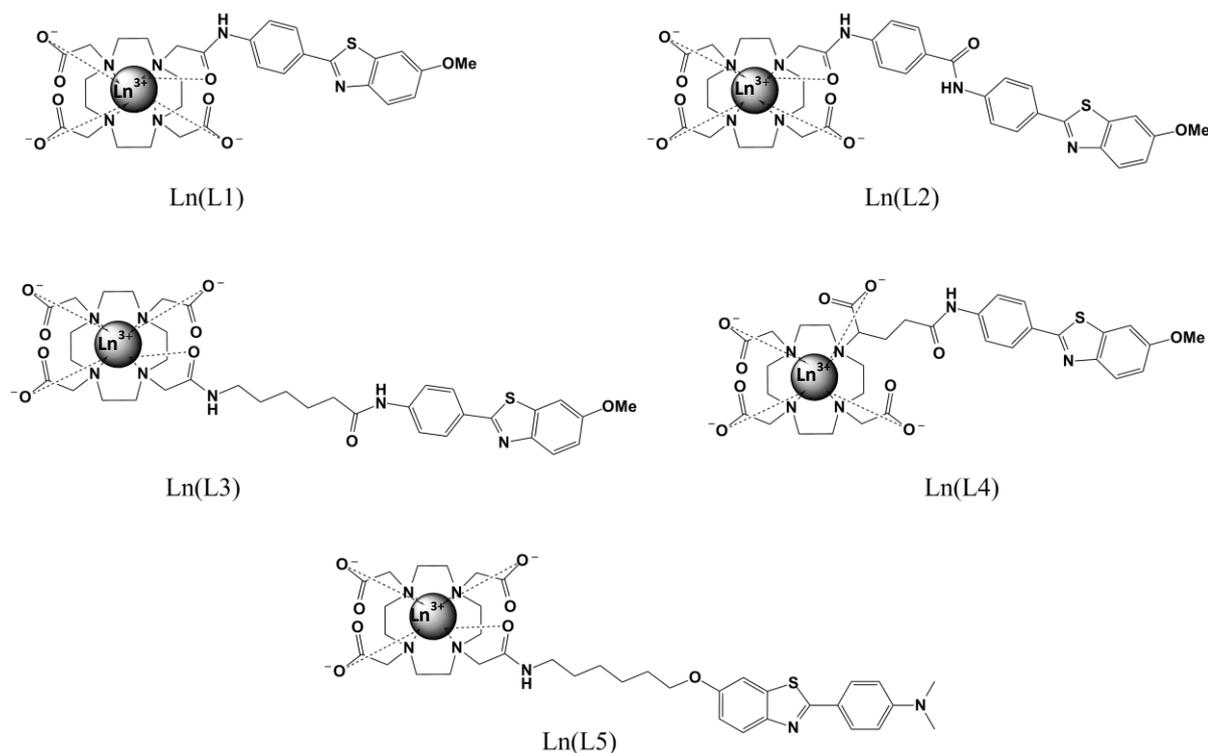
Os complexos formados pelos ligandos L1, L2, L3, L4 e L5 estão apresentados na Figura 1.20. Os ligandos L1, L2 e L3 são da família dos complexos com DO3A, conjugado com o fenil-benzotiazol pela posição 4 formando uma amida e substituído por um grupo metóxido na posição 6, e os complexos formados com iões metálicos trivalentes são neutros. A diferença nestes ligandos está no espaçador, a partir do qual provocam diferenças nas propriedades físico-químicas. O ligando L4 é um derivado do ligando DOTA, o H<sub>5</sub>DOTAGA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-glutarico-1,4,7-triacético) substituído no átomo C $\alpha$  de um dos braços metileno carboxilato pelo espaçador etileno que conjuga o mesmo derivado de fenil-benzotiazol que nos ligandos L1, L2 e L3. Este ligando foi desenvolvido com o intuito de aumentar a estabilidade do complexo metálico, mudando a carga para uma unidade negativa, e diminuindo a coordenação do oxigénio da amida ao centro metálico que afecta negativamente a velocidade de troca da água coordenada provocando uma diminuição da relaxividade protónica, que é uma propriedade importante em IRM. O ligando L5 é da família dos complexos neutros com o macrociclo DO3A, em que o fragmento fenil-benzotiazol é invertido e conjugado pela posição 6, formando um éter e substituído na posição 4 por uma amina secundária. O espaçador longo do ligando L5, uma cadeia hidrocarbonada saturada de 6 carbonos, foi desenvolvido com o intuito de aumentar a lipofilicidade do complexo.

No Capítulo 2 é descrita a forma de obtenção dos complexos bem como as respectivas estratégias de quantificação. Também foi incluído a caracterização dos ligandos usados por RMN e espectrometria de massa.

No Capítulo 3 é estudada a potencialidade dos ligandos L4 e L5 funcionarem como sonda para Imagiologia Óptica e foram ainda investigadas as propriedades do ligando L5 complexado com Gd<sup>3+</sup> para ser usado em IRM. Como os compostos apresentam um sistema  $\pi$  conjugado na

zona do PiB, foi feita a caracterização fotofísica dos complexos com a determinação de parâmetros importantes no uso das sondas em Imagiologia Óptica, incluindo a determinação do coeficiente de absorção molar, estudo da fotoestabilidade dos ligandos, a determinação do rendimento quântico e tempo de vida de fluorescência, obtenção dos espectros de absorção transiente e tempo de vida do estado tripleto, obtenção de espectros de luminescência com a determinação do rendimento quântico de luminescência e obtenção do número de águas coordenadas no complexo e um estudo computacional para determinação do isômero do complexo energeticamente mais estável. Para a utilização do complexo GdL5 em IRM, primeiramente, foi averiguada o seu caracter anfifílico com a determinação do valor de log P, a obtenção da concentração micelar crítica (CMC), e a determinação das propriedades relaxométricas do complexo.

Por fim, no Capítulo 4, é feito um estudo *in vitro* para avaliar a interacção do complexo GdL5 com o péptido Aβ<sub>1-40</sub> através de um estudo relaxométrico, a determinação da constantes de afinidade ( $K_D$ ) por ressonância de plasmão de superfície (do inglês *Surface Plasmon Resonance*, SPR), bem como o estudo da interacção baseado no péptido para averiguar que zonas do péptido Aβ<sub>1-40</sub>, na sua forma monomérica, interage com o GdL5 por RMN, por aquisição de espectros



**Figura 1.20** - Estrutura química dos complexos LnL4 e LnL5 estudados no presente trabalho e estrutura dos complexos Ln(Lx) (x = 1, 2 e 3) anteriormente desenvolvidos.

$2D^{15}N-^1H$ -HSQC (do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Foi ainda incluído a determinação da constante de associação ( $K_A$ ) entre o GdL5 e albumina de soro humano (do inglês *Human Serum Albumin*, HSA) por aumento da relaxação protónica (do inglês *Proton Relaxation Enhancement*, PRE). O estudo da interacção baseado no ligando, foi realizado pela experiência de STD (do inglês *Saturation Transfer Difference*) por RMN para averiguar que zonas do complexo interagem com o péptido  $A\beta_{1-40}$ . Por fim, foi investigado a influência do complexo GdL5 na agregação e na estrutura secundária do péptido por dicroísmo circular (do inglês *Circular Dichroism*, CD) e por microscopia de transmissão electrónica (do inglês *Transmission Electronic Microscopie*, TEM).



## **CAPÍTULO 2**

**Síntese dos complexos,  
caracterização dos ligandos e  
quantificação dos complexos  
de lantanídeos**



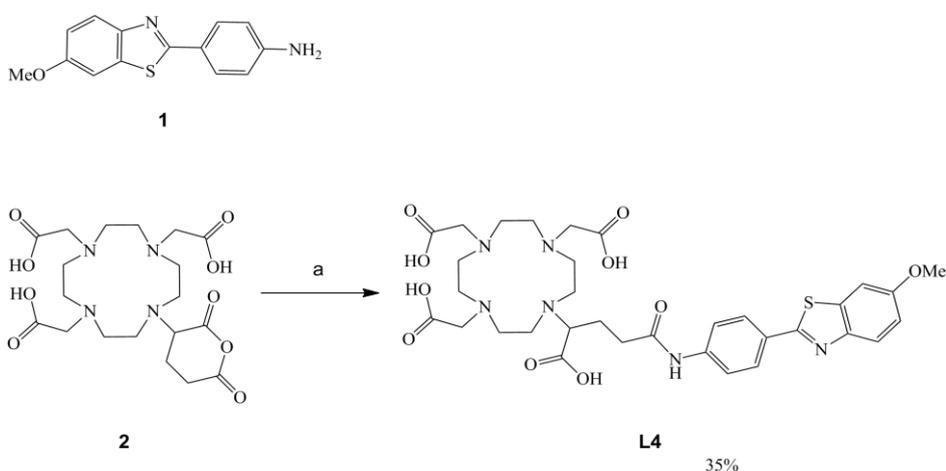
## 2.1 Síntese dos complexos

Usando os ligandos L4 e L5, foram sintetizados vários complexos de lantanídeos com os iões metálicos de  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$  e  $\text{Lu}^{3+}$ . Os ligandos foram previamente sintetizados no Centro de Biofísica Molecular do CNRS em Orleães (França) pelo Doutor Jean-François Morfin. O ligando L4 foi sintetizado segundo o procedimento publicado por Martins *et al.* (Figura 2.1)<sup>120</sup> e o ligando L5 foi sintetizado segundo o esquema apresentado na Figura 2.2.

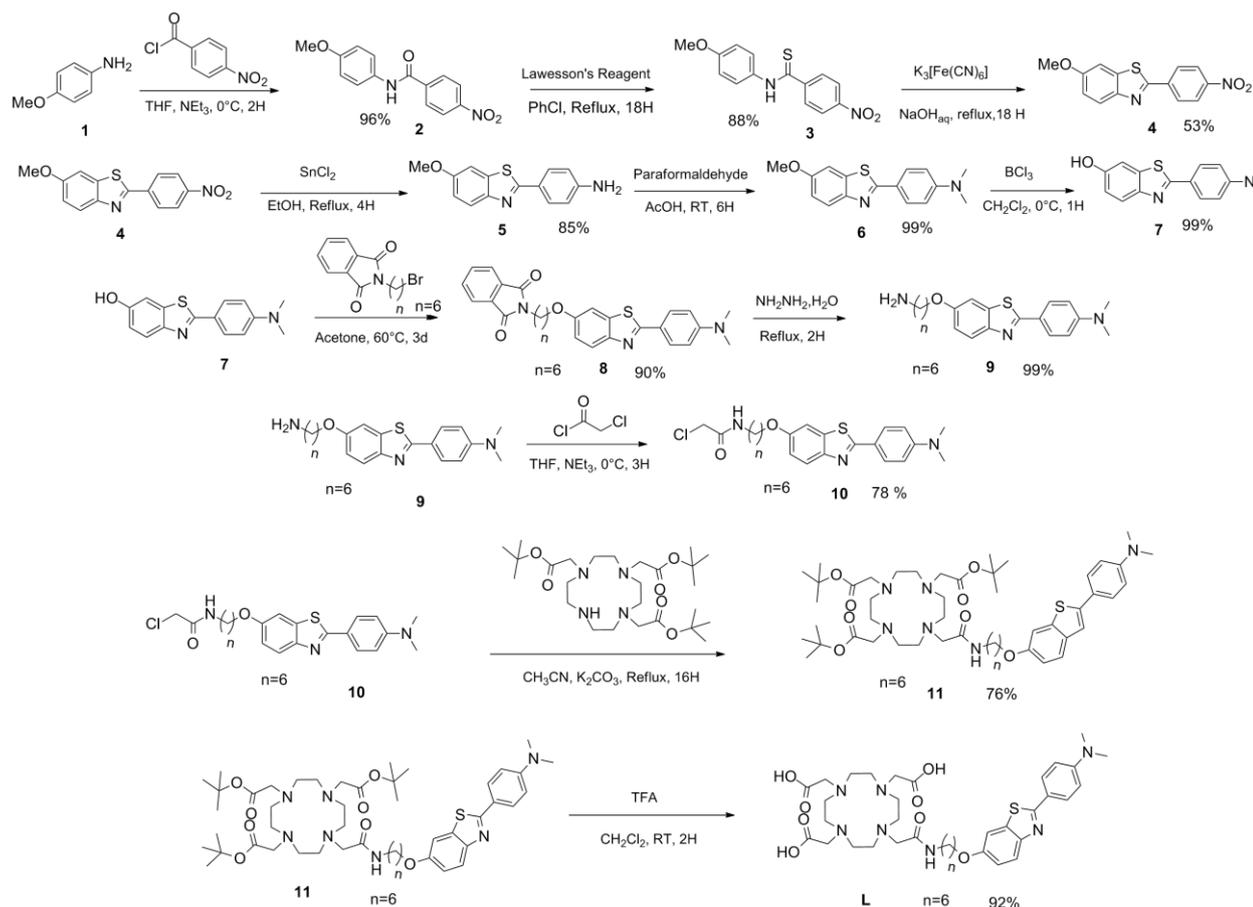
As soluções dos iões metálicos trivalentes foram obtidas por dissolução dos respectivos cloretos de lantanídeos anidros no estado sólido, tricloreto de lantânio (III), tricloreto de európio (III), tricloreto de térbio (III), tricloreto de itérbio (III) e tricloreto de lutécio (III), todos obtidos da (Aldrich®). Soluções aquosas do ião metálico de gadolínio (III) foram obtidas a partir do sal de tricloreto de gadolínio (III) hexahidratado (Aldrich®).

As soluções *stock* dos iões metálicos foram preparadas em água desionizada, e o pH foi ajustada a aproximadamente 2, com um solução de HCl 1 M, até ocorrer a dissolução do sal, prevenindo a precipitação do ião metálico na forma hidrolisada que ocorre a pH mais elevado.

As soluções dos iões metálicos paramagnéticos foram quantificadas utilizando o método de Evans<sup>121</sup>, com uso do desvio de susceptibilidade magnética em massa (do inglês *Bulk Magnetic Shift*, BMS) de uma referência inerte, *tert-butanol* (Merck®), causado pela presença do soluto paramagnético, determinado por  $^1\text{H}$  RMN (procedimento descrito na secção 2.3). As soluções dos iões metálicos paramagnéticos foram utilizadas na padronização de uma solução de EDTA (ácido etilenodiaminatetraacético) (General Purpose Reagent ®) dissolvido em água desionizada com o ajuste de pH para valores superiores a 8. As titulações realizadas com EDTA



**Figura 2.1** – Esquema de síntese para obtenção do ligando L4 com o rendimento de reacção. O ligando L4 foi obtido da reacção em uma etapa do *DOTAGA anidro* comercial **2** com o *fenil-benzotiazol* em dimetilformamida (DMF) a 70°C. (retirado da referência 120).



**Figura 2.2** – Esquema de síntese para obtenção do ligando L5 com os rendimentos de reacção. Primeiramente foi realizado a formação de amida por acilação do 4-metoxianilina **1** com cloreto de 4-nitrobenzoil para formar o produto **2**. Subsequentemente, o composto **2** foi colocado a reagir com meio equivalente de reagente de Lawesson obtendo-se a tioamida **3**. A ciclização do composto **3** na posição *–orto* do anel metoxifenil levando a formação do 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzo[d]tiazol, **4**. Esta ciclização de Jacobson é uma reacção oxidativa para formação de derivados de benzotiazóis usando *potassium ferricyanide* como oxidante. O grupo funcional nitro foi reduzido com cloreto de estanho e a metilação da amina correspondente foi realizada por aminação redutiva com paraformaldeído, levando à formação do composto **6**. O metilo do grupo metóxido foi quantitativamente clivado com ácido de Lewis forte (triclureto de boro), e o N-(6-bromohexil)ftalimida foi alquilado ao grupo hidróxido obtendo-se o composto **9**. O grupo funcional amina foi colocado a reagir com cloreto de cloroacetil levando à formação do braço **10** que foi alquilado com o macrociclo DO3A-tBu comercial para originar o ligando **11** protegido. Por fim, o ligando foi desprotegido em condições ácidas usando ácido trifluoroacético.

para quantificação dos metais, foram realizadas utilizando o alaranjado de xilenol como indicador, em tampão de ácido acético/acetato de sódio com pH compreendido entre 5.6 e 5.8 (intervalo de pH óptimo para uma correcta titulação)<sup>122</sup>. As titulações foram realizadas na presença de excesso de tampão, sendo o pH verificado antes e depois da titulação.

Com a padronização da solução de EDTA, foi possível quantificar por titulação as soluções dos iões metálicos diamagnéticos,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Lu}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , obtidos a partir de tricloreto de lantânio (III), tricloreto de lutécio (III) e dicloreto de zinco (II) hepta-hidratado (Aldrich®), que não podem ser quantificadas pelo método de Evans.

Com a aferição da concentração da solução de  $Zn^{2+}$  foi possível quantificar as soluções de ligando, dissolvido em água desionizada com o pH ajustado para 5.5. À amostra a titular foi adicionada uma quantidade em excesso e conhecida de  $Zn^{2+}$  comparativamente ao ligando, sendo o excesso de  $Zn^{2+}$  titulado com a solução de EDTA padronizada. A diferença entre a quantidade total adicionada e o excesso de  $Zn^{2+}$  titulado deu-nos a quantidade de ligando presente, que complexou com o  $Zn^{2+}$ .

A síntese dos complexos foi realizada através da mistura equimolar das soluções de  $LnCl_3$ , com as soluções de ligando. Para garantir a complexação de todo o metal, de modo a evitar a presença de íão metálico livre, usou-se uma quantidade de metal ligeiramente inferior à equimolaridade, cerca de 1% inferior à quantidade molar total de ligando usado. A metalação foi realizada a pH 5.5 e a uma temperatura de 60° com agitação. O pH foi monitorizado e ajustado continuamente com soluções de NaOH de 10 ou 100 mM, uma vez que à medida que ocorre a complexação, o pH foi diminuindo devido à desprotonação do ligando. No ajuste do pH foi necessária alguma cautela para não o elevar para valores superiores a 6, uma vez que nessas condições o íão metálico começa a hidrolisar e precipitar<sup>55</sup>. Após o pH da solução estabilizar, a solução foi deixada a reagir durante 24 horas à temperatura de 60°C e em agitação. Ao fim de 24 horas de reacção, foi realizado o teste do alaranjado de xilenol, para confirmar a não existência de íão livre em solução (ver secção 2.2)<sup>122</sup>. No caso de ainda existir íão metálico livre, adicionou-se pequenas quantidades de ligando na solução, até o teste de laranja de xilenol ser negativo para a presença de íão metálico livre.

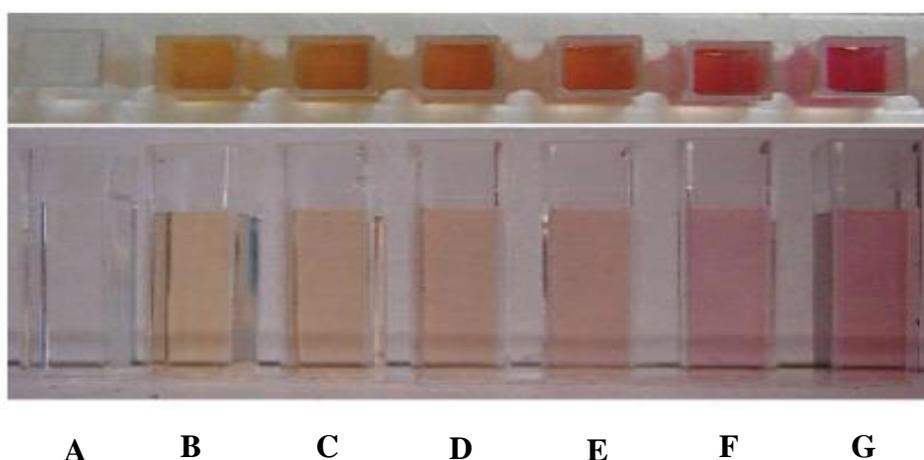
A quantificação do complexo em solução foi realizada ou por espectrofotometria de UV/Vis, com a prévia determinação do coeficiente de absorção molar, ou pelo método de Evans, ficando esta última técnica restrita para complexos de metais paramagnéticos (ver secção 2.3). Como a parte do complexo que absorve luz na região UV/Vis é a porção do PiB, que possui um sistema  $\pi$  conjugado, a presença de um íão metálico complexado no interior do macrociclo não irá afectar o coeficiente de absorção molar, tendo sido apenas necessária a determinação desse coeficiente para os complexos previamente quantificados pelo método de Evans, e com o valor do coeficiente de absorção molar obtido, foi quantificada a concentração em solução dos restantes complexos formados com o mesmo ligando.

## 2.2 Teste do alaranjado de xilenol e quantificação de íon livre

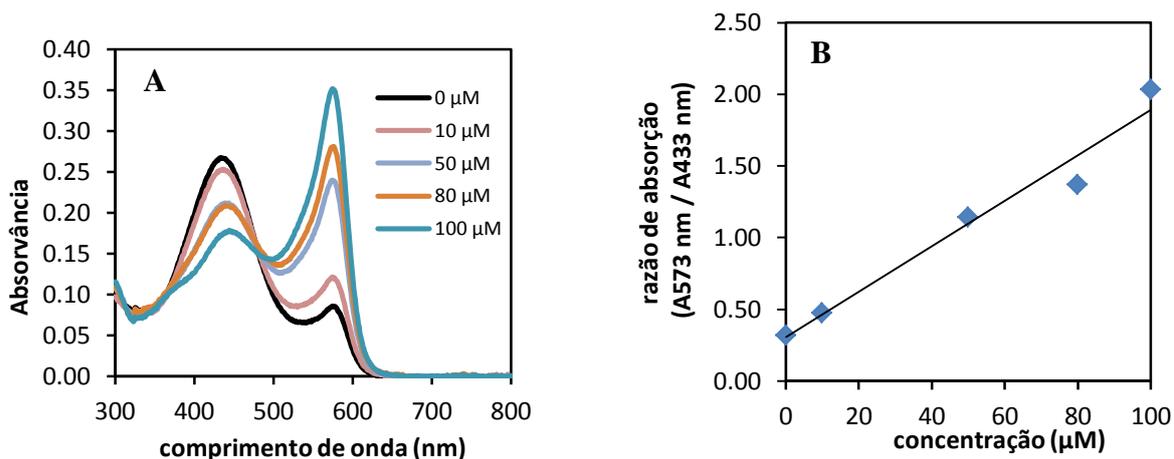
O teste do alaranjado de xilenol permite a confirmação qualitativa da existência de íon lantanídeo  $\text{Ln}^{3+}$  livre através da mudança de cor. A existência de íon metálico livre em solução, provoca a mudança de cor do indicador de amarelo para vermelho arroxeado (Figura 2.3). A solução de alaranjado de xilenol é dissolvida em tampão ácido acético/acetato de sódio 50 mM, pH 5.8, com a concentração de alaranjado de xilenol ajustada para 20  $\mu\text{M}$ . Se necessário, o indicador alaranjado de xilenol também permite uma análise quantitativa da concentração de íon metálico livre em solução, através de uma recta de calibração obtida por espectrofotometria de UV-Vis.

O método de análise quantitativa por espectrofotometria é baseado na razão entre a intensidade do espectro de absorção de UV/Vis do alaranjado de xilenol livre e complexado. O resultado aqui apresentado exemplifica a quantificação para o íon  $\text{La}^{3+}$ , podendo ser estendido para os restantes metais. As medições foram efectuadas de forma que a amostra final mantenha constante a concentração de alaranjado de xilenol a 18  $\mu\text{M}$ , em tampão ácido acético 50 mM, pH 5.8, contendo uma concentração conhecida de íon  $\text{La}^{3+}$ , usando a solução *stock* previamente padronizada por titulação com EDTA (secção 2.1).

O espectro de absorção UV/Vis do alaranjado de xilenol mostra duas bandas, a 433 nm e 573 nm. Quando o íon  $\text{Ln}^{3+}$  é adicionado à solução, a intensidade relativa das duas bandas altera-se: a banda a 433 nm diminui enquanto a banda a 573 aumenta de intensidade (Figura 2.4A).



**Figura 2.3** – Fotografia ilustrando a variação da cor do alaranjado de xilenol com o aumento da concentração de íon metálico livre em solução de C até G. Solução de tampão ácido acético **A**); Solução de alaranjado de xilenol **B**); Solução de alaranjado de xilenol na presença de íon  $\text{Gd}^{3+}$  a 10  $\mu\text{M}$  **C**), 20  $\mu\text{M}$  **D**), 30  $\mu\text{M}$  **E**), 40  $\mu\text{M}$  **F**) e 50  $\mu\text{M}$  **G**) (retirado da referência 122).



**Figura 2.4**– Espectro de absorção do alaranjado de xilenol na ausência e presença de diferentes concentrações de íão metálico La<sup>3+</sup> **A**). Recta de calibração da razão de absorvância dos dois máximos de absorção do alaranjado de xilenol em função da concentração **B**) em tampão ácido acético/acetato de sódio 50 mM, pH= 5.8.

A concentração de íão La<sup>3+</sup> é directamente proporcional à razão entre a absorvância a 573 e 433 nm, e segundo a lei de Beer-Lambert, a equação da recta de calibração geral pode ser traduzida da seguinte forma:

$$\frac{A_{573 \text{ nm}}}{A_{433 \text{ nm}}} = A + B \times [\text{Ln}^{3+}] \quad (2.1)$$

O parâmetro A na equação representa a absorvância inicial do alaranjado de xilenol na ausência de íão metálico. O parâmetro B é semelhante ao coeficiente de absorção molar, sendo um parâmetro empírico. À medida que a concentração de íão metálico em solução aumenta, a razão das absorvâncias A<sub>573</sub>/A<sub>433</sub> nm também vai aumentar (Figura 2.4B).

É possível determinar a concentração de qualquer íão metálico livre em solução, desde que se conheça a identidade do metal e que não seja uma mistura de diferentes íões, e com a obtenção prévia da recta de calibração para esse íão.

### 2.3 Método de Evans

A utilização de compostos paramagnéticos pode afectar os spin nucleares através da indução de alterações no desvio químico e/ou aumentando a velocidade de relaxação. Por exemplo, os complexos de túlio (III), Tm<sup>3+</sup>, e de disprósio (III), Dy<sup>3+</sup>, têm sido aplicados como reagentes de desvio do sinal de <sup>23</sup>Na em RMN para por exemplo monitorização da concentração do íão sódio em tecidos vivos, distinguindo a concentração intra e extracelular<sup>123</sup>. Os complexos

de gadolínio (III),  $Gd^{3+}$ , são agentes de relaxação, usados como agentes de contraste em IRM (ver secção 1.2.2).

Em termos gerais, uma espécie paramagnética pode induzir um desvio químico na frequência nuclear de ressonância através de três mecanismos: diamagnético, hiperfino e BMS. O desvio diamagnético está relacionado com o efeito da complexação pelo ligando devido a alterações conformacionais, independentemente do ião metálico usado ser diamagnético ou paramagnéticos. No desvio hiperfino há duas componentes, a contribuição de contacto ou escalar e de pseudo-contacto ou dipolar. Ambas requerem uma interacção magnética entre o centro paramagnético e os núcleos dos átomos do ligando, através de ligações químicas ou pelo espaço, respectivamente, sendo os núcleos do composto paramagnético os principais afectados. Contudo, a ocorrência de interacções intermoleculares (iónicas) entre duas espécies, por exemplo formação de pares iónicos, faz com que a contribuição de pseudo-contacto afecte os núcleos de outras moléculas. A indução de alterações no desvio químico devido à contribuição do BMS deve-se ao alinhamento parcial do momento magnético da espécie paramagnética com o campo magnético externo, assim a susceptibilidade magnética de toda a solução é afectada. Para a determinação da alteração no desvio químico de um composto inerte, como o *tert-butanol*, só é necessário considerar a contribuição do BMS, que se relaciona com a concentração do soluto paramagnético através da seguinte equação:

$$\Delta_x = \frac{4\pi cs}{T} \left( \frac{\mu_{\text{eff}}}{2.84} \right)^2 \times 10^3 \quad (2.2)$$

Em que  $\Delta_x$  é o desvio provocado pelo efeito BMS,  $c$  é a concentração do soluto paramagnético em Molar,  $s$  é um parâmetro dependente da forma da amostra e da sua posição no campo magnético (para um cilindro paralelo ao campo magnético  $s = 1/3$ , para um cilindro perpendicular ao campo magnético  $s = -1/6$  e para uma esfera  $s = 0$ ),  $T$  é a temperatura absoluta e  $\mu_{\text{eff}}$  é o momento magnético efectivo para um determinado ião paramagnético existente no soluto, e que se encontra tabelado<sup>124,125</sup>.

O valor de  $\Delta_x$  foi medido utilizando um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro com um tubo co-axial no seu interior. No tubo exterior foi colocado cerca de 10 mg de *tert-butanol* (Merck®) em água deuterada 99.9% (Euriso-top®) e no tubo co-axial foi colocada a solução contendo o composto paramagnético após a adição duma massa conhecida de *tert-butanol*. A partir do espectro de RMN 1D de protão foi possível visualizar dois sinais correspondentes aos protões do *tert-butanol* nos dois tubos, o do tubo externo a campo alto em relação ao do tubo co-axial, tendo este último sofrido uma alteração no desvio químico devido ao efeito BMS do soluto paramagnético. A diferença em ppm entre os dois sinais corresponde ao valor do desvio

provocado pelo efeito BMS da amostra, o qual ao ser introduzido na equação 2.2 permitiu obter a concentração do complexo em solução, após efectuar a correcção devido à adição de uma massa conhecida de tert-butanol à amostra. No entanto, para se efectuar este método, a concentração da amostra deve ser suficientemente elevada para ser possível visualizar correctamente a separação dos dois sinais, devendo para isso a concentração do soluto paramagnético ser superior a 1 mM<sup>125</sup>.

## 2.4 Caracterização dos ligandos L4 e L5

A obtenção dos espectros de RMN e de massa permitem confirmar a identidade dos compostos sintetizados e verificar o seu estado de pureza (as estruturas dos complexos estão indicadas no Capítulo 1, Figura 1.20). A correcta atribuição dos desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H para este tipo de moléculas é dificultada por conterem muitos protões, por não apresentarem simetria (ou simetria C<sub>1</sub>), por sofrerem grandes alterações conformacionais à temperatura ambiente provocando alargamento das bandas, e por possuírem vários grupos protonáveis num intervalo grande de pH, ficando os desvios químicos dependentes dele.

No caso do ligando L5, as alterações conformacionais à temperatura ambiente são suficientemente elevadas para que as bandas de RMN de <sup>1</sup>H sejam tão largas que não são visíveis. Para tornar as bandas mais finas e visíveis no espectro de RMN foi necessário aumentar a temperatura de aquisição do espectro, para que as alterações conformacionais sejam suficientemente rápidas na escala temporal de RMN, obtendo-se um sinal que corresponde a uma média do desvio químico dos diferentes confórmeros. Neste tipo de moléculas, com grandes alterações conformacionais, acresce o facto dos acoplamentos spin-spin não terem sido detectados, obtendo-se apenas uma média do desvio químico, tornando ainda mais difícil a atribuição dos sinais. Deste modo, a atribuição dos desvios químicos dos ligandos L4 e L5 foi realizada por comparação com os trabalhos dos ligandos L1, L2 e L3<sup>114,115</sup>, que são similares com os ligandos L4 e L5.

A metalação dos ligandos provoca alterações conformacionais no macrociclo, no qual os protões adoptam posições axiais e equatoriais, tornando-os todos magneticamente e quimicamente não equivalentes, e como não existe simetria nestes complexos, todos os protões do anel têm desvios químicos diferentes. Porém, como os desvios químicos destes protões são suficientemente próximos, acabam por se sobrepor e formar uma banda larga. A presença de um

ião metálico diamagnético não afecta significativamente os desvios químicos, havendo pequenos desvios, correspondendo ao desvio diamagnético. No entanto, é mantida a ordem dos sinais, de campo alto para campo baixo. Por outro lado, com a presença de um ião metálico paramagnético, os desvios químicos irão sofrer grandes alterações, decorrente dos mecanismos de desvio diamagnético, de contacto e de pseudo-contacto, podendo auxiliar por exemplo na determinação da estereoquímica do tetraaza-macrocielo, que pode adoptar conformações de antiprisma quadrado (do inglês *Square Antiprismatic*, SAP) ou antiprisma quadrado distorcido (do inglês *Twisted Square Antiprismatic*, TSAP) (Figura 2.5)<sup>19,126</sup>.

A estereoquímica dos complexos depende do tipo de macrocielo, dos seus grupos substituintes e do tamanho do ião metálico complexado. Os estudos efectuados em solução dos complexos dos macrociclos Ln(DOTA)<sup>-</sup> e Ln(DO3A) e de seus derivados por RMN demonstram que existe uma mistura em solução de duas estruturas isoméricas interconvertíveis com diferente população, designados SAP e TSAP que em situações de troca lenta na escala de tempo do RMN originam dois grupos de picos tanto no espectro de <sup>1</sup>H como no espectro de <sup>13</sup>C. Na Figura 2.5, está ilustrada a dinâmica e a estrutura para os complexos do macrocielo Ln(DOTA)<sup>-</sup>, em que a

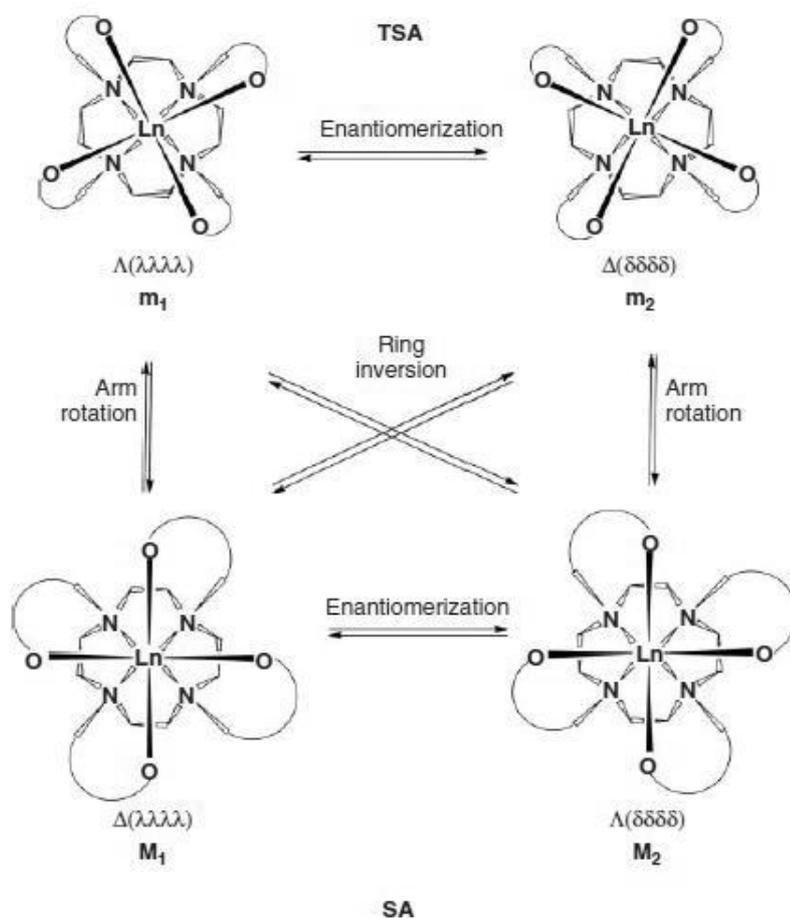


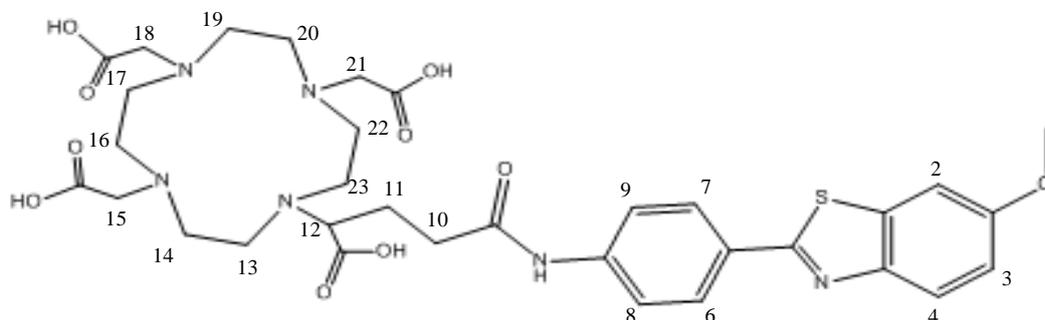
Figura 2.5- Estrutura dos complexos Ln(DOTA)<sup>-</sup> (retirado da referência 19).

diferença na orientação dos braços dos acetatos nas geometrias SAP e TSAP, são descritos por um ângulo distorcido entre o plano  $O_4$  e  $N_4$  de aproximado de  $40^\circ$  e  $-30^\circ$ , respectivamente. Os dois estereoisómeros podem ser combinados em dois pares de enantiómeros: para o SAP temos o par  $\Delta(\lambda\lambda\lambda\lambda)/\Lambda(\delta\delta\delta\delta)$  com diferente elipticidade do anel e dos braços dos acetatos e para o TSAP temos  $\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)/\Delta(\delta\delta\delta\delta)$  com a mesma helipticidade do anel e dos braços com os grupos acetatos. Estas estruturas podem-se interconverter em solução, quer por inversão da configuração do anel ( $(\delta\delta\delta\delta)\leftrightarrow(\lambda\lambda\lambda\lambda)$ ) ou por inversão dos braços dos grupos acetatos ( $\Delta\leftrightarrow\Lambda$ ). A ocorrência de apenas um destes processos leva á alteração de geometria entre SAP e TSAP, e a ocorrência dos dois processos quer simultaneamente quer concertado, leva a alteração entre o par enantiomérico<sup>19</sup>.

### 2.4.1 Métodos

Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN do ligando L4 foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance-500 (11.7 T), operando a 500.132 MHz e para o ligando L5 num espectrómetro Varian VNMRS 600 MHz (14.09 T) operando a 600.14 MHz. As amostras dos ligandos foram preparadas dissolvendo o composto liofilizado em água deuterada 99.9% (Euriso-top®). Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN foram adquiridos a  $60^\circ\text{C}$ . Os espectros de Massa dos ligandos L4 e L5 foram realizados num espectrómetro de massa de alta resolução, HRMS Q-ToF MaXis. A utilização dos espectrómetros de RMN Bruker e de Massa foi realizada no Centro de Biofísica Molecular do CNRS em Orleães, França e a utilização do espectrómetro de RMN Varian foi feita no Laboratório da Plataforma de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da Universidade de Coimbra.

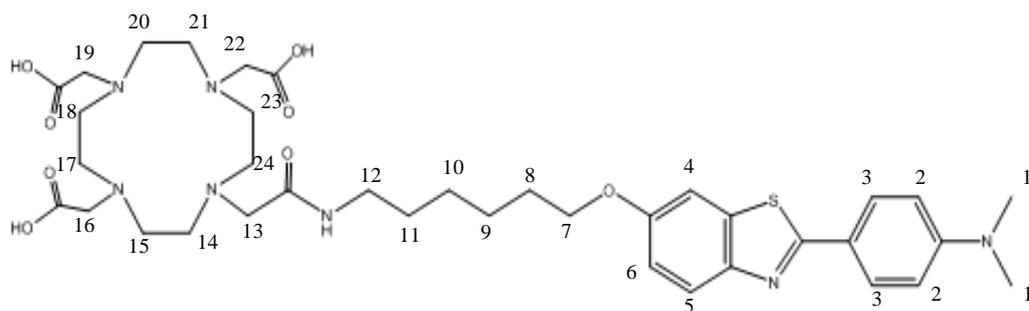
### 2.4.2 Caracterização do ligando L4



Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 2.42 (bs, 2H, H-11), 2.51 (bs, 2H, H-10), 3.60 (bs, 8H, H-16,17,19,20), 3.79 (bs, 8H, H-13,14,22,23), 4.04 (bs, 4H, H-1,12), 4.16 (bs, 6H, H-15, 18,21), 7.58 (bs, 2H, H-8,9), 7.94 (bs, 1H, H-2), 8.00 (bs, 1H, H-4), 8.24 (bs, 1H, H-3), 8.31 (bs, 2H, H-6,7).

HRMS (ESI): m/z: calcd para  $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}$ : 714.79, encontrado 714.78.

### 2.4.3 Caracterização do ligando L5



Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , 600 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.63 (bs, 4H, H-10, H-9), 1.81 (bs, 2H, H-11), 1.95 (bs, 2H, H-8), 3.12 (bs, 6H, H-1), 3.42 (bs, 8H, H-17, 18,20,21), 3.49 (bs, 2H, H-12), 3.69 (bs, 8H, H-14,15,23,24), 3.88 (bs, 2H, H-7), 3.90 (bs, 2H, H-13), 4.12 (bs, 6H, H-16, 19, 22), 7.29 (bs, 2H, H-2), 7.90 (bs, 2H, H-3), 8.03 (bs, 2H, H-4, 6), 8.24 (bs, 1H, H-5).

HRMS (ESI): m/z: calcd para  $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}$ : 755.92, encontrado 755.37.

# CAPÍTULO 3

**Caracterização físico-química  
dos complexos derivados de PiB**



### 3.1 Introdução

Os ligandos desenvolvidos apresentam na sua estrutura um macrociclo, para a coordenação do íon metálico, ligado a um grupo fenil-benzotiazol (PiB) que apresenta um sistema  $\pi$  conjugado que absorve na zona UV/Vis e emite fluorescência no visível. Inicialmente foi realizada uma caracterização fotofísica dos ligandos e dos respectivos complexos com íons  $\text{Ln}^{3+}$ . No presente trabalho, foi estudada a possibilidade das sondas desenvolvidas, baseadas nos ligando L4 e L5 complexados com íons lantanídeos, poderem ser usadas em Imagiologia Óptica, a partir da escolha criteriosa do íon metálico a ser coordenado, que irá ser estimulado a emitir luminescência por um processo de transferência de energia a partir da excitação do grupo fenil-benzotiazol. Os íons metálicos da série dos lantanídeos apresentam características interessantes nesse sentido, tais como serem emissores no visível e infravermelho próximo, sendo a emissão nesta última região espectral especialmente interessante *in vivo*, uma vez que há poucos constituintes biológicos a absorverem e emitirem no infravermelho próximo, na chamada janela terapêutica 650-1350 nm, diminuindo o ruído do sinal (ver secção 1.3.1). Uma outra vantagem destes íons metálicos é terem tempos de vida de luminescência bastante mais longos ( $\mu\text{s}$ -ms) que os processos de fluorescência (ns), podendo ser aplicados em Imagiologia Óptica resolvida no tempo. Com este conhecimento da literatura, foi estudada a eficiência do processo de luminescência para os complexos preparados a partir dos ligandos L4 e L5, com a coordenação dos íons metálicos luminescentes  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ .

A Imagiologia de Ressonância Magnética, como referido anteriormente, é um método não invasivo de obtenção de imagem anatómica mapeando informação fisiológica (ver secção 1.1.4), em que o contraste da imagem pode ser melhorado com a utilização de agentes de contraste paramagnéticos, nomeadamente com complexos de  $\text{Gd}^{3+}$ . Isto devido ao seu elevado spin electrónico ( $S= 7/2$ ), com distribuição electrónica de simetria esférica, e relaxação electrónica lenta, que origina uma forte diminuição do tempo de relaxação  $T_1$  dos prótons das moléculas de água nas proximidades, garantindo um contraste positivo nas imagens obtidas (ver secção 1.2.2). Como referido na secção 1.4.2, o desenvolvimento de sondas IRM para detecção específica de placas amilóides no diagnóstico da doença de Alzheimer tem sido modesto. O complexo desenvolvido, por possuir uma unidade que garante a vectorização específica aos agregados amilóides e por possuir um macrociclo com propriedades termodinâmicas e cinéticas que garantem a estabilidade do quelato, potenciam o complexo GdL5 como possível sonda IRM para diagnóstico da doença de Alzheimer. Como tal, foram estudadas as suas propriedades

físico-químicas mais importantes para esta aplicação. Esses estudos incluem a determinação do log P (logaritmo da partição octanol/água) para avaliar a lipofilicidade do complexo GdL5 e prever a capacidade do complexo de ultrapassar a barreira hemato-encefálica. Foi também obtido o CMC do complexo em água por espectroscopia UV/Vis para avaliar a capacidade anfifílica do complexo para formar micelas, assim como foi avaliado o tamanho micelar por dispersão dinâmica de luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*, DLS). Foram também estudadas as propriedades relaxométricas do complexo utilizando a técnica de NMRD (do inglês *Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion*).

## 3.2 Procedimento experimental

### 3.2.1 Material e preparação das amostras

Os ligandos L4 e L5 foram sintetizados no grupo de investigação da Dr.<sup>a</sup> Eva Tóth, do Centro de Biofísica Molecular (CBM) do CNRS de Orleans, França. Para o ligando L4 foi usado o protocolo publicado na literatura (ver secção 2.1)<sup>120</sup>. O ligando L5 foi sintetizado a partir do processo descrito na secção na secção 2.1. Os complexos LnL4 (Ln = La<sup>3+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup>) e LnL5 (Ln = La<sup>3+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup>) foram preparados como descrito no Capítulo 2.

### 3.2.2 Estudo por espectrofotometria de UV/Vis

A obtenção do coeficiente de absorção molar, do valor de log P e a determinação do CMC do complexo GdL5 foi realizada usando um espectrofotómetro UV/Vis Uvikon XL (Secoman) à temperatura ambiente. A aquisição dos espectros de absorção dos ligandos L4 e L5 e respectivos complexos, incluindo a determinação do coeficiente de absorção molar do TbL4, bem como o estudo da fotodegradação dos ligandos L4 e L5, foi realizada utilizando um espectrofotómetro UV500 (Spectronic Unicam ®) à temperatura ambiente. De referir que se utilizou um percurso óptico adequado sempre que as absorvâncias medidas eram demasiado elevadas, saindo da região de linearidade instrumental.

### 3.2.3 Estudo da fluorescência

A aquisição dos espectros de fluorescência foi obtida com um Fluorímetro Cary Eclipse (Varian®), com o software Varian Cary Eclipse versão 1.1. A aquisição dos espectros de fluorescência a baixa temperatura, realizada em matriz sólida à temperatura do azoto líquido (77K), e a determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência foram efectuados num fluorímetro Fluorog 3.2.2 (Horiba-Jovin-Yvon ®). O espectro de fluorescência foi corrigido no comprimento de onda pela resposta instrumental.

Os rendimentos quânticos de fluorescência ( $\Phi_F$ ) foram determinados através dum método comparativo<sup>127</sup> utilizando um composto de referência que absorva em zonas espectrais idênticas às do composto em estudo e que possua um rendimento quântico bem determinado. A espécie de referência usada para as determinações no UV-Vis foi o sulfato de quinino ( $\lambda_{ex} = 366$  nm,  $\Phi_F = 0,546$  em  $H_2SO_4$  0.5 M em solução desarejada)<sup>128</sup>. As soluções foram preparadas de forma a terem densidades ópticas baixas, entre 0.1-0.2, no comprimento de onda de excitação, de modo a evitar o efeito de filtro interno. Assim, a determinação do rendimento quântico  $\Phi_F$  foi feita utilizando a equação seguinte:

$$\Phi_F = \frac{\int I(\lambda)^{cp} d\lambda}{\int I(\lambda)^{ref} d\lambda} \times \frac{D.O.^{cp}}{D.O.^{ref}} \times \frac{\eta^2(cp)}{\eta^2(ref)} \times \frac{fd(cp)}{fd(ref)} \times \Phi_F^{ref} \quad (3.1)$$

a qual compara as áreas integradas dos espectros de emissão das duas amostras usadas ( $\int I(\lambda)^{cp} d\lambda$  para o composto em estudo em solução aquosa e  $\int I(\lambda)^{ref} d\lambda$  para a solução de sulfato de quinino em  $H_2SO_4$  0.5 M), tendo em conta as correcções resultantes dos diferentes índices de refração do solvente ( $\eta$ ) (1,333 para a  $H_2O$ , 1,338 para o  $H_2SO_4$  0.5 M e 1,328 para a  $D_2O$ ), bem como a razão das absorvâncias (densidades ópticas, DO) da amostra e da referência ao comprimento de onda de excitação utilizada. Para evitar a utilização deste último parâmetro é garantido que no comprimento de onda de excitação usado, as duas soluções absorvem a mesma quantidade de radiação, o comprimento de onda de excitação usado reflecte o cruzamento entre os espectros de absorção das duas soluções através do auxílio da espectrofotometria de UV/Vis. A equação inclui ainda um factor correctivo designado por factor de desarejamento (fd). Este factor pode ser excluído se a experiência for efectuada com soluções desarejadas. Porém, como o tempo de decaimento de fluorescência dos compostos em estudo é relativamente curto, cerca de 1-2 ns, não é necessário desarejar as soluções, sendo apenas necessário desarejar a solução de sulfato de quinino, que tem um tempo de fluorescência significativamente superior, podendo ocorrer problemas de supressão devido à difusão do oxigénio molecular presente em solução. O rendimento quântico de fluorescência para os ligandos livres L4 e L5 e respectivos complexos

foram obtidos pela média de 3 amostras independentes. A análise dos dados experimentais foi realizada com auxílio do software OriginPro 8 versão 8.0.

### 3.2.4 Estudo da fotodegradação

O estudo de fotodegradação dos ligandos foi realizado com o auxílio de um reactor fotoquímico Semi-Micro (Applied Photophysics®) em que a amostra foi colocada numa célula com percurso óptico de 1 cm dentro do reactor e irradiado a 350 nm, tendo sido registados vários espectros de absorção por espectrofotometria com diferentes tempos de irradiação.

### 3.2.5 Tempos de vida de fluorescência

As medidas de luminescência em tempo resolvido nos picossegundos foram realizadas usando um TCSPC (do inglês *Time Correlated Single Photon Counting*) de picossegundos. Para o ligando L4 e respectivos complexos a excitação foi efectuada a 339 nm usando um picoLED como fonte de excitação. Para o ligando L5 e respectivos complexos a excitação foi efectuada a 371 nm usando um laser de picossegundos mode-lock Tsunami (Ti:sapphire) modelo 3950 (com frequência de repetição de 82 MHz, com intervalo de sintonização de 700–1000 nm), bombeado por uma Millennia Pro-10s, onda contínua de dupla frequência, diodo bombeado, laser de estado sólido ( $\lambda_{em} = 532$  nm) (Spectra-Physics®), como fonte de excitação. Para produzir a segunda e terceira harmónica da frequência de excitação do feixe de laser Ti:sapphira foi usado um gerador modelo GWU-23PS (Spectra-Physics®). O feixe polarizado horizontal de saída do GWU (segunda harmonica) foi primeiramente passado por um despolarizador WDPOL-A (ThorLabs®) e depois por um polarizador Glan-Thompson modelo 10GT04 com polarização vertical (Newport®). A emissão foi recolhida a 90° através de um monocromador duplo subtrativo Cornestone 260 (Oriel®) através de um fotomultiplicador de placa de microcanal modelo R3809U-50 (Hamamatsu®). A aquisição e o processamento de sinal foram realizadas com um modulo SPC-630 TCSPC (Becker & Hickl®). O decaimento de fluorescência e a resposta instrumental foram recolhidos usando 1024 canais com uma escala de 22.3 ps/canal para o ligando L4 e respectivos complexos, e usando 4096 canais com uma escala de 1.74 ps/canal para

o ligando L5 e respectivos complexos, até atingir uma contagem máxima de  $5 \times 10^3$ . A análise dos dados experimentais foi realizada com auxílio do software OriginPro 8 versão 8.0.

### 3.2.6 Estudo da absorção transiente

O estudo do estado tripleto foi realizado com a aquisição de espectros de absorção transiente resolvido no tempo em nano-segundos, usando instrumentação fotofísica aplicada de flash fotólise de laser bombeada com um laser Nd:YAG (Spectra Physics®). O espectro de absorção transiente foi obtido pela monitorização da variação de densidade óptica a intervalos de 10 nm de 300-600 nm e fazendo a média de pelo menos 5 decaimentos a cada comprimento de onda. Foram observadas cinéticas de primeira ordem do decaimento do estado tripleto de menor energia. A excitação foi feita a 355 nm com um feixe não focado. Houve especial atenção de forma a ter baixa energia de laser ( $\leq 2$  mJ) para evitar efeitos de multi-fotão ou de aniquilação tripleto-tripletto. As amostras usadas foram desarejadas com azoto durante aproximadamente 20 minutos e seladas. A análise dos dados experimentais foi realizada com auxílio do software OriginPro 8 versão 8.0.

### 3.2.7 Aquisição dos espectros de luminescência e respectivos tempos de vida dos complexos com $\text{Eu}^{3+}$ e $\text{Tb}^{3+}$

A aquisição dos espectros de luminescência e de excitação dos complexos resolvidos no tempo e a determinação dos tempos de vida de luminescência foram efectuados usando um Fluorímetro Cary Eclipse (Varian®), com o software Varian Cary Eclipse versão 1.1.

A aquisição dos espectros de luminescência e de excitação de luminescência foram obtidos por excitação pulsada, com 5 flashes, um tempo de atraso de 100  $\mu\text{s}$ , com uma janela temporal de aquisição de 1 ms, e com as “*slits*” de excitação a 20 nm e de emissão a 2.5 nm para os complexo EuL4 e EuL5 e “*slits*” de excitação de 20 nm e de emissão de 5 nm para os complexos TbL4 e TbL5, com incrementos de 0.2 nm com tempo de integração de 0.1 s, e com o fotomultiplicador a 800 V para os complexos TbL4 e EuL4, e de 950 V para os complexos TbL5 e EuL5. Para o espectro de luminescência a excitação foi efectuada no comprimento de onda do máximo de absorção e para o espectro de excitação de luminescência a emissão foi monitorizada

no comprimento de onda a 616 nm para os complexos com  $\text{Eu}^{3+}$  e a 545 nm para os complexos com  $\text{Tb}^{3+}$ .

As soluções em  $\text{H}_2\text{O}$  para medição dos tempos de vida de luminescência, foram preparadas em água desionizada e os tempos de vida em  $\text{D}_2\text{O}$  foram medidas em soluções preparadas com óxido de deutério (99.9%) obtido da Euriso-top®. Os tempos de decaimento de luminescência foram obtidos por excitação pulsada com 10 flashes, um tempo de atraso de 100  $\mu\text{s}$ , em incrementos de 10  $\mu\text{s}$ , com as “*slits*” de excitação a 20 nm e de emissão a 10 nm, a voltagem do fotomultiplicador foi mantida a 1000 V, e o decaimento foi obtido pela média de 100 ciclos. A excitação foi realizada no comprimento de onda do máximo de absorção e a emissão foi monitorizada a 701 nm e a 587 nm para os complexos com  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ , respectivamente. As curvas de decaimento da intensidade de luminescência em função do tempo foram ajustadas a uma função mono-exponencial.

A aquisição dos espectros de fluorescência atrasada e de excitação dos ligandos L4 e L5 foram obtidos por excitação pulsada, com 5 flashes, um tempo de atraso de 200  $\mu\text{s}$ , com uma janela temporal de aquisição de 1 ms, e com as “*slits*” de excitação e de emissão a 20 nm, com incrementos de 1 nm com tempo de integração de 0.05 s, e com o fotomultiplicador a 800 V. Para os espectros de fluorescência atrasada a excitação foi efectuada no comprimento de onda do máximo de absorção e o espectro de excitação foi efectuada com a emissão no comprimento de onda do máximo da fluorescência atrasada.

Os rendimentos quânticos de luminescência (da emissão do íon metálico,  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ ) foram obtidos da mesma forma que os rendimentos quânticos de fluorescência, usando o método comparativo (ver secção 3.2.3). No entanto, a referência usada foi o dicloreto de tris(bipirilo) de Ruténio (II) ( $[\text{Rubpy}_3]\text{Cl}_2$ ), em equilíbrio com o ar ( $\Phi=0.028$ )<sup>129</sup>. As soluções dos complexos também foram mantidas em equilíbrio com o ar uma vez que os íons metálicos da série dos lantanídeos estão protegidos do efeito supressor do oxigénio. Houve especial cuidado em garantir que no comprimento de onda de excitação usado, as duas soluções absorvam a mesma quantidade de luz, com densidades ópticas compreendidas entre 0.1-0.2, para evitar problemas de filtro interno. Todos os espectros adquiridos dos complexos e da referência foram adquiridos com os mesmos parâmetros instrumentais, no entanto os espectros de luminescência dos lantanídeos foram adquiridos com um atraso de aquisição de 100  $\mu\text{s}$ . O rendimento quântico de luminescência dos complexos EuL4, EuL5, TbL4 e TbL5, e a determinação no números de hidratação para os complexos EuL4 e EuL5 foram obtidos pela média de 3 amostras independentes. A análise dos dados experimentais foi realizada com auxílio do software OriginPro 8 versão 8.0.

### 3.2.8 Estudo computacional

A estrutura e energia de 6 conformeros do complexo  $[\text{EuL4}(\text{H}_2\text{O})]^-$  foram calculadas ao nível da teoria do funcional da densidade (do inglês *Density Functional Theory*, DFT), utilizando o funcional de troca e correlação híbrido meta-GGA TPSSh<sup>130</sup> e usando o código GAMESS-US<sup>131</sup>. As geometrias foram otimizadas sem restrições de simetria, utilizando o pseudopotencial de Dolg *et al.* e a base de funções [5s4p3d]-GTO para o ião európio (III)<sup>132</sup> e a base de funções 6-31G(d,p) para os átomos de enxofre, oxigénio, nitrogénio, carbono e hidrogénio. O pseudopotencial de Dolg *et al.* utilizado inclui os electrões 4f<sup>6</sup> do ião  $\text{Eu}^{3+}$  no cerne, deixando os electrões 5s e 5p para serem tratados explicitamente. A utilização de um pseudopotencial deste tipo para lantanídeos tem sido justificada pelo facto de as orbitais 4f não contribuírem significativamente para a ligação química devido à sua limitada extensão radial<sup>133,134</sup>. Foi efectuado o cálculo das frequências vibracionais no ponto estacionário resultante para cada conformero, de forma a garantir que as estruturas obtidas são mínimos na superfície de energia de potencial, pela ausência de frequências imaginárias. As energias relativas apresentadas para os diferentes conformeros são energias livres de Gibbs. Devido à grande dimensão do sistema e ao elevado número de conformeros possíveis, alguns ângulos torsionais não foram investigados. Foram investigados os ângulos torsionais mais relevantes para a determinação dos conformeros mais estáveis do complexo. O trabalho foi realizado em colaboração com a Doutora Licínia Justino Simões.

### 3.2.9 Determinação do coeficiente de partição octanol-água

O coeficiente de partição octanol-água foi determinado a partir da razão entre as concentrações do complexo na fase de octanol e a fase aquosa. O logaritmo do coeficiente de partição é referido como log P e é traduzido pela seguinte equação:

$$\log P = \log \frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{aquosa}}} \quad (3.2)$$

Para a determinação do valor de log P foi utilizado o método de “agitação do frasco” (*shake flask*)<sup>135</sup>. Foi utilizada na experiência água saturada com octanol e octanol saturado com água. Num Eppendorf de 2 mL foi adicionado 0.5 mL de uma solução de GdL5 100  $\mu\text{M}$  e 0.5 mL da solução de octanol saturada com água, e o Eppendorf foi posteriormente agitado manualmente. O Eppendorf foi deixado a centrifugar durante 30 min para separação das fases.

Foi retirada cuidadosamente a fase aquosa e quantificado o soluto presente por espectrofotometria de UV/Vis, a partir do coeficiente de absorção molar do complexo determinado anteriormente. A partir da concentração obtida na fase aquosa foi obtida a concentração do soluto na fase em octanol, uma vez que a quantidade total de complexo presente em cada amostra é conhecida. O procedimento foi repetido com 6 amostras independentes.

### **3.2.10 Medidas de $^1\text{H}$ NMRD**

Os perfis de NMRD de próton foram realizados num relaxómetro Stelar SMARtracer Fast Field Cycling RMN (0.01-10 MHz) e num electromagneto Bruker WP80 RMN (20, 40, 60 e 80 MHz) adaptado para medidas de campo variável e controlados por uma consola PC-RMN SMARTtracer. A temperatura foi monitorizada por uma unidade de controlo de temperatura VTC91 e mantida por fluxo de gás. A temperatura foi determinada por prévia calibração por uma sonda de temperatura com uma resistência de platina. As medidas foram realizadas em meio aquoso com tampão HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil,) piperazina-1-etanesulfónico, Aldrich®) 50 mM, pH=7.4, a 298 e 310 K para o complexo GdL5.

### **3.2.11 Medidas de relaxometria**

O estudo da contribuição paramagnética para a velocidade de relaxação longitudinal  $^1\text{H}$  da água em função da concentração do complexo GdL5 foi realizado num relaxómetro Bruker Minispec mq20 (20 MHz,  $B_0 = 0.47$  T) a 298 K, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4.

### **3.2.12 Dispersão dinâmica da luz (DLS)**

As medidas de DLS foram realizadas com um instrumento Malvern Zetasizer Nano Range. As medições foram realizadas a 298 K e a luz dispersa foi detectada a um ângulo de  $173^\circ$ . A amostra antes de ser estudada por DLS foi filtrada por um filtro embutido em seringa de  $0.45 \mu\text{m}$  para retirar quaisquer partículas que pudessem afectar as medidas. A amostra foi preparada em solução aquosa em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4.

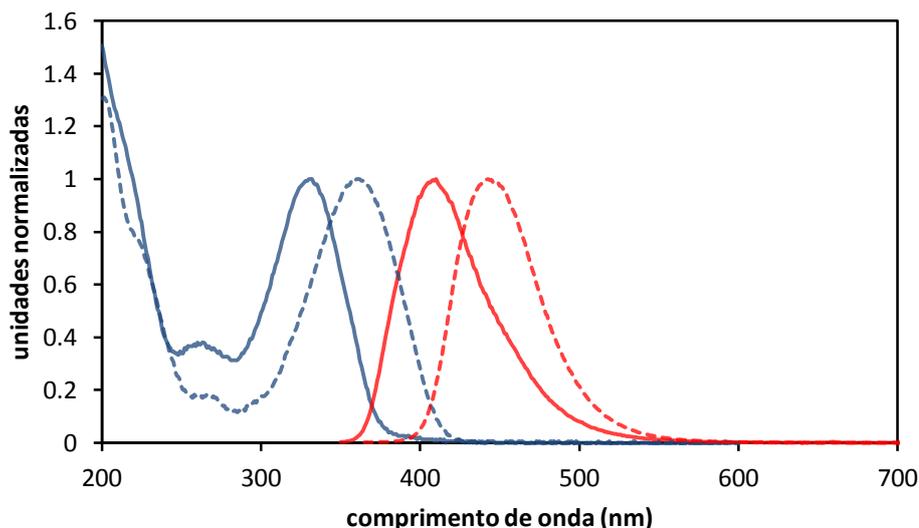
### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 Estudo fotofísico do fenil-benzotiazol (PiB) conjugado nos compostos

Um composto é detectado por espectrofotometria de UV/Vis quando ocorrem transições electrónicas entre orbitais moleculares, em que a transição de mais baixa energia é entre a HOMO (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) e a LUMO (do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) ou orbitais antiligantes de energia mais elevada. As transições visíveis por espectrofotometria têm de ocorrer a comprimentos de onda superiores a 190 nm, sendo em moléculas orgânicas as transições electrónicas  $\pi^* \leftarrow \pi$  e  $\pi^* \leftarrow n$  as mais importantes nesta região, e normalmente as transições  $\sigma^* \leftarrow \sigma$  e  $\sigma^* \leftarrow n$  envolvem energias elevadas correspondentes à região do espectro do UV no vácuo.

As transições electrónicas do tipo  $\pi^* \leftarrow \pi$ , ocorrem em compostos que possuem cromóforos com sistemas conjugados. Como a maior parte dos compostos não possuem grande simetria, estas transições são geralmente fortemente permitidas e possuem coeficientes de absorção molar elevados. Tirando os casos em que a molécula tem grande simetria (exemplo dos pequenos compostos aromáticos) a transição  $\pi^* \leftarrow \pi$  poderá ser proibida por simetria e apresenta coeficiente de absorção molar baixo. As transições do tipo  $\pi^* \leftarrow n$  envolvem a transição de um electrão não ligante para uma orbital com simetria  $\pi$ . Estas transições são proibidas por simetria quando a orbital n tem simetria  $\sigma$ , como no caso do grupo carbonilo, no entanto o movimento vibracional diminui a proibição da transição. Para muitos compostos orgânicos que possuem hetero-átomos na sua estrutura, como O, N ou S, as transições  $\pi^* \leftarrow \pi$  e  $\pi^* \leftarrow n$  são energeticamente próximas e a posição relativa destas transições pode ser alterada com a utilização de solventes com diferentes polaridades. Exemplificando para um composto carbonílico insaturado- $\alpha,\beta$ , num solvente polar, a transição  $\pi^* \leftarrow \pi$  é de menor energia que num solvente apolar e a transição  $\pi^* \leftarrow n$ , num solvente polar, é de maior energia que num solvente apolar<sup>136</sup>.

Os ligandos estudados apresentam ambos um sistema  $\pi$  conjugado na porção do PiB, o fenil-benzotiazol, porção da molécula responsável pelas propriedades fotofísicas do composto. A principal diferença do cromóforo nos dois ligandos é o facto de que no caso do ligando L4 o PiB foi conjugado com o resto do composto pelo grupo amina, com a formação de um grupo amida, e no ligando L5 o PiB foi conjugado à restante molécula virado ao contrário (ver Figura 1.20, secção 1.5). Os espectros de absorção dos dois ligandos evidenciam um máximo nos 330 nm e 360 nm, para o ligando L4 e L5 respectivamente, associado à transição para o primeiro estado

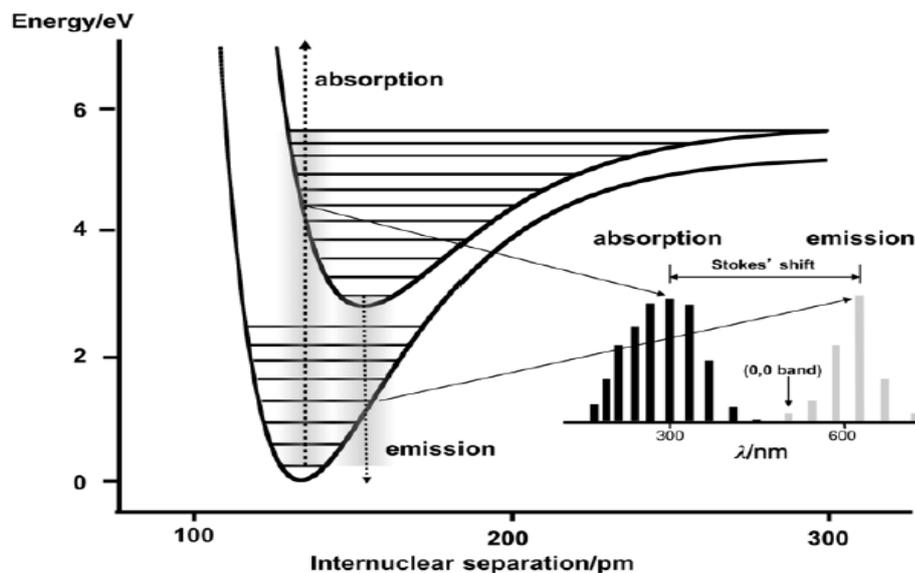


**Figura 3.1-** Espectro de absorção (azul) e espectro de fluorescência (vermelho) do ligando L4 (linha a cheio) e do ligando L5 (linha a tracejado) em solução aquosa com tampão fosfato de sódio 10mM, pH= 7.4. Os espectros foram normalizados no máximo de absorção, correspondente à transição  $S_1 \leftarrow S_0$ , e no máximo de intensidade de fluorescência.

excitado singlete ( $S_1$ ) (Figura 3.1). Em ambos os espectros de absorção é possível verificar a existência de uma banda mais pequena a 265 nm associada a uma transferência de carga. A diferença no máximo de absorção observada para os ligandos pode ser explicada pelo facto que no ligando L5, há dois substituintes doadores de densidade electrónica ao fenil-benzotiazol (o grupo amina secundária e o grupo alcóxido), aumentando desta forma a energia do estado singlete fundamental ( $S_0$ ), aproximando-se do estado excitado singlete de menor energia ( $S_1$ ), envolvendo desta forma menor energia de transição e aparecendo a comprimentos de onda maiores que no ligando L4, que possui apenas um grupo doador de densidade electrónica (o grupo metóxido) e um grupo aceitador de densidade electrónica (o grupo amida).

Nos espectros de emissão de fluorescência dos ligandos L4 e L5, o máximo de emissão ocorre a 410 nm e a 445 nm, respectivamente, associado à transição  $S_0 \leftarrow S_1$ . A energia do estado singlete excitado do ligando L4 é de 324.40 kJ/mol e do ligando L5 é de 294.12 kJ/mol, sendo estes valores obtidos pela equação de Planck ( $E=h\nu$ , em que E é a energia, h a constante de Planck e  $\nu$  a frequência), usando o comprimento de onda de intercepção dos espectros de absorção e de emissão de fluorescência, que corresponde à transição vibrónica, que envolve a transição vibracional  $0 \leftarrow 0$  da transição electrónica  $S_0 \leftarrow S_1$ .

Dos espectros de absorção e de fluorescência em ambos os casos podemos verificar que as bandas associadas à transição entre os estados electrónicos  $S_0$  entre  $S_1$  são largas, sem resolução vibracional e o desvio de Stokes é significativo. Isto pode ser explicado pelo princípio de Franck-Condon em que a transição electrónica ocorre com um tempo de vida na ordem dos



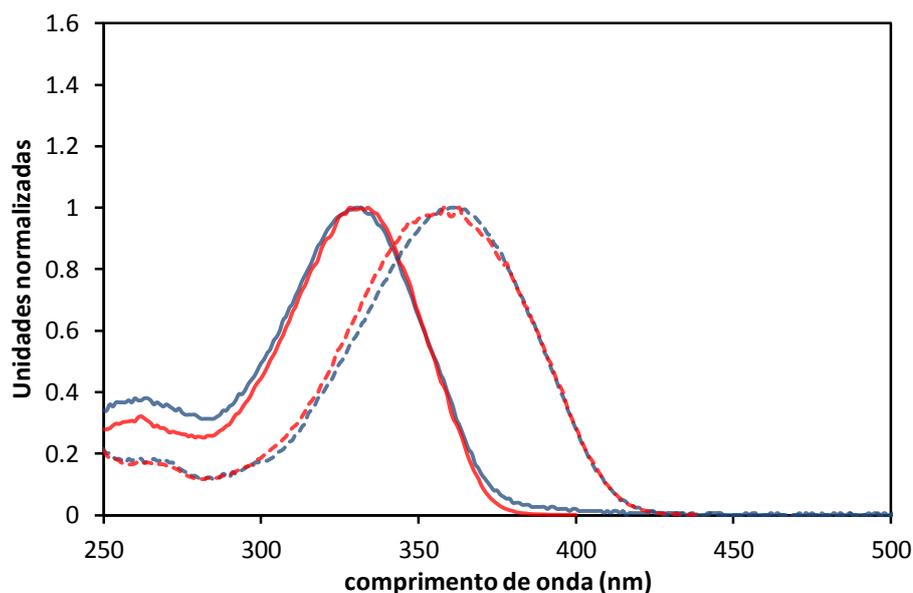
**Figura 3.2-** Exemplificação de possíveis curvas de potenciais unidimensionais do estado fundamental e excitado para uma molécula diatômica, com a influência das alterações da geometria nuclear de equilíbrio na absorção e emissão (retirado da referência 136).

fentosegundos ( $10^{-15}$ s) enquanto o movimento nuclear, vibracional e rotacional, é cerca de 100-1000 vezes mais lento. Desta forma, a absorção e a emissão ocorre sem variação da posição nuclear e como as coordenadas nucleares não são alteradas num tão curto espaço de tempo, a transição é “vertical” num diagrama de energia potencial, que geralmente origina a transição para um estado vibracional excitado (Figura 3.2). Em termos quânticos, isto é explicado pelo facto de a transição ocorrer para o nível vibracional onde ocorre maior sobreposição entre as funções de onda do estado fundamental e do estado excitado. Após a transição para o estado excitado, o tempo de vida deste estado é suficientemente longo para haver reorientação das coordenadas nucleares (exemplo: rotações moleculares, torsionais ou vibracionais) de forma a adoptar o mínimo de energia, assim como também há tempo para as vizinhanças se reorientarem em volta do composto, formando um pseudo-equilíbrio. Como este processo de reorientação do composto é acompanhado por relaxação vibracional, com perdas energéticas até atingir o primeiro nível vibracional do estado  $S_1$ , ocorre emissão a partir deste nível para os vários níveis vibracionais do estado fundamental. Como tal, a emissão surge a comprimentos de onda maiores e portanto o fóton emitido é menos energético do que o fóton absorvido, ocorrendo um desvio de Stokes, que é tanto maior quanto maior for a alteração das coordenadas nucleares entre o estado fundamental e excitado<sup>136</sup>. Pela Figura 3.1 podemos verificar que o desvio de Stokes é bastante significativo para ambos os ligandos, podendo ser concluído que há grandes alterações conformacionais entre o estado fundamental e excitado, correspondendo a diferentes

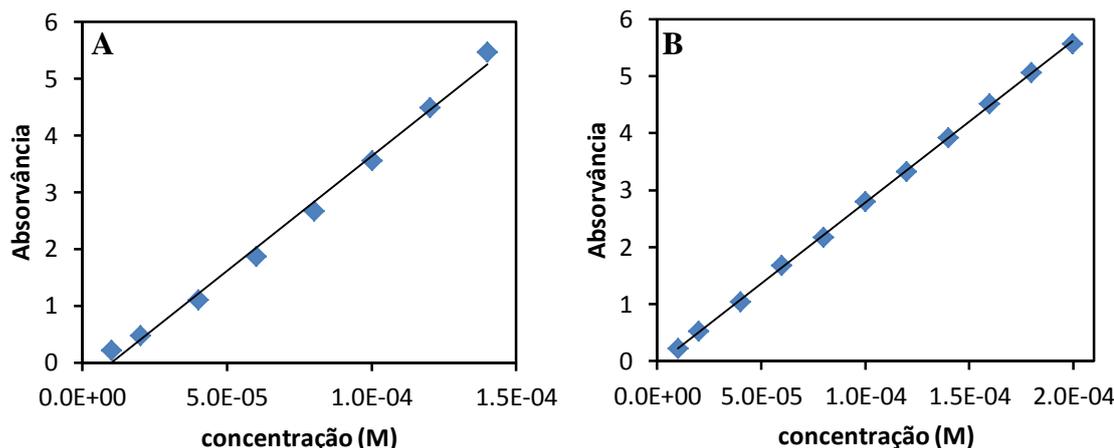
coordenadas nucleares associadas a diferentes diagramas de superfície de energia potencial, indicando que o composto não tem uma estrutura rígida.

Por comparação dos espectros de absorção e de emissão dos complexos dos ligando L4 e L5 não se verificam, como seria de esperar, diferenças nos espectros com a presença de um metal complexado nos ligandos, uma vez que o grupo fenil-benzotiazol está separado do macrociclo por um espaçador, não interagindo com o cromóforo.

Na Figura 3.3 foram sobrepostos e normalizados os espectros de absorção com o espectro de excitação de emissão de fluorescência do ligando L4 e L5 livres. O espectro de excitação foi recolhido fixando-se o comprimento de onda no máximo de emissão de fluorescência e variando-se o comprimento de onda de excitação. O espectro de excitação baseia-se no facto de que o comprimento de onda do máximo de emissão de fluorescência é independente do comprimento de onda de excitação, desde que a excitação seja suficientemente energética para ocorrer transição electrónica (regra de Kasha). Isto dá-se porque a emissão de fluorescência ocorre sempre a partir do estado excitado de menor energia ( $S_1$ ) para o estado fundamental ( $S_0$ ), exceptuando-se alguns casos especiais como o azuleno em que a emissão pode ocorrer a partir do estado  $S_2$  para o estado  $S_0$ <sup>137</sup>. Desta forma, o espectro de excitação pode servir para identificar qual a transição envolvida na emissão de fluorescência, uma vez que a banda de fluorescência é a imagem-espelho da banda de absorção associada à transição electrónica envolvida na fluorescência. A partir da Figura 3.3 verificamos que a transição envolvida na fluorescência, que é imagem-espelho da banda de absorção, é uma transição  $S_0 \leftarrow S_1$ , seguindo a regra de Kasha.



**Figura 3.3-** – Espectro de excitação de fluorescência (vermelho) e de absorção (azul) do ligando L4 (linhas a cheio) e L5 (linhas a tracejado) em solução aquosa com tampão fosfato de sódio 10mM, pH=7.4.



**Figura 3.4-** Absorbância dos complexos TbL4 **A)** e GdL5 **B)** em solução aquosa com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7.4, em função da concentração.

Um outro dado importante que pode ser retirado do espectro de excitação de fluorescência é a identificação de alguma impureza em solução, uma vez que a emissão corresponde apenas ao composto em estudo, e se o espectro de excitação não corresponder ao espectro de absorção, poderá haver alguma impureza que esteja a absorver na janela espectral estudada. A Figura 3.3 mostra que para ambos os ligandos o espectro de excitação de fluorescência e de absorção são sobreponíveis, evidenciando que não há impurezas presentes que possam absorver.

A determinação do coeficiente de absorção molar foi realizada para os complexos TbL4 e GdL5 e não directamente para os ligandos, uma vez que a determinação das concentrações de *stock* iniciais foram realizadas por BMS, em que é necessária a presença de um composto paramagnético como é o caso do  $Tb^{3+}$  e  $Gd^{3+}$ , sendo uma técnica mais simples de determinação das concentrações iniciais do que as técnicas de titulação manuais. Como tínhamos verificado que não há interacção entre o macrociclo e o cromóforo, por se encontrarem separados por um espaçador, a presença de um ião metálico no macrociclo não afecta o valor do coeficiente de absorção molar, podendo este valor ser utilizado para os restantes complexos, inclusivamente para o ligando livre. O coeficiente de absorção molar foi obtido a partir do declive da recta de calibração da absorção no comprimento de onda do máximo de absorção dos complexos a 330 e 360 nm, para o TbL4 e GdL5 respectivamente, em função da concentração (Figura 3.4). O valor obtido para o TbL4 foi  $\epsilon = 40500 \pm 3300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e para o complexo GdL5 foi  $\epsilon = 28400 \pm 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

O processo de absorção, à luz da mecânica Quântica, envolve a interacção entre três ondas, duas funções de onda correspondentes ao estado fundamental e excitado do electrão e a onda da radiação electromagnética da luz incidente. A eficiência da onda do fóton incidente para

perturbar a posição e o momento do electrão do estado fundamental de modo a transitar para a posição e momento correspondente ao estado excitado é medida pela força do oscilador que a onda electromagnética exerce no dipolo formado entre o núcleo e o electrão. A determinação se uma transição é permitida ou não para a absorção por parte de um dipolo eléctrico entre dois estados energéticos  $E_1$  e  $E_2$  é calculada pelo momento de transição de dipolo ( $M_{12}$ ):

$$M_{12} = \int \psi_1 \hat{\mu} \psi_2 \quad (3.3)$$

em que  $\psi_1$  e  $\psi_2$  são as funções de onda do estado fundamental e excitado e  $\hat{\mu}$  é o operador do momento de dipolo que traduz o efeito da radiação electromagnética em acoplar os dois estados energéticos. As duas funções de onda devem-se sobrepor no espaço e a simetria das funções de onda combinadas com as propriedades de simetria do operador do momento de dipolo, devem resultar num integral diferente de zero para que ocorra a transição. Se devido à simetria o integral é zero, a transição é proibida, o que resulta nas chamadas regras de selecção<sup>136</sup>.

A probabilidade de transição para a absorção é dada pelo quadrado do momento de transição dipolar  $|M_{12}|$ . No entanto, existe uma variedade de termos usados para descrever a probabilidade de absorção, incluindo o coeficiente de absorção molar, os coeficientes de Einstein e a força do oscilador. A força do oscilador, que mede a força de acoplamento necessário para promover a transição, é uma ideia útil, onde é usado um valor relativo em vez de absoluto, usando a referência do “oscilador ideal” de um electrão livre, em que a transição é completamente permitida e com valor unitário. O coeficiente de absorção molar como vimos anteriormente, assim como os coeficientes de Einstein traduzem valores absolutos de probabilidade de transição. Todos estes termos são derivados do momento de transição de dipolo<sup>136</sup>.

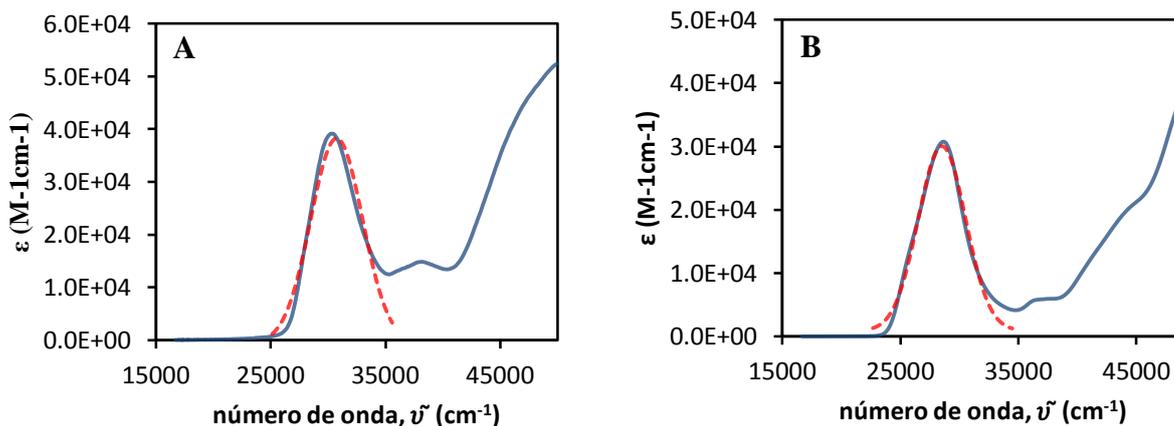
A força do oscilador,  $f$ , é calculada através do integral do espectro de absorção (CAI, coeficiente de absorção molar integrada) onde é colocado o coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) em função do número de onda ( $\tilde{\nu}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>136</sup>:

$$\text{CAI} = \int_0^{\infty} \epsilon(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (3.4)$$

A força do oscilador é então dada por<sup>136</sup>:

$$f = 4.33 \times 10^{-9} \int_0^{\infty} \epsilon(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (3.5)$$

A partir do espectro de absorção em termos do coeficiente de absorção molar ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) em função do número de onda  $\tilde{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) para o TbL4 e GdL5 (Figura 3.5), foi efectuado o ajuste da banda de absorção principal com uma função gaussiana para sua respectiva integração de modo a obter o valor de CAI. A partir deste valor obtém-se a força do oscilador, que para o complexo TbL4 é de 0.90 e para o complexo GdL5 é de 0.68, sendo estes valores bastante



**Figura 3.5-** Espectro de absorção em termos de coeficiente de absorção molar em função do número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) do complexo TbL4 **A)** GdL5 **B)** em solução aquosa com tampão fosfato de sódio 10mM, pH= 7.4, com o respectivo ajuste da banda de absorção com uma função gaussiana (linha tracejado vermelho).

elevados mostrando o carácter permitido da transição de absorção. Na Tabela 3.1 são apresentados de forma resumida os parâmetros obtidos do estudo fotofísico dos ligandos L4 e L5, fazendo a aproximação de que as propriedades fotofísicas do fenil-benzotiazol conjugado são independentes da presença de um metal. A determinação e discussão dos rendimentos quânticos de fluorescência e respectivos tempos de vida serão discutidos na secção 3.3.3.

A obtenção da resolução vibracional dos compostos pode ser realizada a baixa temperatura, nomeadamente à temperatura do azoto líquido (77 K), onde os movimentos translacionais e rotacionais estão restritos. Os espectros foram obtidos em solução de etanol, por razões de facilidade experimental, uma vez que soluções aquosas em estado sólido formam um vidro, que dispersa a luz tornando difícil a aquisição do espectro.

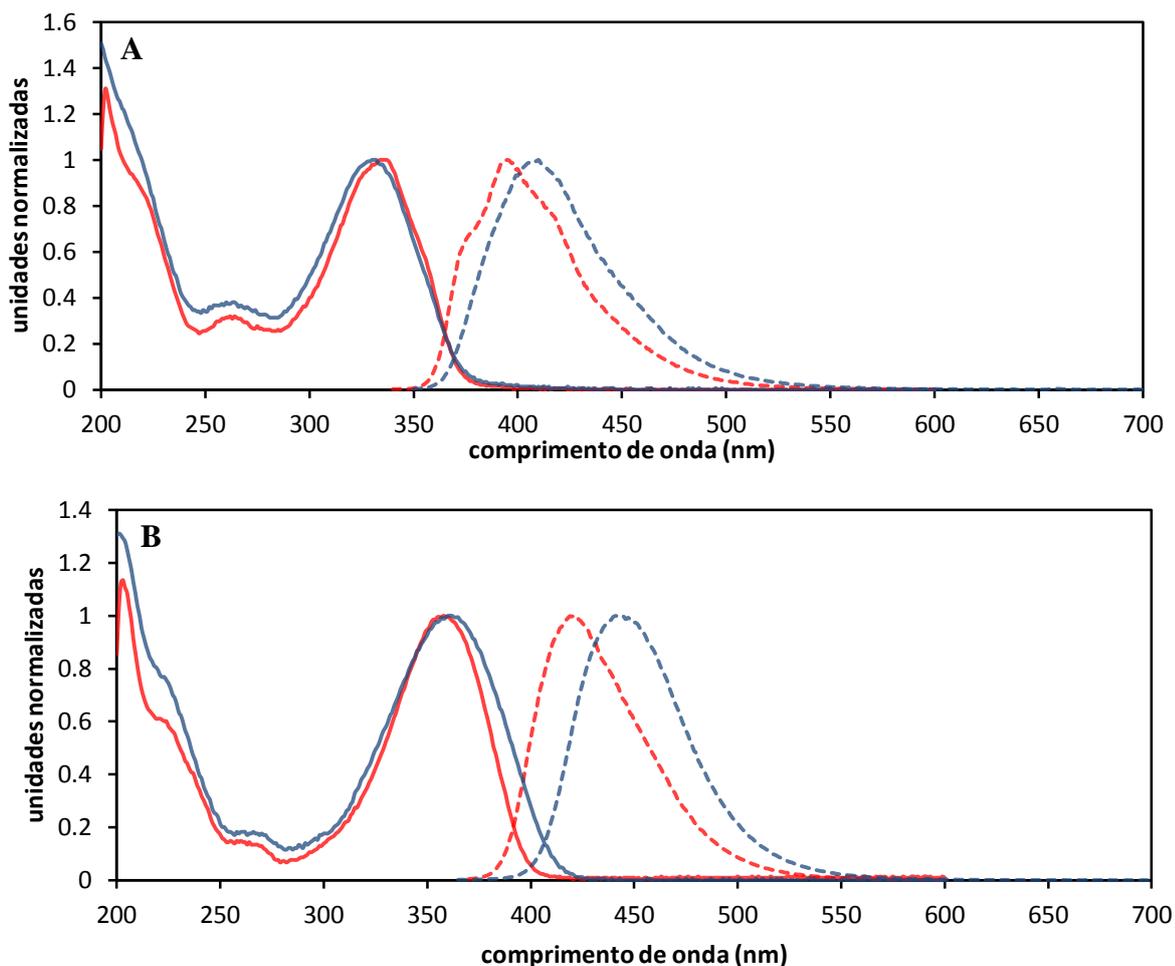
Da comparação dos espectros de absorvância e de fluorescência dos ligandos L4 e L5 em solução aquosa e em etanol a 298 K, são evidentes algumas diferenças, decorrentes da alteração da polaridade do solvente (Figura 3.6). Tanto no ligando L4 como no L5, o espectro de absorção nos dois solventes é bastante similar. No entanto, no espectro de fluorescência são evidentes

**Tabela 3.1-** Parâmetros obtidos do estudo fotofísico dos ligandos L4 e L5.

	$\lambda^{\max}$ de absorção (nm)	$\lambda^{\max}$ de emissão (nm)	Energia do estado singleto kJ/mol, ( $\text{cm}^{-1}$ )	Coefficiente de absorção molar ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	Força do oscilador ( $f$ )
<b>L4</b>	330	410	324.40 (27100)	40500±3300	0.90
<b>L5</b>	360	445	294.12 (24570)	28400±350	0.68

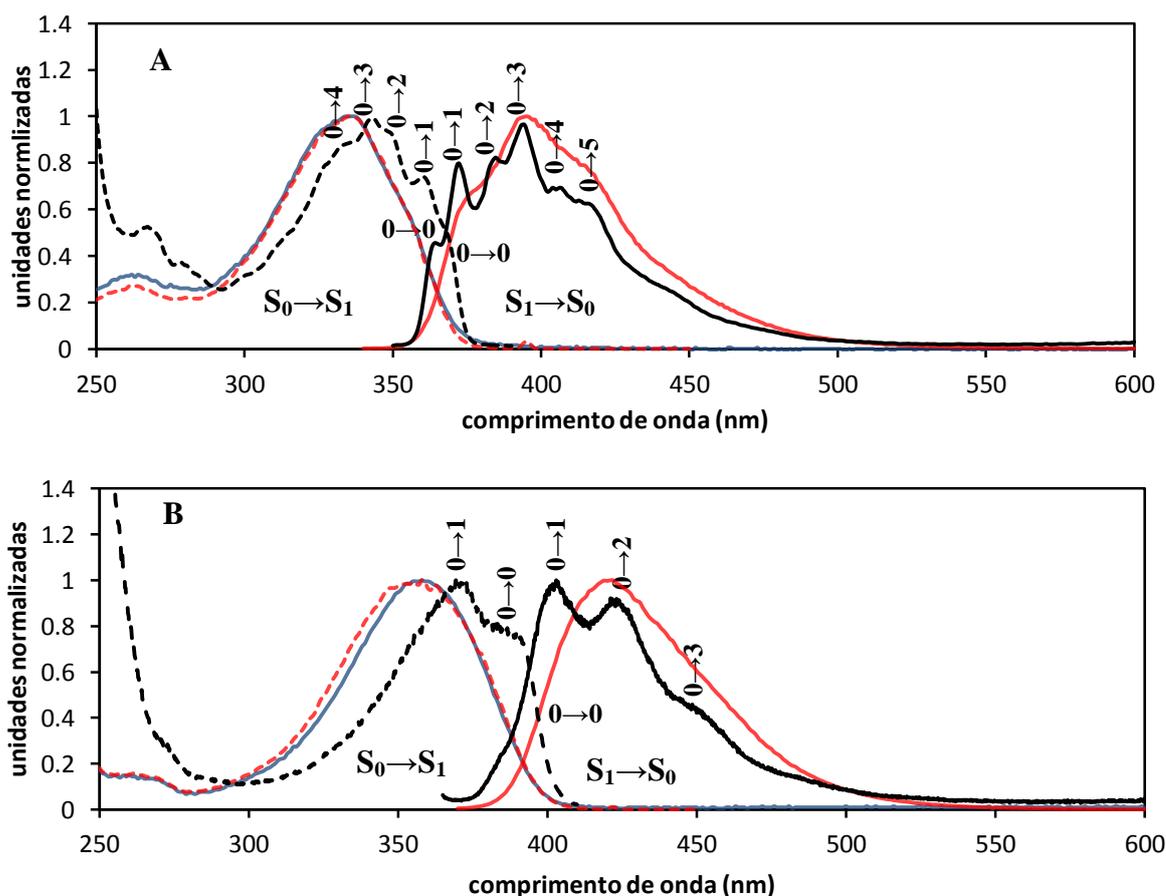
desvios para o azul (desvio hipsocrômico) em ambos os casos, demonstrando que o estado singlete excitado ( $S_1$ ) aumenta de energia, justificado pela diminuição da polaridade do solvente etanol comparativamente à água, provocando aumento de energia na transição  $\pi^* \leftarrow \pi$ . No espectro em etanol do ligando L4 é visível alguma resolução vibracional e diminuição do desvio de Stokes, demonstrando o carácter conformacionalmente mais rígido do estado excitado em etanol comparativamente ao estado excitado em solução aquosa. O menor desvio de Stokes verificado para ambos os ligandos em solução de etanol, é explicado pelo menor deslocamento das coordenadas nucleares do estado excitado comparativamente ao estado fundamental, explicado pelo princípio de Franck-Condon, enunciado anteriormente.

À temperatura do azoto líquido é possível verificar as várias transições vibrônicas tanto do estado excitado para o estado fundamental como do estado fundamental para o estado excitado através dos espectros de fluorescência e dos espectros de excitação de fluorescência, respectivamente (Figura 3.7). É possível verificar que os espectros de fluorescência a 77 K são



**Figura 3.6-** Espectros de absorção (linhas a cheio) e de fluorescência (linhas a tracejado) em etanol (linhas a vermelho) e em solução aquosa com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4, à temperatura ambiente (linhas a azul) para o ligando L4 **A**) e o ligando L5 **B**).

significativamente diferentes entre os ligandos L4 e L5. Tal como tinha sido verificado no início, a parte do fenil-benzotiazol em ambos os ligandos é bastante similar, no entanto, pequenas alterações estruturais podem afectar grandemente as propriedades fotofísicas e vibracionais. Como podemos verificar para o ligando L4, o espectro de fluorescência a 77 K, é o que apresenta maior resolução vibracional onde é possível ver um maior número de transições vibrônicas do nível vibracional 0 do estado excitado singlete ( $S_1$ ) para os vários níveis vibracionais do estado fundamental ( $v=0,1,\dots,5$ ), demonstrando a maior rigidez conformacional do estado excitado do L4 comparativamente ao seu estado fundamental e ao estado fundamental e excitado do L5. No entanto, é possível concluir que em ambos os ligandos o estado excitado apresenta maior rigidez conformacional que o estado fundamental, uma vez que é visível maior resolução vibracional no espectro de fluorescência comparativamente ao espectro de excitação de emissão de fluorescência.



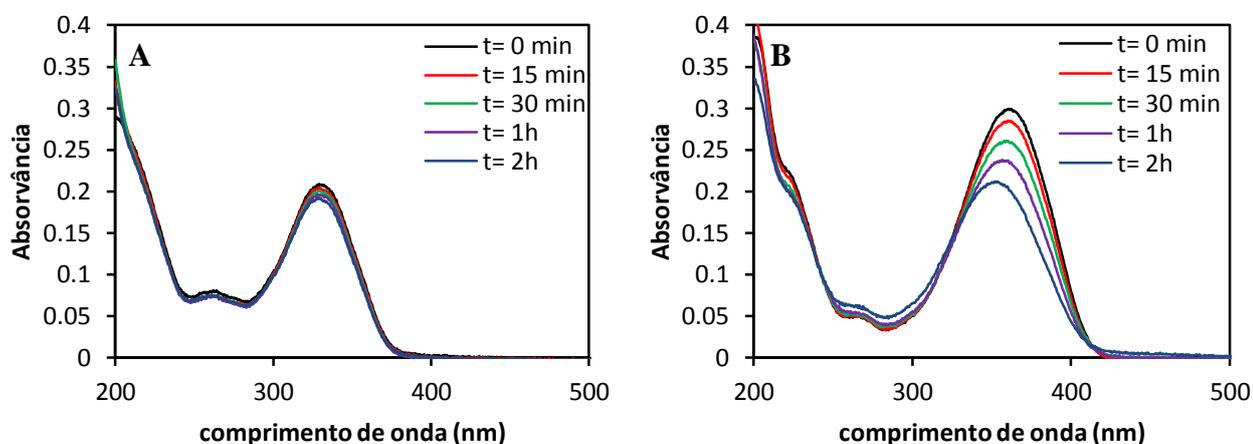
**Figura 3.7-** Espectros de absorção à temperatura ambiente (linhas a azul), de fluorescência a 298 K (linha a cheio a vermelho), espectro de excitação de fluorescência a 298 K (linha vermelho a tracejado), e os espectros de fluorescência a 77K (linha a cheio preto) e o respectivo espectro de excitação de fluorescência a 77 K (linha tracejado preto) dos ligandos L4 **A**) e L5 **B**) em etanol.

Dos espectros a baixa temperatura é ainda possível verificar onde há maior sobreposição da função de onda vibracional do estado fundamental para o estado excitado e vice-versa, que traduz a maior probabilidade de uma determinada transição vibrónica ocorrer, que pode ser visualizada no espectro pela banda de maior intensidade. No ligando L4, o vibrónico mais intenso do estado excitado para o estado fundamental é  $\nu=3 \leftarrow \nu=0$  e do estado fundamental para o estado excitado também é  $\nu=3 \leftarrow \nu=0$ . No caso do ligando L5, o vibrónico mais intenso do estado excitado para o estado fundamental é o  $\nu=1 \leftarrow \nu=0$ , e do estado fundamental para o estado excitado parece ser também a transição associada a  $\nu=1 \leftarrow \nu=0$ .

### 3.3.2 Estudo da fotoestabilidade dos ligandos

O estudo da fotoestabilidade dos compostos é de grande importância uma vez que se pretende usar a sonda em Imagiologia Óptica. Por isso, a sonda tem de ser estável na presença de luz e não se degradar quando irradiada. Foram preparadas soluções dos ligandos L4 e L5 em meio aquoso com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH= 7.4, e estas soluções foram irradiadas a 350 nm em células de 1 cm dentro de um fotoreactor.

A Figura 3.8 mostra que o ligando L4 ao longo de 2 horas de irradiação manteve a sua absorvância aproximadamente constante, não tendo sofrido degradação significativa, concluindo-se assim que o ligando L4 é fotoestável. Por outro lado, na Figura 3.8 é visível que a absorvância do ligando L5, ao longo de 2 horas, vai diminuindo em consequência da sua diminuição de concentração, demonstrando-se assim que o ligando L5 é fotodegradável.



**Figura 3.8-** Espectro de absorção obtido a diferentes tempos de irradiação para o ligando L4 **A)** e L5 **B)** em solução aquosa com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH= 7.4.

Com este estudo não é possível averiguar o mecanismo de degradação nem o conhecimento dos fotoprodutos. No entanto, nos espectros obtidos ao longo do tempo de irradiação do ligando L5 nota-se um desvio no comprimento de onda do máximo de absorção, evidenciando uma alteração estrutural, decorrente de uma possível reacção fotoquímica. É possível verificar dois pontos isobésticos a 240 nm e a 325 nm, em que o espectro de absorção de um composto desaparece para surgir o espectro de absorção de outro composto, indicando que provavelmente o mecanismo de degradação é a transformação do ligando L5 num outro composto. No entanto, para este tipo de conclusões mais estudos são necessários, o que não é o objectivo deste trabalho, sendo apenas importante confirmar a fotoestabilidade dos ligandos.

A utilização do ligando L5 como sonda para Imagiologia Óptica, com a complexação de iões metálicos emissores, poderá ser problemática uma vez que o ligando é fotodegradável. Por outro lado, o ligando L4 é fotoestável e perspectiva-se que possa efectivamente funcionar como sonda imagiológica.

### **3.3.3 Determinação de rendimentos quânticos e tempos de vida de fluorescência**

O rendimento quântico ( $\Phi$ ), de uma forma generalizada, relaciona a velocidade de absorção de fótons (ou quanta) com a velocidade de qualquer processo de interesse, e integrado ao longo do tempo dá o quociente entre o número total de eventos de interesse e o número total de fótons absorvidos, sendo portanto um parâmetro que reflecte a eficiência de um determinado processo. De acordo com a lei de Stark-Einstein, o rendimento quântico deve ser igual ou menor que um, porém se houver processos secundários este valor pode ser superior a 1. Quando falamos em rendimento quântico de emissão, referimo-nos à razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos<sup>136</sup>.

O rendimento quântico e os tempos de vida de fluorescência foram determinados para os ligandos livre, L4 e L5, e para os seus respectivos complexos com o ião  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  (Figura 3.9 e Tabela 3.2). De uma forma generalizada os valores obtidos de rendimento quântico de fluorescência são elevados, demonstrando a boa eficiência de fluorescência dos compostos. Para os tempos de vidas de fluorescência foram obtidos valores curtos, entre 1 e 2 ns.

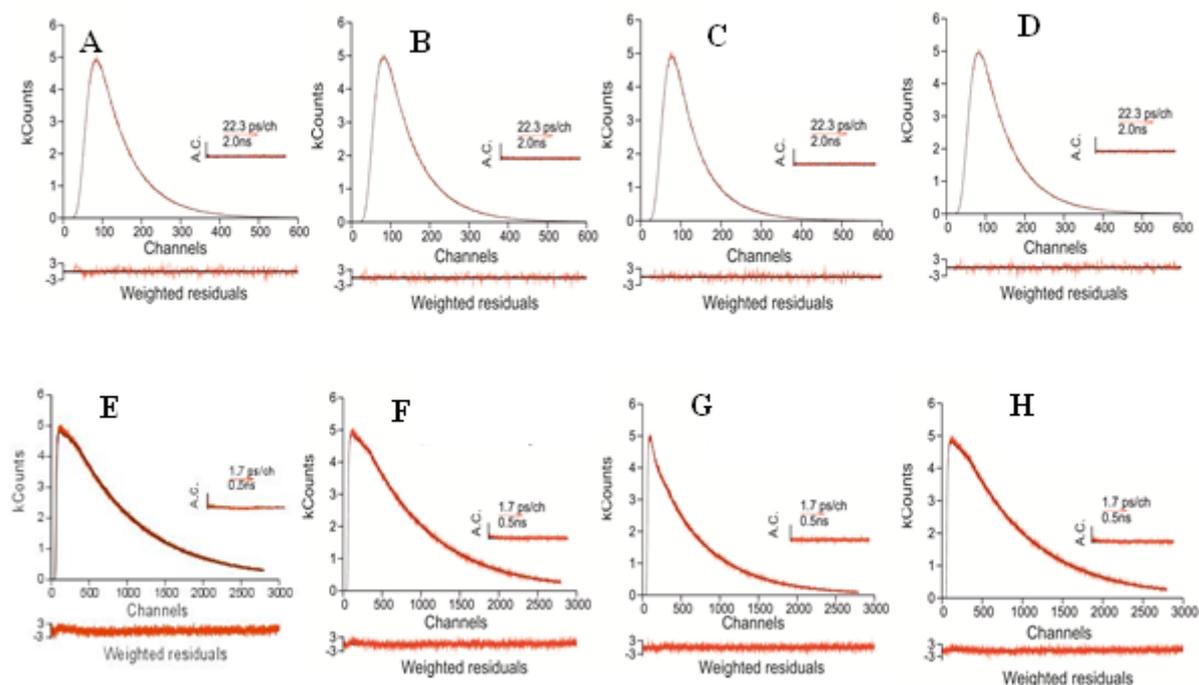
Os ligandos livres L4 e L5 apresentam valores de rendimento quântico de fluorescência e de tempos de vida similares. O ligando L4 apresenta um rendimento quântico de 0.611 e um

tempo de vida de 1.80 ns, ao passo que o ligando L5 tem um rendimento quântico de 0.644 e um tempo de vida de 1.56 ns. Com a presença de um íon metálico emissor no macrociclo é esperado que este funcione como supressor (do inglês *quencher*) de fluorescência do estado excitado  $S_1$ , com a formação de uma nova rota de desactivação do estado excitado, com a consequente redução do rendimento quântico de fluorescência e do tempo de vida de fluorescência. Neste caso o cromóforo, fenil-benzotiazol, funciona como doador (efeito antena), que transfere energia para um aceitador, o centro metálico. No entanto, a transferência de energia não é directa do estado excitado  $S_1$  para os estados excitados do metal, sendo provavelmente a partir do estado  $T_1$  do cromóforo, após cruzamento de intersistemas, favorecido pelo efeito de átomo pesado do enxofre<sup>138</sup>. Desta forma, a eficiência de supressão do estado  $S_1$  não é directamente comparável à eficiência efectiva de transferência de energia do cromóforo para os estados excitados do centro metálico, uma vez que não é este estado electrónico que transfere energia, mas dá uma boa indicação, uma vez que a presença do íon metálico induz supressão do estado  $S_1$ . Este processo de transferência de energia é de extrema importância para o uso destas sondas em Imagiologia Óptica com íões metálicos da série dos lantanídeos, visto que a transição electrónica directa nestes íões (4f-4f) é proibida por simetria. Desta forma, devido ao efeito antena, há aumento da população no estado excitado do íon metálico com o consequente aumento do rendimento quântico de luminescência.

**Tabela 3.2** – Resultados obtidos dos rendimentos quânticos de fluorescência e dos tempos de decaimento de fluorescência adquiridos através da técnica TCSPC para os ligandos livres L4 e L5 e respectivos complexos em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH= 7.4. O ajuste dos dados adquiridos foi realizado com uma curva mono-exponencial para os ligandos livre e os complexos com  $La^{3+}$  e  $Tb^{3+}$ . No caso dos complexos com  $Eu^{3+}$  os tempos de decaimento são melhor ajustados com uma curva bi-exponencial e para cada um dos tempos de vida são apresentados as contribuições de cada uma destas componentes na curva de decaimento ( $a_{ij}$ ).

	Rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ )	$\tau_1$ (ns) ( $a_{ij}$ )	$\tau_2$ (ns) ( $a_{ij}$ )	Eficiência de desactivação do estado $S_1$ ( $\eta$ ) <sup>a)</sup>
<b>L4</b>	0.611±0.015	1.80		
<b>LaL4</b>	0.607±0.021	1.82		-
<b>EuL4</b>	0.490±0.016	1.66 (0.691)	0.88 (0.309)	0.198
<b>TbL4</b>	0.606±0.016	1.78		0.00818
<b>L5</b>	0.644±0.031	1.56		
<b>LaL5</b>	0.624±0.021	1.49		-
<b>EuL5</b>	0.351±0.017	1.18 (0.664)	0.170 (0.336)	0.455
<b>TbL5</b>	0.602±0.025	1.49		0.0652

- a) A eficiência de supressão do estado  $S_1$  do cromóforo é calculada através da razão do rendimento quântico de fluorescência entre o ligando livre ( $\Phi_F^0$ ) e o complexo com um íon metálico ( $\Phi_F^{Ln^{3+}}$ ) através de:  $\eta = 1 - \frac{\Phi_F^{Ln^{3+}}}{\Phi_F^0}$ .



**Figura 3.9-** tempos de decaimento de fluorescência adquiridos através da técnica TCSPC e com o ajuste dos dados adquiridos com uma curva mono-exponencial para os ligandos livre e dos complexos com  $\text{La}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$ . No caso dos complexos com  $\text{Eu}^{3+}$  os tempos de decaimento são melhor ajustados com uma curva bi-exponencial. L4 **A**), LaL4 **B**), EuL4 **C**), Tbl4 **D**), L5 **E**), LaL5 **F**), EuL5 **G**) e Tbl5 **H**) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH= 7.4.

Relativamente aos complexos com o íon metálico diamagnético  $\text{La}^{3+}$  não há alteração significativa do rendimento quântico assim como do tempo de vida de fluorescência, em comparação aos respectivos ligandos livres, o que já era espectável uma vez que o íon  $\text{La}^{3+}$  não é luminescente por não possuir electrões nas orbitais f. Como tal não há transferência de energia do fenil-benzotiazol para o centro metálico, e o íon  $\text{La}^{3+}$  não funciona como supressor do estado excitado  $S_1$  do cromóforo.

Para os complexos com o centro metálico de  $\text{Eu}^{3+}$  verifica-se uma redução tanto no rendimento quântico como no tempo de vida de fluorescência do ligando, indicando que o  $\text{Eu}^{3+}$  funciona como supressor, havendo transferência de energia do cromóforo para o centro metálico. O decaimento de fluorescência tanto no EuL4 como no EuL5 segue uma cinética bi-exponencial, onde um dos tempos de vida é próximo do valor obtido para o ligando livre, e o outro tempo de vida é significativamente inferior. Este fenómeno pode ser interpretado em termos dos mecanismos de transferência de energia. Independentemente do tipo, a eficiência de transferência é dependente de um factor de orientação entre o dador e o aceitador assim como da sua distância de separação, neste caso intramolecular. Desta forma, como em solução os complexos podem adoptar um grande número de conformações, poderá haver um equilíbrio entre complexos que adoptam uma conformação adequada em que o cromóforo adopta uma

orientação e atinge uma distância de separação doador-aceitador adequada para a transferência de energia com um tempo de vida  $\tau_2$ , com complexos que não adoptam uma conformação adequada para transferência de energia, e desta forma têm um tempo de vida de fluorescência similar ao do ligando livre na ausência do supressor com um tempo de vida  $\tau_1$ . A redução do rendimento quântico de fluorescência assim como do  $\tau_2$  é mais acentuada no complexo EuL5 do que no complexo EuL4, reflectindo a maior eficiência de supressão do estado  $S_1$  no EuL5. No entanto, esta maior eficiência do EuL5, como veremos na secção 3.3.5, não se traduz num maior rendimento quântico de luminescência comparativamente ao EuL4, tendo este último complexo um rendimento quântico de luminescência cerca de uma ordem de grandeza superior ao EuL5. Isto pode ser explicado pelo maior número de rotas de desactivação do complexo EuL5 em relação ao EuL4, como veremos nas secções seguintes, sendo uma dessas rotas de desactivação provavelmente uma transferência de energia de volta do  $\text{Eu}^{3+}$  para o cromóforo.

Nos complexos com a presença de  $\text{Tb}^{3+}$  tanto no L4 como com L5 a redução do rendimento quântico de fluorescência assim como do tempo de vida de fluorescência é pouco significativa ou mesmo inexistente, demonstrando a fraca capacidade de supressão do estado  $S_1$  do fenil-benzotiazol pelo ião  $\text{Tb}^{3+}$ .

Deste estudo perspectiva-se que a utilização destas sondas para Imagiologia Óptica seja mais favorável para os complexos com  $\text{Eu}^{3+}$  do que para os complexos com  $\text{Tb}^{3+}$ , devido à maior eficiência de supressão do estado  $S_1$  do cromóforo nos complexos com  $\text{Eu}^{3+}$ , sendo esta informação apoiada pelo maior rendimento quântico de luminescência obtido para os complexos com  $\text{Eu}^{3+}$  (secção 3.3.5).

### 3.3.4 Estudo do estado tripleto

A transição electrónica  $T_1 \leftarrow S_0$  é uma transição proibida pela Mecânica Quântica pela regra de selecção de spin, que enuncia que para uma transição electrónica ser permitida, a multiplicidade de spin deve-se manter inalterada ( $\Delta S=0$ ). O que acontece em cromóforos orgânicos é a transição electrónica do estado fundamental singlete ( $S_0$ ) para um estado electrónico singlete excitado ( $S_N$ ) que decai para o estado singlete excitado de menor energia ( $S_1$ ). A partir do estado  $S_1$  pode ocorrer cruzamento intersistemas para um nível do estado tripleto isoenergético que subsequentemente decai para o estado tripleto de menor energia ( $T_1$ ). De igual forma, o processo de cruzamento de intersistemas é proibida, levando a que seja um processo com uma cinética lenta com tempos de vida na ordem dos  $\mu\text{s}$  aos s. No entanto, a

presença de átomos pesados na estrutura do composto provoca o chamado efeito de átomo pesado, em que ocorre acoplamento spin-órbita tornando a transição parcialmente permitida. Devido ao tempo de vida longo do estado tripleto, normalmente há vários mecanismos de supressão do estado  $T_1$ , nomeadamente por processos não-radiativos de conversão interna para o estado fundamental, ou supressão pelo oxigénio presente em solução ou no presente trabalho o estado tripleto irá ser suprimido pelos iões lantanídeos ( $Ln^{3+}$ ) por transferência de energia  $Ln^{3+} \leftarrow T_1$ <sup>139,140</sup>.

Nos composto aqui estudados, ambos os ligandos apresentam um átomo de enxofre na estrutura do benzotiazol, e devido ao seu efeito como átomo pesado é expectável haver cruzamento intersistemas e aumento da população do estado tripleto,<sup>138</sup> o qual em solução desarejada irá sofrer supressão por transferência de energia para os átomos de lantanídeo, com a consequente redução do tempo de vida do estado tripleto. A energia do estado tripleto ( $T_1$ ) é determinada através do estudo de fosforescência (pela transição  $S_0 \leftarrow T_1$ ) ou por um método de transferência de energia tripleto-tripletto desenvolvido por Bensasson e Land que envolve povoar o estado tripleto do composto em estudo (aceitador) por um doador, a referência, cuja energia do estado tripleto é conhecida. Desta forma se o estado tripleto do composto em estudo for suprimido pela referência, o nível de energia do estado tripleto do composto em estudo encontra-se acima do nível de energia do estado tripleto da referência. Se o estado tripleto do composto não for suprimido pela referência então o nível de energia do estado tripleto encontra-se abaixo da referência<sup>136</sup>. No entanto, por questões técnicas e de tempo não se determinou a energia do estado  $T_1$ , mas podemos estimar que a energia do estado tripleto ( $T_1$ ) dos compostos aqui estudados seja próximo do valor obtido para o 2-fenil-benzothiazol, que é similar ao cromóforo conjugado nos ligandos aqui desenvolvidos, e portanto é uma boa aproximação. A energia do estado  $T_1$  para o 2-fenil-benzothiazol em solvente polar é  $E_T = 250 \text{ kJ mol}^{-1}$  ( $\tilde{\nu} = 20870 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 479 \text{ nm}$ )<sup>141</sup>.

A identificação do estado tripleto foi realizada pela obtenção dos espectros de diferença de densidades ópticas transiente, resolvido no tempo em nano-segundos, usando um espectrómetro de flash fotólise com excitação a 355 nm. A aquisição dos espectros de absorção transiente dos ligandos L4 e L5, em equilíbrio com ar, mostrou haver supressão do sinal pelo oxigénio atmosférico dissolvido em solução, com a consequente diminuição do tempo de vida, comprovando que a espécie transiente em ambos os casos é um estado tripleto. Neste tipo de espectros foi possível estudar a transição electrónica  $T_n \leftarrow T_1$  e foi medido o tempo de vida do estado tripleto em soluções desarejadas. Do espectro de absorção transiente a banda com valores negativos de variação de densidade óptica ( $\Delta.O.$ ) demonstra a depleção do composto do estado

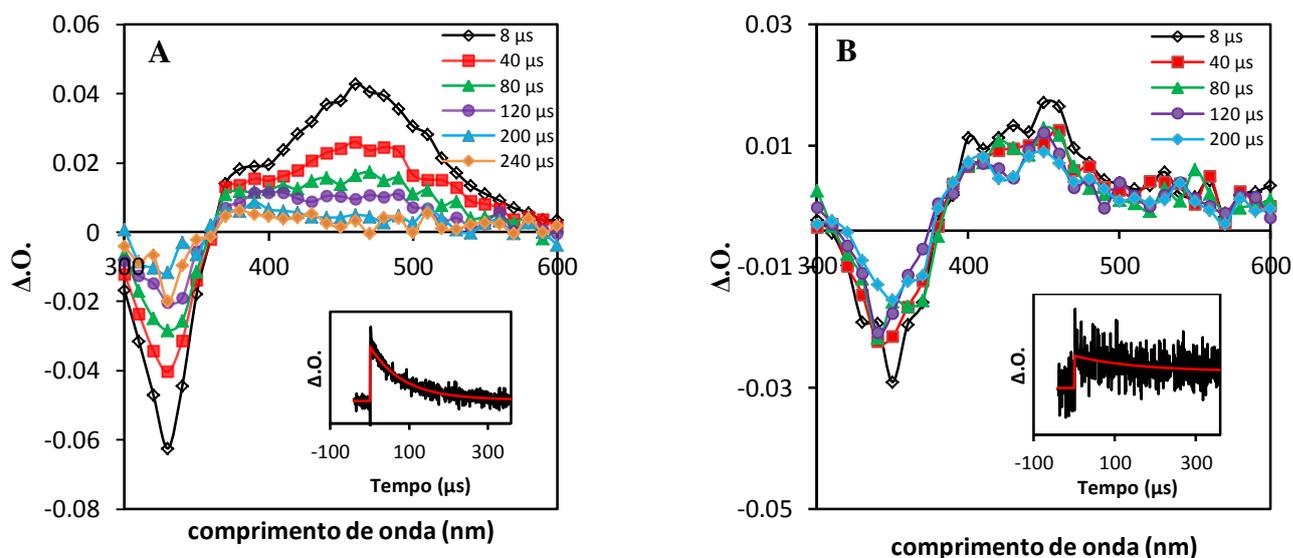
fundamental para o estado tripleto. A banda com valores positivos de  $\Delta.O.$  é referente possivelmente à transição  $T_2 \leftarrow T_1$  em que o comprimento de onda do máximo de  $\Delta.O.$  para o ligando L4 é a 460 nm e para o ligando L5 é a 450 nm (Figura 3.10). De salientar que a fraca qualidade do espectro de absorção transiente obtido para o ligando L5 advém do facto do ligando ser fotodegradável como demonstrado na secção 3.3.2, e com a utilização de um laser o composto vai-se degradando, com a conseqüente diminuição da sua concentração em solução. Do estudo do tempo de vida do estado tripleto foi obtida uma cinética de primeira ordem, com tempos de vida de 94  $\mu\text{s}$  e 153  $\mu\text{s}$  para o ligando L4 e L5, respectivamente (Figura 3.10 e Tabela 3.3).

A incorporação de um ião metálico da série dos lantanídeos neste tipo de ligandos não altera o máximo de absorção de transiente, uma vez que o cromóforo está separado do macrociclo, não havendo interacção directa entre ambos, e portanto, verificou-se que os espectros de absorção transiente dos complexos são iguais aos respectivos espectros dos ligandos livres. No entanto, é esperado que o ião metálico provoque supressão do estado tripleto devido à transferência intramolecular de energia deste estado para um dos estados excitados do ião metálico, provocando uma diminuição do tempo de vida do estado tripleto, à semelhança do que tínhamos visto no estudo do decaimento de fluorescência (secção 3.3.3). Para ocorrer uma transferência energética eficiente, com conseqüente rendimento quântico de luminescência elevado, a regra empírica de Latva<sup>142</sup> sugere que a diferença energética ( $\Delta E$ ) entre o estado tripleto  $T_1$  e o estado excitado emissor do ião metálico deva ser entre 1850-5000  $\text{cm}^{-1}$ , inclusive

**Tabela 3.3** – Resultados obtidos por flash fotólise com a obtenção da constante de decaimento do estado tripleto a 450 nm e respectivo tempo de vida para os ligandos livres L4 e L5 e respectivos complexos em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH= 7.4.

	<b>P(2) <math>\lambda=450 \text{ nm}^{\text{a}}</math></b>	<b><math>\tau</math> (<math>\mu\text{s}</math>)<sup>b</sup></b>
<b>L4</b>	$1.06 \times 10^4$	94
<b>LaL4</b>	$1.17 \times 10^4$	85
<b>EuL4</b>	$1.46 \times 10^4$	68
<b>TbL4</b>	$1.15 \times 10^4$	87
<b>L5</b>	$6.53 \times 10^3$	153
<b>LaL5</b>	$6.58 \times 10^3$	152
<b>EuL5</b>	$1.53 \times 10^5$	4.06
<b>TbL5</b>	$8.36 \times 10^3$	121

- a) Constante de decaimento do estado tripleto ( $T_1$ ) pelo ajuste dos dados experimentais da diferença de absorção transiente ( $\Delta.O.$ ), a 450 nm, com uma equação de cinética mono-exponencial ( $\Delta.O. = P(1) \times e^{-P(2)t} + P(3)$ ).
- b) Tempo de vida de decaimento do estado  $T_1$  ( $\tau=1/P(2)$ ).



**Figura 3.10-** Espectro de diferença de densidade óptica transiente resolvida no tempo em nanosegundos após um pulso de laser ( $\lambda_{\text{ex}}= 330$  A), 350 B)) com os decaimentos do estado  $T_1$  a 450 nm para o ligando L4 **A**) e L5 **B**) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH= 7.4.

se  $\Delta E$  for inferior a  $1850 \text{ cm}^{-1}$  há transferência de energia de volta do ião metálico para o estado tripleto  $T_1$  do cromóforo. Desta forma, o ião lantânio ( $\text{La}^{3+}$ ), por não possuir electrões nas orbitais 4f e consequentemente também não possuir estados electrónicos excitados emissores na região visível-infravermelho próximo, não suprime o estado tripleto do cromóforo e, como podemos ver na Tabela 3.3 o tempo de vida do estado  $T_1$  fica praticamente inalterado com a presença de  $\text{La}^{3+}$ . Por outro lado, com a presença de  $\text{Eu}^{3+}$  no macrociclo há uma redução significativa do tempo de vida de  $T_1$  em ambos os complexos para  $68 \mu\text{s}$  e  $4.06 \mu\text{s}$  nos complexos  $\text{EuL4}$  e  $\text{EuL5}$ , respectivamente, demonstrando que o ião metálico  $\text{Eu}^{3+}$  é um bom supressor do estado  $T_1$ , ocorrendo uma transferência energética eficiente. No entanto, com a incorporação do ião  $\text{Tb}^{3+}$  a redução do tempo de vida  $T_1$  em ambos os complexos  $\text{TbL4}$  e  $\text{TbL5}$  não é tão pronunciada, o que indica que a transferência de energia não é muito eficiente para o ião metálico  $\text{Tb}^{3+}$ . Como veremos na secção 3.3.5, a diferença aproximada de energia entre  $T_1$  e o estado excitado emissor do  $\text{Tb}^{3+}$  ( ${}^5D_4$ ) nos complexos  $\text{TbL4}$  e  $\text{TbL5}$  é inferior a  $1850 \text{ cm}^{-1}$ , demonstrando a razão de não haver supressão significativa do estado tripleto nestes complexos.

### 3.3.5 Estudo da luminescência dos complexos

Como é sabido da literatura, a maioria dos íons da série dos lantanídeos são emissores na região visível e infravermelho próximo. No presente trabalho foi estudada a possibilidade dos ligandos desenvolvidos poderem ser usados como sondas em Imagiologia Óptica. Os íons metálicos escolhidos foram o  $Tb^{3+}$ , emissor no visível, e o íon  $Eu^{3+}$ , emissor no visível e infravermelho próximo. A escolha destes metais remete para o facto de apresentarem maior rendimento quântico de luminescência que os restantes íons da série dos lantanídeos e sobretudo o  $Eu^{3+}$  inclui ainda a vantagem de emitir no infravermelho próximo e portanto na janela terapêutica onde poucos constituintes biológicos absorvem ou emitem. Acresce ainda a vantagem de terem tempos de vida de luminescência em solução mais elevados que os restantes íons da série dos lantanídeos emissores no visível-infravermelho próximo que sofrem grande supressão pelo solvente, podendo ser realizada Imagiologia Óptica resolvida no tempo com maiores tempos de atraso de aquisição.

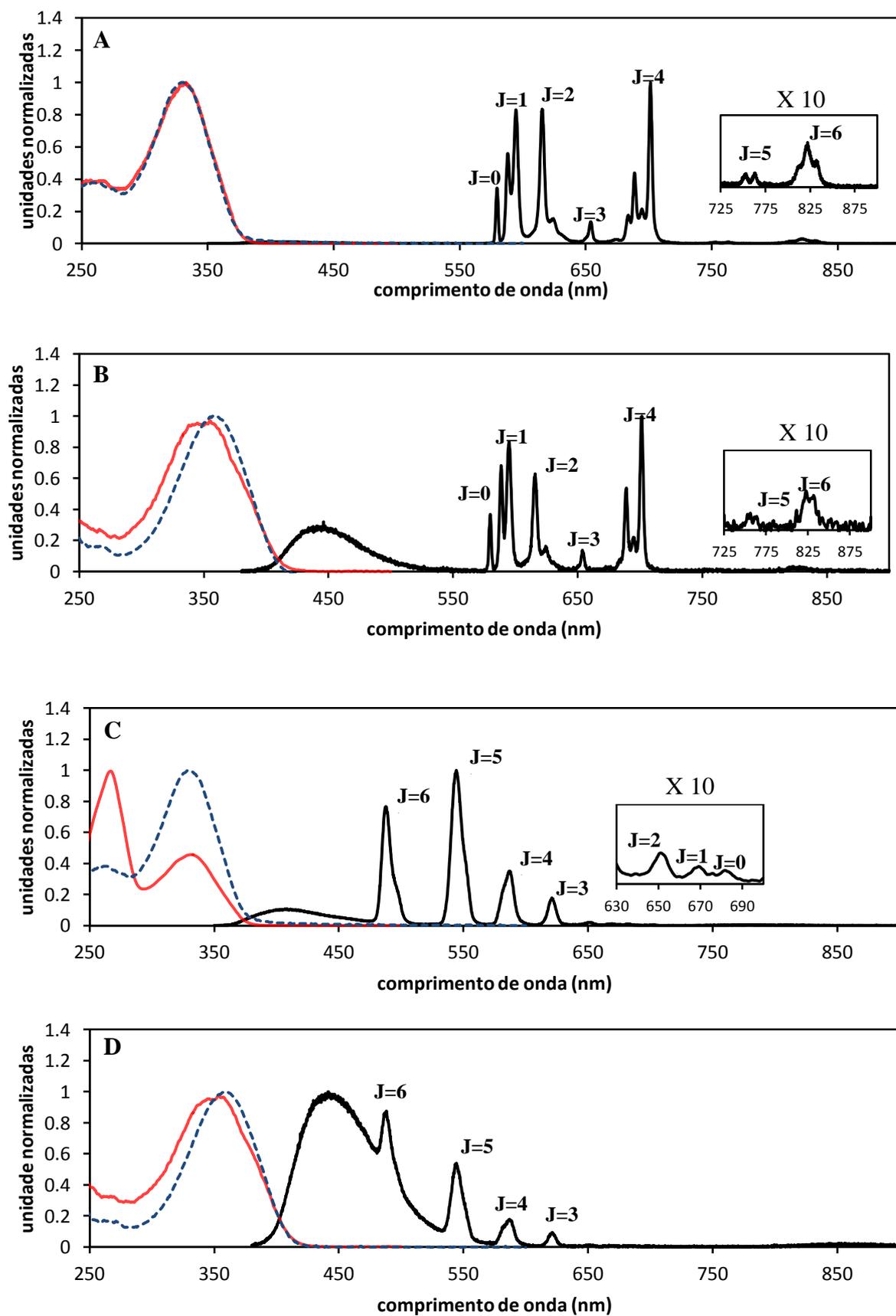
Como já tinha sido discutido anteriormente, os íons da série dos lantanídeos têm baixos coeficientes de absorção molar (normalmente  $1\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) devido à proibição por simetria da transição (regra de Laporte). Devido a esta proibição, o estado excitado do metal é povoado através de transferência de energia da porção do PiB após a sua excitação (efeito antena) sendo estudada a emissão de luminescência envolvendo o decaimento do metal do seu estado excitado emissor para os vários níveis do estado fundamental. As transições que envolvem a emissão dos complexos de  $Eu^{3+}$  têm lugar do seu estado excitado de mais baixa energia  $^5D_0$  para o estado fundamental  $^7F_j$ , ao passo que no complexo de  $Tb^{3+}$  as transições ocorrem do seu estado excitado de mais baixa energia  $^5D_4$  para o estado fundamental  $^7F_j$ . Na Figura 3.11 apresentam-se os espectros de emissão de luminescência dos complexos EuL4, EuL5, TbL4 e TbL5, com os respectivos espectros de absorção e espectros de excitação de luminescência.

Como referido anteriormente, a presença do metal no quelato não altera o espectro de absorção comparativamente ao ligando livre, demonstrado que o macrociclo e o cromóforo estão bem separados, não havendo qualquer tipo de interacção entre ambos. O espectro de excitação de luminescência corresponde bem ao espectro de absorção do respectivo complexo, indicando que efectivamente o fenil-benzotiazol é o cromóforo responsável pela formação do estado excitado do metal, nomeadamente a transição  $^*\pi \leftarrow \pi$  (Figura 3.11), por um mecanismo de transferência de energia através do estado tripleto  $T_1$  do cromóforo que sofre supressão, com redução do seu tempo de vida, na presença de um metal emissor (ver secção 3.3.4). No entanto, no caso do TbL4, apesar de os máximos das duas bandas do espectro de excitação de luminescência estarem

no mesmo comprimento de onda do respectivo espectro de absorção, existe uma diferença na intensidade relativa das bandas, o que poderá indicar a existência de um outro mecanismo de transferência de energia mais favorável, e que não seja o vulgar processo de transferência de energia de ressonância de Förster (do inglês *Förster Resonance Energy Transfer*, FRET). Este mecanismo de transferência baseia-se num processo de acoplamento através do espaço do momento de transição de dipolo entre as funções de onda do doador (fenil-benzotiazol) e do aceitador (o centro metálico). Os dados experimentais sugerem haver sobreposição espectral entre o estado tripleto do fenil-benzotiazol conjugado no complexo, e o estado excitado do  $\text{Tb}^{3+}$  ( $^5\text{D}_4$ ), sugerindo um mecanismo de transferência de Förster. No entanto, a diferença de energia ( $\Delta E$ ) entre o estado  $T_1$  (usando como aproximação o valor de energia do estado  $T_1$  do fenil-benzotiazol,  $20870 \text{ cm}^{-1}$ , ver secção 3.3.4) e o estado excitado emissor do  $\text{Tb}^{3+}$  ( $^5\text{D}_4$ , em que a energia deste estado é calculado através da transição  $^7\text{F}_6 \leftarrow ^5\text{D}_4$  dando um valor de  $20503.57 \text{ cm}^{-1}$ , Tabela 3.4) é igual a  $366.4 \text{ cm}^{-1}$ , o que segundo a regra empírica de Latva, como referido na secção 3.3.4, sugere que há transferência de volta do ião metálico para o cromóforo quando esta  $\Delta E$  é inferior  $1850 \text{ cm}^{-1}$ <sup>142</sup>, o que torna o mecanismo de transferência de energia de Förster pouco eficiente. A partir do espectro, o processo de transferência de energia parece ser mais eficiente a partir da banda associada a transferência de carga do fenil-benzotiazol conjugado. A partir destes dados experimentais podemos propor um mecanismo de transferência de energia de Dexter por meio de transferência simultânea de dois electrões, de um electrão do doador para o aceitador e outro electrão em sentido inverso, uma vez que a transferência do metal para o ligando está favorecida neste sistema. Este mecanismo é pouco restritivo, podendo haver transição entre estados de qualquer multiplicidade de spin, desde que haja sobreposição orbital<sup>136</sup>. A ocorrência deste mecanismo no complexo  $\text{TbL4}$  também pode ser explicada pela distância de separação entre o cromóforo e o centro metálico, que deverá ser inferior a  $1000 \text{ pm}$  ( $10 \text{ \AA}$ ), distância máxima para que possa ocorrer transferência de energia pelo mecanismo de Dexter<sup>143</sup>. Por esta ordem de ideias, o processo de transferência de energia pelo mecanismo de Dexter para os complexos envolvendo o ligando  $\text{L5}$  serão improváveis, uma vez que a distâncias entre o cromóforo e o centro metálico, separados por uma cadeia alifática saturada de 6 carbonos (adoptando a conformação *all trans* de mais baixa energia) mais um grupo amida, deverá ser superior a  $10 \text{ \AA}$ , sendo espectável que a transferência de energia ocorra por um mecanismo de Förster. No entanto, no complexo  $\text{TbL5}$ , a separação de energia entre o estado excitado  $T_1$  e o estado excitado  $^5\text{D}_4$  do  $\text{Tb}^{3+}$  é igual a  $366.4 \text{ cm}^{-1}$ , mostrando que também ocorre transferência de volta do metal para o cromóforo. Também neste complexo, o tempo de vida de luminescência obtido foi de  $0.079 \text{ ms}$ , que é extremamente curto em relação aos valores habituais para os

complexos com  $Tb^{3+}$ , mostrando efectivamente ocorrência de mais uma rota de desactivação. Para os complexos EuL4 e EuL5 esta diferença de energia entre o estado  $T_1$  do cromóforo e o estado excitado do  $Eu^{3+}$  ( $^5D_0$ ) é igual a  $3615.2\text{ cm}^{-1}$  e  $3624.2\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, o que segundo a regra de Latva, sugere que está dentro do intervalo de energia adequado para uma boa eficiência de transferência de energia do cromóforo para o ião metálico. A baixa diferença de energia ( $T_1$ - $^5D_4$ ) nos complexos com  $Tb^{3+}$  reflectem uma transferência de energia pouco eficiente, ocorrendo transferência de volta para o cromóforo, tendo tempos de vida de luminescência menores que os habituais, os quais são tipicamente superiores aos dos respectivos complexos de  $Eu^{3+}$ . Esta situação traduz-se em rendimentos quânticos de luminescência dos complexos com  $Tb^{3+}$  cerca de uma ordem de grandeza inferior aos respectivos complexos com ião  $Eu^{3+}$  (Tabela 3.4).

Os tempos de vida de luminescência dos complexos EuL4 e EuL5 estão sumariados na Tabela 3.5. Através desses valores em  $H_2O$  e  $D_2O$  é possível obter o valor do número de hidratação na primeira esfera de coordenação do metal ( $q$ ). A obtenção deste parâmetro é possível uma vez que existe um efeito isotópico quanto ao processo de supressão do estado excitado do metal, por meio de transferência de energia vibracional envolvendo níveis vibracionais de alta energia das moléculas de solvente. O oscilador O-H, do  $H_2O$ , é um supressor mais eficiente que o oscilador O-D, do  $D_2O$ , e a eficiência de supressão de luminescência é inversamente proporcional ao intervalo de energia entre o estado excitado emissor do metal e os vários níveis do estado fundamental, sendo este intervalo aproximadamente de  $12000\text{ cm}^{-1}$  para o  $Eu^{3+}$  e  $15000\text{ cm}^{-1}$  para o  $Tb^{3+}$ . Desta forma, o processo de supressão é mais eficiente no  $Eu^{3+}$  do que no  $Tb^{3+}$ , uma vez que o acoplamento do estado excitado do  $Eu^{3+}$  com o oscilador O-H ocorre para o seu terceiro sobreton (do inglês *overtone*) e para o estado excitado do  $Tb^{3+}$  o acoplamento ocorre para o quarto sobreton do oscilador O-H da água, e assim neste último, o factor de sobreposição de Franck-Condon é menor (ver secção 3.3.1), tornando o processo de supressão menos eficiente (Figura 3.12). O mesmo tipo de explicação é dado para a maior eficiência de supressão do oscilador O-H do  $H_2O$  comparativamente ao oscilador O-D do  $D_2O$ , uma vez que a frequência de alongação da ligação O-D é menor que na ligação O-H e desta forma, o acoplamento do estado excitado do metal ocorre para um sobreton superior no oscilador O-D, levando a um factor de sobreposição de Franck-Condon menor, e a uma eficiência de supressão menor comparativamente ao oscilador O-H. Assim, quanto maior for o número de moléculas de água coordenadas ao centro metálico, maior será a eficiência de supressão do estado excitado do ião metálico, e menor será o seu tempo de vida<sup>144,145</sup>. Desta forma usando a equação de



**Figura 3.11-** Representação dos espectros de absorção (azul tracejado), do espectro de luminescência (preto) e o espectro de excitação de luminescência (vermelho) para o complexo EuL4 **A**), EuL5 **B**), TbL4 **C**) e TbL5 **D**) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4, T= 298K.

**Tabela 3.4** – Determinação do comprimento de onda e número de onda das transições de emissão de luminescência com a indicação do tipo de transição, do rendimento quântico de luminescência ( $\Phi_L^{Ln}$ ) e dos tempos de vida de luminescência dos complexos EuL4, EuL5, TbL4 e TbL5 em solução aquosa (H<sub>2</sub>O) em equilíbrio com o ar com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4, T=298 K.

Complexo	$\lambda$ excitação nm (cm <sup>-1</sup> )	$\lambda$ emissão nm (cm <sup>-1</sup> )	Transição	Rendimento Quântico de luminescência em H <sub>2</sub> O ( $\Phi_L^{Ln}$ ) <sup>a)</sup>	Tempo de vida de Luminescência em H <sub>2</sub> O ( $\tau_v$ , ms)
<b>EuL4</b>	330 (30303)	579.55 (17254.77)	<sup>7</sup> F <sub>0</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>	1.835×10 <sup>-3</sup> ± 7.7×10 <sup>-5</sup>	0.583
		588.26 (16999.29)	<sup>7</sup> F <sub>1</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>		
		594.55 (16819.44)			
		615.36 (16250.65)	<sup>7</sup> F <sub>2</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>		
		624.34 (16016.91)			
		653.76 (15296.13)	<sup>7</sup> F <sub>3</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>		
		683.80 (14624.16)			
		688.73 (14519.48)	<sup>7</sup> F <sub>4</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>		
		694.57 (14397.40)			
701.40 (14257.20)					
753.33 (13274.40)	<sup>7</sup> F <sub>5</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>				
763.19 (13102.90)					
822.16 (12163.08)	<sup>7</sup> F <sub>6</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>				
<b>EuL5</b>	360 (27778)	579.85 (17245.84)	<sup>7</sup> F <sub>0</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>	1.268×10 <sup>-4</sup> ± 2.5×10 <sup>-5</sup>	0.400
		588.55 (16990.91)	<sup>7</sup> F <sub>1</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>		
		595.00 (16806.72)			
		615.79 (16239.30)	<sup>7</sup> F <sub>2</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>		
		624.34 (16016.91)			
		653.76 (15296.13)	<sup>7</sup> F <sub>3</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>		
		689.15 (14510.63)			
		694.85 (14391.60)	<sup>7</sup> F <sub>4</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>		
		701.54 (14254.36)			
756.25 (13223.14)	<sup>7</sup> F <sub>5</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>				
763.75 (13093.29)					
822.83 (12153.18)	<sup>7</sup> F <sub>6</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>0</sub>				
831.60 (12025.01)					
<b>TbL4</b>	330 (30303)	487.72 (20503.57)	<sup>7</sup> F <sub>6</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>	2.619×10 <sup>-4</sup> ± 1.4×10 <sup>-5</sup>	0.298
		544.26 (18373.57)	<sup>7</sup> F <sub>5</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>		
		586.95 (17037.23)	<sup>7</sup> F <sub>4</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>		
		621.01 (16102.80)	<sup>7</sup> F <sub>3</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>		
		651.01 (15360.75)	<sup>7</sup> F <sub>2</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>		
		669.14 (14944.56)	<sup>7</sup> F <sub>1</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>		
		681.83 (14666.41)	<sup>7</sup> F <sub>0</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>		
<b>TbL5</b>	360 (27778)	488.03 (20490.54)	<sup>7</sup> F <sub>6</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>	2.089×10 <sup>-5</sup> ± 5.7×10 <sup>-6</sup>	0.079
		544.41 (18368.51)	<sup>7</sup> F <sub>5</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>		
		586.95 (17037.23)	<sup>7</sup> F <sub>4</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>		
		621.15 (16099.17)	<sup>7</sup> F <sub>3</sub> ← <sup>5</sup> D <sub>4</sub>		

a) Rendimento quântico de luminescência determinado por método comparativo usando como referência [Ru(bpy)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub> em equilíbrio com o ar ( $\Phi = 0.028$ )<sup>129</sup>.

Horrocks<sup>144</sup> é possível obter o valor de q:

$$q = A(k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}}), \text{ onde } k = \frac{1}{\tau} \quad (3.6)$$

onde  $k_{\text{H}_2\text{O}}$  e  $k_{\text{D}_2\text{O}}$  são a constante de velocidade observadas de desactivação do estado excitado do metal em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{D}_2\text{O}$ , respectivamente, onde a constante é o inverso do tempo de vida do estado excitado em  $\text{ms}^{-1}$ , e A é uma constante de proporcionalidade que para o  $\text{Eu}^{3+}$  é 1.05. No entanto, esta equação não leva em consideração o pequeno efeito das moléculas de solvente na esfera externa no decaimento do estado excitado do ião metálico e assim foi proposto por Beeby *et al.* uma nova equação, tendo em conta esta considerações<sup>145</sup>:

$$q_{\text{corr}} = A' \times \Delta k_{\text{corr}}, \text{ onde } \Delta k_{\text{corr}} = (k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}}) + B \quad (3.7)$$

onde A' é a constante de proporcionalidade, que para  $\text{Eu}^{3+}$  é 1.2 em vez de 1.05 na equação de Horrocks, e B é um factor correctivo para a esfera externa, que para o  $\text{Eu}^{3+}$  é  $-0.25 \text{ ms}^{-1}$ .

Os valores de q obtidos pela equação de Beeby *et al.* para o  $\text{EuL4}$  e  $\text{EuL5}$  foram de 1.12 e 1.30, respectivamente (Tabela 3.5). Não se considerou necessário fazer a determinação de q para os complexos  $\text{TbL4}$  e  $\text{TbL5}$ , uma vez que este valor não irá ser significativamente afectado pela troca entre estes iões metálicos. Este tipo de complexação ocorre por interacção electrostática, não havendo preferência geométrica no complexo pela orientação das orbitais (como acontece nos metais de transição) mas sim por efeitos estereoquímicos. Uma vez que os dois iões metálicos têm raios atómicos muito semelhantes, o número de coordenação deverá manter-se inalterado. Os valores de q obtidos para os complexos de  $\text{Eu}^{3+}$  são consistentes com os dos complexos de ligandos poliaminocarboxilatos octadentadas estruturalmente semelhantes onde

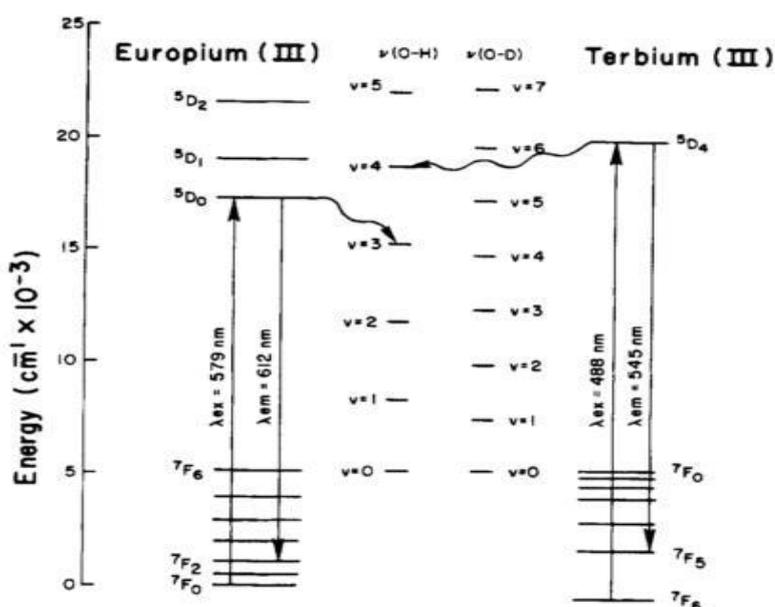


Figura 3.12- Desexcitação dos iões  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  pelos osciladores OH e OD (retirado da referência 144).

uma molécula de água ligada ao centro metálico aumenta o número de coordenação total do complexo para 9<sup>146</sup>. No caso do complexo EuL4, em que L4 é um derivado do DOTA, ele apenas tem uma água coordenada ao centro metálico, levando a que o número de coordenação seja igual a 9. No entanto, no EuL5, um derivado de DO3A, este número de coordenação não é tão evidente. Porém há evidências na literatura que em compostos similares que possuem um grupo carbonilo como substituinte no DO3A, há coordenação do grupo carbonilo ao centro metálico<sup>147</sup>. O valor de  $q$  igual a 1.30 obtido para o complexo EuL5 sugere que existe um equilíbrio entre complexos com uma e com duas águas coordenadas ao centro metálico, evidenciado que a coordenação do carbonilo não é suficientemente forte para impedir a entrada de uma segunda molécula de água para se coordenar ao centro metálico. No entanto, este valor  $q$  demonstra que o complexo se encontra majoritariamente em solução, cerca de 70%, com o carbonilo e uma molécula de água coordenada ao centro metálico, e que uma menor percentagem do complexo em solução, de 30%, que em vez de ter o carbonilo coordenado tem duas moléculas de água coordenadas.

Da literatura sabemos que os complexos de  $\text{Ln}^{3+}$  com derivados de DOTA e DO3A se encontram em solução na forma de dois isómeros, SAP e TSAP, com geometrias diferentes, que correspondem a dois pares de enantiómeros com diferentes combinações das geometrias  $\lambda\lambda\lambda\lambda$  e  $\delta\delta\delta\delta$  para o macrociclo e  $\Delta$  e  $\Lambda$  para a orientação dos grupos pendentes (ver secção 2.4)<sup>19</sup>. A partir dos espectros de luminescência dos complexos de  $\text{Eu}^{3+}$  (Figura 3.11) é possível verificar o número de espécies diferentes em solução e o tipo de ambiente químico que envolve o ião trivalente  $\text{Eu}^{3+}$ , nomeadamente a simetria do quelato. A transição  ${}^7\text{F}_0 \leftarrow {}^4\text{D}_0$  no espectro de complexos de  $\text{Eu}^{3+}$  não apresenta sub-níveis degenerados, sendo portanto uma transição única para cada espécie diferente presente em solução<sup>55</sup>. Do espectro de luminescência tanto do EuL4 como no EuL5 só é visível um pico entre 577-581 nm, correspondente à transição  ${}^7\text{F}_0 \leftarrow {}^5\text{D}_0$ , a 579.55 nm ( $17254.77 \text{ cm}^{-1}$ ) e a 579.85 nm ( $17245.84 \text{ cm}^{-1}$ ), respectivamente, mostrando que uma das geometrias é muito mais favorável que a outra, tanto que só é visível uma espécie em solução (Tabela 3.4 e Figura 3.11). No caso do EuL5, tínhamos verificado que existe um equilíbrio entre o complexo com uma molécula de água coordenada e o complexo com duas moléculas de água coordenadas, no entanto só foi identificado uma espécie em solução para o complexo EuL5, sendo isto explicado que com a substituição da coordenação do carbonilo por uma segunda molécula de água, não há alteração significativa na simetria do ambiente químico sentido pelo ião  $\text{Eu}^{3+}$ , justificando-se desta forma a ocorrência de apenas uma transição  ${}^7\text{F}_0 \leftarrow {}^5\text{D}_0$  no complexo EuL5, associado à presença de apenas uma espécie em solução. O estudo computacional, apresentado na próxima secção 3.3.6 irá esclarecer quanto ao tipo de geometria

favorável para o complexo EuL4 (SAP ou TSAP) e será deduzida pela informação da literatura a geometria espectável para o complexo EuL5.

Como referido na secção 1.3.1, as transições de dipolo eléctrico são proibidas por paridade nos iões  $\text{Ln}^{3+}$ . No entanto, quando estes iões são colocados em ambiente químico, interacções não centrosimétricas permitem a mistura de estados electrónicos de diferentes paridades tornando estas transições parcialmente permitidas e a intensidade de algumas transições são particularmente sensíveis ao ambiente. O campo eléctrico assimétrico provocado pelo ambiente químico destrói a simetria esférica do ião, provocando desdobramento de cada nível espectroscópico (efeito do campo do ligante) em vários sub-níveis, dos vários níveis de energia com diferentes números quânticos J, sendo o desdobramento dependente do grupo de simetria do complexo<sup>55</sup>.

Os espectros de emissão dos complexos EuL4 e EuL5 (Figura 3.11), como era espectável, são muito parecidos, indicando ambientes químicos semelhantes envolvendo o catião  $\text{Eu}^{3+}$  nos dois complexos. Em ambos os espectros foi possível a identificação de todas as transições envolvidas no  $\text{Eu}^{3+}$ ,  ${}^7\text{F}_J \leftarrow {}^5\text{D}_0$  com  $J=0-6$ , tendo sido necessário ampliar 10x a intensidade de emissão da zona espectral das transições de mais fraca intensidade para poderem ser visualizadas ( ${}^7\text{F}_5 \leftarrow {}^5\text{D}_0$  e  ${}^7\text{F}_6 \leftarrow {}^5\text{D}_0$ ). A partir dos espectros podemos verificar que a transição de dipolo magnético ( ${}^7\text{F}_1 \leftarrow {}^5\text{D}_0$ ), e a transição  ${}^7\text{F}_4 \leftarrow {}^5\text{D}_0$  têm intensidades relativas semelhantes à transição hipersensível ao ambiente ( ${}^7\text{F}_2 \leftarrow {}^5\text{D}_0$ ), indicando um ambiente químico, envolvendo o ião  $\text{Eu}^{3+}$ , de alta simetria, à semelhança de outros derivados de complexos de DOTA e DO3A<sup>147,148</sup>. Apesar da simetria total dos complexos estudados ser C1, ou seja não têm simetria, a simetria só do quelato é aproximadamente C4, em ambos os complexos. Com esta simetria, os níveis energético com diferentes valores do número quântico J são desdobrados em vários sub-níveis, havendo, para o tipo de simetria tetragonal geral, e para os números quânticos  $J=0,1,2,3,4,5,6$  respectivamente, desdobramento em 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 sub-níveis. Este aumento do número de sub-níveis à medida que J aumenta, provoca uma maior sobreposição espectral destes subníveis para cada valor de J, tornando-os indistinguíveis<sup>55</sup>. Contudo, podemos ver no espectro de EuL4 e EuL5 que há dois subníveis para a transição  ${}^7\text{F}_1 \leftarrow {}^5\text{D}_0$ , estando em concordância com a simetria esperada dos complexos. A transição puramente de dipolo magnético,  ${}^7\text{F}_1 \leftarrow {}^5\text{D}_0$ , é semelhante em ambos os complexos. No entanto, a transição  ${}^7\text{F}_2 \leftarrow {}^5\text{D}_0$ , hipersensível ao ambiente e de dipolo eléctrico induzido, é mais intensa no complexo EuL4. De forma a explicar a hipersensibilidade da transição tem sido recorrido a modelos de acoplamento estático, como a teoria de Judd-Ofelt<sup>149</sup>, e a modelos de acoplamento dinâmico, ou mecanismo de polarisabilidade<sup>150</sup>, sendo a intensidade da banda dependente da geometria de coordenação e dos átomos envolvidos na

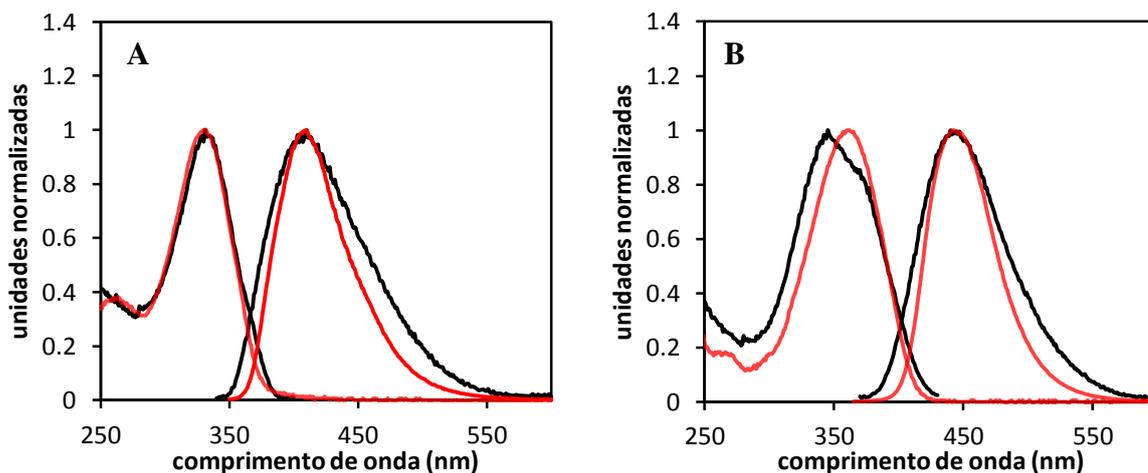
coordenação. No último modelo, a intensidade da transição hipersensível é explicada em termos da polarisabilidade dipolar dos átomos do ligando, assim como da geometria do complexo. Desta forma, a diferença de intensidade na transição  ${}^7F_2 \leftarrow {}^5D_0$  pode ser racionalizada da seguinte maneira: como tínhamos visto anteriormente, pela determinação do número de hidratação no complexo EuL5, o grupo carbonilo do macrociclo nem sempre está coordenado ao centro metálico, existindo um equilíbrio entre o complexo com o carbonilo coordenado e não coordenado. Uma vez que nem sempre o grupo carbonilo está coordenado, há uma diminuição da polarisabilidade local dos átomos do ligando envolvidos directamente na coordenação ao ião metálico e consequentemente a intensidade da transição é menor que no caso do EuL4 em que os grupos acetatos estão todos fortemente coordenados ao  $\text{Eu}^{3+}$ .

No complexo TbL4 é possível identificar todas as transições ( ${}^7F_J \leftarrow {}^5D_4$ , com  $J=6-0$ ). No entanto, mesmo com ampliação, no complexo TbL5 não foi possível visualizar as transições de mais fraca intensidade ( ${}^7F_J \leftarrow {}^5D_4$ , com  $J=2,1$  e  $0$ ) (Figura 3.11). No espectro de emissão do complexo TbL4 e TbL5, assim como no EuL5, é visualizada uma banda a 408 nm e a 442 nm, respectivamente, que não corresponde à emissão do ião metálico, e que se encontra na mesma zona espectral que a fluorescência da porção do PiB. Porém, uma vez que os espectros de luminescência foram adquiridos com um tempo de atraso de 100  $\mu\text{s}$  e como o tempo de vida de fluorescência é entre 1 e 2 ns (ver secção 3.3.3), esta banda não pode corresponder a um tipo de fluorescência normal. Curiosamente esta banda é verificada com os ligandos L4 e L5 livres, adquiridos com um tempo de atraso de 200  $\mu\text{s}$  e o espectro de excitação corresponde ao espectro de absorção dos respectivos ligandos (Figura 3.13). Este fenómeno parece estar associado a um tipo de fluorescência atrasada, em que a partir do estado excitado singlete de menor energia ( $S_1$ ) ocorre cruzamento intersistemas com a formação do estado tripleto, e de seguida há novamente a formação do estado  $S_1$ , ocorrendo a partir deste estado emissão de fluorescência mas numa escala temporal mais longa. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer este fenómeno.

O rendimento quântico total de luminescência ( $\Phi_L^{\text{Ln}}$ ) foi obtido da mesma forma que o rendimento quântico de fluorescência usando como referência uma solução de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  em equilíbrio com o ar. Tendo em conta que o rendimento quântico total de luminescência é descrito como:

$$\Phi_L^{\text{Ln}} = \eta_{\text{pop}}^{\text{D}} \times \eta_{\text{te}} \times \Phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}} = \eta_{\text{sens}} \times \Phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}}; \eta_{\text{sens}} = \frac{\Phi_L^{\text{Ln}}}{\Phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}}} \quad (3.8)$$

onde  $\eta_{\text{pop}}^{\text{D}}$  é a eficiência de popular os níveis energéticos responsáveis pela transferência de energia para os níveis excitados dos Lantanídeos (III) (por exemplo  ${}^1S$ ,  ${}^3T$ , TCLM, estados 4f5d,

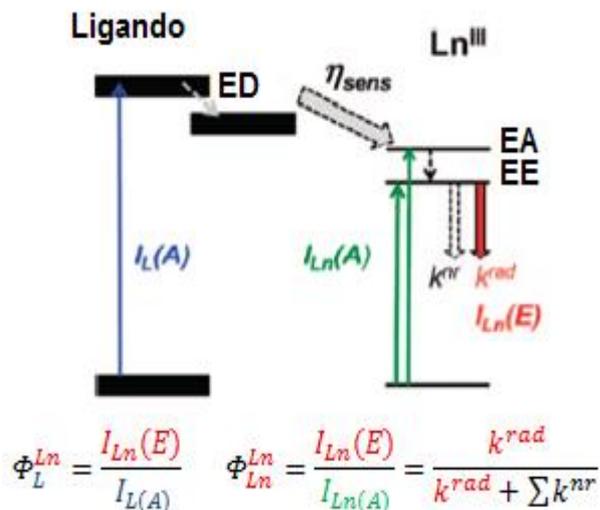


**Figura 3.13-** Espectro de fluorescência atrasada e respectivo espectro de excitação de fluorescência atrasada adquiridos com um atraso de 200  $\mu\text{s}$  (linhas a preto) com a sobreposição dos espectros de absorção e de fluorescência (linha a vermelho) para o ligando L4 **A**) e para o ligando L5 **B**) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH= 7.4, T= 298 K.

TCML, ver secção 1.3.1) a partir da excitação inicial,  $\eta_{te}$  é a eficiência de transferência de energia do estado electrónico doador para os níveis energéticos aceitadores do lantanídeo ( $\text{Ln}^{3+}$ ),  $\Phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}}$  é o rendimento quântico de luminescência intrínseco, que é o rendimento quântico de luminescência centrada no metal após excitação directa nos níveis electrónicos 4f do ião metálico, e  $\eta_{\text{sens}}$  é a eficiência total de sensibilização dos estados excitados dos iões  $\text{Ln}^{3+}$  que inclui os termos de eficiência de popular os níveis electrónicos doadores e a respectiva eficiência de transferência de energia ( $\eta_{\text{pop}}^{\text{D}} \times \eta_{te}$ ) (Figura 3.14). Este último parâmetro pode ser obtido uma vez que  $\Phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}}$  é obtido experimentalmente e os rendimentos quânticos intrínsecos de luminescência ( $\Phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}}$ ) para os complexos de Európio (III) são facilmente obtidos pela aquisição do espectro de emissão de luminescência, como veremos. O rendimento quântico intrínseco de luminescência é relacionado com a constante de desactivação observada ( $k_{\text{obs}}$ ) e com a constante de desactivação radiativa ( $k_{\text{rad}}$ ):

$$\Phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}} = \frac{k_{\text{rad}}}{k_{\text{obs}}} = \frac{\tau_{\text{obs}}}{\tau^{\text{rad}}}, \text{ onde } k = \frac{1}{\tau} \quad (3.9)$$

O valor do rendimento quântico intrínseco de luminescência reflecte a extensão dos processos de desactivação provocados pela esfera interna e externa do metal, dependendo da diferença de energia entre o estado electrónico emissor e do sub-nível mais elevado do estado fundamental ( $\Delta E$ ). Quanto menor for esta diferença mais facilmente ocorrerá a supressão do nível excitado do metal pelos sobretons vibracionais dos osciladores do ligando coordenado ou do solvente, sendo principalmente relevante para os metais emissores no infravermelho próximo onde  $\Delta E$  é pequeno, sofrendo processos de supressão mais eficientemente. O  $k_{\text{obs}}$  é a constante de



**Figura 3.14-** Esquema simplificado para ilustração da origem do rendimento quântico de luminescência total  $\Phi_L^{Ln}$  e do rendimento quântico de luminescência intrínseco  $\Phi_{Ln}^{Ln}$ . ED- estado doador, EA- estado aceitador, EE- estado emissor, A- absorção, E-emissão, linhas a tracejado denotam processos não radiativos. (adaptado da referência 51).

velocidade da soma dos vários processos de desativação, que inclui a desativação radiativa ( $k^{rad}$ ) e os vários processos de desativação não radiativos ( $k^{nr}$ ):

$$k_{obs} = k^{rad} + \sum_n k_n^{nr} \quad (3.10)$$

Na ausência de processos de desativação não radiativos  $k_{obs} = k^{rad}$ , Significando que o rendimento quântico intrínseco de luminescência é igual 1, o que é raro tirando o caso de algumas lâmpadas inorgânicas de fosforo. O tempo de vida observado ( $\tau_{obs}$ ) é obtido experimentalmente, sobrando a determinação do tempo de vida radiativo na ausência de processos de desativação, que pode ser obtido a partir da equação de Einstein para emissão espontânea. Alternativamente se o espectro de absorção para o nível electrónico emissor for conhecido  $\epsilon(\tilde{\nu})$ , o tempo de vida radiativo pode ser obtido da seguinte equação:

$$\frac{1}{\tau} = 2303 \times \frac{8\pi c n^2 \tilde{\nu}^2 (2J+1)}{N_A (2J'+1)} \int \epsilon(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (3.11)$$

onde  $N_A$  é a constante de Avogadro e  $J$  e  $J'$  são o número quântico  $J$  do estados inicial e final da transição, respectivamente. No entanto, no caso do  $Eu^{3+}$ , a transição  ${}^7F_1 \leftarrow {}^5D_0$  tem um carácter puramente magnético, servindo como referência interna, levando à formulação de uma equação conveniente e simplificada para a obtenção de  $\tau^{rad}$ :

$$A(\Psi_J, \Psi'_{J'}) = \frac{1}{\tau^{rad}} = A_{MD,0} \times n^3 \times \left( \frac{I_{tot}}{I_{MD}} \right) \quad (3.12)$$

onde  $A_{MD,0}$  é constante e iguala  $14.65 \text{ s}^{-1}$ ,  $n$  é o índice de refração do meio e  $\left( \frac{I_{tot}}{I_{MD}} \right)$  é a razão entre o integral de todo o espectro de intensidade de emissão de luminescência correspondente às

transições  ${}^7F_1 \leftarrow {}^5D_0$  com  $J=(0-6)$  e o integral da intensidade da transição de dipolo magnético correspondente a  ${}^7F_1 \leftarrow {}^5D_0$ <sup>51</sup>.

Experimentalmente foi verificado que o EuL4 tem um rendimento quântico de luminescência cerca de uma ordem de grandeza superior ao do complexo EuL5. Após a determinação da eficiência total de sensibilização dos estados electrónicos excitados do metal verificamos que em ambos os complexos este valor é baixo, 0.0274 e 0.00143 para o complexo EuL4 e EuL5, respectivamente (Tabela 3.5). Esta baixa eficiência é explicada devido à distância de separação entre o cromóforo (doador) e o ião metálico ( $Ln^{3+}$ ) ser relativa grande, tornando a

**Tabela 3.5** – Cálculo dos parâmetros  $q$ ,  $\tau_r$ ,  $k_R$ ,  $\Phi_{Ln}^{Ln}$ ,  $\eta_{sens}$  e  $\Sigma k_{nr}$ , usando os valores obtidos experimentalmente de  $\tau_{obs}$  e  $k_{obs}$  em  $H_2O$  e  $D_2O$ ,  $[I_{tot}/I(0,1)]$  e  $\Phi_L^{Ln}$ .

	<b>EuL4</b>	<b>EuL5</b>
$\tau_{obs} (H_2O, ms)^a)$	$0.583 \pm 0.003$	$0.400 \pm 0.011$
$\tau_{obs} (D_2O, ms)^a)$	$1.871 \pm 0.023$	$0.857 \pm 0.017$
$k_{obs} (H_2O, s^{-1})^b)$	$1716.26 \pm 8.3$	$2500.39 \pm 70.5$
$k_{obs} (D_2O, s^{-1})^b)$	$534.58 \pm 6.5$	$1166.49 \pm 22.6$
$q^c)$	$1.12 \pm 0.01$	$1.30 \pm 0.07$
$[I_{tot}/I(0,1)], H_2O^d)$	3.50	6.17
$\tau_r, (H_2O, ms)^e)$	8.29	4.70
$k_R, (H_2O, s^{-1})^f)$	120.64	212.75
$\Phi_{Ln}^{Ln}, H_2O^g)$	0.0673	0.0884
$\Phi_L^{Ln}, H_2O^h)$	$1.835 \times 10^{-3} \pm 7.7 \times 10^{-5}$	$1.268 \times 10^{-4} \pm 2.5 \times 10^{-5}$
$\eta_{sens}, H_2O^i)$	0.0274	0.00143
$\Sigma k_{nr} (H_2O, s^{-1})^j)$	1595.6	2287.6

Todos os parâmetros experimentais foram determinados em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4, T=298 K em  $H_2O$ , à excepção da determinação do tempo de vida de luminescência em  $D_2O$  nas mesmas condições de tamponamento e de temperatura.

- a) Tempos de vida luminescência monitorizados no máximo de emissão a 701 nm.
- b) Constante de velocidade de decaimento observada ( $k_{obs} = 1/\tau_{obs}$ ).
- c) Número de águas coordenadas na esfera interna do metal usando equação 3.7.
- d) Contribuição relativa da transição  ${}^7F_1 \leftarrow {}^5D_0$ , I(0,1), no espectro total integrado de emissão de luminescência,  $I_{tot}$ .
- e) Tempo de vida radiativo na ausência de outros processos de desactivação.
- f) Constante cinética radiativa ( $k_r = 1/\tau_r$ ).
- g) Rendimento quântico de luminescência intrínseco do metal (ver descrição no texto).
- h) Rendimento quântico total de luminescência determinado por método comparativo usando como referência  $[Ru(bpy)_3]Cl_2$  em equilíbrio com o ar ( $\Phi = 0.028$ )<sup>129</sup>.
- i) Eficiência total de sensibilização dos níveis excitados do metal, que inclui a eficiência de transferência de energia e de sensibilização dos níveis electrónicos excitados doadores (ver descrição no texto).
- j) Soma das constantes não radiativas de desactivação do estado excitado do lantanídeo.

transferência de energia pouco eficiente. Uma vez que esta distância de separação é ainda superior no EuL5 comparativamente ao EuL4, verificamos que a eficiência é cerca de uma ordem grandeza inferior, tornando ainda mais difícil a transferência de energia. Da literatura verifica-se que complexos com o cromóforo directamente coordenado ao centro metálico apresentam valores de rendimentos quânticos de luminescência e de eficiência total de sensibilização cerca de uma ou duas ordens de grandeza superior ao complexo EuL4<sup>147,151</sup>, sendo perceptível que distância de separação entre o cromóforo (doador) e o ião metálico (aceitador) é um factor chave para o desenvolvimento deste tipo de sondas.

### 3.3.6 Estudo computacional da geometria conformacional do complexo EuL4

A literatura descreve que este tipo de tetraaza-macrociclos, quando complexados com um ião metálico  $\text{Ln}^{3+}$ , pode adoptar dois tipos de geometrias em solução, designados por SAP e TSAP (ver secção 2.4). Como referido anteriormente, a partir dos espectros de luminescência só foi possível identificar uma espécie em solução tanto no complexo EuL4 como no EuL5. Com o intuito de esclarecer qual das geometrias é mais estável, foram efectuados cálculos teóricos ao nível de teoria de DFT, para o complexo EuL4. Uma vez que são necessários grandes recursos computacionais para este tipo de cálculo com este tipo de complexos de grandes dimensões, não foi efectuado o cálculo para o complexo EuL5. Tendo em conta que o complexo só tem uma molécula de água coordenada na esfera interna do complexo, um dado obtido a partir dos tempos de vida de luminescência do complexo EuL4 em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{D}_2\text{O}$ , foi estudado qual das duas geometrias isoméricas do complexo com a inclusão da molécula de água coordenada é mais estável (SAP ou TSAP), bem como a respectiva percentagem relativa de população entre os conformeros optimizados a 298.15 K. Como o complexo apresenta um número relativamente grande de conformeros possíveis no braço espaçador, foi incluído no estudo conformacional a variação do ângulo torsional C-C-C-N que liga a porção do PiB com o espaçador (entre o átomo de azoto do grupo amida e os 3 carbonos seguintes do espaçador), pois aparenta ser o ângulo conformacional mais relevante em termos energéticos para a definição da conformação mais estável. Foram assim estudados 6 conformeros, 3 com geometria SAP e 3 com geometria TSAP, e dentro de cada uma destas geometrias foi variado o ângulo torsional inicial C-C-C-N a  $180^\circ$ ,  $+90^\circ$  e  $-90^\circ$ , a partir do qual foi optimizado a geometria dos conformeros. Os conformeros foram genericamente apelidados pelo tipo de geometria do quelato (SAP ou TSAP) com a indicação do

ângulo torsional C-C-C-N inicial (180, +90° e -90°). Desta forma os conformémeros são apelidados de SAP180, SAP+90, SAP-90, TSAP180, TSAP+90 e TSAP-90 (Figura 3.15).

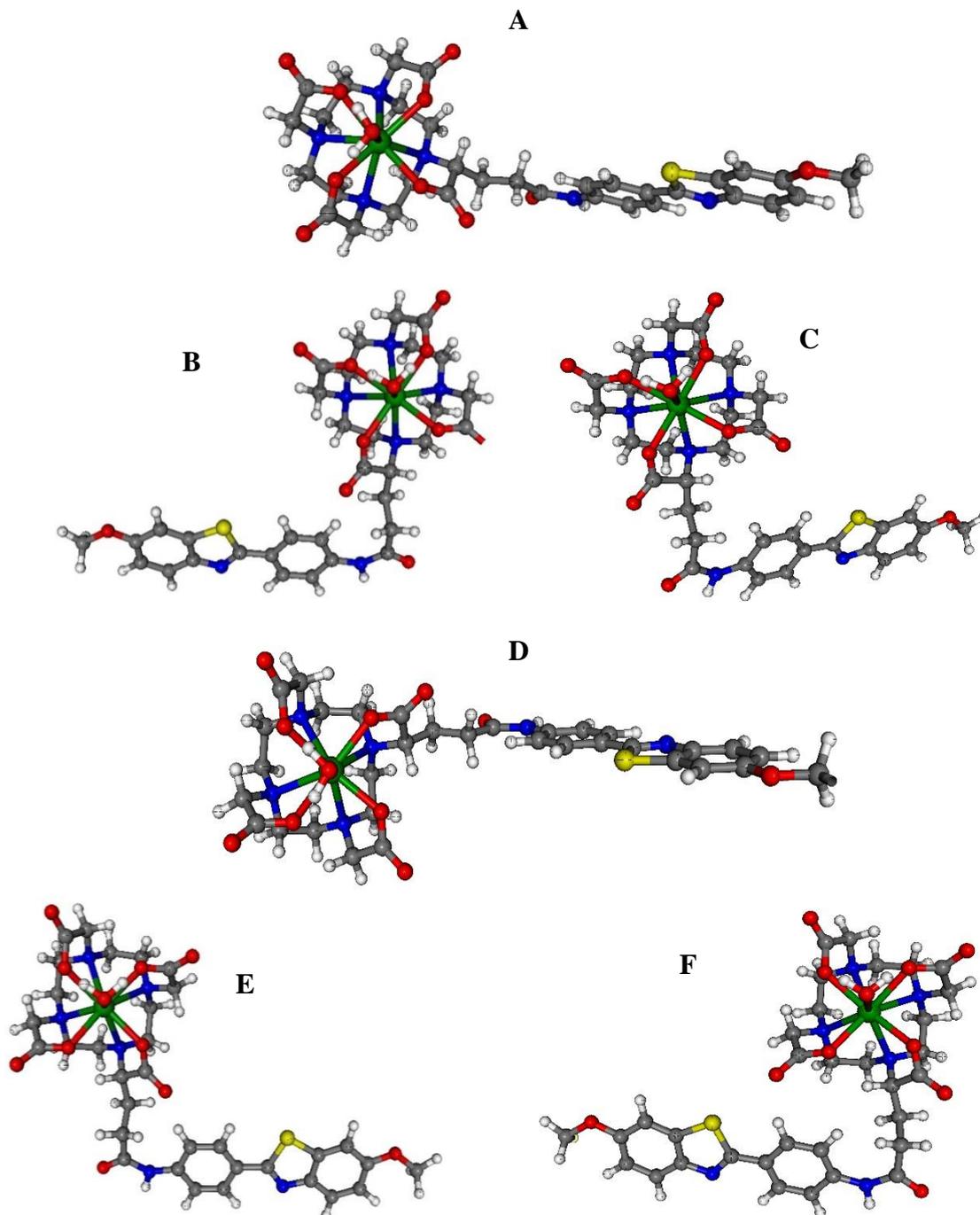
Os resultados dos cálculos demonstram que para o complexo EuL4, o conformémero SAP180 é o mais estável energeticamente, tendo em termos populacionais a 298.15 K uma percentagem relativa em relação às restantes estruturas de 68.3%. Fazendo a soma percentual relativa da população dos 3 conformémeros com geometria SAP a 298.15 K, obtemos uma percentagem de 90.5%. Apesar de ser impossível fazer o estudo conformacional completo, com este valor percentual concluímos que a geometria SAP é muito mais favorável que a estrutura TSAP (Tabela 3.6). Estes dados encontram-se em concordância com a observação de apenas uma transição no espectro de luminescência a 298 K, indicando apenas um tipo de geometria no complexo. Apesar de poder haver uma pequena percentagem do complexo com geometria TSAP, esta percentagem é demasiado pequena para ser visualizada uma segunda transição  ${}^7F_0 \leftarrow {}^5D_0$  no espectro de luminescência. Estes resultados estão em concordância com a literatura, segundo a qual os complexos de DOTA e derivados, de uma maneira genérica, adoptam uma estrutura TSAP com os catiões de maiores dimensões da série dos lantanídeos,  $La^{3+}$ - $Nd^{3+}$ , ao passo que com os catiões de menores dimensões  $Sm^{3+}$ - $Er^{3+}$ , onde se inclui o  $Eu^{3+}$ , a geometria SAP torna-se mais estável. Para os catiões de ainda menores dimensões  $Tm^{3+}$ - $Lu^{3+}$  a geometria SAP continua a ser a dominante mas aparece uma forma TSAP' não hidratada ( $q=0$ ) em pequena percentagem. Para o muito menor catião  $Sc^{3+}$  (dos metais de transição) é a geometria SAP' ( $q=0$ ) a mais estável<sup>19</sup>.

Para o complexo EuL5 também foi verificada a existência de apenas um pico correspondente à transição  ${}^7F_0 \leftarrow {}^5D_0$ , indicando a presença maioritária de uma das geometrias. Comparativamente aos resultados da literatura de derivados de DO3A com um substituinte mono-amida contendo um grupo fosfato, onde a estrutura do macrociclo é praticamente igual à do complexo EuL5, foi verificada uma proporção de SAP/TSAP de 3:1, estudado por

**Tabela 3.6** – Energia livre de Gibbs relativa e população em percentagem a 298.15 K, para os vários conformémeros do complexo  $[EuL4(H_2O)]$  (ver Figura 3.15) obtidos dos cálculos computacionais ao nível da teoria DFT.

Conformação	SAP180	SAP-90	TSAP180	TSAP+90	TSAP-90	SAP+90
$\Delta G$ (kJ/mol)	0	2.789	6.105	8.703	18.662	19.735
$P_{298.15}$ (%)	68.3	22.2	5.8	3.6	0.0	0.0

RMN  $^1\text{H}$  <sup>19</sup>. Provavelmente, no caso do EuL5, a geometria SAP deverá ser ainda mais estável e por isso apenas se verifica um pico na região 577-581 nm no espectro de emissão de luminescência do complexo.



**Figura 3.15-** Estruturas conformacionais obtidas por cálculos teóricos DFT, para o complexo EuL4. As estruturas **A)**, **B)** e **C)** têm geometria SAP e as estruturas **D)**, **E)** e **F)** têm geometria TSAP. As estruturas para ambas as geometrias foram obtidas com variação do ângulo torsional C-C-C-N na porção que liga o PiB ao espaçador. Genericamente **A)** é apelidada de SAP180, **B)** SAP-90, **C)** SAP+90, **D)** TSAP180, **E)** TSAP+90 e **F)** TSAP-90.

### 3.3.7 Determinação da lipofilicidade do complexo GdL5 através do log P

Uma vez que o agente de contraste estudado foi desenvolvido para detectar placas amilóides que se localizam no cérebro, o complexo tem de atravessar a barreira hemato-encefálica. Algumas regras, enunciadas na literatura, que permitem prever a permeação à barreira hemato-encefálica de compostos anfifílicos em quantidades suficientes para serem detectados, referem que a massa do composto deve ser inferior a 500 Da e ser suficientemente lipofílico, experimentalmente estimado pela medição do log P, que deve ser próximo de 2 ou superior<sup>92</sup>. O valor de  $\log P_{\text{oct/água}}$  obtido para o complexo GdL5 foi de  $0.65 \pm 0.028$ , demonstrando o carácter anfifílico e hidrofóbico do complexo, sendo este valor significativamente superior aos valores obtidos para os complexos GdL<sub>x</sub> (x=1,2,3) (Tabela 3.7). No entanto, este valor de log P, apesar de ser superior ao valor da tioflavina T, continua a ser significativamente inferior aos valores do PiB e dos derivados lipofílicos fenil-benzotiazóis<sup>99,152</sup>. O aumento de lipofilicidade do complexo GdL5 relativamente ao complexo GdL1 resultou do aumento do comprimento da cadeia carbonada saturada do espaçador, com o consequente aumento da massa molecular. Apesar das massas moleculares dos complexos GdL2 e GdL5 serem muito semelhantes, o facto do espaçador do último complexo ser mais longo que o espaçador no GdL2 permite que a lipofilicidade do complexo GdL5 seja maior. Comparativamente ao complexo GdL3, que também tem massa molecular semelhante ao complexo GdL5, o aumento da lipofilicidade neste último complexo com um valor maior de log P, é também devido ao maior tamanho do seu espaçador, uma vez que é uma cadeia

**Tabela 3.7-** Comparação dos valores de lipofilicidade (log P) e massa molecular do complexo GdL5 com os compostos de referência (tioflavina T e PiB) e os complexos GdLx desenvolvidos anteriormente.

	Log P <sub>Oct/H<sub>2</sub>O</sub>	Massa Molecular (daltons)	Referência
Tioflavina T	0.57	319	99
PiB	1.23	256	152
GdL1(H <sub>2</sub> O)	-0.15	860	114
GdL2(H <sub>2</sub> O)	0.32	936	115
GdL3(H <sub>2</sub> O)	0.03	930	115
GdL5(H <sub>2</sub> O)	$0.65 \pm 0.028$	931	Obtido neste trabalho

hidrocarbonada saturada de 6 carbonos em comparação com o complexo GdL3 que tem uma cadeia hidrocarbonada saturada de apenas 5 carbonos.

Apesar do valor relativamente favorável de log P obtido, a massa molecular de 913 Da permite prever dificuldade do complexo GdL5 permear a barreira hemato-encefálica, Contudo, nos trabalhos anteriormente desenvolvidos, verificou-se *in vivo* alguma passagem através da barreira hemato-encefálica do complexo formado pelo ligando L1, o que permite prever que ocorra alguma passagem do complexo GdL5 pela barreira hemato-encefálica, embora possa não ser em quantidade suficiente para poder ser detectado por IRM *in vivo*<sup>114</sup>.

### 3.3.8 Medidas relaxométricas, determinação da concentração micelar crítica (CMC) e do tamanho micelar

Os perfis de dispersão da relaxação magnética nuclear (NMRD), que representam a dependência da relaxividade protónica em função do campo magnético, são vulgarmente utilizados para caracterizar os agentes de contraste para IRM. O formato das curvas de NMRD, obtidas a 0.2 mM, a 25° e 37°C, com um pico a uma frequência de Larmor de 20 MHz, é característico dum sistema em rotação lenta, que corresponde a uma forma agregada micelar do composto (Figura 3.16A), tal como tem sido observado para diferentes complexos anfífilicos ou macromoleculares de Gd<sup>3+</sup>, incluindo para Gd(Lx) (x= 1,3,4)<sup>115,120</sup>.

A determinação do valor de CMC pode ser feita pela monitorização da variação de uma propriedade do sistema na região de concentrações do CMC. A partir da informação do perfil de NMRD, tentou-se determinar a concentração micelar crítica através de medidas relaxométricas<sup>153</sup>, analisando a representação gráfica da velocidade de relaxação paramagnética, R<sub>1p</sub>, em função da concentração de GdL5 a 20 MHz e 25°C. O valor deste campo magnético foi escolhido uma vez que maximiza o efeito da rotação lenta ( $\tau_r$ ) das micelas, tornando a diferença entre a relaxividade do complexo no sistema agregado micelar e monomérico mais evidente.

A uma concentração abaixo do CMC apenas a forma monomérica do complexo contribui para a relaxação paramagnética protónica, traduzindo-se em:

$$R_{1p} = R_1^{obs} - R_1^d = r_1^{n.a.} \times C_{Gd} \quad (3.13)$$

onde R<sub>1</sub><sup>d</sup> é a contribuição diamagnética para a velocidade de relaxação longitudinal, r<sub>1</sub><sup>n.a.</sup> representa a relaxividade da forma monomérica não agregada do complexo de Gd<sup>3+</sup> (mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>), e C<sub>Gd</sub> é a concentração analítica de Gd<sup>3+</sup>. A concentrações superiores ao CMC, a velocidade de

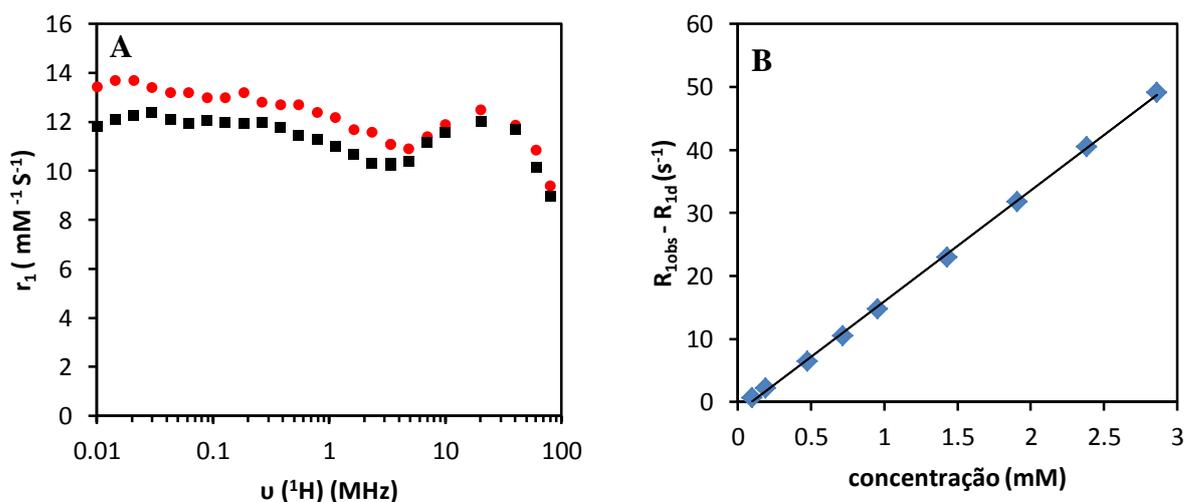
relaxação paramagnética é a soma das contribuições da forma monomérica e da forma agregada micelar do complexo, podendo ser traduzida por:

$$R_{1p} = R_{1}^{obs} - R_{1}^d = (r_{1}^{n.a.} - r_{1}^a) \times CMC + r_{1}^a \times C_{Gd} \quad (3.14)$$

onde  $r_{1}^a$  é a relaxividade da forma agregada micelar. O CMC é então determinado por ajuste de mínimos quadrados da intercepção das duas linhas rectas obtidas experimentalmente. No entanto, como já tínhamos a informação que a 0.2 mM o complexo já se encontrava na forma micelar, a partir da Figura 3.16B foi possível verificar que não há alteração das propriedades relaxométricas do composto entre 3 mM e 0.1 mM, demonstrando que neste intervalo de concentrações o complexo se encontra na forma micelar e que portanto o CMC está abaixo de 0.1 mM.

Do perfil de NMRD da (Figura 3.16A) podemos inferir que a relaxividade da forma agregada micelar é  $r_{1}^a = 11.87 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (298 K, 40 MHz), que é semelhante aos valores obtidos para os complexos GdL1 e GdL3, que também são derivados de DO3A (Tabela 3.8). Como não foi possível observar a forma monomérica, uma vez que para concentrações abaixo de 0.1 mM a contribuição paramagnética para a velocidade de relaxação ( $R_{1p}$ ) é desprezável, não é possível obter o valor da sua relaxividade. No entanto, podemos prever que o seu valor deva rondar os  $6.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , semelhante aos valores obtidos para o complexo GdL3, uma vez que o complexo GdL5 tem o mesmo tipo de quelato (DO3A) e é similar em tamanho ao GdL3.

A partir desta informação tentou-se obter o valor de CMC através de outros métodos. Foi tentado por fluorescência<sup>154</sup>, no entanto, como o composto possui um rendimento quântico de fluorescência elevado, a partir de uma determinada concentração ocorre problemas de filtro



**Figura 3.16-** Perfil  $^1\text{H}$  NMRD do complexo GdL5 a 0.2 mM a 298 K (●) e 310 K (■) em tampão HEPES 50 mM, pH 7.4 A). Contribuição paramagnética para a velocidade de relaxação longitudinal  $^1\text{H}$  da água a 20 MHz em função da concentração de GdL5 em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4, a 298 K B).

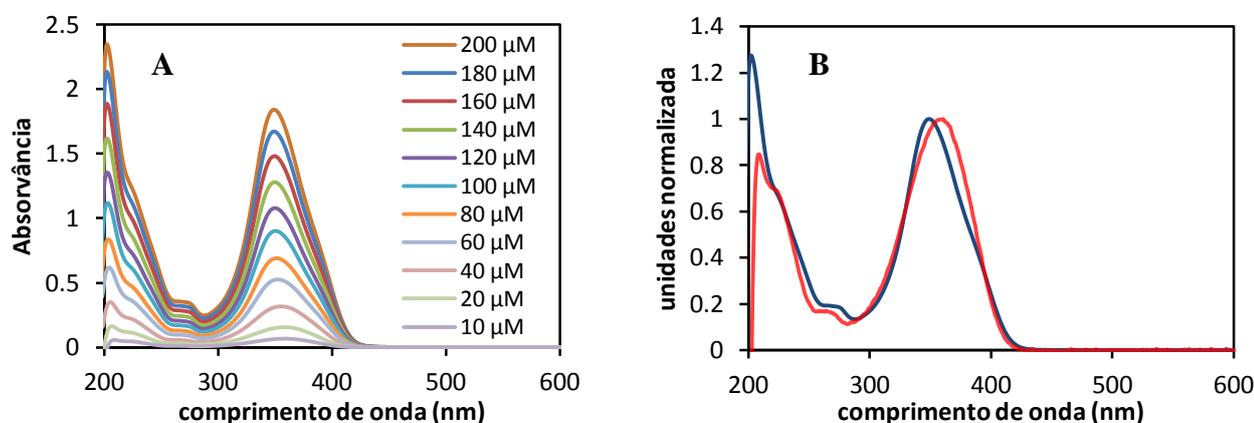
**Tabela 3.8-** Relaxividade da forma monomérica não agregada ( $r_1^{n.a.}$ ) e da forma agregada micelar ( $r_1^a$ ), com o respectivo valor de CMC do complexo estudado (GdL5), comparados com outros sistemas da literatura.

	$r_1^{n.a.}$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$r_1^a$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	CMC (mM)	Referência
GdL1 <sup>a)</sup>	6.4	13.9	1.49	115
GdL3 <sup>a)</sup>	6.1	13.8	1.00	115
GdL4 <sup>a)</sup>	7.9	22	0.68	120
GdL5 <sup>a)</sup>	-	11.87	0.02±0.005	Obtido neste trabalho

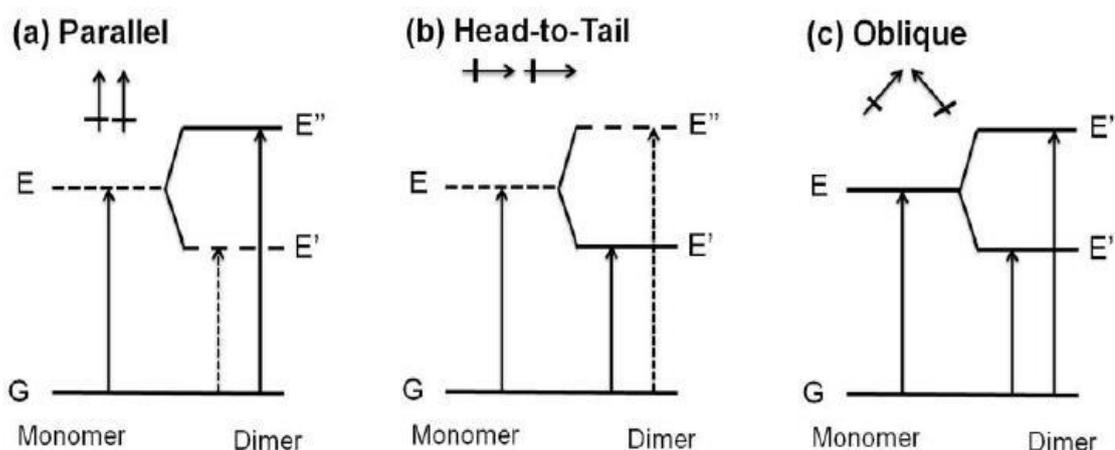
a) Valores obtidos a 40 MHz, 25 °C

interno, inviabilizando a realização da experiência.

A determinação do valor do CMC foi realizada por espectrofotometria de UV/Vis, tendo sido adquiridos vários espectros a diferentes concentrações (Figura 3.17A). Quando os espectros são normalizados no máximo de absorção, correspondente à transição  $S_0 \rightarrow S_1$  a cerca de 360 nm, é possível verificar que há alterações nas propriedades ópticas da forma monomérica do complexo e da forma micelar do complexo (Figura 3.17B). Para simplificação, na Figura 3.17B só são apresentados os espectros correspondentes aos valores extremos das concentrações da amostra estudadas, 10 e 200  $\mu\text{M}$ . Como podemos ver na Figura 3.17B, o máximo de absorção correspondente à transição  $S_1 \leftarrow S_0$  sofre um desvio de 360 nm, na forma monomérica, para 349 nm, na forma micelar, indicando que o CMC se encontra neste intervalo de concentrações. Este fenómeno pode ser explicado da seguinte maneira: quando dois compostos com um sistema aromático se aproximam o suficiente formando um dímero, podendo interagir ou acoplar, há um desdobramento do estado excitado em dois. O efeito deste acoplamento depende de como estão organizados os momentos de transição de dipolo das duas moléculas. Se estiverem numa



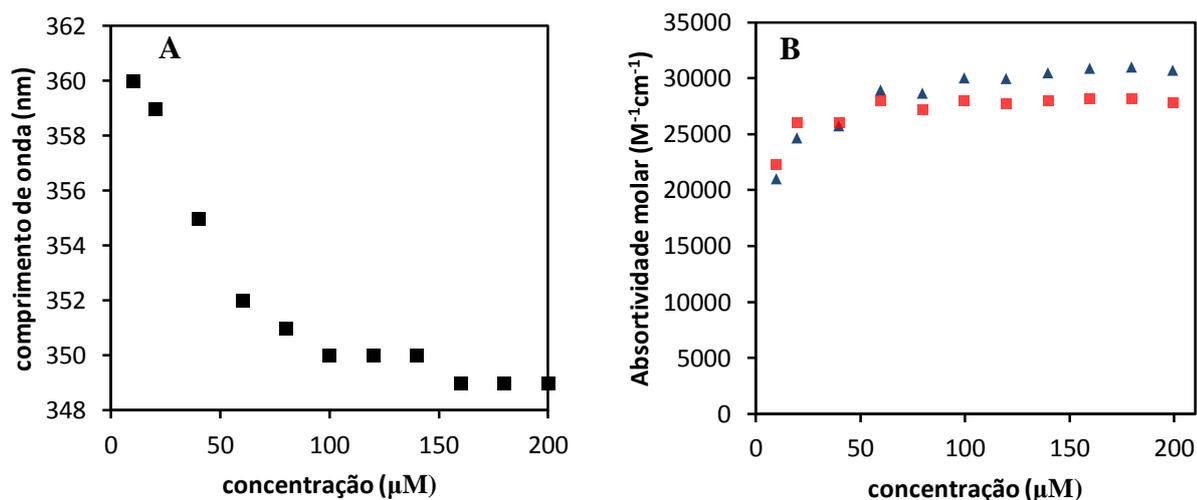
**Figura 3.17-** Espectros UV/Vis em função da concentração de GdL5 **A)** Espectros UV/Vis com as absorvâncias normalizadas pelo máximo de absorção correspondente à transição  $S_0 \rightarrow S_1$  entre os 345-360 nm de GdL5 a 10  $\mu\text{M}$  (vermelho) e a 200  $\mu\text{M}$  (azul) **B)** (tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4, T=298 K).



**Figura 3.18-** Esquema do desdobramento do estado excitado com as probabilidades de transição (linhas a cheio) para dímeros com diferentes orientações dos seus momentos de transição de dipolo (retirado da referência 136).

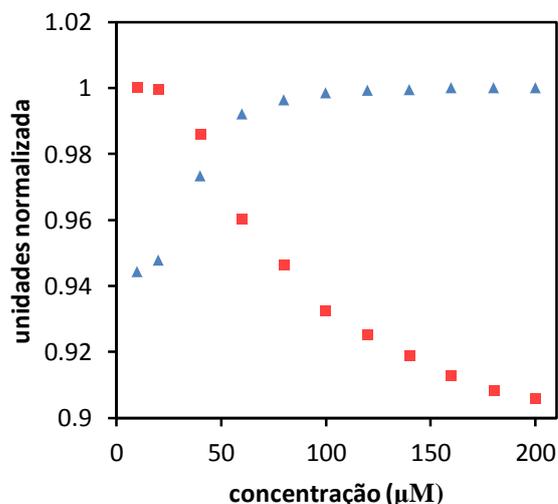
configuração relativa paralela, a transição ocorrerá mais favoravelmente para o estado excitado de maior energia, levando a um desvio para o azul ou hipsocrómico no espectro de absorção, aparecendo a comprimentos de onda menor, originando os chamados agregados H. Se, por outro lado, os momentos de transição de dipolo das duas moléculas tiverem uma configuração relativa de cabeça de um para a cauda do outro (*head-to-tail*), a transição ocorrerá preferencialmente para o estado de menor energia, ocorrendo um desvio para o vermelho ou batocrómico, originando os chamados agregados J. Por último, se os momentos de transição de dipolo das duas moléculas estiverem numa configuração relativa oblíqua, ocorre transição para os dois estados energéticos excitados, desdobrando a banda de absorção em duas (Figura 3.18)<sup>155</sup>. Pela Figura 3.19A podemos verificar que à medida que aumenta a concentração de complexo GdL5 há um desvio do máximo de absorção para comprimentos de onda menores, ou seja um desvio hipsocrómico, indicando que os momentos de transição de dipolo do complexo ao agregarem se encontram paralelos.

Foi verificado que o coeficiente de absorção molar, para cada concentração e a um determinado comprimento de onda, varia com o grau de agregação, apresentando na forma monomérica valores mais baixos do que na forma micelar. Verifica-se assim que o coeficiente de absorção molar vai aumentando com a concentração até atingir um valor fixo para a forma micelar, mostrando a maior probabilidade de transição electrónica para a forma micelar (Figura 3.19B).



**Figura 3.19-** Gráfico representando a variação do comprimento de onda do máximo de absorção em função da concentração **A**). Variação do coeficiente de absorção molar do complexo GdL5 em função da concentração a 349 nm ( $\blacktriangle$ ) e a 360 nm ( $\blacksquare$ ) **B**). (tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4, T=298K).

O valor do CMC foi obtido representando graficamente a absorvância normalizada em função da concentração, que é uma forma de seguir as alterações no comprimento de onda do máximo de absorção. Usaram-se os valores das absorvâncias normalizados no comprimento de onda do máximo de absorvância da forma monomérica, a 360 nm, e da forma micelar, a 349 nm (Figura 3.20). O valor de CMC é definido como sendo a última concentração a partir do qual começam a surgir as micelas, e em termos experimentais corresponde à concentração em que se identifica uma variação brusca numa propriedade. A partir desta definição e da Figura 3.20, no comprimento de onda do máximo de absorção da forma monomérica (360 nm), a absorvância normalizada é máxima e igual a um a baixas concentrações, sendo que a absorvância

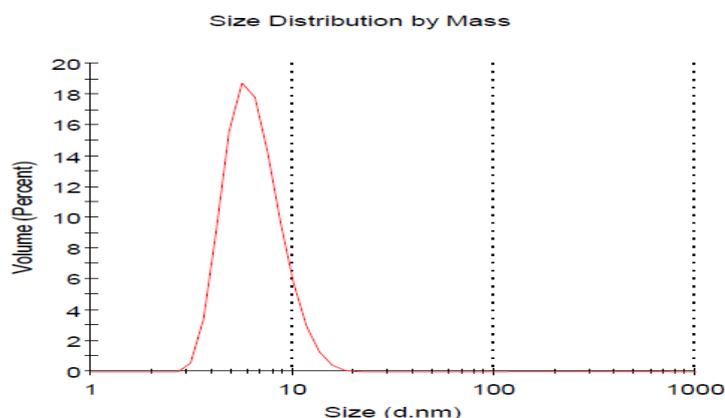


**Figura 3.20-** Variação da absorvância normalizada do complexo GdL5 em função da concentração a 349 nm ( $\blacktriangle$ ) e a 360 nm ( $\blacksquare$ ) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4, T=298 K.

normalizada diminui a partir dos 20  $\mu\text{M}$ . Para o comprimento de onda do máximo de absorção da forma micelar (349 nm), é visível que a absorvância normalizada é máxima para concentrações superiores a 50  $\mu\text{M}$  e que atinge um mínimo a partir dos 20  $\mu\text{M}$ . Desta forma, o valor do CMC obtido foi de  $20 \pm 5 \mu\text{M}$ , podendo-se definir o erro como sendo aproximadamente metade do intervalo de concentrações estudadas, que nesta região foi de 10  $\mu\text{M}$ . Apesar de ter sido possível localizar o CMC, é necessário recorrer a melhores técnicas para obter um valor mais correcto.

A grande diferença verifica entre os valores de CMC dos complexos GdL $x$  ( $x=1,3$  e 4) e o complexo GdL5 pode ser explicada principalmente pela maior lipofilicidade do complexo GdL5, verificada anteriormente pela determinação do valor de log P (ver secção 3.3.7). Desta forma, a maior lipofilicidade do complexo GdL5 permite esperar que forme micelas a muito menores concentrações que os restantes complexos (Tabela 3.8).

Foi medido o tamanho hidrodinâmico médio das micelas formadas pelo complexo GdL5 por medidas de dispersão dinâmica de luz (DLS), tendo-se obtido um valor do diâmetro de  $8.72 \pm 2.91 \text{ nm}$  e uma estimativa de massa molecular de  $105.2 \pm 64.2 \text{ kDa}$ , fornecida pelo software do instrumento, que é baseada numa recta de calibração da massa empírica em função do tamanho da partícula (Figura 3.21). Utilizando o valor de 930.6 Da para a massa molecular do complexo GdL5(H<sub>2</sub>O), o número de agregação micelar ( $N_{\text{agg}}$ ) obtido foi de 113 monómeros de complexos por micela. No entanto, este valor poderá não ser correcto, pois estas medidas de DLS mede o tamanho da micela incluindo a esfera de hidratação, acrescido ainda do problema da solução ser polidispersa, obtendo-se desta forma um valor sobrestimado. Seriam necessários mais estudos utilizando outras técnicas, tais como a dispersão de neutrões (do inglês *Small-Angle Neutron Scattering*, SANS) que elimina o efeito do solvente.



**Figura 3.21-** Determinação do tamanho da micela GdL5 a 1 mM de em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7.4, T= 298 K, utilizando medidas da dispersão dinâmica de luz (DLS).

### 3.4 Conclusão

Neste capítulo foram estudadas as propriedades físico-químicas dos ligandos L<sub>x</sub> (x = 4 e 5) e dos respectivos complexos com iões Ln<sup>3+</sup> para a sua aplicação em Imagiologia Óptica e de Ressonância Magnética, com a escolha do ião metálico adequada para cada uma destas modalidades. Para Imagiologia Óptica foram estudados complexos com os iões metálicos Eu<sup>3+</sup> e Tb<sup>3+</sup>, tendo sido demonstrado que os complexos com Tb<sup>3+</sup> têm muito menor rendimento quântico de luminescência que os respectivos complexos com Eu<sup>3+</sup>. Para além do mais, o maior tamanho de espaçador no complexo envolvendo o ligando L5 provoca uma diminuição de cerca de uma ordem de grandeza no rendimento quântico de luminescência em relação aos respectivos complexos envolvendo o ligando L4, que possui um espaçador de menor dimensões. Foi ainda verificado que o ligando L5 é fotodegradável, inviabilizando a utilização dos complexos com este ligando em Imagem Óptica. Por outro lado, o complexo EuL4 é o que apresenta as melhores propriedades para ser usado em imagiologia Óptica, incluindo a vantagem de ser um emissor no infravermelho próximo, região onde há poucos constituintes biológicos a absorver ou emitir. Tem ainda as vantagens de ser o complexo que possui o maior rendimento quântico de luminescência, para além de ter o maior tempo de vida de luminescência, permitindo realizar de forma mais eficaz Imagiologia Óptica resolvida no tempo. O ligando L4, ao contrário do ligando L5, não é fotodegradável, característica fundamental para a realização de Imagiologia Óptica.

Para o complexo GdL5 foi verificado, pela determinação do valor de Log P<sub>octanol/água</sub>, que é bastante mais lipofílico que os restantes ligandos desenvolvidos anteriormente, GdL<sub>x</sub> (x=1,2 e 3), perspectivando-se melhor capacidade deste complexo para atravessar a barreira hemato-encefálica. O carácter anfifílico do complexo provoca a formação de micelas, que para este complexo, por ser mais lipofílico, se formam a um menor valor de CMC (20 µM) que os restantes complexos GdL<sub>x</sub> (x = 1,3 e 4). Devido a este baixo valor de CMC, só foi possível determinar a relaxividade do complexo GdL5 na forma micelar, tendo-se obtido um valor de 11.87 mM s<sup>-1</sup>. No que respeita à forma monomérica, prevê-se que tenha um valor semelhante ao do complexo GdL3 (6.1 mM s<sup>-1</sup>)<sup>115</sup>. De facto, à semelhança do GdL3, o GdL5 é um derivado de DO3A e tem estrutura química semelhante ao GdL3 (Figura 1.20). Portanto, os valores de relaxividade do GdL5 são elevados, dando uma boa indicação para seu uso em IRM.

## CAPÍTULO 4

**Estudo *in vitro* da interacção dos complexos derivados de PiB com a HSA e com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub>, e sua influência na agregação do péptido amilóide**



## 4.1 Introdução

A proposta inicial do projecto é o desenvolvimento de sondas imagiológicas vectorizadas para a detecção de agregados amilóides, implicados na doença de Alzheimer. Como tal, é necessário realizar experiências *in vitro* que provem que a sonda interage com os agregados amilóides, com afinidades e cinéticas adequadas, que permitam o seu uso como sonda imagiológica. No capítulo 3 foram estudadas as propriedades físico-químicas dos complexos. No presente capítulo vai ser estudado a interacção do complexo GdL5 com a albumina de soro humana (HSA) com a determinação da constante de associação ( $K_A$ ) por aumento de relaxação protónica (PRE). A interacção do complexo GdL5 com o péptido  $A\beta_{1-40}$  foi estudada por relaxometria e por ressonância de plasmão de superfície (SPR), com a determinação da constante de dissociação ( $K_D$ ). Foram ainda efectuados estudos de interacção por RMN, como a experiência de STD para verificar se efectivamente é o fenil-benzotiazol (PiB) o responsável pela interacção com o péptido  $A\beta_{1-40}$ , e a experiência de HSQC para verificar que resíduos do péptido interagem com o complexo. Por fim, foi estudado a influência do complexo na estrutura secundária do péptido  $A\beta_{1-40}$ , por dicroísmo circular (CD) e por microscopia de transmissão electrónica (TEM), para compreender se o complexo inibe ou promove a agregação do péptido.

## 4.2 Procedimento experimental

### 4.2.1 Material e preparação das amostras

Os complexos foram obtidos como descrito no capítulo 2. O péptido  $A\beta_{1-40}$  marcado com  $^{15}N$  e não marcado foram adquiridos na AlexoTech®. A albumina de soro humana (HSA) livre de ácidos gordos ( $\leq 0.01\%$ ) e de globulinas ( $\leq 1\%$ ) foi obtido da Sigma Aldrich®. A água deuterada (99.9%) e o ácido acético deuterado ( $C_2D_4O_2$ ) foram obtidos da Euriso-top®. O dimetil sulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) foi obtido da Aldrich®.

### 4.2.2 Interacção com o péptido $A\beta_{1-40}$ usando $^1H$ NMRD.

Os perfis de NMRD de protão foram realizados num relaxómetro Stelar SMARtracer Fast Field Cycling RMN (0.01-10 MHz) e num electromagneto Bruker WP80 RMN (20, 40, 60 e 80 MHz) adaptado para medidas de campo variável e controlados por uma consola PC-RMN

SMARTtracer. A temperatura foi monitorizada por uma unidade de controlo de temperatura VTC91 e mantida por fluxo de gás. A temperatura foi determinada por prévia calibração por uma sonda de temperatura com uma resistência de platina. As medidas foram realizadas em meio aquoso com tampão HEPES 50 mM, pH=7.4, a 310 K para o complexo GdL5 na presença e ausência de péptido A $\beta_{1-40}$ .

O péptido A $\beta_{1-40}$  foi inicialmente dissolvido em solução ligeiramente alcalina com NaOH, e após a dissolução foi adicionado tampão HEPES 50 mM, pH=7.4, obtendo-se uma solução de péptido A $\beta_{1-40}$  0.2 mM e com uma concentração estequiométrica de complexo GdL5.

### 4.2.3 Determinação da constante de afinidade com a albumina de soro humano

A constante de afinidade entre o complexo GdL5 e a albumina de soro humana (HSA) foi obtida pela técnica de aumento de relaxação protónica (PRE)<sup>156</sup>. O aumento da velocidade de relaxação protónica ( $R_1^{p\text{ obs}} = R_{1p} - R_1^0$ , diferença entre as velocidades de relaxação das soluções contendo GdL5 e HSA, com a solução diamagnética do solvente aquoso em tampão HEPES 50 mM, pH= 7.4) foi obtido a concentrações crescentes de proteína, mantendo constante a concentração de GdL5 a 0.1 mM em tampão HEPES 50 mM, pH = 7.4. A constante de associação ( $K_A$ ) foi obtida fazendo o ajuste dos dados experimentais à seguinte equação:

$$R_1^{p\text{ obs}} = 10^3 \times \left\{ \frac{(r_1^f \cdot c_1) + \frac{1}{2}(r_1^c - r_1^f) \times}{\left( n \cdot c_{\text{HSA}} + c_1 + K_A^{-1} - \sqrt{(n \cdot c_{\text{HSA}} + c_1 + K_A^{-1})^2 - 4 \cdot n \cdot c_{\text{HSA}} \cdot c_1} \right)} \right\} \quad (4.1)$$

onde  $r_1^f$  e  $r_1^c$  representam as relaxividades protónicas do complexo livre e ligado à albumina,  $c_{\text{HSA}}$  e  $c_1$  são as concentrações de HSA e de complexo GdL5, respectivamente, e  $n$  é o número de locais de ligação na proteína. As medições foram realizadas num relaxómetro Bruker Minispec mq20 (20 MHz,  $B_o = 0.47$  T) a 310 K. A concentração da solução padrão de HSA foi verificada por espectrofotometria de UV/Vis usando a absorvância a 279 nm, considerando o valor tabelado de absorvância de 0.531 para 1 g/L de HSA e a massa molecular em solução da HSA de 66500 Da<sup>157</sup>. A análise dos dados experimentais foi realizada com auxílio do software OriginPro 8 versão 8.0.

#### 4.2.4 Medidas de ressonância de plasmão de superfície (SPR)

Os estudos de interacção em tempo real do complexo GdL5 com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> imobilizado por espectroscopia de SPR foram realizados usando instrumentação Biacore 3000 (Biacore Life Sciences/GE Healthcare®) equipado com 4 células de fluxo num chip sensor (Chip Sensor Série S, CM5) e termostaticado para 25°C. N-hidroxissuccinimida (NHS), N-etil-N'-[(dimetilamino) propil]-carbodiimide (EDC) e etanolamina HCl foram obtidos da Biacore. O péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> foi dissolvido em água desionizada a uma concentração de 1 mg/mL, e pequenas aliquotas foram congeladas até a sua utilização. Tampão HEPES salino contendo 0.01M HEPES, pH= 7.4, 0.15 M NaCl, 3mM EDTA e 0.005% de surfactante P20 foi usado como tampão de corrida e na preparação da amostra.

O protocolo de imobilização do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> no “*chip*” seguiu as condições padrão de acoplamento de amina<sup>158</sup>. A matriz de carboximetildextrano no “*chip*” foi activada por injeção de uma mistura de EDC e NHS (70  $\mu$ L, 200 mM de EDC e 50 mM de NHS) para permitir a ligação covalente do péptido através de grupos amina primários, formando uma amida. O péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> a uma concentração de 0.5 mg/mL em tampão de acetato de sódio foi injectado nas células de fluxo activas. Uma solução de etanolamina (70  $\mu$ L, 1M, pH=8.5) foi injectada para reagir com o éster de NHS que não reagiu<sup>158,159</sup>.

Para maximizar o tempo de contacto, a velocidade de fluxo em todas as etapas foi mantida a 20  $\mu$ L/min. Soluções de GdL5 de 140  $\mu$ L com concentração entre 0 e 250  $\mu$ M, em tampão de corrida, descrito anteriormente, foram injectadas para a associação com o péptido imobilizado ( tempo de contacto de 400 s). A subsequente dissociação foi seguida com o mesmo tampão durante 200 s. Após cada injeção de complexo GdL5, o “*chip*” foi regenerado com tampão de regeneração ( glicina-HCl 100 mM em tampão Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 10 mM, pH= 9, tempo de contacto 240 s) e lavado com tampão de corrida entre 5 e 10 minutos antes de nova injeção. Todas as soluções tampão foram filtradas com filtros de nylon embutidos em seringas 0.22  $\mu$ m (Millipore®, USA) antes de serem utilizadas.

O software de controlo Biacore 3000 (versão 4.1) da Biacore Life Sciences/GE Healthcare® foi usado para recolher e analisar a dependência temporal dos sensogramas (RUs). Os dados de controlo foram subtraídos dos dados em bruto obtidos através da célula de fluxo com péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> imobilizado. A resposta no equilíbrio em função da concentração foi ajustada

a uma curva isotérmica de Langmuir 1:1 (proteína:ligando), para obtenção da constante de dissociação ( $K_D$ )<sup>160</sup>:

$$Y = \frac{Y_{\max}}{1 + \frac{K_D}{[GdL5]}} \quad (4.2)$$

Onde Y é o sinal instrumental obtido para uma determinada concentração de complexo GdL5 e  $Y_{\max}$  corresponde ao sinal instrumental máximo obtido para o sistema em estudo associado à saturação dos sítios de ligação do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> pelo complexo GdL5. A análise dos dados experimentais foi realizada com auxílio do software OriginPro 8 versão 8.0.

#### 4.2.5 Estudo da interacção péptido-ligando por RMN

A amostra para obtenção do espectro <sup>1</sup>H STD-RMN foi obtida por incubação durante aproximadamente 10 dias, a 37°C, do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> em fosfato de sódio 30 mM, pH 7.4 em água deuterada, de modo a obter o péptido na forma agregada. O espectro STD foi efectuado num espectrómetro Bruker Avance III HD 500 MHz funcionando a 11.7 T, 500.13 MHz, equipado com uma sonda 5 mm BBF-H-D. A amostra final deste estudo consiste em 50  $\mu$ M de péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> agregado na presença de 450  $\mu$ M de complexo LaL4 (razão molar de complexo LaL4 e péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> de 9:1) em 10 mM de tampão fosfato a pH 7.4, usando D<sub>2</sub>O (99.9%). A supressão de água foi efectuada usando a sequência de pulsos DPGSE (do inglês *Double Pulse Field Gradient Spin Echo*). Neste sistema de RMN os espectros de STD foram adquiridos directamente através da ciclização de fase dos pulsos. O espectro “*off-resonance*” foi adquirido com a saturação a uma frequência de 30 ppm, o que corresponde a um espectro RMN 1D normal. Para o espectro “*on-resonance*” a saturação foi efectuada a 0.7 ppm (zona metilo do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub>), com um pulso gaussiano. Os espectros “*on*”- e “*off-resonance*” foram adquiridos alternadamente, com utilização de um pulso “*Trim*” para remover o sinal do péptido.

O espectro de <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC de RMN para caracterização da interacção do complexo GdL5 com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> marcado com <sup>15</sup>N foi obtido num espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz operando a 14.09 T observando <sup>1</sup>H a 600.13 MHz, equipado com criosonda de três canais (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e <sup>15</sup>N). O péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> marcado com <sup>15</sup>N a uma concentração “*stock*” de 1 mM em DMSO-d<sub>6</sub> foi diluído 10 vezes em tampão fosfato 10 mM e 10 % D<sub>2</sub>O. O pH inicial era ligeiramente alcalino tendo sido diminuído para 7.2 pela adição de pequenas quantidades de ácido acético deuterado. A concentração final do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> era cerca de 100  $\mu$ M. Espectros

1D  $^1\text{H}$  (16 “*scans*” por espectro) e espectros 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (matriz= 1024 para a dimensão  $^1\text{H}$  e 128 para a dimensão  $^{15}\text{N}$ , “8 *scans*”) foram adquiridos a 5°C. Foi usado um módulo de Watergate à base de gradiente para supressão do solvente. Foi usado como referência o desvio químico do DMSO.

#### 4.2.6 Estudo da agregação do péptido $\text{A}\beta_{1-40}$ por fluorescência da Tioflavina T

A aquisição dos espectros de fluorescência foi obtida com um Fluorímetro Cary Eclipse (Varian®), com o software Varian Cary Eclipse versão 1.1 à temperatura ambiente. A preparação da solução de tioflavina T (ThT) foi realizada com a sua dissolução em água desionizada, tendo sido de seguida filtrada por um filtro embutido em seringa de 0.45  $\mu\text{M}$ . A ThT foi quantificada pela dissolução de uma alíquota em etanol usando um coeficiente de absorção molar de 26620  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 416 nm<sup>161</sup>.

#### 4.2.7 Estudo da agregação do péptido $\text{A}\beta_{1-40}$ por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) no UV longínquo

O espectro de dicroísmo circular no UV longínquo foi adquirido num espectropolarímetro Jasco J-810 CD equipado com sistema de controlo de temperatura Jasco PTC-423S. As medidas foram realizadas a 25°C e a 37°C usando uma célula de percurso óptico de 1 mm. O espectro foi recolhido numa atmosfera de  $\text{N}_2$ , de 190 a 260 nm com incrementos de 0.5 nm. Os dados foram adquiridos com integração de 0.5 s por ponto e o espectro foi obtido pela média de pelo menos 10 scans e a contribuição do tampão foi subtraída ao espectro da amostra.

O péptido foi preparado através do protocolo adaptado de Abelein *et al.* para a preparação da solução “*stock*”<sup>90</sup>. A preparação da solução “*stock*” iniciou-se com a dissolução dos péptidos numa solução em água ligeiramente alcalina, com o ajuste do pH para valores a rondar os 9 com NaOH. Por fim, com o intuito de agregar o péptido, este foi misturado com uma solução de tampão fosfato de sódio, para que a concentração final do tampão fosse de 10 mM, pH 7.4, ajustado com NaOH e HCl. As amostras contêm uma concentração final de 40  $\mu\text{M}$  de péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4 e várias razões molares de complexo GdL5

(1:1, 1:2, 1:4, 1:10, péptido:complexo GdL5). As amostras foram incubadas ao longo do tempo à respectiva temperatura em estudo.

Os espectros de dicroísmo circular obtidos para as amostras de 40  $\mu\text{M}$  de péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  com 10 equivalentes de complexo GdL5 a 25°C e 37°C foram suavizadas pelo método de Adjacent-Averaging com 10 pontos.

#### **4.2.8 Estudo da agregação do péptido $\text{A}\beta_{1-40}$ por microscopia de transmissão electrónica (TEM)**

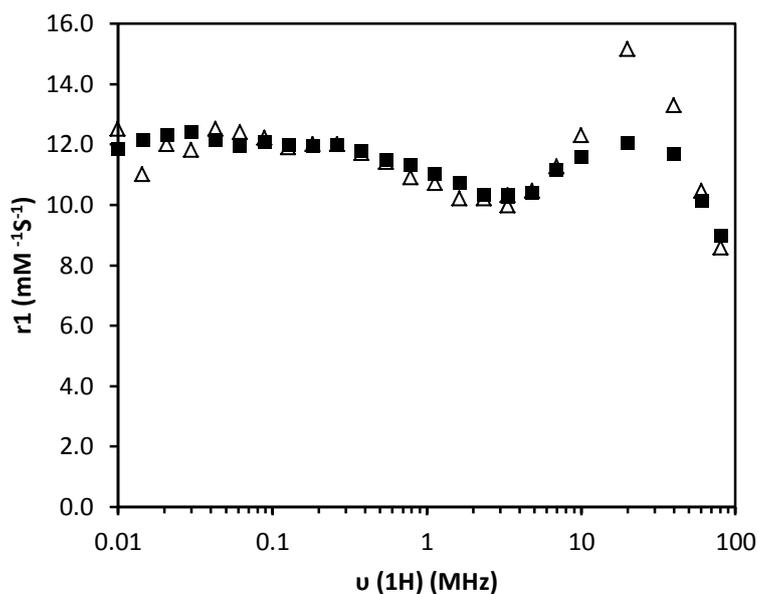
Amostras de 5  $\mu\text{L}$  de péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  agregado com diferentes concentrações de complexo GdL5, incubados pelo menos durante 10 dias a 37°C, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4, foram depositadas numa grelha de cobre recoberta por uma membrana de carbono. Após 5 minutos de decantação, a solução é absorvida com papel de filtro. De forma a lavar o tampão da grelha sem remover as fibras precipitadas na membrana de carbono, foi depositado 5  $\mu\text{L}$  de água destilada ultra-pura em cada grelha durante 1 minuto e foi reabsorvido, e esta operação foi repetida duas vezes. Em cada grelha foi depositado 5  $\mu\text{L}$  de acetato de uranilo a 2% em água durante 3 minutos e foi reabsorvido após o processo com papel de filtro. As amostras foram examinadas num microscópio de transmissão electrónica CM20 Philips® operando a 200 kV.

### 4.3 Resultados e Discussão

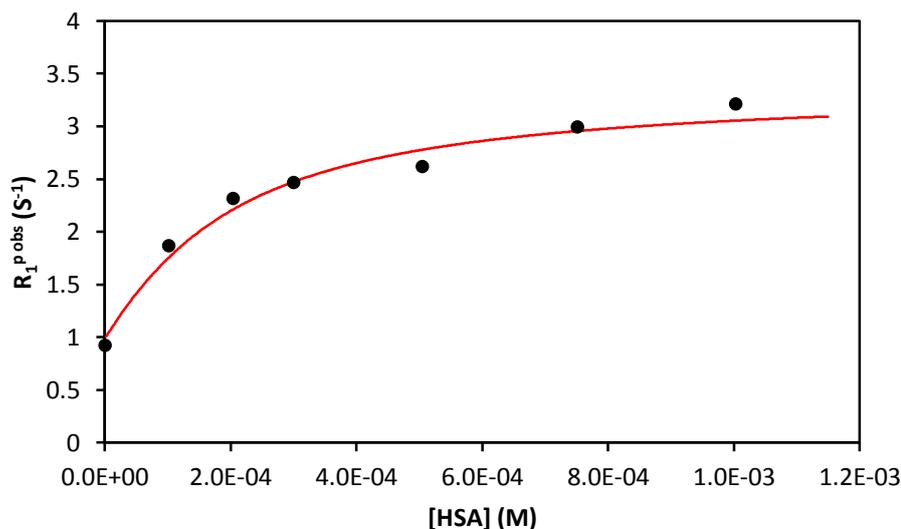
#### 4.3.1 Medidas relaxométricas na determinação da interacção do complexo GdL5 com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> e com a albumina de soro humana

A interacção do complexo GdL5 com os agregados amilóides provoca a imobilização do complexo nesses agregados, com a consequente restrição dos movimentos rotacionais e a diminuição do seu tempo de correlação ( $\tau_r$ ), provocando um aumento na relaxividade, nomeadamente em valores intermédios de campo magnético. A relaxividade do complexo GdL5 na sua forma micelar, na presença de péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> na razão de concentrações de 1:1 ( $[GdL5] = [A\beta_{1-40}] = 0.2 \text{ mM}$ ), aumenta consideravelmente para valores do campo magnético correspondentes a frequências de 10-60 MHz, onde o efeito da rotação lenta é mais pronunciado (Figura 4.1). O máximo de relaxividade do complexo GdL5 na presença do péptido amilóide é verificado a 20 MHz, onde a relaxividade aumenta 26% em relação ao complexo GdL5 sozinho na sua forma micelar, demonstrando que a interacção específica com os agregados amilóides melhora consideravelmente a eficiência da sonda como agente de contraste positivo para IRM.

A partir dos resultados dos estudos com os complexos GdLx ( $x= 1, 3$  e  $4$ ), em que foi verificada a interacção destes complexos com a albumina humana<sup>115,120</sup>, é expectável que o complexo GdL5 também interaja com a albumina humana e que a campo magnético intermédio haja um grande aumento de relaxividade. A interacção do complexo com a albumina humana



**Figura 4.1-** Perfil <sup>1</sup>H NMRD do complexo GdL5 a 0.2 mM sozinho (■) e na presença de 0.2 mM de péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> (Δ). (Tampão HEPES 50 mM, pH 7.4, T= 310 K).



**Figura 4.2** - Gráfico da Relaxação protónica induzida para obtenção da constante de associação ( $K_A$ ) em função da concentração da albumina humana e com concentração fixa de GdL5 a 0.1 mM, em tampão HEPES 50 mM, pH= 7.4 (20 MHz, 310K).

permite prever um maior tempo de vida do complexo no plasma sanguíneo, evitando uma rápida excreção do complexo do corpo humano, porém trás a desvantagem do complexo estar menos disponível para atravessar a barreira hemato-encefálica<sup>162</sup>. É de referir que a albumina humana e o péptido  $A\beta_{1-40}$  não são competidores directos *in vivo* pelo complexo GdL5 uma vez que estes se encontram em diferentes compartimentos corporais.

A constante de associação do complexo GdL5 com a albumina humana foi obtida através da técnica de aumento de relaxação protónica (PRE), método não separativo comum no estudo bioquímico entre sistemas biológicos e complexos de  $Gd^{3+}$  para obtenção de parâmetros de interacção, através das diferenças na relaxação da ressonância magnética nuclear dos prótons da água entre o substrato ligado e não ligado à proteína, uma vez que a interacção de compostos paramagnéticos com proteínas aumenta consideravelmente a relaxação protónica da água<sup>156</sup>. O gráfico representando o aumento da velocidade de relaxação protónica numa solução com concentração constante de GdL5 em função da concentração crescente de HSA, está apresentado na Figura 4.2. Assumindo que há apenas um sítio de ligação na albumina humana ( $n= 1$ ), o ajuste não linear da curva de titulação com a equação 4.1 permitiu obter o valor da constante de associação ( $K_A$ ) de  $7.45 \pm 2.7 \times 10^3 M^{-1}$ , uma relaxividade do complexo interagindo com a HSA ( $r1^c$ ) de  $31.9 \pm 1.8 mM^{-1}s^{-1}$  e uma relaxividade do complexo livre ( $r1^f$ ) de  $9.1 \pm 1.2 mM^{-1}s^{-1}$  (Figura 4.2, Tabela 4.1). Esta constante de associação é um valor médio obtido na região de concentrações estudados, não levando em conta a possível formação de agregados entre o complexo na sua forma micelar com a albumina, podendo haver vários fenómenos ao longo da região de concentrações estudados. A afinidade do complexo GdL5 é cerca de uma ordem de

**Tabela 4.1** - Parâmetros obtidos do ajuste da titulação do complexo GdL5 com a albumina de soro humana (HSA) a 310 K, comparados com valores da literatura.  $K_A$ - constante de associação;  $r1^c$ -relaxividade do complexo de ligação não covalente entre o complexo e a albumina;  $r1^f$ - relaxividade da forma livre do complexo.

	$K_A/10^3$ ( $M^{-1}$ )	$r1^c$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )	$r1^f$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )	Referência
GdL1 <sup>b)</sup>	0.91	55.0	5.3	114
GdL3 <sup>b)</sup>	0.25	77.0	4.9	115
GdL4 <sup>b)</sup>	6.53	39.0	7.3	120
GdL5 <sup>a)</sup>	7.45±2.7	31.9±1.8	9.1±1.2	Obtido neste trabalho
[Gd(BOPTA)(H <sub>2</sub> O)] <sup>2-</sup> a)	1.5	42.9	5.2	164
[Gd(EOB-DTPA)(H <sub>2</sub> O)] <sup>2-</sup> a)	1.5	37.3	6.0	164

a) Valores obtidos a 20 MHz

b) Valores obtidos a 40 MHz

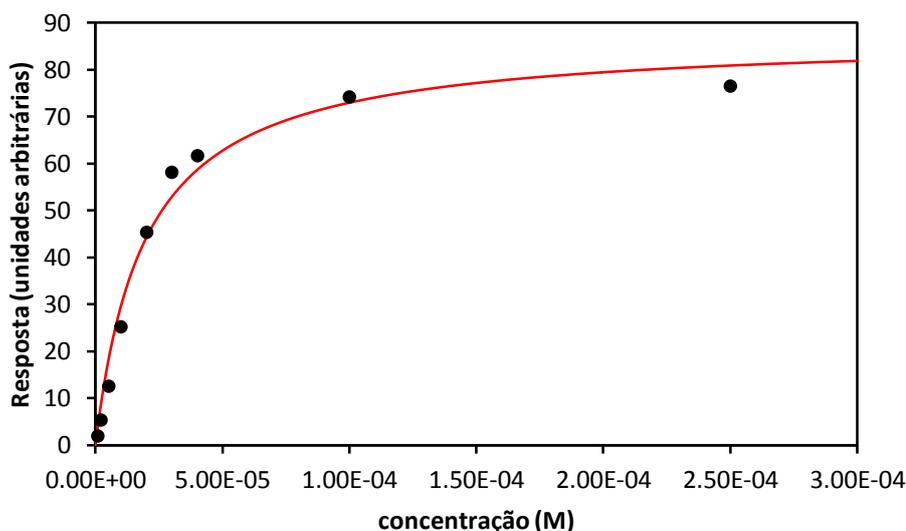
grandeza superior à afinidade dos complexos GdL1 e GdL3, e da mesma ordem de grandeza do complexo GdL4 (Tabela 4.1). A maior hidrofobicidade do complexo GdL5 poderá explicar a sua maior afinidade comparativamente aos complexos GdL1 e GdL3. A carga negativa do complexo GdL4 torna mais favorável a interação com a albumina humana, no entanto, a forma micelar do complexo GdL5 deverá também tornar favorável a interação com a albumina comparativamente aos restantes complexos. A afinidade do complexo GdL5 está na mesma ordem de grandeza que a dos complexos acíclicos e carregados negativamente, [Gd(BOPTA)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2-</sup> e [Gd(EOB-DTPA)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2-</sup>(Tabela 4.1). Com esta técnica não é possível obter o valor de  $K_A$  para molécula de PiB uma vez que ele não é paramagnético.

Como é sabido, a albumina humana possui múltiplos potenciais sítios de ligação. Na literatura são reportados alguns exemplos de ligação de complexos Gd<sup>3+</sup> a mais de um sítio de ligação independente com diferentes constantes de associação. Este tipo de estudos são realizados por ultrafiltração e os resultados obtidos normalmente indicam que uma das constantes de associação é bastante superior à outra (tipicamente  $K_{A1}/K_{A2}=15-30$ , podendo haver casos em que a diferença ainda é significativamente superior) e uma vez que os dados relaxométricos não permitem distinguir entre diferentes modelos de ligação, um modelo de ligação isotérmico 1:1 (proteína-ligando) é uma boa aproximação para os complexos de Gadolínio (III)<sup>163-165</sup>.

### 4.3.2 Estudo de interação do complexo GdL5 com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> por SPR

Como tínhamos visto anteriormente que o complexo GdL5 interagia com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> por relaxometria, foi obtida a constante de dissociação ( $K_D$ ) por SPR com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> imobilizado, sendo uma técnica que permite mimetizar o estado agregado do péptido. Esta técnica permite atenuar significativamente problemas experimentais como a possível variação do estado agregado do péptido durante a experiência, bem como a reprodutibilidade da experiência uma vez que é difícil obter o mesmo estado de agregação na repetição experimental.

A Figura 4.3 mostra a curva de ligação obtida com ajuste dos dados de SPR com uma isotérmica de Langmuir 1:1 (equação 4.2) para a interação entre o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> e GdL5, dando um valor de  $K_D$  de  $19.5 \pm 3.0 \mu\text{M}$ . Na Tabela 4.2 são comparados os valores de  $K_D$  dos complexos anteriormente estudados LaL1, LaL3 e GdL4 e nota-se uma melhoria significativa na constante obtida para o complexo GdL5 com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub>, evidenciado que a maior lipofilicidade do complexo verificada pelo valor de log P, devido ao aumento do tamanho do espaçador, é um factor importante no aumento da interação do complexo com os agregados amilóides. No entanto, o valor de  $K_D$  para o complexo GdL5 continua a ser bastante mais elevado que para as pequenas moléculas orgânicas (PiB e ThT)<sup>119,166</sup>. A conjugação do quelato metálico à sonda diminui significativamente a interação do PiB com o péptido amilóide, sendo que a interação do GdL5 é cerca de uma ordem de grandeza inferior à do composto orgânico ThT carregado positivamente, e cerca de 4 ordens de grandeza inferior ao composto PiB livre (Tabela 4.2). Desta forma, nota-se que à medida que o espaçador aumenta a interação torna-se mais



**Figura 4.3-** Curvas de interação do complexo GdL5 com péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> ajustada com uma função isotérmica de Langmuir com o número de sítios de ligação igual a um ( $n=1$ ).

**Tabela 4.2-** Constantes de afinidade ( $K_D$ ) do GdL5 e dos complexos desenvolvidos anteriormente LaLx (x=1,3) e GdL4 e pequenas moléculas orgânicas na interacção com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub>.

	$K_D$ ( $\mu$ M)	Referência
LaL1	170 <sup>a)</sup>	116
LaL3	67 <sup>a)</sup>	116
LaL4	194 <sup>a)</sup>	120
GdL5	19.5 $\pm$ 3.0 <sup>a)</sup>	Obtido neste trabalho
ThT	2 <sup>b)</sup>	166
[ <sup>11</sup> C]-PiB	0.0047 <sup>c)</sup>	119

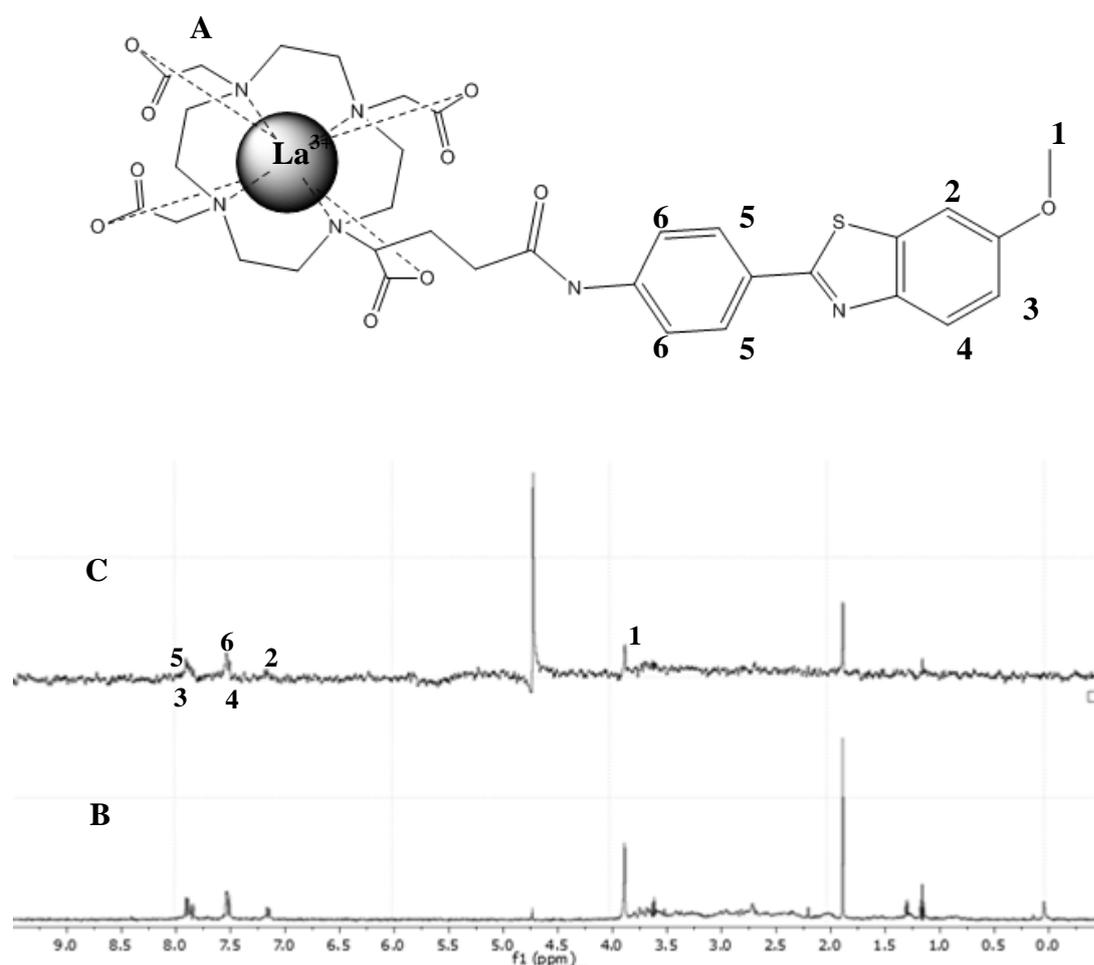
- a) Obtido por SPR  
 b) Obtido por fluorescência  
 c) Obtido por radioactividade do <sup>11</sup>C

forte, como visto pelo menor valor  $K_D$  verificado para os complexos LaL3 e GdL5, que são os que têm maior tamanho de espaçador, diminuindo desta forma o efeito do quelato em tornar a interacção com os agregados amilóides mais fraca. O aumento do espaçador deverá aumentar a flexibilidade da zona do PiB, permitindo uma maior liberdade conformacional com o consequente aumento da interacção com o agregado amilóide.

### 4.3.3 Estudo da interacção dos complexos com o péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> por espectroscopia de RMN (STD e HSQC)

A experiência de STD, que foi descrita pela primeira vez por Mayer *et al.*, é uma técnica de RMN baseada na transferência de saturação intra e intermolecular, permitindo identificar ligandos, assim como que partes dum ligando que interagem selectivamente com macromoléculas, normalmente proteínas, que têm massa molar maior que 10 kDa<sup>167</sup>. Desta forma, é possível construir um mapa epitopo, uma vez que os prótons recebem diferentes saturações em função da distância à macromolécula, que no presente caso é um agregado de péptido.

Na experiência de STD realizada com uma amostra contendo 50  $\mu$ M de péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> em tampão fosfato 10 mM, PH 7.4 com 450  $\mu$ M de complexo diamagnético LaL4, a saturação do agregado foi realizada a 0.7 ppm, num pico correspondente aos grupos metilos do péptido numa zona onde o complexo não tem ressonâncias. A partir do espectro 1D de STD é possível verificar que zonas do complexo interagem com o agregado. A atribuição dos sinais de <sup>1</sup>H de RMN foi



**Figura 4.4** – Estrutura do complexo LaL4 usado na experiência de STD com a numeração dos prótons, da porção do PiB **A**). Espectro de referência de RMN 1D DPGSE de LaL4 450  $\mu\text{M}$  na presença de 50  $\mu\text{M}$  de péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  em tampão fosfato 10 mM, pH=7.4, T=25°C **B**) e respectivo espectro RMN 1D de STD **C**).

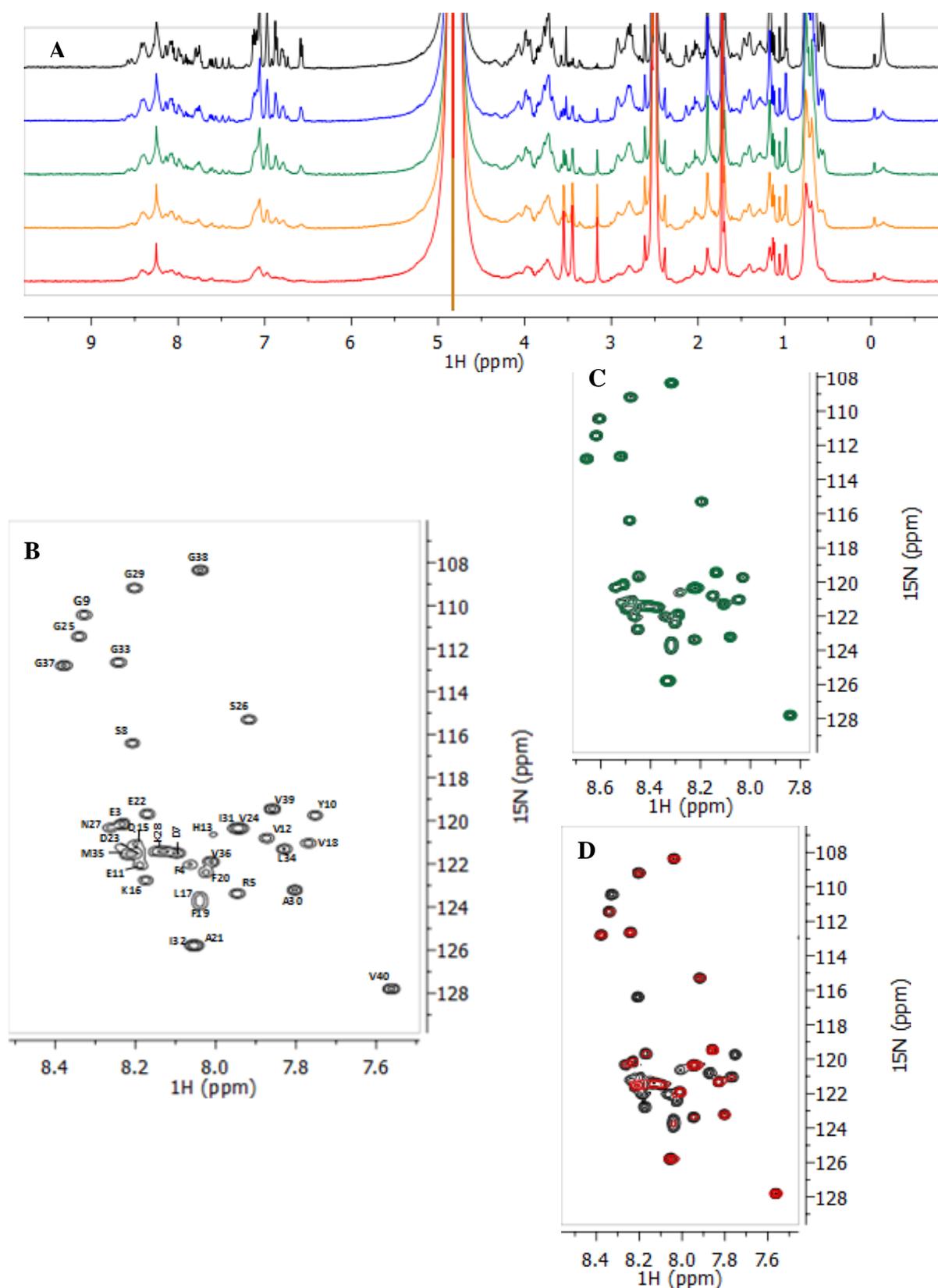
realizada através do auxílio dos trabalhos anteriores, tendo sido seguido o esquema de atribuição de sinal anteriormente usado para o complexo LaL3 e LaL1, em que a estrutura do PiB é igual<sup>116</sup>. Na Figura 4.4B temos os espectro de referência  $^1\text{H}$  DPGSE de RMN da amostra e na Figura 4.4C o respectivo espectro STD. Tendo em conta o esquema de numeração dos prótons do complexo (Figura 4.4A), e a partir do espectro de STD (Figura 4.4C), conclui-se que os prótons do LaL4 que interagem com o péptido são principalmente os do fenil-benzotiazol e o grupo metoxi. O pico a 2 ppm que surge tanto no espectro de referência como no espectro de STD é uma impureza, e o pico a 4.7 ppm é o sinal da água. Como se vê na Figura 4.4C, o espectro STD apresenta muito ruído e baixa intensidade de sinal, não sendo possível fazer a sua integração e

obter o mapa epitopo com a indicação de quais os prótons que estão mais próximos do péptido agregado.

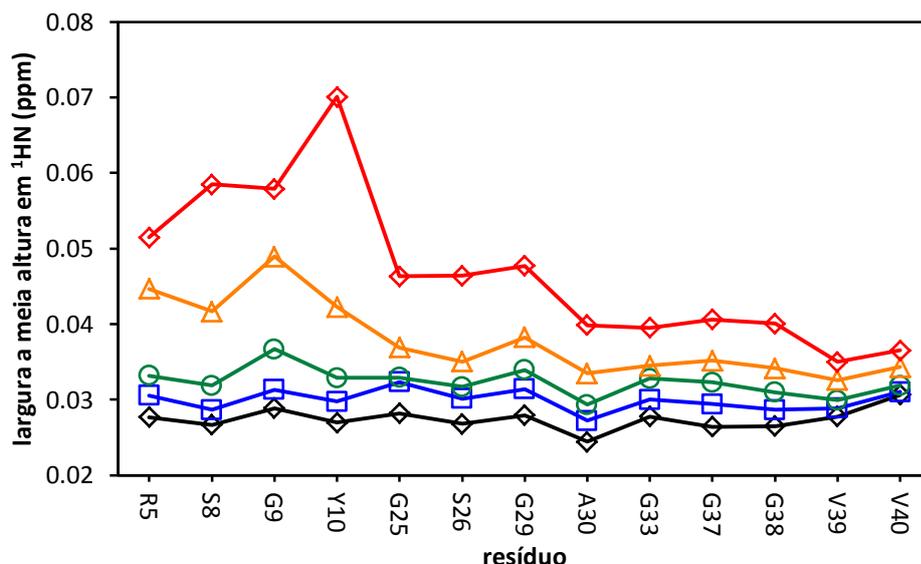
A experiência de STD também foi executada para o complexo LaL5, no entanto, não se conseguiu visualizar o sinal do espectro 1D  $^1\text{H}$  a 25°C do complexo, pelas mesmas razões enunciadas na secção 2.4 para o ligando L5 livre, no qual as alterações conformacionais a esta temperatura são duma ordem de grandeza que tornam as bandas de RMN de  $^1\text{H}$  tão largas que não são visíveis. Foi realizada a metalação do ligando L5 com ião metálico  $\text{Lu}^{3+}$ , que também é diamagnético e é o ião metálico da série dos lantânios com raio atómico mais pequeno, de forma a tentar restringir a liberdade conformacional do ligando no complexo para ser possível ver o sinal  $^1\text{H}$  a 25°C. Contudo, novamente não foi possível ver o sinal protónico do complexo, e como é impraticável realizar este tipo de experiências a temperaturas elevadas com o péptido, como foi o caso da obtenção dos sinais do ligando L5 livre a 60°C, esta experiência não é praticável e foi abandonada. No entanto, é expectável que seja também o fenil-benzotiazol dos complexos formados pelo ligando L5 que interaja com o péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$ .

O estudo da interacção do complexo GdL5 com a forma monomérica do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  foi estudada por RMN, de forma semelhante ao que tinha sido realizado para o complexo GdL4<sup>120</sup>. Para esse propósito foram seguidas as alterações no espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC do péptido  $^{15}\text{N}$ - $\text{A}\beta_{1-40}$  a 100  $\mu\text{M}$  com a adição do complexo GdL5. Para garantir o estado monomérico do péptido este estudo foi realizado a 5°C para minimizar problemas associados à troca de próton da amida com a água assim como problemas associados à auto-agregação do péptido que provocam perda de sinal. O péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  em solução aquosa a baixa temperatura tem uma estrutura desordenada (do inglês *random coil*) com dois segmentos com propensão para adoptar uma conformação em folha- $\beta$  (segmento de resíduos de 16-24 e 31-36), com duas regiões com tendência em adoptar uma hélice poli-*prolina* do tipo II (hélice-PII, resíduos 1-4 e 11-15) e duas regiões sem estrutura com elevada mobilidade conectando estes elementos estruturais (resíduos 5-10 e 25-30). Ao longo do tempo, o péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  tem tendência a formar oligómeros e fibrilas amilóides<sup>168</sup>.

O espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC do péptido  $^{15}\text{N}$ - $\text{A}\beta_{1-40}$  sozinho está representado na Figura 4.5B em que foi realizada a expansão do espectro para corresponder à zona dos  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  da cadeia principal do péptido, excluindo o par de picos dos grupos  $^1\text{H}_2$ - $^{15}\text{N}$  da amida da cadeia lateral dos resíduos Gln15 e Asn27, e o pico  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  da cadeia lateral Arg5. Com esta expansão obtém-se um pico por resíduo e a atribuição dos sinais foi realizada com o auxílio de trabalhos anteriormente publicados<sup>90,120,168-170</sup>. A maior parte dos picos são visíveis e distinguíveis, e apesar de alguns picos aparecerem sobrepostos, é possível fazer a sua atribuição. Porém, devido



**Figura 4.5** – Interação do complexo GdL5 com o péptido  $^{15}\text{N}$ -A $\beta_{1-40}$  a  $100\ \mu\text{M}$  estudado por RMN. Espectro 1D  $^1\text{H}$  do péptido A $\beta_{1-40}$  (preto), com 0.5 equivalentes de GdL5 (azul), com 1 equivalente (verde) e 2 equivalentes (laranja) e 4 equivalentes de GdL5 (vermelho) **A**). Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC do péptido A $\beta_{1-40}$  com atribuição dos sinais baseada em publicações anteriores<sup>90,120,168-170</sup> **B**). Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC do péptido A $\beta_{1-40}$  (preto) sobreposto com o espectro HSQC 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC do péptido A $\beta_{1-40}$  com 1 equivalente de GdL5 (verde) **C**) e com 4 equivalentes de GdL5 (vermelho) **D**). Os espectros foram recolhidos a  $5^\circ\text{C}$  em tampão fosfato  $10\ \text{mM}$ ,  $\text{pH}=7.2$  em  $90\% \text{H}_2\text{O}$ ,  $10\% \text{D}_2\text{O}$ , num espectrómetro Bruker  $600\ \text{MHz}$  equipado com crio-sonda.



**Figura 4.6** – Largura a meia altura em ppm na frequência  $^1\text{H}$  dos sinais  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  de alguns resíduos do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  a  $100\ \mu\text{M}$  na ausência de GdL5 (preto), com 0.5 equivalentes (azul), 1 equivalente (verde), 2 equivalentes (laranja) e 4 equivalentes de GdL5 (vermelho). A largura a meia altura em ppm dos sinais foi recolhida onde não se verifica sobreposição de sinais no espectro 2D  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC.

ao alargamento do sinal em consequência da troca protónica dos protões HN com os protões do solvente, não é possível identificar os sinais dos resíduos D1, A2, H6, H14.

A adição de 0.5 e 1 equivalentes de complexo GdL5 à solução de péptido  $^{15}\text{N}-\text{A}\beta_{1-40}$  produz apenas pequenos alargamentos de alguns sinais  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ , e nenhum desvio nos desvios químicos (Figura 4.5A e Figura 4.6). Como é visível na Figura 4.5C, em que são sobrepostos os espectros  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC do péptido  $^{15}\text{N}-\text{A}\beta_{1-40}$  sozinho e com 1 equivalente de complexo GdL5, não há alterações significativas nos espectros. No entanto, com a adição de 2 e 4 equivalentes, são visíveis alargamentos drásticos nos sinais dos  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  (Figura 4.5A e Figura 4.6). Também na sobreposição dos espectros  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC do péptido  $^{15}\text{N}-\text{A}\beta_{1-40}$  na ausência e na presença de 4 equivalente de complexo GdL5 é visível que alguns picos alargam tanto que deixam de ser visíveis (Figura 4.5D). De referir que o alargamento dos sinais  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  é verificada apenas na frequência  $^1\text{H}$ .

A partir da Figura 4.5A, por adição de complexo GdL5 é visível, sobretudo no espectro 1D  $^1\text{H}$  do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  com 4 equivalentes de complexo GdL5, para além de um alargamento

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40  
 - - + + - - + + + - - +  
 D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V

**Figura 4.7** – Sequência de aminoácidos do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  com a indicação dos resíduos que desapareceram no espectro  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC do péptido  $^{15}\text{N}-\text{A}\beta_{1-40}$  a  $100\ \mu\text{M}$  com 4 equivalentes de complexo GdL5 (Figura 4.5D), devido ao alargamento dos sinais provocado pela interacção entre o péptido e o complexo (resíduos a azul). Na sequência de resíduos é ainda indicado as cargas dos resíduos a pH fisiológico (pH=7.4) e a indicação da região do péptido intramembranar, hidrofóbica (resíduos a roxo)

na zona dos sinais dos prótons  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (7.5-8.5 ppm), também se verifica um alargamento na zona aromática do sinal  $^1\text{H}$  (6.5-7.5 ppm), na zona dos prótons do carbono  $\alpha$  dos resíduos (3.1 – 4.5 ppm), e na dos prótons da zona alifática de carbonos da cadeia lateral mais afastados do carbono  $\alpha$  (2.2 – 0.5 ppm). Este alargamento dos sinais é devido à proximidade do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  ao ião  $\text{Gd}^{3+}$  paramagnético do complexo  $\text{GdL5}$ . No entanto, não podemos excluir o facto da interacção do complexo com o péptido poder induzir no péptido a adopção de múltiplas conformações que se interconvertem na escala temporal do RMN dos  $\mu\text{s}$ - $\text{ms}$ , provocando também alargamento do sinal. De forma semelhante ao que se verifica da interacção entre o péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  e moléculas do tipo detergente, como o dodecil sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS)<sup>171</sup> e vermelho do congo<sup>90</sup>, e moléculas hidrofóbicas como o lacmoide<sup>91</sup>, em que a perda de sinal  $^1\text{H}$  do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  verificado por RMN é interpretado em termos de formação de pequenos agregados heterogéneos que se interconvertem na escala temporal do RMN nos  $\mu\text{s}$ - $\text{ms}$ .

Todas estas evidências mostram uma interacção do complexo  $\text{GdL5}$  com a forma monomérica do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$ , à semelhança do que se tinha verificado para os complexos  $\text{GdL1}$ <sup>116</sup> e  $\text{GdL4}$ <sup>120</sup>, onde também ocorria alargamento selectivo dos sinais no espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$ , contrastando com a ausência de alterações no espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  na presença do complexo  $\text{GdL3}$ , indicando que este último complexo não interage com a forma monomérica do péptido<sup>116</sup>. Na Figura 4.7 estão representados os resíduos que desaparecem no espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC do péptido  $^{15}\text{N}$ - $\text{A}\beta_{1-40}$  na presença de 4 equivalentes de complexo  $\text{GdL5}$  (Figura 4.5D), devido ao grande alargamento do sinal como visto na Figura 4.6. Com estes dados, à semelhança do que tinha sido verificado para os complexos  $\text{GdL1}$  e  $\text{GdL4}$ , conclui-se que a interacção do complexo  $\text{GdL5}$  com o péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  tem lugar na zona hidrofílica, no segmento de resíduos F4-F20, numa zona de grande densidade de carga, que inclui uma das regiões com tendência em adoptar uma hélice-PII (resíduos de 11-15), uma das regiões sem estrutura (resíduos de 5-10) e o início do segmento com tendência para adoptar a conformação em folha- $\beta$  (resíduos 16-24).

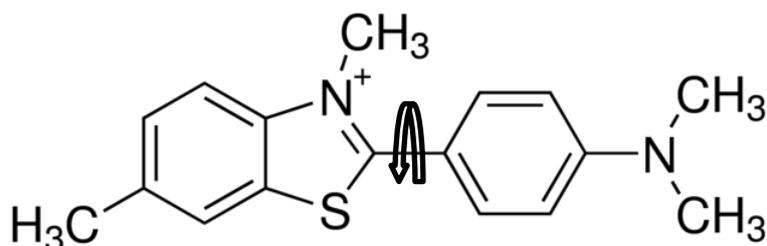
A interacção do complexo  $\text{GdL5}$  com a forma monomérica do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  só foi verificada no espectro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC do péptido a partir da presença de 2 equivalentes de  $\text{GdL5}$  (200  $\mu\text{M}$ ). Isto sugere que a afinidade do complexo  $\text{GdL5}$  com a forma monomérica do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  é inferior à afinidade do complexo  $\text{GdL5}$  com os agregados do péptido, o que é uma característica importante uma vez que se pretende detectar os agregados do péptido e não a sua forma monomérica.

#### 4.3.4 Efeito do complexo GdL5 na agregação e estrutura secundária do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub>

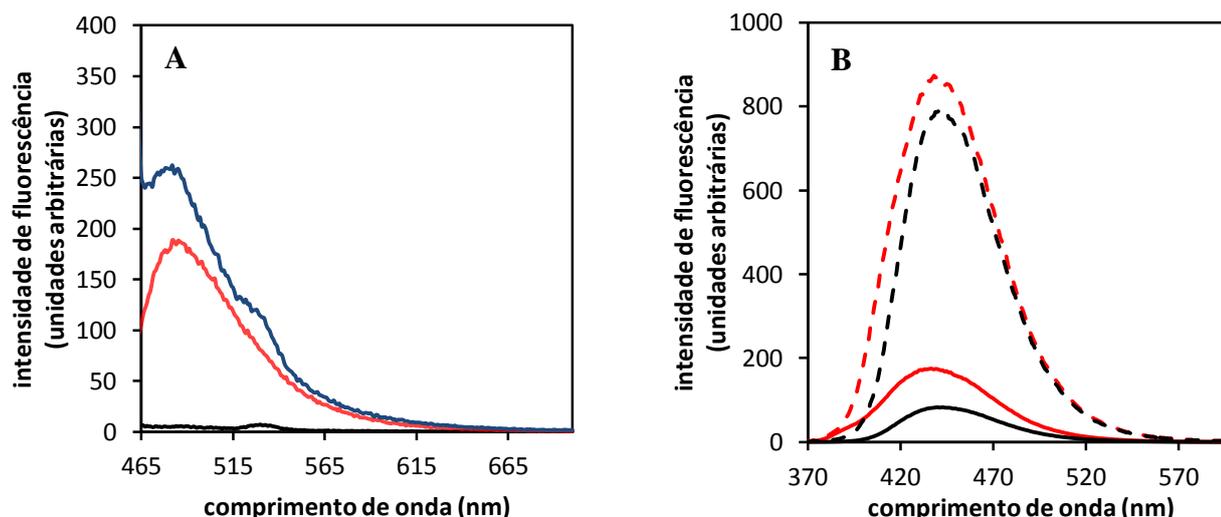
Na literatura têm sido reportados variados estudos que se baseiam em investigar a influência da adição de aditivos na agregação do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> monitorizado pela fluorescência da tioflavina T (ThT), por dicroísmo circular (CD) e por microscopia de transmissão electrónica (TEM) e verifica-se que alguns destes aditivos inibem e outros promovem a agregação do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub><sup>90,91,116,120,171</sup>. No presente trabalho tentou-se estudar o efeito do complexo GdL5 na agregação do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> por monitorização da fluorescência da ThT, por CD e por TEM.

A Tioflavina-T (ThT) é uma sonda que se associa rapidamente e especificamente a agregados com estrutura em folha- $\beta$  dando origem a um novo máximo de absorção a 450 nm e emissão a 482 nm, em contraste com o máximo de absorção a 385 nm e emissão a 445 nm para a sonda livre. Estas mudanças fotofísicas da ThT são dependentes do estado de agregação do péptido, sendo que não há interacção entre a ThT e péptidos monoméricos. A interacção da ThT com agregados do péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> ocorre com um  $K_D$  de 2  $\mu$ M. A razão das mudanças fotofísicas da ThT da forma livre para forma ligada a agregados tem sido alvo de grande debate, sem haver um consenso geral. No entanto para explicar o aumento na intensidade de fluorescência da ThT aquando da ligação a agregados amilóides, estudos recentes apontam que a restrição do movimento rotacional entre o benzotiazol e o aminobenzoil no estado fundamental e excitado é a principal razão para este fenómeno, sendo sugerido que a ThT interage com os agregados amilóides numa conformação planar provocando maior conjugação no composto e um desvio batocrómico (ou para o vermelho), em contraste com a grande liberdade de movimento rotacional da ThT na forma livre, diminuindo a conjugação no composto(Figura 4.8)<sup>161,166,172-174</sup>.

Usando a ThT como sonda para detectar agregados amilóides, verificamos efectivamente o que é descrito na literatura, em que a ThT na forma livre com excitação a 450 nm não emite luz, mas na presença de agregados amilóides emite a 482 nm (Figura 4.9A). No entanto, na



**Figura 4.8** – Estrutura da Tioflavina T (ThT) com a indicação da rotação entre o benzotiazol e o aminobenzoil que explica a variação das propriedades fotofísicas da ThT aquando da ligação a agregados amilóides.



**Figure 4.9-** Espectro de fluorescência da sonda ThT sozinha a 2  $\mu\text{M}$  (linha a preto), na presença de 5  $\mu\text{M}$  de péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  (linha a vermelho) com a sobreposição do espectro de fluorescência da sonda ThT a 2  $\mu\text{M}$  na presença de 10  $\mu\text{M}$  de complexo GdL5 (linha a azul) **A**). Emissão de fluorescência de GdL5 a 1  $\mu\text{M}$  (linha preto a cheio) e a 5  $\mu\text{M}$  GdL5 (linha a tracejado a preto), e na presença de 5  $\mu\text{M}$  de péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  (linhas a vermelho) **B**). (tampão fosfato de sódio 10 mM, pH=7.4).

Figura 4.9A também é visível que a fluorescência da ThT aumenta na presença do complexo GdL5, evidenciado uma interacção entre a ThT e GdL5. Isto poderá ser explicado da mesma forma que a interacção da ThT com os agregados amilóides, em que a ThT ao interagir com complexo GdL5 sofre restrição do movimento rotacional entre o benzotiazol e o aminobenzoil e é observada a emissão da ThT na mesma zona espectral como se estivesse a interagir com agregados amilóides. Esta observação da interacção da ThT com aditivos não é nova, tendo sido reportados alguns exemplos da mesma observação como descrito por Abelein *et al.* da interferência entre os corantes como o vermelho do *Congo*, e o lacmoide, com a sonda ThT<sup>90,91</sup>. O estudo cinético da agregação do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  na presença de complexo GdL5, monitorizado pela fluorescência da ThT, não foi realizado devido justamente a esta interacção entre a ThT e o complexo GdL5.

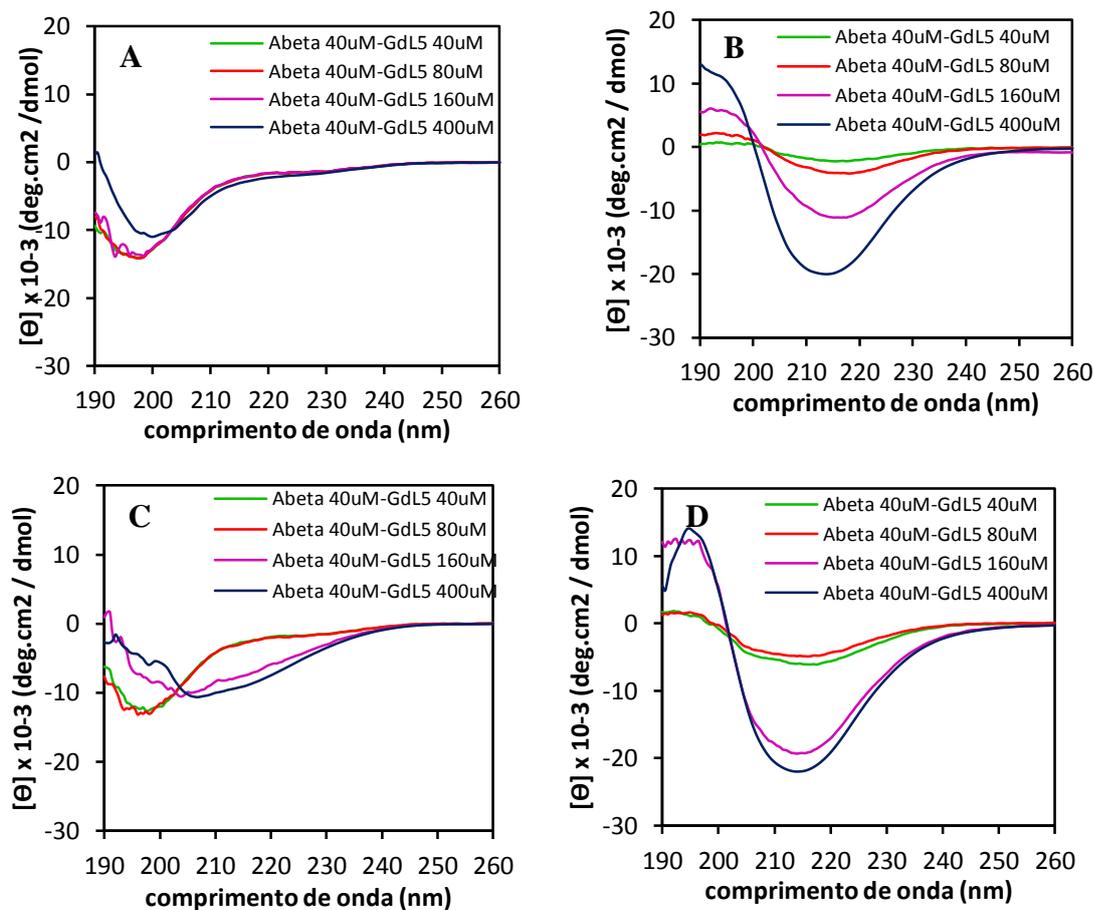
Curiosamente foi verificado que a fluorescência do complexo GdL5 na presença de agregados de péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$  aumenta de intensidade e sofre um ligeiro desvio hipsocrómico (para o azul) (Figura 4.9B). O aumento da intensidade de fluorescência pode ser explicado pelo facto de que a interacção com os agregados amilóides torna o ambiente menos simétrico, aumentando a probabilidade de emissão. O desvio no comprimento de onda poderá ser devido a um efeito de polaridade do ambiente, em que o complexo GdL5, no agregado, se encontra num ambiente mais hidrofóbico, ou devido à interacção de empilhamento entre os electrões  $\pi$  da porção aromática do complexo e os electrões  $\pi$  da tirosina do péptido  $\text{A}\beta_{1-40}$ , que provocam um desdobramento do estado excitado, à semelhança do que se tinha verificado aquando da

formação de micelas do complexo GdL5 (ver secção 3.3.8). Ao se verificar a alteração na fluorescência do complexo GdL5 na forma livre e interagindo com os agregados amilóides, torna-se possível o estudo de aspectos termodinâmicos da interacção, como por exemplo a determinação do  $\Delta H$  (variação de entalpia).

O dicroísmo circular no UV longínquo é uma técnica usada para estudar a estrutura secundária de uma proteína ou péptido em solução. A luz linearmente polarizada pode ser vista como a soma de duas componentes de igual magnitude, de luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita, e o espectropolarímetro mede justamente a diferença de absorção destas duas componentes. Se não houver absorção de nenhuma das componentes ou se as duas componentes de luz circularmente polarizada forem absorvidas na mesma extensão, a recombinação das duas componentes regenera a radiação linearmente polarizada e o sinal adquirido pelo espectropolarímetro é nulo. Se houver diferenças de absorção das duas componentes, a radiação resultante será elipticamente polarizada e haverá registo de sinal de CD, que será dependente da presença de centro quirais (por exemplo carbonos quirais) ou da presença de um ambiente assimétrico, devido a estruturas tridimensionais, que é o que ocorre nos péptidos e proteínas. O cromóforo que absorve na região do UV longínquo do espectro é a ligação peptídica que tem um carácter parcial de ligação dupla, absorvendo a comprimentos de onda inferiores a 240 nm. As transições electrónicas que se visualizam no CD nesta região estão associadas a transições do tipo  $\pi^* \leftarrow n$  pouco intensas entre os 240 e os 200 nm e a transições  $\pi^* \leftarrow \pi$  mais intensas, à volta dos 190 nm. Com os espectros de CD no UV longínquo é possível identificar diferentes tipos de estrutura secundária regular existente em proteínas e péptidos, sendo as principais: 1) as estruturas em hélice- $\alpha$ , com dois mínimos a 208 e 222 nm e um máximo a 193 nm; 2) as estruturas em folha- $\beta$ , com um negativo a 218 nm e um máximo a 195 nm; e 3) estruturas desordenadas (*random coil*) que apresentam um mínimo próximo dos 195 nm e um máximo a 220 nm<sup>175,176</sup>.

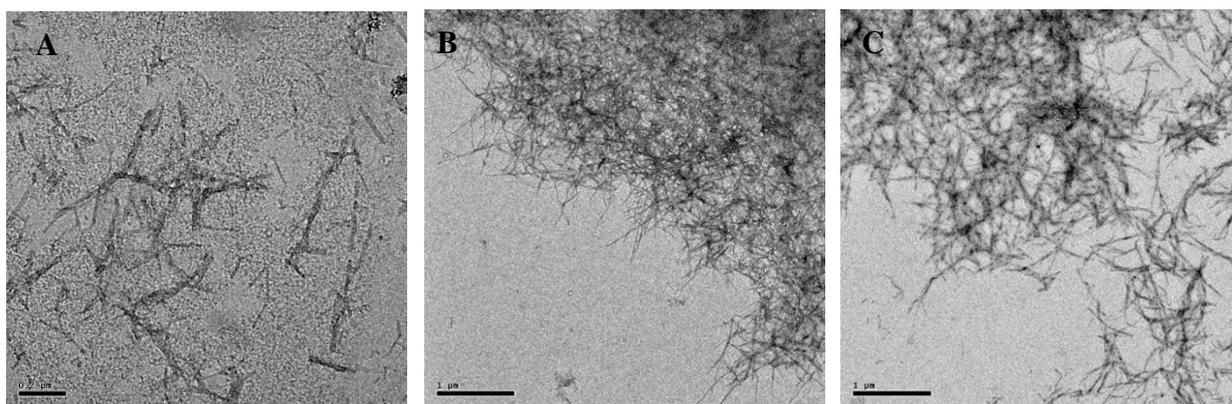
Foi realizado um estudo por CD durante 20 dias, para se observar o efeito do complexo GdL5 na agregação do péptido A $\beta_{1-40}$  a duas temperaturas de incubação (25° e 37°C) e foi verificado por TEM a evolução da formação de fibrilas com pelo menos 10 dias de incubação a 37°C. Por questões técnicas e de tempo, este estudo ainda é preliminar, faltando seguir a cinética de agregação do péptido A $\beta_{1-40}$  sozinho por CD e obter as imagens de TEM para as todas as amostras com o mesmo tempo de incubação. O estudo de CD foi realizado com o péptido A $\beta_{1-40}$  a 40  $\mu\text{M}$  na presença de 40, 80, 160 e 400  $\mu\text{M}$  de complexo GdL5, respectivamente 1, 2, 4 e 10 equivalentes. Apesar deste estudo ser preliminar, é possível tirar algumas conclusões a partir do estudo de CD. O péptido A $\beta_{1-40}$  na presença de complexo GdL5 no início da experiência

encontra-se numa estrutura desordenada a 25°C (Figura 4.10A). A 37°C no início da experiência ( $t=0$  horas) o péptido encontra-se em estrutura desordenada na presença de 1 e 2 equivalentes de complexo GdL5, porém na presença de 4 e 10 equivalentes o péptido, apesar de se encontrar maioritariamente em estrutura desordenada, o tempo de aquisição do espectro é suficiente para o péptido começar a adoptar uma estrutura ordenada (Figura 4.10C). Ao fim de 20 dias de incubação, em ambas as temperaturas, o péptido  $A\beta_{1-40}$  encontra-se com estrutura em folha  $\beta$  (Figura 4.10B e D). Com o estudo de CD é mostrado ainda que ao fim de 20 dias, o sinal correspondente à estrutura em folha  $\beta$  aumenta com o aumento da concentração de complexo GdL5, evidenciando que o aumento da concentração de GdL5 promove a formação de agregados maiores com estrutura em folha  $\beta$ . Esta conclusão também é sugerida pelas imagens de TEM adquiridas, em que é monitorizada a evolução fibrilar do péptido  $A\beta_{1-40}$  sozinho, na presença de 40  $\mu\text{M}$  (1 equivalente) e 160  $\mu\text{M}$  (4 equivalentes) de complexo GdL5, mostrando que a presença do complexo GdL5 provoca a formação de fibrilas maiores do que em comparação com o péptido sozinho (Figura 4.11). O complexo GdL5 mostra ter um efeito de promover a agregação



**Figura 4.10-** Espectro de CD no UV-longínquo do péptido  $A\beta_{1-40}$  a 40  $\mu\text{M}$  na presença de 40, 80, 160 e 400  $\mu\text{M}$  de complexo GdL5, respectivamente 1, 2, 4 e 10 equivalentes, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH= 7.4, a 25° (A,B) e 37°C (C,D) a 0h (A,C) e ao fim de 20 dias (B,D) de incubação.

do péptido  $A\beta_{1-40}$  de forma similar ao verificado para o complexo  $GdL1^{116}$  e para o congo red<sup>91</sup>, em contraste com efeito inibitório verificado para o complexo  $GdL3^{116}$  e  $GdL4^{120}$  e o lacmoide<sup>90</sup>. Este efeito do complexo  $GdL5$  sugere que poderá ter um efeito tóxico *in vivo*. No entanto, este estudo foi realizado a concentrações muito superiores ao verificado no córtex frontal de doentes de Alzheimer, em que se verifica uma concentração de péptido amilóide de 1-3  $\mu M$ <sup>109</sup>, mostrando que o efeito tóxico do complexo  $GdL5$  poderá eventualmente não ser significativo *in vivo*.



**Figura 4.11-** Imagens TEM do péptido  $A\beta_{1-40}$  adquiridas com pelo menos 10 dias de incubação a 37°C, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH= 7.4. O péptido  $A\beta_{1-40}$  sozinho a 40  $\mu M$  **A**) na presença de 40  $\mu M$  de  $GdL5$  **B**), e 160  $\mu M$  de  $GdL5$  **C**).

#### 4.4 Conclusão

No presente capítulo foi estudada a interação principalmente do complexo  $GdL5$  com o péptido  $A\beta_{1-40}$ , podendo estes resultados ser estendidos para outros iões trivalentes a complexar com o ligando L5, tais como os iões  $Eu^{3+}$ ,  $^{111}In^{3+}$  e  $^{68}Ga^{3+}$ , que são importantes para as modalidades Imagiológicas Óptica, SPECT e PET, respectivamente.

Nos trabalhos realizados anteriores já se tinha verificado a interação dos complexos  $LnLx$  ( $x= 1, 3, 4$ ) com o péptido  $A\beta_{1-40}$  e com a HSA<sup>116,120</sup>. No presente trabalho conseguimos provar pelo perfil de NMRD que o complexo  $GdL5$  interage com o péptido  $A\beta_{1-40}$ , havendo um aumento na relaxividade de cerca de 26% a 20 MHz, devido ao aumento do tempo de correlação ( $\tau_c$ ), o que é um dado importante do uso do complexo em IRM, e obtivemos por SPR um valor da constante de dissociação ( $K_D$ ) com o péptido agregado de  $19.5 \pm 3.0 \mu M$ . A visualização da interação do complexo com HSA permite prever um maior tempo de vida do complexo no

plasma sanguíneo, evitando uma rápida excreção do complexo do corpo humano, tendo-se obtido uma constante de associação ( $K_A$ ) de  $7.45 \pm 2.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  por PRE.

Com o aprofundar do estudo da interacção dos complexos com o péptido  $A\beta_{1-40}$  tentou-se obter o mapa do epitopo da interacção dos complexos com agregados  $A\beta_{1-40}$  por RMN pela experiência de STD, para averiguar que zonas do complexo interage, tendo-se verificado para o complexo LaL4 que a zona do PiB é a principal zona que interage com os agregados. Para o complexo LaL5 por razões técnicas de rápida interconversão na escala temporal do RMN ( $\mu\text{s}$ -ms), não foi possível obter o resultado da experiência. Contudo é expectável que também seja a zona do PiB a responsável pela interacção, devido à similaridade da sonda com o complexo LaL4, e também devido ao facto de as sondas terem sido desenvolvidas com o intuito de interagirem com agregados amilóides devido à conjugação com o PiB, que tem comprovada afinidade pelos agregados amilóides<sup>118</sup>. Foi verificado por  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC que o complexo GdL5 interage com a forma monomérica do péptido  $A\beta_{1-40}$  e que essa interacção ocorre preferencialmente na zona hidrofílica do péptido, entre os resíduos F4-F20. No entanto, a afinidade do complexo GdL5 com a forma agregada do péptido  $A\beta_{1-40}$  é maior do que a afinidade do complexo com a forma monomérica do péptido, sendo uma característica importante uma vez que se pretende detectar os agregados amilóides e não a sua forma monomérica.

Foi ainda estudada a influência do complexo GdL5 no processo de agregação do péptido  $A\beta_{1-40}$  por TEM e CD, verificando-se uma estimulação pelo complexo da ocorrência da formação de fibrilas com estrutura em folha- $\beta$ .

# **CAPÍTULO 5**

**Conclusões gerais e  
perspectivas futura**



A doença de Alzheimer é uma das grandes preocupações do século XXI, com o aumento da prevalência associado à maior esperança de vida. A falta de recursos disponíveis no diagnóstico desta patologia torna urgente o desenvolvimento de sondas que possam servir este propósito *in vivo*, uma vez que o diagnóstico é obtido somente *post mortem*. É com este propósito que o presente trabalho foi desenvolvido para dar seguimento ao trabalho desenvolvido anteriormente no grupo de investigação com os complexos  $\text{LnL}_x$  ( $x= 1,2,3$  e  $4$ )<sup>49,114–116,120</sup> e tentar otimizar as propriedades da sonda para seu uso nas várias modalidades imagiológicas através da alteração da estrutura do ligando. Os ligandos foram desenvolvidos de modo a formarem complexos metálicos termodinamicamente estáveis e cineticamente inertes usando um derivado de DOTA, para o ligando L4, e um derivado de DO3A, conjugado com um vector, um derivado de PiB com comprovada afinidade pelos agregados amilóides.

Estas sondas foram desenvolvidas para serem multi-modais, ou seja, poderem ser utilizadas em várias modalidades imagiológicas através da escolha adequada do metal usando o mesmo ligando, como por exemplo a utilização de  $\text{Gd}^{3+}$  para IRM,  $^{111}\text{In}^{3+}$  para SPECT,  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  para PET ou  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  e  $\text{Yb}^{3+}$  para Imagiologia Óptica no visível ou no infravermelho próximo. Com esse objectivo foi estudada a possível utilização do ligando L4 em Imagiologia Óptica para dar seguimento ao trabalho efectuado com este ligando para sua utilização em IRM<sup>120</sup>. O estudo do ligando L5 foi mais completo tendo-se sido investigadas as propriedades deste ligando para uso em Imagiologia Óptica e de Ressonância Magnética.

Em termos de utilização potencial dos complexos com iões  $\text{Ln}^{3+}$  dos ligandos L4 e L5 em Imagiologia Óptica, foi feita uma caracterização fotofísica dos ligandos e complexos para averiguar a eficiência de transferência de energia do cromóforo para o centro metálico, com o respectivo cálculo do rendimento quântico de luminescência. Uma das mais importantes características que os ligandos têm de verificar para seu uso em Imagiologia Óptica é serem fotoestáveis, tendo-se verificado que o ligando L4 é efectivamente fotoestável, ao contrário do ligando L5 que é fotodegradável, o que inviabiliza a sua utilização em Imagiologia Óptica. Neste estudo foi verificado que o complexo  $\text{EuL}_4$  é o que apresenta maior rendimento quântico de luminescência. No entanto o valor obtido  $\Phi_{\text{L}}^{\text{Ln}} = 1.835 \times 10^{-3} \pm 7.7 \times 10^{-5}$  é baixo para sua utilização em Imagiologia Óptica, sendo a distância entre o cromóforo e o centro metálico demasiado grande, a razão principal para este baixo rendimento.

O estudo *in vitro* para avaliar a capacidade do complexo  $\text{GdL}_5$  poder ser usado em IRM como agente de contraste positivo, sugere que este complexo tem boas propriedades físico-químicas para essa finalidade, como ter relaxividade elevada devido ao tempo lento de correlação rotacional ( $\tau_r$ ) provocado pela formação micelar a baixas concentrações,  $20 \pm 5 \mu\text{M}$ . O

caracter anfílico foi avaliado pela determinação de  $\log P$ , obtendo-se um valor de  $0.65 \pm 0.028$ , mostrando que este complexo é mais lipofílico que os restantes complexos  $GdLx$  ( $x= 1,2,3$ )<sup>115</sup>. Todavia, segundo algumas regras enunciadas na literatura<sup>92,93</sup>, prevê-se dificuldade do complexo  $GdL5$  atravessar a barreira hemato-encefálica a concentrações suficientemente elevadas para o complexo poder ser usado em IRM. A interacção do complexo  $GdL5$  com o péptido  $A\beta_{1-40}$  provoca um aumento na relaxividade de cerca de 26% a 20 MHz, devido ao aumento do tempo correlação rotacional, o que é uma característica importante em IRM, uma vez que aumenta o contraste das imagens. Tendo em conta que o complexo  $GdL5$  também interage com a HSA com um valor de  $K_A$  de  $7.45 \pm 2.7 \times 10^3 M^{-1}$  obtido por aumento de relaxação protónica (PRE), há indicação que o complexo terá um tempo de vida no plasma sanguíneo maior, evitando a sua rápida excreção do organismo.

O estudo da interacção do complexo  $GdL5$  com o péptido  $A\beta_{1-40}$  mostrou que o complexo interage com moderada afinidade com os agregados amilóides com um  $K_D$  de  $19.5 \pm 3.0 \mu M$  obtido por SPR. A maior afinidade do complexo  $GdL5$  com os agregados amilóides que os complexos formados pelos ligandos  $Lx$  ( $x= 1, 3$  e  $4$ ) poderão evidenciar que a maior hidrofobicidade do complexo  $GdL5$  em relação aos restantes complexos poderá ser um factor chave nesta interacção, assim como a maior distância de separação entre o  $PiB$  e o quelato metálico poderá favorecer a interacção. Foi ainda comprovado que o complexo  $GdL5$  interage com a forma monomérica do péptido  $A\beta_{1-40}$  com menor afinidade do que para os agregados do péptido, o que é importante uma vez que se pretende detectar os agregados e não a forma monomérica do péptido. Deste estudo, verificou-se ainda um alargamento selectivo de alguns sinais nos espectros 2D  $^{15}N$ - $^1H$  HSQC por RMN, identificando-se que o complexo  $GdL5$  interage com a zona hidrofílica do péptido na sua forma monomérica, dos resíduos F4-F20 de grande densidade de carga a pH fisiológico.

A constatação por CD e TEM que o complexo  $GdL5$  induz a formação de fibrilas com estrutura em folha  $\beta$  do péptido  $A\beta_{1-40}$ , poderá acarretar um problema de aumento de toxicidade *in vivo*. Contudo, o estudo foi realizado a concentrações de péptido de  $40 \mu M$ , bastante superiores ao que se verifica no córtex frontal de doentes de Alzheimer  $1-3 \mu M$ <sup>109</sup>, mostrando que a toxicidade do complexo  $GdL5$  poderá não ser significativa *in vivo*.

Com o presente estudo perspectiva-se dificuldade da utilização do complexo  $LnL4$  e  $LnL5$  *in vivo* para sua utilização em Imagiologia. Uma das grandes razões para a dificuldade da utilização deste tipo de complexos e outros tipos de complexos reportados na literatura<sup>109</sup> é a grande dificuldade de atravessarem a barreira hemato-encefálica. Recentemente foi demonstrada uma conexão entre o sistema linfático e o cérebro<sup>177</sup>, que poderá ser explorado para utilização

deste tipo de sondas específicas para detecção de agregados amilóides associados à patologia de Alzheimer sem haver o problema de passagem da barreira hemato-encefálica. Foi ainda mostrado que com o avançar da patologia há um enfraquecimento progressivo da função da barreira hemato-encefálica<sup>178</sup>, permitindo haver permeação dos complexos para atingir o cérebro. Porém isto não se verifica em fases precoces da doença, constatando-se que a utilização da sonda não é possível para diagnóstico precoce. Artificialmente, a barreira hemaotencefálica pode ser enfraquecida com o recurso a soluções hiperosmóticas com manitol, composto vasoactivo. Apesar de esta solução ser tóxica para humanos<sup>95</sup>, esta estratégia pode ser usada em estudo em animais *in vivo* usando os complexos aqui desenvolvidos. A partir deste trabalho e de outros trabalhos publicados, fica claro que a utilização destes complexos sozinhos é uma estratégia de pouco sucesso, havendo necessidade futura de investigar veículos de transporte que atravessem a barreira hemato-encefálica chegando ao cérebro e que tenham a capacidade de libertar os complexos vectorizados para detectar agregados amilóides, de modo a que seja possível utilizar estas sondas para realizar um diagnóstico precoce, independentemente da modalidade imagiológica. Com este intuito, têm sido estudadas estratégias como a utilização de ultra-sons e micro-bolhas para abrir a barreira hemato-encefálica e a utilização de agentes lipídicos solúveis, proteínas carregadoras ou ainda a associação de agentes de contraste com proteínas que podem ser especificamente transportadas por receptores mediadores de endocitose e mecanismos de transcitose<sup>95</sup>.

Apesar de já ter sido desenvolvida e aprovada para uso clínico uma sonda para detecção de agregados amilóides, o Florbetapir-<sup>18</sup>F, havendo ainda uma outra sonda que se encontra em testes clínicos, o regente de Pittsburg B ([<sup>11</sup>C]PIB), em que ambas as sondas são detectadas por PET, urge a necessidade de desenvolver sondas que possam ser usados em modalidades imagiológicas mais baratas e de maior disponibilidade como o IRM, que está disponível em praticamente todos os hospitais. O desenvolvimento destas sondas permitiriam uma oportunidade de monitorização de novas estratégias terapêuticas, de forma barata e mais acessível, sem se recorrer a radiofármacos, emissores de radiação ionizante, que são produzidos a partir de um ciclotrão, que apenas se encontra disponível em determinados sítios.



## Referências Bibliográficas

1. Weissleder, R. & Mahmood, U. Molecular imaging. *Radiology* **219**, 316–333 (2001).
2. Roentgen, W. C. Ueber eine art von strahlen. *Sitzungsber Phys.-Med. Ges. Wuerzbg.* 132–141 (1895).
3. Bushberg, J. T., Seibert, J. A., Leidholdt, E. M. & Boone, J. M. *The essential physics of medical imaging*. (Philadelphia: Wolters Kluwer, 2012).
4. Gillies, R. J. In vivo molecular imaging. *J. Cell Biochem. Suppl.* **39**, 231–238 (2002).
5. Herman, G. T. *Fundamentals of computerized tomography: image reconstruction from projection*. (Londres: Springer, 2009).
6. Muehlehner, G. & Karp, J. S. Positron emission tomography. *Phys. Med. Biol.* **51**, R117–R137 (2006).
7. Strijckmans, K. The isochronous cyclotron : principles and recent developments. *Comput. Med. Imaging Graph* **25**, 69–78 (2001).
8. Rösch, F. & Baum, R. P. Generator-based PET radiopharmaceuticals for molecular imaging of tumours : on the way to theranostics. *Dalt. Trans.* **40**, 6104–6111 (2011).
9. Gambhir, S. S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 683–693 (2002).
10. Rahmim, A. & Zaidi, H. PET versus SPECT : strengths , limitations and challenges. *Nucl. Med. Commun.* **29**, 193–207 (2008).
11. Reivich, M. *et al.* The [18F]fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man. *Circ. Res.* **44**, 127–137 (1979).
12. Chiro, G. Di *et al.* Glucose utilization of cerebral gliomas measured by [18F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography. *Neurology* **32**, 1323–1329 (1982).
13. McBride, W. J. *et al.* A novel method of 18F radiolabeling for PET. *J. Nucl. Med.* **50**, 991–998 (2009).
14. Turkington, T. G. Introduction to PET instrumentation. *J. Nucl. Med. Technol.* **29**, 4–11 (2001).
15. Lecomte, R. Biomedical imaging: SPECT and PET. in *AIP Conf. Proc.* **958**, 115–122 (Aip, 2007).
16. Semmler, W. & Schwaiger, M. *Molecular imaging I*. (Berlin: Springer, 2008).

17. Bockisch, A., Freudenberg, L. S., Schmidt, D. & Kuwert, T. Hybrid imaging by SPECT/CT and PET/CT: proven outcomes in cancer imaging. *Semin. Nucl. Med.* **39**, 276–289 (2009).
18. Jacques, V. & Desreux, J. F. New classes of MRI contrast agents. *Top. Curr. Chem.* **221**, 123–164 (2002).
19. Merbach, A., Helm, L. & Tóth, É. *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*. (U.K.: Wiley, 2013).
20. Gil, V.M.S. & Geraldes, C.F.G.C. *Ressonância magnética nuclear - fundamentos, métodos e aplicações*. (Coimbra: Fundação Calouste Gulbenkian. 2002).
21. Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J. & Lauffer, R. B. Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **99**, 2293–2352 (1999).
22. Weissleder, R., Bogdanov, A., Neuwelt, E. A. & Papisov, M. Long-circulating iron oxides for MR imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**, 321–334 (1995).
23. Sun, C., Lee, J. S. H. & Zhang, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1252–1265 (2008).
24. Na, H. Bin, Song, I. C. & Hyeon, T. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Adv. Mater.* **21**, 2133–2148 (2009).
25. Tong, S., Hou, S., Zheng, Z., Zhou, J. & Bao, G. Coating optimization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for high T2 relaxivity. *Nano lett.* **10**, 4607–4613 (2010).
26. Gossuin, Y., Gillis, P., Hocq, A., Vuong, Q. L. & Roch, A. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. *Wiley Interdisci. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **1**, 299–310 (2009).
27. Koenig, S. H. & Kellar, K. E. Theory of 1/T1 and 1/T2 NMRD profiles of solutions of magnetic nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* **34**, 227–233 (1995).
28. Roch, A., Muller, R. N. & Gillis, P. Theory of proton relaxation induced by superparamagnetic particles. *J. Chem. Phys.* **110**, 5403–5411 (1999).
29. Reimer, P. & Balzer, T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur. Radiol.* **13**, 1266–1276 (2003).
30. Wang, Y.-X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: current status of clinical application. *Quant. Imaging Med. Surg.* **1**, 35–40 (2011).
31. Wang, Y.-X. J., Hussain, S. M. & Krestin, G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur. Radiol.* **11**, 2319–2331 (2001).

32. Lauterbur, P. C., Mendonca, Dias, M. & Rudin, A. M. Augmentation of tissue water proton spin-lattice relaxation rates by in vivo addition of paramagnetic ions. in *Front. Biol. Energ.* (Dutton, P. L., Leigh, L. S. & Scarpa, A.) **1**, 752–759 (Academic Press, 1978).
33. Pierre, C. V., Allen, J. M. & Peter, C. Contrast agents for MRI: 30+ years and where are we going? *J. Biol. Inorg. Chem.* **19**, 127–131 (2014).
34. Gallez, B., Bacic, G. & Swartz, H. M. Evidence for the dissociation of the hepatobiliary MRI contrast agent Mn-DPDP. *Magn. Reson. Med.* **35**, 14–19 (1996).
35. Cacheris, W. P., Quay, S. C. & Rocklage, S. M. Nephrogenic systemic fibrosis and gadolinium exposure: association and lessons for idiopathic fibrosing disorders. *Arthritis Rheum.* **56**, 3173–3175 (2007).
36. Cacheris, W. P., Quay, S. C. & Rocklage, S. M. The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *Magn. Reson. Imaging* **8**, 467–481 (1990).
37. Sherry, D. A., Caravan, P. & Lenkinski, R. E. A primer on gadolinium chemistry. *J. Mag. Reson. Imaging* **30**, 1240–1248 (2009).
38. Laurent, S., Elst, L. Vander & Muller, R. N. Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Med. Mol. Imaging* **1**, 128–137 (2006).
39. Tweedle, M. F., Hagan, J. J., Kumar, K., Mantha, S. & Chang, C. A. Reaction of gadolinium chelates with endogenously available ions. *Magn. Reson. Imaging* **9**, 409–415 (1991).
40. Wedeking, P., Kumar, K. & Tweedle, M. F. Dissociation of gadolinium chelates in mice: relationship to chemical characteristics. *Magn. Reson. Imaging* **10**, 641–648 (1992).
41. Uggeri, F. *et al.* Novel contrast agents for magnetic resonance imaging. Synthesis and characterization of the ligand BOPTA and its Ln(III) complexes (Ln= Gd, La, Lu). X-ray structure of disodium (TPS-9-145337286-C-S)-[4-carboxy-5,8,11-tris(carboxymethyl)-l-phenyl-2-oxa- 5]. *Inorg. Chem.* **34**, 633–642 (1995).
42. Tombach, B. & Heindel, W. Value of 1.0-M gadolinium chelates: review of preclinical and clinical data on gadobutrol. *Eur. Radiol.* **12**, 1550–1556 (2002).
43. Bloembergen, N. & Morgan, L. O. Proton relaxation times in paramagnetic solutions. Effects of electron spin relaxation. *J. Chem. Phys.* **34**, 842–850 (1961).
44. Bloembergen, N., Purcell, E. M. & Pound, R. V. Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Phys. Rev.* **73**, 679–712 (1948).
45. Connick, R. E. & Fiat, D. Oxygen-17 nuclear magnetic resonance study of the hydration shell of nickelous ion. *J. Chem. Phys.* **44**, 4103–4107 (1966).

46. Solomon, I. Relaxation processes in a system of two spins. *Phys. Rev.* **99**, 559–565 (1955).
47. Doble, D. M. J. *et al.* Optimization of the relaxivity of MRI contrast agents: effect of poly(ethylene glycol) chains on the water-exchange rates of Gd(III) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10758–10759 (2001).
48. Aime, S. *et al.* [Gd-AAZTA]<sup>-</sup>: A new structural entry for an improved generation of MRI contrast agents. *Inorg. Chem.* **43**, 7588–7590 (2004).
49. Martins, A. F. Multimodal imaging probes for the diagnostics of Alzheimer's disease. PhD Thesis, University of Coimbra, Portugal (2013).
50. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (N.Y.: Springer, 2006).
51. Bünzli, J. G. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. *Chem. Rev.* **110**, 2729–2755 (2010).
52. Bünzli, J.-C. G. & Piguet, C. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chem. Soc. Rev.* **34**, 1048–1077 (2005).
53. Uh, H. & Petoud, S. Novel antennae for the sensitization of near infrared luminescent lanthanide cations. *C. R. Chim.* **13**, 668–680 (2010).
54. Parker, D. Luminescent lanthanide sensors for pH, pO<sub>2</sub> and selected anions. *Coord. Chem. Rev.* **205**, 109–130 (2000).
55. Bunzli, J. C. G. & Choppin, G. R. *Lanthanide probes in life, chemical and earth sciences*. (Amsterdam: Elsevier, 1989).
56. Hagan, A. K. & Zuchner, T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 2847–2864 (2011).
57. Smith, A. M., Mancini, M. C. & Nie, S. Bioimaging: second window for in vivo imaging. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 710–711 (2009).
58. Faulkner, S., Pope, S. J. A. & Burton-Pye, B. P. Lanthanide complexes for luminescence imaging applications. *Appl. Spectrosc. Rev.* **40**, 1–31 (2005).
59. Hemmilä, I. & Laitala, V. Progress in lanthanides as luminescent probes. *J. Fluoresc.* **15**, 529–542 (2005).
60. Graeber, M. B. *et al.* Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics* **1**, 73–80 (1997).
61. Macchi, G., Brahe, C. & Pomponi, M. Alois Alzheimer and Gaetano Perusini: should man divide what fate united? *Behav. Neurol.* **4**, 210–213 (1997).
62. Galimberti, D. & Scarpini, E. Progress in Alzheimer's disease. *J. Neurol.* **259**, 201–211 (2012).

63. Griffin, W. S. T. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 470S–474S (2006).
64. Virchow, R. Cellulose-frage. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin Med* **6**, 416–426 (1854).
65. Sipe, J. D. & Cohen, A. S. Review: history of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* **130**, 88–98 (2000).
66. Pettersson, T. & Kontinen, Y. T. Amyloidosis-recent developments. *Semin. Arthritis Rheum.* **39**, 356–368 (2010).
67. Hardy, J. A. & Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (80-. )*. **256**, 184–185 (1992).
68. Itkin, A. *et al.* Calcium ions promote formation of amyloid  $\beta$ -peptide (1-40) oligomers causally implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease. *PLoS One* **6**, e18250 (2011).
69. Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C. & Gage, F. H. Mechanism underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* **140**, 918–934 (2010).
70. Smith, D. G., Cappai, R. & Barnham, K. J. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 1976–1990 (2007).
71. Castellani, R. J., Nunomura, A., Lee, H., Peryy, G. & Smithe, M. A. Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above. *J. Alzheimers Dis.* **14**, 377–383 (2008).
72. Roychaudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M. M. & Teplow, D. B. Amyloid  $\beta$ -protein assembly and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **284**, 4749–4753 (2009).
73. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353–356 (2002).
74. Di Carlo, M. Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur. Biophys. J.* **39**, 877–888 (2010).
75. De Strooper, B. & Annaert, W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* **113**, 1857–1870 (2000).
76. Granic, A., Padmanabhan, J., Norden, M. & Potter, H. Alzheimer A $\beta$  peptide induces chromosome mis-segregation and aneuploidy, including trisomy 21: requirement for tau and APP. *Mol. Biol. Cell* **21**, 511–520 (2010).
77. Cavallucci, V., D'Amelio, M. & Cecconi, F. A $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* **45**, 366–378 (2012).
78. Kandalepas, P. C. & Vassar, R. Identification and biology of  $\beta$ -secretase. *J. Neurochem.* **120**, 55–61 (2012).

79. Vassar, R. BACE1: The  $\beta$ -Secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* **23**, 105–114 (2004).
80. Haass, C. *et al.* Amyloid  $\beta$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322–325 (1992).
81. Goate, A. *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704–706 (1991).
82. Sherrington, R. *et al.* Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**, 754–760 (1995).
83. Levy-lahad, E. *et al.* Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* **269**, 973–977 (1995).
84. Steiner, H. *et al.* PEN-2 is an integral component of the  $\gamma$ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J. Biol. Chem.* **277**, 39062–39065 (2002).
85. Wolfe, M. S. *et al.* Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and  $\gamma$ -secretase activity. *Nature* **398**, 513–517 (1999).
86. Dubois, B. *et al.* Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* **6**, 734–746 (2007).
87. Talmard, C., Yonal, R. L. & Faller, P. Mechanism of zinc(II)-promoted amyloid formation: zinc(II) binding facilitates the transition from the partially  $\alpha$ -helical conformer to aggregates of amyloid  $\beta$  protein(1-28). *J. Biol. Inorg. Chem.* **14**, 449–455 (2009).
88. Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L. & Markesbery, W. R. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* **158**, 47–52 (1998).
89. Vivekanandan, S., Brender, J. R., Lee, S. Y. & Ramamoorthy, A. A partially folded structure of amyloid-beta(1-40) in an aqueous environment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 312–316 (2011).
90. Abelein, A., Bolognesi, B., Dobson, C. M., Gräslund, A. & Lendel, C. Hydrophobicity and conformational change as mechanistic determinants for nonspecific modulators of amyloid  $\beta$  self-assembly. *Biochemistry* **51**, 126–137 (2012).
91. Lendel, C., Bolognesi, B., Wahlström, A., Dobson, C. M. & Gräslund, A. Detergent-like interaction of Congo Red with the amyloid  $\beta$  peptide. *Biochemistry* **49**, 1358–1360 (2010).
92. Pardridge, W. M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. **2**, 3–14 (2005).
93. Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **1**, 337–341 (2004).

94. Balériaux, D. *et al.* Magnetic resonance imaging of metastatic disease to the brain with gadobenate dimeglumine. *Neuroradiology* **44**, 191–203 (2002).
95. Petiet, A. & Dhenain, M. Improvement of microscopic MR imaging of amyloid plaques with targeting and non-targeting contrast agents. *Curr. Med. Imaging Rev.* **7**, 8–15 (2011).
96. Cai, L., Innis, R. B. & Pike, V. W. Radioligand development for PET imaging of  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ )-current status. *Curr. Med. Chem.* **14**, 19–52 (2007).
97. Furumoto, S. *et al.* Recent advances in the development of amyloid imaging agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 1773–1789 (2007).
98. Nordberg, A., Rinne, J. O., Kadir, A. & Långström, B. The use of PET in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **6**, 78–87 (2010).
99. Mathis, C. A. *et al.* A lipophilic thioflavin-t derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 295–298 (2002).
100. Kung, M.-P., Hou, C., Zhuang, Z.-P., Skovronsky, D. & Kung, H. F. Binding of two potential imaging agents targeting amyloid plaques in postmortem brain tissues of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1025**, 98–105 (2004).
101. Vandenberghe, R. *et al.* 18F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial. *Ann. Neurol.* **68**, 319–329 (2010).
102. Clark, C. M. *et al.* Use of Florbetapir-PET for imaging  $\beta$ -amyloid pathology. *J. Am. Med. Assoc.* **305**, 275–283 (2011).
103. Klunk, W. E. & Mathis, C. A. The future of amyloid-beta imaging: a tale of radionuclides and tracer proliferation. *Curr. Opin. Neurol.* **21**, 683–687 (2008).
104. Landau, S. M. *et al.* Amyloid- $\beta$  imaging with Pittsburgh compound B and florbetapir: comparing radiotracers and quantification methods. *J. Nucl. Med.* **54**, 70–77 (2013).
105. Forsberg, A. *et al.* PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* **29**, 1456–1465 (2008).
106. Chen, X., Yu, P., Zhang, L. & Liu, B. Synthesis and biological evaluation of  $^{99m}Tc$ , re-monoamine-monoamide conjugated to 2-(4-aminophenyl)benzothiazole as potential probes for  $\beta$ -amyloid plaques in the brain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 1442–1445 (2008).
107. Zhuang, Z.-P., Kung, M.-P., Hou, C., Ploessl, K. & Kung, H. F. Biphenyls labeled with technetium  $^{99m}$  for imaging  $\beta$ -amyloid plaques in the brain. *Nucl. Med. Biol.* **32**, 171–184 (2005).
108. Ono, M. *et al.* Synthesis and evaluation of novel chalcone derivatives with ( $^{99m}$ )Tc/Re complexes as potential probes for detection of  $\beta$ -amyloid plaques. *ACS Chem. Neurosci.* **1**, 598–607 (2010).

109. Bort, G. *et al.* Gadolinium-based contrast agents targeted to amyloid aggregates for the early diagnosis of Alzheimer's disease by MRI. *Eur. J. Med. Chem.* **87**, 843–861 (2014).
110. Jack, C. R. *et al.* In vivo visualization of Alzheimer's amyloid plaques by magnetic resonance imaging in transgenic mice without a contrast agent. *Magn. Reson. Med.* **52**, 1263–1271 (2004).
111. Wadghiri, Y. Z. *et al.* Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *Magn. Reson. Med.* **50**, 293–302 (2003).
112. Poduslo, J. F. *et al.* Molecular targeting of Alzheimer's amyloid plaques for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Neurobiol. Dis.* **11**, 315–329 (2002).
113. Poduslo, J. F. *et al.* Design and chemical synthesis of a magnetic resonance contrast agent with enhanced in vitro binding , high blood - brain barrier permeability , and in vivo targeting to Alzheimer ' s disease amyloid plaques. *Biochemistry* **43**, 6064–6075 (2004).
114. Martins, A. F. *et al.* PiB-conjugated, metal-based imaging probes: multimodal approaches for the visualization of  $\beta$ -amyloid plaques. *ACS Med. Chem. Lett.* **4**, 436–440 (2013).
115. Martins, A. F., Morfin, J.-F., Geraldes, C. F. G. C. & Tóth, E. Gd(3+) complexes conjugated to Pittsburgh compound B: potential MRI markers of  $\beta$ -amyloid plaques. *J. Biol. Inorg. Chem.* **19**, 281–295 (2014).
116. Martins, A. F. *et al.* Interaction of PiB-derivative metal complexes with beta-amyloid peptides: selective recognition of the aggregated forms. *Chem. Eur. J.* **21**, 5413–5422 (2015).
117. Yang, J. *et al.* Detection of amyloid plaques targeted by USPIO-A $\beta$ 1-42 in Alzheimer's disease transgenic mice using magnetic resonance microimaging. *Neuroimage* **55**, 1600–1609 (2011).
118. Choi, S. R. *et al.* Preclinical properties of 18F-AV-45: a PET agent for A $\beta$  plaques in the brain. *J. Nucl. Med.* **50**, 1887–1894 (2009).
119. Mathis, C. A. *et al.* Synthesis and evaluation of 11C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J. Med. Chem.* **46**, 2740–2754 (2003).
120. Martins, A. F. *et al.* Associating a negatively charged GdDOTA-derivative to the Pittsburgh compound B for targeting A $\beta$  amyloid aggregates. *J. Biol. Inorg. Chem.* **21**, 83–99 (2015)
121. Evans, D. F. The determination of the paramagnetic susceptibility of substances in solution by nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Soc.* 2003–2005 (1959).
122. Barge, A., Cravotto, G., Gianolio, E. & Fedeli, F. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates . A technical note. *Contrast Med. Mol. Imaging* **1**, 184–188 (2006).

123. Boulanger, Y., Vinay, P. & Desroches, M. Measurement of a wide range of intracellular sodium concentrations in erythrocytes by  $^{23}\text{Na}$  nuclear magnetic resonance. *Biophys. J.* **47**, 553–561 (1985).
124. Peters, J. A., Huskens, J. & Raber, D. J. Lanthanide induced shifts and relaxation rate enhancements. *Prog. Nucl. Magn. Reson Spectrosc.* **28**, 283–350 (1996).
125. Corsi, D. M., Platas-Iglesias, C., Bekkum, H. Van & Peters, J. A. Determination of paramagnetic lanthanide(III) concentrations from bulk magnetic susceptibility shifts in NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* **39**, 723–726 (2001).
126. Marques, M. P. M. *et al.* NMR conformational study of the lanthanide(III) complexes of DOTA in aqueous solution. *J. Alloy. Compd.* **225**, 303–307 (1995).
127. Demas, J. N. & Crosby, G. A. The measurement of photoluminescence quantum yields. A review. *J. Phys. Chem.* **75**, 991–1024 (1971).
128. Melhuish, W. H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *J. Phys. Chem.* **65**, 229–235 (1961).
129. Nakamaru, K. Synthesis, luminescence quantum yields, and lifetimes of trischelated ruthenium(II) mixed-ligand complexes including 3,3'-dimethyl-2,2'-bipyridyl. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **55**, 2697–2705 (1982).
130. Tao, J., Perdew, J. P., Staroverov, V. N. & Scuseria, G. E. Climbing the density functional ladder: nonempirical meta-generalized gradient approximation designed for molecules and solids. *Phys. Rev. Lett.* **91**, 146401 (2003).
131. Schmidt, M. W. *et al.* General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem.* **14**, 1347–1363 (1993).
132. Dolg, M., Stoll, H., Savin, A. & Preuss, H. Energy-adjusted pseudopotentials for the rare earth elements. *Theor. Chim. Acta* **75**, 173–194 (1989).
133. Dolg, M., Stoll, H. & Preuss, H. A combination of quasirelativistic pseudopotential and ligand field calculations for lanthanoid compounds. *Theor. Chim. Acta* **85**, 441–450 (1993).
134. Martins, A. F. *et al.* A bis(pyridine N-oxide) analogue of DOTA: relaxometric properties of the Gd(III) complex and efficient sensitization of visible and NIR-emitting lanthanide(III) cations including Pr(III) and Ho(III). *Chem. Eur. J.* **20**, 14834–14845 (2014).
135. Leo, A., Hansch, C. & Elkins, D. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* **71**, 525–616 (1971).
136. Evans, R. C., Douglas, P. & Burrows, H. D. *Applied photochemistry*. (N.Y.: Springer Dordrecht Heidelberg, 2013).

137. Beer, M. & Longuet-Higgins, H. C. Anomalous light emission of azulene. *J. Chem. Phys.* **23**, 1390–1391 (1955).
138. Beljonne, D., Shuai, Z., Pourtois, G. & Bredas, J. L. Spin-orbit coupling and intersystem crossing in conjugated polymers: a configuration interaction description. *J. Phys. Chem. A* **105**, 3899–3907 (2001).
139. Yang, P., Zhao, J., Wu, W., Yu, X. & Liu, Y. Accessing the long-lived triplet excited states in bodipy- conjugated 2- ( 2-hydroxyphenyl ) benzothiazole/benzoxazoles and applications as organic triplet photosensitizers for photooxidations. *J. Org. Chem.* **77**, 6166–6178 (2012).
140. Devi, R., Bala, M., Khatkar, S. P., Taxak, V. B. & Boora, P. Investigations of luminescent behavior and intramolecular energy transfer mechanism of europium(III) complexes with fluorinated  $\beta$ -ketoester ligand. *J. Fluor. Chem.* **181**, 36–44 (2016).
141. Montalti, M., Credi, A., Prodi, L. & Gandolfi, M. T. *Handbook of photochemistry*. (N.Y.: Taylor & Francis Group, 2006).
142. Latva, M. *et al.* Correlation between the lowest triplet state energy level of the ligand and lanthanide(III) luminescence quantum yield. *J. Lumin.* **75**, 149–169 (1997).
143. Hassoon, S., Lustig, H., Rubin, M. B. & Speiser, S. The mechanism of short-range intramolecular electronic energy transfer in bichromophoric molecules. *J. Phys. Chem.* **88**, 6367–6374 (1984).
144. Horrocks, W. D. & Sudnick, D. R. Lanthanide ion luminescence probes of the structure of biological macromolecules. *Acc. Chem. Res.* **14**, 384–392 (1981).
145. Beeby, A. *et al.* Non-radiative deactivation of the excited states of europium, terbium and ytterbium complexes by proximate energy-matched OH, NH and CH oscillators: an improved luminescence method for establishing solution hydration states. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 493–504 (1999). doi:10.1039/a808692c
146. Dickins, R. S. *et al.* Synthesis, time-resolved luminescence, NMR spectroscopy, circular dichroism and circularly polarised luminescence studies of enantiopure macrocyclic lanthanide tetraamide complexes. *Chem. Eur. J.* **5**, 1095–1105 (1999).
147. Beeby, A., Bushby, L. M., Maffeo, D. & Williams, G. J. A. Intramolecular sensitisation of lanthanide(III) luminescence by acetophenone-containing ligands: the critical effect of para-substituents and solvent. *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.* 48–54 (2002).
148. Li, M. & Selvin, P. R. Luminescent polyaminocarboxylate chelates of terbium and europium: the effect of chelate structure. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8132–8138 (1995).
149. Hehlen, M. P., Brik, M. G. & Krämer, K. W. 50th anniversary of the Judd–Ofelt theory: an experimentalist's view of the formalism and its application. *J. Lumin.* **136**, 221–239 (2013).

150. Mason, S. F., Peacock, R. D. & Stewart, B. Ligand-polarization contributions to the intensity of hypersensitive trivalent lanthanide transitions. *Mol. Phys.* **30**, 1829–1841 (1975).
151. Quici, S. *et al.* Visible and near-infrared intense luminescence from water soluble lanthanide [Tb (III), Eu (III), Sm (III), Dy (III), Pr (III), Ho (III), Yb (III), Nd (III), Er (III)] complexes. *Inorg. Chem.* **44**, 529–537 (2005).
152. Lin, K.-S., Debnath, M. L., Mathis, C. A. & Klunk, W. E. Synthesis and beta-amyloid binding properties of rhenium 2-phenylbenzothiazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 2258–2262 (2009).
153. Nicolle, G. M., Tóth, E., Eisenwiener, K.-P., Mäcke, H. R. & Merbach, A. E. From monomers to micelles: investigation of the parameters influencing proton relaxivity. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**, 757–769 (2002).
154. Yu, D., Huang, F. & Xu, H. Determination of critical concentrations by synchronous fluorescence spectrometry. *Anal. Methods* **4**, 47–49 (2012).
155. Kasha, M. Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates. *Radiat. Res.* **20**, 55–70 (1963).
156. Burton, D. R., Forsen, S., Karlstrom, G. & Dwek, R. A. Proton relaxation (PRE) in Biochemistry: a critical survey. *Prog. Nucl. Magn. Reson Spectrosc.* **13**, 1–45 (1979).
157. Peters, T. *All about albumin*. (N.Y.: Wiley, 1996).
158. Shuvaev, V. V. & Siest, G. Interaction between human amphipathic apolipoproteins and amyloid 13-peptide: surface plasmon resonance studies. *FEBS Lett.* **383**, 9–12 (1996).
159. Myszka, D. G., Wood, S. J. & Biere, A. L. Analysis of fibril elongation using surface plasmon resonance biosensors. *Methods Enzym.* **309**, 386–402 (1999).
160. Copeland, R. A. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. (N.Y.: Wiley-VCH, 2000).
161. Khurana, R. *et al.* Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* **151**, 229–238 (2005).
162. Mensch, J., Oyarzabal, J., Mackie, C. & Augustijns, P. In vivo , in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *J. Pharm. Sci.* **98**, 4429–4468 (2009).
163. Caravan, P. *et al.* The interaction of MS-325 with human serum albumin and its effect on proton relaxation rates. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3152–3162 (2002).
164. Henrotte, V., Vander Elst, L., Laurent, S. & Muller, R. N. Comprehensive investigation of the non-covalent binding of MRI contrast agents with human serum albumin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **12**, 929–937 (2007).

165. Moriggi, L., Yaseen, M. A., Helm, L. & Caravan, P. Serum albumin targeted, pH-dependent magnetic resonance relaxation agents. *Chem. Eur. J.* **18**, 3675–3686 (2012).
166. Levine, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer ' s disease  $\beta$ -amyloid peptides : detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **2**, 404–410 (1993).
167. Mayer, M. & Meyer, B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1784–1788 (1999).
168. Danielsson, J., Andersson, A., Jarvet, J. & Gräslund, A.  $^{15}\text{N}$  relaxation study of the amyloid  $\beta$ -peptide: structural propensities and persistence length. *Magn. Reson. Chem.* **44**, S114–S121 (2006).
169. Long, F., Cho, W. & Yoshitaka, I. Expression and purification of  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$ -isotope labeled 40-residue human Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide for NMR-based structural analysis. *Protein Expr. Purif.* **79**, 16–24 (2011).
170. Hou, L. & Zagorski, M. G. NMR reveals anomalous copper (II) binding to the amyloid A $\beta$  peptide of Alzheimer ' s disease. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9260–9261 (2006).
171. Wahlström, A., Hugonin, L., Perálvarez-Marín, A., Jarvet, J. & Gräslund, A. Secondary structure conversions of Alzheimer's A $\beta$ (1-40) peptide induced by membrane-mimicking detergents. *FEBS J.* **275**, 5117–5128 (2008).
172. Sulatskaya, A. I., Maskevich, A. A., Kuznetsova, I. M., Uversky, V. N. & Turoverov, K. K. Fluorescence quantum yield of thioflavin t in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils. *PLoS One* **5**, e15385 (2010).
173. Sulatskaya, A. I., Kuznetsova, I. M. & Turoverov, K. K. Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: fluorescence quantum yield of bound dye. *J. Phys. Chem. B* **8**, 2538–2544 (2012).
174. Groenning, M. Binding mode of thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. *J. Chem. Biol.* **3**, 1–18 (2010).
175. Greenfield, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* **1**, 2876–2890 (2006).
176. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **1751**, 119–139 (2005).
177. Louveau, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* **523**, 337–341 (2015).
178. Bell, R. D. *et al.* Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* **485**, 512–516 (2012).