



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PREPARAÇÃO DE RASTREADORES FOTÔNICOS
PARA NANOPARTÍCULAS BIOCOMPATÍVEIS**

MARYENE ALVES CAMARGO

Orientador: Prof. Petrus A. Santa-Cruz

Co-orientadores: Profs. Paulo Menezes e Severino Alves Jr.

Recife, agosto de 2003

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Aprovada:

✓ Prof. Dr. Petrus D'Amorim Santa Cruz Oliveira
Departamento de Química Fundamental da UFPE
(orientador)

Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero
Instituto de Química da UNICAMP

Prof. Dr. Oscar Manoel Loureiro Malta
Departamento de Química Fundamental da UFPE

"Preparação de Rastreadores Fotônicos para Nanopartículas Biocompatíveis"
por

MARYENE ALVES CAMARGO

Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
18 de Agosto de 2003

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e estudo da atuação de complexos de íons lantanídeos luminescentes como rastreadores fotônicos incorporados em nanoestruturas carreadoras de fármacos em sistemas biológicos. O rastreamento por luminescência visa uma alternativa na utilização de radioisótopos.

A etapa inicial do trabalho consistiu na síntese de compostos com o objetivo de se desenvolver uma nova classe de rastreadores fotônicos com inspeção via radiação infravermelha, através de processos de conversão ascendente de energia. Decaimentos multifônons impediram o uso de complexos tipo β -dicetonas na conversão ascendente de energia. Compostos macrocíclicos foram sintetizados visando a posterior coordenação de íons lantanídeos para o estudo de suas propriedades luminescentes e possíveis aplicações. Diversas metodologias sintéticas foram empregadas para a obtenção dos compostos desejados. Adicionalmente, foi realizado um estudo da eficiência dos compostos na coordenação de cátions, através de análises RMN ^1H .

Em uma segunda etapa do trabalho, foram utilizados complexos de β -dicetonas com íons Eu^{3+} , conhecidos como excelentes DMCL (dispositivos moleculares conversores de luz) para o rastreamento, utilizando-se radiação ultravioleta em sistemas biológicos. Os testes de citotoxicidade indicaram o complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ como o mais adequado ao uso nessses sistemas.

Nanoesferas (DEX-PCL) foram preparadas pelo método de emulsão múltipla (A/O/A), sendo o complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ incorporado na primeira emulsão. Estudos de espectroscopia de luminescência mostraram esse complexo incorporado em nanoesfera como o sistema potencialmente mais eficiente para ser usado como nanorastreador fotônico. Após a administração intravenosa do nanomarcador em camundongos, um estudo cinético foi realizado das amostras de sangue, rins, fígado e baço, monitorado por espectroscopia de emissão do íon Eu^{3+} , explorando efeito antena de seus ligantes. Foi possível se detectar a luminescência do nanomarcador fotônico durante a 1^a hora em circulação no sangue. Após a 6^a hora, é possível que as proteínas plasmáticas constituintes do sangue, adsorvidas ou ligadas na superfície dos nanomarcadores, promovam o reconhecimento e a captura por células fagocitárias. Não foi detectado, no entanto, luminescência nos tecidos dos rins, fígado e baço.

Estudos mais detalhados estão sendo programados para se evitar a supressão da luminescência dos nanomarcadores, além disso, como perspectiva, está sendo investigado um mecanismo para a determinação de resposta imunológica através deste sistema.

Índice

| | |
|---|-----------|
| I Introdução Geral..... | 1 |
| II Objetivos..... | 3 |
| II.1 Estratégia de Atuação..... | 7 |
| III Fundamentação Teórica..... | 9 |
| Íons Lantanídeos..... | 9 |
| Principais Propriedades dos Íons Lantanídeos..... | 9 |
| Efeito Antena..... | 11 |
| Sondas Luminescentes..... | 12 |
| Propriedades Luminescentes do íon trivalente Európio..... | 13 |
| Sistemas Nanoparticulados em Liberação Controlada de Fármacos..... | 15 |
| Nanopartículas..... | 16 |
| Sistemas Nanoparticulados e Íons Lantanídeos..... | 18 |
| Química Supramolecular..... | 18 |
| Ligantes Macrocíclicos..... | 20 |
| Criptatos..... | 21 |
| Éteres de Coroa..... | 22 |
| Diaza-éteres de Coroa..... | 23 |
| Lauril-éteres e BiBLE..... | 23 |
| Complexos Supramoleculares com Íons Lantanídeos..... | 26 |
| IV PARTE 1: Síntese de macrocíclicos para posteriores tentativas de formaçao de um rastreador especial..... | 28 |
| IV.1 Procedimento Experimental (parte I)..... | 28 |
| Metodologia de Caracterização..... | 28 |
| Procedimento Geral..... | 29 |
| Procedimento para obtenção de agentes alquilantes (método radicalar)..... | 30 |
| Tentativa de alquilação do macrocíclico (1) com o dietil-2-(bromometil)-6-metilpiridina-3,5-dicarboxilato (9) | 31 |

| | |
|--|----|
| Tentativa de obtenção do agente alquilante 2-bromometil-6-cloropiridina (15) (redução e bromação)..... | 32 |
| Tentativas de alquilação do 3-bromopropanoato de etila (16) ao macrocíclico (1).... | 33 |
| Tentativa de hidrogenação da acrilamida..... | 35 |
| Tentativa de adição do macrocíclico (1) a acrilamida..... | 36 |
| Procedimento para síntese do 1,4,10,13-tetraoxo-7,16-diazaciclooctadecano-N,N'-propanoato de metila (19)..... | 36 |
| Tentativas de hidrólise do composto (19) | 36 |
| IV.2 Resultados e Discussões (parte 1) | 38 |
| IV.2.1 Reações de Alquilação do Macrocíclico (1) com Haletos Orgânicos..... | 39 |
| Tentativas de alquilação do macrocíclico (1) com o brometo (9)..... | 40 |
| Tentativas de alquilação do macrocíclico (1) com o brometo (16)..... | 43 |
| IV.2.2 Reações de Adição Nucleofílica do Macrocíclico (1) à Acrilatos..... | 46 |
| Tentativa de adição do macrocíclico (1) a acrilamida..... | 46 |
| Adição do macrocíclico (1) ao acrilato de metila..... | 47 |
| IV.2.3 Estudos de Conversão Ascendente de Energia em Compostos Orgânicos..... | 42 |
| | |
| V PARTE 2: Rastreadores com Excitação UV (Efeito Antena)..... | 59 |
| V.1 Procedimento Experimental (parte 2) | 59 |
| Metodologia de Caracterização..... | 59 |
| Procedimento Geral..... | 60 |
| Procedimento usado para a síntese do complexo $\text{Ln}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ ou $\text{Ln}(\text{Btfa})_3\text{o-fen}$ ($\text{Ln} = \text{Eu}^{3+}, \text{Tb}^{3+}$)..... | 61 |
| Procedimento para preparação dos nanomarcadores (nanoesferas + complexo luminescente)..... | 62 |
| Procedimento realizado no sangue..... | 63 |
| Procedimento para avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos complexos $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$, $\text{Er}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ e $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{o-fen}$ | 63 |
| Tentativa de rastreamento do nanomarcador fotônico <i>in vivo</i> | 64 |
| Procedimento para preparação das nanocápsulas com complexo luminescente [$\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ ou $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{o-fen}$]..... | 65 |

| | |
|--|------------|
| Procedimento para preparação das microesferas com complexo Eu(Btfa) ₃ ofen..... | 66 |
| V.2 Resultados e Discussões (parte 2) | 67 |
| Estudos de Luminescência dos Complexos de Lantanídeos (Ln(Btfa) ₃ Bipy) Incorporados nas Nanoesferas..... | 67 |
| Estudos <i>in vitro</i> de Luminescência de Tecido Animal..... | 75 |
| Experiências Realizadas no Sangue (<i>in vitro</i>)... | 77 |
| Estudos de luminescência de criptatos de lantanídeos incorporados nas nanoesferas..... | 79 |
| Avaliação na Citotoxicidade de Complexos de Lantanídeos..... | 80 |
| Estudos <i>In Vivo</i> | 83 |
| Estudos de Luminescência dos Complexos de Lantanídeos Incorporados em Nanocápsulas... | 86 |
| Teste de Luminescência do complexo Eu(Btfa) ₃ o-fen incorporado em microesferas..... | 88 |
| Medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (EELS) | 89 |
| Caracterização das Nanopartículas por Análise Termogravimétrica (TGA)..... | 91 |
| VI Conclusões e Perspectivas..... | 94 |
| ANEXO I - Referências Bibliográficas..... | 95 |
| ANEXO II - Espectros Selecionados..... | 101 |
| ANEXO III - Resumo do trabalho submetido a SBQ..... | 107 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 O macrocíclico 1,4,10,13-tetraoxo-7,16-diazaciclooctadecano (1) e seu respectivo lauril-éter (2) | 3 |
| Figura 2 Sistema macrocíclico trinuclear (3) com $2\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ coordenados..... | 4 |
| Figura 3 Interações de ordem de magnitudes dos Hamiltonianos H_0 , $\text{H}_{\text{e-e}}$, H_{S0} e H_{CL} com níveis de energia da configuração $4f^6$ do íon Eu^{+3} | 9 |
| Figura 4 Representação esquemática do efeito antena: a luz é absorvida na região do ultravioleta pelos grupos cromóforos (antenas) e a energia eletrônica é transferida para o íon central luminescente, que emite radiação visível..... | 11 |
| Figura 5 Imagem RMN transversa (0,6T, 24MHz) do cérebro de um paciente com tumor cancerígeno antes (esquerda) e 3 min depois (direita) da injeção intravenosa de $\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^2$ | 13 |
| Figura 6 Diagrama de Energia do íon trivalente Európio..... | 14 |
| Figura 7 Exemplo de nanocápsula com o fármaco (parte amarela) incorporado ao interior da cavidade.. | 17 |
| Figura 8 Exemplo de nanoesfera com o fármaco disperso na matriz polimérica..... | 17 |
| Figura 9 Exemplo de criptato com nomenclatura [2.2.2]-criptando (4)..... | 21 |
| Figura 10 Éter de coroa com nomenclatura dibenzeno-18-coroa-6 (5)..... | 22 |
| Figura 11 Estrutura molecular da valinomycina (6) e de seu complexo (7) com íon K^+ (os grupos metila e isopropila foram omitidos para melhor visualização da coordenação do íon)..... | 24 |
| Figura 12 Esquema do processo de coordenação de cátion (M^+) ao lauril-éter constituído de braço com grupos doadores (D)..... | 25 |
| Figura 13 Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da mistura do composto (19) com cloreto de potássio em D_2O (25 °C). | 49 |
| Figura 14 Valores obtidos de T_1 (s) para os correspondentes prótons do composto (19)e o suposto complexo formado na mistura com KCl | 51 |
| Figura 15 Sobreposição de espectros de RMN ^1H (300 MHz) do composto (19) em D_2O (25°C) em diferentes unidades de tempo..... | 51 |

| | |
|--|----|
| Figura 16 Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da mistura do composto (19) com $\text{EuCl}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ em D_2O (25°C)..... | 52 |
| Figura 17 Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da mistura do composto (19) com $\text{EuCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em D_2O (25°C) após 3 dias..... | 53 |
| Figura 18 Representação da suposta coordenação do íon trivalente európio ao BiBLE constituído de braços com ácidos carboxílicos (20)..... | 53 |
| Figura 19 Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da mistura do composto (19) com $\text{LaCl}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ em D_2O (25°C). | 54 |
| Figura 20 Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da mistura do lauril-éter (19) com $\text{LaCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em D_2O (25°C) após 3 dias..... | 54 |
| Figura 21 Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em D_2O (25°C) do produto obtido da hidrólise do composto (19) - método III..... | 56 |
| Figura 22 Espectros de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ [40 $\mu\text{g}/\text{ml}$] incorporado a nanoesferas em diferentes formulações, utilizando-se a banda $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ como referência interna ($\lambda_{\text{excitação}} = 350 \text{ nm}$)..... | 69 |
| Figura 23 Espectros de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ [40 $\mu\text{g}/\text{ml}$] incorporado a nanoesferas nas duas formulações. ($\lambda_{\text{excitação}} = 350 \text{ nm}$)..... | 69 |
| Figura 24 Espectros de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ [5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] incorporado às nanoesferas em diferentes formulações. Os espectros do precipitado e sobrenadante foram feitos nas mesmas condições: fendas de observação de 1 mm, e sem fendas de excitação (baixo sinal), porém a formulação total foi realizada com fendas de observação de 0,6 X 0,7 mm e de excitação de 1 mm ($\lambda_{\text{excitação}} = 350 \text{ nm}$)..... | 71 |
| Figura 25 Espectros de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ [5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] incorporado a nanoesferas em duas formulações ($\lambda_{\text{excitação}} = 350 \text{ nm}$)..... | 72 |
| Figura 26 Espectros de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_2\text{Bipy}$ [5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] incorporado a nanoesferas em duas formulações, utilizando-se a banda $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ como referência interna ($\lambda_{\text{excitação}} = 350 \text{ nm}$)... | 73 |
| Figura 27 Espectros de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ [1mg/ml] incorporado a nanoesferas em duas formas, normalizado com a transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ referência interna ($\lambda_{\text{excitação}} = 350 \text{ nm}$)... | 74 |

| | |
|---|----|
| Figura 28 Espectros de emissão do complexo $\text{Tb}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ [40 $\mu\text{g/ml}$] incorporado em nanoesfera em duas formulações ($\lambda_{\text{excitação}}= 340 \text{ nm}$)..... | 75 |
| Figura 29 Espectros de emissão das amostras de sangue, rins, fígado e baço na região de 5700 - 7200 \AA ($\lambda_{\text{excitação}}= 350 \text{ nm}$)..... | 76 |
| Figura 30 Espectros de emissão do complexo $[\text{Tb}(\text{Bipy})_3\text{Bipy}]^{3+}$ [100 $\mu\text{g/ml}$] incorporado às diferentes formulações de nanoesferas ($\lambda_{\text{excitação}}= 330 \text{ nm}$)..... | 80 |
| Figura 31 Porcentagem de células vivas em relação a concentração utilizada de complexo luminescente..... | 81 |
| Figura 32 Porcentagem de células vivas para concentrações mais baixas dos complexos..... | 82 |
| Figura 33 Espectro de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ no sangue na primeira hora de circulação na corrente sanguínea do camundongo ($\lambda_{\text{excitação}}= 360 \text{ nm}$)..... | 84 |
| Figura 34 Espectros de emissão das amostras de tecidos (sangue, fígado, rins e baço) recolhidas do animal após várias horas <i>ex vivo</i> ($\lambda_{\text{excitação}}= 360 \text{ nm}$)..... | 86 |
| Figura 35 Espectro de absorção das nanocápsulas (formulação total)..... | 87 |
| Figura 36 Espectro de absorção do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})\text{Bipy}$ [10^{-4}M]..... | 87 |
| Figura 37 Espectro de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{o-fen}$ incorporado às microesferas ($\lambda_{\text{excitação}}= 355 \text{ nm}$) | 88 |
| Figura 38 Micrografia (MET) de nanocápsulas (PLGA com ácido úsnico encapsulado). A barra abaixo e à direita tem dimensão de 100 nm..... | 90 |
| Figura 39 Curvas de TGA (10°C/min , fluxo de N_2) das amostras de nanoesferas e PCL-Dex. | 91 |
| Figura 40 Curvas normalizadas pela massa inicial, de TGA (10°C/min , fluxo de N_2) das nanocápsulas e seus precursores..... | 92 |
| Figura 41 Curvas normalizadas pela massa inicial, de TGA (10°C/min , fluxo de N_2) das microesferas e seus precursores..... | 93 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela I Sumário do procedimento realizado na tentativa de bromação dos compostos (8) e (11)..... | 30 |
| Tabela II Sumário das tentativas de alquilação do brometo (16) ao macrocíclico (1) | 44 |
| Tabela III Relações de porcentagem de células vivas frente a concentrações relativamente altas dos complexos luminescentes..... | 81 |
| Tabela IV Relações de porcentagem de células vivas frente a concentrações mais baixas dos complexos luminescentes..... | 82 |

Lista de Símbolos e Abreviaturas

AZOBIS - 1,1'-Azobis(ciclohexanocarbonitrila)

CCD - Cromatografia de Camada Delgada

CG – Cromatografia Gasosa

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze

CG-EM – Espectro de Massa de Baixa Resolução

THF – tetraidrofurano

n-BuLi – *n*-butilíto

NBS - N-bromosuccinamida

MeCN- Acetonitrila

ButCN – Butironitrila

Et₃N – Trietilamina

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução (*High Performance Liquid Chromatography*)

d = Deslocamento químico

J = Constante de acoplamento

s = singlet

d = doublet

t = triplet

m = multiplet

IV = infravermelho.

UV = ultravioleta

DMSO – Dimetilsulfóxido

m/z (int. rel.) – Relação massa carga (intensidade relativa)

Btfa - 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona

Bipy – Bipiridina

o-fen – 1, 10-fenantrolina

ácido úsnico - [2,6-diacetyl-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzeno-furadione] - (C₁₈ H₁₆ O₇)

I - INTRODUÇÃO GERAL

Com o desenvolvimento de nanoestruturas carreadoras de fármacos em sistemas biológicos, o rastreamento das mesmas passou a ser assunto de interesse, em particular em estudos de vetorização para sítios específicos, em que é importante o conhecimento de propriedades intrínsecas da partícula, como tamanho, eficiência de encapsulação, característica de liberação do fármaco.

Em opção aos métodos de rastreamento de nanoestruturas até então utilizados, como os que utilizam radioisótopos como marcadores, propõe-se neste trabalho o desenvolvimento de rastreadores fotônicos, a partir da inclusão de complexos luminescentes que atuem como sonda.

O desenvolvimento de complexos de coordenação de lantanídeos com propriedades fotônicas tem se tornado um importante alvo de pesquisas envolvendo muitas classes de ligantes, tais como, β -dicetonas, derivados de ácidos carboxílicos ou ligantes macrocíclicos. O interesse contínuo no *design* de novos precursores (ligantes) para complexos luminescentes, advém do seu amplo potencial de aplicação, particularmente a partir do encapsulamento de íons lantanídeos em estruturas supramoleculares, originando compostos que atuam como excelentes dispositivos moleculares conversores de luz (DMCL), os quais absorvem eficientemente radiação na região do ultravioleta e reemitem na região do visível.

Por outro lado, mecanismos de conversão ascendente de energia (*up-conversion*), podem permitir a detecção de marcadores através de excitação na região espectral do infravermelho, bem mais conveniente em sistemas biológicos, não só por ser menos agressiva às células, mas também por não promoverem luminescência dos tecidos, que podem interferir na detecção da luminescência do nanomarcador.

Dentre os compostos aqui estudados podem-se destacar os complexos de β -dicetonas e criptatos de lantanídeos, cujas propriedades luminescentes são bem estabelecidas. Dessa forma, estes compostos foram escolhidos, juntamente com os macrocíclicos (lauril-éteres e BiBLE) para atuarem como possíveis sondas na vetorização de fármacos.

Este trabalho consiste basicamente em cinco seções, onde se descreve a síntese de lauril-éteres e BiBLE para coordenação de íons lantanídeos, referente a uma estratégia de desenvolvimento de precursores de rastreadores específicos, em particular para inspeção por infravermelho, bem como o rastreamento por excitação ultravioleta, *in vitro*, e posteriormente *in vivo*, de nanopartículas ativadas com complexos de β -dicetonas e criptatos de lantanídeos (nanorastreadores fotônicos).

Sendo assim, as seções são apresentadas da seguinte forma:

- Primeiramente apresentaram-se os objetivos que levaram ao desenvolvimento deste trabalho, bem como as estratégias de atuação seguidas;
- Depois, introduziram-se alguns conceitos considerados relevantes sobre os íons lantanídeos, sondas luminescentes, nanopartículas, sistemas nanoparticulados em liberação de fármacos e química supramolecular, para auxiliarem no entendimento das discussões posteriores;
- Em seguida foram descritas tentativas de sínteses e métodos de caracterização de lauril-éteres e BiBLE, além de estudos preliminares da eficiência de coordenação destes ligantes com diferentes cátions;
- Apresentou-se o estudo dos complexos de β -dicetonas e criptatos de lantanídeos incorporados em nanocápsulas e nanoesferas, como rastreadores fotônicos, utilizando radiação ultravioleta como fonte de excitação;
- Finalizou-se com as conclusões gerais do trabalho realizado e perspectivas sobre a aplicação dos sistemas sintetizados e utilizados.

II - OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho consistem principalmente no desenvolvimento de rastreadores fotônicos para nanoestruturas carreadoras de fármacos em sistemas biológicos.

A primeira etapa (**PARTE 1**), consiste na preparação de **rastreadores fotônicos especiais**, a partir de sistemas macrocíclicos (lauril-éteres, como também BiBLE), coordenados à íons lantanídeos para se obter precursores específicos para o **rastreamento por infravermelho**.

O macrocíclico (1) [figura 1] constitui um precursor interessante para compostos de coordenação, pois existe um grande número de informações sobre suas respectivas conformações e tipos de ligações a diferentes cátions.

A síntese do lauril-éter (2) a partir do macrocíclico (1) [figura 1] é necessária para obtenção do sistema macrocíclico trinuclear (3) [figura 2], no intuito de promovê-lo a um dispositivo inovador de conversão ascendente de energia (*up-conversion*), no qual radiação infravermelha pode ser convertida em radiação visível¹.

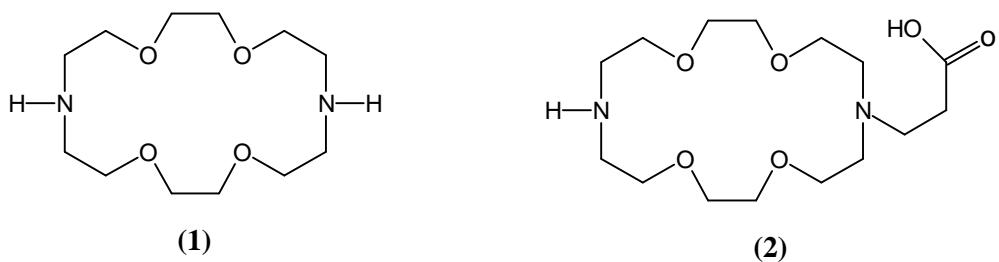


Figura 1 – O macrocíclico 1,4,10,13-tetraoxo-7,16-diazaciclooctadecano (1) e seu respectivo lauril-éter (2)

¹ Sá, G. F.; Auzel, F.; Santa-Cruz, P. A. *Rev. Phys. Appliquée*. **1985**, *20*, 273.

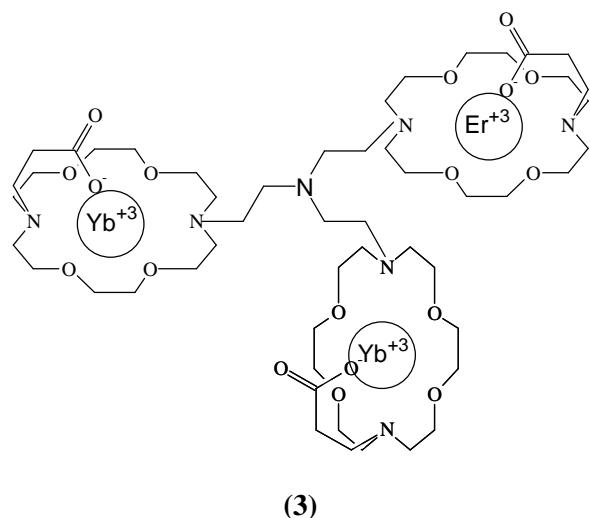


Figura 2 – Sistema macrocíclico trinuclear (3) com $2\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ coordenados

Apesar de sistemas eficientes conhecidos para processos de conversão ascendente de energia limitar-se a sistemas vítreos, vitrocerâmicos ou cristais inorgânicos², incompatíveis com sistemas biológicos, uma das estratégias do trabalho consiste na tentativa de se obter o efeito de *up-conversion* em ambiente inovador: meio orgânico, mais especificamente, o complexo macrocíclico trinuclear (3). Este sistema, a princípio, mostra-se bastante propício a tais estudos devido à ausência de cromóforos, que atuam como agentes supressores de energia, e também por apresentar ambiente estável para a coordenação de íons lantanídeos, mais especificamente os íons trivalentes Yb/Er na proporção estequiométrica adequada. Esta estratégia visa a tentativa de utilização do sistema macrocíclico trinuclear (3) como rastreador de fármacos em seres vivos, promovendo o estudo com radiação inofensiva aos mesmos.

Com o propósito de estudos de propriedades de coordenação para um maior entendimento e consequente preparação do sistema trinuclear (figura 2), propôs-se a preparação de complexos de lauril-éteres, como também de BiBLE (associados a braços alifáticos constituídos de ânions carboxilatos) a partir do macrocíclico (1) com íons lantanídeos, para formação de um sistema mononuclear bastante semelhante ao composto trinuclear.

Em paralelo, objetivou-se a preparação de lauril-éteres, constituídos de grupos cromóforos variados (anéis piridínicos), a partir do macrocíclico (1) para posterior coordenação com íons lantanídeos (Eu^{3+} , Tb^{3+}). Tal sistema poderá levar a estudos de

² Sá, G. F. ; Santa-Cruz, P. A.; Malta, O. L.; Auzel, F., *Y. J. Lumin.* **1984**, 31-32, 693.

luminescência destes íons (rendimento quântico, tempo de vida do estado excitado, etc), explorando o efeito antena de seus cromóforos. Estes tipos de complexos apresentam-se como promissores rastreadores fotônicos e “sondas estruturais”. Sistemas deste tipo podem ser incorporados, por exemplo, a matrizes poliméricas superabsorventes (PSA), auxiliando, assim, no trabalho que vem sendo realizado pelo aluno de doutorado do Departamento de Química Fundamental, Israel Crescêncio da Costa, sob mesma orientação, que trabalha no desenvolvimento de dispositivos capazes de detectar a presença de substâncias poluentes (metais de transição) em água potável.

Nos complexos supramoleculares, com Eu^{3+} coordenado ao macrocíclico, o íon encontra-se em ambiente menos protegido, ou seja, mais sensível ao ambiente químico e consequentemente mais eficiente como sonda estrutural em relação aos complexos β -dicetonas fluoradas. Além disso, complexos macrocíclicos, provavelmente apresentam maior solubilidade em meio aquoso.

A segunda etapa deste trabalho (**PARTE 2**) consiste na preparação e caracterização de **nanorastreadores** utilizando-se **radiação ultravioleta (UV)** em sistemas biológicos. O nanorastreador é constituído da nanopartícula carreadora e do marcador fotônico.

Como marcadores fotônicos, são usados nesta parte, complexos de lantanídeos, mais especificamente os íons trivalentes Európio ou Térbio coordenados com β -dicetonas ou criptatos, por suas propriedades já serem bastante conhecidas de trabalhos anteriores do Grupo. Pretende-se associá-los a nanopartículas carreadoras de fármacos (nanocápsulas ou nanoesferas) para posteriores tentativas de rastreamento utilizando-se mecanismo de excitação por ultravioleta via ligantes (efeito antena).

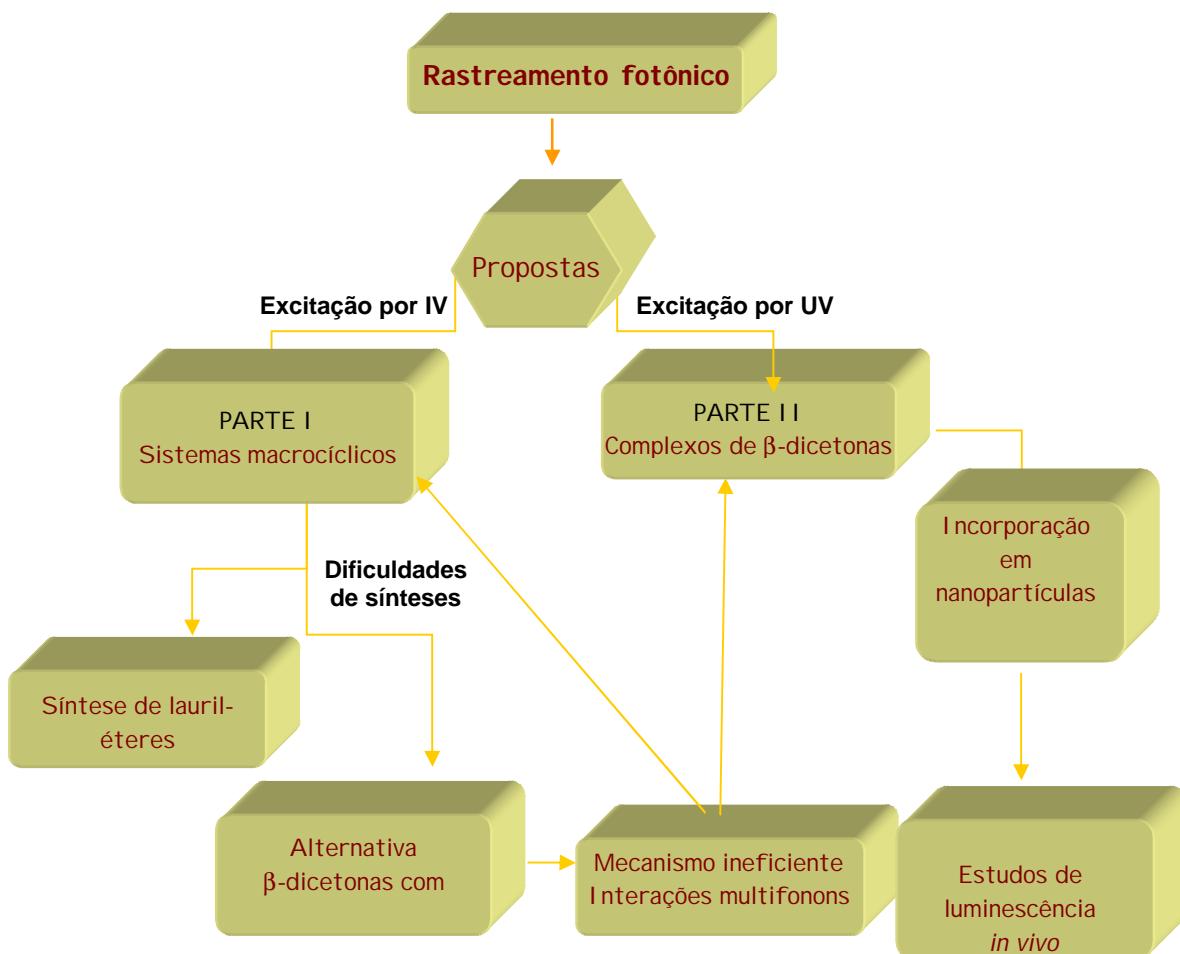
O estudo da vetorização do fármaco para sítios específicos pode ser realizado *in vitro* com o uso, por exemplo, de microscopia eletrônica (observação de variações em tecidos, etc.), ou ainda, fazendo-se do uso de radiomarcadores (radioisótopos). Uma alternativa a este método, que é relativamente caro e perigoso, é a utilização de compostos fluorescentes como nanomarcadores. Associados a nanoestruturas carreadoras, constituem um nanodispositivo fotônico, com o qual pretende-se rastrear nanopartículas pela luminescência e, consequentemente, o fármaco.

A proposta principal desta segunda etapa do trabalho visa o desenvolvimento de nanorastreadores fotônicos para o rastreamento de nanopartículas *in vivo*, através da fluorescência de complexos luminescentes de lantanídeos, excitados por UV, incorporados nessas nanopartículas. Para isso, faz-se necessário a síntese e a caracterização espectroscópica dos nanodispositivos fotônicos, para posterior estudo *in vitro* (em ambiente sanguíneo), bem como estudos de citotoxicidade, precedendo o rastreamento destes nanodispositivos *in vivo*.

A inclusão dos complexos luminescentes (nanomarcadores) em nanopartículas é realizada conjuntamente com o grupo de pesquisa da Prof. Dra. Nereide Santos Magalhães, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

11.1 – ESTRATÉGIA DE ATUAÇÃO

Devido ao caráter interdisciplinar do presente trabalho, fez-se necessário a esquematização de um fluxograma descrevendo as estratégias tomadas no decorrer deste estudo, no sentido de se atingir a meta do rastreamento fotônico de nanopartículas em sistemas biológicos.



Uma primeira proposta foi idealizada: preparação de rastreadores fotônicos com inspeção por infravermelho, devido suas vantagens em estudos de sistemas biológicos. A estratégia consistia na utilização de sistemas macrocíclicos (síntese de lauril-éteres e BiBLE) como precursores para esses rastreadores específicos. Porém, várias dificuldades de síntese e caracterização foram enfrentadas.

Uma alternativa de inspeção por infravermelho (*up-conversion*) foi proposta, utilizando-se de complexos de β -dicetonas com pares ativadores (Er^{3+}) e

sensibilizadores (Yb^{3+}), entretanto tal mecanismo mostrou-se ineficiente e nenhum sinal luminescente foi observado sob excitação infravermelha, provavelmente devido a interações multifônonos. Diante deste fato, novas tentativas de síntese de macrícíclicos foram continuadas, em paralelo com uma segunda estratégia (proposta II): estudo de rastreamento fotônico com inspeção por ultravioleta, utilizando como marcadores fotônicos, complexos de β -dicetonas com lantanídeos. Apesar dos inconvenientes associados à utilização de radiação UV, este sistema é bastante conhecido pelo grupo, não apresentando dificuldades em sua preparação. O complexo é, então, incorporado em nanopartículas para rastreamento através de sua luminescência por coleta *in vivo*.

III - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

ÍONS LANTANÍDEOS

Os íons lantanídeos constituem uma série de elementos com números atômicos variando de 58 (Cério) a 71 (Lutécio), caracterizando-se pelo preenchimento gradativo dos orbitais $4f$. Geralmente apresentam-se na sua forma mais estável com número de oxidação (3+) e configuração $[Xe] 4f^n$. Tais íons têm encontrado uso nos mais diversos processos em optoeletrônica e fotônica, como por exemplo, em lasers de estado sólido ou dispositivos luminescentes, cintiladores, telas luminescentes, fibras óticas ativas, sondas para análises biológicas.

PRI NCIPAI S PROPRI EDADES DOS ÍONS LANTANÍDEOS

A configuração eletrônica $4f^n$ dos íons lantanídeos, com energia resultante da interação com o campo central (H_0), dá origem a vários termos nos quais as energias são determinadas por combinações de repulsão intereletrônica (H_{e-e}), acoplamento spin-órbita (H_{SO}), e, no ambiente de coordenação, pelo campo ligante (H_{CL}) (figura 3).

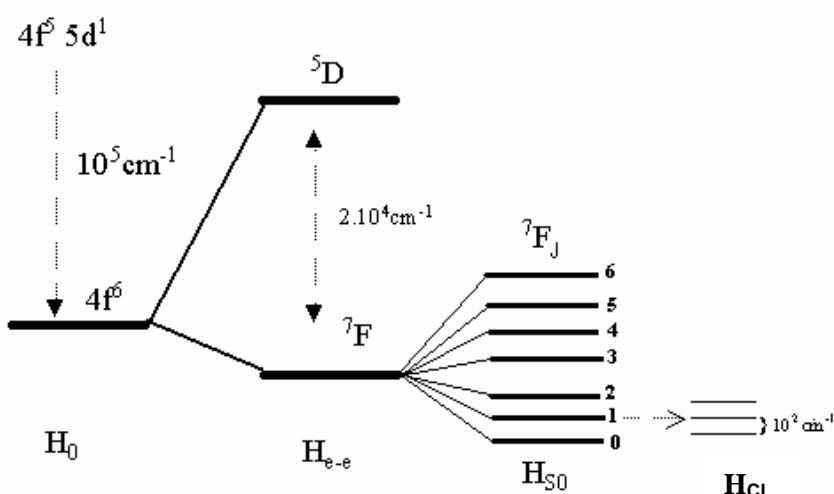


Figura 3 - Interações de ordem de magnitudes dos Hamiltonianos H_0 , H_{e-e} , H_{SO} e H_{CL} com níveis de energia da configuração $4f^6$ do íon Eu^{+3}

A interação eletrostática produz termos ^{2S+1}L com separações da ordem de 10^4 cm^{-1} . Já interação spin-órbita desdobra os termos em estados J, com típicos desdobramentos de 10^3 cm^{-1} . Finalmente, a degenerescência em J para estados do íon livre é parcialmente ou totalmente removida em compostos de coordenação pelo campo ligante, sendo o desdobramento da ordem de 10^2 cm^{-1} (mesma ordem de grandeza da energia térmica, kT). A extensão da remoção dessa degenerescência depende da força e simetria do campo cristalino. Portanto a análise do número de bandas para cada transição permite inferir a simetria pontual do complexo.

Devido ao efeito de blindagem dos orbitais $4f$ pelas subcamadas mais externas $5s^2 5p^6$, as propriedades espectrais dos íons Ln (3+) são minimamente perturbadas pelo campo externo gerado por ligantes ou moléculas de contra-íon, resultando em estreitas bandas f-f de emissão e absorção. Além disso, a coordenação de ligantes a íons Ln^{3+} ocorre predominantemente via interação iônica, pois, como os orbitais f são blindados do ambiente químico, existe pequeno ou nenhum direcionamento nas interações Ln-ligante (caráter eletrostático), tal que o número de coordenação primária e geometrias dos complexos são determinados predominantemente pelas características do ligante (propriedades conformacionais, tamanhos e natureza dos grupos doadores).

Os lantanídeos apresentam fortes afinidades por grupos doadores carregados negativamente (bases duras) e com ligantes neutros, sendo a preferência por átomos doadores na ordem $\text{O} > \text{N} > \text{S}$.

As transições entre estados de uma configuração $4f^n$, apesar de serem proibidas pela **regra de Laporte** (não existe mudança de paridade do estado fundamental para o estado excitado), ocorrem devido a mistura das funções de onda dos estados 4f de paridades opostas provocadas pelo campo cristalino. A probabilidade de transição é baixa e os tempos de vida radiativos são da ordem de milisegundos. Porém, certos íons lantanídeos, quando coordenados a determinados ligantes (β -dicetonas, por exemplo), apresentam forte luminescência, tornando os respectivos complexos promissores dispositivos moleculares conversores de luz (DMCL), podendo absorver radiação na região espectral do ultravioleta (via ligantes - efeito antena) e emitir na região espectral visível (via transições $4f$ - $4f$ do íon central).

EFEITO ANTENA

J.-M. Lehn introduziu o termo “efeito antena” para denominar o processo de conversão de luz ultravioleta em visível via uma seqüência de absorção, transferência de energia intramolecular e emissão (luminescência), envolvendo componentes absorvedores (ligantes) e emissores (Ln^{3+}) distintos (figura 4).

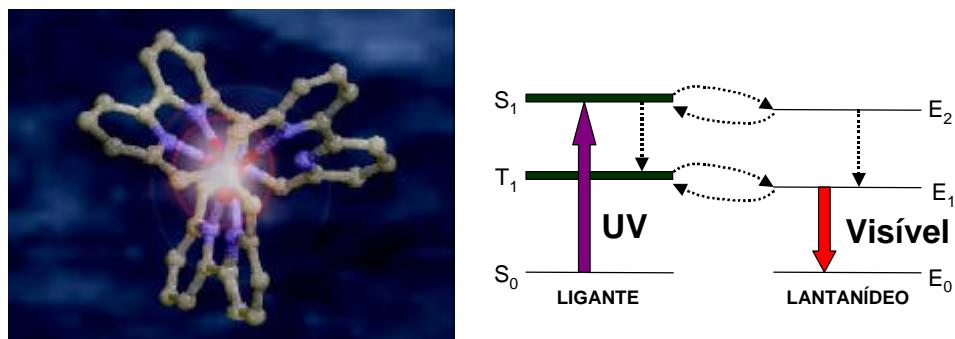


Figura 4- Representação esquemática do efeito antena: a luz é absorvida na região do ultravioleta pelos grupos cromóforos (antenas) e a energia eletrônica é transferida para o íon central luminescente, que emite radiação visível

As β -dicetonas constituem uma das famílias de ligantes mais estudadas em química de coordenação de lantanídeos, não somente devido a suas afinidades pelos cátions, mas também aos benefícios promovidos por estes ligantes no aumento das propriedades luminescentes dos complexos. A intensidade de luminescência dos íons Ln (3+) coordenados a tais sistemas é dependente de vários fatores: a capacidade de absorção do ligante, a eficiência da transferência de energia ligante – íon central e a eficiência da luminescência do íon central. Assim a eficiência do processo de luminescência torna tais complexos de lantanídeos eficientes DMCLs, podendo ser utilizados, por exemplo, como marcadores luminescentes para espécies químicas, dispositivos eletroluminescentes³, e dispositivos fotônicos, como os dosímetros UV n-DOMO desenvolvidos no nosso Grupo. Os complexos de lantanídeos podem ainda ser usados como **sondas luminescentes** em ensaios biomédicos, inclusive utilizando-se microscopia resolvida no tempo⁴.

³ Christou, V.; Salata, O. V.; Ly, T. Q.; Capecchi, S.; Bailey, N. J.; Cowley, A.; Chippindale, A. M. *Synthetic Metals* **2000**, 111-112, 7.

⁴ Phimphivong, S.; Saavedra, S. S. *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9, 350.

SONDAS LUMINESCENTES

A maioria dos íons de metais considerados essenciais ou importantes para a estrutura biológica e funcional não apresenta luminescência em meios biológicos. Porém, exceções para este tipo de comportamento são os íons trivalentes Európio e Térbio, os quais mantêm suas características luminescentes quando incorporados artificialmente aos sistemas biológicos. A luminescência desses íons pode ainda aumentar, quando ligados a certos sistemas ligantes biomoleculares complexos, como por exemplo a proteína humana responsável pelo transporte de ferro, transferina⁵, ou as proteínas ligantes de cálcio termolisina⁶ e parvalbumina⁷, onde inúmeras informações estruturais puderam ser obtidas destas biomoléculas a partir de simples estudos espectroscópicos do íon Eu³⁺ incorporado a tais sistemas.

A sensibilidade dos espectros de excitação e emissão dos íons Európio e Térbio para fatores estruturais específicos ou propriedades ligantes de complexos faz destes íons naturais candidatos para o uso como **sondas luminescentes** em sistemas biomoleculares. Suas propriedades ligantes unidas com a relativamente alta intensidade detectável de emissão sob variadas condições de amostras promovem seu uso como **marcadores**⁸. Porém, para a utilização de Eu³⁺ e Tb³⁺ como marcadores luminescentes, é necessário que tais íons sejam capazes de se ligarem fortemente e reterem suas propriedades luminescentes *in situ* (em sistemas biológicos). Estas propriedades podem ser encontradas em complexos destes lantanídeos com β-dicetonas, por exemplo⁹.

Os quelantes de lantanídeos têm encontrado um extenso uso como sondas em RMN¹⁰ (sondas de relaxação e deslocamento) para aplicações biomédicas, incluindo a

⁵ O'Hara, P. B.; Bersohn, R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 5269.

⁶ Horrocks, W. DeW., Jr.; Sudnick, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 334.

⁷ Cronce, D. T.; Horrocks, W. DeW., Jr. *Biochemistry* **1992**, *31*, 7963.

⁸ Mazor, O.; Boisferon, M. H.; Lombet, A.; Gruaz-Guyon, A.; Gayer, B.; Skrzydelsky, D.; Kohen, F.; Forgez, P.; Scherz, A. *Anal. Biochem.* **2002**, *301*, 75

⁹ Sokolnicki, J.; Legendziewicz, J.; Amirkhanov, W.; Ovchinnikov, V.; Macalik, L.; Hanuza, J. *Spectrochimica Acta Part A* **1999**, *55*, 349.

¹⁰ a) Parker, D.; Dickins, R. S.; Puschmann, H.; Crossland, C.; Howard, J. A. K. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1977; b) Brough, A. R.; Grey, C. P.; Dobson, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7318; c) Bertini, I.; Janik, M. B. L.; Lee, Y.-M.; Luchinat, C.; Rosato, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4181.

separação de enantiômeros por deslocamento quiral de reagentes lantanídeos¹¹. Com o desenvolvimento das técnicas de Imagem por Ressonância Magnética (MRI) no diagnóstico clínico, tem crescido o estudo de complexos de Ln^{3+} como agentes contrastantes¹² (Figura 5).

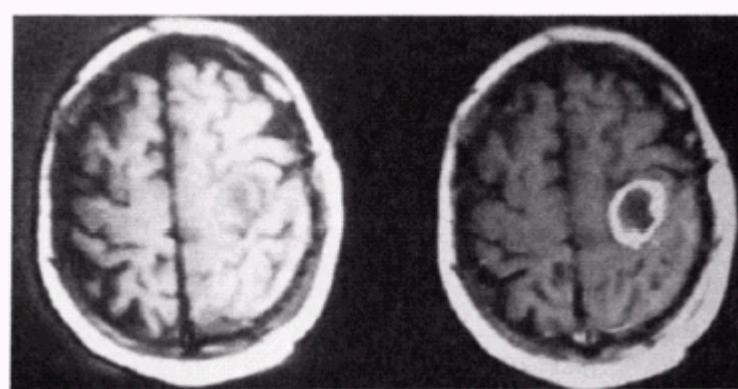


Figura 5 – Imagem RMN transversa (0,6T, 24MHz) do cérebro de um paciente com tumor cancerígeno antes (esquerda) e 3 min depois (direita) da injeção intravenosa de $\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})_2^{2-}$

PROPRIEDADES LUMINESCENTES DO ÍON TRIVALENTE EUROPIO

A aplicação de íons Eu^{3+} como “sonda estrutural luminescente” advém da simplicidade principalmente da emissão $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ e da excitação $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{D}_0$ (figura 6), bem como das transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_{1,2}$, sendo a segunda muito sensível à natureza do ambiente ligante (hipersensitiva). Os desdobramentos e intensidades observados nestas transições são relativamente simples e oferecem promissoras interpretações em termos de simetria de sítio¹³, geometria de coordenação, constante de estabilidade de quelatos de íons de lantanídeos¹⁴, etc.

¹¹ Glover-Fischer, D. P.; Metcalf, D. H.; Hopkins, T. A.; Pugh, V. J.; Chisdes, S. J.; Kankare, J.; Richardson, F. S. *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 3026.

¹² Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1987**, 87, 901.

¹³ Serpaggi, F.; Férey, G.; Antic-Fidancev, E. *J. Sol. St. Chem.* **1999**, 347.

¹⁴ Wu, S. L.; Horrocks, W. DeW., Jr. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 394.

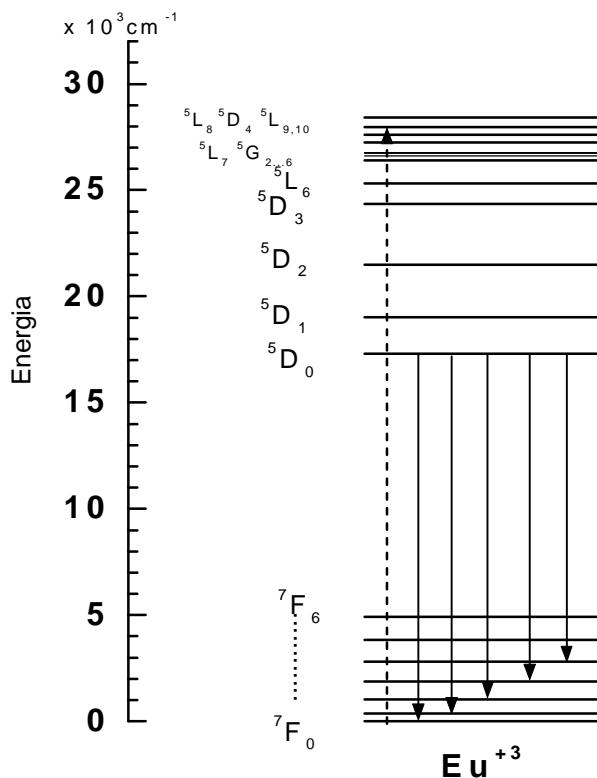


Figura 6 – Diagrama de Energia do íon trivalente Európio

A transição $^7F_0 \rightarrow ^5D_0$ tem especial característica de ser inteiramente não-degenerada, resultando na presença de apenas um pico para cada ambiente distinto de Eu^{3+} no espectro de excitação. Dessa forma, a aparição de mais de uma linha nesta região espectral (579-581) implicaria na presença de diferenciados ambientes químicos para o centro Eu^{3+} . Entretanto, tais desdobramentos de linhas são da ordem de 15-30 cm^{-1} ($\sim 5\text{-}10 \text{ \AA}$), necessitando de fonte de excitação estreita produzida por um laser sintonizável no intervalo 577-581 nm.

A transição $^7F_0 \rightarrow ^5D_0$ é considerada a melhor “sonda diagnóstica” para a coordenação de íons Eu^{3+} , porém a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, referida como hipersensitiva, é também utilizada como sonda da estrutura de coordenação dos íons Eu^{3+} , pois mudanças no ambiente de coordenação do íon podem levar a consideráveis mudanças nas intensidades relativas desta banda, a qual é monitorada em torno de 614 nm.

Dessa forma, a partir do monitoramento das transições características do íon Európio trivalente, é possível extrair informações sobre o ambiente químico em torno

do mesmo¹⁵, como, por exemplo, a determinação da constante de formação de complexos de Eu³⁺¹⁶. Relações quantitativas têm sido desenvolvidas, nas quais se pode prever o número de coordenação do ligante¹⁷.

SISTEMAS NANOPARTICULADOS EM LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

A nanotecnologia tem seu uso nos mais variados campos. Porém, um especial interesse emana no desenvolvimento de nanodispositivos para **votorização de fármacos** em sistemas biológicos¹⁸.

A votorização de fármacos pode ser definida como uma liberação seletiva destes a órgãos, tecidos ou células específicas do organismo, onde é requerida a atividade farmacológica. Nanoestruturas poliméricas têm sido amplamente estudadas¹⁹ com este propósito devido às suas propriedades de alterar a distribuição de fármacos após a sua administração, possibilitando um aumento de sua eficácia, diminuição da toxicidade ou ainda desenvolvimento de formas de “liberação controlada”.

Assim, há um grande interesse no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (direcionamento específico) e sustentada de fármacos, com o objetivo de aumentar a eficiência do fármaco (proteção de degradação no trato digestivo, mascarar um gosto indesejável, por exemplo)²⁰ e ao mesmo tempo minimizar os efeitos colaterais e a toxicidade de certos compostos ativos, que normalmente acompanham a terapia convencional: na medicação oral (comprimidos ou cápsulas), por exemplo, uma quantidade em excesso de droga é administrada para assegurar o efeito terapêutico, ocasionando uma liberação imprevisível ou descontrolada²⁰.

¹⁵ a) Frey, S. T.; Chang, C. A.; Carvalho, J. F.; Varadarajan, A.; Schultze, L. M.; Pounds, K. L.; Horrocks, W. DeW., Jr. *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 2882. b) Bünzli, J.-C. G.; Plancherel, D.; Pradervand, G.-O. *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 980.

¹⁶ Albin, M.; Farber, G. K.; Horrocks, W. DeW., Jr. *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 1648.

¹⁷ Choppin, G. R.; Peterman, D. R. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, 174, 283.

¹⁸ Song, C. X.; Labhasetwar, V.; Murphy, H.; Qu, X.; Humphrey, W. R.; Shebuski, R. J.; Levy, R. J. *J. Cont. Rel.* **1997**, 43, 197.

¹⁹ Santos-Magalhães, N. S.; Pontes, A.; Pereira, V. M. W.; Caetano, M. N. P. **2000**, 208, 71

²⁰ Barrat, G. M. *Pharm. Sci. Tech. Today* **2000**, 3, 163.

O principal objetivo da nanotecnologia é, portanto, desenvolver um modelo de sistema carreador de compostos bioativos com adequada estabilidade, absorção, liberação controlada e transferência quantitativa e específica da molécula do fármaco ao tecido doente.

Dessa forma, **nanopartículas** tornam-se potenciais carreadores para a liberação controlada de fármacos, pois tais sistemas possuem a propriedade de isolar o agente ativo do meio externo e, até certo ponto, controlar a liberação destes agentes no momento pretendido. O fármaco, quando encapsulado no interior de matrizes poliméricas, tem sua liberação no meio fisiológico (degradação da matriz polimérica, difusão do fármaco ou sistemas por ativação de solventes) estendida a um tempo muito maior quando comparado ao fármaco na sua forma livre.

NANOPARTÍCULAS

Inicialmente, eram produzidas micropartículas²¹ (microesferas e microcápsulas) com tamanhos variando de 5 μm até 2 mm. Entretanto desde 1980, com o desenvolvimento dos polímeros biodegradáveis, uma segunda geração de sistemas de dimensões menores vem sendo desenvolvida: as nanopartículas que consistem num sistema coloidal submicrômico ($<1\mu\text{m}$), constituído geralmente por polímeros biodegradáveis. Tais nanopartículas são classificadas, de acordo com o método de preparação, em:

- **Nanocápsulas** - sistemas vesiculares, que apresentam uma cavidade interna oca ou de natureza oleosa, estabilizada por um filme interfacial de agentes tensoativos e revestida superficialmente por uma fina membrana polimérica²² (figura 7). O fármaco, por sua vez, pode ser incorporado diretamente na cavidade oleosa interna, ou retido na parede polimérica, ou adsorvido na superfície das nanocápsulas.

²¹ García del Barrio, G.; Novo, F. J.; Irache, J. M. *J. Cont. Rel.* **2003**, 86, 123.

²² Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.; Ammoury, N.; Benita, S. *Int. J. of Pharm.* **1989**, 55, R1



Figura 7 – Exemplo de nanocápsula com o fármaco (parte amarela) incorporado ao interior da cavidade

- **Nanoesferas** - constituída por uma matriz polimérica na qual a droga se encontra dispersa por toda a partícula.

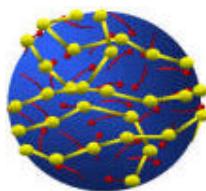


Figura 8 – Exemplo de nanoesfera com o fármaco disperso na matriz polimérica

Os polímeros mais usados na formação de nanopartículas são os poliésteres biodegradáveis, aprovados pela agência de vigilância sanitária americana, *Food and Drug Administration* (FDA), como, por exemplo, os derivados do ácido lático (PLA), o polietilenoglicol (PEG), os derivados da caprolactona (PCL) e os copolímeros de ácido lático e glicólico (PLGA).

A nanopartícula deve ser capaz de atingir especificamente o sítio alvo (órgão, tecido ou célula) e liberar o fármaco num processo dinâmico. A nanopartícula deve, ainda, garantir a estabilidade do fármaco na circulação, permitindo uma grande concentração deste no alvo de interesse.

Um amplo estudo²³ tem-se desenvolvido na utilização de nanopartículas em terapia de câncer, em substituição aos drásticos métodos quimioterápicos convencionais.

²³ Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Adv. Drug Del. Rev.* **2002**, 54, 631.

SISTEMAS NANOPARTICULADOS E ÍONS LANTANÍDEOS

Estudos em dimensões nanométricas com íons lantanídeos são relativamente novos e poucos relatos são encontrados na literatura, como os exemplos:

- As propriedades luminescentes de nanocristais contendo íons lantanídeos têm se tornado atrativo em termos de importância fundamental e tecnológica, utilizando-se técnicas de sol-gel²⁴;
- Síntese e estudo de luminescência de nanopartículas de semicondutores²⁵ dopadas com íons ou óxidos de lantanídeos;
- Síntese e estudo espectroscópico de nanocristalitos de fosfatos²⁶ dopados com lantanídeos;
- Estudos de fluorimetria resolvida no tempo (DELFIA) de quelantes de Európio (Eu-DTPA) encapsulados em lipossomas²⁷;
- Preparação e caracterização de nanopartículas de complexos de lantanídeos com ligantes β -dicetonas, embora haja poucos relatos na literatura²⁸, já demonstram um aumento considerável da intensidade de emissão de complexos de lantanídeos em nanopartículas, quando comparados a similares complexos em maiores dimensões. Há relatos²⁹, ainda, de sínteses de nanopartículas com quelantes (β -dicetonas) de Európio, aplicadas com sucesso em métodos de fluorescência resolvida no tempo, na detecção de antígenos.

QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

Durante décadas os químicos tentaram compreender a natureza sob o aspecto puramente molecular, envolvendo a síntese e a investigação de propriedades físico-químicas, considerando apenas estruturas e ligações covalentes. Porém, a partir das observações dos fenômenos biológicos, constatou-se que a maioria dos processos não

²⁴ Shen, J. Y.; Lochhead, M. J.; Bray, K. L. Chen, Y.; Dumesic, J.A. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 2384.

²⁵ Reisfeld, R.; Gaft, M.; Saridarov, T.; Panczer, G.; Zelner, M. *Mat. Lett.* **2000**, 45, 154.

²⁶ Haase, M.; Riwotzki, K.; Meyssamy, H.; Kornowski, A. *J. All. Comp.* **2000**, 303-304, 191.

²⁷ Orellana, A.; Laukkonen, M.-L.; Keinänen, K. *Biochim. et Biophys. Acta* **1996**, 1284, 29.

²⁸ Qian, D.-J.; Liu, H.-G.; Huang, H.-X.; Fu, Q.; Feng, X.-S. *Mat. Lett.* **2001**, 51, 525.

²⁹ Härmä, H.; Soukka, T.; Lövgren, T. *Clin. Chem.* **2001**, 47:3, 561.

envolve formação ou quebra de ligações covalentes, pelo contrário, as estruturas biológicas são usualmente constituídas a partir de agregados mantidos por interações fracas, não covalentes. Tais observações levaram a uma mudança considerável na química de coordenação, a qual passa da química puramente molecular para supramolecular³⁰.

O início dessa mudança ocorreu em 1894, quando Emil Fischer propôs a analogia entre a interação de uma enzima com seu substrato e a relação entre uma chave com sua respectiva fechadura³¹. Este elegante mecanismo contém os princípios fundamentais daquilo que viria a se tornar uma nova área denominada Química Supramolecular. Tal área surge após estudos de compostos de inclusão, os éteres de coroa³² e os criptatos³³, realizados principalmente por Jean-Marie Lehn, o responsável pela expressão Química Supramolecular³⁴.

A motivação, o princípio, era o *design* de sistemas químicos que mimetizassem processos biológicos. Hoje, a Química Supramolecular, entretanto, vem sendo definida como um ramo da química que trata de um universo além da molécula, envolvendo interações intramoleculares fracas³⁵.

Dentro da química supramolecular, podemos citar os compostos **macrocíclicos**. A família dos macrocíclicos é constituída de diferentes tipos de compostos os quais têm sido amplamente sintetizados, no intuito de promovê-los a promissores receptores para cátions e ânions em ligações efetivas³⁰.

Compostos macrocíclicos são por definição qualquer composto de estrutura cíclica ou multicíclica contendo átomos doadores (oxigênio, nitrogênio, por exemplo) em sua estrutura.

O professor Jean-Marie Lehn observou a existência de uma correlação entre o tamanho do cátion e do macrocíclico a serem utilizados, chamando a isto de “hóspede-hospedeiro”³⁶. Tal correlação é de grande interesse aos químicos orgânicos

³⁰ Lehn, J.-M. “*Supramolecular Chemistry Concept and Perspectives*” **1995**, Wienheim-New York.

³¹ Fischer, E. Ber. *Deutsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985.

³² a) Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 7017; b) Pedersen, C. J. *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1053.

³³ Lehn, J.-M. *Struct. Bonding* **1973**, 16, 1.

³⁴ Lehn, J.-M. *Pure Appl. Chem.* **1978**, 50, 871.

³⁵ Yui, N. “*Supramolecular Design for Biological Applications*” **2002**, CRC Press, New York.

³⁶ a) Cram, D. J.; Cram, J. M. “*Container Molecules and Their Guests*” Monographs in Supramolecular Chemistry, **1997**, Series Editor J. Fraser Stoddart, University of Califórnia, Los Angeles, USA; b) Cram, D. J.; Cram, J. M. *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 8.

e inorgânicos na síntese de complexos macrocíclicos de diversos tamanhos de cavidade que se coordenam a diferentes cátions metálicos.

LI GANTES MACROCÍCLICOS

Uma das propriedades mais relevantes dos macrocíclicos é o fato de a coordenação destes ligantes a determinados íons metálicos apresentar um acréscimo considerável na força e seletividade de ligação, quando comparadas a similares de cadeia aberta. A esta propriedade denomina-se **efeito macrocíclico**³⁷. Desse modo, complexos macrocíclicos são mais estáveis cinética e termodinamicamente que os complexos análogos de ligantes de cadeia aberta.

A principal diferença entre um ligante macrocíclico e o similar de cadeia aberta é a “prévia organização”³⁰ do ligante macrocíclico, assumindo que o ligante previamente organizado já provém de ambiente ideal de ligação para um íon metálico em particular, a ligação requer um ajuste mínimo na conformação do ligante, sugerindo que tal “prévia organização” (decréscimo na entropia) do macrocíclico constitui o maior contribuinte para o “efeito macrocíclico”³⁸.

As propriedades dos ligantes macrocíclicos, se atendo ao “efeito macrocíclico”, incluem aumento da estabilidade termodinâmica do íon metal coordenado, aumento na seletividade e estabilização de estados de oxidação não usuais de íons metais.

Os ligantes macrocíclicos apresentam ampla aplicação em processos de separação de íons por transporte através de membrana natural ou artificial, em virtude das habilidades de se ligarem a tais espécies seletivamente. Os macrocíclicos podem ser usados, ainda, como agentes terapêuticos e para o diagnóstico em análise clínica, envolvendo a identificação e o monitoramento de espécies de importância médica no sangue e em outros fluidos do corpo.

³⁷ a) Cabbines, D. K.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 6540; b) Cabbines, D. K.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 2151; c) Busch, D. H.; Stephenson, N. A. *Coord. Chem. Rev.* **1990**, 100, 119.

³⁸ Martell, A. E.; Hancock, R. D.; Motekaitis, R. J. *Coord. Chem. Rev.* **1994**, 133, 39.

As principais classes de macrocíclicos sintetizados são: Criptatos, Éteres de coroa, Calixarenos³⁹, *Spherands*⁴⁰, entre outros. Duas classes destes compostos serão descritas abaixo, devido sua relevância neste trabalho.

CRIPTATOS

Na década de 60, Jean-Marie Lehn e colaboradores⁴¹ conseguiram coordenar cátions a macromoléculas num arranjo tridimensional, de forma flexível, permitindo ao cátion além de complexado, ser também encapsulado. Esses compostos foram denominados criptatos (figura 9).

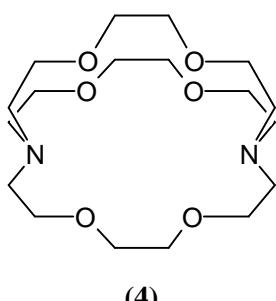


Figura 9 –Exemplo de criptato com nomenclatura [2.2.2]-criptando (4)

Os criptatos apresentam uma cavidade no centro de sua estrutura, podendo servir como hospedeira para cátions. Tais ligantes formam complexos de inclusão, nos quais o substrato está contido dentro desta cavidade (ou cripta), daí o termo utilizado por Lehn que provém da palavra latina *crypta*, que significa oculto, já que o cátion, quando encapsulado, apresenta-se completamente isolado do meio externo.

Os fatores que contribuem para uma maior estabilidade dos complexos macrocíclicos, quando comparados aos complexos de cadeia aberta, são também responsáveis pela maior estabilidade dos complexos de criptatos quando comparados aos correspondentes compostos macrocíclicos⁴². Logo o “efeito criptato”⁴³ na

³⁹Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V.; Tantikunwatthana, N.; Ngampaiboonsombut, O.; Seangprasertkij-Magee, R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3985.

⁴⁰ Vögtle, F. “*Supramolecular Chemistry An Introduction*” **1991**, John Wiley & Sons Ltd, England.

⁴¹ Lehn, J.-M. *Angew. Chem.* **1988**, 100, 91.

⁴² Buschmann, H.-J. *Inorg. Chim. Acta* **1985**, 105, 59

⁴³ Lehn, J.-M. *Acc. Chem. Res.*, **1978**, 11, 49.

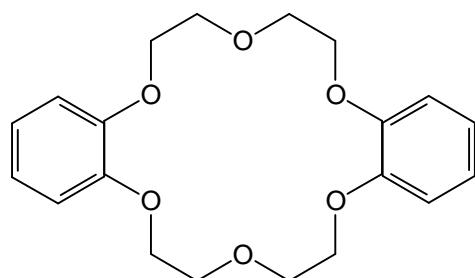
estabilidade cinética e termodinâmica destes compostos é mais pronunciado que o “efeito macrocíclico”.

Os criptatos podem ser utilizados, por exemplo, como marcadores biológicos, carreadores seletivos para a regularização de níveis de cátions e transporte em organismos, ou até mesmo, em aplicações ambientais, na separação e despoluição de resíduos industriais.

ÉTERES DE COROA

Os éteres de coroa são compostos poliéteres macrocíclicos que geralmente contêm heteroátomos de oxigênio ou seus equivalentes, separados por dois átomos de carbono. Basicamente, para ser considerado um éter coroa, o composto deve conter grupos doadores de elétrons.

A primeira síntese de éter de coroa foi realizada accidentalmente pelo químico industrial Perdesen em 1967 que, ao tentar sintetizar um derivado do bis(fenol), obteve também como subproduto o dibenzeno-18-coroa-6 (figura 10)⁴⁴.



(5)

Figura 10 – Éter de coroa com nomenclatura dibenzeno-18-coroa-6 (5)

Para Perdesen, o modelo do complexo contendo o íon potássio assemelhava-se ao tipo de coroa utilizada pela monarquia, daí o termo éter de coroa.

Os éteres de coroa são catalisadores de transferência de fase muito poderosos. São utilizados para transferir compostos iônicos para uma fase orgânica a partir de uma fase aquosa ou a partir de um cristal sólido⁴⁰.

⁴⁴ Pedersen, C. J. *Aldrichim. Acta* **1971**, 4, 1.

DI AZA-ÉTERES DE COROA

Os aza-éteres de coroa apresentam propriedades de coordenação intermediárias entre os éteres coroa, que formam complexos bastante estáveis com metais alcalinos e alcalinos terrosos, e os ciclanos de nitrogênio, os quais coordenam-se fortemente a metais pesados⁴⁵. Os aza-éteres de coroa formam complexos estáveis especialmente com cátions de metais de transição⁴⁶, podendo ainda se coordenar a cátions orgânicos ou ânions. Em alguns casos, a coordenação com ânions é similar a processos de complexação em certos sistemas biológicos, apresentando importante uso como receptores sintéticos em processos de reconhecimento celular⁴⁷.

Por disporem de funções aminas (secundárias) em seus anéis macrocíclicos, os aza-éteres de coroa propiciam o *design* de ligantes com arranjo tridimensional, tais como os criptatos descritos anteriormente.

LAURIL-ÉTERES E BiBLE

Um dos estímulos para o desenvolvimento de lauril-éteres foi o entendimento da estrutura e da função de um carreador macrocíclico natural conhecido como valinomicina⁴⁸ (Figura 11), responsável pelo transporte seletivo de íons potássio através de membranas mitocôndrial.

⁴⁵ Krakowiak, K. E.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M.; Zamecka-Krakowiak, D. J. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4061

⁴⁶ Izatt, R. M.; Bradshaw, J. S.; Nielsen, S. A.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J. *Chem. Rev.* **1985**, 85, 271

⁴⁷ Sutherland, I. O. *Chem. Soc. Rev.* **1986**, 15, 63.

⁴⁸ Beer, P. D.; Gale, P. A.; Smith, D. K. *Supramolecular Chemistry*, Oxford University Press, New York, **1999**.

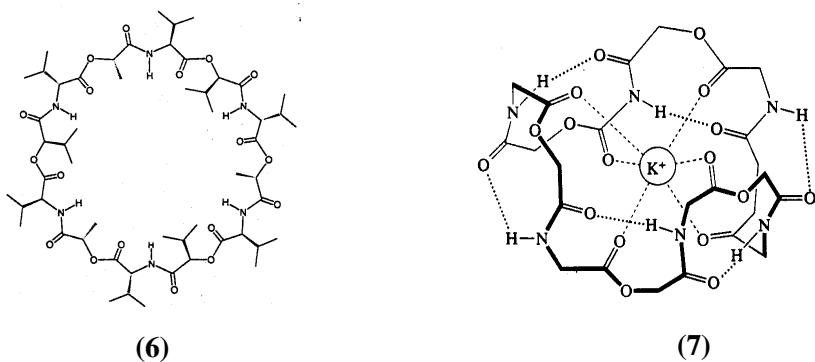


Figura 11 – Estrutura molecular da valinomicina (6) e de seu complexo (7) com íon K^+ (os grupos metila e isopropila foram omitidos para melhor visualização da coordenação do íon)

Dessa forma, os lauril-éteres foram projetados para mimetizar a dinâmica do processo de complexação existente em muitos ligantes macrocíclicos naturais, como também aumentar as propriedades de ligação dos cátions⁴⁸.

Os grupos lauril, como chamados por Gokel e colaboradores⁴⁹, são caracterizados por um anel macrocíclico do tipo coroa, contendo átomos de carbono ou nitrogênio (preferencialmente)⁵⁰ ligados a um ou mais braços, os quais teriam a função de conter grupos doadores (bases de Lewis) que pudessem de alguma forma se ligar a cátions complexados, promovendo, assim, grupos doadores em adição aos encontrados no próprio macrocíclico.

A palavra lauril vem do espanhol *la reata*, que significa “o laço”, sugerindo sua aparência com modelos moleculares (figura 12). Porém tal conceito é menos satisfatório quando se trata de um macrocíclico ligado a dois “braços”. Neste caso o termo utilizado é *bracchium* do latim, que significa braço. Assim, lauril-éter com dois braços é um “bibracchium lauril éter” ou “BiBLE”.

Na complexação, os átomos doadores do braço lauril se coordenam envolvendo os cátions, resultando assim em uma sobreposição tridimensional (figura 12).

⁴⁹ Schultz, R. A.; Dishong, D. M.; Gokel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 625.

⁵⁰ Dishop, D. M.; Diamond, C. J.; Cinoman, M. J.; Gokel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 586.

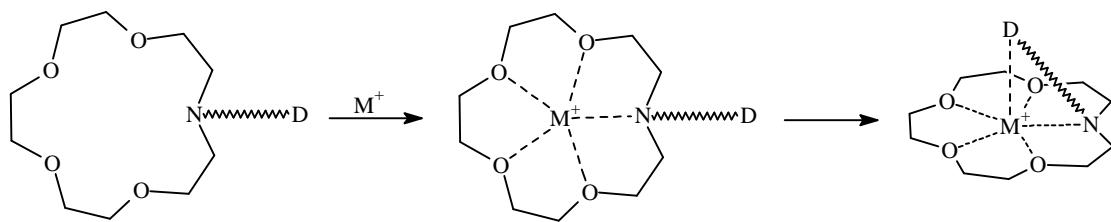


Figura 12 – Esquema do processo de coordenação de cátion (M^+) ao lauril-éter constituído de braço com grupos doadores (D)

Neste processo de complexação de cátion ao lauril-éter, considera-se o primeiro estágio da reação a colisão do cátion com o macrocíclico e consequentemente a coordenação com o mesmo. Não se deve descartar a possibilidade de colisões com os braços, porém, o grande número de doadores presentes no anel, com seu padrão previamente organizado, sugere que as colisões com o anel são mais produtivas. Além do mais, mudanças de conformações nos braços que melhor envolvam o cátion são esperadas, proporcionando uma coordenação segura do cátion. Logo as forças de interação entre o cátion e os átomos doadores no anel devem dominar a estabilidade do complexo devido ao processo de ciclização forçar os átomos doadores do anel a otimizarem a coordenação do íon metal a cavidade. Adicionalmente os braços suficientemente flexíveis podem estabilizar o cátion contido no anel macrocíclico.

Além da rigidez do ligante e da taxa de liberação (processo dinâmico de complexação-descomplexação de cátions), os lauril-éteres apresentam inúmeras vantagens em relação a similares macrocíclicos, das quais podem-se destacar as seguintes:

- Quando envolvidos em complexação, grupos lauril éteres introduzem um efeito quelante adicional ao efeito macrocíclico, crescendo assim, a força de ligação com o íon metálico;
- Os grupos lauril, por serem grupos doadores, podem se coordenar aos íons metálicos complexados, eliminando competições de contra-ânions ou moléculas de solvente, promovendo a estabilização do complexo;
- Inúmeras variantes no grupo lauril (comprimento do braço, rigidez, número e tipos de átomos doadores) permitem uma seletividade adicional para íons.

Os complexos lauril-éteres podem, ainda, apresentar inúmeras vantagens em relação aos complexos de criptatos estáveis⁵¹. Como os criptatos são mais rígidos e “previamente organizados” do que os lauril-éteres, dispõem assim de uma grande força de ligação e seletividade o que faz com que estes complexos apresentem baixíssimas taxas de dissociação, isto é considerado desvantagem quando o ligante é usado em certas aplicações, tais como, membranas de separações, onde a rápida liberação do íon metálico é a fase decisiva. Com a introdução de “grupos lauril” à éteres de coroa monocíclicos é esperado o aumento da força de ligação do íon e a seletividade sobre os monocíclicos sem significativo crescimento na rigidez do ligante.

Os complexos de lauril-éteres apresentam-se como excelentes carreadores de cátion para o transporte através de membrana⁵², capazes de se ligarem seletivamente a um certo cátion e ainda serem capazes de o liberarem rapidamente, mantendo um sistema dinâmico, como o carreador natural já citado anteriormente, o Valinomycina.

Os lauril-éteres e os BiBLE constituem uma importante e crescente classe de éteres de coroa. Com o crescimento do entendimento sobre os fenômenos de complexação, muitas aplicações em tecnologia de sensor, formação de membranas e modelos para estrutura biológica e funcional irão certamente envolver esta classe de estruturas.

COMPLEXOS SUPRAMOLECULARES COM ÍONS LANTANÍDEOS

O “design” de novos complexos de íons lantanídeos, particularmente envolvendo o encapsulamento destes íons a estruturas supramoleculares, oferece a possibilidade da obtenção de compostos com elevada luminescência, estabilidade cinética e termodinâmica. Tais compostos são freqüentemente utilizados em aplicações médicas e clínicas. O desenvolvimento de fluoroimunoensaios homogênicos, baseado em criptatos de lantanídeos, é um ótimo exemplo de geração de

⁵¹ a) Thaler, A.; Bergter, R.; Ossowski, T.; Cox, B. G.; Schneider, H. *Inorg. Chim. Acta* **1999**, 285, 1; b) Zhang, X. X.; Bordunov, A. V.; Bradshaw, J. S.; Dalley, N. K.; Kou, X.; Izatt, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11507.

⁵² Koulov, A. V.; Mahoney, J. M.; Smith, B. D., *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 27.

tecnologia para a sociedade⁵³. Outras aplicações freqüentes para estes sistemas ocorrem em áreas como radioimunoterapia, agente de aumento de contraste em imagem de ressonância e marcadores luminescentes em fluoroimunoensaios, o que amplia, neste trabalho, o interesse no estudo sistemático desta classe de compostos.

Os íons lantanídeos não só apresentam coeficiente de absorção muito baixo na região do UV e visível como também, devido a sua configuração eletrônica, não exibem fortes habilidades de coordenação frente a ligantes convencionais, especialmente em soluções aquosas onde moléculas do solvente competem na ocupação dos sítios de coordenação. Porém certos ligantes em “estruturas supramoleculares” apresentam efeitos cinegéticos, permitindo a síntese de complexos supramoleculares estáveis com íons lantanídeos. Desde meados de 1980, vários estudos⁵⁴ no sentido de melhorar o encapsulamento de íons lantanídeos, onde aspectos como a relação diâmetro da cavidade/ diâmetro do cátion, a natureza do contra-íon, a flexibilidade do ligante e o número de átomos doadores do ligante são importantes na formação de estáveis complexos supramoleculares têm sido desenvolvidos. Dessa forma, em adição a intensa luminescência e longos tempos de vida no estado excitado, apresentados pelos lantanídeos, complexos supramoleculares podem ser usados como sondas espectroscópicas na resolução de uma variedade de problemas químicos e biológicos.

⁵³ a) Mathis, G. *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 1391; b) Mathis, G. *Clin. Chem.* **1993**, *39/9*, 1953.

⁵⁴ a) Bünzli, J.-C. G.; Wessner, D. *Coord. Chem. Rev.* **1984**, *60*, 191; b) Alexander, V. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 273.

IV - PARTE 1: Síntese de macrocíclicos para posteriores tentativas de formação de um rastreador especial

IV.1 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL (PARTE 1)

Metodologia de Caracterização

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) foram registrados no aparelho Varian Unity Plus. Os deslocamentos químicos estão expressos em partes por milhão em relação ao pico residual do padrão interno usado: clorofórmio (7,26 ppm), ou água (4,72 ppm), ou acetona (2,05 ppm), ou metanol (3,31; 4,79 ppm) no caso de espectro de próton. Os deslocamentos químicos estão expressos ainda, em relação ao pico central do: CDCl_3 (77,00 ppm), ou $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (30,50; 205,10 ppm), ou MeOD (49,00 ppm) no caso de espectro de carbono.

Análise Cromatográfica

Purificações através de cromatografia em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (230-400 mesh) [Merck] ou alumina 507 C neutra (100-125 mesh) [FLUKA].⁵⁵

As cromatografias em camada delgada (**CCD**) foram realizadas utilizando-se placas sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) ou placas de alumina 60 F₂₅₄ neutra (Merck). Para visualização dos compostos foram utilizados lâmpada de UV e/ou recipiente contendo cristais de iodo.

As cromatografias gasosas (**CG**) foram realizadas em um aparelho Hewlett Packard 5890 Séries II com detector de ionização de chamas (FID) e detector de condutividade térmica (TCD) e equipado com coluna HP – 5 de 25 m X 0,32 m X 0,52 μm .

⁵⁵ Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1975**, 43, 2923.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (**HPLC**) foram realizadas em um cromatógrafo Schimadzu equipado com duas bombas LC-10AV, detector UV-visível SPD-10AV e integrador SCL-10A. Foram empregadas colunas analíticas RP18 (5 microns, 125 mm x 4,6 mm) e a coluna semipreparativa RP18-E (5 microns, 250 mm x 10,5 mm).

Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros de transmissão na região do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}) foram registrados em um espectrômetro com transformada de Fourier Bruker I modelo FS66. Os compostos analisados foram preparados em forma de pastilhas de KBr prensadas sob vácuo.

Espectroscopia de Massa

Os espectros de massa de baixa resolução (**CG-EM**) foram realizados em um aparelho Finnigan GCQ Mat tipo quadrupolo íon-trap, acoplado a um cromatográfico a gás. Os valores estão descritos em unidades de massa sobre carga (m/e).

Procedimento Geral

A maioria dos reagentes e solventes foi utilizada na sua forma comercial (P. A.) dos fornecedores: Merck, Aldrich, Vetec, Quimex, sem nenhuma purificação prévia.

As seringas e a vidraria empregadas na manipulação de reagentes organometálicos foram secadas em estufa (100°C) e manipuladas sob atmosfera de nitrogênio (balões vedados com septos de borracha).

O THF foi destilado imediatamente antes de seu uso com sódio metálico, sob atmosfera de nitrogênio, utilizando-se benzofenona como indicador.

As temperaturas abaixo de 0°C foram alcançadas misturando, em recipiente isolante, gelo seco com etanol ou acetona.

Os solventes foram evaporados em rotaevaporador Büchi Modelo R-114 ou Büchi Modelo R-134, operando a pressão reduzida e o solvente remanescente foi evaporado utilizando bomba de alto vácuo.

A concentração do reagente *n*-BuLi foi determinada através de sua titulação com isopropanol, utilizando-se 1,10-fenantrolina como indicador.⁵⁶

Procedimento para obtenção de agentes alquilantes (método radicalar)⁵⁷

Adicionou-se quantidades equimolares de ambos materiais de partida (tabela I): do precursor e de N-bromosuccinâmida (NBS, 177,99 g/mol) em tetracloreto de carbono (10ml/1 mmol de reagentes). Uma pequena quantidade do catalisador (AZOBIS) foi acrescentada na reação. Montou-se um sistema de agitação/refluxo com constante irradiação de lâmpada de tungstênio (100W).

A reação foi acompanhada por CCD em sílica utilizando CH₂Cl₂ como eluente. Ao término da reação, fez-se um banho de gelo, a fim de retirar os possíveis excessos dos reagentes, pois o produto é bastante solúvel em CCl₄. Filtrou-se em seguida e o filtrado foi evaporado à pressão reduzida. O produto desejado foi, enfim purificado.

Tabela I - Sumário do procedimento realizado na tentativa de bromação dos compostos (8) e (11)

| Compostos | Precursors | Condições de refluxo | Método de separação/purificação | Método de caracterização |
|-----------|--|----------------------|--|----------------------------|
| (8) | Dietil 2,6-dimetilpiridina-3,5-dicarboxilato, 99% (251,28 g/mol) | 2 horas | Coluna cromatográfica em sílica gel utilizando CHCl ₃ como eluente. | RMN ¹ H e CG-EM |
| (11) | 2-picolina (93,13 g/mol) | 3 horas | Destilação horizontal (40°C, 0,5 mmHg) | CG |

⁵⁶ Watson, S. C.; Eastham, J. F. *J. Organomet. Chem.* **1967**, 9, 165.

⁵⁷ Lehn, J. M.; de Vains, J.-B. R. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2209.

Análises realizadas do produto dietil-2-(bromometil)-6-metilpiridina-3,5-dicarboxilato (9):

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8,74 (s, 1H); 5,00 (s, 2H); 4,46 (q, $J= 6,0$ Hz, 2H, OEt); 4,43 (q, $J= 6,0$ Hz, 2H, OEt); 2,87 (s, 3H); 1,46 (t, $J= 6,0$ Hz, 3H, OEt); 1,44(t, $J= 6,0$ Hz, 3H, OEt), **CG-EM, m/z (int. rel.):** 251 (M, 22), 250 (100), 222 (90), 194 (49).

Tentativa de alquilação⁵⁸ do macrocíclico (1) com o dietil-2-(bromometil)-6-metilpiridina-3,5-dicarboxilato (9)

A um balão de 100 mL contendo uma mistura do macrocíclico (0,4 mmol; 105,26 mg) previamente dissolvido em 40 mL de acetonitrila (recentemente destilada) com 1 mmol de K_2CO_3 , foi adicionado sob atmosfera de N_2 , dietil 2-(bromometil)-6-metilpiridina-3,5-dicarboxilato (0,2 mmol; 66 mg) em 10 mL de acetonitrila. A mistura foi refluxada durante 20 horas e a reação foi acompanhada por GC. A solução resultante foi filtrada, e o filtrado foi evaporado à pressão reduzida e o produto desejado foi purificado por coluna cromatográfica em alumina utilizando uma mistura de metanol/diclorometano para levar ao 1,4,10,13-tetraoxo-7,16-diazaciclooctadecano-N-dietil-2,6-dimetilpiridina-3,5-dicarboxilato (10).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 8,47 (s, 1H, C6); 5,25 (s, 2H, C16); 4,40 (q, $J= 7,2$ Hz, 2H, OEt, C2 ou C10); 4,39 (q, $J= 7,2$ Hz, 2H, OEt, C2 ou C10); 4,06 (s, NH); 3,72-3,54 (m, 16H, C19, C21, C22, C24); 2,93-2,86 (m, 8H, C18 e C25); 2,84 (s, 3H, C13); 1,42 (t, $J= 7,2$ Hz, 3H, C1 ou C11); 1,41 (t, $J= 7,2$ Hz, 3H, C1 ou C11), **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):** δ 14,13 (C1 ou C11); 14,30 (C1 ou C11); 24,93 (C13); 29,69 (C16); 49,01 (C25); 53,75 (C18); 61,46 (C2 ou C10); 61,53 (C2 ou C10); 68,84 (C19); 69,27 (C21); 69,49 (C22); 70,49 (C24); 123,53 (C7 ou C5); 125,31 (C7 ou C5); 139,90 (C6); 160,88 (C4 ou C8); 162,36 (C4 ou C8); 165,92 (C12 ou C15); 166,74 (C12 ou C15).

⁵⁸ Li, C.; Wong, W. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3217.

Tentativa de obtenção do agente alquilante 2-bromometil-6-cloropiridina (15) (redução e bromação)

Etapa I: Reação de redução do metil 6-cloropiridina-2-carboxilato (13):

Em um balão de duas bocas de 250 mL, adicionou-se metil-6-cloropiridina-2-carboxilato (20 mmol, 3,43 g) e THF (100 mL) sob atmosfera de N₂. A solução foi resfriada a 0 °C e sobre agitação, foram adicionados lentamente LiAlH₄ (10 mmol, 12 mL de uma solução 1M). A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 24 hora e a reação monitorada por CCD em sílica utilizando mistura de acetato de etila/ciclohexano (1:1). Ao término deste período, foram adicionados 8 mL de uma solução saturada de NH₄Cl. O produto da reação foi extraído com éter etílico e a fase orgânica lavada com água (3 x 100 mL). A fase orgânica foi então separada e secada com Na₂SO₄. Filtrou-se e o filtrado foi evaporado à pressão reduzida.

Dois métodos de purificação do produto (6-cloropiridina-2-il)metanol (14) foram testados: coluna cromatográfica em sílica gel utilizando uma mistura cicloexano/acetato de etila e destilação horizontal (100 °C, 0,5 mmHg).

RMN ¹H(300MHz, CDCl₃): δ 7,66 (t, J= 7,5 Hz, 1H); 7,29 (d, J= 6,0 Hz, 1H); 7,22 (d, J= 6,0 Hz, 1H); 4,74 (s, 2H); 3,80 (s, OH), **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃):** δ 64,21; 119,07; 122,80; 139,48; 150,61; 161,01, **IV (filme KBr):** 3356, 1588, 1565, 1439, 1416, 1159, 1139, 787 cm⁻¹, **CG-EM, m/z (int. rel.):** 143 (M, 100), 144 (M+1, 8), 145 (M+2, 31).

Devido a pesquena quantidade de produto purificado (14), não foi realizada a segunda etapa da reação.

Tentativas de aquilação do 3-bromopropanoato de etila (16) ao macrocíclico (1)

Método I:

Em um balão de 5 mL adicionou-se o macrocíclico (0,11 mmol; 30 mg) em 2 mL de acetonitrila em constante agitação, logo em seguida 3-bromopropanoato de etila (0,06 mmol, 7,28 μ L) foi adicionado a solução. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 3 dias. A reação foi acompanhada por CCD em sílica utilizando metanol com eluente e ao término da reação o solvente foi evaporado a pressão reduzida. Uma tentativa de purificação utilizando parte do produto obtido foi realizada usando coluna cromatográfica em sílica, utilizando metanol como eluente. O produto da reação ficou retido na coluna. Desse modo, a análise RMN 1 H foi realizada do produto bruto obtido.

Método II⁵⁹:

Em um balão de 10 mL contendo 5 mL de acetonitrila foram adicionados os seguintes reagentes: macrocíclico (0,11 mmol; 30 mg), 3-bromopropanoato de etila (0,09 mmol; 11,66 μ L), K_2CO_3 (1,53 mmol; 211,28 mg) e iodeto de potássio (0,004 mmol; 0,59 mg). A mistura agitada à temperatura ambiente por 18 horas e então refluxada por mais 8 horas. A solução resultante foi evaporada a pressão reduzida. Foram realizadas duas tentativas de purificação do produto: por recristalização em hexano e por coluna cromatografia em alumina utilizando mistura de MeOH/CH₂Cl₂ como eluente. Não foi possível isolar o produto da reação.

Análises de CG e RMN 1 H foram realizadas das frações obtidas.

Método III⁵⁹:

Em um balão de 25 mL contendo 20 mL de acetonitrila foram adicionados os seguintes reagentes: macrocíclico (0,11 mmol; 30 mg), 3-bromopropanoato de etila (0,09 mmol; 11,66 μ L), K_2CO_3 (1,53 mmol; 211,28 mg) e iodeto de potássio (0,004 mmol; 0,59 mg). A mistura foi agitada durante 20 dias sob refluxo e a reação foi acompanhada por HPLC, sendo observada somente a decomposição do macrocíclico na coluna. Desse modo, a reação foi monitorada por cromatografia em

⁵⁹ Medina, J. C.; Lynn, B. C.; Rojas, M. T.; Gokel, G. W.; Kaifer, A. E. *Supramol. Chem.*. **1993**, *1*, 145.

camada delgada em sílica utilizando mistura de MeOH/CH₂Cl₂ como eluente. Não foi observada a formação do produto.

Método IV⁵⁹:

Em um balão de 10 mL contendo 5 mL de butironitrila foram adicionados os seguintes reagentes: macrocíclico (0,11 mmol; 30 mg), 3-bromopropanoato de etila recentemente destilado (0,09 mmol; 11,66 µl), K₂CO₃ (1,53 mmol; 211,28 mg) e iodeto de potássio (0,004 mmol; 0,59 mg). A mistura foi submetida a refluxo por 5 dias. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada em alumina utilizando mistura de MeOH/CH₂Cl₂ como eluente. Não foi observada a formação do produto.

Método V:

Em um balão de duas bocas sob atmosfera de N₂ foi adicionado macrocíclico (0,12 mmol; 32 mg) em 2 mL de THF. A solução foi resfriada a -72°C e sob agitação foi adicionado lentamente *n*-BuLi⁵⁶ (0,25 mmol; 0,30 mL de uma solução 0,80 M). Após 10 min de agitação, adicionou-se à mistura 3-bromopropanoato de etila destilado (0,12 mmol; 16 µl). A solução resultante foi agitada a temperatura ambiente por 22 horas e a reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. A solução foi, então, evaporada a pressão reduzida e o sólido resultante foi dissolvido em metanol, filtrado e novamente evaporado a pressão reduzida. Não foi observada a formação do produto através de análises posteriores de RMN ¹H.

Método VI⁵⁸:

Em um balão de 250 mL adicionou-se macrocíclico (1 mmol; 262,35 mg) e K₂CO₃ (2,5 mmol; 345,53 mg) em 125 mL de acetonitrila. A esta mistura, sob atmosfera de N₂, foi adicionado 3-bromopropanoato de etila, recentemente destilado (0,89 mmol; 114 µl). A solução resultante foi então submetida à 62 horas de refluxo. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada em sílica, utilizando mistura de MeOH/CH₂Cl₂ e por GC. A solução resultante foi filtrada e o filtrado evaporado a pressão reduzida. O espectro de RMN ¹H não correspondeu ao produto desejado.

Método VII⁶⁰ - síntese do 1,4,10,13-tetraoxo-7,16-diazaciclooctadecano-N,N'-propanoato de etila (18).

Em um balão de 100 mL adicionou-se macrocíclico (1 mmol; 262,35 mg) e trietyl-amina (2,21 mmol; 160 μ L) em 50 mL de acetonitrila. Após 15 minutos de agitação, foi adicionado o 3-bromopropanoato de etila destilado (1,06 mmol; 135 μ L). A mistura foi submetida à agitação a temperatura ambiente por 18 horas e refluxo por mais 36 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada em sílica utilizando-se uma mistura acetato de etila/álcool etílico 1:1. A solução resultante foi evaporada a pressão reduzida, obtendo-se um sólido amarelo heterogêneo que foi, então, sublimado para levar ao produto di-substituído (18) em baixo rendimento.

RMN 1 H (300 MHz, CDCl₃): δ 4,13 (q, J = 7,0 Hz, 4H, C2); 3,64-3,59 (m, 16H, C9 e C11); 2,89 (t, J = 7,5 Hz, 4H, C5); 2,82-2,76 (m, 8H, C8); 2,47 (t, J = 7,5 Hz, 4H, C6); 1,26 (t, J = 7,0 Hz, 6H, C1)

Tentativa de hidrogenação da acrilamida⁶¹

Em um balão de 500 mL sob atmosfera de N₂ foram adicionados acrilamida (33,08 mmol; 2,35g) e 400 mL de KOH (85%) a mistura foi submetida a refluxo e agitação durante 15 horas e em seguida, foi adicionado HCl (37%) até pH 5. A solução resultante foi filtrada em filtro de placa porosa e o produto da reação foi extraído com diclorometano (2 x 100 mL) e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl. A fase orgânica separada foi, então, evaporada à pressão reduzida. Obteve-se um produto viscoso, característico da reação de polimerização do ácido acrílico.

⁶⁰ a) Kim, J. S.; Shon, O. J.; Ko, J. W.; Cho, M. H.; Yu, Y.; Vicens, J. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2386; b) Kele, P.; Orbulescu, J.; Calhoun, T. L.; Gawley, R. E.; Leblanc, R. M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4413; c) Beer, P. D.; Dent, S. W.; Fletcher, N. C. *Polyhedron* **1996**, 15, 2983.

⁶¹ Tanner, D. D.; Osman S. A. A. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4689.

Tentativa de adição do macrocíclico (1) a acrilamida

Em um balão de duas bocas de 25 mL, sob atmosfera de N₂, foram adicionados macrocíclico (0,06 mmol; 16 mg) e acrilamida (1 mmol; 106 mg) em 6 mL de acetonitrila. A mistura foi submetida a refluxo e agitação por 24 horas e acompanhada por CG. Através da análise de RMN ¹H não foi observada a formação do produto desejado.

Procedimento⁶² para síntese do 1,4,10,13-tetraoxo-7,16-diazaciclooctadecano-N,N'-propanoato de metila (19)

A um balão de 25 mL contendo acrilato de metila (183,87 mmol; 17 mL) foi adicionado, sob atmosfera de N₂, o macrocíclico (1,91 mmol; 500mg). A mistura foi submetida a refluxo e agitação por 24 horas. A reação foi acompanhada por CCD em sílica utilizando uma mistura de MeOH:CH₂Cl₂ (1:1), como eluente. O excesso de acrilato de metila foi então separado do produto desejado (19) sob vácuo (0,5 mmHg), utilizando-se um *trap* intermediário, resfriado com gelo seco e acetona (-78°C).

RMN ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ 3,62 (s, 6H, C1); 3,57-3,53 (m, 16H, C8 e C10); 2,83 (t, J= 6,0 Hz, 4H, C4); 2,74 (t, J= 6,0 Hz, 8H, C7); 2,44 (t, J= 6,0 Hz, 4H, C5), **RMN ¹H (300 MHz, D₂O):** δ 3,70 (s, 6H); 3,69-3,64 (m, 16H); 2,93-2,85 (m, 4H); 2,81-2,74 (m, 8H); 2,60-2,53 (m, 4H), **RMN ¹³C (75 MHz, (CD₃)₂CO):** δ 34,15 (C5); 52,16 (C4); 52,51 (C7); 55,57 (C1); 71,44 (C8); 72,04(C10); 173,93 (C3), **IV (filme KBr):** 2877, 1732, 1439, 1353, 1200, 1105 cm⁻¹.

Tentativas de hidrólise do composto (19)

➤ Inúmeras tentativas de hidrólise foram realizadas, utilizando-se de muitas variantes na reação entre o BiBLE (19) e hidróxido de potássio em metanol:

⁶² Takagi, M.; Tazaki, M.; Ueno, K. *Chemistry Lett.* **1978**, 1179.

Método I:

Em um balão, contendo uma solução do macrocíclico (0,15 mmol; 67 mg) em metanol (3 mL) e resfriado a 0 °C, foram adicionadas pequenas porções (aproximadamente 100 mg) de KOH, previamente macerado. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 1 hora e a solução resultante foi filtrada em filtro de placa porosa contendo uma camada de Celite, secada com MgSO₄ e novamente filtrada, sendo o solvente evaporado a pressão reduzida. Foram feitas duas tentativas de purificação: coluna cromatográfica em sílica, utilizando uma mistura MeOH:CH₂Cl₂ (7:3) como eluente e tentativa de recristalização em H₂O ou MeOH.

Método II⁶²:

Em um balão contendo uma solução do macrocíclico (0,10 mmol; 43,4 mg) em metanol (2 mL) e resfriado a 0 °C, foram adicionadas pequenas porções (aproximadamente 100 mg) de KOH, previamente macerado. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 2 horas e em seguida adicionou-se lentamente HCl (37 %) até pH 7. A solução resultante foi, então, filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida.

Método III⁶²

Em um balão adicionou-se macrocíclico (1,04 mmol; 450 mg) em 7 mL de metanol. A solução foi resfriada a 0 °C e sobre agitação e foi adicionado grande excesso de KOH. A mistura foi submetida à agitação a temperatura ambiente por 4 horas. À solução resultante foram adicionados 15 mL de metanol e novamente resfriada a 0°C para adição de HCl (37 %) até pH 3. A mistura foi filtrada e o filtrado evaporado a pressão reduzida.

As análises de RMN ¹H e RMN ¹³C e evidenciaram a presença do material de partida e do produto desejado. Resolveu-se então, acrescentar ao produto, dissolvido em D₂O, 4 mL de metanol e KOH (excesso). A mistura foi agitada a temperatura ambiente durante 4 dias. À solução resultante, foram acrescentados 15 mL de metanol e novamente adicionado HCl (37 %) até pH 3. A solução resultante foi filtrada (papel de filtro) e o filtrado evaporado a pressão reduzida.

➤ Tentativas de hidrólise do composto (19) utilizando-se hidróxido de lítio ou hidróxido de sódio foram realizadas. Um grande excesso (> 100%) dos hidróxidos foi necessário, submetendo o sistema resultante a agitação por vários dias.

Observação:

Todas as tentativas de hidrólise foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica, utilizando uma mistura de MeOH:CH₂Cl₂ (1:1), como eluente.

IV.2 - RESULTADOS E DISCUSSÕES (PARTE 1)

Dentro da química supramolecular, pode-se destacar a classe de precursores derivados de diaza-éteres de coroa, mais precisamente a síntese de lauril-éteres e BiBLE, os quais vêm sendo exaustivamente estudados⁶³. Em grande parte destas sínteses, os átomos de N são substituídos antes do macrocíclico ser formado, usualmente por grupos alquila ou sulfonas⁶⁴. Estudos mostram, ainda, maior eficiência na complexação quando os cátions são adicionados durante a ciclização do macro (efeito templante do metal)^{54b)}.

Apesar da síntese de BiBLE ser mais prática a partir de precursores acíclicos, dificuldades experimentais e de manipulação na formação do macrocíclico (1) com “braços” pendentes (CH₂COOEt ou CH₂COOH) são relatadas,⁶⁵ tornando mais vantajoso a síntese desses lauril-éteres, como também BiBLE a partir de alquilações ou acetilações diretas ao macrocíclico (1).

Este capítulo descreve as tentativas de formação de lauril-éteres e BiBLE (associados a braços de anéis cromóforos ou a compostos acíclicos com grupos

⁶³ a) Bradshaw, J. S.; Krakowiak, K. E.; An, H.; Izatt, R. M. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 1163; b) White, B. D.; Fronczek, F. R.; Gandour, R. D.; Gokel, G. W. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1753; c) White, B. D.; Arnold, K. A.; Gokel, G. W. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1749; d) Hancock, R. D.; Bhavan, R.; Wade, P. W.; Boeyens, J. C. A.; Dobson, S. M. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 187.

⁶⁴ Bradshaw, J. S.; Stott, P. E. *Tetrahedron Report* **1980**, *36*, 461.

⁶⁵ Gatto, V. J.; Gokel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8240.

carboxílicos) a partir do precursor macrocíclico (1), os quais serão utilizados na complexação de íons lantanídeos.

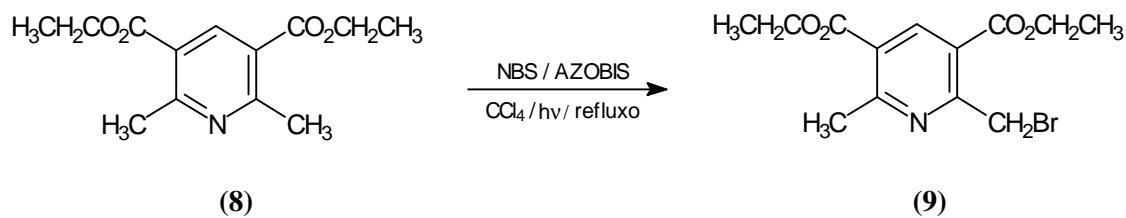
O encapsulamento de íons Ln(III) a macrocíclicos do tipo diaza-éteres de coroa mostra-se bastante eficiente para toda a serie de lantanídeos^{54a), 66} O macrocíclico (1) oferece tamanho compatível com o raio iônico de íons trivalentes, por exemplo, Eu^{+3} e Am^{+3} , podendo formar complexos estáveis.⁶⁷

IV.2.1 - REAÇÕES DE ALQUILAÇÃO DO MACROCÍCLICO (1) COM HALETOS ORGÂNICOS

A primeira estratégia utilizada consistiu na alquilação do macrocíclico (1). Para isso, foi necessária a síntese do agente alquilante (9).

O brometo desejado (9) foi obtido através de uma reação análoga a um procedimento já bastante conhecido, baseado na bromação de compostos piridínicos substituídos, cujos rendimentos variam de acordo com a espécie reagente⁵⁷.

ESQUEMA 1



A reação foi monitorada por CCD e após 2 horas levou ao produto desejado (9). Embora se tenha utilizado quantidades equimolares dos materiais de partida, foi observada a formação de vários produtos. Este fato pode ser explicado pela reação consistir de um método radicalar, podendo com isso resultar na formação de uma mistura de produtos mono e polihalogenados. A posterior purificação em cromatografia em sílica gel levou ao produto desejado em um rendimento de 36%, o

⁶⁶ Galaup, C.; Carrié, M-C; Azéma, J.; Picard, C. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1573.

⁶⁷ Manchanda, V. K.; Mohapatra, P. K, *Polyhedron* **1990**, 9, 2455.

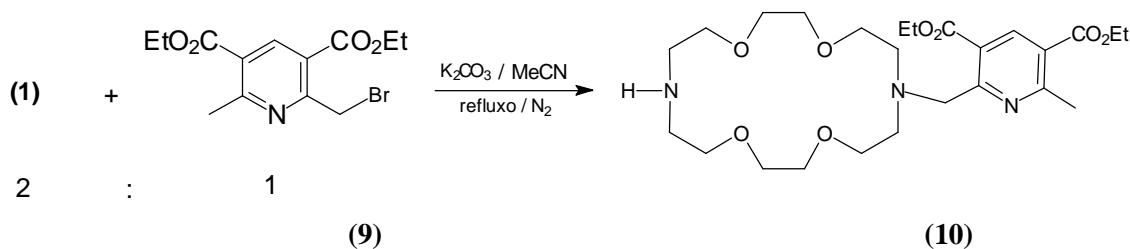
qual foi caracterizado através de RMN ^1H e CG-EM, sendo observada a presença de uma pequena quantidade de contaminantes de difícil identificação e consequente separação do produto.

Tentativas de alquilação do macrocíclico (1) com o brometo (9)

Evidências na literatura⁵¹ mostram o aumento da estabilidade de cátions coordenados ao macrocíclico (1) quando conectados a braços constituídos de anéis cromóforos. Contudo estudos do macrocíclico (1) complexado a íons prata^{51a} mostram o aumento da estabilidade do complexo quando conectado a um braço cromóforo ($\text{CH}_2\text{-Bipy}$). Quando o complexo é bi-funcionalizado há uma perda na estabilidade, possivelmente devido a impedimento estéricos. Dessa forma foi proposta a síntese mono-alquilada do macrocíclico (1) com o brometo (9) preparado anteriormente (Esquema 1).

A provável estabilidade de lauril-éter de coroa associado a braços cromóforos, quando coordenados a íons lantanídeos, promovem estes complexos a dispositivos molecular conversores de luz (DMCL), podendo ainda ser explorado o efeito antena de seus cromóforos⁶⁸.

ESQUEMA 2



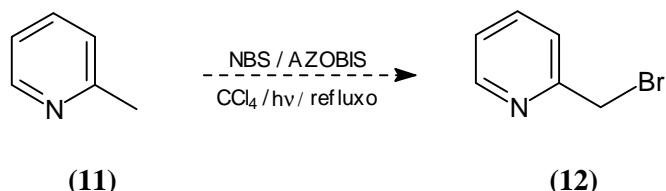
Em substituição a métodos de alquilação que envolvem várias etapas de reação (proteção, mono-funcionalização e conseguinte desproteção), a reação de mono N-alquilação seletiva de macrocíclicos é possível a partir da utilização de um excesso do macrocíclico num sistema $\text{MeCN}/\text{K}_2\text{CO}_3$ a qual leva aos produtos desejados em bons rendimentos⁵⁸. A alquilação direta do macrocíclico (1) com o agente alquilante (9), previamente sintetizado, utilizando esta metodologia levou ao produto monoalquilado (10) em baixo rendimento, após purificação em coluna cromatográfica.

⁶⁸ Lehn, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1304

O produto foi caracterizado através de análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C , onde observou-se a presença de contaminantes, provenientes do material de partida (9), os quais mostraram-se de difícil separação através dos métodos de purificação usuais.

Na tentativa de simplificar a reação de alquilação anterior (Esquema 2), propôs-se a utilização de um agente alquilante mais simples e menos impedido, constituído de poucos grupos funcionais. Como no laboratório havia a disponibilidade do composto (11) fez-se novamente necessário a bromação utilizando-se procedimento análogo ao Esquema 1.

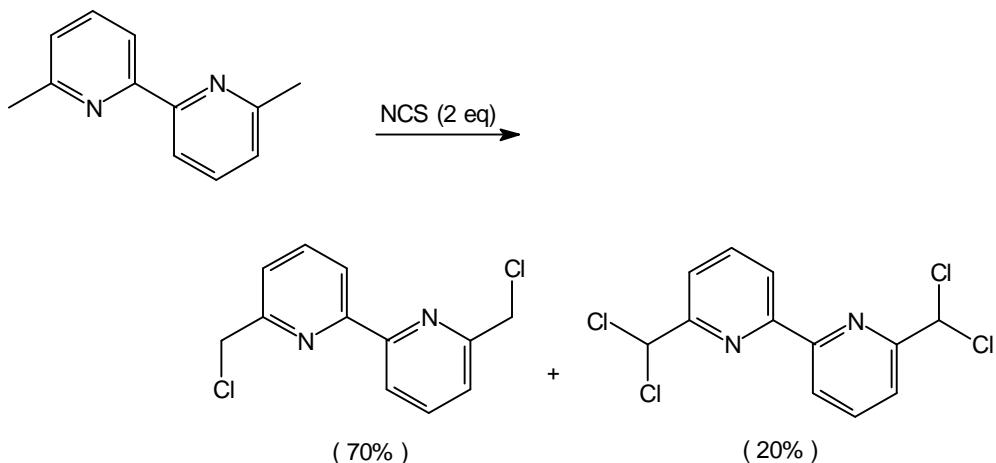
ESQUEMA 3



O acompanhamento da reação por cromatografia em camada delgada mostrou o desaparecimento do material de partida com consequente formação de vários produtos. As tentativas de purificação do produto desejado (12), através de destilação não foram bem sucedidas, possivelmente devido ao produto obtido ser constituído de uma mistura de compostos halogenados. Esse fato foi posteriormente confirmado através de comparação com dados da literatura,⁶⁹ onde uma reação análoga foi realizada (Esquema 4).

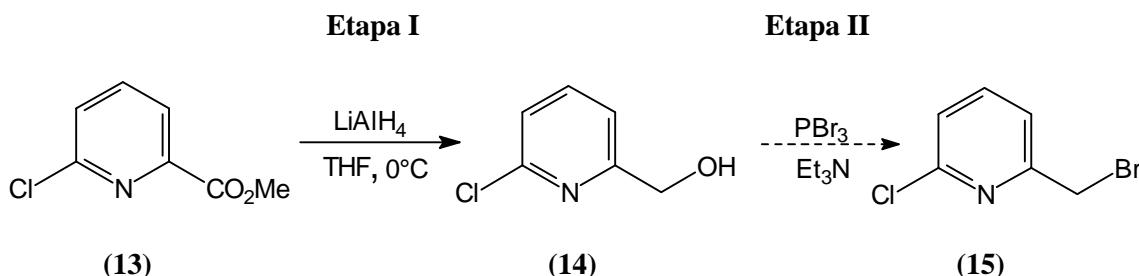
⁶⁹ Newkome, G. R.; Kiefer, G. E.; Puckett, W. E.; Vreeland, T. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 5112.

ESQUEMA 4



Devido aos resultados insatisfatórios obtidos na tentativa de bromação por método radicalar, uma outra metodologia foi proposta, a partir do composto (13). A seguinte estratégia de síntese (redução e substituição) foi sugerida:

ESQUEMA 5



A redução de ésteres álcoois primários é um processo bastante usual no qual utiliza-se geralmente LiAlH_4 ou LiBH_4 como agentes redutores.

A reação de redução do composto (13) foi realizada em THF utilizando-se LiAlH_4 . Após 24 horas de agitação, foi possível observar, através do acompanhamento por CCD, a formação de vários produtos. A hidrólise da mistura reacional e posterior purificação em cromatografia em sílica gel levou ao produto desejado (14) em baixo rendimento. Posteiros tentativas de purificação por destilação horizontal não foram bem sucedidas.

Devido ao baixo rendimento obtido, não foi possível a continuidade da segunda etapa da reação (bromação) para a formação do agente alquilante (15).

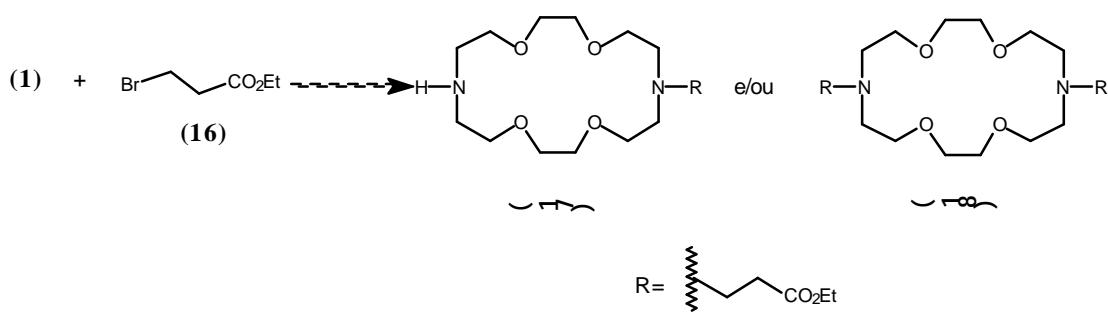
O fato da seletividade de cátions coordenados a macrocíclicos poder ser atribuída somente a relação tamanho do íon/cavidade, constitui uma idéia simplória.⁷⁰ A presença de braços alifáticos constituídos de grupos carboxílicos em um macrocíclico (diaza-éter de coroa) provoca aumento na estabilidade dos complexos coordenados, principalmente de cátions grandes^{63d), 54b)} Tais grupos oferecem solvatação adicional à complexação, dispondo o cátion num arranjo tridimensional⁷¹.

A síntese de lauril-éteres de coroa, formados de braços alifáticos com grupos carboxílicos, era um dos objetivos do trabalho para a posterior coordenação com íons lantanídeos (Yb^{3+} e Er^{3+}), na tentativa de utilização em dispositivos de *up-conversion*. Além disso, a síntese de BiBLE, associados a grupos carboxílicos, também era objetivada para posterior coordenação a íons Eu^{3+} , afim de estudar o comportamento luminescente destes complexos, frente a diferentes contra-íons.

Dessa forma várias tentativas de aquilação de agentes alifáticos carboxílicos ao macrocíclico (1) foram realizadas.

Tentativas de aquilação do macrocíclico (1) com o brometo (16)

ESQUEMA 6



Na tentativa de aquilação do macrocíclico (1) com o brometo (16) inúmeras metodologias foram realizadas variando-se as condições da reação, como também os

⁷⁰ Gokel, G. W.; Goli, D. M.; Minganti, C.; Echegoyen, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6786

⁷¹ Arnold, K. A.; Echegoyen, L.; Fronczek, F. R.; Gandour, R. D.; Gatto, V. J.; White, B. D.; Gokel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3716.

métodos de purificação do produto desejado da mistura reacional, ambos descritos na tabela II a seguir:

Tabela II: Sumário das tentativas de alquilação do brometo (16) ao macrocíclico (1)

| Reação | Condições | Método de purificação | Rendimento |
|--------------------------|--|---|------------|
| Método I | em MeCN agitação (3 d) | Cromatografia em sílica | — |
| Método II ⁵⁹ | K ₂ CO ₃ /KI em MeCN Agitação (18 h) refluxo (8 h) | Recristalização em hexano e cromatografia em alumina | — |
| Método III ⁵⁹ | K ₂ CO ₃ /KI em MeCN Refluxo (20 d) | — | — |
| Método IV ⁵⁹ | K ₂ CO ₃ /KI em ButCN, refluxo (5 d) | — | — |
| Método V | THF, N ₂ / <i>n</i> -BuLi Agitação (22 h) | — | — |
| Método VI ⁵⁸ | K ₂ CO ₃ /N ₂ em MeCN refluxo (62 h) | — | — |
| Método VII ⁶⁰ | Et ₃ N em MeCN agitação (18 h) Refluxo (3 d) | Sublimado | baixo |

Na tentativa de alquilação em acetonitrila (Método I) observou-se, através de CCD o desaparecimento dos materiais de partida. A fim de separar o suposto produto do excesso do macrocíclico (1) realizou-se coluna cromatográfica em sílica gel, porém o produto ficou retido na coluna. Posteriores tentativas de separação (Método II) por recristalização e coluna cromatográfica em alumina, também fracassaram, não sendo possível o isolamento do produto da reação.

Embora tenham-se utilizado reagentes e metodologias equivalentes a literatura⁵⁹, as tentativas de alquilação utilizando os métodos de II à IV não foram bem sucedidas. No método IV utilizou-se exatamente a metodologia da literatura.

No método V, a alquilação foi realizada utilizando-se uma base mais reativa, o composto organometálico *n*-BuLi, porém não foi observada a formação do produto desejado através de análises de RMN ¹H da mistura reacional.

Metodologias análogas de mono N-alquilações descritas na literatura⁵⁸, as quais levam aos produtos desejados em bons rendimentos (método VI), também foram realizadas, no entanto, os resultados não foram reproduzíveis.

Em um dos casos, fez-se a reação (Método VII)⁶⁰ do macrociclo (5) com o agente alquilante (16) utilizando trietilamina como base. O acompanhamento da reação por CCD mostrou o desaparecimento dos materiais de partida e a posterior purificação por sublimação levou ao produto di-substituído (18) em baixo rendimento, o qual foi caracterizado através de RMN ¹H.

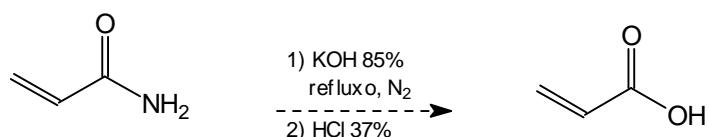
Embora as reações de alquilação de compostos macrocíclicos do tipo diazateres de coroa serem bastante conhecidas e descritas na literatura, com altos rendimentos, exaustivas tentativas de alquilação do macrocíclico (1) descritas neste trabalho apresentaram dificuldades experimentais e de difícil purificação dos produtos desejados. O composto 1,4,10,13-tetraoxo-7,16-diazaciclooctadecano-N,N'-propanoato de etila (18) e o composto 1,4,10,13-tetraoxo-7,16-diazaciclooctadecano-N-dietil-2,6-dimetilpiridina-3,5-dicarboxilato (10) foram obtidos em baixos rendimentos.

Devido aos resultados insatisfatórios obtidos na tentativa de formação de lauril-éteres e BiBLE a partir da reação de alquilação do macrocíclico (1) com halogenetos, uma segunda estratégia sintética baseada na adição nucleofílica do macrocíclico a acrilatos foi proposta.

IV.2.2 - REAÇÕES DE ADIÇÃO NUCLEOFÍLICA DO MACROCÍCLICO (1) À ACRILATOS

A primeira tentativa de reação consistiu na adição do tipo Michael do macrocíclico (1) ao ácido acrílico, o qual poderia ser obtido a partir da hidrólise da acrilamida⁶¹, disponível no laboratório (Esquema 7).

ESQUEMA 7

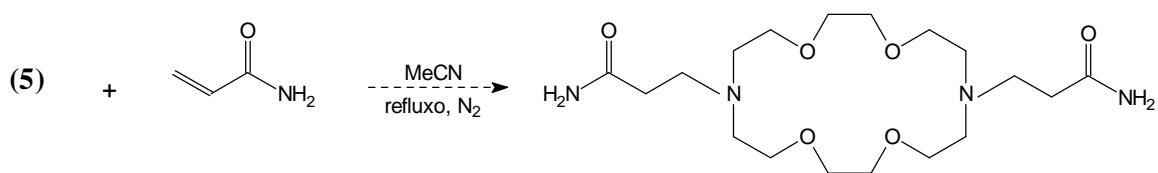


A tentativa de hidrólise da acrilamida, no entanto, produziu um produto viscoso, característico da reação de polimerização do ácido acrílico. O espectro de RMN ¹H não correspondeu ao produto desejado.

Devido ao resultado insatisfatório obtido na tentativa de formação do ácido acrílico a partir da acrilamida, propôs-se a adição direta do macrocíclico (1) a acrilamida (Esquema 8). Uma etapa posterior de hidrólise levaria ao produto desejado.

Tentativa de adição do macrocíclico (1) a acrilamida

ESQUEMA 8



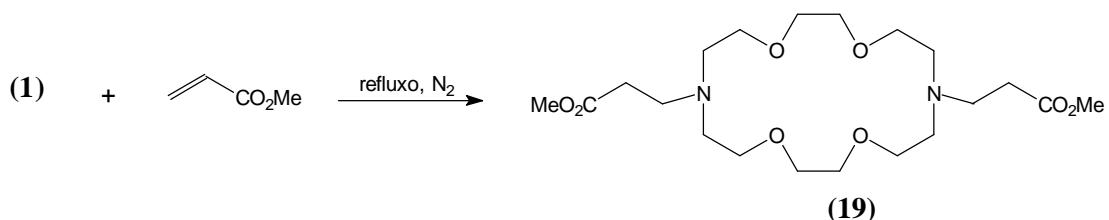
A reação foi monitorada através de GC, e após 24 horas de refluxo, a análise de RMN ¹H constatou predominantemente a presença dos materiais de partida. Esse fato pode ser explicado pela baixa reatividade de amidas em reações de adição de Michael⁷².

⁷² Kamimura, A.; Murakami, N.; Yokota, K.; Shirai, M.; Okamoto, H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7521.

Devido aos resultados insatisfatórios utilizando-se acrilamida, foi proposta a adição do macrocíclico (1) a um acrilato mais reativo (acrilato de metila), porém de menor disponibilidade no laboratório.

Adição do macrocíclico (1) ao acrilato de metila

ESQUEMA 9



Utilizando-se metodologia análoga a literatura⁶², fez-se o uso de excesso do acrilato de metila. O acompanhamento por CCD em sílica mostrou a formação do produto (19) após 24 horas de refluxo. O excesso de acrilato de metila foi então removido sob vácuo (aproximadamente 0.5 mmHg) utilizando-se um *trap* intermediário resfriado à -78°C, sendo possível a purificação do produto (19) em rendimento de 67%, o qual foi caracterizado através de RMN ¹H, RMN ¹³C e IV.

Dessa forma as reações de adição nucleofílica do macrocíclico (1) a acrilatos mostraram-se mais eficientes quando comparadas às tentativas de formação de lauril-éteres e BiBLE a partir de alquilações. Embora os acrilatos exijam certos cuidados no manuseio de suas reações (atmosfera inerte, temperatura e luminosidade brandas) devido a serem relativamente instáveis e de fácil polimerização, a reação de formação do BiBLE (19) a partir da adição de Michael, mostrou-se bastante eficiente, pois em apenas uma etapa (sem necessidade de adição de bases) foi possível a obtenção do produto desejado em rendimento razoável, em uma reação limpa, sem a necessidade posterior de purificação, necessitando apenas a separação do excesso de acrilato do produto reacional.

A coordenação de cátions a lauril-éteres, como também a BiBLE constituídos de braços com **ânions carboxilatos** pode-se dar da seguinte maneira: o cátion complexado aos grupos doadores encontrados no macrocíclico se coordena aos ânions

carboxilatos, alcançando a eletroneutralidade dentro do complexo, eliminando, dessa forma, competições de contra-ânions ou moléculas de solvente, promovendo a estabilização do mesmo. Além disso, os ânions carboxilatos possuem uma afinidade intrínseca por ácidos duros, como Ca^+ ou Ln^{3+} . Vários estudos comprovam a maior estabilidade de complexos de lauril-éteres, como também BiBLE contendo ânions carboxilatos, quando comparados a complexos de éteres de coroa similares (efeito quelante).⁷³

É esperada assim, que a coordenação de cátions ao BiBLE formado (19) seja menos eficiente quando comparado com o derivado ácido (obtido a partir de sua hidrólise). Dessa forma no intuito de observar tal comportamento, foi proposto primeiramente um estudo da eficiência do composto (19) na coordenação de cátions, mais especificamente íons lantanídeos, através de análises de RMN ^1H . Uma possível coordenação resultaria na variação do ambiente químico dos prótons do macrocíclico, facilmente detectável pela análise do espectro.

A primeira tentativa consistiu na análise da suposta coordenação do íon potássio, quando uma relação estequiométrica do composto (19) e KCl foram misturadas, seguido da obtenção do espectro (figura 13).

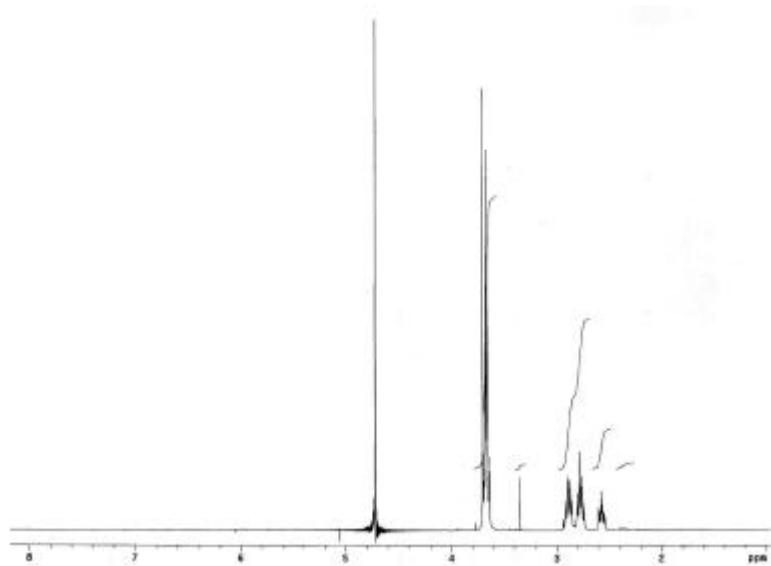


Figura 13 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da mistura do composto (19) com cloreto de potássio em D_2O (25°C)

⁷³ a) Izatt, R. M.; Bradshaw, J. S.; Nielsen, S. A.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J., *Chem. Rev.*, 85, **1985**, 271; b) Izatt, R. M.; Pawlak, K.; Bradshaw, J. S.; Bruening, R. L., *Chem. Rev.*, 91, **1991**, 1721.

Na literatura⁷¹ há relatos de complexos de lauril-éteres e também BiBLE similares, relativamente estáveis na coordenação com íons potássio. Os macrocíclicos do tipo éteres de coroa são usados como eficientes catalizadores na hidrólise de ésteres estericamente impedidos, devido a sua elevada capacidade de coordenação de íons K^+ tornando os ânions (OH^-) “desprotegidos” e consequentemente muito reativos em reações de hidrólise⁴⁰.

Não foi possível observar mudanças significativas no espectro do suposto complexo formado com íons K^+ , quando comparado ao composto “livre” (19). Desse modo, um estudo alternativo, baseado na variação do **tempo de relaxação** dos prótons do composto (19) na presença e na ausência do cátion (livre e coordenado), foi proposto e realizado com a ajuda do aluno de doutorado Fernando Hallwass.

➤ **Tempo de Relaxação (T_1)⁷⁴**

As medidas dos tempos de relaxação (T_1) dos núcleos fornecem dados importantes sobre a estrutura e a dinâmica molecular, podendo ser útil, por exemplo, na atribuição dos sinais de RMN e na determinação da dinâmica molecular do sistema como um todo ou somente de segmentos moleculares.

Na presença de um campo magnético externo, o momento magnético do *spin* nuclear assume dois estados, sendo a distribuição de suas populações, no equilíbrio, dado pela distribuição de Boltzmann.

Quando um pulso de radiofreqüência é aplicado, o sistema é perturbado, modificando a distribuição das populações nos níveis de energia. Uma vez cessada a excitação, o sistema tende a restabelecer o equilíbrio e a energia absorvida pelos *spins* é dissipada para a rede, através do movimento molecular. O processo de restauração do equilíbrio é denominado relaxação spin-rede ou longitudinal, representado por T_1 .

O processo de relaxação do spin não é espontâneo, podendo ser estimulado, por exemplo, pelo movimento molecular (vibração, rotação, difusão, etc.). No caso de pequenas moléculas, com movimento rápido, o tempo de relaxação é longo e as linhas estreitas, porém, aumentando a viscosidade do solvente ou reduzindo a temperatura, o comportamento apresenta-se mais complexo. Na literatura, os primeiros estudos, utilizando a medida de tempo de relaxação spin-rede, foram realizados em sistemas

⁷⁴ T. D. W. Claridge, *High Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, eds. J. E. Baldwin and R. M. Williams, Tetrahedron Organic Series, Pergamon, Oxford, 1999.

macrocíclicos, onde observou-se uma diminuição no T_1 do ^{13}C de éteres de coroa quando os mesmos eram complexados a íons K^+ , devido a perda da flexibilidade na formação do complexo.⁷⁵

Dessa forma espera-se obter tempos de relaxação dos prótons menores referentes ao suposto complexo formado da mistura do BiBLE (19) com KCl, quando comparados aos prótons do composto “livre” (19). Pois, no complexo, o ambiente é mais rígido, com menor mobilidade e, consequentemente com menores tempos de relaxação.

Como pode ser observado (Figura 14), houve apenas uma pequena variação nos tempos de relaxação das duas amostras analisadas. Pode-se notar, entretanto, um ligeiro decréscimo dos T_1 de alguns prótons correspondentes a mistura do composto (19) com KCl, indicando suposta complexação do íon K^+ .

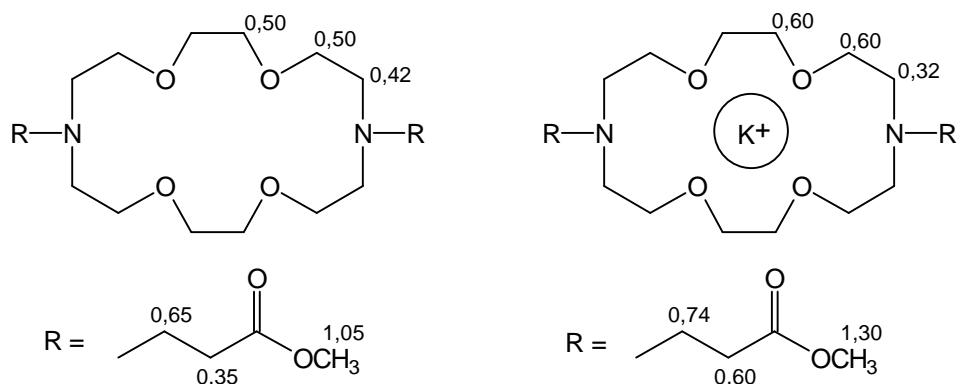


Figura 14 – Valores obtidos de T_1 (s) para os correspondentes prótons do composto (19) e o suposto complexo formado na mistura com KCl

Pôde-se observar, ainda, na mistura reacional (composto 19 + KCl em D_2O) após 3 dias, a formação de um novo produto detectado através do espectro de RMN ^1H , provavelmente o derivado ácido. A fim de questionar a possível hidrólise, um estudo a partir de análises de RMN ^1H , foi realizado do BiBLE obtido anteriormente (19) em D_2O , em função do tempo (Figura 15).

⁷⁵ Fedarko M. C. *J. Mag. Res.* **1973**, 12, 30.

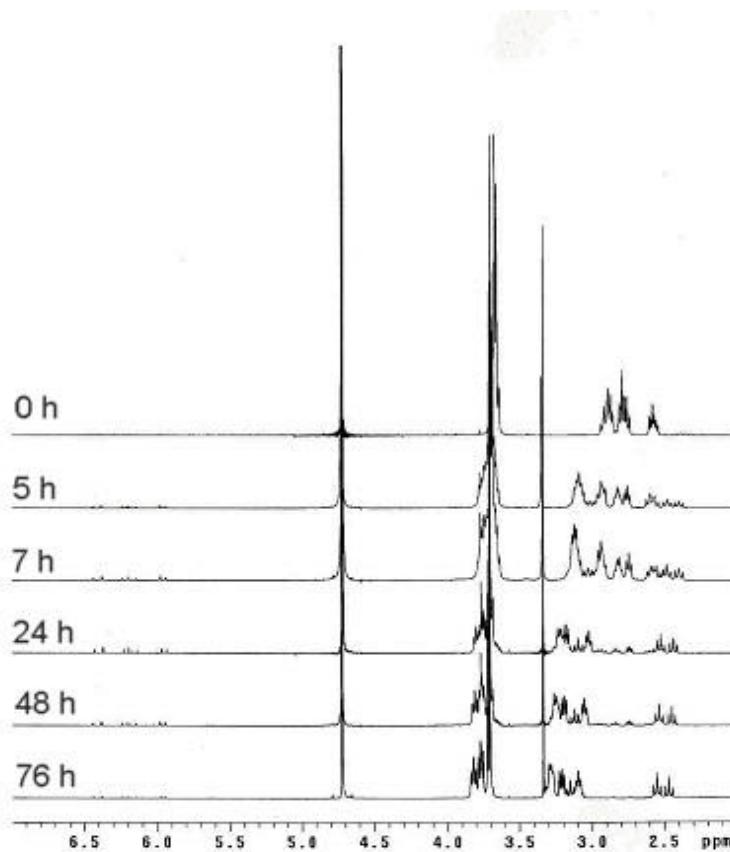


Figura 15 – Sobreposição de espectros de RMN ^1H (300 MHz) do composto (19) em D_2O (25°C) em diferentes unidades de tempo

Dessa forma foi possível observar, com o aumento do tempo de exposição do composto em solução aquosa, a diminuição gradual dos picos referentes ao composto (19) e o surgimento e aumento gradativo de novos picos, provavelmente referentes aos prótons correspondentes ao derivado ácido (20) e um singuleto em 3,34 ppm, provavelmente referente ao grupamento metila do metanol (subproduto da hidrólise). A partir deste estudo (Figura 15) foi possível observar, ainda, uma pequena decomposição do composto (19) aos respectivos materiais de partida [surgimento de pequenos sinais vinílicos (região de 6,4 à 5,9 ppm) e metilênicos (3,7 ppm) referentes aos prótons do acrilato de metila].

Como um dos objetivos do trabalho consistia na síntese de complexos com íons európio trivalente, foram realizadas análises de RMN ^1H a partir da mistura do composto (19) com $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em D_2O (Figura 16).

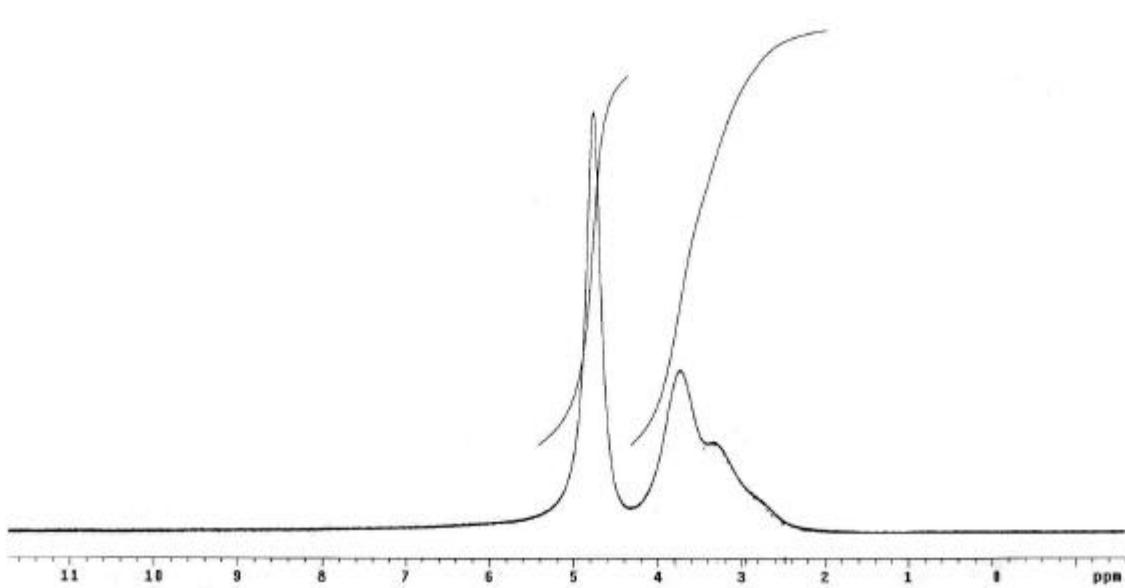


Figura 16 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da mistura do composto (19) com $\text{EuCl}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ em D_2O (25°C)

Como pode ser observado pelo espectro (Figura 16), nitidamente houve uma drástica mudança no ambiente químico dos prótons: considerável deslocamento químico (para campo baixo) e um alargamento nos sinais, quando comparado ao espectro de RMN ^1H do BiBLE (19) livre. Indicando, dessa forma, a provável coordenação do íon Eu^{3+} .

Após 3 dias, um novo espectro de RMN ^1H foi realizado, a partir da mistura reacional e uma drástica mudança foi observada (Figura 17).

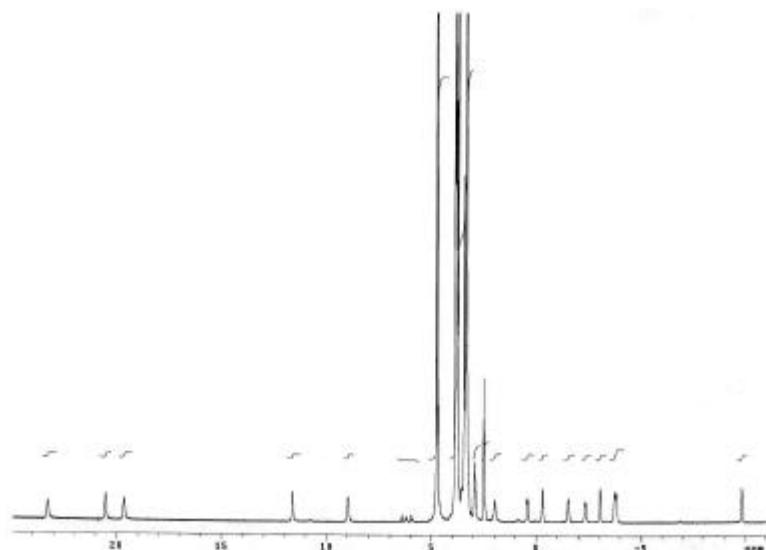


Figura 17 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da mistura do composto (19) com $\text{EuCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em D_2O (25°C) após 3 dias

Novamente houve uma drástica mudança no ambiente químico dos prótons, provavelmente ocasionada pela suposta hidrólise do BiBLE (19) e consequentemente maior eficiência na coordenação do íon Eu^{3+} (Figura 18).

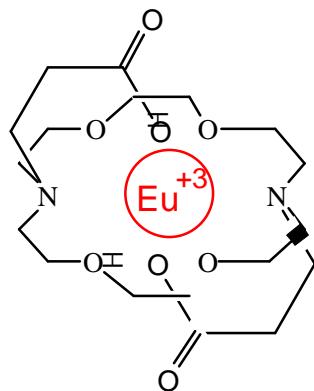


Figura 18 – Representação da suposta coordenação do íon trivalente európio ao BiBLE constituído de braços com ácidos carboxílicos (20)

Com o propósito de se obter maiores informações sobre a coordenação de íons lantanídeos, análises de RMN ^1H foram realizadas da mistura do composto (19) e $\text{LaCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Pois, sendo o íon lantânia diamagnético, esperaria obter um espectro com melhor resolução (Figura 19), podendo, assim, analisar a multiplicidade dos prótons envolvidos na coordenação.

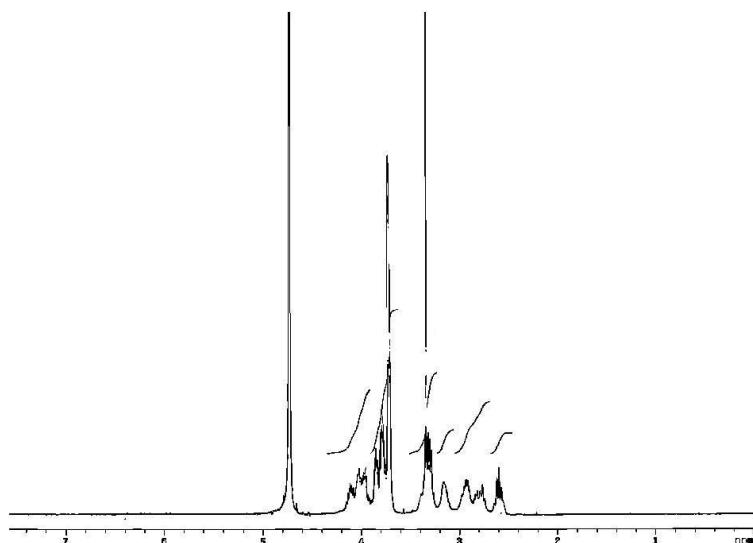


Figura 19 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da mistura do composto (19) com $\text{LaCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em D_2O (25°C)

Foi possível observar uma maior dispersão dos sinais e deslocamento, sugerindo a complexação do íon (La^{3+}). Foi possível observar novamente uma mudança no ambiente químico em torno do íon, após 3 dias da mistura reacional (Figura 20)

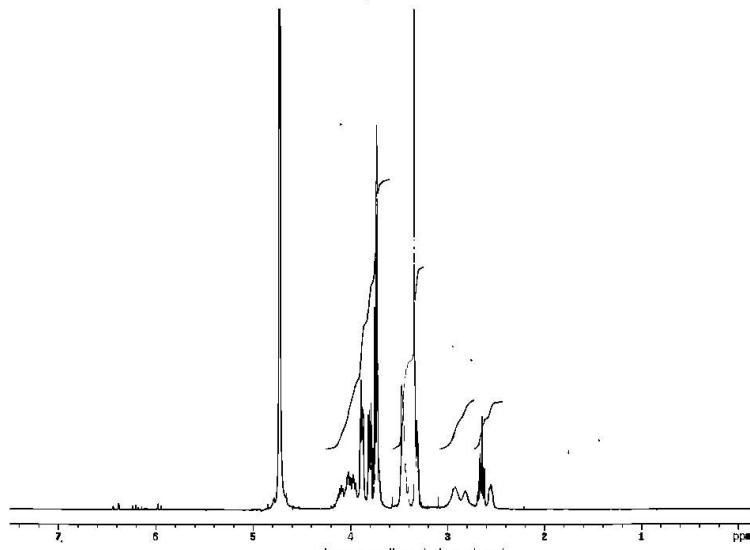


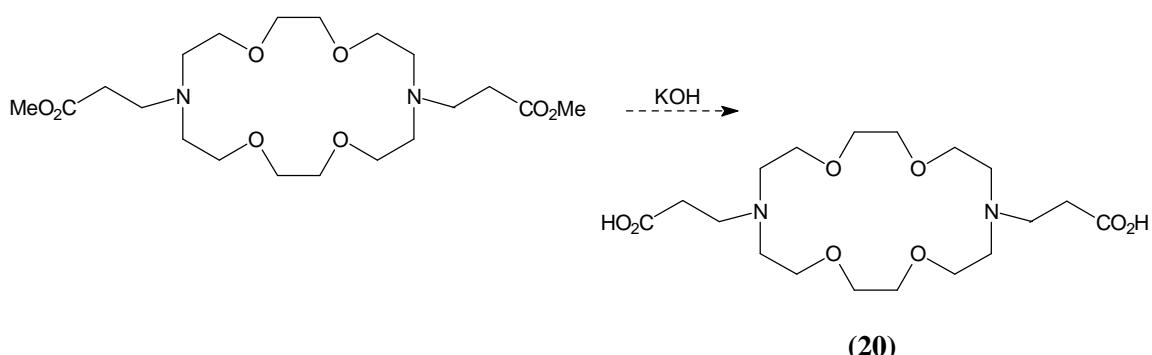
Figura 20 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da mistura do lauril-éter (19) com $\text{LaCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em D_2O (25°C) após 3 dias

A partir de análises de espectros de RMN ^1H e medidas de tempo de relaxação (T_1), foi possível estudar a eficiência de coordenação do produto obtido (19), com diferentes cátions, mostrando que a coordenação de íons lantanídeos (Eu^{3+} e La^{3+}) é mais efetiva em relação a íons potássio. Numa primeira análise, o provável derivado ácido (20) obtido após 3 dias em D_2O ou pela hidrólise em KOH, mostrou maior eficiência na coordenação de cátions.

Estudos posteriores para a avaliação da eficiência da coordenação de cátions ao derivado ácido, a partir do tempo de relaxação de prótons, são necessários. Desse modo, poder-se-ia estimar os valores respectivos das constantes de estabilidade dos complexos com cátions variados e, consequentemente, compará-los a dados na literatura obtidos, por exemplo, por titulações potenciométricas.

Na tentativa de formação de BiBLE constituídos de braços com ânions carboxilatos, fazia-se necessário a hidrólise do BiBLE obtido anteriormente (19). Inúmeras tentativas de hidrólise foram realizadas do composto (19) em condições mais “severas”, utilizando-se muitas variantes:

ESQUEMA 10



➤ Tentativas de hidrólise, utilizando-se hidróxido de potássio em metanol:

O provável produto obtido (**método I**) da reação do composto (19) com excesso de KOH, após 1 hora de agitação, apresentou baixa solubilidade em solventes orgânicos. Tentativas de purificação por recristalização em H₂O ou MeOH não foram bem sucedidas. A posterior tentativa de purificação do produto por cromatografia em sílica mostrou-se ineficaz, não sendo possível separar o suposto produto da mistura reacional.

No **método II** após suposta hidrólise com KOH, utilizando-se metodologia análoga a literatura⁶², na tentativa de retirar o excesso de KOH neutralizou-se a reação com HCl (37 %) e o sal formado foi separado da reação. Análises de RMN ¹H e RMN ¹³C evidenciaram a presença do produto desejado.

No **método III** utilizou-se metodologia análoga a anterior⁶², porém com o dobro de relação estequiométrica dos reagentes. Após 4 horas de agitação, análises de CCD mostraram o desaparecimento do material de partida adicionou-se, então, HCl (37 %) até pH 3 e o sal formado foi separado do suposto produto. Análises de RMN ¹H e RMN ¹³C e IV do produto reacional evidenciaram a presença do produto desejado, mas o material de partida ainda estava presente. Dessa forma, a fim de forçar a reação para o produto desejado adicionou-se novamente KOH e após 4 dias de agitação, retirou-se o excesso de base com adição de HCl (37 %) até pH 3. Porém, o espectro de RMN ¹H do produto bruto obtido apresentou-se equivalente ao anterior, não sendo possível a conversão total do composto (19) ao seu derivado ácido, nem o isolamento do produto final (20) da mistura reacional.

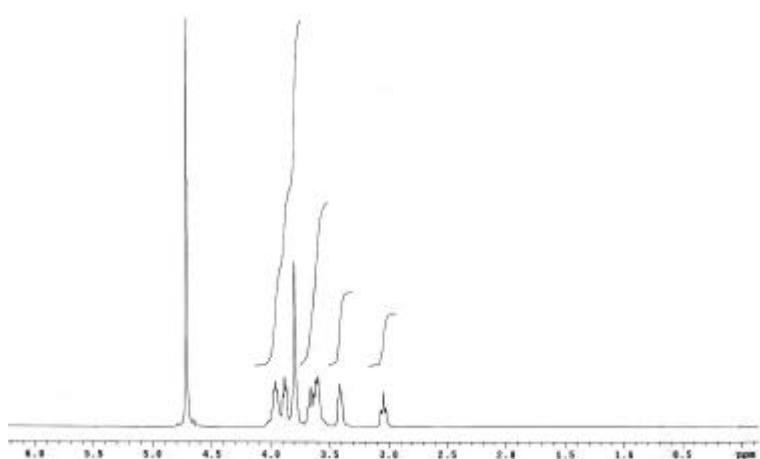


Figura 21 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) em D_2O (25°C) do produto obtido da hidrólise do composto (19) - método III

Através do espectro de RMN ^1H (Figura 21) do produto bruto obtido a partir da tentativa de hidrólise utilizando o método III, pôde-se observar um nítido deslocamento dos prótons (campo baixo) e alargamento dos sinais, ao se comparar ao espectro de RMN ^1H do referente derivado ácido obtido da mistura estequiométrica de composto (19) e KCl em D_2O (Figura 13), sugerindo a coordenação de íons potássio ser mais eficiente, quando um excesso de KOH é utilizado (Figura 21).

➤ **Tentativas de hidrólise utilizando-se hidróxido de sódio ou hidróxido de lítio:** foram realizadas a fim de estudar a influência do cátion na hidrólise e consequente complexação. Porém as reações submetidas a vários dias de agitação, não resultaram na formação do derivado ácido (20) desejado.

Os produtos obtidos das tentativas de hidrólise do BiBLE (19) apresentaram baixa solubilidade em vários solventes, isto deve-se ao fato da suposta coordenação do íon potássio ao macrocíclico e provavelmente aos supostos ânions carboxilatos presentes nos braços do BiBLE. Esse fato foi posteriormente confirmado através de comparação com dados da literatura^{666b, 76} em que íon sódio apresenta-se coordenado ao um aza de coroa constituído de braços carboxílicos.

Dessa forma, faz-se necessário a otimização na hidrólise e consequente purificação do derivado ácido obtido (20) para a realização de estudos das propriedades de luminescência propostos no início deste trabalho.

⁷⁶ Galaup, Chantal; Carrié, M.-C.; Tisnès, P.; Picard, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2165

Devido às dificuldades de preparação dos complexos objetivados no início do trabalho, uma alternativa de inspeção por infravermelho (*up-conversion*) foi proposta, utilizando-se de complexos de β -dicetonas com pares ativadores (Er^{3+}) e sensibilizadores (Yb^{3+}).

IV.2.3 - ESTUDOS DE CONVERSÃO ASCENDENTE DE ENERGIA EM COMPOSTOS ORGÂNICOS

Em 1966 F. Auzel desenvolveu um eficiente processo fotônico, de conversão ascendente de energia, explicado através de um mecanismo denominado APTE (adição de fôtons por transferência de energia). O processo envolve, além do íon luminescente (ativador), outro íon (sensibilizador), caracterizado pelo grande poder de absorção da radiação de excitação, devendo transferir com facilidade a energia absorvida para o íon ativador emitir um fôton de energia maior (visível, por exemplo). Estudos demonstraram a grande eficiência deste processo em sistema vitrocerâmicos, graças à freqüência máxima de fôtons nessas matrizes, compatíveis com os processos não ressonantes em questão. No caso do par $\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$, por exemplo, uma proporção 2:1 desses íons resulta numa eficiente emissão nas regiões espectrais do verde ou vermelho, sob excitação por radiação infravermelha⁷⁷.

Devido às dificuldades enfrentadas na preparação de lauril-éteres demonstradas anteriormente, não foi possível a síntese do complexo macrocíclico trinuclear (3) 2Yb:Er para posteriores estudos de conversão ascendente de energia. Dessa forma foi proposto o estudo de up-conversion em complexos β -dicetonas (ligante = Btfa e heterobiaril = Bipy) cuja síntese é bastante conhecida do grupo de terras-raras do Departamento de Química Fundamental.

Utilizou-se um sistema de detecção síncrona, constituído de um laser pulsado de infravermelho de GaAs:Si (980 nm) acoplado a um amplificador sensível à fase tipo lock-in e uma fotomultiplicadora Hamamatsu tipo 1P28-A.

Tentativas de observação de sinal luminescente resultante de conversão ascendente de energia no complexo $2\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ não foram bem sucedidas,

⁷⁷ Auzel, F.; Santa-Cruz, P. A.; de Sá, G. F. *Revue Phys. Appl.* **1985**, 20, 273.

não sendo possível a detecção de nenhum sinal luminescente, provavelmente devido a perdas não radiativas por relaxações multi-fônon relacionadas à parte orgânica do complexo.

Pretende-se dar continuidade com novas estratégias de síntese de sistemas compatíveis com o processo APTE de conversão ascendente em energia, para rastreamento por infravermelho.

V - PARTE 2: Rastreadores com excitação UV (efeito antena)

Devido aos problemas descritos na seção anterior e ao tempo reduzido durante um programa de mestrado, as tentativas de inspeção por infravermelho (via conversão ascendente em energia) e de síntese dos complexos objetivados inicialmente, passarão a constituir as perspectivas do presente trabalho. Desta forma, a partir deste ponto pretende-se utilizar mecanismo de excitação por ultravioleta via ligantes (efeito antena), com complexos de β -dicetonas bem conhecidos e utilizados pelo grupo.

V.1 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL (PARTE 2)

Metodologia de Caracterização

Espectroscopia de emissão

Os espectros de emissão foram registrados à temperatura ambiente utilizando-se um espectrômetro Jobin Yvon modelo Ramanor U-1000, possuindo como detector uma fotomultiplicadora RCA C31034-RF refrigerada por um sistema Peltier. Utilizou-se a lâmpada de Xe-Hg de 150 W como fonte de excitação, usando-se como monocromador de excitação um Jobin Yvon modelo H10-UV e um monocromador duplo Ramanor U-1000 da Jobin Yvon como monocromador de emissão. O registro e processamento do sinal foram feitos através de uma interface Jobin-Yvon Spectralink ligada a um microcomputador IBM utilizando o softwere PRISM versão 2.3 da I.S.A.-Instruments Science.

Para as medidas de fluorescência de amostras em solução foram utilizadas ampolas de quartzo, e para amostras sólidas foram adaptados suportes específicos.

Para a obtenção dos espectros de emissão (varredura do comprimento de onda de emissão com o comprimento de onda de excitação fixo), com o objetivo de se obter a melhor relação sinal/ruído, em cada amostra analisada foram otimizados parâmetros

como larguras de fendas de excitação e observação, tempo de integração e passo do monocromador, bem como o emprego de filtros.

Espectroscopia Eletrônica de Absorção no UV-Visível

Os espectros de absorção eletrônica na região do UV-visível (~ 200-700 nm) foram registrados em um espectrofotômetro Perkin Elmer-Lambda 6 modelo 2688-002, com lâmpada de deutério (190 a 350 nm) e lâmpada de tungstênio (340 a 800 nm). As amostras foram analisadas em solução nos solventes etanol e água com adequado grau de pureza para análise.

Análises C, H e N

As análises elementares de C, H e N foram realizadas no Analisador Elementar CHNS-O Carlo Erba Instruments modelo EA 1110.

Análises Termogravimétricas (TG)

As análises termogravimétricas foram efetuadas no equipamento Shimadzu TGA-50, sob constante fluxo de nitrogênio (25ml/min) na faixa de temperatura de 20 a 700°C, com velocidade de aquecimento de 10°C/min.

Procedimento Geral

Os reagentes e solventes (Merck, Aldrich, Vetec, Quimex.) foram utilizados sem prévia purificação.

As amostras do complexo, criptato com Eu³⁺ [Eu \subset Bipy.Bipy.PyCO₂Et]³⁺) foi sintetizado⁷⁸ e gentilmente fornecido pelo prof. Dr. Severino Alves Jr do departamento de Química Fundamental (UFPE).

As amostras do complexo, criptato com Tb³⁺ [Tb \subset Bipy.Bipy.Bipy]³⁺ foi sintetizado⁷⁹ e gentilmente fornecido pela aluna de doutorado Suzana do departamento de Química Fundamental (UFPE).

⁷⁸ Em processo de publicação.

⁷⁹ a) Rodrigues-Ubis, J.-C.; Alpha, B.; Plancherel, D.; Lehn, J.-M. *Helv. Chim. Acta* **1984**, 67, 2264. b) Lehn, J.- M.; Roth, C. O. *Helv. Chim. Acta* 1991, 74, 572.

As amostras de sangue e órgãos (fígado, rins e baço) utilizados nos experimentos foram obtidas de camundongos preparados para o estudo cinético dos nanomarcadores por Dra. Jaqueline Rodrigues, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

A preparação dos nanomarcadores (nanoesfera + complexo luminescente), bem como os testes de citotoxicidade dos complexos, foram realizados com auxílio da Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

Procedimento usado para a síntese do complexo $\text{Ln}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ ou $\text{Ln}(\text{Btfa})_3\text{o-fen}$ ($\text{Ln} = \text{Eu}^{3+}, \text{Tb}^{3+}$)

Primeiramente fez-se necessário a preparação dos sais de lantanídeos ($\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): a uma massa equivalente a 0,5 mmol do óxido de lantanídeo (Ln_2O_3), previamente calcinado a 900 °C por 4 horas, foram adicionados 5 ml de solução aquosa de HCl (0,7 M) num bêquer de 250 ml. Tal sistema foi agitado e aquecido (~50 °C) até total dissolução do óxido. Em seguida, adicionou-se cerca de 15 ml de H_2O deionizada, novamente submetendo-se à agitação e aquecimento até evaporação e consequente secagem. Tal procedimento de diluição e secagem com água deionizada foi repetido (~3 vezes) até obtenção de pH em torno de 5. Em seguida, adicionou-se 10 ml de etanol, e em constante agitação evaporou-se até quase secagem. Finalmente adicionou-se etanol até volume desejado (250 ml).

A concentração do íon lantanídeo na solução etanólica foi estimada através de titulação complexométrica com EDTA⁸⁰, utilizando-se solução tampão de acetato com *xilenol orange* como indicador.

Após a formação do sal de lantanídeo, pôde-se então, preparar o complexo $\text{Ln}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ ou $\text{Ln}(\text{Btfa})_3\text{o-fen}$:

Em um balão de três bocas adicionou-se solução etanólica de $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol) e um sistema de refluxo foi montado. A solução foi aquecida até 60°C e sob agitação foi adicionada lentamente (funil de adição) solução etanólica do ligante 4,4,4-trifluoro-1-fenil-1,3-butanodiona (Btfa, 3 mmol). A mistura foi submetida a

⁸⁰ Lyle, S. L.; Raiman, M. *Talanta* **1963**, 10, 1177.

refluxo por 20 minutos, em seguida adicionou-se lentamente solução etanólica do segundo ligante - bipiridina ou 1, 10-fenantrolina (Bipy ou o-fen, 1 mmol). Após 30 min de refluxo, adicionou-se solução etanólica de NaOH 0,1 M até pH 6. A mistura foi então submetida a refluxo por 4 horas. A solução resultante é evaporada à pressão reduzida, e o produto lavado com H₂O destilada. O produto desejado foi purificado por método de recristalização em EtOH/H₂O.

Procedimento para preparação dos nanomarcadores (nanoesferas + complexo luminescente)

As nanoesferas foram preparadas pelo método de emulsão múltipla (w/o/w = fases aquosa/orgânica/aquosa), o qual reduz o tamanho das partículas a dimensões de submícrons⁸¹.

A um recipiente contendo 1 ml de diclorometano foram adicionados o polímero Dex-PCL_{5,5} (4 mg), solução do complexo luminescente (~200 µl) previamente dissolvido no mesmo solvente, e 200 µl de água. A mistura resultante foi vigorosamente agitada por 1 minuto, resultando na emulsão A/O. Em seguida, a emulsão foi submetida a ultra-som (CV 145 *sonicator, Vibra Cell*) a 40 W durante 20 segundos em banho de gelo. À solução resultante foram adicionados 4 ml de solução aquosa de colato de sódio (0,1 %), que foi submetida a vigorosa agitação num “vortex” por 3 minutos, resultando na emulsão múltipla (A/O/A). A emulsão foi novamente submetida a ultra-som a 40 W durante 30 segundos. O solvente (CH₂Cl₂) foi enfim evaporado a pressão reduzida obtendo uma solução aquosa das nanoesferas (**formulação total**). Tal formulação, quando submetida à centrifugação (centrífuga Beckman L7-55 USA) à 144,000 g por 30 minutos, resulta em duas fases: solução aquosa (**sobrenadante**) e nanoesferas decantadas. As nanoesferas são retiradas e lavadas com duas vezes com água. Qualquer agente não ligante (excesso de colato de sódio) foi eliminado através de diálise em água durante 6 horas resultando nas nanoesferas em tamanho médio de 200 nm (**precipitado**).

⁸¹ Li, Y.-P.; Pei, Y.-Y.; Zhang, X.-Y.; Gu, Z.-H.; Zhou, Z.-H.; Yuan, W.-F.; Zhou, J.-J.; Zhu, J.-H.; Gao, X.-J. *J. Cont. Rel.* **2001**, 71, 203.

Para a **formulação liofilizada** é necessário a adição de 2 ml de glicose 5 % nas nanoesferas em suspensão (formulação total).

O procedimento de preparação das nanoesferas encontra-se detalhado na tese de doutorado (dezembro-2002)⁸² de Jaqueline Rodrigues, sob orientação da Prof. Dra. Nereide Magalhães.

Procedimento realizado no sangue

Inúmeras tentativas de observação de luminescência foram realizados utilizando-se lâmpada de UV e espectrômetro Jobin Yvon modelo Ramanor U-1000:

- Em amostras de sangue (plasma, hemácia) contendo anticoagulante EDTA misturadas a complexos $\text{Ln}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ ($\text{Ln} = \text{Eu}^{3+}, \text{Tb}^{3+}$);
- Em amostras de nanomarcadores (nanoesfera + $\text{Ln}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$) nas formulações precipitado e sobrenadante, misturados ao soro sanguíneo com e sem EDTA (adições de solução etanólica de KOH no sangue foram feitas antes e depois da adição de nanomarcadores ao soro sanguíneo);
- Em soluções tampão contendo diferentes anticoagulantes (citrato de sódio, heparina e EDTA) com nanomarcadores, como também em ambiente ácido (tricloroacético 5%).

Procedimento para avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos complexos $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$, $\text{Er}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ e $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{o-fen}$

As células NCI-H 292 foram mantidas em meio DMEM (*Dubelcco's modified Eagle's medium*) contendo 25mM de glicose (Eurobio, França), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Boehringer, Alemanha), 1% de aminoácido não-essencial. Para a viabilidade do experimento, as células foram cultivadas durante 3 dias em frascos de 80-100% de confluência. Uma suspensão celular (5×10^5 células/ml) foi

⁸² da Silva, J. R. "Nanopartículas com Superfície Modificada do Tipo NúcleoCoroa de Novos Copolímeros de Dextrana-Policaprolactona para Conjugação de Ligantes de Reconhecimento" **2002**, *Tese de doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

então distribuída em placa de cultura com 96 poços (220 μ l/ poço). Tais culturas foram expostas a diferentes concentrações dos complexos de lantanídeos durante 72 horas. Após este período de encubação, solução de 0,05 % MTT/poço foi adicionada ao sistema, novamente encubado por 4 horas. O sobrenadante foi removido (50 μ l/poço) sendo a densidade óptica (absorvância) determinada a 595 nm numa placa de leitura⁸³.

Obs.: Em todo o experimento as células foram incubadas a 37°C com atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

As diferentes concentrações dos complexos de lantanídeos foram, cada uma, testadas em quadruplicata, com três repetições em experimentos separados. Os resultados foram expressos pela média das células viáveis.

Tentativa de rastreamento do nanomarcador fotônico *in vivo*

No procedimento *in vivo*, foram utilizados camundongos albinos Suíços (*Mus-musculus*), fêmeas com idade de 60 dias e peso médio de 33,0 g provenientes do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-Lika-UFPE. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente, sob ciclo dia/noite natural (12h luz e 12h escuro), com livre acesso à água e alimento durante todo experimento.

O nanomarcador fotônico consiste no complexo Eu(Btfa)₃Bipy na concentração de 1 mg/ml incorporado às nanoesferas (precipitado). Para administração intravenosa no animal foi necessário o uso da relação de peso 15 mg de nanomarcador/1Kg de peso do animal.

Estudo cinético: volumes de 100 μ l do nanomarcador fotônico foram injetados na região intraperitoneal dos camundongos. Em tempos pré-determinados (1° hora, 6° hora, 24° hora, 48° hora e a 72° hora) após a administração do nanomarcador na corrente sanguínea do animal, alíquotas de cerca de 300 μ l de sangue foram retiradas dos animais pela cauda. No mesmo intervalo, um animal era sacrificado (um na 1° hora, outro na 6° hora, etc.) para a extração de seus órgãos (fígado, baço e rins) os quais eram macerados e re-suspendidos em solução salina (0,9 % NaCl).

⁸³ Berridge, M. V.; Tan, A. S.; McCoy, K. D.; Wang, R. *Biochemica*, **1996**, 4, 14.

Todas as amostras coletadas (sangue, rins, fígado e baço) foram mantidas sem a presença de anticoagulantes.

Tentativas de extração do nanomarcador nas amostras coletadas dos tecidos dos animais foram realizadas com etanol. A solução depois de filtrada foi submetida à centrifugação por 3 vezes recolhendo-se a porção sobrenadante, sendo em seguida evaporada à pressão reduzida.

Procedimento para preparação das nanocápsulas com complexo luminescente [Eu(Btfa)₃Bipy ou Eu(Btfa)₃o-fen].

A preparação das nanocápsulas contendo complexo luminescente foi realizada pela Dra. Noemia Pereira Santos no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). O procedimento de preparação das nanocápsulas encontra-se detalhado em sua tese de doutorado (fevereiro-2003)⁸⁴, sob orientação da Prof. Dra. Nereide Magalhães.

Nanocápsulas de PLGA (ácido d, l-lático-co-glicólico) contendo ácido úsnico foram obtidas utilizando-se o método de deposição interfacial do polímero pré-formado proposto segundo literatura²². O princípio baseia-se na diminuição da solubilidade dos constituintes da formulação, formadores do núcleo oleoso e polímero, relacionada à difusão de seu solvente no não solvente.

Uma solução de acetona (mistura orgânica) contendo o polímero (PLGA), fosfatidilcolina de soja (Epikuron), óleo de girassol, ácido úsnico, e 1mg do complexo luminescente, foi introduzida lentamente na fase aquosa constituída de tampão fosfato (pH 7,4) e o poloxamer, sob agitação moderada. A formação das nanocápsulas é imediatamente observada. Tal sistema foi mantido em agitação por 30 minutos. Em seguida evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, e a suspensão coloidal foi então concentrada em um volume de 20% do inicial, resultando na formação de nanocápsulas com tamanho médio de 367 nm.

O tensoativo hidrofílico (polaxamer) promove a formação de partículas menores e mais homogêneas. O tensoativo lipofílico (Epikuron) evita a sedimentação

⁸⁴ Santos, N. P. “Nanocápsulas de PLGA contendo Ácido Úsnico de Cladonia Substellata com Potencial Ação Anti-tumoral” **2003**, *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

das partículas e a passagem da substância ativa encapsulada (ácido úsnico) para a fase externa da suspensão. A concentração de ácido úsnico encapsulado é de cerca de 1 mg/ml.

Procedimento para preparação das microesferas com complexo Eu(Btfa)₃-fen.

As microesferas com o complexo (micromarcador) foram preparadas pela mestrande Roseane Costa no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) seguindo o mesmo princípio da formação das nanoesferas (método de emulsão múltipla). O procedimento de preparação das microesferas se encontra bastante detalhado na sua tese de mestrado (março 2003)⁸⁵, sob orientação da Prof. Dra. Nereide Magalhães.

As microesferas são constituídas basicamente de polímero PLGA e ácido úsnico disperso na matriz.

V.2 - RESUSTADOS E DISCUSSÕES (PARTE 2)

ESTUDOS DE LUMINESCÊNCIA DOS COMPLEXOS DE LANTANÍDEOS [Ln(Btfa)₃Bipy] INCORPORADOS NAS NANOESFERAS

Um espectro de luminescência característico de compostos de Eu³⁺ consiste em transições originadas dos níveis ⁵D_j, mais particularmente ⁵D₀ aos níveis finais ⁷F_j. A maioria das transições se encontra na região do visível. As emissões ⁵D₀ → ⁷F_{0, 2, 4} são basicamente de caráter iônico, sendo suas intensidades sensíveis à simetria do campo ligante. A transição ⁵D₀ → ⁷F₂ (~610 a 620 nm) a qual ocorre por mecanismo de dipolo elétrico é responsável pela fluorescência vermelha observada em quelatos

⁸⁵ Costa, R. M. R. “Avaliação da Citotoxicidade e Atividade Anti-Tumoral das Microesferas de PLGA contendo Ácido Úsnico de Cladonia Substellata” **2003**, *Tese de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

de β -dicetonas de Eu^{3+} . A transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ (~ 590 nm) ocorre por mecanismo de dipolo magnético, praticamente insensível ao ambiente ligante. Já a emissão $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$ apresenta caráter misturado: dipolo elétrico e magnético.

Devido à disponibilidade de instrumentação espectroscópica de alta resolução, foi possível obter espectros de emissão de amostras contendo íons lantanídeos à temperatura ambiente em boa resolução e com boa relação sinal/ruído, mesmo em concentrações relativamente baixas da espécie luminescente. Para a obtenção dos espectros foram otimizados parâmetros como larguras de fendas de excitação e observação, tempo de integração e passo do monocromador, bem como o emprego de filtros.

➤ Complexo de $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ em concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ incorporado em nanoesferas

As Amostras de nanoesferas com $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ foram preparadas em diferentes formas:

- Formulação Total suspensa em H_2O
- Precipitado suspenso em 1 ml de H_2O
- Sobre-nadante

Os espectros de emissão das amostras apresentaram as transições características do íon Eu^{3+} a ser utilizado como nanomarcador fotônico na forma do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$.

O primeiro resultado relevante foi a observação nítida da luminescência do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ na nanoesfera (precipitado) suspensa em água, indicando ser possível a detecção da luminescência do nanomarcador em meio aquoso. Trata-se de uma observação importante, já que se pretende trabalhar em ambiente sanguíneo. É importante que o complexo luminescente esteja protegido do meio aquoso, pois a presença de osciladores OH pode ocasionar um eficiente mecanismo de desativação não radioativa dos estados excitados do íon Eu^{3+} em questão^{10a)}.

Como a banda $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ está associada a uma transição de caráter dipolos magnéticos, praticamente independentes do ambiente químico, a mesma podem ser usados como referência interna, ou seja, espectros podem ser normalizados de modo

que a área da transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ seja igual para todos. Estudos⁸⁶ mostram ser possível calcular tempos de vida radiativos de Eu³⁺ diretamente a partir do espectro de emissão, através da análise das bandas ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ como referência. Desse modo, para a comparação das diferentes formas de amostras, fez-se a normalização dos espectros pela banda ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, podendo com isso se comparar as intensidades das transições hipersensitivas ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (mais intensas), ou seja, obter informações sobre o meio em que se encontra o complexo Eu(Btfa)₃Bipy incorporado nas nanoesferas (figura 22)

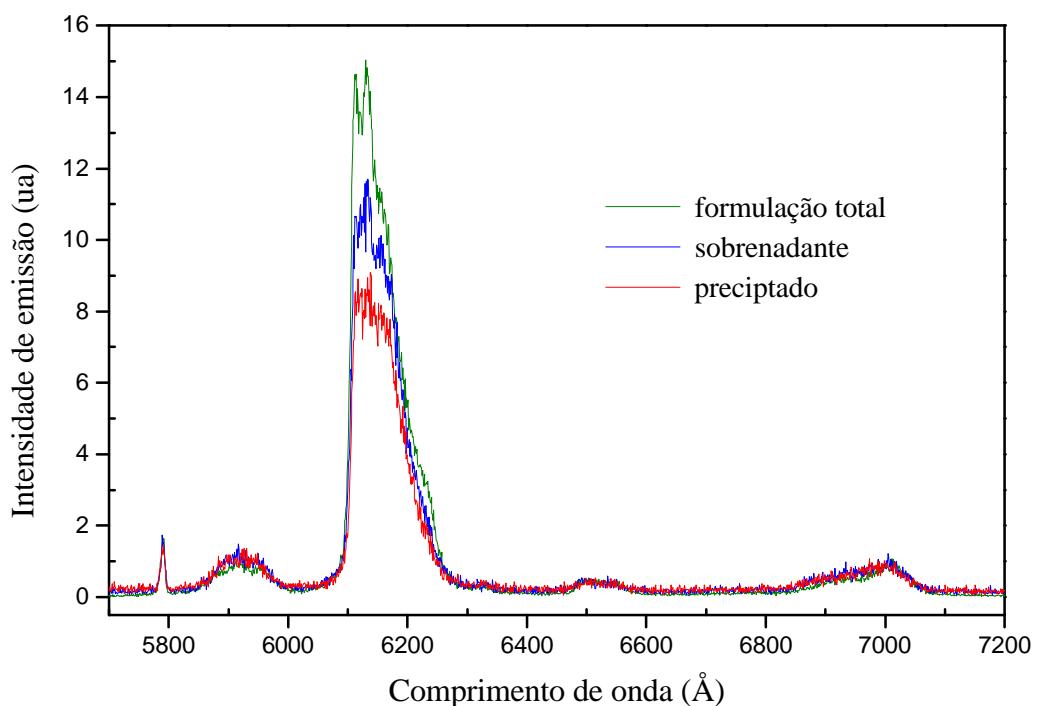


Figura 22 – Espectros de emissão do complexo Eu(Btfa)₃Bipy [40 μ g/ml] incorporado a nanoesferas em diferentes formulações, utilizando-se a banda ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ como referência interna ($\lambda_{\text{excitação}} = 350$ nm)

⁸⁶ Werts, M. H. V. “Luminescent Lanthanide Complexes” Tese de Doutorado, 2000, Amsterdam

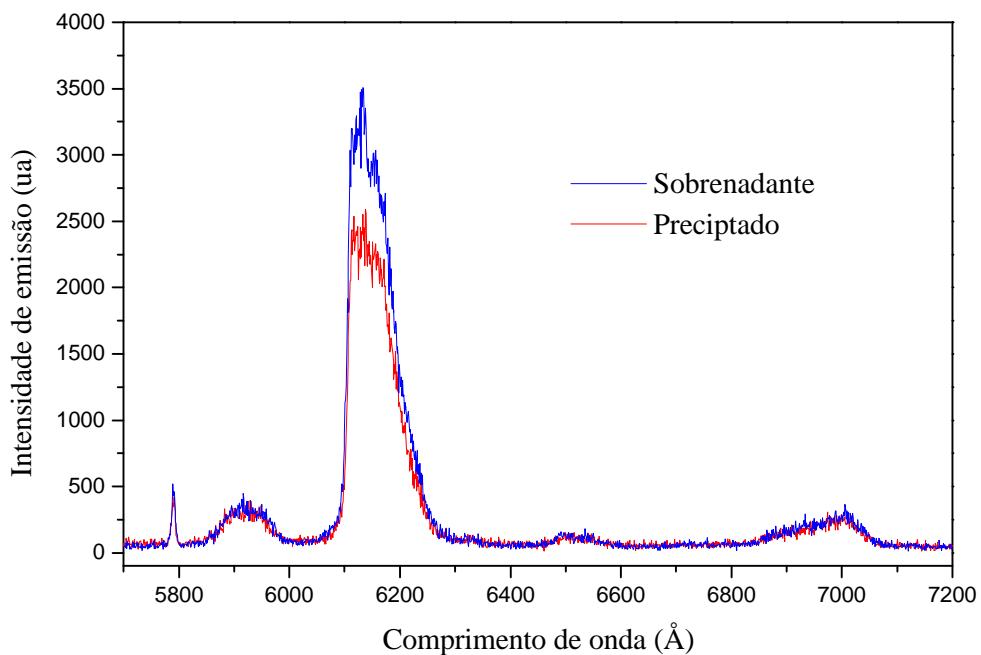


Figura 23 – Espectros de emissão do complexo Eu(Btfa)₃Bipy [40 μ g/ml] incorporado a nanoesferas nas duas formulações. ($\lambda_{\text{excitação}} = 350$ nm)

O sobrenadante obtido na formulação da nanoesfera apresentou luminescência do íon Eu³⁺ característica do complexo Eu(Btfa)₃Bipy. Apesar do meio ser constituído basicamente de solução aquosa e o complexo insolúvel em água, não se esperava, dessa maneira, a presença do complexo nessa solução, aparentemente límpida. Além disso, não se observa supressão de luminescência por decaimentos não radiativos via osciladores OH.

Quanto mais intensa a transição por dipolo elétrico $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ em relação à transição por dipolo magnético $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, sugere a presença do íon Eu³⁺ em ambiente de menor simetria. Como se pode observar na figura 22, o complexo Eu(Btfa)₃Bipy sofre nitidamente a influência do meio. O ambiente químico do precipitado apresenta aparentemente maior simetria, já que se observa menor intensidade da banda $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ neste meio. As nanoesferas na formulação total encontram-se aparentemente em meio de menor simetria apresentando dessa forma, maior intensidade da banda $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$.

Nas figuras 22 e 23, observando-se a região espectral 579-581 nm, constatou-se a presença de apenas um pico associado à transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$, indicando que os íons Eu³⁺ devem-se encontrar em um único sítio, em um único ambiente químico. Tal

suposição poderia ser comprovada em medidas de fluorescência à baixa temperatura⁸⁷.

Com o objetivo de se determinar o limite detectável de concentração dos complexos de lantanídeos em sistemas biológicos, elaborou-se formulações de nanoesferas em menor concentração.

➤ Complexo de Eu(Btfa)₃Bipy em concentração de 5 µg/ml incorporados a nanoesferas

Amostras de nanoesferas contendo o complexo Eu(Btfa)₃Bipy em diferentes condições foram formuladas:

- Formulação total suspensa em H₂O
- Formulação total liofilizada
- Precipitado suspenso em água
- Sobrenadante

Os espectros de emissão das formulações suspensas em água, como pode ser observado na figura 24, reproduziram os resultados obtidos previamente em maiores concentrações (figuras 22 e 23), porém com perdas de resolução, devido ao aumento das fendas para melhorar a relação sinal/ruído.

⁸⁷ de Sá, G. F.; Nunes, L. H. A.; Wang, Z.-M.; Choppin, G. R. *J. of Alloys and Compounds* **1993**, 196, 17

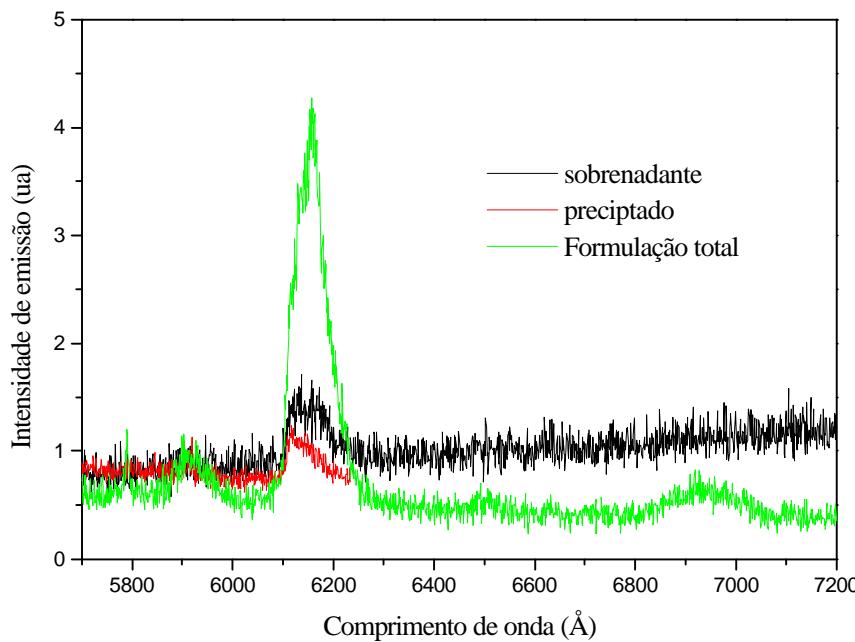


Figura 24 – Espectros de emissão do complexo Eu(Btfa)₃Bipy [5 µg/ml] incorporado às nanoesferas em diferentes formulações. Os espectros do precipitado e sobrenadante foram feitos nas mesmas condições: fendas de observação de 1 mm, e sem fendas de excitação (baixo sinal), porém a formulação total foi realizada com fendas de observação de 0,6 X 0,7 mm e de excitação de 1 mm ($\lambda_{\text{excitação}} = 350$ nm)

Mesmo utilizando-se baixas concentrações do complexo Eu(Btfa)₃Bipy, na formulação da nanoesfera, constatou-se novamente a presença do mesmo no sobrenadante. Acredita-se com este resultado que o sobrenadante não deve ser constituído apenas de solução aquosa. Provavelmente há presença de nanopartículas em suspensão.

A figura 25 mostra nitidamente a maior intensidade de emissão do complexo contido na formulação total liofilizada, quando comparado à formulação total suspensa. Tal resultado se deve provavelmente a formulação total estar suspensa em água, ocorrendo perdas de energia por decaimentos não radioativos dos estados excitados do íon európio através de osciladores vibracionais OH, provocando dessa forma uma parcial supressão da luminescência do complexo.

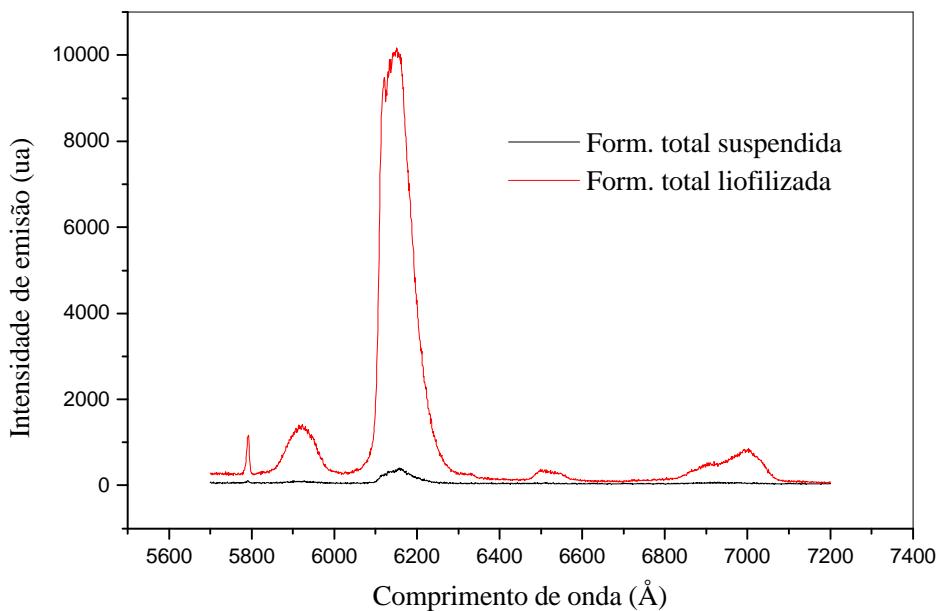


Figura 25 – Espectros de emissão do complexo Eu(Btfa)₃Bipy [5 μg/ml] incorporado a nanoesferas em duas formulações ($\lambda_{\text{excitação}} = 350$ nm)

Através da comparação do espectro de luminescência da formulação suspensa em água com a formulação liofilizada, utilizando-se como referência interna a transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ (figura 26), pôde-se observar que o complexo luminescente na formulação liofilizada apresenta alterações na forma da banda de emissão hipersensitiva, quando comparado ao complexo incorporado a nanoesfera em suspensão.

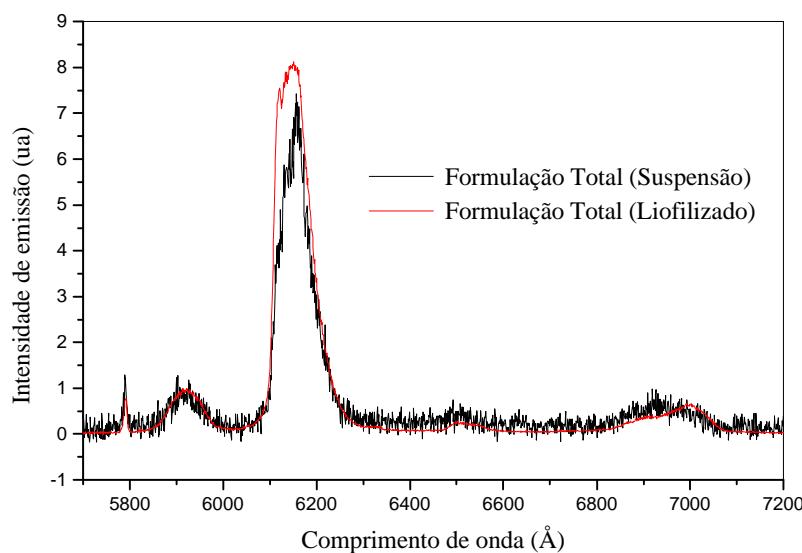


Figura 26 – Espectros de emissão do complexo Eu(Btfa)₂Bipy [5 μg/ml] incorporado a nanoesferas em duas formulações, utilizando-se a banda ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ como referência interna ($\lambda_{\text{excitação}} = 350$ nm)

- Complexo de $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ em alta concentração (1 mg/ml) incorporado em nanoesferas

Com o intuito de se utilizar o nanomarcador no estudo *in vivo*, devido às relações de peso nanomarcador/ animal, era necessário utilizar concentração relativamente alta do complexo para fins de detecção fotônica, dessa forma, fez-se necessário a formulação de nanoesferas com complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ em concentração de 1 mg/ml:

- Precipitado suspenso em água
- Sobreáquido

Os espectros de emissão do complexo incorporado as nanoesferas nas condições sobreáquido e precipitado reproduziram os comportamentos observados anteriormente (figuras 22 e 24).

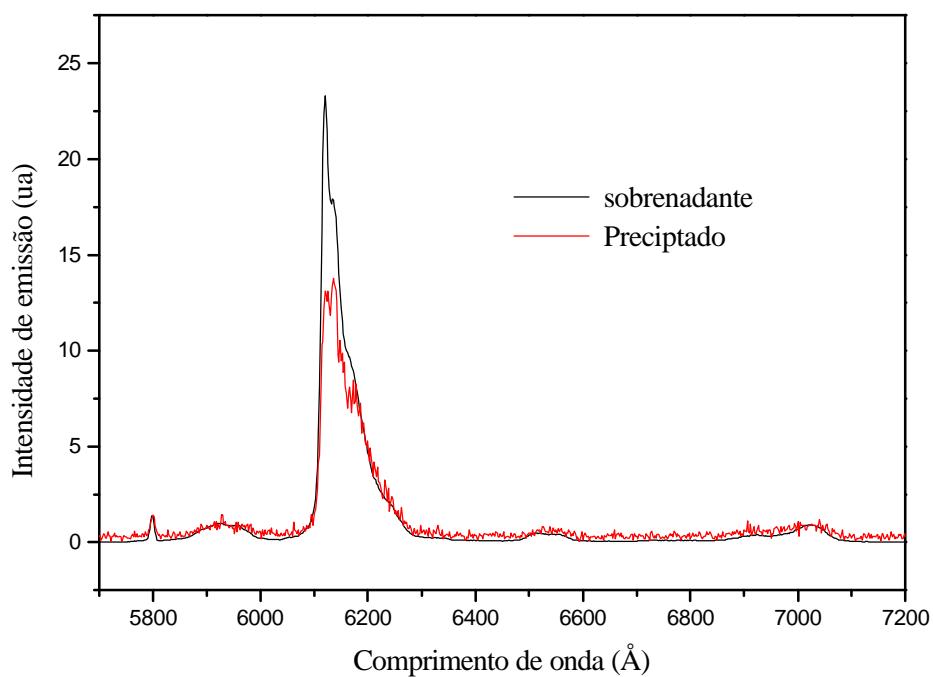


Figura 27 – Espectros de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ [1mg/ml] incorporado a nanoesferas em duas formas, normalizado com a transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ referência interna ($\lambda_{\text{excitação}}=350$ nm)

➤ Complexo de $\text{Tb}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ em concentração de 40 $\mu\text{g/ml}$ incorporados em nanoesferas

Um espectro de luminescência característico de compostos de Tb^{3+} consiste em transições originadas do estado $^5\text{D}_4$ aos estados finais $^7\text{F}_j$ ($J = 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0$), sendo a mais intensa emissão observada na região entre 540-555 nm ($^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$). As emissões $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_{0,1}$ são sempre fracas, e as intensidades relativas das demais transições seguem a ordem $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_6 > ^7\text{F}_4 > ^7\text{F}_3 > ^7\text{F}_2$.

As intensidades relativas das emissões $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_j$ são sensíveis (mas não hipersensitivas) ao detalhamento da natureza do ambiente ligante, com as emissões $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_6$, $^7\text{F}_4$ e $^7\text{F}_2$ mostrando maiores sensibilidades, porém, tal detalhamento não resulta em uma “sonda diagnóstica” confiável da estrutura de complexos. As transições $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$ e $^7\text{F}_3$ apresentam forte natureza dipolo magnético.

A luminescência do íon Tb^{3+} é intensificada quando coordenado a certos ligantes, como os ligantes β -dicetonas.

O complexo $\text{Tb}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ apresenta maior rendimento quântico do que o respectivo complexo com íon Eu^{3+} , no entanto, as propriedades luminescentes do complexo $\text{Tb}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ incorporado às nanoesferas apresentaram-se menos eficientes quando comparadas à do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$. Como se pode observar na figura 28, os espectros de emissão apresentaram menor relação sinal/ruído quando comparados aos espectros do complexo de $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ incorporado nas nanoesferas.

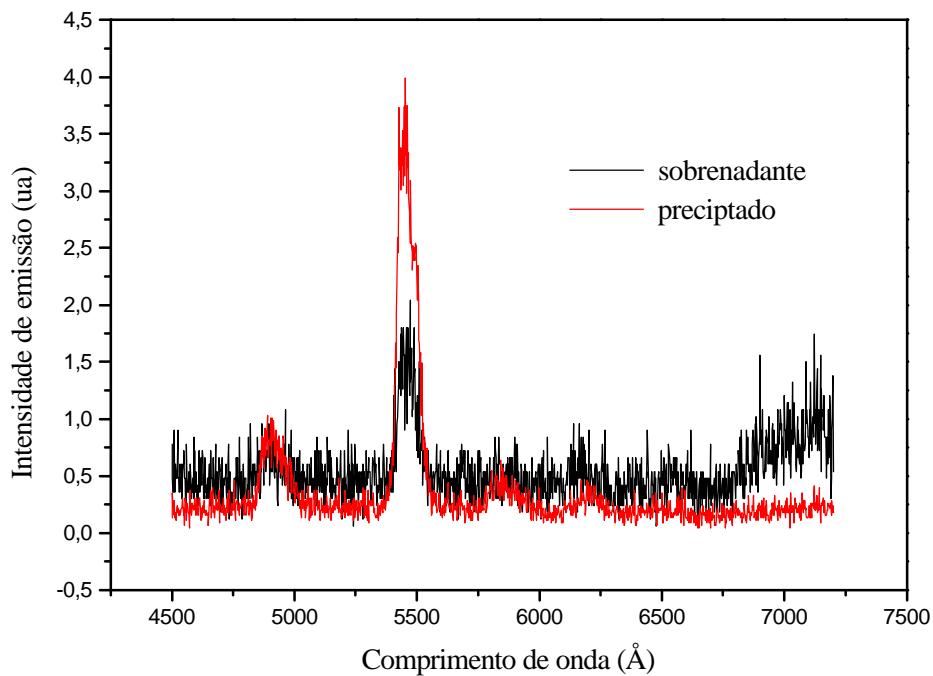


Figura 28 – Espectros de emissão do complexo $\text{Tb}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ [40 $\mu\text{g}/\text{ml}$] incorporado em nanoesfera em duas formulações ($\lambda_{\text{excitação}} = 340 \text{ nm}$)

ESTUDOS *IN VITRO* DE LUMINESCÊNCIA DE TECIDO ANIMAL

Com intuito do uso dos nanomarcadores como rastreadores fotônicos *in vivo*, foram realizadas medidas de fluorescência de amostras de sangue (com anticoagulante EDTA), rins, fígado e baço (macerados e suspensos em solução salina) de camundongos.

Os espectros de luminescência das amostras foram realizados na região de emissão do íon Eu^{3+} e sob excitação de 350 nm, a fim de se observar possíveis auto-fluorescências celulares na região de interesse fotônico. Como pode ser observada na figura 29, nenhuma luminescência foi detectada nas amostras, salvo tecidos do fígado, apresentando uma discreta luminescência verde, porém, nada significativo foi registrado pelo espectro de emissão, salvo leve alteração na linha de base.

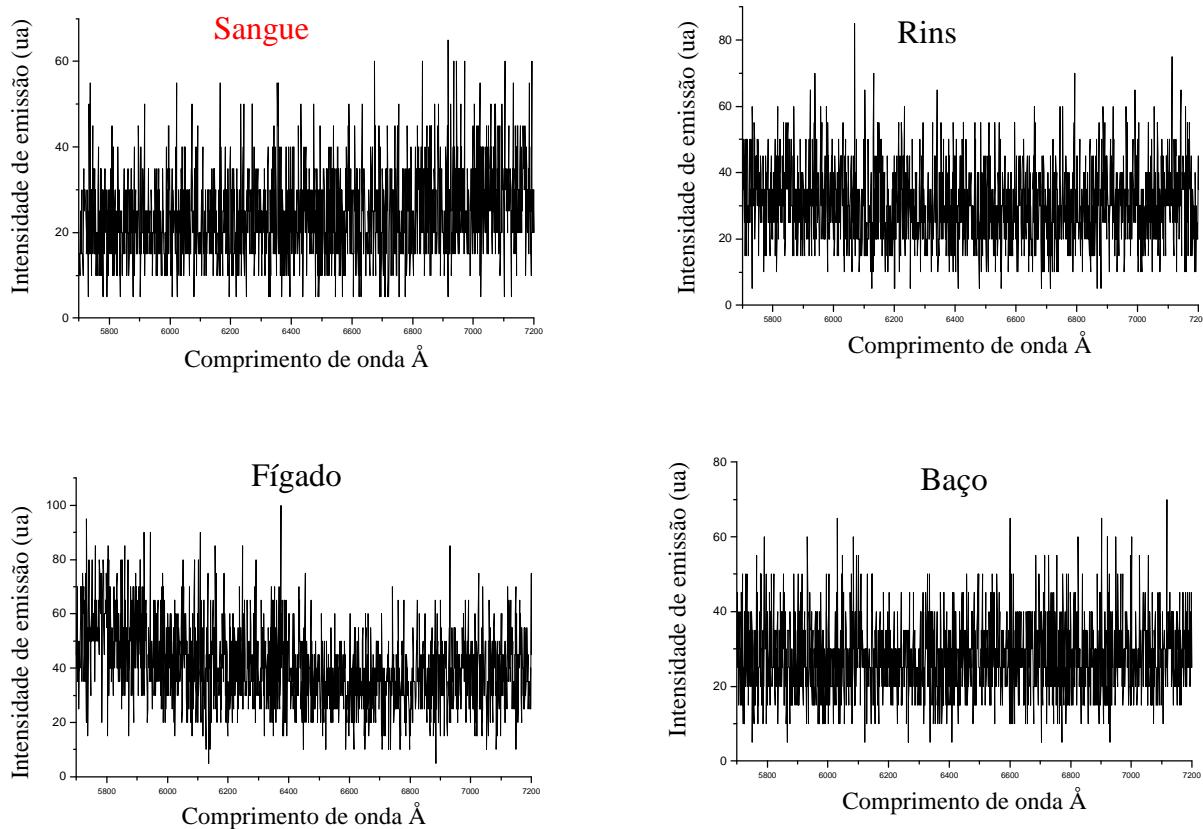


Figura 29 – Espectros de emissão das amostras de sangue, rins, fígado e baço na região de $5700 - 7200 \text{ Å}$ ($\lambda_{\text{excitação}} = 350 \text{ nm}$)

Os espectros de emissão das amostras de sangue e dos tecidos apresentaram praticamente apenas luz espalhada.

EXPERIÊNCIAS REALIZADAS NO SANGUE (*IN VIVO*)

A finalidade do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ incorporado em nanoesferas é o desenvolvimento de um processo de rastreamento fotônico *in vivo*. Para isso, testes em ambiente sanguíneo *ex-vivo* foram realizados com os complexos livres e incorporados em nanoesferas.

O sangue permanece na forma líquida enquanto estiver em contato com as superfícies internas do coração (endocárdio) e dos vasos sanguíneos (endotélio), graças a um complexo equilíbrio físico-químico, porém quando em contato com qualquer outro tipo de superfície, tal equilíbrio se altera e o sangue tende a coagular:

ao entrar em contato com qualquer superfície não revestida pelo endotélio, ocorre um conjunto de alterações no sangue, que resultam na conversão de uma proteína, o fibrinogênio, em um complexo de proteínas insolúveis, a fibrina, que é a matriz do coágulo, etapa final dos fenômenos da coagulação. Daí o uso dos anticoagulantes⁸⁸, os quais interfere nestas etapas de coagulação inibindo, de certa forma, a coagulação do sangue.

Testes preliminares de soluções sanguíneas com EDTA mostraram a extrema instabilidade dos complexos $\text{Ln}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ ($\text{Ln} = \text{Tb}^{3+}$ ou Eu^{3+}) na presença do anticoagulante. Há uma total supressão da luminescência dos complexos.

Experiências realizadas com o complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ incorporado nas nanoesferas, em ambiente sanguíneo, novamente mostraram a total supressão da luminescência do complexo. Pôde-se, ainda, constatar nítida diferença da ação do anticoagulante em relação aos nanomarcadores nas formulações sobrenadante e precipitado: a supressão da luminescência do complexo é muito mais rápida quando o sobrenadante entra em contato com solução de anticoagulante quando comparado ao precipitado. Desse modo tais estudos mostraram a presença de anticoagulante no sangue como o agente desta supressão, mesmo quando o complexo está incorporado nas nanoesferas.

A supressão da luminescência é, porém, minimizada quando na presença de hidróxido de potássio. A adição de solução de KOH no sangue provoca imediata precipitação de aglomerados escuros, e a posterior adição do nanomarcador permite a observação da luminescência na solução, porém o inverso não acontece, após a adição de nanomarcadores no sangue (com anticoagulante), a supressão da luminescência não é revertida com a adição posterior de KOH.

A luminescência dos complexos incorporados em nanoesferas em ambiente sanguíneo (*ex vivo*), pôde ser observada na ausência de anticoagulante. Porém, a adição posterior de KOH provoca certa supressão da luminescência do nanomarcador.

Devido aos resultados obtidos com o uso de EDTA como anticoagulante no sangue, foram realizados estudos da ação de outros anticoagulantes de menor ação complexante em relação ao complexo nanomarcador, obtendo a seguinte relação decrescente de supressão da luminescência do nanomarcador em relação a espécie anticoagulante: EDTA > Citrato de sódio (3,8 % p/v) > Heparina.

⁸⁸ Caliskan, S.; Kuralay, F.; Onvural, B. *Clin. Chim. Acta* **2001**, 309, 53.

A heparina⁸⁹, portanto, é o anticoagulante com menor ação supressora da luminescência do nanomarcador, provavelmente devido a sua menor ação complexante.

A instabilidade do complexo incorporado às nanoesferas em meio ácido (TCA) foi constatada, como também em solução tampão. A adição de nanomarcador à solução tampão (pH 7), provocou parcial supressão da sua luminescência e precipitação de aglomerados bastante luminescentes. Aparentemente a presença de solução salina provocou a precipitação do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ incorporado às nanoesferas.

Os testes de luminescência do complexo $\text{Ln}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ ($\text{Ln} = \text{Tb}^{3+}$ ou Eu^{3+}) incorporado às nanoesferas realizados em ambiente sanguíneo (*in vitro*) mostraram a instabilidade do complexo (parcial ou total supressão da luminescência) na presença de anti-coagulantes e pH ácido. Dessa maneira, foi proposta a inclusão as nanoesferas de outra espécie luminescente, mais estável: criptato com lantanídeo.

ESTUDOS DE LUMINESCÊNCIA DE CRIPTATOS DE LANTANÍDEOS INCORPORADOS NAS NANOESFERAS

➤ Criptato $[\text{Eu}^{\text{C}}\text{Bipy.Bipy.PyCO}_2\text{Et}]^{3+}$ em concentração de 40 $\mu\text{g/ml}$ incorporado em nanoesferas.

Os criptatos com íons lantanídeos são bastante conhecidos⁹⁰ e possuem uma ampla aplicação em fluoroimunensiões⁹¹. Isto se deve ao eficiente processo de encapsulação dos cátions, os quais se encontram completamente protegidos do meio. Daí a ampla atuação de criptatos com lantanídeos em solução aquosa⁹² e em ambiente sanguíneo. A maioria dos criptatos apresenta ainda, boa solubilidade em água.

⁸⁹ Petitou, M.; Casu, B.; Lindahl, U. *Biochimie* **2003**, In Press.

⁹⁰ a) Gansow, O. A.; Kausar, A. R. *Inorg. Chim. Acta* **1983**, 72, 39. b) Tabib, J.; Hupp, J. T.; Weaver, M. J. *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 1916. c) Burns, J. H.; Baes, C. F. *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 616. d) Pizer, R.; Selzer, R. *Inorg. Chem.* **1983**, 22, 1359.

⁹¹ a) Mathis, G.; Socquet, F.; Viguier, M.; Darbouret, B. *Anticancer Research* **1997**, 17, 3011. b) Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Manet, I.; Ziessel, R.; Lehn, J.-M. *Méd. Biol. Environn.* **1995**, 23, 101.

⁹² a) Yee, E. L.; Gansow, O. A.; Weaver, M. J. *J. of the Am. Chem. Soc.* **1980**, 102:7, 2278. b) Gansow, O. A.; Kausar, A. R.; Triplett, K. M.; Weaver, M. J.; Yee, E. L. *J. of the Am. Chem. Soc.* **1977**, 99:21, 7087.

O criptato $[\text{Eu} \subset \text{Bipy.Bipy.PyCO}_2\text{Et}]^{3+}$ possui eficientes grupos cromóforos que promovem o efeito antena⁹³. Porém não foi possível observar luminescência do complexo nas formulações das nanoesferas (precipitado e sobrenadante).

➤ Criptato $[\text{Tb} \subset \text{Bipy.Bipy.Bipy}]^{3+}$ em concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ incorporado às nanoesferas

Devido ao insucesso obtido na tentativa anterior, optou-se na inclusão às nanoesferas (sobrenadante e precipitado) de um complexo mais luminescente, criptato $[\text{Tb} \subset \text{Bipy.Bipy.Bipy}]^{3+}$, em maior concentração (100 $\mu\text{g/ml}$). Este criptato apresenta eficientes grupos cromóforos que promovem o aumento da intensidade de luminescência do lantanídeo através do efeito antena⁹⁴.

Pela figura 30, pode-se observar as transições características do íon Tb^{3+} e a sobreposição entre os espectros de emissão do sobrenadante e precipitado, pois o íon Tb^{3+} encontra-se protegido do meio, apresentando suas características luminescentes muito próximas mesmo em diferentes ambientes.

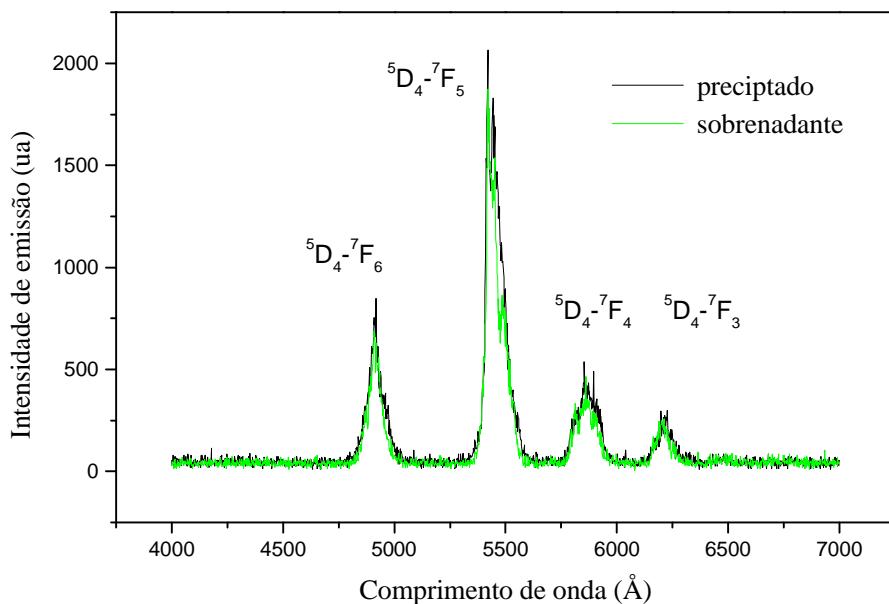


Figura 30 – Espectros de emissão do complexo $[\text{Tb} \subset \text{Bipy.Bipy.Bipy}]^{3+}$ [100 $\mu\text{g/ml}$] incorporado às diferentes formulações de nanoesferas ($\lambda_{\text{excitação}} = 330 \text{ nm}$)

⁹³ Galembeck, A.; Amorim, M. S.; Bazin, H.; Mathis, G.; Donegá, C. M.; de Sá, G. F.; Jr., S. A. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2002**, 374, 267.

⁹⁴ a) Sabbatini, N; Guardigli, M.; Lehn, J-M. *Coord. Chem. Rev.* **1993**, 123, 201. b) Alpha, B.; Ballardini, R.; Balzani, V.; Lehn, J-M. *Photoch. and Photobiol.* **1990**, 52, 299.

A formulação das nanoesferas com o criptato $[\text{Tb} \subset \text{Bipy.Bipy.Bipy}]^{3+}$ apresentou aspecto inomogêneo, aparentemente com precipitação de partículas luminescentes. De alguma forma, o criptato de Tb^{3+} interferiu na formulação das nanoesferas.

Após os estudos de luminescência e estabilidade dos complexos fotônicos incorporados às nanoesferas em diferentes ambientes, o complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ mostrou-se o mais eficiente marcador fotônico para a incorporação nas nanoesferas e promissor precursor para o rastreamento luminescente *in vivo*.

AVALIAÇÃO NA CITO TOXIDADE DE COMPLEXOS DE LANTANÍDEOS

Com o objetivo de se determinar o limite de concentração tolerável dos complexos de lantanídeos em sistemas biológicos, foram realizados testes de citotoxicidade dos complexos $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$, $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{-fen}$ e $\text{Er}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$. O efeito citotóxico dos complexos, todos dissolvidos em DMSO, foram avaliados em células NCI-H 292, através do método colorimétrico MTT.

Nas primeiras relações de concentração utilizadas, como pode ser observado na figura 31, a menor concentração usada já extrapolava a percentagem máxima de células mortas.

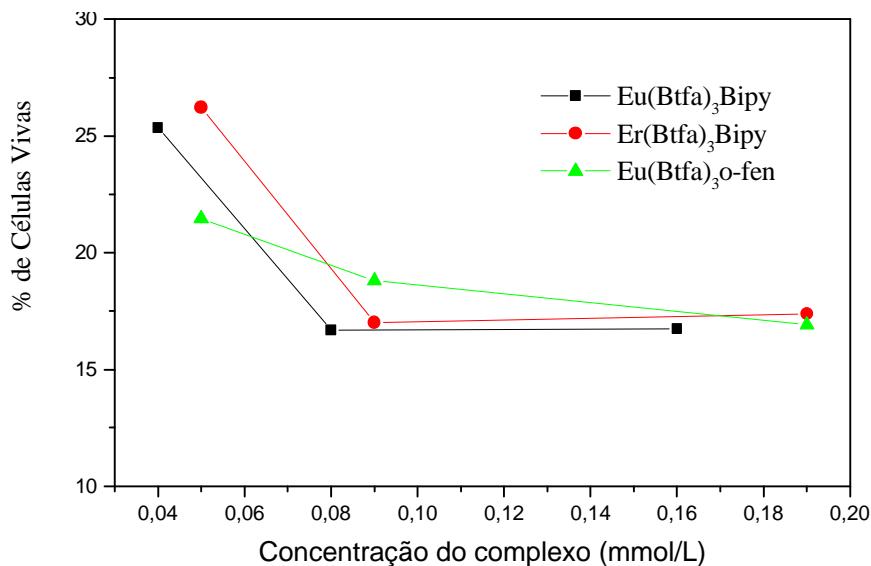


Figura 31 – Porcentagem de células vivas em relação a concentração utilizada de complexo luminescente

Como pode observar pela tabela III, a menor concentração utilizada de Eu(Btfa)₃Bipy já ocasionava a morte de praticamente 75% das células.

Tabela III – Relações de porcentagem de células vivas frente a concentrações relativamente altas dos complexos luminescentes

| | Concentração do Complexo (mmol/L) | % de Células Vivas |
|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Controle | 0,00 | 100,00 |
| Eu(Btfa) ₃ Bipy | 0,16 | 16,74 |
| | 0,08 | 16,69 |
| | 0,04 | 25,35 |
| | 0,19 | 17,38 |
| Er(Btfa) ₃ Bipy | 0,09 | 17,01 |
| | 0,05 | 26,23 |
| | 0,19 | 17,01 |
| Eu(Btfa) ₃ o-fen | 0,19 | 16,91 |
| | 0,09 | 18,81 |
| | 0,05 | 21,45 |

Devido aos resultados mostrados acima, repetiu-se o teste utilizando-se menores concentrações dos complexos (figura 32).

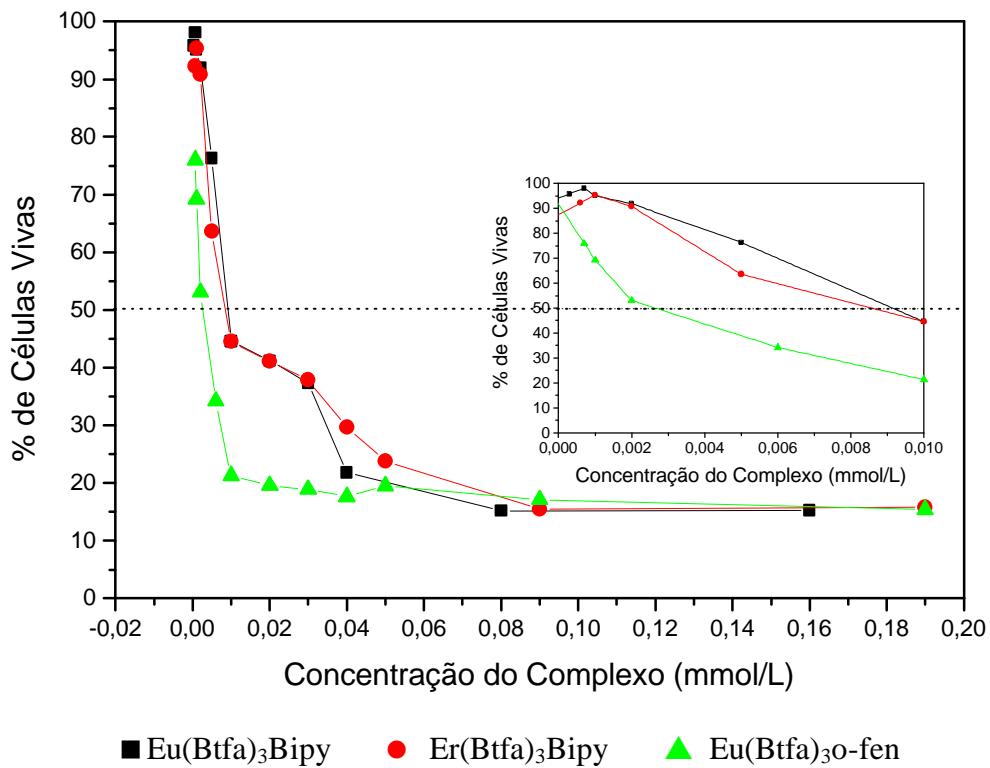


Figura 32 – Porcentagem de células vivas para concentrações mais baixas dos complexos

Tabela IV - Relações de porcentagem de células vivas frente a concentrações mais baixas dos complexos luminescentes

| Eu(Btfa)₃Bipy | | Er(Btfa)₃Bipy | | Eu(Btfa)₃o-fen | |
|---------------------------------|------------|---------------------------------|------------|----------------------------------|------------|
| Concentração mmol/L | % C. Vivas | Concentração mmol/L | % C. Vivas | Concentração mmol/L | % C. Vivas |
| 0,16 | 15,23 | 0,19 | 15,81 | 0,19 | 15,38 |
| 0,08 | 15,18 | 0,09 | 15,47 | 0,09 | 17,11 |
| 0,04 | 21,83 | 0,05 | 23,86 | 0,05 | 19,51 |
| 0,03 | 37,35 | 0,04 | 29,64 | 0,04 | 17,63 |
| 0,02 | 41,17 | 0,03 | 37,93 | 0,03 | 18,93 |
| 0,01 | 44,54 | 0,02 | 41,10 | 0,02 | 19,54 |
| 0,05x10 ⁻¹ | 76,33 | 0,01 | 44,51 | 0,01 | 21,32 |
| 0,02x10 ⁻¹ | 91,92 | 0,05x10 ⁻¹ | 63,64 | 0,06x10 ⁻¹ | 34,21 |
| 0,01x10 ⁻¹ | 95,16 | 0,02x10 ⁻¹ | 90,83 | 0,02x10 ⁻¹ | 53,04 |
| 0,07x10 ⁻² | 98,09 | 0,01x10 ⁻¹ | 95,40 | 0,01x10 ⁻¹ | 69,24 |
| 0,03x10 ⁻² | 95,80 | 0,06x10 ⁻² | 92,22 | 0,07x10 ⁻² | 76,02 |

Analizando-se as tabelas III e IV e os gráficos (31 e 32) pode-se observar a nítida diferença no comportamento citotóxico dos complexos com os diferentes ligantes. O complexo Eu(Btfa)₃o-fen apresentou bem maior citotoxicidade frente aos outros complexos. Não foi observado diferença significativa entre os complexos

$\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ e $\text{Er}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$, mostrando que a ação maior na citotoxicidade se deve aos ligantes coordenados, e não ao lantanídeo.

O complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ passa a ser o mais adequado a ser utilizado como sonda *in vivo*, em concentrações no máximo em torno de $10 \mu\text{g/ml}$, ou seja 10^{-5} mol/L , concentração esta, compatível com os limites de detecção do espectrofotômetro utilizado, com detecção por fotomultiplicadora tipo RCA C31034-02-RF refrigerada por Peltier.

ESTUDOS *IN VIVO*

Após a administração intravenosa do nanomarcador (nanoesferas + $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$) em camundongos, um estudo cinético foi realizado de amostras de sangue (sem anti-coagulante), rins, fígado e baço.

Na 1^a hora do nanomarcador em circulação na corrente sanguínea, a luminescência do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ pôde ser detectada no sangue do camundongo (figura 33). O espectro de emissão foi registrado em torno da região da transição hipersensitiva $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ do íon Eu^{3+} , transição esta de maior intensidade.

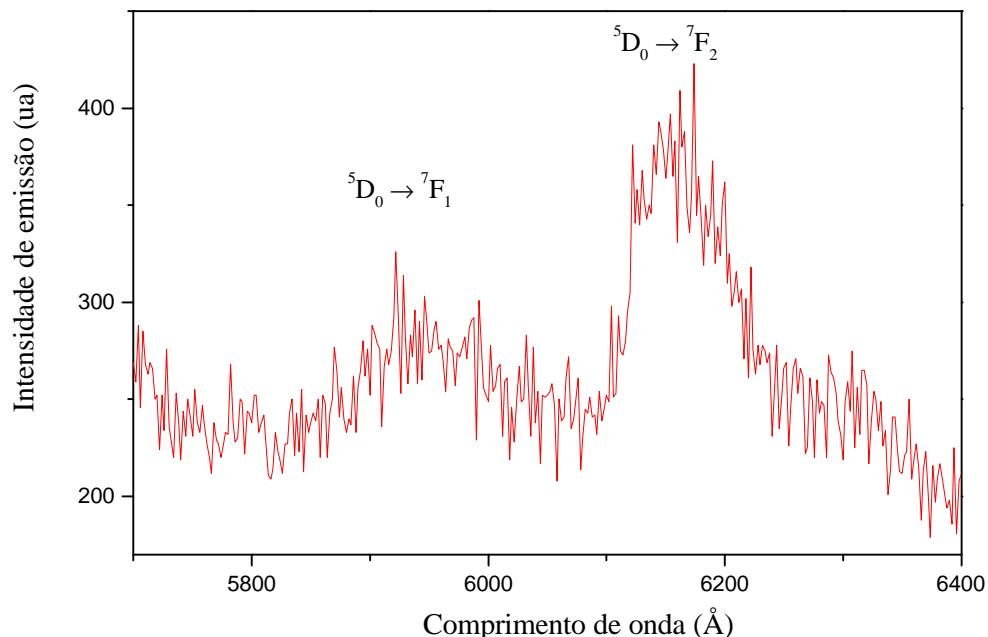


Figura 33 – Espectro de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ no sangue na primeira hora de circulação na corrente sanguínea do camundongo ($\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$)

Não se detectou luminescência alguma nas amostras de tecidos de fígado, baço e rins, também retiradas do animal na primeira hora de administração dos nanomarcadores na corrente sanguínea.

Na 6^a hora de administração dos nanomarcadores nos camundongos, as amostras colhidas (sangue, fígado, rins e baço) não apresentaram luminescência. Tal resultado se reproduziu para as amostras retiradas na 24^a hora. Resolveu-se, com isso, interromper o estudo da cinética e consequentemente sacrificar os animais utilizados.

No intuito de se evitar possíveis autofluorescências dos tecidos das amostras coletadas, várias tentativas de extrações com álcool foram realizadas, com amostras de sangue, fígado, baço e rins, referentes aos camundongos, sem resultados significativos.

No caso da amostra coletada na 1^a hora de circulação, após a sexta hora *in vitro* a luminescência do complexo permaneceu inalterada, ao contrário da amostra coletada na 6^o hora *in vivo*, indicando a possível interação do sistema imunológico do animal.

Após a administração intravenosa, nanopartículas (convencionais) são rapidamente recobertas por proteínas plasmáticas constituintes do sangue. Assim, proteínas adsorvidas ou ligadas na superfície de nanopartículas promovem o reconhecimento e captura por **células fagocitárias** do sistema retículo endotelial (SRE)⁹⁵ limitando, dessa forma, a eficiência das nanopartículas em carreadores de fármacos no organismo, sendo vantajoso somente para doenças no sistema reticuloendotelial, devido à alta concentração de agentes farmacêuticos no fígado, baço ou rins. Porém, vem sendo desenvolvidas nanopartículas biodegradáveis com superfície modificada com um polímero hidrofílico, flexível e não-iônico (partículas do tipo núcleo-coroa)⁹⁶, promovendo uma barreira estérica ao redor das partículas capaz de repelir as proteínas plasmáticas, fazendo com que não sejam reconhecidas pelo sistema fagocitário e consequentemente sendo direcionadas a uma célula alvo, além de longa permanência no sangue.

Mesmo utilizando-se nanoesferas do tipo núcleo-coroa, é possível ainda que o comportamento das proteínas adsorvidas ou ligadas na superfície das nanopartículas promova o reconhecimento e captura por células fagocitárias, conforme constatado

⁹⁵ Stolnik, S.; Illum, L.; Davis, S.S. *Adv. Drug Del. Rev.* **1995**, 16, 195.

⁹⁶ Peracchia, M. T.; Vauthier, C.; Passirani, C.; Couvreur, P.; Labarre, D. *Life Sci.* **1997**, 61, 749.

pela supressão da luminescência do complexo após a 6^a hora *in vivo*. Não foi detectado, no entanto, luminescência nos tecidos dos rins, fígado e baço.

Pretende-se, com isto, desenvolver um mecanismo para o estudo de **resposta imunológica** através da supressão de luminescência de nanomarcadores.

Os espectros de emissão de amostras recolhidas de tecidos dos animais, após várias horas *ex vivo*, apresentaram alterações (figura 34), provavelmente associada à decomposição com possível formação de subprodutos.

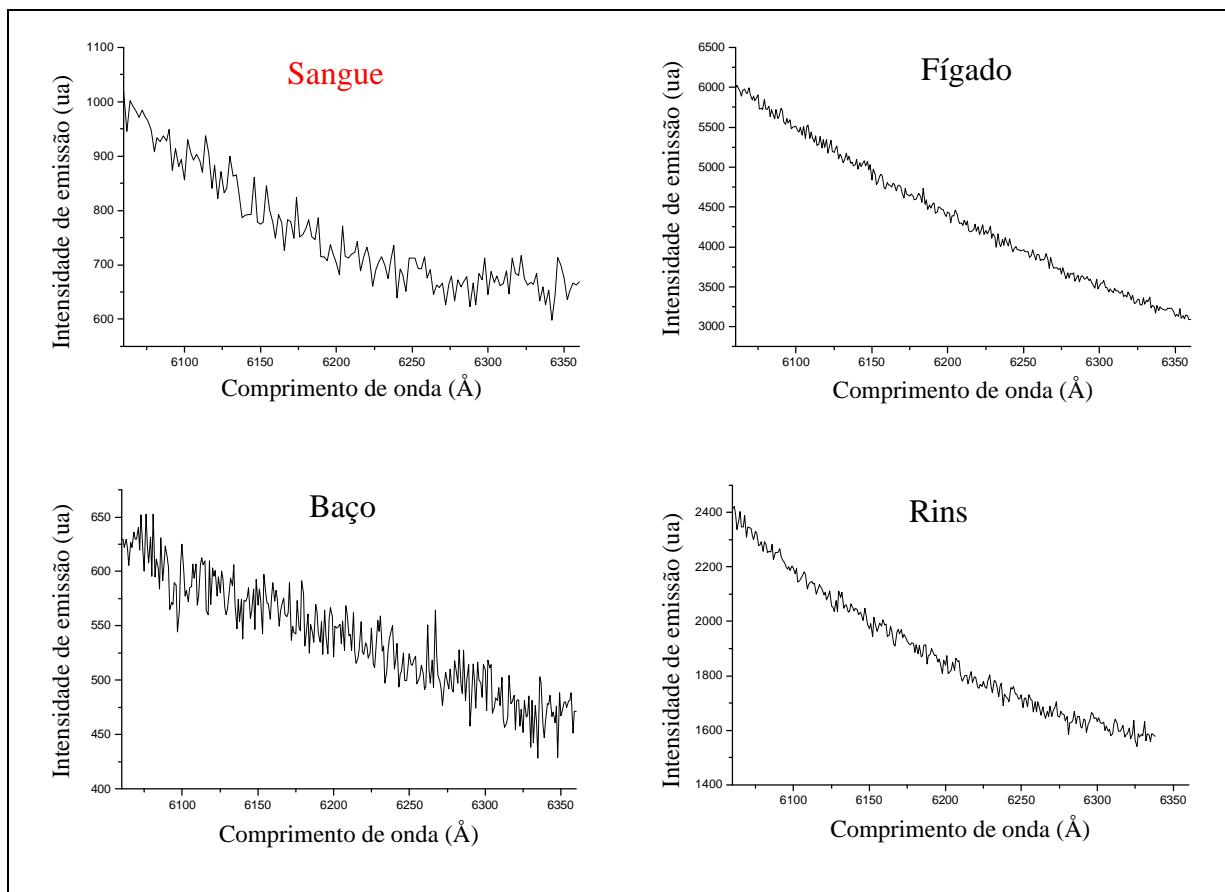


Figura 34 – Espectros de emissão das amostras de tecidos (sangue, fígado, rins e baço)

recolhidas do animal após várias horas *ex vivo* ($\lambda_{\text{excitação}} = 360 \text{ nm}$)

ESTUDOS DE LUMINESCÊNCIA DOS COMPLEXOS DE LANTANÍDEOS INCORPORADOS EM NANOCÁPSULAS

- Complexo de $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$ com concentração de 1 mg/ml incorporado nas nanocápsulas

Mesmo utilizando-se uma alta concentração do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{Bipy}$, não foi possível se observar luminescência do íon Eu^{3+} em nanocápsulas (nas formas de suspensão em água ou liofilizada).

Com o objetivo de se elucidar o motivo da ausência de luminescência do complexo incorporado nas nanocápsulas, foram realizados estudos de absorção eletrônica dos precursores (constituintes das nanocápsulas), como também da formulação total.

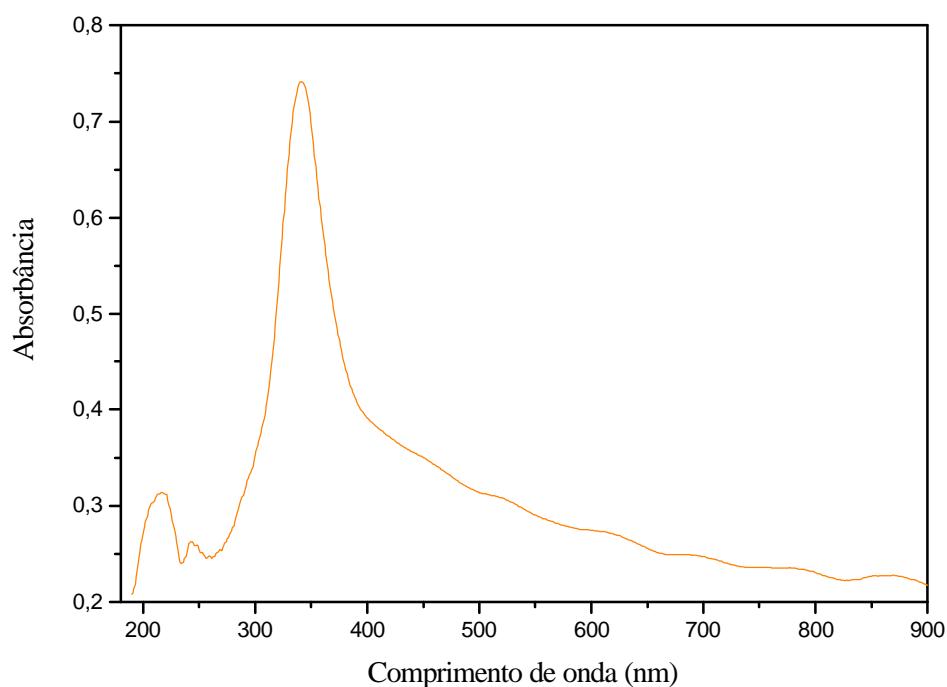


Figura 35 – Espectro de absorção das nanocápsulas (formulação total)

Ao observar o espectro de absorção das nanocápsulas (figura 35), pôde-se constatar o máximo de absorção na região em torno de 350 nm, absorção esta referente ao ácido úsnico, composto ativo na formulação, pois os demais constituintes da formulação não apresentaram nenhuma absorção na região espectral do UV-visível.

O complexo Eu(Btfa)₃Bipy, como pode ser observado pela figura 36, apresenta máximo de excitação, também na região de 350 nm .

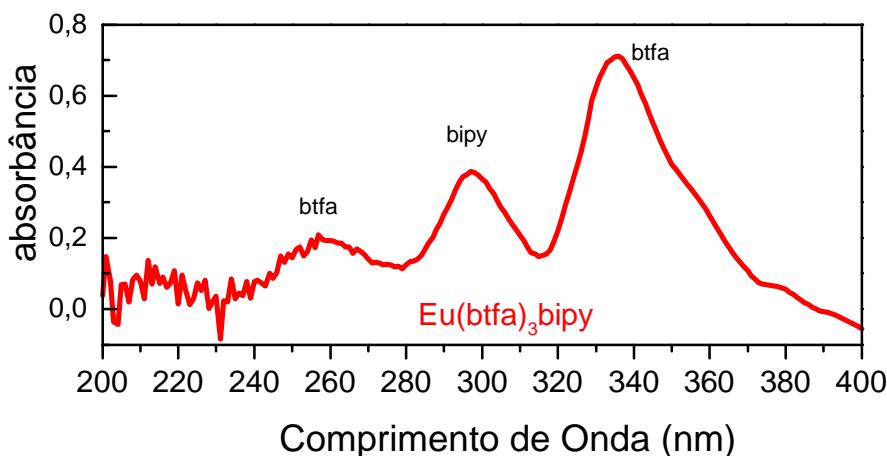


Figura 36 – Espectro de absorção do complexo Eu(Btfa)Bipy [10⁻⁴M]

Acredita-se que a coincidência entre o máximo de excitação do complexo e o máximo de absorção da nanoesfera, seja a causa da ausência de luminescência apresentada pelo complexo Eu(Btfa)₃Bipy incorporado às nanocápsulas. Buscou-se, dessa forma, outro complexo de β -dicetona com íon Eu³⁺, com o máximo de excitação em região espectral diferente.

O complexo Eu(Btfa)₃-o-fen apresenta o máximo de excitação em torno de 300 nm, porém, novamente não foi possível observar luminescência do complexo incorporado às nanocápsulas, mesmo formulações sem a presença do ácido úsnico.

TESTE DE LUMINESCÊNCIA DO COMPLEXO EU(Btfa)₃-o-fen INCORPORADO EM MICROESFERAS

A uma formulação de microesfera, constituída basicamente de polímero PLGA e ácido úsnico, foi incorporado o complexo Eu(Btfa)₃-o-fen em concentração de 1mg/ml. Resultou em um **micromarcador** com altíssima luminescência, como pode ser observado no espectro (figura 37), não confirmando a suposta ação supressora de luminescência do ácido úsnico.

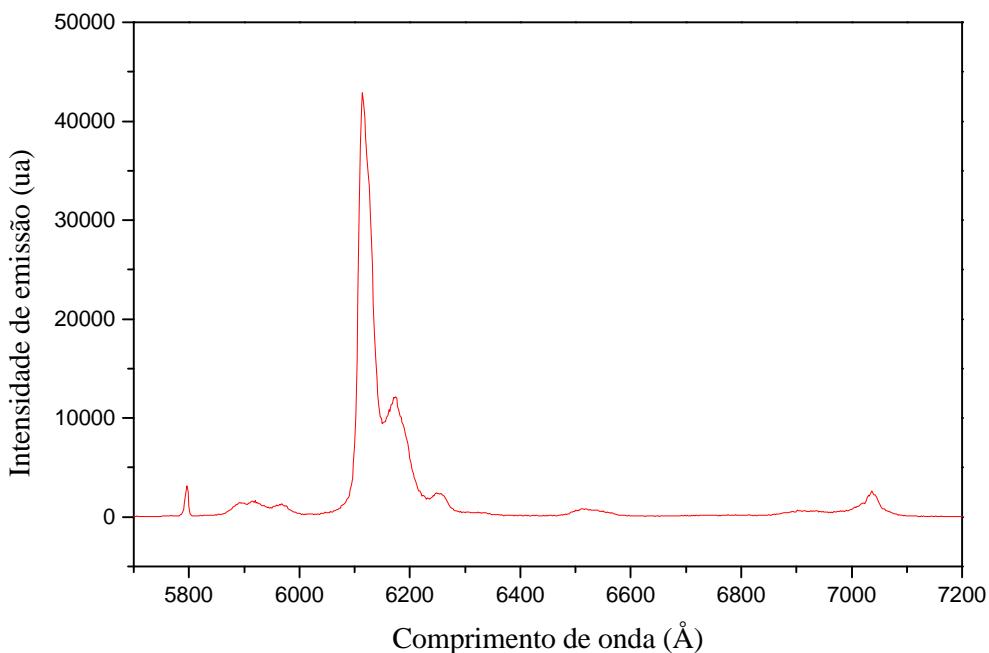


Figura 37 – Espectro de emissão do complexo $\text{Eu}(\text{Btfa})_3\text{o-fen}$ incorporado às microesferas
 $(\lambda_{\text{excitação}} = 355 \text{ nm})$

Com este resultado pôde-se chegar a duas propostas para a provável causa da ausência de luminescência dos complexos de Eu^{3+} incorporados supostamente no interior das nanocápsulas (na parte oleosa):

- A suposta presença do complexo luminescente apenas no interior da nanocápsula, impossibilitando a radiação UV ultrapassar a camada (parede) polimérica, e consequentemente impedindo a excitação do complexo. Porém, esta suposição é pouco provável, já que o mesmo polímero encontra-se presente nas microesferas, onde a forte luminescência do európio pode ser observada, como mostra a figura 37 acima;

- Estando o complexo apenas na parte interna da nanocápsula, a luminescência vermelha emitida pelo íon Eu^{3+} sofreria inúmeras reflexões internas devido à variação do índice de refração na parede das nanocápsulas, até total supressão dessa luminescência. A luminescência ficaria “aprisionada” no interior da nanocápsula até ser suprimida por perdas não radiativas.

MEDI DAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (EELS)

Com o propósito de detecção do íon Eu³⁺ nas nanopartículas obtidas, amostras das formulações de nanoesferas e nanocápsulas contendo o complexo Eu(Btfa)₃Bipy foram preparadas para medidas de espectroscopia de perda de energia de elétrons (EELS – *Electron energy-loss spectrometry*) acoplado a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Essas medidas foram feitas com a colaboração do Grupo do Prof. Fernando Galembeck, do Instituto de Química da UNICAMP.

A EELS é bastante usada em microquímica, pois constitui uma rica fonte de informações sobre a composição química (elementar) da amostra. Esta técnica depende da formação e análise de elétrons de energias relativamente baixas. Por outro lado, a resolução em energia que pode ser alcançada é muito alta, permitindo, por exemplo, a distinção entre carbono de CaCO₃ e carbono BaCO₃, sendo dessa forma muito sensível ao ambiente químico do elemento.

O feixe emergente é monocromado, e os elétrons que sofreram diferentes perdas de energia são contados.

Espectros de perda de energia podem ser obtidos ponto a ponto, em uma imagem; o seu processamento fornece mapas de distribuição elementar, de alta resolução.

O maior objetivo era determinar a presença do complexo Eu(Btfa)₃Bipy nas nanocápsulas, dentro da cavidade e/ou disperso pela superfície do polímero. Porém tais amostras apresentaram-se pouco resistentes à exposição ao feixe de elétrons com foco bastante concentrado utilizado na análise EELS, resultando na decomposição do material e impedindo a continuação da análise. As tentativas de fixação das nanopartículas (liofilizadas ou em suspensão) através de Poli L-Lisina também não foram bem sucedidas. A figura abaixo (figura 38) mostra imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão de amostra de nanocápsulas (PLGA com ácido úsnico encapsulado).

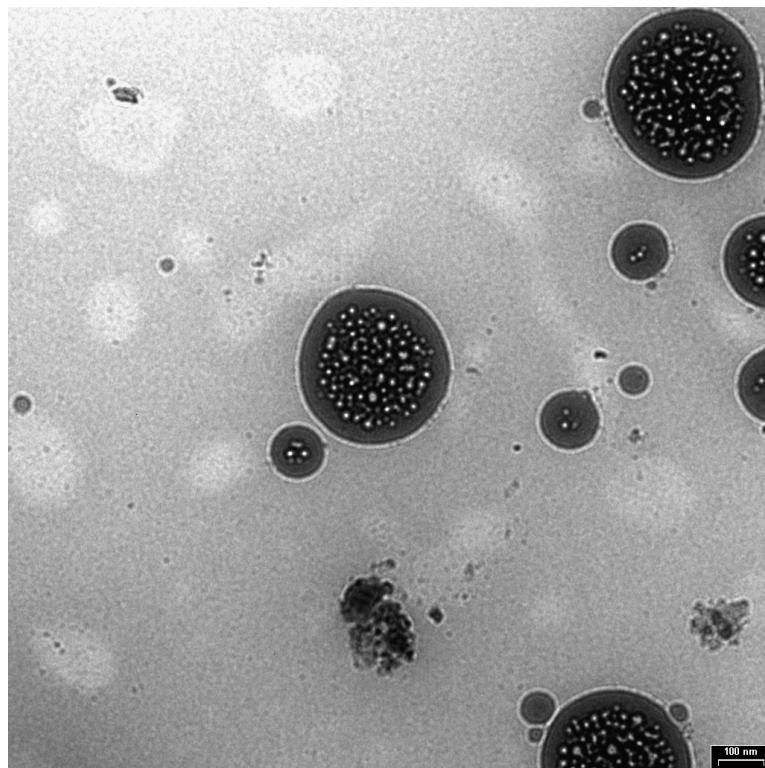


Figura 38 – Micrografia (MET) de nanocápsulas (PLGA com ácido úsnico encapsulado).

A barra abaixo e à direita tem dimensão de 100 nm

A imagem obtida mostra a nítida camada polimérica e o interior oleoso das nanocápsulas.

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A termogravimetria (TG) é uma técnica de termoanálise útil para caracterização de decomposição e estabilidade térmica de materiais a partir da análise de perda de massa durante evolução térmica. Pode ser processada sob uma variedade de condições e para examinar a cinética de processos físico-químicos ocorridos nas amostras.

Assim, análises termogravimétricas foram realizadas no intuito de se estudar a estabilidade térmica das nanopartículas, como também as possíveis variações desta estabilidade em função das formulações e quando na presença de certos agentes.

➤ Nanoesferas

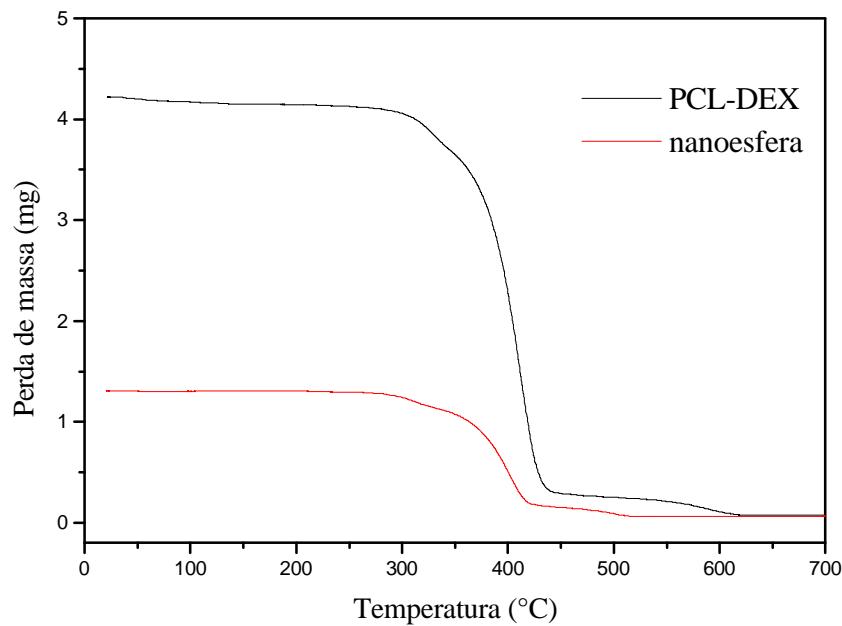


Figura 39 – Curvas de TGA (10°C/min, fluxo de N₂) das amostras de nanoesferas e PCL-Dex

A figura 39 mostra que o termograma obtido para as nanoesferas é basicamente o mesmo que o referente ao polímero precursor (PCL-DEX), indicando que não há alteração na estabilidade térmica do polímero, quando na forma de nanoesferas.

➤ Nanocápsulas

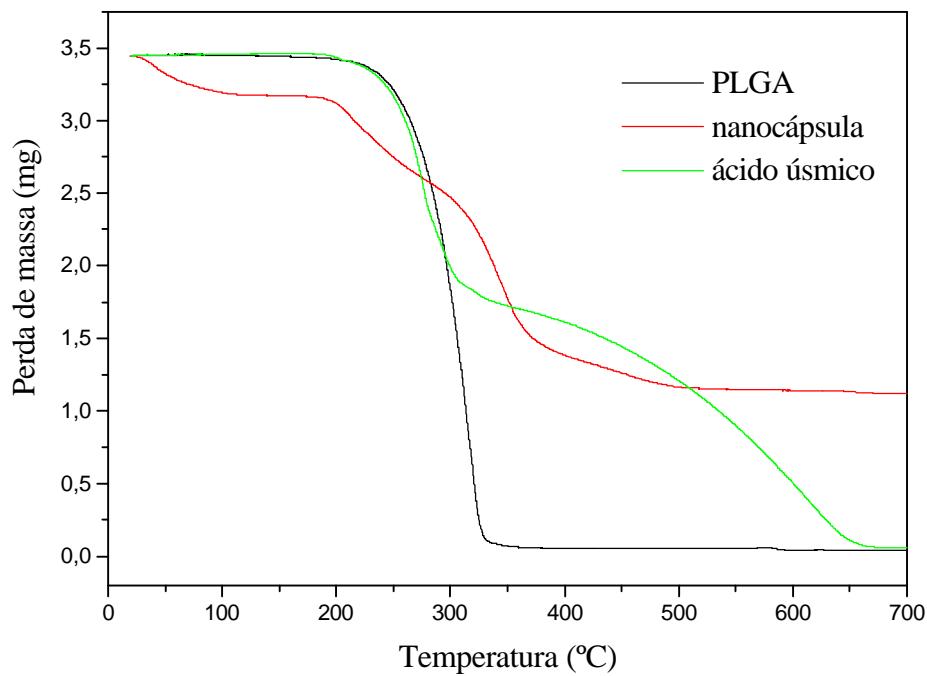


Figura 40 – Curvas normalizadas pela massa inicial, de TGA (10°C/min, fluxo de N₂) das nanocápsulas e seus precursores

Como pode ser observado na figura 40, o termograma referente à nanocápsula apresenta características associadas aos seus precursores (PLGA e ácido úsnico), no entanto, identifica-se:

- Diminuição nas temperaturas de decomposição, implicando em menor estabilidade térmica do material;
- Presença de subproduto de decomposição no final do ciclo de aquecimento;
- Presença de água de hidratação, mesmo na amostra liofilizada, identificada por perda de massa em torno de 100°C.

➤ Microesferas

Ao contrário das nanocápsulas, o termograma mostrado na figura 41 mostra um aumento de estabilidade térmica das microesferas em relação aos seus precursores. Observa-se ainda, pelos mesmos termogramas, ausência de produto sólido de decomposição térmica.

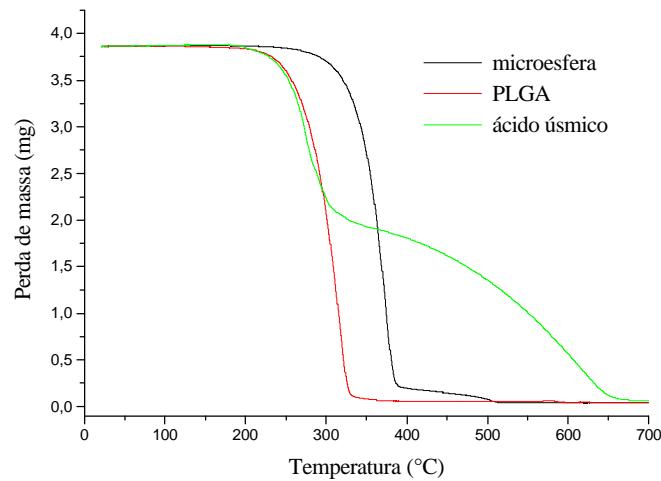


Figura 41– Curvas normalizadas pela massa inicial, de TGA (10°C/min, fluxo de N₂) das microesferas e seus precursores

VI - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

➤ Faz-se necessário maiores estudos para a otimização das estratégias de síntese de complexos macrocíclicos para se obter precursores específicos para rastreamento por infravermelho;

➤ Para a classe de nanorastreadores fotônicos por excitação ultravioleta, os testes de citotoxicidade e os estudos de espectroscopia de luminescência (extra-vivo) mostraram o complexo Eu(Btfa)₃Bipy ser o mais adequado ao uso em sistemas biológicos. Nanocápsulas não apresentaram propriedades fotônicas, após inclusão do mesmo complexo;

➤ Estudo *in vivo* com nanoesferas - Após a administração intravenosa do nanomarcador em camundongos, um estudo cinético foi realizado das amostras de sangue (sem anticoagulante), rins, fígado e baço, monitorado por espectroscopia de emissão do íon Eu³⁺, explorando efeito antena de ligantes:

- Após a primeira hora de administração do nanomarcador - detecção de luminescência do complexo no sangue;
- Após a sexta hora *in vivo* - ausência de luminescência do complexo no sangue;
- Após a sexta hora *ex vivo* - presença de luminescência do complexo no sangue.

Foi possível se detectar a luminescência do nanomarcador fotônico durante a primeira hora em circulação no sangue. Após a sexta hora, é possível que as proteínas plasmáticas constituintes do sangue, adsorvidas ou ligadas na superfície dos nanomarcadores, promovam o reconhecimento e a captura por células fagocitárias. Não foi detectado, no entanto, luminescência nos tecidos dos rins, fígado e baço.

➤ Estudos mais detalhados estão sendo programados para se evitar a supressão da luminescência dos nanomarcadores, no entanto, como principal perspectiva, está sendo estudado um mecanismo para o estudo de resposta imunológica através da supressão de luminescência de nanomarcadores fotônicos, através do mecanismo acima proposto. Em se tratando de processo inédito, uma patente está sendo depositada, e novas medidas da dinâmica da supressão da luminescência *in vivo* estão programadas.

ANEXO I

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Sá, G. F.; Auzel, F.; Santa-Cruz, P. A. *Rev. Phys. Appliquée*. **1985**, *20*, 273.
- 2 - Sá, G. F. Santa-Cruz, P. A.; Malta, O. L.; Auzel, F., Y. *J. Lumin.* **1984**, *31-32*, 693
- 3 - Christou, V.; Salata, O. V.; Ly, T. Q.; Capecchi, S.; Bailey, N. J.; Cowley, A.; Chippindale, A. M. *Synthetic Metals* **2000**, *111-112*, 7.
- 4 - Phimphivong, S.; Saavedra, S. S. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 350.
- 5 - O'Hara, P. B.; Bersohn, R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 5269.
- 6 - Horrocks, W. DeW., Jr.; Sudnick, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 334.
- 7 - Cronce, D. T.; Horrocks, W. DeW., Jr. *Biochemistry* **1992**, *31*, 7963.
- 8 - Mazor, O.; Boisferon, M. H.; Lombet, A.; Gruaz-Guyon, A.; Gayer, B.; Skrzypdelsky, D.; Kohen, F.; Forgez, P.; Scherz, A. *Anal. Biochem.* **2002**, *301*, 75
- 9 - Sokolnicki, J.; Legendziewicz, J.; Amirkhanov, W.; Ovchinnikov, V.; Macalik, L.; Hanuza, J. *Spectrochimica Acta Part A* **1999**, *55*, 349.
- 10 - a) Parker, D.; Dickins, R. S.; Puschmann, H.; Crossland, C.; Howard, J. A. K. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1977; b) Brough, A. R.; Grey, C. P.; Dobson, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7318; c) Bertini, I.; Janik, M. B. L.; Lee, Y.-M.; Luchinat, C.; Rosato, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4181.
- 11 - Glover-Fischer, D. P.; Metcalf, D. H.; Hopkins, T. A.; Pugh, V. J.; Chisdes, S. J.; Kankare, J.; Richardson, F. S. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 3026.
- 12 - Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 901.
- 13 - Serpaggi, F.; Férey, G.; Antic-Fidancev, E. *J. Sol. St. Chem.* **1999**, *347*.
- 14 - Wu, S. L.; Horrocks, W. DeW., Jr. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 394.
- 15 - a) Frey, S. T.; Chang, C. A.; Carvalho, J. F.; Varadarajan, A.; Schultze, L. M.; Pounds, K. L.; Horrocks, W. DeW., Jr. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 2882. b) Bünzli, J.-C. G.; Plancherel, D.; Pradervand, G.-O. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 980.
- 16 - Albin, M.; Farber, G. K.; Horrocks, W. DeW., Jr. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 1648.
- 17 - Choppin, G. R.; Peterman, D. R. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *174*, 283.
- 18 - Song, C. X.; Labhasetwar, V.; Murphy, H.; Qu, X.; Humphrey, W. R.; Shebuski, R. J.; Levy, R. J. *J. Cont. Rel.* **1997**, *43*, 197.
- 19 - Santos-Magalhães, N. S.; Pontes, A.; Pereira, V. M. W.; Caetano, M. N. P. **2000**, *208*, 71
- 20 - Barrat, G. M. *Pharm. Sci. Tech. Today* **2000**, *3*, 163.
- 21 - García del Barrio, G.; Novo, F. J.; Irache, J. M. *J. Cont. Rel.* **2003**, *86*, 123.
- 22 - Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.; Ammoury, N.; Benita, S. *Int. J. of Pharm.* **1989**, *55*, R1

23 - Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. *Adv. Drug Del. Rev.* **2002**, *54*, 631.

24 - Shen, J. Y.; Lochhead, M. J.; Bray, K. L. Chen, Y.; Dumesic, J.A. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 2384.

25 - Reisfeld, R.; Gaft, M.; Saridarov, T.; Panczer, G.; Zelner, M. *Mat. Lett.* **2000**, *45*, 154.

26 - Haase, M.; Riwotzki, K.; Meyssamy, H.; Kornowski, A. *J. All. Comp.* **2000**, *303-304*, 191.

27 - Orellana, A.; Laukkanen, M.-L.; Keinänen, K. *Biochim. et Biophys. Acta* **1996**, *1284*, 29.

28 - Qian, D.-J.; Liu, H.-G.; Huang, H.-X.; Fu, Q.; Feng, X.-S. *Mat. Lett.* **2001**, *51*, 525.

29 - Härmä, H.; Soukka, T.; Lövgren, T. *Clin. Chem.* **2001**, *47:3*, 561.

30 - Lehn, J.-M. "Supramolecular Chemistry Concept and Perspectives" **1995**, Wienheim-New York.

31 - Fischer, E. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985.

32 - a) Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017; b) Pedersen, C. J. *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1053.

33 - Lehn, J.-M. *Struct. Bonding* **1973**, *16*, 1.

34 - Lehn, J.-M. *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 871.

35 - Yui, N. "Supramolecular Design for Biological Applications" **2002**, CRC Press, New York.

36 - a) Cram, D. J.; Cram, J. M. "Container Molecules and Their Guests" Monographs in Supramolecular Chemistry, **1997**, Series Editor J. Fraser Stoddart, University of California, Los Angeles, USA; b) Cram, D. J.; Cram, J. M. *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 8.

37 - a) Cabbines, D. K.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6540; b) Cabbines, D. K.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2151; c) Busch, D. H.; Stephenson, N. A. *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *100*, 119.

38 - Martell, A. E.; Hancock, R. D.; Motekaitis, R. J. *Coord. Chem. Rev.* **1994**, *133*, 39.

39 - Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V.; Tantikunwatthana, N.; Ngampaiboonsombut, O.; Seangprasertkij-Magee, R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3985.

40 - Vögtle, F. "Supramolecular Chemistry An Introduction" **1991**, John Wiley & Sons Ltd, England.

41 - Lehn, J.-M. *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 91.

42 - Buschmann, H.-J. *Inorg. Chim. Acta* **1985**, *105*, 59

43 - Lehn, J.-M. *Acc. Chem. Res.*, **1978**, *11*, 49.

44 - Pedersen, C. J. *Aldrichim. Acta* **1971**, *4*, 1.

45 - Krakowiak, K. E.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M.; Zamecka-Krakowiak, D. J. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4061

46 - Izatt, R. M.; Bradshaw, J. S.; Nielsen, S. A.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J. *Chem. Rev.* **1985**, *85*, 271

47 - Sutherland, I. O. *Chem. Soc. Rev.* **1986**, *15*, 63.

48 - Beer, P. D.; Gale, P. A.; Smith, D. K. *Supramolecular Chemistry*, Oxford University Press, New York, **1999**.

49 - Schultz, R. A.; Dishong, D. M.; Gokel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 625.

50 - Dishong, D. M.; Diamond, C. J.; Cinoman, M. I.; Gokel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 586.

51 - a) Thaler, A.; Bergter, R.; Ossowski, T.; Cox, B. G.; Schneider, H. *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *285*, 1; b) Zhang, X. X.; Bordunov, A. V.; Bradshaw, J. S.; Dalley, N. K.; Kou, X.; Izatt, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11507.

52 - Koulov, A. V.; Mahoney, J. M.; Smith, B. D., *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 27.

53 - a) Mathis, G. *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 1391; b) Mathis, G. *Clin. Chem.* **1993**, *39/9*, 1953.

54 - a) Bünzli, J.-C. G.; Wessner, D. *Coord. Chem. Rev.* **1984**, *60*, 191; b) Alexander, V. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 273.

55 - Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1975**, *43*, 2923.

56 - Watson, S. C.; Eastham, J. F. *J. Organomet. Chem.* **1967**, *9*, 165.

57 - Lehn, J. M.; de Vains, J.-B. R. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2209.

58 - Li, C.; Wong, W. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3217.

59 - Medina, J. C.; Lynn, B. C.; Rojas, M. T.; Gokel, G. W.; Kaifer, A. E. *Supramol. Chem.* **1993**, *1*, 145.

60 - a) Kim, J. S.; Shon, O. J.; Ko, J. W.; Cho, M. H.; Yu, Y.; Vicens, J. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2386; b) Kele, P.; Orbulescu, J.; Calhoun, T. L.; Gawley, R. E.; Leblanc, R. M. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4413; c) Beer, P. D.; Dent, S. W.; Fletcher, N. C. *Polyhedron* **1996**, *15*, 2983.

61 - Tanner, D. D.; Osman S. A. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4689.

62 - Takagi, M.; Tazaki, M.; Ueno, K. *Chemistry Lett.* **1978**, 1179.

63 - a) Bradshaw, J. S.; Krakowiak, K. E.; An, H.; Izatt, R. M. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 1163; b) White, B. D.; Fronczek, F. R.; Gandour, R. D.; Gokel, G. W. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1753; c) White, B. D.; Arnold, K. A.; Gokel, G. W. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1749; d) Hancock, R. D.; Bhavan, R.; Wade, P. W.; Boeyens, J. C. A.; Dobson, S. M. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 187.

64 - Bradshaw, J. S.; Stott, P. E. *Tetrahedron Report* **1980**, *36*, 461.

65 - Gatto, V. J.; Gokel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8240.

66 - Galaup, C.; Carrié, M-C; Azéma, J.; Picard, C. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1573.

67 - Manchanda, V. K.; Mohapatra, P. K. *Polyhedron* **1990**, *9*, 2455.

68 - Lehn, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1304

69 - Newkome, G. R.; Kiefer, G. E.; Puckett, W. E.; Vreeland, T. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 5112.

70 - Gokel, G. W.; Goli, D. M.; Minganti, C.; Echegoyen, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6786

71 - Arnold, K. A.; Echegoyen, L.; Fronczek, F. R.; Gandour, R. D.; Gatto, V. J.; White, B. D.; Gokel, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3716.

72 - Kamimura, A.; Murakami, N.; Yokota, K.; Shirai, M.; Okamoto, H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7521.

73 - a) Izatt, R. M.; Bradshaw, J. S.; Nielsen, S. A.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J., *Chem. Rev.*, **85**, *1985*, 271; b) Izatt, R. M.; Pawlak, K.; Bradshaw, J. S.; Bruening, R. L., *Chem. Rev.*, **91**, *1991*, 1721.

74 - T. D. W. Claridge, *High Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, eds. J. E. Baldwin and R. M. Williams, Tetrahedron Organic Series, Pergamon, Oxford, **1999**.

75 - Fedarko M. C. *J. Mag. Res.* **1973**, *12*, 30.

76 - Galaup, Chantal; Carrié, M.-C.; Tisnès, P.; Picard, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2165

77 - Auzel, F.; Santa-Cruz, P. A.; de Sá, G. F. *Revue Phys. Appl.* **1985**, *20*, 273.

78 - Em processo de publicação.

79 - a) Rodrigues-Ubis, J.-C.; Alpha, B.; Plancherel, D.; Lehn, J.-M. *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 2264. b) Lehn, J.- M.; Roth, C. O. *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 572.

80 - Lyle, S. L.; Raiman, M. *Talanta* **1963**, *10*, 1177.

81 - Li, Y.-P.; Pei, Y.-Y.; Zhang, X.-Y.; Gu, Z.-H.; Zhou, Z.-H.; Yuan, W.-F.; Zhou, J.-J.; Zhu, J.-H.; Gao, X.-J. *J. Cont. Rel.* **2001**, *71*, 203.

82 - da Silva, J. R. "Nanopartículas com Superfície Modificada do Tipo NúcleoCoroa de Novos Copolímeros de Dextrana-Policaprolactona para Conjugação de Ligantes de Reconhecimento" **2002**, *Tese de doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

83 - Berridge, M. V.; Tan, A. S.; McCoy, K. D.; Wang, R. *Biochemica*, **1996**, 4, 14.

84 - Santos, N. P. "Nanocápsulas de PLGA contendo Ácido Úsnico de Cladonia Substellata com Potencial Ação Anti-tumoral" **2003**, *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

85 - Costa, R. M. R. "Avaliação da Citotoxicidade e Atividade Anti-Tumoral das Microesferas de PLGA contendo Ácido Úsnico de Cladonia Substellata" **2003**, *Tese de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

86 - Werts, M. H. V. "Luminescent Lanthanide Complexes" *Tese de Doutorado*, 2000, Amsterdam

87 - de Sá, G. F.; Nunes, L. H. A.; Wang, Z.-M.; Choppin, G. R. *J. of Alloys and Compounds* **1993**, 196, 17

88 - Caliskan, S.; Kuralay, F.; Onvural, B. *Clin. Chim. Acta* **2001**, 309, 53.

89 - Petitou, M.; Casu, B.; Lindahl, U. *Biochimie* **2003**, In Press.

90 - a) Gansow, O. A.; Kausar, A. R. *Inorg. Chim. Acta* **1983**, 72, 39. b) Tabib, J.; Hupp, J. T.; Weaver, M. J. *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 1916. c) Burns, J. H.; Baes, C. F. *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 616. d) Pizer, R.; Selzer, R. *Inorg. Chem.* **1983**, 22, 1359.

91 - a) Mathis, G.; Socquet, F.; Viguer, M.; Darbouret, B. *Anticancer Research* **1997**, 17, 3011. b) Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Manet, I.; Ziessel, R.; Lehn, J.-M. *Méd. Biol. Environn.* **1995**, 23, 101.

92 - a) Yee, E. L.; Gansow, O. A.; Weaver, M. J. *J. of the Am. Chem. Soc.* **1980**, 102:7, 2278. b) Gansow, O. A.; Kausar, A. R.; Triplett, K. M.; Weaver, M. J.; Yee, E. L. *J. of the Am. Chem. Soc.* **1977**, 99:21, 7087.

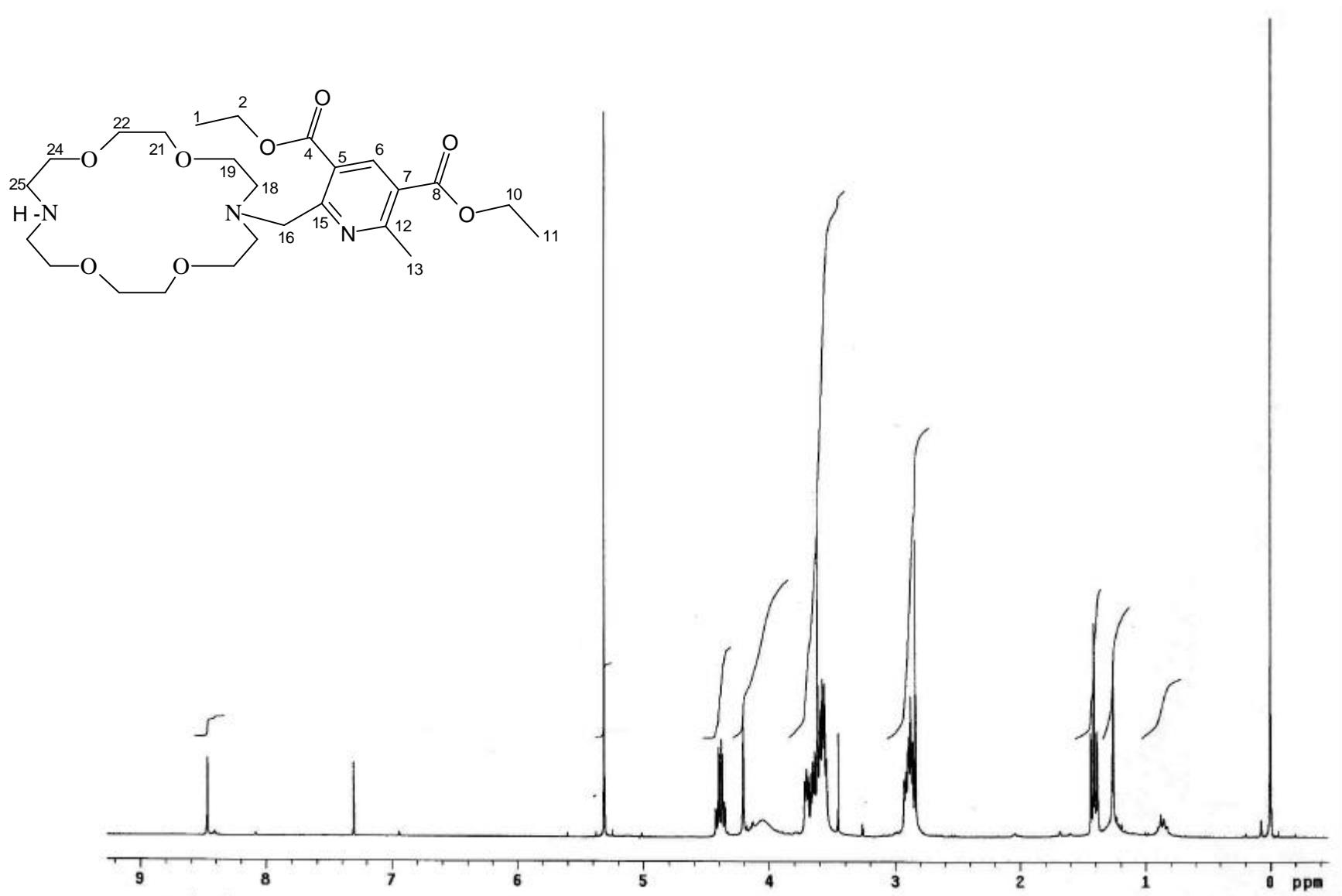
93 - Galembeck, A.; Amorim, M. S.; Bazin, H.; Mathis, G.; Donegá, C. M.; de Sá, G. F.; Jr., S. A. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2002**, 374, 267.

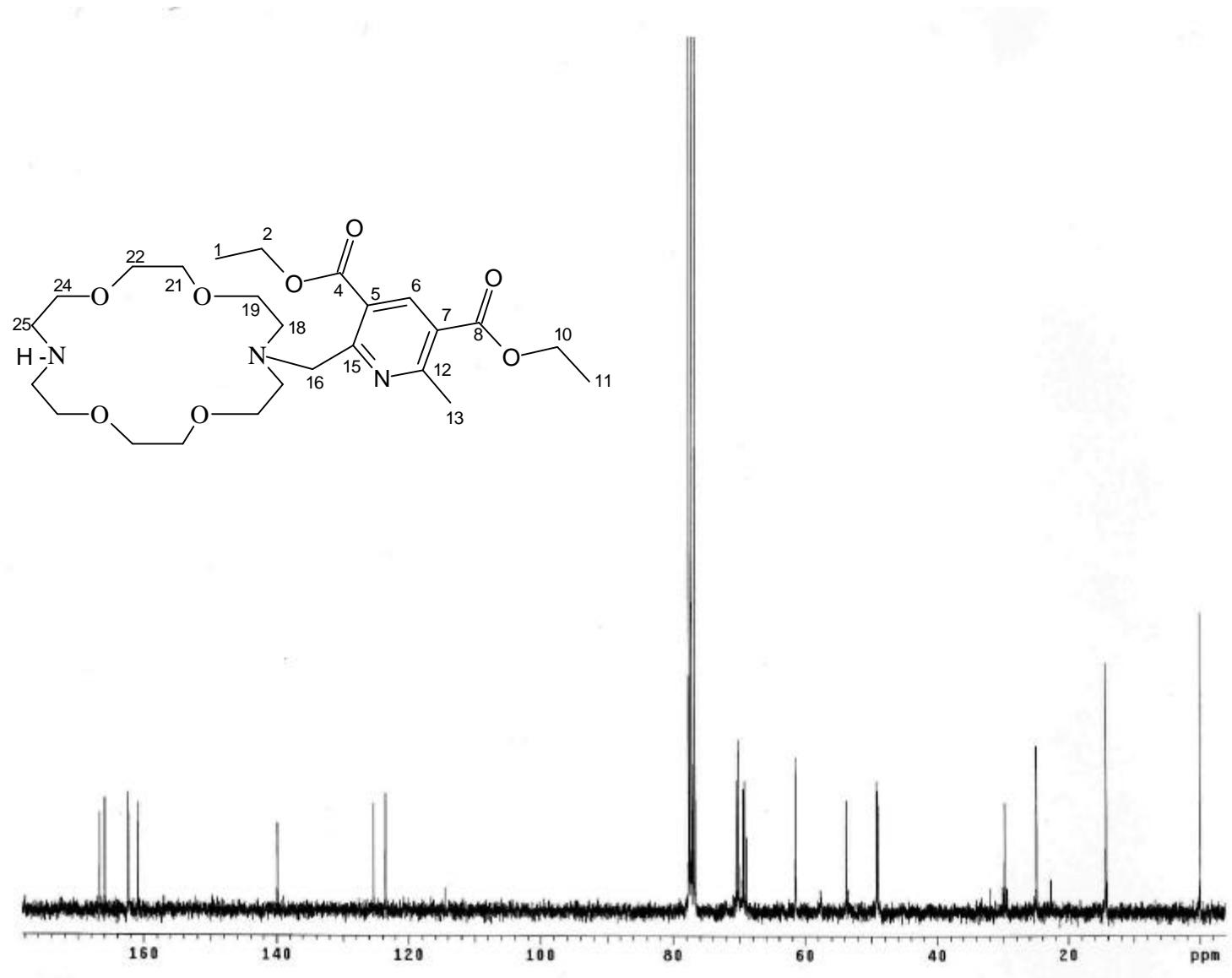
94 - a) Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Lehn, J.-M. *Coord. Chem. Rev.* **1993**, 123, 201. b) Alpha, B.; Ballardini, R.; Balzani, V.; Lehn, J.-M. *Photoch. and Photobiol.* **1990**, 52, 299.

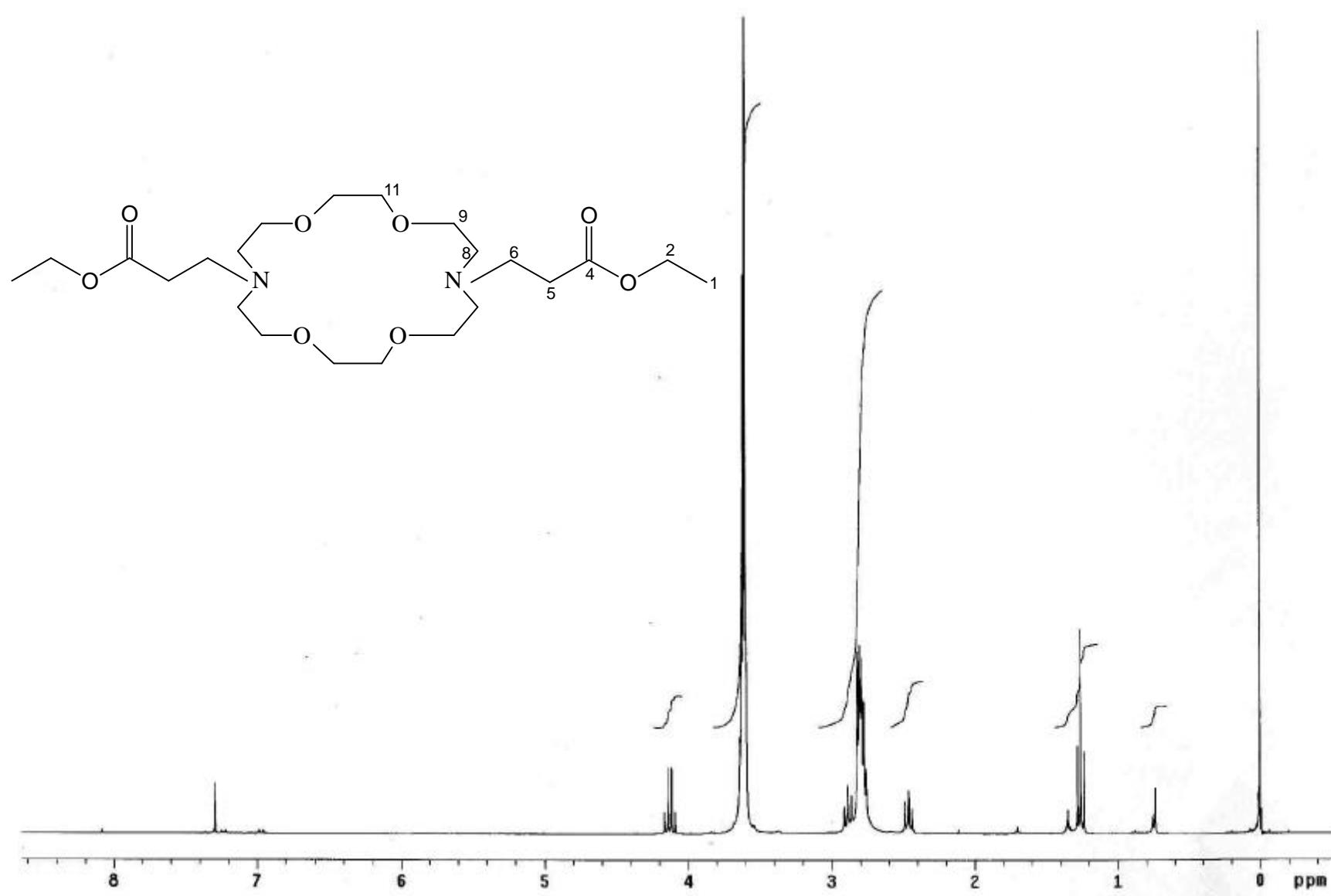
95 - Stolnik, S.; Illum, L.; Davis, S.S. *Adv. Drug Del. Rev.* **1995**, 16, 195.

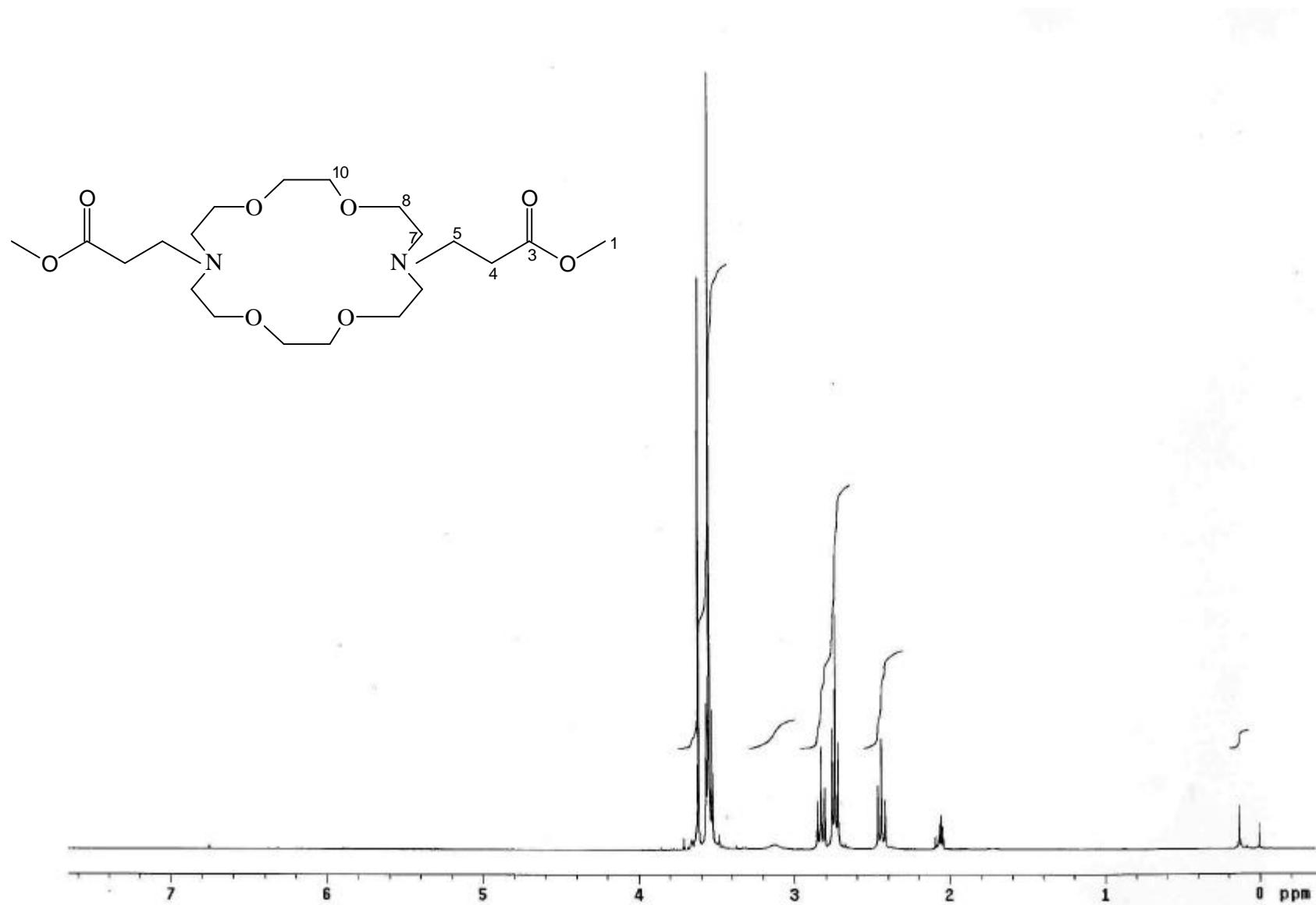
96 - Peracchia, M. T.; Vauthier, C.; Passirani, C.; Couvreur, P.; Labarre, D. *Life Sci.* **1997**, 61, 749.

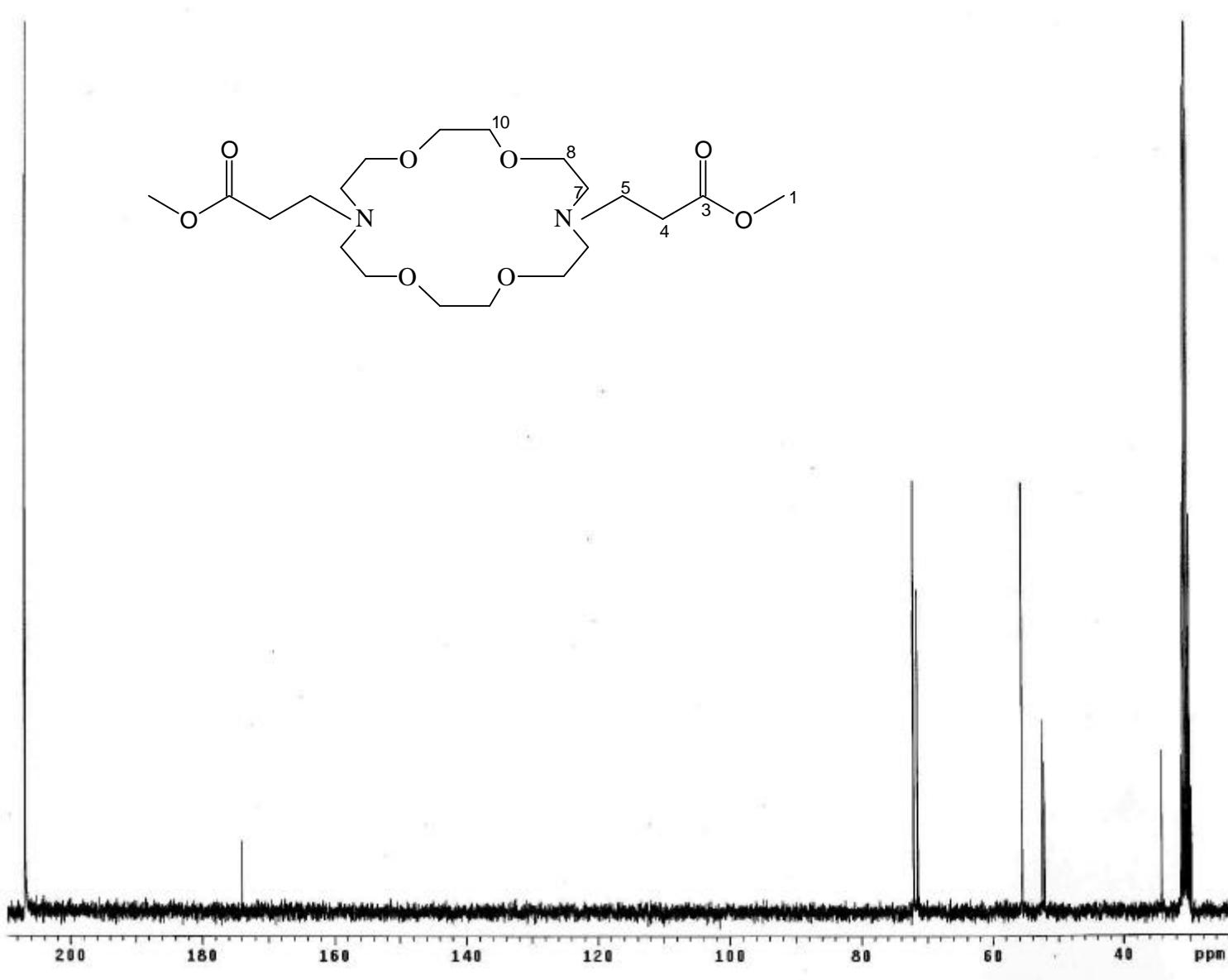
ANEXO II
ESPECTROS SELECCIONADOS











ANEXO III
RESUMO DE TRABALHO SUBMETIDO A SBQ

Monitoramento da atuação de nanomarcadores fotônicos *in vivo*

Maryene Alves Camargo^{1*} (PG), Jaqueline Rodrigues da Silva² (PG), Nereide Magalhães² (PQ), Severino Alves Júnior¹ (PQ), Petrus A. Santa-Cruz¹ (PQ).

¹Departamento de Química Fundamental – 50.740-540 CCEN – UFPE; ²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - 50670-901 CCB – UFPE * maryene@renami.com.br

Palavras Chave: complexos de lantanídeos, nanopartículas biocompatíveis, rastreamento *in vivo*

Introdução

O rastreamento de fármacos é uma técnica importante para o estudo da vetorização de drogas em seres vivos. No presente trabalho estudou-se a atuação de complexos de lantanídeos incorporados em nanopartículas (nanomarcadores), como precursores de rastreadores luminescentes, visando uma alternativa na utilização de radioisótopos.

Neste trabalho utilizou-se derivados da caprolactona (PCL) para a formação de nanopartículas, um polímero biodegradável e biocompatível aprovado pela agência americana FDA. Incorporou-se às nanopartículas, complexos de ? -dicetonas do tipo $\text{Eu}(\text{btfa})_3\text{bipy}$, devido às propriedades fotônicas deste complexo, já bastante estudado pelo nosso grupo 1.

Resultados e Discussão

Com o objetivo de se determinar o limite de concentração tolerável dos complexos de lantanídeos em sistemas biológicos, foram realizados testes de citotoxicidade. O efeito citotóxico do complexo em DMSO foi avaliado em células NCI-H 292 através de colorimetria MTT. O complexo $\text{Eu}(\text{btfa})_3\text{bipy}$ mostrou-se o mais adequado (fig. 1).

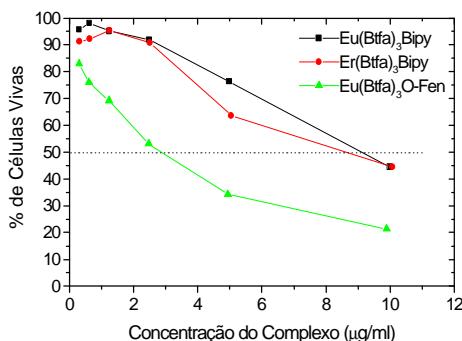


Figura 1. Teste de citotoxicidade dos complexos.

Para a preparação das nanopartículas, utilizou-se o método de emulsão dupla, com a inclusão do complexo na primeira emulsão.

Após a administração intravenosa das nanopartículas em camundongos, foi feito estudo cinético monitorado por espectroscopia de emissão do íon Eu^{3+} , explorando-se o efeito antena dos ligantes. Foi possível detectar a luminescência do complexo no sangue do camundongo após a primeira hora de administração. Na sexta

hora após a administração, não foi mais possível se observar a luminescência do complexo. Um comportamento diferente foi observado nas medidas in vitro após a sexta hora de coleta do sangue, em que a luminescência do complexo permaneceu inalterada. A fig. 2 mostra o espectro de luminescência do complexo Eu(btfa)₃bipy administrado em nanopartículas no sangue (1^a hora). Não se detectou sinal nos tecidos dos rins, fígado e baço.

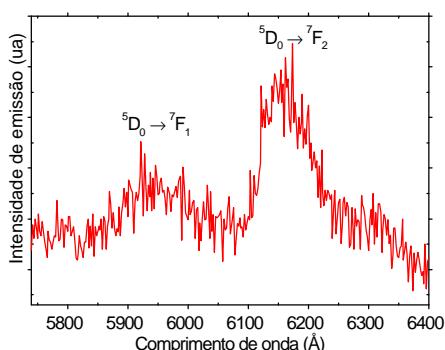


Figura 2. Luminescência do Eu(Btfa)₃Bipy/sangue

Conclusões

Foi possível se detectar a luminescência do nanomarcador fotônico durante a primeira hora em circulação no sangue. Após a sexta hora é possível que o comportamento das proteínas adsorvidas ou ligadas na superfície das nanopartículas promovam o reconhecimento e captura por células fagocitárias. Não foi detectado, no entanto, luminescência nos tecidos dos rins, fígado e baço. Pretende-se com isto desenvolver um mecanismo para o estudo de resposta imunológica através da supressão de luminescência de nanomarcadores.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES, FINEP e FACEPE, bem como à Rede de Nanotecnologia Molecular e de Interfaces (RENAMI).

¹ de Sá, G. F.; Malta, O. L.; Donega, C.; Simas, A. M.; Longo, R. L.; Silva Jr, E. F. e Santa-Cruz, P. A., *Coordination Chemistry Review*, **2000**, 196 [1], 165.