



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

Defesa de Tese

Novos Macrociclos de Lantanídeos: Marcadores
Fotônicos Projetados para Aplicações
Biotecnológicas

Área de concentração: Química Inorgânica

Doutoranda: Suzana Pereira Vila Nova

Orientador: Prof. Dr. Severino Alves Jr (DQF/UFPE)

Co-orientadores: Prof. Dr. Gilberto Fernandes de Sá (DQF/UFPE)
Dra. Patrícia Targon Campana (IFSC/USP)
Dr. Eduardo I. C. Beltrão (LIKA/UFPE)

Outubro de 2003



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

Defesa de Tese

Novos Macrociclos de Lantanídeos: Marcadores Fotônicos Projetados para Aplicações Biotecnológicas

Tese de Doutorado submetida ao Departamento de Química Fundamental, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Inorgânica

Doutoranda: Suzana Pereira Vila Nova

Orientador: Prof. Dr. Severino Alves Jr (DQF/UFPE)

Co-orientadores: Prof. Dr. Gilberto Fernandes de Sá (DQF/UFPE)
Dra. Patrícia Targon Campana (IFSC/USP)
Dr. Eduardo I. C. Beltrão (LIKA/UFPE)

Outubro de 2003

Tese 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 Doutor em Química.

Aprovada:

Prof. Dr. Severino Alves Júnior
Departamento de Química Fundamental da UFPE
(orientador)

Profa. Dra. Dulce Maria de Araújo Melo
Departamento de Química da UFRN

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes
Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFCE

Prof. Dr. Alfredo Arnóbio de Souza da Gama
Departamento de Química Fundamental da UFPE

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Departamento de Bioquímica da UFPE

***"Novos Macrocíclios de Lantanídeos: Marcadores Fotônicos
Projetados para Aplicações Biotecnológicas"***

por

SUZANA PEREIRA VILA NOVA

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

*À Lucia, minha mãe, mulher doce e forte,
exemplo de bondade e amor que carrego em
meu coração.*

*"Se seus sonhos estiverem nas nuvens, não se
preocupe, pois eles estão no lugar certo;
agora construa os alicerces."*

Shakespeare

Agradecimentos

- Aos Profs. Gilberto F. de Sá e Severino Alves Jr, pelos quais tenho carinho de pai e de irmão, pela orientação, apoio, amizade e confiança.
- À minha família, em especial minha mãe, que se alegrou com minha felicidade e me consolou nos momentos ruins, por toda minha vida.
- A Wilson Paulo, pelo apoio amplo e irrestrito em todos os momentos.
- Ao corpo docente, discente e aos funcionários do Departamento de Química Fundamental, por tantos ensinamentos científicos e exemplos de vida.
- Aos alunos e técnicos que fazem e que fizeram parte do grupo BSTR, por tantos anos de convivência e amizade, em especial a Giovannia Araújo de L. Pereira, Bruno Parente, Cristiane Kelly de Oliveira e Elisabete Menezes, que estiveram envolvidos mais diretamente no desenvolvimento de minha tese.
- Aos funcionários da Central Analítica, sobretudo a Ricardo Oliveira e Eliete, pelas análises e auxílio nas interpretações das mesmas.
- Aos Profs. Leila M. Beltramini e Antonio José, e a Dra. Patrícia Targon Campana, do Grupo de Biofísica Molecular e Espectroscopia do Instituto de Física de São Carlos/USP pela orientação e colaboração no desenvolvimento nas medidas de dicroísmo circular, fluorescência de proteínas e EPR.
- Ao Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, do LIKA / UFPE pela orientação no desenvolvimento das conjugações e testes de histoquímica com lectinas.
- Ao Prof. Ícaro e todo o grupo do Laboratório de Bioinorgânica – UFC, pelo uso das instalações e equipamento HPLC de seu laboratório.

- À Profa. Judith Feitosa e ao Prof. Luiz Gonzaga – UFC pela acolhida durante minha estadia no Ceará, em suas residências.
- Aos grupos de Química Teórica e Arquitetura Molecular, em especial ao Gerd Bruno, Rodrigo Queiroz, Gustavo Henrique e Hécio Batista, pelos trabalhos desenvolvidos em colaboração.
- Aos Drs. G. Mathis e Hervè Bazin da Cis Bio International-França, pela doação de reagentes e colunas analíticas do equipamento HPLC.
- Ao Prof. Marcos Nogueira Eberlin e sua equipe, do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas - Universidade Estadual de Campinas, pela análise de espectrometria de massas realizada em seu laboratório.
- Aos meus muitos e queridos amigos e colegas que contribuíram pouco ou muito, mas sempre contribuíram, para o enriquecimento de minha vida.

RESUMO

O presente trabalho descreve a síntese, a caracterização e o estudo das propriedades fotofísicas dos criptatos de lantanídeo $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ e $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2]^{3+}$ com $\text{Ln} = \text{Eu}^{3+}$, Tb^{3+} e Gd^{3+} , os quais atuam como eficientes dispositivos moleculares conversores de luz em solução aquosa.

As análises espectroscópicas de emissão e medidas de tempos de vida a 298K e 77K desses criptatos ajudaram a elucidar a posição e a natureza dos níveis de energia dos ligantes e níveis emissores dos íons lantanídeos. Uma maior eficiência na transferência de energia foi observada entre os níveis triplete do ligante e o nível emissor do criptato de Térbio ($T \rightarrow {}^5D_4$), com aumento nos valores de rendimento quântico de emissão em solução aquosa. Para o criptato $\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2^{3+}$ obteve-se 25% de rendimento quântico enquanto o análogo de Európio produziu 14%.

Os criptatos $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2]^{3+}$ com os lantanídeos $\text{Ln} = \text{Eu}^{3+}$ e Tb^{3+} foram conjugados a lectina Con A e espectroscopicamente caracterizados. Através da técnica de dicroísmo circular pôde-se observar a manutenção da estrutura secundária da Con A. As medidas de fluorescência e fosforescência deste complexo com a proteína forneceram indícios da integridade de sua estrutura terciária e foram empregadas também para avaliar o grau de conjugação do criptato.

O conjugado Con A-criptato foi empregado em teste histoquímico, onde o criptato atuou como marcador luminescente no reconhecimento de um tumor de mama.

O criptato $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ foi conjugado a microcistina-LR (uma toxina produzida por algas azuis) para o desenvolvimento de um novo método de detecção delas em amostras de água.

ABSTRACT

The present work describes the synthesis, characterization and photophysical properties of the lanthanide cryptates $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ and $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2]^{3+}$ with $\text{Ln}^{3+} = \text{Eu}^{3+}, \text{Tb}^{3+}$ and Gd^{3+} , which are efficient light conversor molecular devices in aqueous solution.

Emission spectroscopic analysis and lifetime measurements at 298K and 77K of such cryptates provided information about the position and characteristics of the ligand energy levels and lanthanide ions emission levels. A more efficient energy transfer was observed between the ligand triplet and emission level for the Terbium systems ($\text{T} \rightarrow {}^5\text{D}_4$), with improvement on the cryptates emission quantum yield in aqueous solution. In the cryptate $\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2^{3+}$ 25% of quantum yield was found while the Europium analogue gave 14%.

The cryptates $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2]^{3+}$ with the lanthanides Eu^{3+} and Tb^{3+} were conjugated to Con A lectin and spectroscopically characterized. With the help of circular dichroism technique was elucidated that the secondary structure of Con A was maintained. Fluorescence and phosphorescence measurements of such protein complexes provided indications of its tertiary structure integrity and were also used for evaluating the degree of the cryptate conjugation.

The Con A-cryptate system was applied in histochemical assays, where the cryptate worked as a luminescence marker for the detection of a breast tumor.

The cryptate $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ was conjugated to the LR-microcystin (a toxin produced by blue seaweed) for the development of a new LR-microcystin detection method in water samples.

ÍNDICE

Lista de Esquemas	xii
Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiii
 Apresentação e Objetivos	 xviii
 Capítulo 1: Fundamentação teórica	 1
Fundamentação teórica	2
1-Íons Lantanídeos	2
1.1-Propriedades fotofísicas dos lantanídeos	2
1.2-De Molecular a Supramolecular	3
1.2.1-Compostos de Coordenação	3
1.2.2-Complexos de Íons Lantanídeos	5
1.2.3-Complexos Supramoleculares	6
1.2.4-Macrociclos	8
1.2.4.1-Aspectos sintéticos	10
Síntese do tipo não-template	11
Síntese do tipo template: reações direcionadas por metal	13
1.3-Imunoensaios	15
1.3.1-Os marcadores	15
1.3.2-Métodos de dosagens	17
Dosagem imunológica por competição	17
Dosagem imunométrica (técnica “sanduíche”)	18

1.3.3-Processos em fase homogênea ou heterogênea	18
1.3.4-Os marcadores fluorescentes	19
1.3.4.1-Os fluoróforos orgânicos	19
1.3.4.2-Os quelatos de lantanídeos	20
1.4-A fluorimetria de resolução temporal	21
1.4.1-Procedimento em fase heterogênea: método Delfia	22
1.4.2-Procedimento em fase homogênea: método TRACE [®] (Time Resolved Amplification of Cryptate Emission)	24
1.5-Lectinas	27
1.5.1-Funções naturais das lectinas	28
1.5.2-As lectinas vegetais	29
1.5.2.1-Concanavalina A	29
1.5.3-Aplicações biotecnológicas das lectinas	30
1.6-Microcistina-LR	31
Capítulo 2: Procedimentos Experimentais	34
2-PARTE I: Metodologia, sínteses e caracterização do criptato de lantanídeo	35
2.1-Reagentes e solventes utilizados	36
2.2-Rotas Sintéticas	36
2.3-Metodologia de caracterização	46
2.3.1-Ponto de fusão (P.f.)	46
2.3.2-Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)	46
2.3.3-Espectrometria de massas (EM)	46
2.3.4-Cromatografia líquida de alta eficiência - (<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - <i>HPLC</i>)	47

2.3.5-Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1)	47
2.3.6-Absorção eletrônica na região do UV-visível (UV-vis)	47
2.3.7-Espectroscopia de luminescência	48
2.3.8-Medidas dos tempos de decaimento dos estados excitados (τ)	48
2.4-Detalhamento experimental	49
2.5-PARTE II: Metodologia, sínteses e caracterização do conjugado Con A – Criptato de lantanídeo	54
2.5.1-Reagentes e solventes utilizados	56
2.5.2-Metodologia de conjugação	56
2.6-Metodologia de caracterização do conjugado	58
2.6.1-Cromatografia por exclusão de tamanho (<i>Size Exclusion Chromathography – SEC</i>)	58
2.6.2-Dicroísmo circular (<i>Circular Dichroism – CD</i>)	58
2.6.3-Fluorescência e fosforescência da proteína	59
2.6.4-Atividade hemaglutinante	59
Capítulo 3: Propriedades Espectroscópicas	60
3-PARTE I: Propriedades Espectroscópicas dos criptatos de lantanídeos	61
3.1-Espectroscopia eletrônica de absorção no UV-visível	61
3.2-Espectroscopia eletrônica de luminescência	65
3.2.1-Espectroscopia eletrônica de luminescência do $[Eu\subset(bipy)_2py(CO_2Et)_2]^{3+}$	65
3.2.2-Espectroscopia eletrônica de luminescência do $[Tb\subset(bipy)_2py(CO_2Et)_2]^{3+}$	68
3.2.3-Espectroscopia eletrônica de luminescência do $[Gd\subset(bipy)_2py(CO_2Et)_2]^{3+}$	71
3.3-Determinação dos tempos de vida dos estados excitados	72
3.4-Rendimento Quântico experimental	73

3.5-PARTE II: Conjugado Con A-Criptato	78
3.5.1-Cromatografia por exclusão de tamanho (<i>Size Exclusion Chromathography – SEC</i>)	78
3.5.2-Dicroísmo circular (<i>Circular Dichroism – CD</i>)	80
3.5.3-Fluorescência e fosforescência da proteína	83
3.5.4-Atividade hemaglutinante	91
Capítulo 4: Aplicações em desenvolvimento	92
4.1-Utilização de criptatos de lantanídeos como ferramenta auxiliar em histoquímica com lectinas	93
4.2-Desenvolvimento de um novo método para determinação de microcistina-LR em água	96
Capítulo 5: Conclusões e perspectivas	101
5.1-Conclusões	102
5.2-Perspectivas	104
Referências Bibliográficas	106
ANEXO I: Caracterização por HPLC, IV e RMN- ¹ H	113
ANEXO II: Artigos submetidos para publicação	129

LISTA DE ESQUEMAS	PÁGINA
Esquema 1: Mecanismo de quebra do 1,1'- azobis (ciclohexanocarbonitrila), sob aquecimento.	37
Esquema 2: Mecanismo radicalar de bromação via 1,1'- azobis (ciclohexanocarbonitrila) e NBS.	37
Esquema 3: Mecanismo de bromação de piridinas substituídas, via intermediário de Pachter [67].	40
Esquema 4: Mecanismo de fechamento do criptato, tendo o Li^+ atuando na pré-organização da síntese.	44

LISTA DE TABELAS	PÁGINA
Tabela 1.1: Limites da detectabilidade física para marcadores [40a].	16
Tabela 2.1: Conjugação de 0,2 mg de Con A ($1,9 \cdot 10^{-9}$ mols), sem inibição de seus sítios de reconhecimento, via cadeias laterais com grupamentos amina e amida (a) ou carboxila (c).	57
Tabela 2.2: Conjugação de 0,2 mg de Con A ($1,9 \cdot 10^{-9}$ mols), com inibição de seus sítios de reconhecimento, via cadeias laterais com grupamentos amina e amida (ai) ou carboxila (ci).	57
Tabela 3.1: Máximo das principais bandas dos ligantes e dos criptatos de Li^+ e Eu^{3+}	64
Tabela 3.2: Comparação do número de linhas nas transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_j$ do criptato de Eu^{3+} .	66
Tabela 3.3: Tempos de vida (τ) dos estados excitados dos criptatos de Eu^{3+} e Tb^{3+} , e número de moléculas de H_2O (n).	73
Tabela 3.4: Rendimento Quântico dos criptatos de Eu^{3+} e Tb^{3+} em solução aquosa.	73
Tabela 3.5: Dados fotofísicos do criptato de Tb^{3+} .	76
Tabela AI.1: Gradiente utilizado no monitoramento das reações.	114
Tabela AI.2: Tempos de retenção dos produtos.	116

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1.1: Esquema simplificado dos processos de absorção (A), transferência de energia (TE) e emissão de luminescência que ocorre após a excitação de um quelato de európio.	5
Figura 1.2: Formação de um composto supramolecular a partir de um outro composto molecular que interage com espécies catiônicas através de ligações não-covalentes.	7
Figura 1.3: Estrutura do [2.2.2]-criptando.	9
Figura 1.4: Representação esquemática do passo de ciclização na síntese de um macrociclo.	11
Figura 1.5: Estratégias para a síntese de ligantes macrocíclicos [37].	12
Figura 1.6: Representação esquemática do passo de ciclização via efeito templante de um metal, na síntese de um macrociclo.	14
Figura 1.7: Dosagem imunológica por competição.	17
Figura 1.8: Dosagem imunométrica.	18
Figura 1.9: Fluorimetria resolvida no tempo.	22
Figura 1.10: Método Delfia.	23
Figura 1.11: Complexo de Európio empregado na metodologia TRACE.	24
Figura 1.12: Detalhamento do método TRACE.	25
Figura 1.13: Esquema de detecção em dois comprimentos de onda. No eixo das ordenadas é medida a intensidade de fluorescência e no eixo das abscissas, o comprimento de onda em nm. O gráfico contínuo representa a emissão do criptato e o pontilhado, representa a emissão da aloficocianina. Em ambos os casos a razão 665 / 620 é constante e igual a 1 [15b].	26
Figura 1.14: Estrutura da Con A, resolvida por Karl D. Hardman e Clinton F. Ainsworth [52].	30
Figura 1.15: Microcistina-LR.	32
Figura 2.1: Macrociclos, onde $R_1 = \text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ou $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$; $R_2 = \text{N}$ ou $\text{N} \rightarrow \text{O}$ e $\text{Ln}^{3+} = \text{Eu}^{3+}, \text{Tb}^{3+}, \text{Gd}^{3+}$.	35
Figura 2.2: Estrutura dos aminoácidos.	54

Figura 2.3: Seqüência primária de um monômero de Con A. Em lilás, destaque para os resíduos asparagina (N), glutamina (Q), lisina (K) e arginina (R). Em azul, destaque para os resíduos de ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E).	55
Figura 3.1: Espectro de absorção do 2,6-dibromometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina (1).	62
Figura 3.2: Espectro de absorção do bipy-bipy (6).	63
Figura 3.3: Espectro de absorção do $[\text{Li} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (7).	63
Figura 3.4: Espectro de absorção do $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (9).	64
Figura 3.5: Espectro de emissão do $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 298K.	66
Figura 3.6: Espectro de emissão do $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 298K.	67
Figura 3.7: Espectro de emissão do $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 77K.	67
Figura 3.8: Espectro de emissão do $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 77K.	68
Figura 3.9: Espectro de emissão do $[\text{Tb} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 298K.	69
Figura 3.10: Espectro de emissão do $[\text{Tb} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 298K.	69
Figura 3.11: Espectro de emissão do $[\text{Tb} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 77K.	70
Figura 3.12: Espectro de emissão do $[\text{Tb} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 77K.	70
Figura 3.13: Espectro de emissão do $[\text{Gd} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 77K.	71
Figura 3.14: Diagramas de níveis de energia do ligante e dos criptatos $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ e $[\text{Tb} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$. Para simplificação, estão mostrados apenas os estados excitados de interesse e as larguras de das transições foram omitidas para melhor visualização.	75
Figura 3.15: Rendimento quântico de luminescência para quelatos de Térbio ³⁺ , como função da energia do estado triplete mais baixo do ligante. Os pontos marcados correspondem aos resultados obtidos para distintos quelatos e a curva traçada, é a representação da dependência (rendimento quântico vs energia do triplete do ligante) proposta por Latva e colaboradores [83].	77
Figura 3.16: Cromatografia por exclusão de tamanho.	78
Figura 3.17: Cromatograma da amostra 7c, em coluna de exclusão de tamanho. A seta em vermelho indica o volume observado para o padrão BSA.	79

Figura 3.18: Cromatograma da amostra de Con A pura em coluna de exclusão de tamanho. A seta em azul indica o tempo de retenção do padrão fosforilase B e a seta em vermelho indica o tempo de retenção observado para o padrão BSA.	79
Figura 3.19: Origem do CD. (I) componentes circularmente polarizados L e R do plano de luz polarizada: como os dois componentes possuem a mesma amplitude, quando combinadas resultam na radiação circularmente polarizada; (II) os componentes combinados em diferentes magnitudes resultam em uma radiação elipticamente polarizada.	80
Figura 3.20: Relação entre os espectros de absorção e o de CD. O espectro de absorção de uma amostra com três bandas de absorção. A primeira (1) é proveniente de um componente aquiral e por isso não apresenta sinal em CD; a segunda (2) é proveniente de um componente quiral, que absorveu mais da componente L que da R e por isso apresenta sinal positivo em CD; a terceira banda (3) é proveniente de um componente quiral, que absorveu mais da componente R que da L e por isso apresenta sinal negativo em CD.	81
Figura 3.21: Espectro de CD na região do UV-distante. Curva sólida: α -hélice; curva tracejada: folha β -antiparalela; curva pontuada: β -turns tipo I; curva com pontos e traços alternadamente: estrutura irregular [85a].	82
Figura 3.22: Espectro de CD obtido para as amostras de Con A pura, 8a (conjugação a não inibida), 8ai (conjugação a com inibição) e 8c (conjugação c não inibida).	83
Figura 3.23: Localização dos resíduos de triptofanos, assinalados em vermelho claro, em um monômero de Con A. Os demais monômeros foram parcialmente ocultados para uma melhor visualização.	84
Figura 3.24: Espectro de emissão dos triptofanos das amostras Con A pura, 7a (não inibida) e 7ai (inibida).	84
Figura 3.25: Espectros de fosforescência das amostras 7a e 8a.	86
Figura 3.26: Espectros de fosforescência das amostras 7ai e 8ai.	87
Figura 3.27: Espectros de fosforescência das amostras 5c-8c.	88
Figura 3.28: Espectros de fosforescência das amostras 5ci-8ci.	89
Figura 3.29: Espectros de fosforescência das amostras 7a, 7ai, 7c e 7ci.	90
Figura 3.30: Em azul, o sítio de reconhecimento a açúcares em um monômero da Con A. Os demais monômeros foram parcialmente ocultados para uma melhor visualização da estrutura.	91

Figura 4.1: Carcinoma ductal infiltrante de mama marcado com o conjugado Con A-peroxidase.	93
Figura 4.2: Espectro de luminescência do tecido anormal de mama em lâmina de vidro (curva preta) e do tecido extraído da mesma amostra, também depositado em lâmina de vidro, marcado com o conjugado Con A-criptato de térbio.	95
Figura 4.3: Esquema simplificado do processo de conjugação da amostra de microcistina-LR ao criptato de Tb^{3+} .	96
Figure 4.4: Cromatograma, em gradiente de fase reversa no HPLC, da mistura do padrão de microcistina-LR (pico 2) e da reação com aminoetanotiol (pico 1). Monitoramento em 238 nm.	97
Figure 4.5: Cromatogramas, em gradiente de fase reversa no HPLC, no início da reação de conjugação do criptato de Tb^{3+} à microcistina-LR-aminoetanotiol, em 238 nm (a) e 310 nm (b): (1) criptato de Tb^{3+} e (2) microcistina-LR-aminoetanotiol.	98
Figure 4.6: Cromatograma, em gradiente de fase reversa no HPLC, ao final de 24 horas da reação de conjugação do criptato de Tb^{3+} à microcistina-LR-aminoetanotiol, em 310 nm: (1) conjugado microcistina-LR-criptato de Tb^{3+} e (2) criptato de Tb^{3+} .	99
Figure 4.7: Espectro de emissão do conjugado microcistina-LR-criptato de Tb^{3+} , exibindo as transições características do íon metálico. O comprimento de onda de excitação foi de 310 nm.	99
Figure 4.8: ELISA competitivo indireto para uma amostra padrão de microcistina-LR, empregando anti-microcistina-LR-KHL IgG.	100
Figura AI.1: Acompanhamento da reação de bromação do 2,6-dimetil-3,5-dicarboxilato de etil piridina (capítulo 2, sessão 2.2, reação 1), após 10 minutos de refluxo. Percentagem de área sobre o pico de interesse=9%.	114
Figura AI.2: Acompanhamento da reação após 1 hora de refluxo. Percentagem de área sobre o pico de interesse=14%.	115
Figura AI.3: Acompanhamento da reação após 2 horas de refluxo. Percentagem de área sobre o pico de interesse=10%.	115
Figura AI.4: Acompanhamento da reação 1, após 3 horas de refluxo. Percentagem de área sobre o pico de interesse=10%.	115
Figura AI.5: Cromatograma do diésterdibromometilpy (1), em coluna analítica.	117
Figura AI.6: Cromatograma do 2,2'-dimetilbipiridina (3), em coluna analítica.	117

Figura AI.7: Cromatograma do 2,2'-dibromometilbipiridina (4), em coluna analítica.	117
Figura AI.8: Cromatograma do acompanhamento da síntese do ditosil-bipy.bipy (5). A seta destaca o sinal do produto.	118
Figura AI.9: Cromatograma do bipy.bipy (6), em coluna analítica.	118
Figura AI.10: Cromatograma do criptato $[\text{Li} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (7).	118
Figura AI.11: Cromatograma do criptato $[\text{Li} \llcorner (\text{bipy})_2\text{pyNO}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (8).	119
Figura AI.12: Cromatograma de acompanhamento da síntese do criptato $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (9).	119
Figura AI.13: Cromatograma de acompanhamento da síntese do criptato $[\text{Tb} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (10).	119
Figura AI.14: Cromatograma de acompanhamento da síntese do criptato $[\text{Gd} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (11).	120
Figura AI.15: Cromatograma de acompanhamento da síntese do criptato $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2]^{3+}$ (12).	120
Figura AI.16: Cromatograma de acompanhamento da síntese do criptato $[\text{Tb} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2]^{3+}$ (13).	120
Figura AI.17: Espectro vibracional do ligante 1 , na região do infravermelho.	122
Figura AI.18: Espectro vibracional do ligante 6 , na região do infravermelho.	122
Figura AI.19: Espectro vibracional do criptato 9 , na região do infravermelho.	123
Figura AI.20: Espectro vibracional do criptato 12 , na região do infravermelho.	123
Figura AI.21: Espectro de RMN- ^1H do 2,6-dibromometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina.	124
Figura AI.22: Espectro de RMN- ^1H do 6,6'-dibromo-2,2'-bipiridina.	125
Figura AI.23: Espectro de RMN- ^1H do bipy-bipy.	126
Figura AI.24: Espectro de RMN- ^1H do $[\text{Li} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (7).	127

APRESENTAÇÃO

A química de coordenação de ligantes macrocíclicos vem tornando-se uma área de pesquisa fascinante para os químicos inorgânicos de todo o mundo. O interesse contínuo no design de novos ligantes advém do seu amplo potencial de aplicação [1, 2], particularmente do encapsulamento de íons lantanídeos em estruturas supramoleculares, originando compostos que atuam como excelentes dispositivos moleculares conversores de luz (DMCLs), os quais absorvem radiação na região do ultravioleta e emitem na região do visível [3, 4]. Estes DMCLs são testados e utilizados freqüentemente em aplicações médicas e clínicas como radioimunoterapia [5-7], tomografia de emissão de pósitron [8, 9], agente de aumento de contraste em imagem de ressonância [10-13], e marcadores luminescentes em fluoroimunoensaios [14-17].

Dentre os compostos macrocíclicos mais estudados pode-se destacar os criptatos de lantanídeos, devido às suas habilidades de coordenação com antígenos ou anticorpos estarem bem estabelecidas [14-17]. Visando estudar a química supramolecular de uma forma interdisciplinar, este trabalho tem como objetivo geral à síntese, a caracterização e a aplicação de novos criptatos de lantanídeos em ensaios fluoroimunológicos, onde eles atuarão como marcadores luminescentes de sondas biológicas.

As lectinas [18a] são proteínas capazes de atuar como sondas, por apresentarem diferentes capacidades de reconhecimento a carboidratos livres ou conjugados juntamente com a potencialidade de serem conjugadas a marcadores químicos. Como podem localizar seqüências de açúcares a níveis morfológicos [18], são empregadas no monitoramento de mudanças que ocorrem na superfície das células em processos de desenvolvimento, em processos patológicos ou de diferenciação. Sendo assim, a conjugação dos criptatos de lantanídeos à lectina Con A surge como uma possibilidade muito viável de desenvolvimento de um novo marcador luminescente para testes histoquímicos.

Ainda visando aplicações biotecnológicas e diante da importância das análises químicas que atestam a qualidade da água, empregou-se os criptatos sintetizados também no planejamento de outro método de análise. As cianobactérias, ou algas azuis, produzem uma variedade de metabólitos que são capazes de exercer ações tóxicas em seres humanos e animais. Dentre estas substâncias pode-se destacar as microcistinas [19], cuja presença na água utilizada para hemodiálise, causou acidente grave e fatal em Caruaru, com a morte de

76 pacientes. Esse acontecimento poderia ter sido evitado com um tratamento e monitoramento adequado da água.

Esta tese consiste em cinco capítulos, onde descrevemos a síntese e estudos espectroscópicos dos novos criptatos de lantanídeos, bem como a sua utilização como marcadores luminescentes para sistemas biológicos. A divisão dos capítulos encontra relacionada abaixo:

Capítulo 1: Fundamentação teórica relativa aos principais conceitos abordados e informações imprescindíveis para a compreensão do assunto desenvolvido nesta tese.

Capítulo 2: Este capítulo encontra-se dividido em duas partes. Na primeira, encontra-se a descrição da metodologia e procedimentos experimentais desenvolvidos para a síntese dos criptatos de lantanídeos, bem como sua caracterização. A segunda parte descreve os procedimentos experimentais desenvolvidos para a conjugação desses criptatos à lectina Con A, e a metodologia de caracterização adotada para esses conjugados.

Capítulo 3: Também dividido em duas partes, relaciona os resultados da caracterização fotofísica dos produtos sintetizados: as propriedades dos criptatos são descritas na primeira parte e as propriedades dos conjugados, na segunda.

Capítulo 4: Discussão dos projetos interdisciplinares iniciados, relatando os resultados preliminares do emprego do conjugado Con A-Criptato de lantanídeo em teste histoquímico de marcação de tumor de mama, bem como os resultados iniciais da conjugação de nossos marcadores luminescentes à toxina microcistina-LR.

Capítulo 5: Conclusões e perspectivas.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos principais: sintetizar e caracterizar, a partir de ligantes aromáticos, novos criptatos de lantanídeos que atuem como antenas eficientes para o íon metálico, produzindo DMCLs com elevado rendimento quântico de emissão visando especificamente:

- ❖ Introduzir na estrutura do criptato, grupos funcionais que permitam seu emprego como marcadores luminescentes no desenvolvimento de novos marcadores imunológicos e histoquímicos;
- ❖ Determinar as propriedades espectroscópicas destes criptatos de Eu^{3+} , Tb^{3+} e Gd^{3+} funcionalizados, bem como calcular seus rendimentos quânticos de emissão.
- ❖ Conjugar e caracterizar estes criptatos sintetizados à Con A, uma proteína de origem não imunológica, empregada em testes histoquímicos de reconhecimento de tecidos transformados.
- ❖ Empregar o conjugado Con A-criptato em testes histoquímicos, para o desenvolvimento de um método quantitativo de detecção de, por exemplo, tumor de mama.
- ❖ Desenvolver um novo método de detecção de microcistina-LR (toxina hepatotóxica) em amostras de água utilizando os novos criptatos sintetizados como marcadores luminescentes.

Referências

- [1] Lehn, J. -M. *Supramolecular Chemistry*, VHC-Weinheim, 1995.
- [2] Alexander, V. *Chem. Rev.* 1995, 95, 273.
- [3] Lehn, J. -M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 1304.
- [4] Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Manet, I.; Ungaro, R.; Casnati, A.; Ziessel, R.; Ulrich, G.; Asfari, Z.; Lehn, J.-M. *Pure & Appl. Chem.* 1995, 67, 135.
- [5] Klein, J. L.; Leichner, P. K.; Callahan, K. M.; Kopher, K. A.; Order S. E. *Antibody, Immunoconjugates, Radiopharm.* 1988, 1, 55.
- [6] Parker, D.; Morphy, J. R.; Karl, J.; Jonathan, C. *Pure & Appl. Chem.* 1989, 61, 1637.
- [7] Raicle, M. E. *Adv. Chem. Ser.* 1981, 197, 419.
- [8] Loch, C.; Maziere, B.; Comar, D. *J. Nucl. Med.* 1981, 21, 171.
- [9] Partain, C. L.; James, A. E.; Rollo, F. D.; Price, R. R. *Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Imaging*, W. B. Saunders, 1983.
- [10] Tweedle, M. F.; Bünzli, J. C.; Choppin, G. R. *Lanthanide Probes In Life, Chemical, and Science*, Elsevier, 1989.
- [11] Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* 1987, 87, 901.
- [12] Kumar, K.; Tweedle, M. F. *Pure & Appl. Chem.* 1993, 65, 515.
- [13] Taylor, D. L.; Waggoner, A. S.; Murphy, R. F.; Lanni, F.; Birge, R. R. *Applications of Fluorescence in Biomedical Sciences*, Eds. A. R. Liss Inc, 1986.
- [14] Lopez, E.; Chypre, C.; Alpha, B.; Mathis, G. *Clin. Chem.* 1993, 39 (2), 196.
- [15] Mathis, G. *Clin. Chem.* 1993, 39 (9), 1653.
- [16] Mathis, G. *Clin. Chem.* 1995, 41 (9), 1391.
- [17] Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Manet, I.; Ziessel, R.; Lehn, J.-M. *Méd. Biol. Environn.* 1995, 23 (1), 101.
- [18] a) Kennedy, J. F.; Palva, P. M. G.; Coerlla, M. T. S.; Cavalcanti, M. S. M.; Coelho, L. C. B. B. *Carbohydrate Polymers* 1995, 26, 219, b) Beltrão, E. I. C.; Correia, M. T. S.; Figueredo-Silva, J.; Coelho, L. C. B. B. *App. Biochem. and Biotechnology*, 1998, 74, 125.
- [19] a) An, J.; Carmichael, W. W. *Toxicon*, 1994, 32(12), 1495, b) Alécio, E. *Tese de doutorado (em andamento)*, UFPE - Brasil.

Capítulo. 1:

Fundamentação teórica

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo faremos uma apresentação dos principais conceitos a serem abordados ao longo deste trabalho, com o objetivo de basear o leitor com informações úteis para a compreensão do assunto desenvolvido nesta tese.

1-Íons Lantanídeos

Os lantanídeos constituem a série de elementos (La a Lu) que apresentam o preenchimento gradual dos orbitais $4f^N$ ($[Xe] 4f^N 5d^1 6s^2$). O preenchimento da camada $4f$ resulta numa contração progressiva dos raios iônicos, mais expressiva que as observadas para a maioria dos elementos da Tabela Periódica, denominada contração lantanídica. A existência de camadas mais externas cheias ($5s$ e $5p$), na configuração eletrônica destes íons propicia uma proteção dos elétrons da camada interna $4f$ e consequentemente, os íons lantanídeos complexados apresentam um comportamento semelhante ao íon livre na maioria dos casos [1]. Por isso, diferentemente dos orbitais d dos íons de metais de transição, os orbitais f dos íons de terras raras contribuem fracamente para a formação de ligações com moléculas ligantes.

Devido à natureza essencialmente eletrostática da ligação, a química de coordenação dos íons lantanídeos trivalentes apresenta ausência de direcionalidade nas interações metal-ligante, fazendo com que os seus números de coordenação e a geometria de seus complexos sejam determinados principalmente: pelo tamanho do íon central; pelas características dos ligantes (propriedades conformacionais, número, tamanho e natureza dos grupos doadores); pela interação entre grupos doadores; pela competição entre grupos doadores e moléculas de solvente [1].

1.1-Propriedades fotofísicas dos lantanídeos

A luminescência é conhecida como o fenômeno de emissão de radiação eletromagnética na região do visível, por algumas espécies tradicionalmente conhecidas como fósforos. A luminescência pode ser induzida de várias maneiras: a fotoluminescência é obtida a partir de absorção de radiação eletromagnética (frequentemente UV);

catodoluminescência, a partir de um feixe de elétrons; eletroluminescência, a partir de uma voltagem elétrica; luminescência de raios-X, a partir de raios-X; quimioluminescência, a partir da energia de uma reação química, etc [2].

Ao interagirem com a radiação eletromagnética, os íons lantanídeos (Ln^{3+}) são excitados, via bandas de transferência de carga ou bandas $4f^n \rightarrow 4f^{n-1}5d^1$ com decaimentos não radiativos aos termos excitados da configuração $4f^n$, diretamente pelos níveis $4f$ ou através de transferência de energia por um ligante orgânico (sessão 1.2.2).

As transições mais interessantes, resultando na emissão de luz no visível (em bandas relativamente finas quando comparadas às bandas dos metais de transição d), são aquelas intra $4f$ ($4f \rightarrow 4f$). Não se tratando de um íon livre (para o qual tais transições são formalmente proibidas pela regra de Laporte), em um dado meio não centrossimétrico, as transições ($4f \rightarrow 4f$) induzidas por dipolo elétrico passam a ser permitidas devido à mistura dos estados de diferentes paridades. Também a regra de seleção de spin é relaxada quando se considera o acoplamento spin-órbita e portanto, as transições são observadas. Vários são os mecanismos propostos para explicar estas transições em diferentes ambientes químicos [3].

A magnitude das perturbações que atuam nas configurações $4f^n$ para quebrar a degenerescência do Hamiltoniano de campo central segue a ordem:

repulsão inter-eletrônica > acoplamento spin-órbita $\gg$ campo-ligante.

O campo ligante nos lantanídeos atua removendo a degenerescência contida nos valores individuais do número quântico J. Este desdobramento adicional pode ser da mesma ordem de grandeza ou maior que a energia térmica (kT), ou seja, 10^2 cm^{-1} .

A extensão da remoção da 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 composto.

1.2-De Molecular a Supramolecular

1.2.1-Compostos de Coordenação

Na teoria de coordenação desenvolvida em 1893, Alfred Werner postulou que o íon metálico se encontra rodeado por vários ligantes e que as propriedades físicas e

químicas do composto resultante são determinadas pela natureza da ligação química entre eles e pela geometria dos ligantes ao redor do íon [1, 4]. Este conceito é válido tanto para íons solvatados como para compostos no estado sólido e pode ser expandido para descrever compostos polinucleares, “gaiolas” contendo ligação metal-metal e moléculas nas quais o átomo metálico (neutro ou carregado) é ligado ao ligante via metal-carbono (química dos organometálicos).

Muitos avanços aconteceram na área de química de coordenação de lantanídeos até o momento. Vários tipos de compostos de coordenação foram obtidos com diversos tipos de ligantes como por exemplo (i) orgânicos que utilizam o nitrogênio como átomo ligante; e (ii) orgânicos que utilizam o oxigênio e o nitrogênio como átomos ligantes.

Pode-se citar vários processos que envolvem espécies inorgânicas, em temperaturas não muito elevadas, onde tais compostos estão presentes. Entre outros:

- a) A hemoglobina que tem o ferro (II) como íon central, e que é responsável pelo transporte de oxigênio no organismo;
- b) A clorofila, onde o magnésio é o íon central, é vital para o processo de fotossíntese nos vegetais;
- c) A produção de polietileno, que seria inviável em larga escala se não fosse o desenvolvimento dos catalisadores de Ziegler-Natta, que promovem a polimerização do etileno a baixas temperatura e pressão por mecanismos de coordenação [5];
- d) Os criptatos de lantanídeos, os quais são bons marcadores para sistemas biológicos, onde são usados particularmente em investigações clínicas de espécies em baixíssimas concentrações [6].

Portanto, devido à vasta presença dos compostos de coordenação, uma grande parte dos trabalhos realizados sobre química inorgânica se relacionam a eles, que recebem também a denominação de aductos ou complexos. Dependendo da natureza química das espécies coordenadas (neutras ou iônicas), suas propriedades físicas, como a estabilidade em solução, variam bastante. Na forma pura, alguns são estáveis apenas a baixas temperaturas, enquanto outros mantêm suas características mesmo a altas temperaturas podendo até serem volatilizados como complexos de lantanídeos com β -dicetonas e ligantes heterobiaris [7].

1.2.2-Complexos de Íons Lantanídeos

O interesse pela síntese de complexos formados a partir da coordenação de moléculas orgânicas a íons lantanídeos, ou do encapsulamento deste numa estrutura supramolecular, vem aumentando consideravelmente pelo fato de que estes compostos podem atuar como excelentes dispositivos moleculares conversores de luz (DMCLs), absorvendo radiação no ultravioleta e emitindo no visível [1d, 8]. Além de que suas propriedades fotoluminescentes apresentam ampla aplicabilidade como marcadores luminescentes [9], mini-laser [10], fósforos para lâmpadas e dispositivos eletroluminescentes [11].

O processo de conversão de luz ultravioleta em visível, o qual foi denominado “efeito antena” (Figura 1.1) ocorre via uma seqüência de absorção (A), transferência de energia intramolecular (TE) e emissão (E), envolvendo componentes absorvedores (ligantes) e emissores (íon lantanídeo) distintos. Deste modo torna-se possível obter conversão de luz com alta eficiência das transições f-f dos íons lantanídeos e a baixa eficiência quântica de emissão dos ligantes.

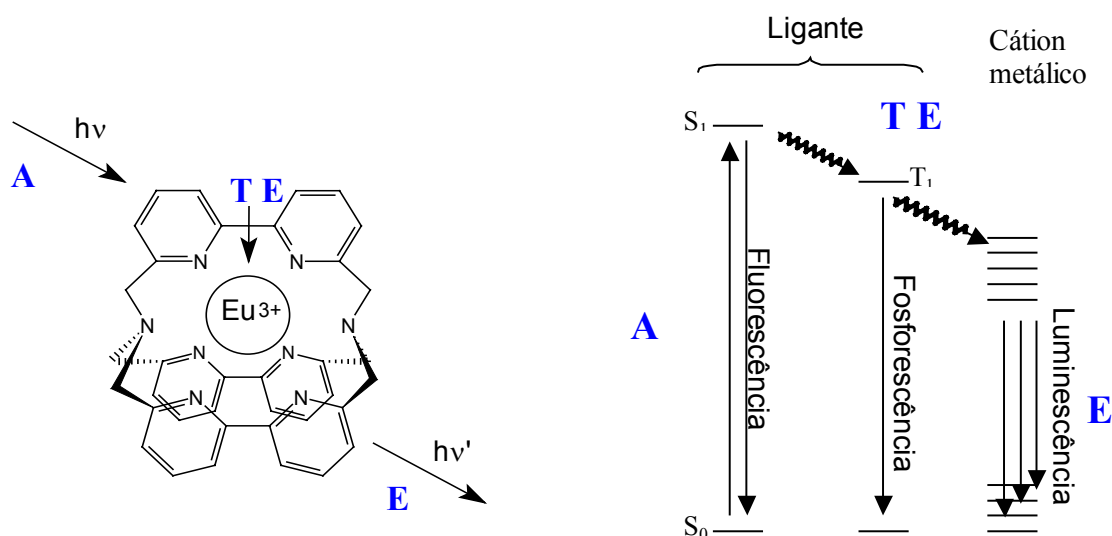


Figura 1.1: Esquema exemplificando um processo de absorção (A), transferência de energia (TE) e emissão de luminescência (E) que ocorre após a excitação de um quelato de európio [12].

Numa primeira etapa deste processo, a energia de excitação é absorvida fortemente pela parte orgânica do complexo. Esta absorção de luz corresponde a uma transição do estado fundamental S_0 para estados excitados do ligante, como por exemplo o estado S_1 .

Na etapa seguinte ocorre a transferência de energia intramolecular de um estado excitado do ligante, aos níveis energeticamente excitados do íon metálico complexado. A eficácia desta transferência depende da posição entre o nível excitado do ligante e os níveis energeticamente excitados do íon, resultado de interações fortes entre o metal e os grupamentos cromofóricos do ligante [12].

A emissão de radiação pelo íon metálico corresponde a desativação do seu nível excitado (por exemplo, 5D_0 e 5D_4 para os íons Eu^{3+} e Tb^{3+} , respectivamente). Esta desativação radiativa efetua-se segundo as transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$ (Eu^{3+}) e $^5D_4 \rightarrow ^7F_j$ (Tb^{3+}) ($j=0$ a 6). A emissão é composta de raias finas, situadas para o íon Eu^{3+} na região do vermelho (entre 580-720 nm) e para o íon Tb^{3+} na região do verde (480-640 nm).

1.2.3-Complexos Supramoleculares

Por muitos anos, os químicos tentaram entender a natureza a nível puramente molecular, envolvendo sínteses e investigações de propriedades físico-químicas, considerando apenas estruturas e ligações covalentes fortes [13].

A observação de fenômenos biológicos de importância para os seres vivos, mostra que a maioria dos processos não envolvem quebra ou formação de ligação. As estruturas biológicas são constituídas a partir de agregados, mantidos por interações fracas não covalentes. Estas observações levaram a uma mudança de direção nos estudos da química das moléculas. O início desta mudança ocorreu em 1894, quando Emil Fischer introduziu o princípio “chave e fechadura” para descrever a interação de uma enzima com seu substrato [13]. Dentro deste mecanismo estão os dois princípios fundamentais da química supramolecular: reconhecimento molecular e função supramolecular. Para haver reconhecimento molecular, é necessário que o tamanho, a forma e a posição sejam compatíveis entre as espécies interagentes.

O desenvolvimento da química supramolecular foi auxiliado, portanto, pela observação de compostos estáveis que não envolvem apenas ligações covalentes. A química supramolecular tem sido definida como “química além da molécula” e envolve investigações de novos sistemas moleculares nos quais a característica mais importante é que os componentes estão interagindo por forças intermoleculares, não por ligações covalentes (Figura 1.2). Os químicos que trabalham nesta área podem ser vistos como arquitetos combinando moléculas em blocos, formando supramoléculas. A expressão

“química supramolecular” foi cunhada por Jean-Marie Lehn, em 1969, em seu estudo de compostos de coordenação, de inclusão e criptatos. A concessão do Prêmio Nobel de Química em 1987 a Charles Perderon, Donald Cram e Jean-Marie Lehn, significou o reconhecimento formal do assunto no cenário químico [13, 14].

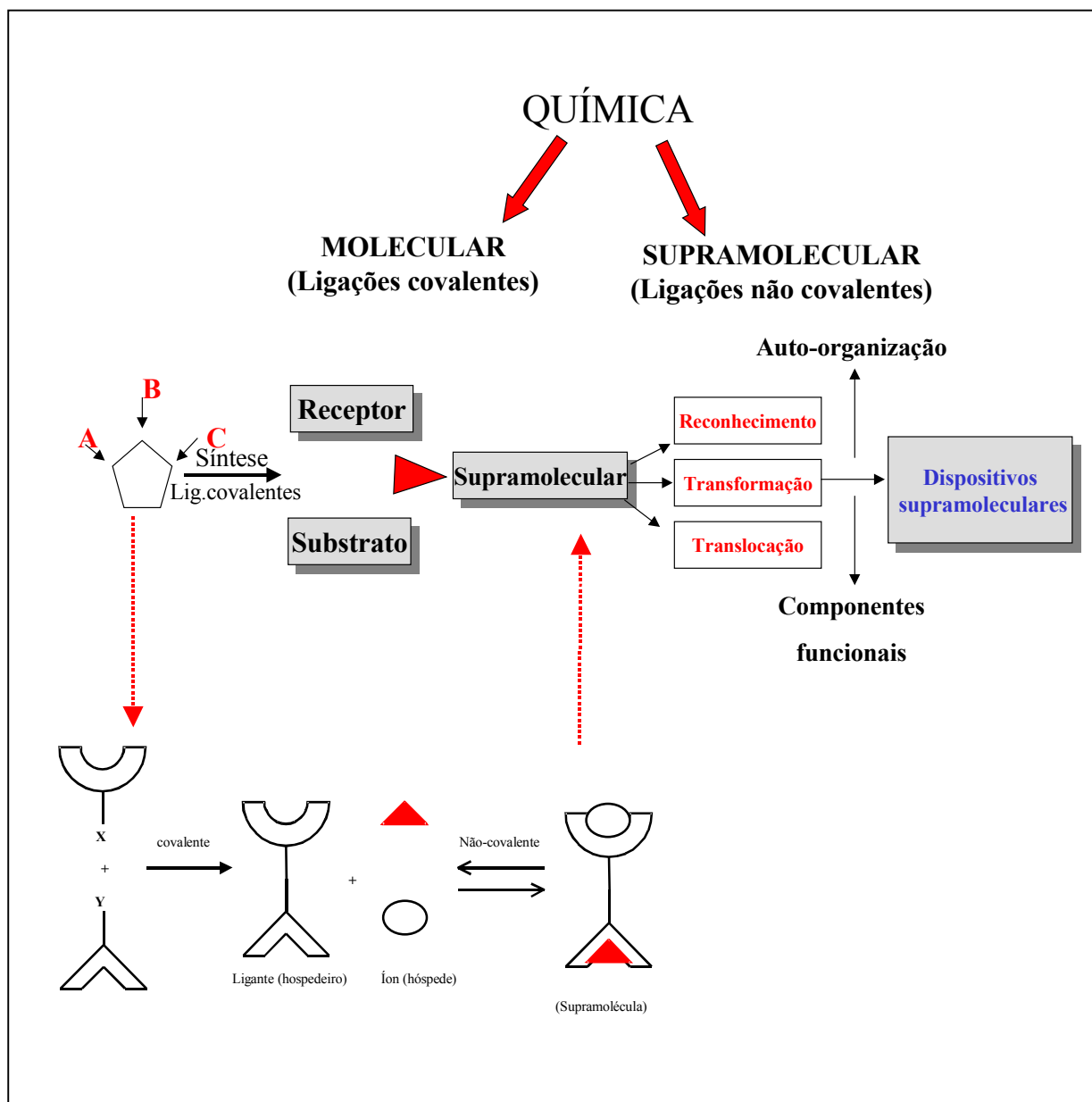


Figura 1.2: Formação de um composto supramolecular a partir de um composto molecular que interage com espécies catiônicas através de ligações não-covalentes.

As estruturas supramoleculares são o resultado não somente de interações aditivas, mas também de interações cooperativas [13, 14], e suas propriedades são, em geral, conseqüências do caráter supramolecular. Estas propriedades são importantes tanto na ciência dos materiais (sensores ópticos não-lineares) como na biologia (desenho de drogas, dobramento de proteínas). A figura anterior resume a química das supramoléculas, desde o aspecto molecular até a composição da idéia de dispositivos como máquinas moleculares e supramoleculares.

A química supramolecular pode conter estruturas bem definidas, formadas por “oligomoléculas” discretas resultante de associação intermolecular de poucos componentes, ou seja, um receptor e um substrato, seguindo o princípio do reconhecimento molecular, ou possuir entidades “polimoleculares” resultantes da associação espontânea de um número “indefinido” de uma fase específica que é organizada a nível microscópico, resultando em estruturas com características macroscópicas como por exemplo filmes, mistelas, fases mesomórficas estruturas do estado sólido entre outros.

As forças intermoleculares mencionadas, que originam as supramoléculas são do tipo eletrostática (íon-íon, íon-dipolo e dipolo-dipolo), ligações de hidrogênio, forças de empilhamento π - π , forças de dispersão (forças van der Waals) e efeitos hidrofóbicos ou solvatofóbicos [13].

Das várias estruturas conhecidas que estão classificadas na química supramolecular, podemos citar os compostos macrocíclicos. Esta classe de compostos pode ser dividida em várias sub-classes, tais como éteres coroa, catenanos, sideroforos, calixarenos e criptatos [13]. Contudo, vale salientar que a sub-classe estudada neste trabalho é a dos criptatos de lantanídeos.

1.2.4-Macrociclos

Segundo a química de coordenação, um macrociclo caracteriza-se por ser uma molécula grande e cíclica, que possuam ao menos 3 ou 4 potenciais átomos doadores que possam atuar em ligações coordenadas a centros metálicos. Embora seja esta uma definição pragmática e empírica, a informação essencial é que o ligante macrocíclico pode ligar um centro metálico no interior de sua cavidade central [13,14].

Pode-se afirmar que o estudo dos ligantes macrocíclicos impulsionou a química inorgânica de coordenação devido a estas estruturas supramoleculares apresentarem propriedades únicas e terem surgido ao mesmo tempo em que novas técnicas físicas e teóricas estavam se desenvolvendo, permitindo assim um melhor entendimento das estruturas e reatividade dos compostos de coordenação [13, 14].

Inicialmente muitos esforços foram empregados no desenvolvimento de rotas sintéticas eficientes para a obtenção de compostos cíclicos elaborados, sendo hoje desejada a síntese dessas supramoléculas com altos rendimentos. Em um segundo momento, o estudo das suas propriedades tornou-se o principal foco de atenção, certamente porque em sua maioria, os complexos macrocíclicos são mais estáveis, termodinâmica e cineticamente, que compostos análogos não cíclicos. Somando-se a esse fato, o interesse por essas supramoléculas é crescente devido o seu emprego clínico, como por exemplo na ligação à metais radioativos para aplicações quimioterapêuticas ou como complexos paramagnéticos de lantanídeos que atuam como agentes de imagem, que se tornarão aplicações rotineiras em breve [13-22].

Da mesma forma que os ligantes macrocíclicos podem ser relacionados à ligantes de cadeias abertas, é possível expandir as estruturas na terceira dimensão para produzir espécies capazes de encapsular íons metálicos ou outras espécies (Figura 1.3). As primeiras espécies que apresentaram esta capacidade foram denominadas criptantes, cujo complexo formado com metais fora chamado criptatos. Esta nomenclatura surgiu do conceito de que o íon metálico encontrava-se encapsulado, no interior da cavidade do ligante [14, 23].

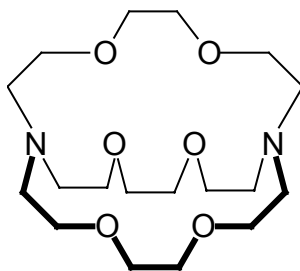


Figura 1.3: Estrutura do [2.2.2]-criptando

Em 1977, Desreux e colaboradores [24] publicaram a síntese de um complexo de lantanídeo com uma diamina monocíclica. A reação de complexação transcorreu em acetonitrila e em condições anidras para prevenir a hidrólise dos íons lantanídeos.

Na década de 80 o pesquisador J. M-Lehn orientou inúmeros trabalhos de síntese e determinação das propriedades luminescentes de diversos tipos de complexos de lantanídeos, que empregavam principalmente anéis heteroaromáticos nitrogenados.

A década de 90 foi marcada pelos estudos das propriedades fotofísicas dos novos macrociclos e criptatos, e suas aplicações em sistemas biológicos. Podemos destacar neste período os seguintes trabalhos: estudos de novos macrociclos com metais de transição e sua aplicação como mediadores na redução de CO₂ [25]; emprego de complexos macrocíclicos como catalisadores em reações de hidroxilação e no transporte seletivo de prata [26]; desenvolvimento e estudo de RMN, luminescência e comportamento eletroquímico de complexos obtidos a partir de bases de Schiff [27].

A partir dessa década podemos ainda destacar o desenvolvimento de rotas sintéticas [28], desenvolvimento de nomenclatura [29] e entendimento da química de formação de estruturas macromoleculares a partir de ligantes menores [30] além de arquitetura molecular [31]. Os grupos que mais contribuíram nesses aspectos foram os grupos dos pesquisadores F. Vogtle e M. Fujita [32].

Valiosas contribuições para a química dos criptatos de lantanídeos foram realizadas por G. Mathis e colaboradores, pelo desenvolvimento e a aplicação da técnica de fluorescência resolvida no tempo em ensaios imunológicos empregando criptatos de lantanídeos, resultando em sistemas miniaturizados [33].

Hoje podemos destacar os trabalhos realizados pelo professor J.-C. Rodríguez Ubis, que desenvolve importantes avanços na síntese de estruturas supramoleculares, sejam ligantes com estruturas abertas ou criptatos [34].

A cada dia, mais avanços são registrados no desenvolvimento de estruturas macromoleculares provenientes de pesquisa no mundo inteiro. Isso é justificado pelo amplo potencial de aplicação dessas estruturas, uma vez que quando complexadas a íons lantanídeos, formam compostos que podem ser empregados em Ressonância Magnética Nuclear de Imagem, Radioimunoterapia, Reagentes de Deslocamento de RMN, catálises, fluoroimunoensaios, etc [13-22, 35].

1.2.4.1-Aspectos sintéticos

Neste tópico serão brevemente descritas as estratégias sintéticas mais utilizadas na síntese de macrociclos: a síntese do tipo *template* e a do tipo *não-template* [13, 36].

Síntese do tipo não-*template*

A maioria dos ligantes macrocíclicos de interesse em química de coordenação pode ser classificado como tendo tamanho médio ou grande, ou seja, envolvem mais de 20 átomos na composição do anel. Embora métodos orgânicos sintéticos para a preparação de estruturas menores estejam bem desenvolvidos e sejam altamente específicos, o mesmo não pode ser dito a respeito dos anéis maiores.

O primeiro aspecto a ser considerado é a tensão do anel. Esta aumenta quanto maior for a necessidade de ângulos e comprimentos de ligações não condizentes com a hibridização dos átomos envolvidos e quando a conformação desejada precisa superar a barreira do impedimento estérico promovido por substituintes.

O fator dominante no controle da síntese de compostos com grandes anéis, é o entrópico. Embora tais compostos possam ser preparados em princípio, a partir de qualquer número de componentes, na maioria dos casos o passo final da reação envolve o processo de ciclização no qual duas extremidades de uma cadeia, contendo funcionalidades reativas mútuas, aproximem-se para formar a ligação de fechamento do anel. Mesmo que a estequiometria da reação envolva dois ou mais componentes, a menos que reações concertadas estejam envolvidas, o que não é comum no caso da síntese de grandes anéis, a etapa final da ciclização pode ser esquematizada como na Figura 1.4.

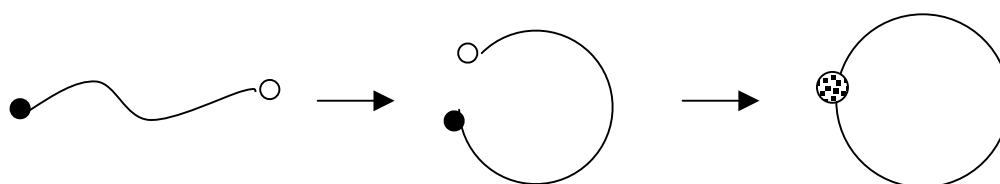


Figura 1.4: Representação esquemática do passo de ciclização na síntese de um macrociclo.

Antes que a ciclização possa ocorrer, os dois grupos reativos devem aproximar-se um do outro. A menos que hajam interações secundárias especiais dentro da cadeia, ou a menos que a reação envolva sistemas rígidos ou pré-organizados, a conformação estendida será a preferida pela molécula. O fato de haver tal barreira entrópica a ser vencida, sugere a polimerização do produto como sendo uma alternativa sintética, frente a desejada macrociclização.

Um método freqüentemente adotado para evitar este problema é o emprego da técnica de condições de reação em *alta diluição*. A probabilidade de uma molécula

encontrar-se com uma segunda molécula igual decresce a medida que a concentração decresce, e assim, a razão macrociclo / polímero pode ser aumentada.

Porém, em alguns casos o emprego da técnica de alta diluição não é necessário. Nestes casos, há a incorporação de sub-unidades rígidas e a conseqüente formação de intermediários acíclicos pré-organizados na conformação correta da ciclização.

Interações secundárias podem ser importantes no controle do curso de uma reação de ciclização. Pode-se prevenir reações indesejadas e viabilizar a síntese em condições “normais” de concentração. Muitas rotas sintéticas podem ser seguidas para a construção de ligantes macrocíclicos [37] e dependendo da seqüência adotada, a estrutura final pode conter grupos idênticos ou diferentes. Pelo esquema da Figura 1.5, podemos distinguir caminhos sintéticos e planejar a seqüência mais adequada a obtenção deste ou aquele macrociclo.

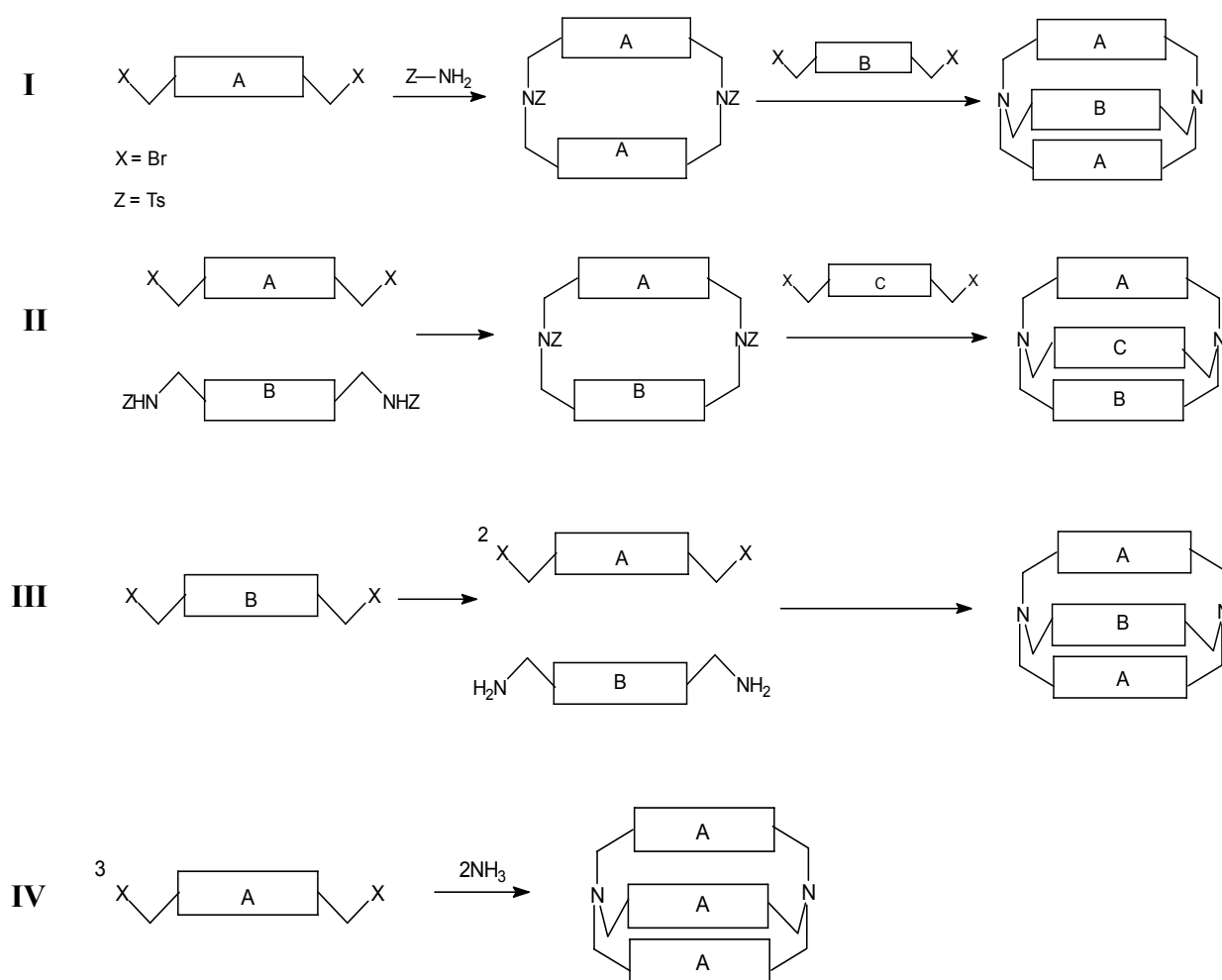


Figura 1.5: Estratégias para a síntese de ligantes macrocíclicos [37].

As rotas I e II representam possibilidades de síntese que se utilizam de um macrociclo mais simples como intermediário. Em I, um macrociclo simétrico diaminado AA é obtido em uma primeira etapa e posteriormente, condensado com uma "ponte" igual aos seus constituintes de partida A ou com uma "ponte" diferente B, para produzir macrociclos AAA ou AAB.

A rota sintética II inicia-se com a tosilação de uma unidade B a partir deste composto bromado ($Z = \text{Tos}$). A essa etapa, segue-se uma condensação com uma "ponte" A, também bromada em suas extremidades, produzindo um macrociclo assimétrico AB. Por fim, uma segunda condensação com uma outra "ponte" dibromada, diferente dos produtos de partida, pode resultar na síntese do macrociclo totalmente assimétrico ABC.

As rotas III e IV constituem-se de procedimentos de macrociclização que dispensam um intermediário, e partem de ligantes acíclicos para que, em uma etapa única, produzam os macrociclos desejados. Em III, o produto bromado B é primeiramente convertido à amina correspondente, e posteriormente sofre condensação com 2 equivalentes do produto bromado A, fornecendo como produto final o macrociclo AAB. Adotando a rota IV, onde "pontes" bromadas reagem em presença de NH_3 , pode-se obter sem nenhuma etapa intermediária, macrociclos do tipo AAA.

Síntese do tipo *template*: reações direcionadas por metal

Como visto anteriormente um dos problemas com a síntese de macrociclos é o controle conformacional das extremidades funcionalizadas, no momento do passo final da ciclização. O *efeito template* é uma estratégia amplamente empregada para evitar este problema [13, 36-39]. Essencialmente, ele consiste da incorporação de átomos doadores adicionais na cadeia e a realização da reação de ciclização na presença de um íon metálico, o qual pode se coordenar a estes átomos (Figura 1.6). A idéia é que o íon metálico coordene-se aos átomos doadores e pré-organize os vários intermediários na conformação requerida para a síntese do produto desejado.

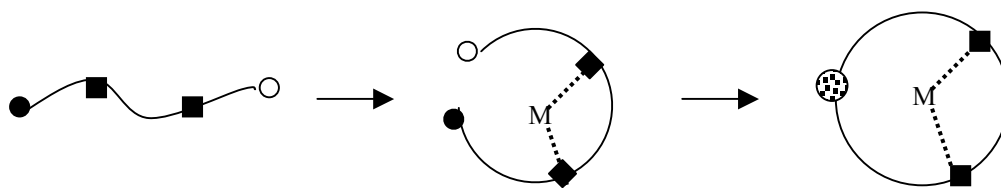


Figura 1.6: Representação esquemática do passo de ciclização via efeito template de um metal, na síntese de um macrociclo.

Reações *template* podem envolver qualquer número de reagentes, embora as ciclizações [1+1] ou [2+2] sejam as mais comuns. Comumente o íon metálico permanece coordenado ao macrociclo e um complexo metálico é obtido diretamente. Vale a pena salientar o fato de que é possível empregar as reações *template*, mesmo quando os precursores orgânicos são instáveis ou quando a obtenção de ligantes macrocíclicos livres são inviáveis.

As vantagens das reações *template* são o fornecimento de bons rendimentos, a obtenção direta do complexo metálico e as condições reacionais brandas, mas infelizmente nem todos os íons metálicos atuam como íon *template* para uma desejada reação e descobrir o íon correto para ser empregado em uma reação de interesse é uma tarefa bastante imprecisa.

O efeito *template* pode ser classificado em dois tipos: o cinético e o termodinâmico.

Segundo o efeito *template* cinético, o íon metálico atua exatamente como explicitado anteriormente. Sua função é controlar a estereoquímica dos intermediários para favorecer a etapa de ciclização. Neste caso, a ausência do íon metálico inviabiliza a ciclização.

Já o efeito *template* termodinâmico é vislumbrado em reações de ciclização que podem ocorrer sem a presença do íon metálico. A função deste último é, ao complexar-se ao macrociclo, imprimir-lhes propriedades tais que permitam sua fácil extração ou remoção do meio reacional.

Embora estes efeitos sejam facilmente definidos, a maioria das reações *template* não foram suficientemente estudadas ou detalhadas para que se possa classificá-las dentro um desse tipos. Isso contudo não impede o emprego dessa metodologia, possibilitando sínteses de estruturas cada vez maiores e mais complexas.

1.3-Imunoensaios

As dosagens imunológicas são agrupadas junto dos métodos analíticos que colocam em jogo a reação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) e são utilizadas para a determinação quantitativa de moléculas biologicamente ativas existentes em concentrações muito baixas como as proteínas, hormônios, medicamentos e microorganismos [17b, 36, 40].

A reação imunológica antígeno-anticorpo é quantificada se um dos reagentes é marcado por uma entidade (íon, molécula, etc) que pode liberar um sinal físico-químico (direto ou indireto) suficientemente intenso que proporcione sua medida de forma quantitativa.

1.3.1-Os marcadores

Por definição, *marcadores* são substâncias que emitem um sinal físico de intensidade proporcional a sua quantidade. Desta forma, se o marcador está ligado irreversivelmente ao complexo de reconhecimento Ag-Ac, sua quantificação permite a determinação do complexo formado [17b, 36, 40]. Dentre as classes de marcadores existentes, detalharemos as mais empregadas em imunoensaios, que são os radioelementos (o iodo 125 por exemplo), as enzimas (a peroxidase por exemplo) e as substâncias fluorescentes (as moléculas orgânicas como a fluoresceína ou os quelatos de certos lantanídeos).

Os métodos de dosagem *radioimunológicos* são os mais empregados pois permanecem competitivos por suas sensibilidade e especificidade. A grande vantagem deste método é a independência da radiação gama em relação as interferências não específicas de componentes da amostra. Contudo eles apresentam os inconvenientes e limitações de se trabalhar com elementos radioativos.

Os métodos que empregam *enzimas* como marcadores são frequentemente empregados em ensaios menos sensíveis que os radioimunológicos (Tabela 1.1). Apesar de serem mais simples e mais acessíveis que estes últimos, a metodologia também precisa ser extremamente controlada já que reações enzimáticas são muito dependentes da temperatura e do tempo. Além disso, se o substrato a ser marcado ou detectado no ensaio for uma substância cromofórica, fluoro ou luminescente, a absorção ou emissão de luz da reação enzimática muda.

Neste contexto, os métodos de dosagem *fluoroimunológicas* suscitam um grande interesse porque eles apresentam inúmeras vantagens tais como a rapidez da medida, a estabilidade, a inocuidade dos reagentes marcadores e o custo relativamente reduzido. Por outro lado, juntamente com o progresso realizado na instrumentação, as imunodosagens que utilizam quelatos de lantanídeos como marcadores tem longa vida de duração e alcançam os limites de detecção apresentados pelas dosagens radioimunológicas. Na seção 1.3.4, detalharemos as vantagens e desvantagens no emprego de marcadores fluorescentes.

Tabela 1.1: Limites da detectabilidade física para marcadores [40a]

Marcador	Sensibilidade f Mol.L ⁻¹
<i>Radioisótopos</i>	
I ¹²⁵	<10
H ³	<100
<i>Enzimas</i>	
Peroxidase, fosfatase	<100
<i>Partículas sólidas</i>	
Látex	<10
<i>Fluorescentes</i>	
Fluoresceína	<10
Lantanídeos (Európio)	0,01-1
<i>Luminescentes</i>	
Isoluminol	<1
Acridina	0,01-1

Qualquer que seja o marcador, o princípio de uma imunodosagem consiste na indução da reação antígeno-anticorpo e a determinação da quantidade de antígeno por meio de curvas de calibração por comparação dos sinais obtidos (tais como contagem, absorbância, quantidade de fótons emitidos) pelas amostras das quais apresentam concentrações conhecidas.

As técnicas de imunodosagens podem ser agrupadas em duas categorias, de acordo com as proporções relativas de anticorpos e de antígenos presentes na reação. Distinguem-se assim os métodos ditos “em falta de anticorpos” ou métodos por competição, e os ditos “em excesso de anticorpos”. Dentre estes últimos, os métodos imunométricos a dois sítios ou métodos “sanduíche” são os mais utilizados e estão amplamente desenvolvidos depois da utilização de anticorpos monoclonais. Em seguida, apresentaremos brevemente estes dois métodos de dosagem imunológica.

1.3.2-Métodos de dosagens

Os métodos de dosagem podem ser classificados como métodos competitivos e imunométricos [17b, 36, 40]. Seus princípios básicos serão descritos a seguir.

Dosagem imunológica por competição

O princípio geral é fazer reagir simultaneamente um antígeno marcado (Ag^*) e o antígeno a dosar (Ag) com uma quantidade limitada de anticorpos (Ac) em relação aqueles que vão entrar em competição (Figura 1.7).

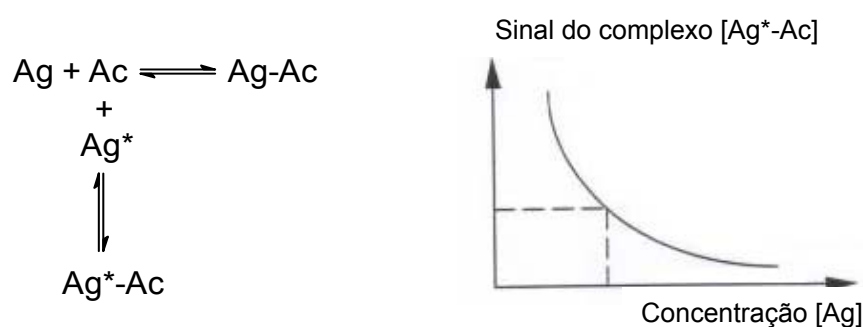


Figura 1.7: Dosagem imunológica por competição.

O aumento da concentração de Ag implica num aumento da concentração do complexo Ag-Ac em detrimento da formação do complexo $\text{Ag}^*\text{-Ac}$. A concentração do antígeno Ag desconhecida pode ser determinada no meio por uma curva de escalonamento pela medida seletiva do sinal emitido pelo complexo $\text{Ag}^*\text{-Ac}$.

Dosagem imunométrica (técnica “sanduíche”)

Este método de dosagem é mais específico porque faz intervir dois determinantes antigênicos específicos a dois anticorpos diferentes. Consiste em fazer reagir o antígeno a dosar (Ag) com dois anticorpos, um dentre estes, previamente marcado, como exemplificado na Figura 1.8.

A medida seletiva do sinal do complexo Ac-Ag-Ac* permite a determinação da concentração do antígeno desconhecida por meio de uma curva de calibração como a da figura abaixo.

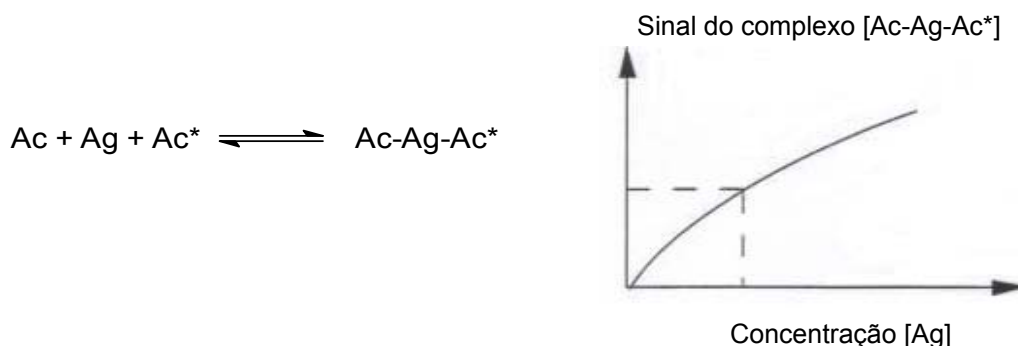


Figura 1.8: Dosagem imunométrica.

1.3.3-Processos em fase homogênea ou heterogênea

Os métodos de dosagens imunológicas por competição ou imunométricos podem ser desenvolvidos em fase heterogênea ou homogênea.

- ♦ O procedimento em fase heterogênea implica uma separação das espécies livres marcadas daquelas complexadas. A maior parte das dosagens em fase heterogênea utiliza um suporte sólido para imobilizar os anticorpos. Após a fixação do antígeno, etapas de lavagem devem ser efetuadas no intuito de eliminar as espécies não ligadas; a medida do sinal é desta forma específica ao complexo imunológico formado e portanto, a ser dosado.

- ♦ O processo em fase homogênea não implica em qualquer separação de espécies livres ou não livres. A medida do sinal é efetuada diretamente dentro da solução. Estes métodos ditos homogêneos têm a vantagem de serem rápidos e facilmente automatizados à condição da medida do sinal ser específica a ligação imune. As fluoroimunodosagens sem separação de fases repousam, portanto, sobre a modulação do sinal dos marcadores no meio reacional imunológico ou no seio do complexo imunológico.

Exemplos mais detalhados desses diferentes processos podem ser encontrados nas seções 1.4.1 e 1.4.2.

1.3.4-Os marcadores fluorescentes [17b, 36, 40]

1.3.4.1-Os fluoróforos orgânicos

Os marcadores fluorescentes utilizam dentro de suas dosagens, moléculas orgânicas que são derivadas da fluoresceína e da rodamina, as quais liberam um intenso sinal (rendimento quântico elevado), mas pouco específico.

As características fotofísicas destes compostos tais como o fraco deslocamento Stokes (intervalo do comprimento de onda que separa os máximos dos espectros de emissão e excitação: 20-50 nm), comprimento de onda de emissão inferior a 600 nm e duração do tempo de vida da fluorescência curto (<20 ns), causam sérias limitações a este método, por não permitir a distinção dos fenômenos parasitas (provenientes do meio) nas medidas de fluorescência, tanto em solução aquosa (método heterogêneo) como em meio biológico (método homogêneo).

As medidas de fluorescência em imunoanálise podem ser afetadas por muitos fenômenos parasitas ou interferentes, os quais abaixam a relação sinal / ruído de fundo, dentro do limite de detecção, os quais relacionam-se a:

- ✓ Fenômenos de difusão (Rayleigh e Raman) produzem um espalhamento indesejável, detectado ao mesmo tempo em que o espalhamento da fluorescência. A difusão Rayleigh é mais importante quando o meio de medida é rico em macromoléculas ou em partículas em suspensão (no caso dos meios biológicos). A difusão Raman sobrevive

quando uma parte da energia dos fótons incidentes é transferida para as moléculas do meio (principalmente as de solvente), sob a forma de energia rotacional e vibracional, e a luz difundida aparece assim em um comprimento de onda superior aquele da luz incidente.

- ✓ Fenômenos de supressão se traduzem por um enfraquecimento da intensidade da fluorescência. Os fluoróforos orgânicos são freqüentemente muito sensíveis a flutuações do meio de medida. Por exemplo, uma variação mínima do pH, da polaridade, do estado de oxidação do meio, ou ainda a presença de elementos de supressão, podem modificar o rendimento quântico da fluorescência.
- ✓ Fluorescência produzida pelas amostras biológicas (proteínas séricas, bilirubina, NADH), que podem gerar sinais não específicos entre 320-600 nm.

Os métodos de dosagens que utilizam tais marcadores proporcionam medidas com sensibilidade inferior a dos métodos que empregam radioisótopos e limitam-se a dosagens de compostos presentes em concentrações relativamente elevadas.

Em imunoanálise, um bom limite de detecção de um sinal de fluorescência necessita da utilização de um fluoróforo que emita um sinal intenso e específico. Esta especificidade pode ser obtida por uma seletividade na medida do comprimento de onda e no tempo. Certos quelatos de lantanídeos (Eu^{3+} e Tb^{3+} , essencialmente) apontam como uma solução para estes problemas.

1.3.4.2-Os quelatos de lantanídeos

Como mencionado anteriormente (sessão **1.2.4**), os macrociclos de lantanídeos vêm sendo utilizados como traçadores em imunodosagens. Contudo, para que estes possam ser utilizados em métodos imunológicos, devem responder a certas exigências, relacionadas a seguir:

- ✓ O complexo de lantanídeo deve ser estável em meio aquoso (dosagem heterogênea) e em meio protéico salino (dosagem homogênea).

- ✓ Ele deve ser capaz de formar com a molécula de anticorpo, uma ligação estável e que não perturbará a reação imunológica.
- ✓ Deve apresentar forte absorbância ($\epsilon \geq 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e um forte rendimento quântico de emissão de luminescência. É desejável que a absorção do marcador seja suficientemente forte, e tenha um comprimento de onda superior a 320 nm, para eliminar o efeito do filtro devido a absorção pelas proteínas do soro.
- ✓ A duração da vida da luminescência do marcador deve ser suficientemente longa para permitir a medida do sinal luminescente por fluorimetria de resolução temporal (objeto do tópico seguinte), afim de melhorar a especificidade do sinal.

Comprovadamente complexos de coordenação formados de íons lantanídeos com criptatos apresentam boa solubilidade em água e elevada estabilidade cinética e termodinâmica [23]. Os principais estudos fotofísicos mostram que estes criptatos povoam eficientemente o nível emissor ($^5\text{D}_0$ para o Európio e $^5\text{D}_4$ para o Tértbio) do íon metálico através de processos não-radiativos, fornecendo assim, altos rendimentos quânticos de emissão. Por isso os criptatos de lantanídeos apresentam grande aplicabilidade em sistemas biológicos [13-22, 35], e há uma necessidade crescente de pesquisas de novos criptatos projetados para estes fins.

1.4-A fluorimetria de resolução temporal

O princípio da fluorimetria de resolução temporal é esquematizado na Figura 1.9 [41]. Uma fonte de excitação (lâmpada de xenônio ou laser pulsado) emite breves *flashes* luminosos entre os quais são efetuadas as contagens de fótons. Estes, depois de um certo tempo, desaparecem progressivamente (100-200 μs). O ruído de fundo da fluorescência, proveniente dos fenômenos de difusão e da fluorescência não específica (do meio biológico) possui duração de vida curta, e conseqüentemente não são detectados. O sinal do traçador com tempo de vida longa pode assim ser medido com uma forte especificidade, a partir de um tempo t .

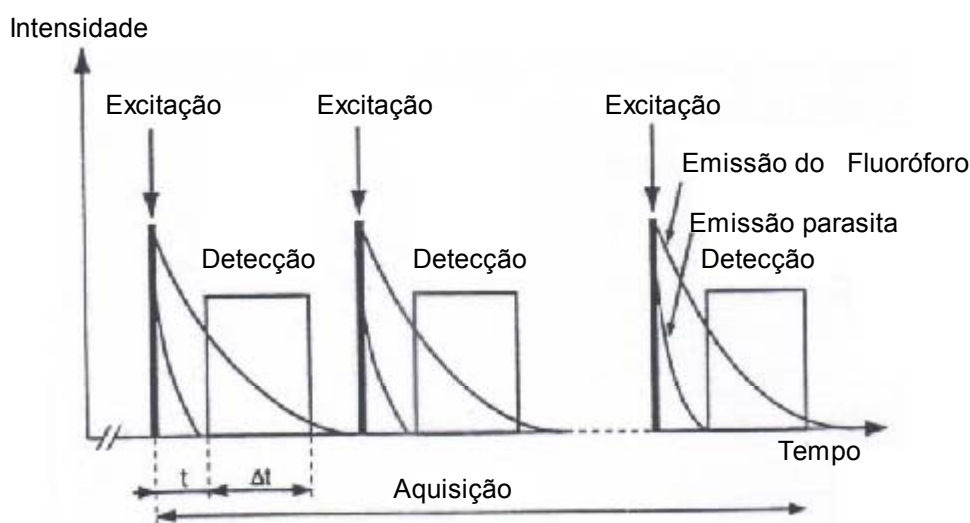


Figura 1.9: Fluorimetria resolvida no tempo.

São descritos brevemente no parágrafo a seguir, dois sistemas destas dosagens imunométricas utilizadas em fases homogênea e heterogênea, com resolução temporal.

1.4.1-Procedimento em fase heterogênea: método Delfia

Este método consiste de um método “sanduíche”, que necessita de dois anticorpos monoclonais direcionados a dois epitopos diferentes do antígeno a dosar [36, 41, 42].

Exemplificamos este método na Figura 1.10. O primeiro tipo de anticorpo é fixado sobre um suporte sólido e o segundo tipo de anticorpo é marcado por um quelato de Eu^{3+} pouco luminescente (o ligante pode ser um derivado de ácido policarboxílico, EDTA ou DTPA, fortemente complexantes).

Depois da reação imunológica, as espécies não ligadas são separadas das espécies complexadas por lavagens. O íon Eu^{3+} é em seguida dissociado de seu quelato inicial em um pH ácido e depois novamente complexado, só que desta vez, por uma outra molécula, a naftoiltrifluoroacetona. A adição do óxido de trioctilfosfina promove a incorporação do novo quelato (muito luminescente) dentro de uma miscela de tensoativos não iônicos (diminuidores da supressão provocada pela água) e melhoram fortemente a intensidade de luminescência medida.

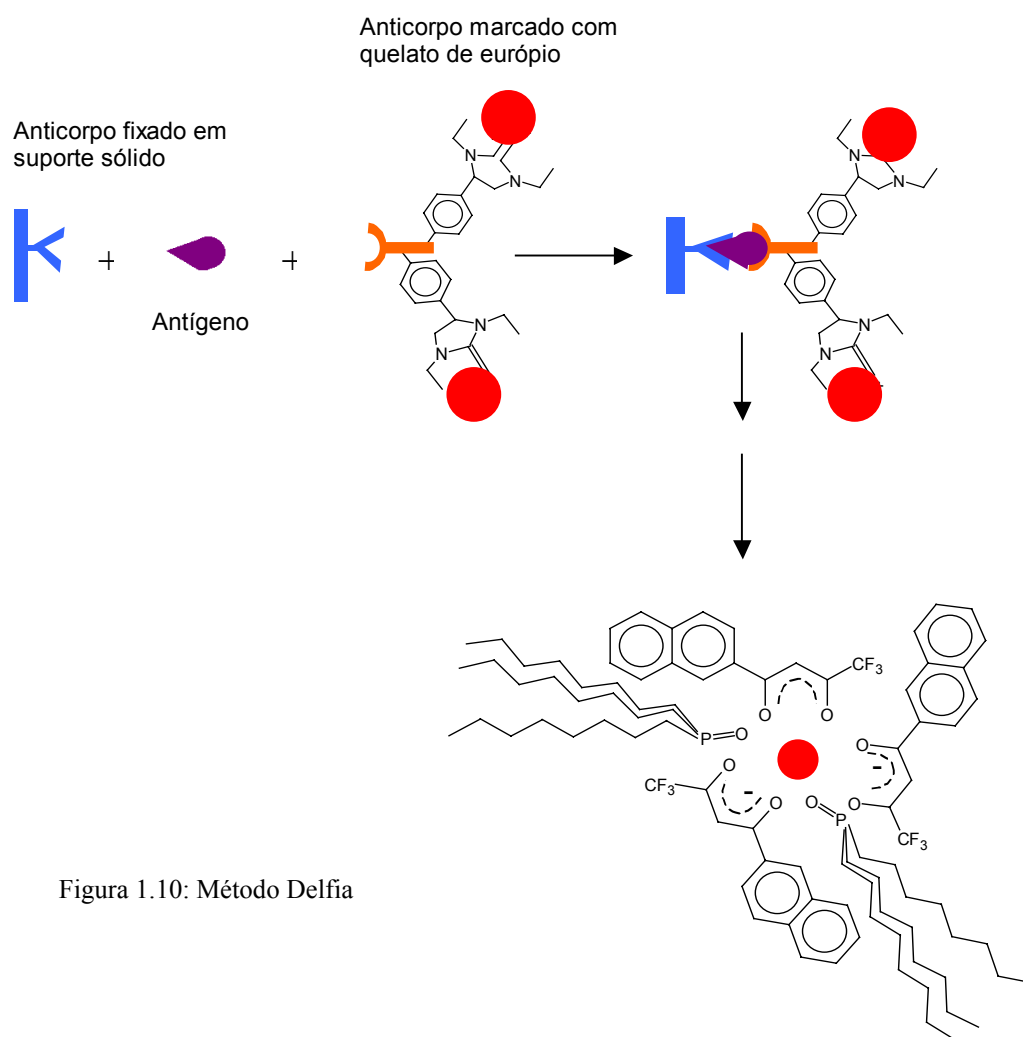


Figura 1.10: Método Delfia

Esta técnica permite amplificar a luminescência em mais de um milhão de vezes e medir concentrações de íon európio da ordem de $5 \cdot 10^{-14}$ a 10^{-7} mol.L⁻¹. Obtém-se assim uma sensibilidade da ordem daquelas obtidas com os marcadores radioativos, como o iodo 125.

A dosagem em fase heterogênea necessita de etapas adicionais (lavagens, aditivos) antes de se efetuar a medida do sinal de luminescência e são por estas razões, dificilmente automatizadas.

O método de dosagem, recentemente desenvolvido pela Cis Bio International, objeto do próximo parágrafo, difere dos procedimentos pré-existentes, por permitir uma medida direta em solução do sinal luminescente.

1.4.2-Procedimento em fase homogênea: método TRACE® (Time Resolved Amplification of Cryptate Emission)

O método de dosagem imunométrica TRACE® repousa sobre o princípio da transferência de energia não radiativa, entre um doador (um criptato de Eu^{3+}) e um receptor (uma ficobiliproteína), que ocorre a distâncias características de complexos [anticorpos marcados por doador – antígeno – anticorpo marcados por receptor] [6, 15, 43]. A transferência de energia permite a amplificação do sinal devido a presença do criptato de Eu^{3+} e efetua-se a medida do sinal do receptor com resolução temporal.

O doador é um complexo com o íon de Eu^{3+} (Figura 1.11) incluso na estrutura macrobíciclica do ligante, que o assegura boa estabilidade, complexação seletiva em meio biológico e fornecendo proteção ao íon contido na cavidade. As principais propriedades fotofísicas do criptato fotoativo ligado a anticorpos, tais como longa vida de fluorescência (em torno de 1 ms) são conservadas em meio sérico.

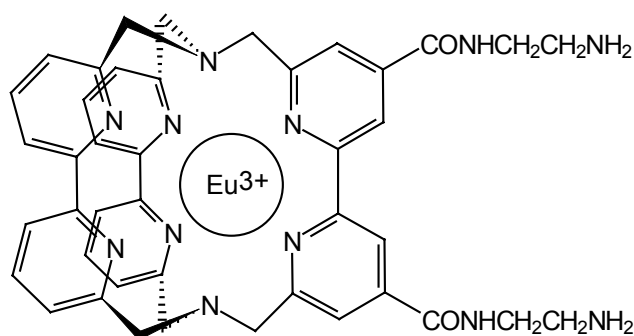


Figura 1.11: Complexo de Európio empregado na metodologia TRACE®.

O receptor em questão é uma ficobiliproteína de 105 u.m.a., a aloficocianina modificada quimicamente (XL 665), que tem sido escolhida como receptor em razão das propriedades seguintes:

- ✓ Apresenta uma grande absorção molar ($\lambda_{\text{max}}=650 \text{ nm}$, $\epsilon=750.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) no comprimento de onda de emissão do criptato de Eu^{3+} , permitindo assim uma grande eficácia de transferência de energia doador-receptor (75% para uma distância doador-receptor de 7,5 nm).

- ✓ A emissão da fluorescência da aloficocianina ocorre com um forte rendimento quântico ($q=0,68$) dentro da região espectral onde a emissão de luminescência do criptato de Eu^{3+} é negligenciável.
- ✓ As propriedades fotofísicas da aloficocianina acoplada aos anticorpos são preservadas em meio sérico.

Na ausência de transferência de energia não-radiativa entre o doador e o receptor, a emissão de fluorescência do receptor ocorre com uma duração de vida muito curta (duração de vida de fluorescência da aloficocianina é de 2,7 ns) (Figura 1.12).

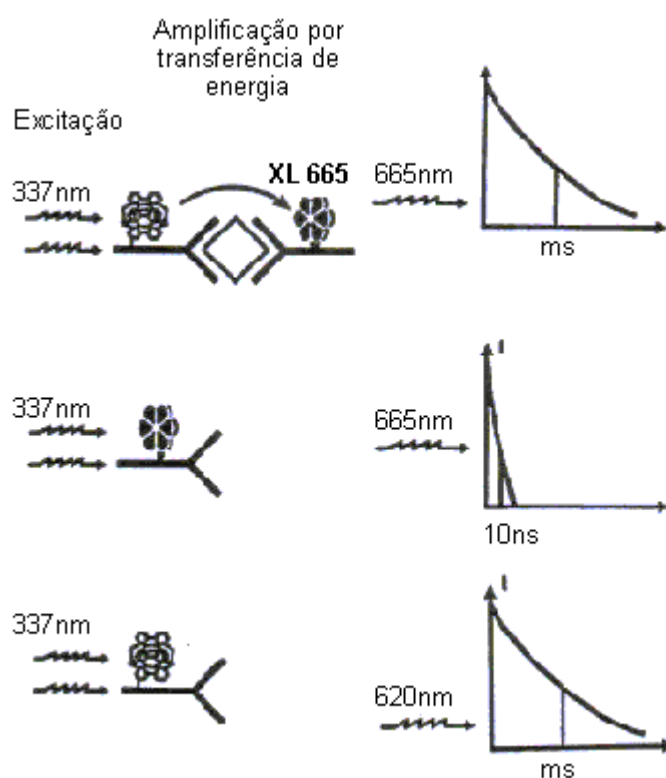


Figura 1.12: Detalhamento do método TRACE®

Em presença de antígeno, a excitação a 337 nm do meio de medida leva a emissão dos anticorpos marcados com o criptato de Eu^{3+} em excesso (tempo de vida longo), seja a emissão de anticorpos marcados a aloficocianinas livres ou as ligadas ao complexo imune.

Na transferência de energia não radiativa doador-receptor, a componente temporal do sinal emitido pelo receptor apresenta uma contribuição igual àquela do doador, desta

forma, a fluorescência emitida pelo receptor dentro do complexo imune apresenta igualmente um tempo de vida de longa duração e pode ser separada do sinal emitido pelo receptor livre por uma medida resolvida no tempo. O sinal do receptor medido em tempo resolvido pode desta forma ser separado do sinal do doador observando-se que eles pertencem a regiões espectrais distintas.

Assim, o sinal emitido pelo receptor a 665 nm medido em tempo resolvido é proporcional a concentração do complexo imune (aquele em que o antígeno está presente) (Figura 1.13). Uma medida simultânea a 665 nm e 620 nm permite a correção da intensidade de fluorescência da densidade óptica do meio biológico. O sinal dos anticorpos marcados com o criptato de európio é utilizado como referência interna. A razão dos sinais a 665 nm/620 nm é unicamente característica da quantidade de antígeno a dosar [15b].

Este método de dosagem em fase homogênea tem sido notadamente testado com os anticorpos marcados, específicos para a prolactina. O limite de detecção é de 0,3 $\mu\text{g/L}$ o que é perfeitamente comparável aos testes heterogêneos, baseados na utilização de marcadores radioativos.

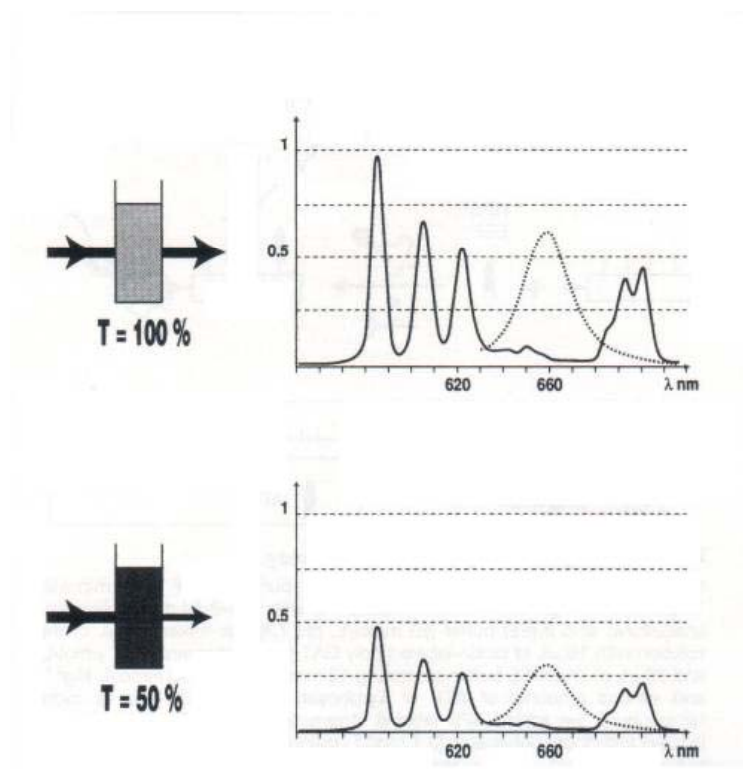


Figura 1.13: Esquema de detecção em dois comprimentos de onda. No eixo das ordenadas é medida a intensidade de fluorescência e no eixo das abscissas, o comprimento de onda em nm. O gráfico contínuo representa a emissão do criptato e o pontilhado, representa a emissão da alofococianina. Em ambos os casos a razão dos sinais 665 nm / 620 nm é constante e igual a 1 [15b].

Na Figura 1.13, apresentamos um esquema de detecção em dois comprimentos de onda. Este é um exemplo de um ensaio imunométrico que emprega excesso de anticorpos. O sinal específico medido a 665 nm decresce pela metade quando o comprimento de onda de excitação move-se de 100% a 50%. Por outro lado, para ambas as situações, a razão entre os sinais (665/620) é constante e proporcional apenas a concentração do analito. Estas observações também são válidas para ensaios competitivos.

Dessa forma, a técnica de fluorometria com resolução temporal aliada às propriedades interessantes dos criptatos de lantanídeos, contribui com o desenvolvimento de novos métodos de detecção e dosagens biológicas.

Nessa tese, foram desenvolvidos dois sistemas que empregam os criptatos de lantanídeos como marcadores luminescentes. O primeiro, baseia-se na utilização de uma lectina bastante conhecida, a Concanavalina A, que conjugada a uma enzima já vem sendo empregada em testes de histoquímica. A segunda aplicação em desenvolvimento intenta desenvolver um método fluorescente de detecção de microcistina-LR, uma toxina hepatotóxica, em amostras de água.

1.5-Lectinas

Em 1888 Hermann Stillmark constatou que extratos de *Ricinus communis* promoviam a aglutinação de eritrócitos, durante a investigação de sua toxicidade. Estudos detalhados foram capazes de isolar e caracterizar, a partir desses extratos, a Ricina [44].

Embora tenham sido descobertas há mais de um século, a denominação lectina, do latim *lectus* (=selecionar), começou a ser empregada em 1954 por Boyd, para identificar um novo grupo de proteínas que apresentavam como propriedade comum a capacidade de complexar-se seletivamente a glicoconjugados [44, 45].

São definidas hoje como um diverso grupo de proteínas e glicoproteínas que apresentam a capacidade de se ligar específica e reversivelmente a mono e oligossacarídeos, não sendo de origem imunológica, nem classificadas como enzimas. São capazes de reconhecer açúcares específicos, através de pelo menos dois sítios de ligação ao carboidrato, que se ajustam em um mecanismo do tipo chave-fechadura. A formação do complexo lectina-carboidrato envolve o deslocamento das moléculas de água associadas aos grupos polares das proteínas e das que se encontram ao redor do grupamento açúcar.

Ocorre então a formação de novas pontes de hidrogênio que, juntamente com as forças van der Waals conferem a estabilidade da ligação do complexo recém formado [44, 46a].

As lectinas costumam ser classificadas de acordo com suas especificidades quanto ao reconhecimento de açúcares terminais, presentes em cadeias laterais de carboidratos [44, 46] embora seja crescente o número de pesquisadores que optem por outros critérios tais como sua origem e evolução [47].

Essa classe de proteínas encontra-se amplamente difundida na natureza, encontrada desde microorganismos, como vírus e bactérias, até animais e plantas. Ainda hoje, o principal método de detecção dessas estruturas ocorre por intermédio de ensaios de hemaglutinação [44, 46a, 47]. Mesmo já tendo sido isoladas a partir de uma enorme quantidade de organismos e diferentes órgãos vegetais, são os estudos com lectinas extraídas de sementes de leguminosas que propiciam a maior compreensão das propriedades moleculares, bioquímicas e funcionais destas proteínas [46, 48].

1.5.1-Funções naturais das lectinas

As funções exercidas pelas lectinas permanecem sob intensa investigação [47]. O fato de seus genes terem sido conservados durante todo o processo evolutivo, além de apresentarem homologies entre o código genético de lectinas extraídas de animais e de plantas [46, 48, 49, 50], sugere que essa classe de proteínas exerça atividades importantes para a manutenção da vida.

As *galectinas* [51], uma família de lectinas de origem animal, estão relacionadas a uma grande variedade de fenômenos biológicos, tais como defesa contra agentes patogênicos, regulação imunológica, metástase tumoral, prevenção da auto-imunidade, etc, embora seu mecanismo de ação ainda não tenha sido totalmente esclarecido.

As *anexinas* são uma família de proteínas que complexam cálcio e reconhecem fosfolipídeos. A essa classe de lectinas, são associadas funções como formação de complexos com fosfolipídios para a regulação da atividade da fosfolipase, além de funções como transporte vesicular, endocitose e exocitose [46a, 47].

A classe mais abundante é a de lectinas extraídas de leguminosas. Apresentam propriedades físico-químicas similares porém diferem em suas especificidades por carboidratos. Desempenham principalmente funções de proteção e como proteínas de reserva dos organismos em que se encontram [46, 47].

Funções tais como recepção de hepatócitos e de células *natural killers*, além de reconhecimento e adesão celular estão associadas a uma outra família de lectinas, as *tipo-C*. Podem ser subdivididas de acordo com semelhanças estruturais e/ou funcionais. São lectinas de origem animal, que também desempenham funções de defesa do organismo e que necessitam estar complexadas a íons cálcio para desempenharem suas atividades [46a, 47].

1.5.2-As lectinas vegetais

As lectinas vegetais foram as primeiras a serem estudadas, pois os processos de isolamento são relativamente simples e elas são abundantes na natureza. A diversidade dos fenômenos em que as lectinas vegetais estão envolvidas, tanto na própria planta, quanto em atividades “in vivo” e “in vitro” envolvendo fenômenos celulares, faz delas uma classe de proteínas bastante empregada em biotecnologia.

Aspectos sobre o reconhecimento de carboidratos na superfície celular, bem como a estrutura destes, vêm sendo ostensivamente estudados durante as últimas décadas, sendo essa propriedade muito aplicada nas pesquisas sobre a arquitetura e dinâmica dos carboidratos da superfície da célula durante a divisão e diferenciação celular. Assim, as lectinas vegetais têm sido utilizadas como ferramentas no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos em muitos fenômenos biológicos [46a]. A Concanavalina A destaca-se por possuir sua estrutura e propriedades bem conhecidas e vem sendo aplicada também em testes de reconhecimento celular.

1.5.2.1-Concanavalina A (Con A)

Extraída de *Canavalia ensiformis*, a Concanavalina A (Con A) foi descoberta em 1936 sendo a primeira lectina a ter sua estrutura tridimensional resolvida pelo método de cristalografia de raios-X. É constituída por um tetrâmero e sua estrutura secundária é quase em sua totalidade, formada de folhas beta anti-paralelas [52].

Apresentando especificidade para os monossacarídeos D-manose/D-glucose, pode ser definida como uma metaloproteína, pois cada um de seus monômeros complexa íons Ca^{2+} e Mn^{2+} . Aparentemente, esses íons são necessários para a manutenção da conformação da lectina, contribuindo para a que os sítios de reconhecimento a carboidratos

sejam corretamente expostos [44, 52]. Esses sítios de ligação a metais estão situados no grupo amino terminal das cadeias polipeptídicas.

Os sítios funcionais da Con A também foram determinados, através da estrutura cristalográfica da lectina complexada com carboidratos. Embora os aminoácidos envolvidos na ligação ao açúcar se encontrem em posições bem diferentes na sequência primária da proteína, espacialmente eles se localizam próximos uns dos outros na sua conformação nativa.

A Figura 1.14 ilustra a estrutura tetramérica da Con A, onde as pequenas esferas observadas representam os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , situados próximos do sítio de reconhecimento a açúcares.

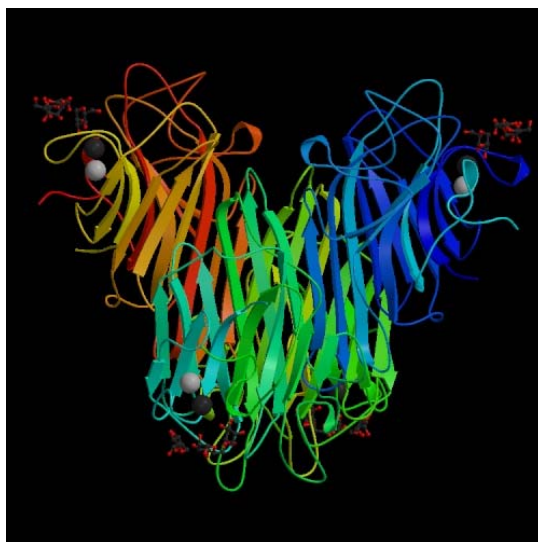


Figura 1.14: Estrutura da Con A, resolvida por Karl D. Hardman e Clinton F. Ainsworth [52].

1.5.3-Aplicações biotecnológicas das lectinas

Por apresentarem diferentes capacidades de reconhecimento juntamente com a susceptibilidade de serem conjugadas a marcadores, estas proteínas são capazes de atuarem como sondas, localizando sequências de açúcares a níveis morfológicos. Sendo assim, elas vêm sendo empregadas como reagentes extremamente úteis para o isolamento de glicoconjugados, para a caracterização de carboidratos, bem como para a monitoração de mudanças que ocorrem na superfície das células em processos de desenvolvimento, em processos patológicos ou de diferenciação [46a, 53-55]. Elas têm sido identificadas como

moléculas mediadoras no reconhecimento celular em vários processos biológicos: isso porque as células reconhecem qualquer outro par que interaja com elas (outra célula, vírus, bactérias ou protozoários) através da complementaridade dos carboidratos contidos em sua superfície.

Pode-se exemplificar as aplicações dessa classe de proteínas, citando seu emprego no desenvolvimento de métodos de cromatografia líquida de alta performance por afinidade [56]; emprego em tipagem sanguínea; caracterização de diferentes estágios do desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*; desenvolvimento de matrizes inertes para purificação de glicoconjugados; quantificação e caracterização dessas mesmas glicoproteínas [46]; investigação de disfunções no tecido epitelial associadas a transformações neoplásicas [54]; vetores para o mapeamento de estruturas celulares cerebrais, em doentes com Mal de Alzheimer [55]; investigação de tumores com lectinas conjugadas a peroxidase [53]; investigação de atividade hipoglicemiante de lectinas para combate a diabetes [57]; utilização terapêutica no tratamento de câncer [58]; acompanhamento da progressão, diagnóstico e tratamento de processos inflamatórios [51] e liberação controlada de drogas [59].

Especificamente a Con A tem sido empregada como sonda para auxílio em diagnósticos patológicos de tumores e distúrbios metabólicos, isto porque não existe um critério absoluto, dentro da patologia, permitindo o reconhecimento de moléculas malignas sem que haja a marcação de células normais [53a].

Diante do exposto, esta classe de proteínas surge como promissoras ferramentas que podem ser conjugadas a marcadores luminescentes, como criptatos de lantanídeos; e atuarem como sondas em diagnósticos histoquímicos ou dosagens imunológicas.

1.6-Microcistina LR

Cianobactérias são microrganismos procariotos fotossintetizantes, isto é, são capazes de sintetizar clorofila e de produzir O₂ como resultado da fotossíntese. Devido a alta concentração de pigmento ficocianina, que ocorre em determinadas condições, estes microrganismos são também denominados como algas azuis.

As cianobactérias produzem uma variedade de metabólitos cuja função natural não está esclarecida, mas que são capazes de exercer ações tóxicas em seres humanos e

animais. Algumas produzem toxinas que fisiologicamente podem ser de dois tipos: Neurotoxinas e Hepatotoxinas.

- **Neurotoxinas:** são alcalóides (compostos de baixa massa molecular que contém nitrogênio), capazes de bloquear a transmissão dos impulsos nervosos entre neurônio-neurônio e neurônio-músculo, nos animais e no homem. Os sintomas de exposição incluem tontura, fasciculações, dificuldade para respirar e convulsões. Podem ser fatais em altas concentrações devido a paralisação do músculo diafragma. As neurotoxinas produzidas são as anatoxina-a, anatoxina-a(S), e as toxinas paralisantes (“Paralytic Shellfish Poisons” – PSP’s, saxitoxinas e análogos).
- **Hepatotoxinas:** são as toxinas peptídicas cíclicas da família das microcistinas e nodularinas, que compõem o grupo de toxinas de cianobactérias mais frequentemente encontradas em florescimentos de água doce e salobras. Uma outra toxina hepática conhecida é a cilindrospermopsina, um alcalóide.

As microcistinas são heptapeptídeos monocíclicos produzidos por cepas do gênero *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Hapalasiphon* e *Anabaenopsis* (Figura 1.15) [60].

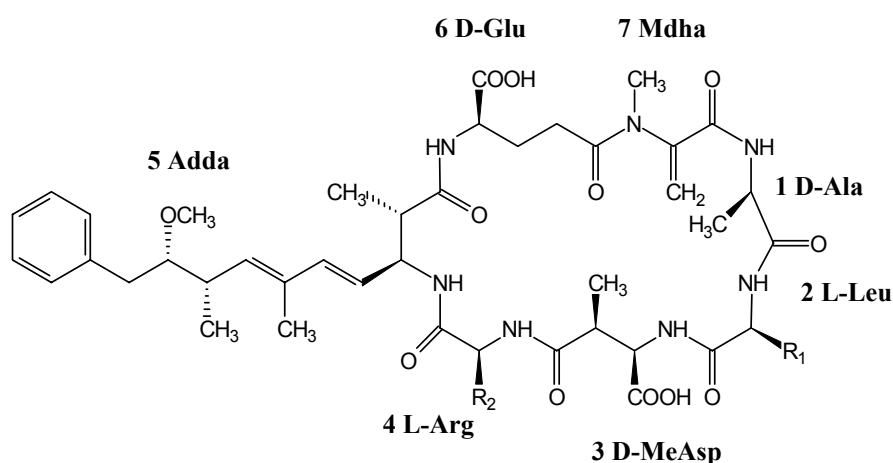


Figura 1.15: Microcistina-LR

Acidente grave e fatal ocorreu na cidade de Caruaru-PE, região agreste do Estado de Pernambuco, abastecida pelo reservatório de Tabocas, através de intoxicação aguda

com as toxinas microcistina e cilindrospermopsina veiculadas em água de diálise. Cento e vinte e seis pacientes renais em tratamento apresentaram sintomas de neurotoxicidade aguda e hepatotoxicidade subaguda. Dos pacientes atingidos 51 faleceram num intervalo de cerca de dois meses após a primeira morte relatada, culminando com um total de 76 mortes até agosto de 1997. O tratamento inadequado da água, acompanhado da falta de monitoramento dos níveis de toxinas, permitiu que tal acidente ocorresse.

A quantificação e a identificação das cianotoxinas em água pode ser realizada por diversos métodos, podendo variar no grau de sofisticação e de informação gerada, bem como na seletividade e sensibilidade. Contudo, os métodos imunossensores [60, 61] são considerados os mais promissores para a detecção de microcistinas em água, o que subsidia o desenvolvimento destes como alternativa para o monitoramento ambiental da presença destas toxinas em água.

Capítulo.2:
Procedimentos
experimentais

Este capítulo encontra-se dividido em duas partes: a primeira descreve a metodologia sintética adotada e a caracterização do criptato obtido, enquanto a segunda parte relata o procedimento de conjugação deste criptato à lectina Con A, e o procedimento de caracterização do produto final.

PARTE I

2.METODOLOGIA, SÍNTESES E CARACTERIZAÇÃO DO CRIPTATO DE LANTANÍDEO.

Nesta etapa do trabalho, objetivou-se primeiramente as sínteses, caracterização e estudo espectroscópicos dos macrociclos relacionados abaixo (Figura 2.1). Posteriormente eles foram testados em sua eficiência como marcadores.

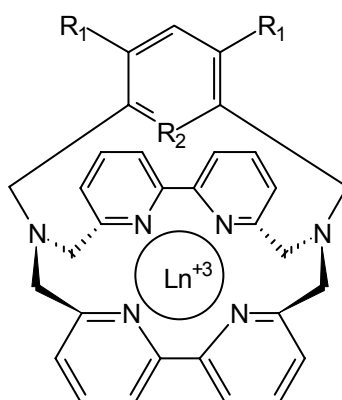


Figura 2.1: Macrociclos, onde $R_1 = \text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ou $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$; $R_2 = \text{N}$ ou $\text{N} \rightarrow \text{O}$ e $\text{Ln}^{3+} = \text{Eu}^{3+}, \text{Tb}^{3+}, \text{Gd}^{3+}$.

A opção por essa estrutura, baseada em anéis aromáticos, visa potencializar através do efeito antena dos cromóforos, a transferência de energia para o íons metálicos encapsulados. A funcionalização do anel piridínico permitirá, a partir de conjugações à lectina Con A ou à toxina microcistina LR, avaliar seu potencial como marcador biológico.

A seguir, são discutidas as reações desenvolvidas e na seção 2.4 podem ser encontrados os procedimentos experimentais detalhados das sínteses relacionadas.

2.1-Reagentes e solventes utilizados

Os reagentes: dietil-2,6-dimetil-3,5-piridinacarboxilato (99%), N-bromosuccinimida (99%), 1,1'- azo-bis(ciclohexanocarbonitrila) (98%), ácido 3-cloroperoxibenzóico (77%), peróxido de hidrogênio (30 volumes), peróxido de benzoíla (97%), anidrido trifluoroacético (99+%), p-toluenosulfonamida (98%), cloreto de európio (99,9%), cloreto de térbio (99,9%), cloreto de gadolínio (99,9%), foram adquiridos na Aldrich e utilizados sem purificação prévia;

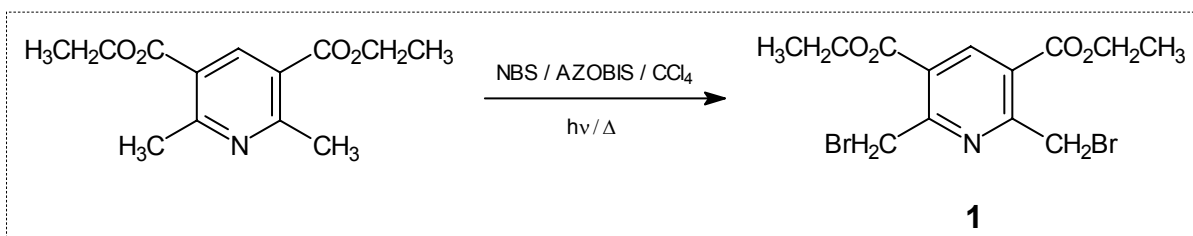
O reagente 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina foi fornecido como doação pela indústria francesa Cis Bio International;

Os demais reagentes e solventes tem grau de pureza P.A. e foram adquiridos via Nuclear, Fluka, Vetec, Reagen, Pro Analysi, Carlos Erba, Merk e Quimex, sendo empregados também sem prévia purificação, excetuando-se os casos relacionados no texto.

2.2 - Rotas Sintéticas

Foram desenvolvidas as rotas sintéticas que serão ilustradas a seguir para, a partir de precursores livres, obtenção dos criptatos funcionalizados e prontos para serem aplicados em testes imunológicos.

1ª etapa: Bromação de 2,6-dimetil-3,5-dicarboxilato de etil piridina

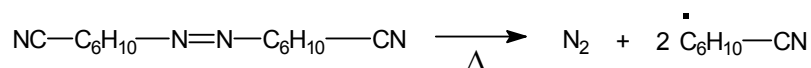


Reação 1: Síntese de 2,6-dibromometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina.

A primeira reação consiste na bromação de 2,6-dimetil-3,5-dicarboxilato de etil piridina, via iniciador 1,1'- azobis (ciclohexanocarbonitrila) e N-bromosuccinimida (NBS),

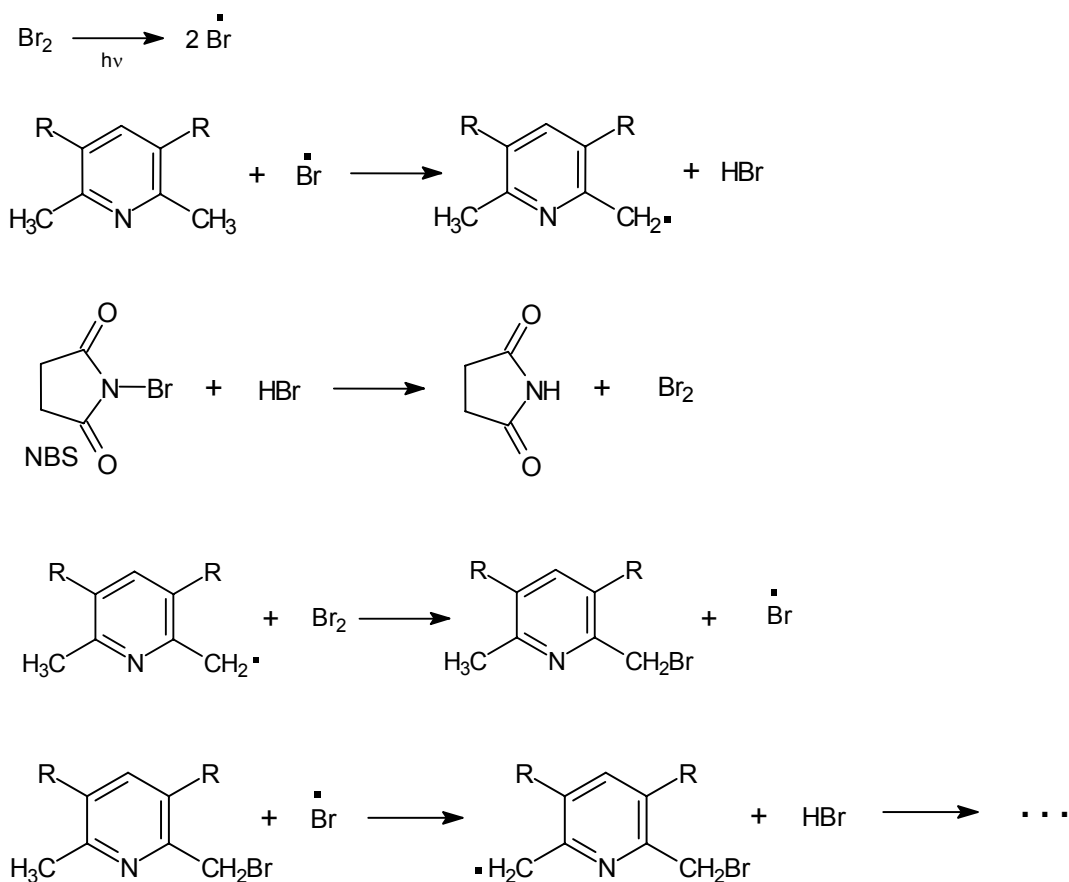
sob refluxo e irradiação por lâmpada incandescente de 100W. A bromação de compostos piridínicos e bipyridínicos substituídos foi bastante estudada e apresenta diferentes rendimentos, de acordo com as diferentes espécies reagentes [37, 62, 63].

O composto azo juntamente com o NBS é amplamente empregado na síntese de brometos de acila a partir de aldeídos [64], e sob aquecimento, o azobis sofre uma quebra liberando N_2 e dois radicais livres, exemplificado no Esquema 1 [65].



Esquema 1: Mecanismo de quebra do 1,1'-azobis (ciclohexanocarbonitrila), sob aquecimento.

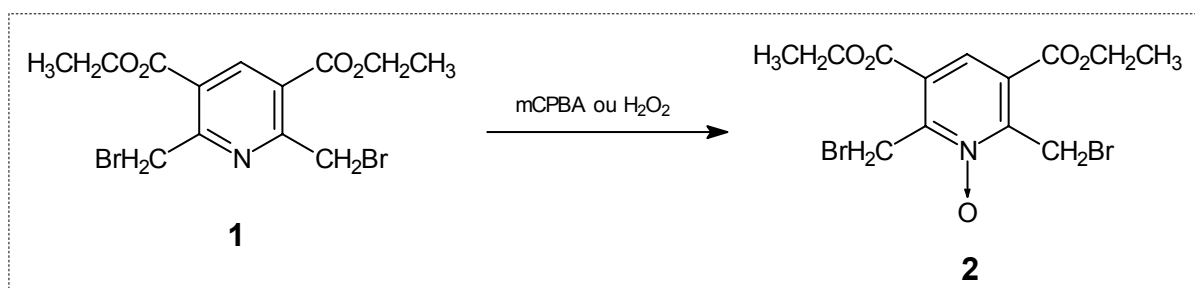
Estes radicais, em presença do NBS, que é fonte de Br_2 , promovem a liberação destas moléculas que sob irradiação sofrem uma quebra homolítica, iniciando o processo de bromação [64] conforme o Esquema 2.



Esquema 2: Mecanismo radicalar de bromação via 1,1'-azobis (ciclohexanocarbonitrila) e NBS.

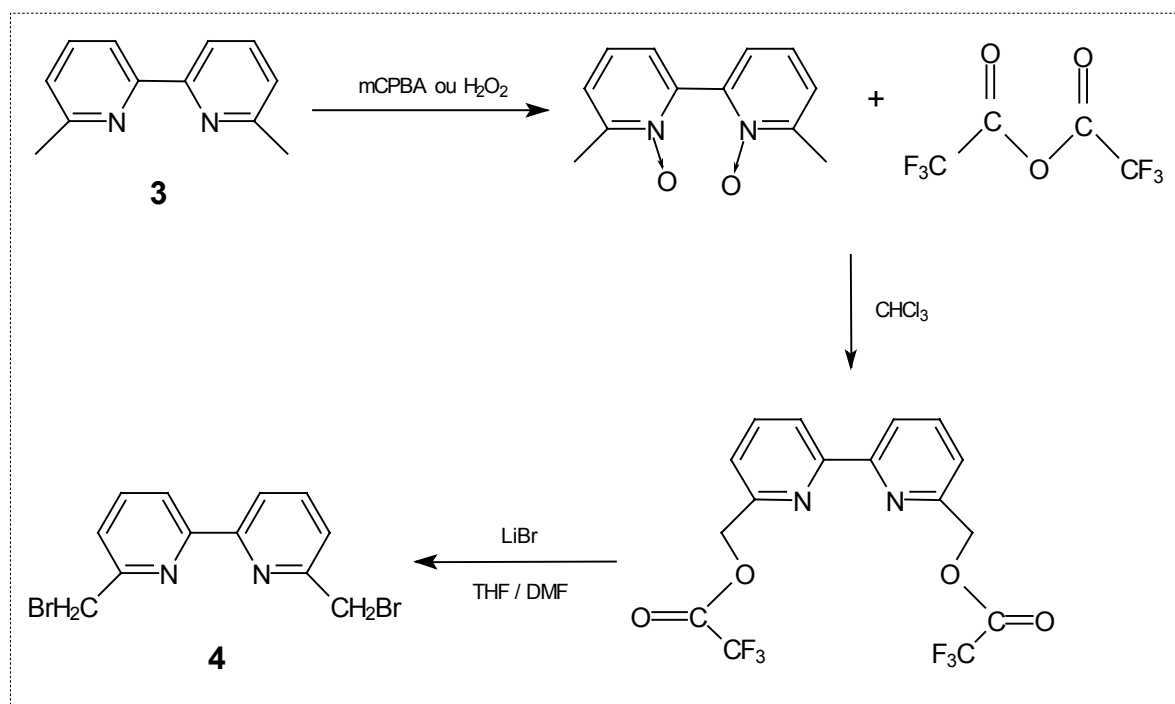
Sendo esta uma reação radicalar, a mistura reacional é constituída de produtos mono e multi bromados, tendo sido acompanhada via cromatografia em camada delgada e monitorada pelo desaparecimento do produto de partida. Apesar disto, não se espera que ocorram bromações nas duplas ligações do sistema aromático porque a formação do íon bromônio como intermediário seria um pré-requisito, já que a liberação do Br₂ é lenta, é improvável que dois íons Br⁻ aproximem-se simultaneamente e por lados opostos, de uma mesma dupla ligação.

2^a etapa : *Oxidação de 2,6-dibromometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina*



Reação 2: Síntese de 2,6-dibromometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina N→O

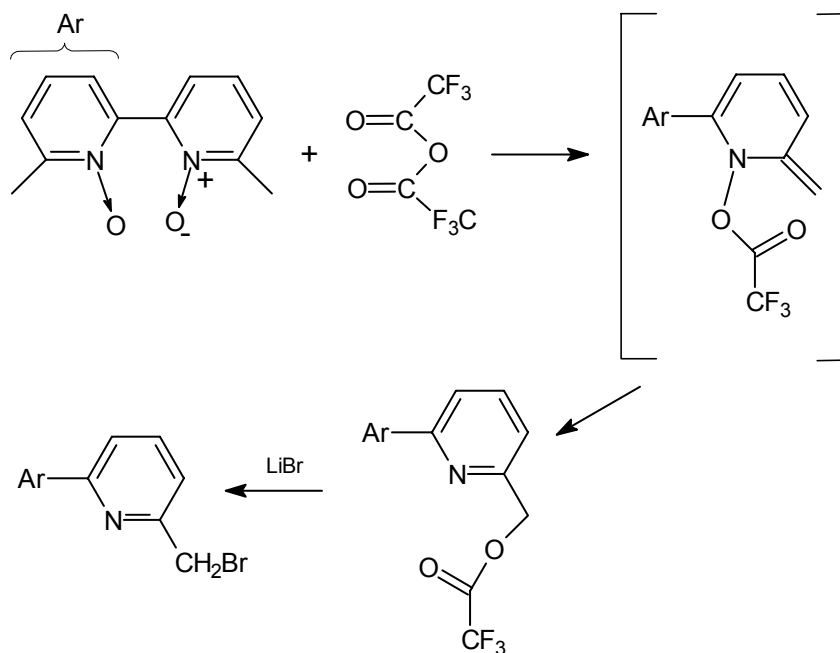
Esta reação consiste na oxidação do produto puro obtido na reação anterior, via ácido 3-cloroperoxibenzóico ou peróxido de hidrogênio 30V, conhecidos agentes oxidantes [63, 64]. Empregando-se o mCPBA, a oxidação se completa em poucas horas e produz uma mistura com muitos sub-produtos entretanto, quando utiliza-se o peróxido de hidrogênio 30V, a reação se processa lentamente, sendo necessárias várias adições deste e muitas horas de reação. O produto de partida não é totalmente consumido mas o único produto formado é o N-óxido.

3ª etapa: Bromação de 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina

Reação 3: Síntese de 6,6'-dibromometil-2,2'-bipiridina.

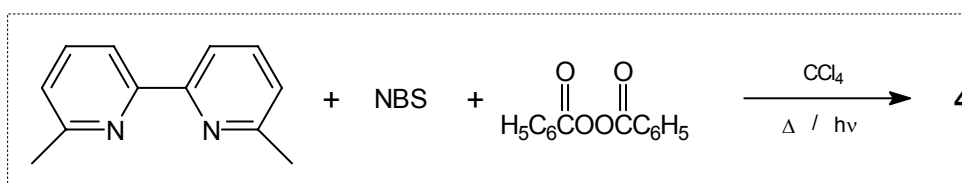
Esta reação consiste na bromação de 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina, através de duas rotas sintéticas. Na primeira rota, desenvolvida em 3 etapas, o produto de partida foi oxidado via mCPBA e/ou peróxido de hidrogênio. O produto N,N'-dióxido é empregado, sem purificação prévia, na reação com anidrido acético, sob refluxo, por 24h. Embora esta reação seja comumente empregada na funcionalização de piridinas [66], seu mecanismo não é totalmente esclarecido. Contudo, Pachter [67], trabalhando com benzoilação de óxido quinaldínico, sugeriu um mecanismo envolvendo um rearranjo (vide Esquema 3), o qual explicaria a obtenção de suas quinaldinas substituídas na posição 2.

O passo seguinte foi a reação da bipiridina dissustituída, sem purificação prévia, com LiBr em THF/DMF secos, quando obteve-se após 24h de refluxo, o produto 6,6'-dibromometil (4), o qual foi purificado via coluna cromatográfica de sílica gel e a mistura CHCl₃/ MeOH (95/5) como eluente. O rendimento foi de 20%.



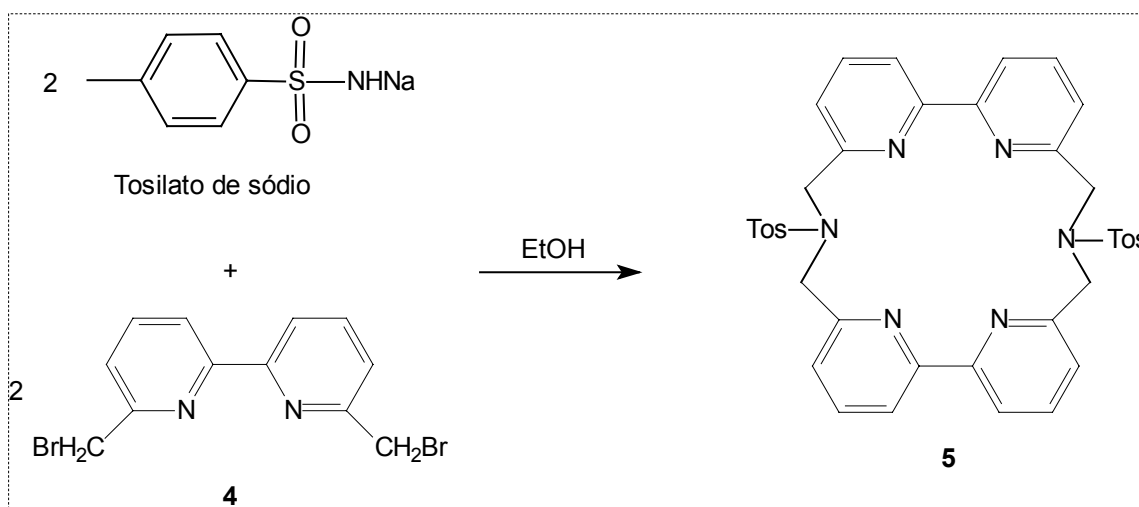
Esquema 3: Mecanismo de bromação de piridinas substituídas, via intermediário de Pachter [67].

A segunda metodologia desenvolvida, empregou o peróxido de benzoíla associado ao NBS na bromação dos derivados piridínicos, seguindo referências de sínteses de macrociclos [62, 68].



Reação 4: Síntese da 6,6'-dibromometil-2,2'-bipiridina por rota alternativa.

O peróxido de benzoíla sofre quebra homolítica sob aquecimento, como observado na primeira reação para o azobis [65]. Posteriormente, com a liberação CO_2 , radicais alquila são produzidos e estes funcionam como catalisadores da reação de bromação, que se processa de forma análoga a reação de bromação da 2,6-dimetil-3,5-dicarboxilato (1ª etapa). Neste procedimento, o produto **4** foi obtido após purificação, com um rendimento de 27% em 3h de reação.

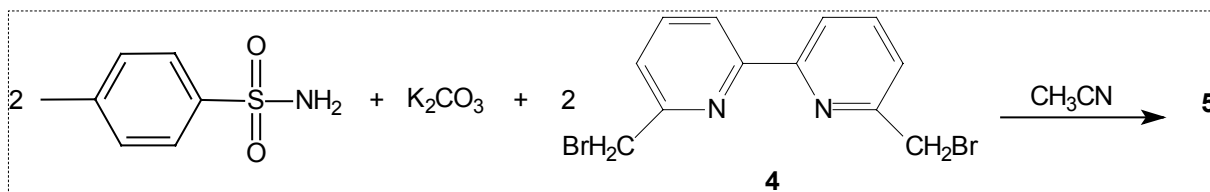
4^a etapa: *Síntese do biciclo tosilado.*

Reação 5: Síntese do anel bipy.bipy-ditosilado, a partir das 6,6'-dibromometil-2,2'-bipiridinas.

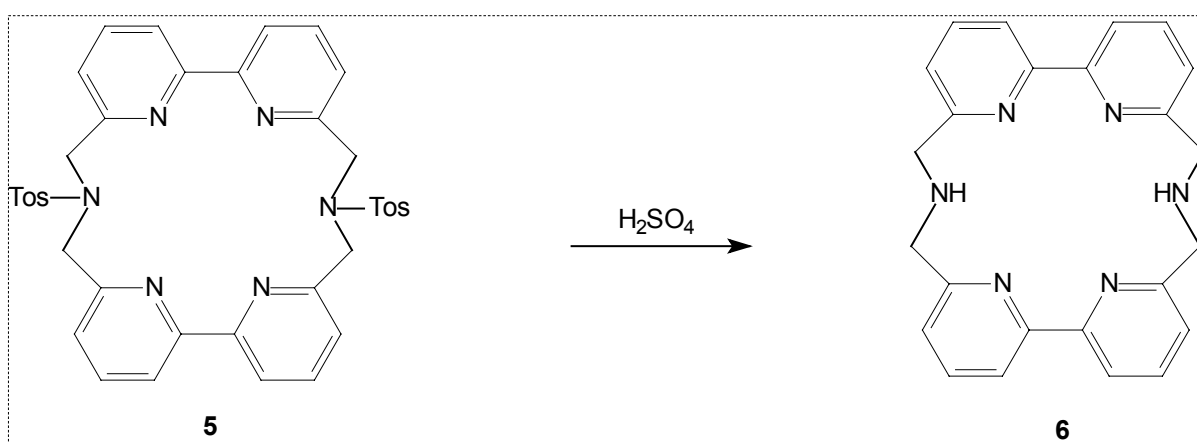
O biciclo **5** foi sintetizado, seguindo o procedimento estabelecido na literatura [68, 69]. Inicialmente reagiu-se o dihalogenado **4** com o tosilato de sódio, durante 25h sob refluxo, sem que fosse preciso empregar alta diluição. Embora este processo não esteja completamente esclarecido, acredita-se que os volumosos grupos tosilatos possam atuar na pré-organização de precursores de cadeia aberta, durante a síntese de macrociclos [13d, 70, 71]. O que se sabe é que estes grupos ao serem inseridos protegem a amina secundária contra a formação de ligações indesejadas, fazendo com que apenas duas moléculas de **4** se liguem a cada átomo de Nitrogênio, além de funcionarem como grupos de saída, na etapa seguinte. O rendimento bruto obtido foi de 50%.

Testou-se uma segunda rota, empregando o K_2CO_3 (base fraca) e a p-toluenosulfonamida, em acetonitrila anidra.

Esta reação processou-se a temperatura ambiente, durante 25h, e forneceu **5** com rendimento de 30%. O mecanismo proposto é a desprotonação da amina pela ação da base (carbonato) e subsequente ataque do ânion formado ao carbono halogenado, liberando assim o Br^- (bom grupo de saída). O produto bruto foi empregado na 5^a etapa de reação.

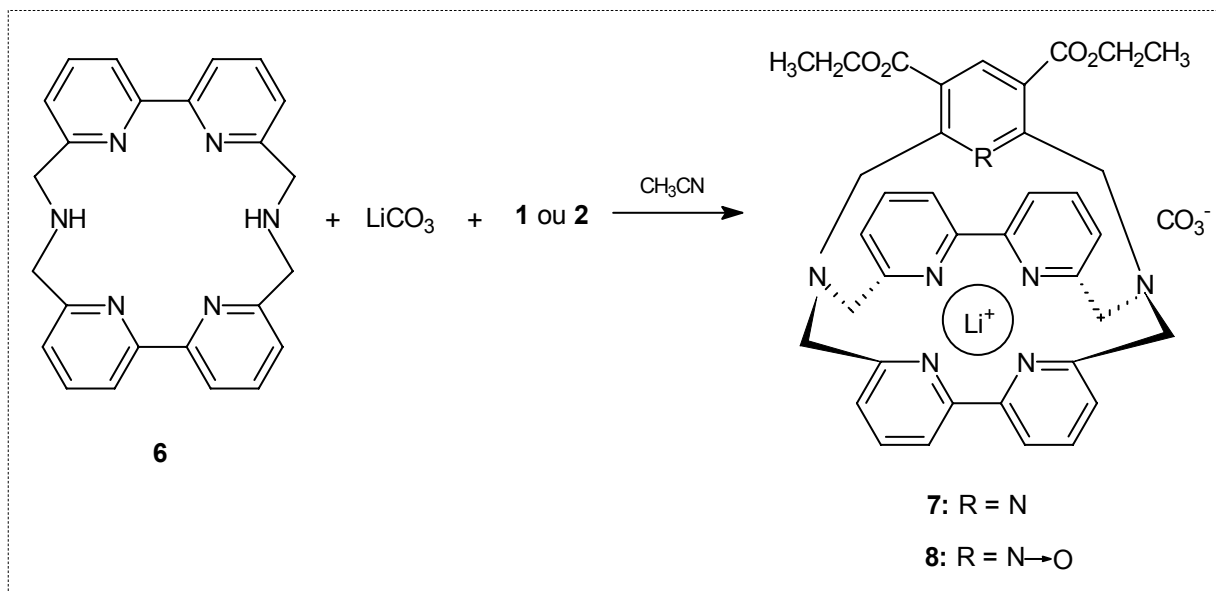


Reação 6: Síntese alternativa do anel bipy.bipy-ditosilado.

5ª etapa: Detosilação

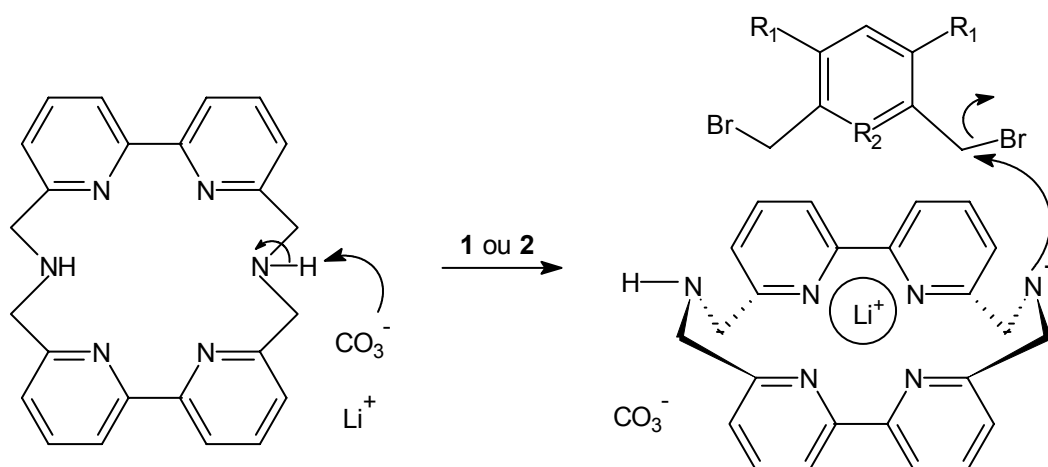
Reação 7: Síntese do anel bipy.bipy.

A detosilação foi feita sob condições drásticas de refluxo, utilizando ácido sulfúrico durante 3h, o que levou a conversão de quase 100% do produto tosilado ao produto desejado **6** [68, 69].

6ª etapa: *Ciclização do macrociclo a partir dos precursores 1 ou 2 e 6.*

Reação 8: Síntese dos criptatos de lítio.

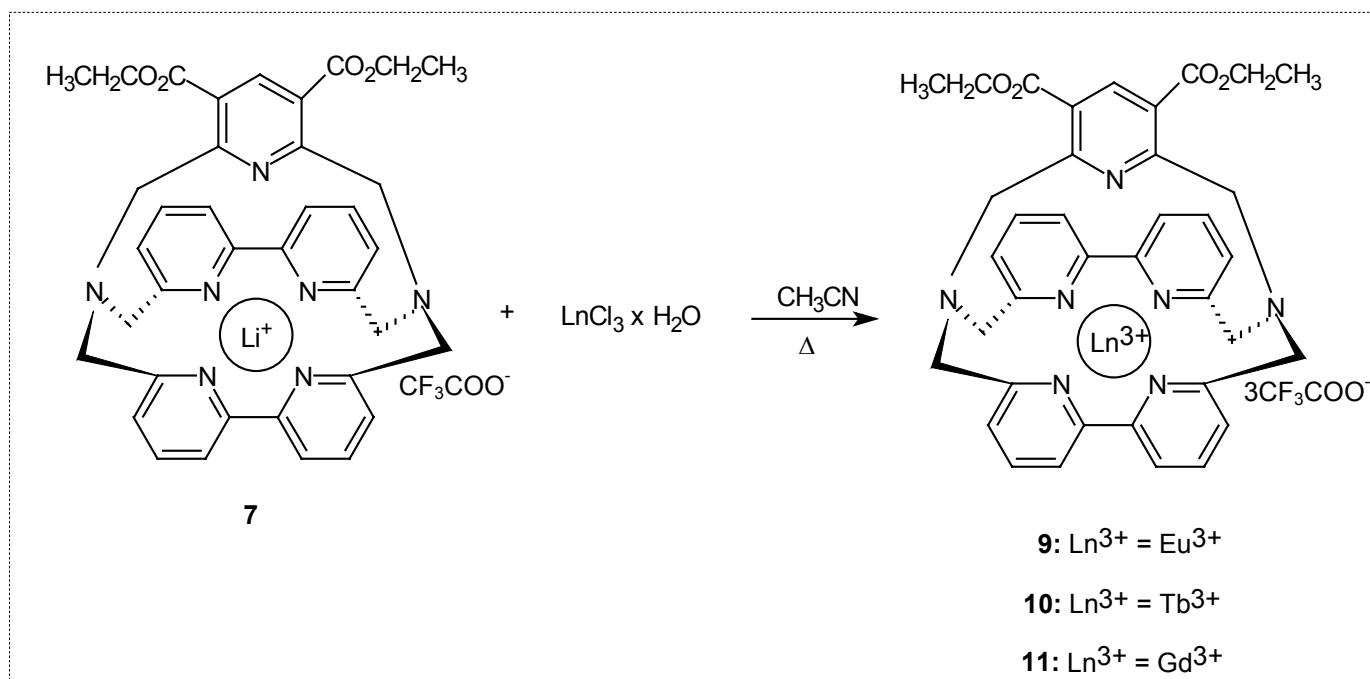
A 6ª etapa consiste na formação do criptato [37, 62, 68]. Seguindo os cuidados relacionados às sínteses de criptatos, descritos no capítulo 1 (sessão 1.2.4.1). O emprego da condição de alta diluição, aliada a adição lenta dos reagentes, concorrem para prevenir a formação de sub-produtos. A base escolhida - o carbonato de lítio, além de promover a desprotonação da amina secundária, fornece o íon Li^+ que conhecidamente tem sido empregado em reações, promovendo o efeito template (Esquema 4) [13d]. Isto quer dizer que ele tem a função de pré-organizar os ligantes a sua volta, dispondo-os em uma conformação espacial ótima para a ocorrência da reação, e a obtenção do produto desejado. Estes foram purificados via técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography - *HPLC*), fornecendo o produto **7** puro, tendo contudo trocado seus contra-íons de CO_3^- , provenientes do carbonato de lítio, por CF_3COO^- , provenientes do ácido trifluoroacético (TFA) da fase móvel empregada na purificação via *HPLC* (ver Anexo I). A síntese do criptato **8** está em desenvolvimento.



Onde: $R_1 = \text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ e $R_2 = \text{N}$ ou $\text{N} \rightarrow \text{O}$

Esquema 4: Mecanismo de fechamento do criptato, tendo o Li^+ atuado na pré-organização da síntese.

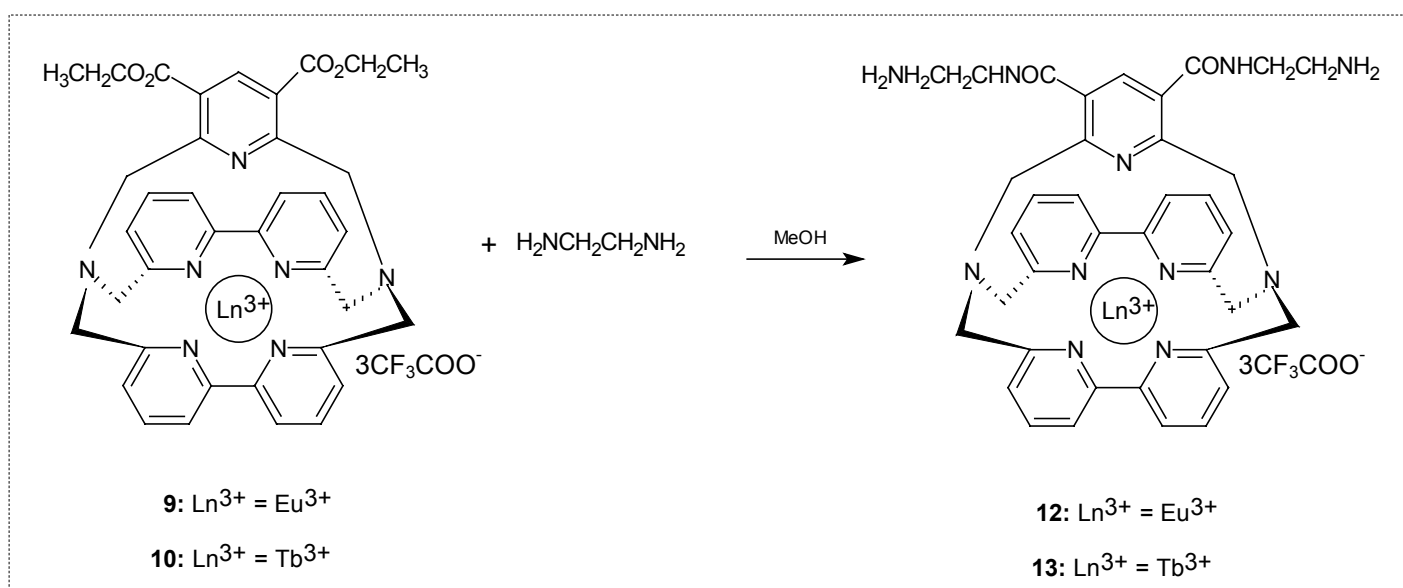
7^a etapa: *Inclusão do íon lantanídeo no interior da criptato.*



Reação 9: Síntese dos criptatos de lantanídeos.

Nesta etapa, procede-se a simples troca do íon Li^+ pelos íons Eu^{3+} , Tb^{3+} ou Gd^{3+} [62, 63]. Esta reação se processa em 3h de refluxo, empregando acetonitrila como solvente. Apesar do íon Li^+ ter sido empregado como template e este estar encapsulado pelo criptato, seu tamanho é pequeno para a cavidade da macromolécula, forçando assim uma torção na sua estrutura para melhor complexá-lo [13d]. Aliado a este fato, os íons Ln^{3+} , que possuem raios iônicos mais compatíveis com a cavidade do criptato, são conhecidamente bem estabilizados por ligantes acíclicos ou cíclicos. Sendo assim, a troca iônica se processa naturalmente e o criptato de lantanídeo, pôde ser purificado também pela técnica de HPLC.

8ª etapa: *Funcionalização dos criptatos.*



Reação 10: Inclusão de uma amina primária na estrutura dos criptatos.

Na última etapa, pôde-se promover a funcionalização necessária para o emprego dos criptatos em conjugações e testes de histoquímica. O grupo éster da piridina reagiu com a etilenodiamina, formando uma ligação amida. A reação se completou após 24h de agitação, à temperatura ambiente e condições anidras. Os produtos também foram purificados via cromatografia líquida de alta eficiência, nas mesmas condições que foram empregadas na purificação dos criptatos das etapas 6 e 7.

2.3-Metodologia de caracterização

Abaixo são relacionadas as principais técnicas empregadas na caracterização e estudo das propriedades dos produtos sintetizados.

2.3.1-Ponto de fusão (P.f.)

Os pontos de fusão/decomposição foram determinados em um aparelho digital da Electrothermal modelo 9100, série IA 9100/ IA 9200, com resolução de 0,1°C e precisão de 0,5°C. As medidas foram realizadas em tubos capilares com ~ 1 mm de diâmetro.

As medidas até quando viáveis de serem efetuadas (até o limite do equipamento), podem ser conferidas após cada detalhamento experimental (sessão 2.4).

2.3.2-Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

A análise por espectroscopia no infravermelho é baseada no fato de que as moléculas possuem frequências específicas de suas vibrações internas, fornecendo informações sobre a estrutura molecular dos ligantes e dos criptatos.

Os espectros vibracionais foram obtidos em pastilhas de KBr, prensadas sob vácuo, utilizando o espectrômetro com transformada de Fourier Bruker modelo IF66 na região entre 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

Após o detalhamento experimental (sessão 2.4), as principais bandas de cada espectro foram relacionadas e à elas, atribuídas as letras f, M ou F, referindo-se a intensidade do sinal ser fraco, médio ou forte, respectivamente, e a análise destas podem ser conferidas no Anexo I.

2.3.3-Espectrometria de massas (EM)

Esta técnica permite através da fragmentação molecular, determinar desde o peso molecular de um dado composto até sua estrutura, através da análise dos fragmentos registrados.

A medida de espectrometria de massas (EM) foi desenvolvida em um equipamento Finnigan MAT com analisador de massa *Ion Trap*, através de inserção direta e ionização

por impacto de elétrons (EI). As amostras analisadas tiveram seus pesos moleculares determinados e explicitados após o detalhamento experimental.

2.3.4-Cromatografia líquida de alta eficiência - (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

A cromatografia é conceituada como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra em fluido insolúvel, que percola através da primeira. Os procedimentos sintéticos foram monitorados e os criptatos foram purificados através desta técnica.

Os experimentos foram realizados em um cromatógrafo Shimadzu equipado com duas bombas LC-10AV, detector UV-vis SPD-10AV e integrador SCL-10A. Foram empregadas colunas analíticas RP18 (5 microns, 125 mm x 4,6 mm) e a coluna semi-preparativa RP18-E (5 microns, 250 mm x 10,5 mm). As análises foram desenvolvidas empregando um gradiente de fases móveis, como pode ser conferido no Anexo I.

2.3.5-Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-¹H)

A espectroscopia de RMN desvenda a estrutura molecular por meio da interação de radiação eletromagnética de rádio frequência em uma coleção de núcleos imersos em um campo magnético forte. Esta técnica pode fornecer informações detalhadas sobre a estrutura molecular.

As análises de RMN-¹H foram obtidas em CDCl₃ e D₂O, utilizando um equipamento VARIAN Unity Plus, com frequência de 300 MHz. Os deslocamentos químicos estão expressos em partes por milhão em relação ao pico residual do CDCl₃ (7,26 ppm) ou H₂O (4,72 ppm). No Anexo I estão reproduzidos os espectros e as atribuições podem ser conferidas após o detalhamento experimental.

2.3.6-Absorção eletrônica na região do UV-visível (UV-vis)

A absorção de luz na região do visível (~750 nm a ~400 nm) e ultravioleta (~400 nm a ~180 nm) do espectro resulta na excitação dos estados eletrônicos. Essa região do

espectro fornece informações a respeito de sistemas π -eletrônicos, especialmente em sistemas aromáticos, proporcionando indicativos estruturais tanto dos ligantes livres sintetizados quanto da coordenação dos íons lantanídeos aos criptatos.

Os espectros de absorção dos produtos, em solventes adequados, foram medidos no espectrofotômetro UV-vis LAMBDA 6 modelo 2688-002.

2.3.7-Espectroscopia de luminescência

A partir dos espectros de emissão dos íons lantanídeos, pode-se inferir sobre os níveis energéticos dos ligantes que o coordenam, que participam do processo de transferência de energia, bem como quantificar este processo e fornecer indícios do grupo pontual do poliedro de coordenação ao redor do íon.

As medidas espectroscópicas de emissão foram obtidas a 298K e 77K em um equipamento Jobin-Yvon Ramanor U-1000 com duplo monocromador. Para excitação foi utilizado um monocromador Jobin-Yvon modelo H-10, usando uma lâmpada de Xe-Hg (150W). Utilizou-se como detector uma fotomultiplicadora RCA C31034RF refrigerada por um sistema peltier. O registro e o processamento do sinal foi feito através de uma interface Spectralink ligada a um microcomputador IBM[®]. No capítulo 3 esses espectros são analisados.

2.3.8-Medidas dos tempos de decaimento dos estados excitados (τ)

Complementando a técnica anterior, as medidas de tempo de decaimento dos estados excitados fornecem informações sobre a população do estado excitado, bem como os processos competitivos de decaimentos radiativos e não radiativos.

As medidas de τ foram obtidas utilizando-se um laser Nd:YAG modelo GCR-170 da Spectra-Physics para excitar as amostras em 355 nm (3^o harmônico). A monitoração do sinal foi feita através de uma fotomultiplicadora acoplada a um boxcar com integrador modelo 4420 e 4422 da EG&G (Princeton Applied Research Corp.), cujo tempo de integração é tipicamente fixado em 20 ns.

2.4-Detalhamento experimental

Síntese de 2,6-dibromometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina (1) [37, 62, 63]: Reagiu-se o 2,6-dimetil-3,5-dicarboxilato de etil piridina (0,50 g) com N-bromosuccinimida (NBS; 0,90 g) em CCl_4 , sob efeito do catalisador 1,1'-Azobis(ciclohexanocarbonitrila (AZOBIS, 4 mg). A reação transcorreu sob irradiação de lâmpada de tungstênio (100 W), refluxo e agitação por 4 horas e foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) em placa de sílica e CH_2Cl_2 . A reação foi finalizada com banho de gelo e filtração do precipitado. O filtrado foi evaporado e o produto purificado via coluna cromatográfica de sílica gel e CHCl_3 . Obteve-se **1** na forma de um sólido branco com 40% de rendimento. P. f. = 55-60°C; R_f = 0,53 (CHCl_3); Tr (HPLC) = 26,8min; IV(KBr): 2978,9(f, $\nu\text{C-H}$ saturado); 1723,1(F, $\nu\text{C=O}$ de éster aril); 1590,5 e 1547,0 (m, $\nu\text{C=C} + \text{C=N}$ de anel piridínico); 1444,1(f, $\delta\text{C-H}$ saturado); 1298,0 e 1236,8(F, $\nu\text{C-O}$ de éster aril); 1095,8(F, $\delta\text{C-H}$ de anel piridínico); 865,2(f, $\delta\text{C-H}$ de aromáticos substituídos), 740,9(f, $\nu\text{C-Br}$); RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 8,80(s, H-py, 1H); 5,01(s, $\text{CH}_2\text{-Br}$, 4H); 4,47(q, J = 7,2Hz, OCH_2 , 4H); 1,45(t, J = 7,2Hz, CH_3 , 6H).

Síntese de 2,6-dibromometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina N-O (2) [63]: Dissolveu-se **1** (98 mg) em CHCl_3 em um balão de 1 boca e iniciou-se agitação. Separadamente, dissolveu-se o ácido 3-cloroperoxibenzóico (mCPBA, 90 mg) em CHCl_3 e adicionou-se Na_2SO_4 anidro. Após 30 minutos, filtrou-se o sulfato de sódio e adicionou-se o mCPBA ao balão reacional. A reação foi acompanhada por CCD em placa de sílica e CH_2Cl_2 (R_f ~0,4) e depois de 24 horas foi encerrada com banho de gelo e filtração do precipitado. O extrato orgânico foi concentrado e o produto purificado via coluna cromatográfica de sílica gel e CH_2Cl_2 . O produto final tem aspecto de óleo amarelo.

Síntese alternativa de 2 : A uma solução contendo ácido acético glacial e o composto **1** (0,4 g) adicionou-se um excesso de peróxido de hidrogênio 30V (2 mL). A reação foi deixada sob refluxo com agitação por 3 dias, sendo adicionados diariamente, 2 mL do H_2O_2 . A mesma foi acompanhada por CCD (placa de sílica e CH_2Cl_2) e encerrada com evaporação do solvente, neutralização com solução super-saturada de NaHCO_3 e extração

com CH_2Cl_2 (3x20 mL). Aos extratos orgânicos adicionou-se Na_2SO_4 anidro, o qual foi filtrado após 30 minutos, concentrado e posteriormente purificado. EM(EI+) m/z: 426,0(M^+).

Síntese de 6,6'-dibromometil-2,2'-bipiridina (4) [37, 66]: Dissolveu-se 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina (0,30 g) em CHCl_3 anidro, sob agitação, à temperatura ambiente. Separadamente, dissolveu-se o mCPBA (0,56 g) em CHCl_3 e adicionou-se Na_2SO_4 anidro. Após 30 minutos, filtrou-se o sulfato de sódio e adicionou-se o mCPBA diretamente ao balão reacional. Manteve-se agitação à temperatura ambiente, por 20 horas. Extraiu-se o excesso de mCPBA em funil de separação, seguida de lavagem com solução saturada de NaHCO_3 (3x20 mL). Em seguida, o extrato orgânico foi lavado com uma solução saturada de NaCl (3x15 mL) e seco na presença de Na_2SO_4 anidro. O sulfato foi filtrado após 30 minutos e o solvente foi evaporado. O produto obtido foi identificado como sendo o intermediário 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina N, N'-dióxido, sendo utilizado na etapa seguinte sem prévia purificação. Todas estas etapas de reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada em sílica e CH_2Cl_2 ($R_f \sim 0,08$).

Após secagem do produto N, N'-dióxido (0,18g), este foi dissolvido em CHCl_3 anidro (8 mL). Em seguida adicionou-se anidrido trifluoroacético (7,30 mL) e manteve-se o refluxo da mistura por 19 horas. Evaporado o solvente da reação, adicionou-se LiBr (0,76 g), DMF anidro (135 μL) e THF anidro (13,20 mL), e a reação foi refluxada, sob atmosfera de $\text{N}_{2(g)}$, por 48 horas. O acompanhamento desta reação foi feito via HPLC e a purificação do produto **2** foi feita por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando-se a mistura $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$ (95/5) como eluente. Rendimento de 20%. P. f. > 180°C (observou-se o escurecimento do produto o que sugere um processo de degradação).

Síntese alternativa [62, 68]: A mistura de 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina (0,50 g) e NBS (1 g) em 30 mL de CCl_4 , foi refluxada por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se peróxido de benzoíla (6 mg), mantendo-se o refluxo por mais 3 horas sob irradiação de lâmpada de tungstênio (100 W). Filtrou-se a mistura ainda quente e resfriou-se o filtrado, obtendo-se **4**, que foi recristalizado em CCl_4 . O acompanhamento da reação, nesta etapa, foi feito via HPLC e o rendimento foi de 27%. Tr (HPLC) = 20,6min; IV(KBr): 2925,7(m, $\nu\text{C-H}$ saturado); 1568,7(m, $\nu\text{C=C} + \text{C=N}$ de anel piridínico); 1462,4(m, $\delta\text{C-H}$ saturado);

1076,1(m, δ C-H de anel piridínico); 806,7(f, δ C-H de aromáticos substituídos), 744,3(f, ν C-Br); RMN- 1 H (300MHz, CDCl₃) δ 8. 38(dd, J = 7,8; 0,9Hz, H3-py, 2H), 7,82(t, J = 7,8Hz, H4-py, 2H), 7,47(dd, J = 7,5; 0,9Hz, H5-bipy, 2H), 4,62(s, CH₂-Br, 4H).

Síntese de 8, 21-ditosil-8, 21, 27, 28, 29, 30, hexaazapentaciclo[21. 3. 1. 1^{2. 6}, 1^{10. 14}, 1^{15. 19}] triaconta-1(27), 2, 4, 6(30), 10, 12, 14(29), 15, 17, 19(28), 23, 25-dodecaenoI (5) [68, 69]: Primeiramente preparou-se o sal monossódico do p-toluenosulfonamida (tosilato de sódio), pela adição de p-toluenosulfonamida a um sistema sob atmosfera inerte, contendo EtOH anidro, e sódio metálico. Manteve-se refluxo até que todo o sódio metálico fosse consumido. Em seguida evaporou-se o solvente e obteve-se o tosilato de sódio na forma de um pó leve, de coloração amarela clara. Dissolveu-se **4** (0,10 g) em EtOH anidro e a este adicionou-se tosilato de sódio (0,11 g) dissolvido no mesmo solvente, mantendo refluxo e agitação por 25 horas. A reação foi colocada em um banho de gelo, o precipitado lavado com água gelada, CHCl₃ e EtOH gelados, alternadamente. Os extratos orgânicos foram evaporados até a secura e reunidos ao sólido do funil. O produto **5** obtido foi empregado na etapa seguinte, sem prévia purificação. O rendimento bruto foi de 50% e o ponto de fusão > 300°C, conforme observado em literatura.

Síntese alternativa de 5: Dissolveu-se **4** (0,10 g) em CH₃CN anidra e a este adicionou-se p-toluenosulfonamida (0,11 g) e K₂CO₃ (0,09 g). Manteve-se a reação sob agitação e a temperatura ambiente por 25 horas, ao final das quais foi colocada em um banho de gelo. O precipitado foi lavado com água gelada, CHCl₃ e EtOH gelados, alternadamente. Os extratos orgânicos foram reunidos e evaporados. O produto obtido na forma de pó esbranquiçado foi empregado na etapa seguinte, sem prévia purificação. Rendimento bruto de 30%.

Síntese de 8, 21, 27, 28, 29, 30, hexaazapentaciclo[21. 3. 1. 1^{2. 6}, 1^{10. 14}, 1^{15. 19}] triaconta-1(27), 2, 4, 6(30), 10, 12, 14(29), 15, 17, 19(28), 23, 25-dodecaeno (6) [68, 69]: Dissolveu-se o produto **5** (0,04 g) em H₂SO₄ concentrado (1 mL) e manteve-se refluxo por 2 horas. Em seguida, neutralizou-se com solução super-saturada de NaOH, e extraiu-se a mistura com CHCl₃ (4x15 mL). Os extratos orgânicos foram secos em presença de Na₂SO₄ anidro.

Após filtração e evaporação do solvente, obteve-se o produto na forma de pó esbranquiçado com rendimento de 80%. P. f. >300°C; EM (EI+) m/z: 394,0 (M^+); RMN- 1H (300MHz, $CDCl_3$) δ 7,71(dd, $J = 7,5$; 1,8Hz, H3-py, 4H), 7,43(t, $J = 7,8$ Hz, H4-py, 4H), 6,95(d, $J = 7,8$ Hz, H5-py, 4H), 4,06(s, CH_2 , 8H), 2,23(ombro largo, NH, 4H).

Sínteses do criptato de 3,5-dicarboxilato de etil piridina ($Li^+ \subset [(bipy)_2py(CO_2Et)_2]CO_3^-$ (7) [37, 62, 68]: Em um sistema sob fluxo de $N_{2(g)}$, adicionou-se ao balão de 3 bocas, o produto **6** (0,05 g) dissolvido em 100 mL de CH_3CN anidra. Em seguida adicionou-se o $LiCO_3$ (0,11 g) sob agitação e aquecimento. No início do refluxo, adicionou-se gota-a-gota, o reagente **1** (0,06 g) dissolvido em 60 mL de CH_3CN anidra. Manteve-se o refluxo por 24 horas e a reação foi acompanhada via HPLC. Ao término da reação, o balão foi submetido a um banho de gelo e após filtração do precipitado, evaporou-se o solvente (de forma análoga se obtém o criptato **8** a partir de **6** e **2**). As purificações dos produtos foram efetuadas via HPLC, em coluna semi-preparativa e o produto apresenta-se como pó amarelado. Rendimento de 60%. Tr (HPLC) = 13,5 min; RMN- 1H (300MHz, $CDCl_3$) δ 8,92(s, H-py, 1H), 7,94 - 7,54(conjunto de sinais atribuídos aos prótons aromáticos bipyridínicos, 12H), 5,10(d, $J = 15,3$ Hz, CH-bipy, 4H), 4,87(d, $J = 15$ Hz, CH-bipy, 4H), 4,51 - 4,39(m, OCH_2 , 4H), 4,20(d, $J = 15$ Hz, CH-py, 2H), 3,88(d, $J = 15$ Hz, CH-py, 2H), 1,42(t, $J = 7,2$ Hz, CH_3 , 3H), 1,41(t, $J = 7,2$ Hz, CH_3 , 3H).

*Substituição do íon Li^+ por íons Ln^{3+} ($Ln^{3+} = Eu^{3+}, Tb^{3+}, Gd^{3+}$, **9**, **10** e **11**)* [62, 63]: A **7** dissolvido em uma mistura de CH_3CN com 1 mL de MeOH, adicionou-se o cloreto de lantanídeo $LnCl_3 \cdot 6H_2O$ desejado. A mistura foi mantida sob agitação e aquecimento por 3 horas após o início do refluxo. O acompanhamento da reação foi feito via HPLC e ao término, filtrou-se o precipitado após resfriamento. Os extratos orgânicos foram concentrados até a secura e a purificação foi feita através de HPLC, em coluna semi-preparativa. Os produtos finais apresentam-se como sólido amarelado. Rendimento de 90%. Tr (HPLC) = 18,2 min; IV(KBr): 3414,2 (f, ν_{O-H}); 2922,2(f, ν_{C-H} saturado); 1711,8(F, $\nu_{C=O}$ de éster e de ácido); 1603,3 (m, $\nu_{C=C + C=N}$ de anel piridínico); 1434,9(m, δ_{C-H} saturado); 1310,8(m, ν_{C-N} amina terciária); 1209,1(F, ν_{C-O} de éster e de ácido); 1132,2(F, ν_{C-F}); 1010,4(m, δ_{C-H} de anel piridínico); 790,9(m, δ_{C-H} de aromáticos substituídos).

Funcionalização de 9 e 10 por reação com etilenodiamina (12 e 13): Primeiramente refluxou-se 100 mL de etilenodiamina em presença de 10 g de KOH, sob atmosfera inerte por 1 hora. Em seguida esta foi destilada sob vácuo a 110°C, desprezando-se os 5 mL iniciais. Ao criptato de lantanídeo (3 mg) adicionou-se 700 µL de MeOH seco e 90 µL de etilenodiamina em um balão arrolhado. Manteve-se a agitação durante 24 horas e em seguida evaporou-se até a secura. Os produtos finais apresentam-se como sólido róseo (para $\text{Ln}^{3+}=\text{Eu}^{3+}$) e amarelado (para $\text{Ln}^{3+}=\text{Tb}^{3+}$), após purificação via HPLC. Rendimento de 100%. Para o criptato **12**: EM TOF(ES+) m/z: 1047,8 (M^+ - contra-íon); EM TOF(ES-) m/z: 113,0 (contra íon: CF_3COO^-)[72]; IV(KBr): 3138,2 e 2938,3 (m, banda larga referente ao *overlap* do ν N-H e o ν C-H saturado); 1685,0 (F, *overlap* entre $\nu\text{C}=\text{O}$ de amida e δ N-H); 1436,1(m, $\delta\text{C-H}$ saturado); 1206,3 e 1130,8 (F, *overlap* entre $\nu\text{C-N}$ de amina, $\nu\text{C-F}$ do contra-íon e νCO , também do contra-íon).

PARTE II

2.5-METODOLOGIA, SÍNTESES E CARACTERIZAÇÃO DO CONJUGADO

Con A - CRIPTATO DE LANTANÍDEO

Aproveitando a função amina primária inserida na estrutura dos criptatos na última etapa sintética, resolveu-se experimentar a conjugação destes à Con A, através das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos passíveis de reações diretas ou indiretas (via adição de glutaraldeído).

A Con A é uma proteína tetramérica de 102.332 u.m.a. composta de 948 resíduos de aminoácidos, sendo que 148 desses resíduos apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos amins ou amidas a saber: asparaginas (N), glutaminas (Q), lisinas (K) e argininas (R), cuja estrutura pode ser observada na Figura 2.2 e 100 resíduos apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos carboxílicos: ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E), apresentados na mesma figura. Trabalhou-se com essas cadeias laterais nos testes de conjugação com os criptatos **12** e **13** sintetizados.

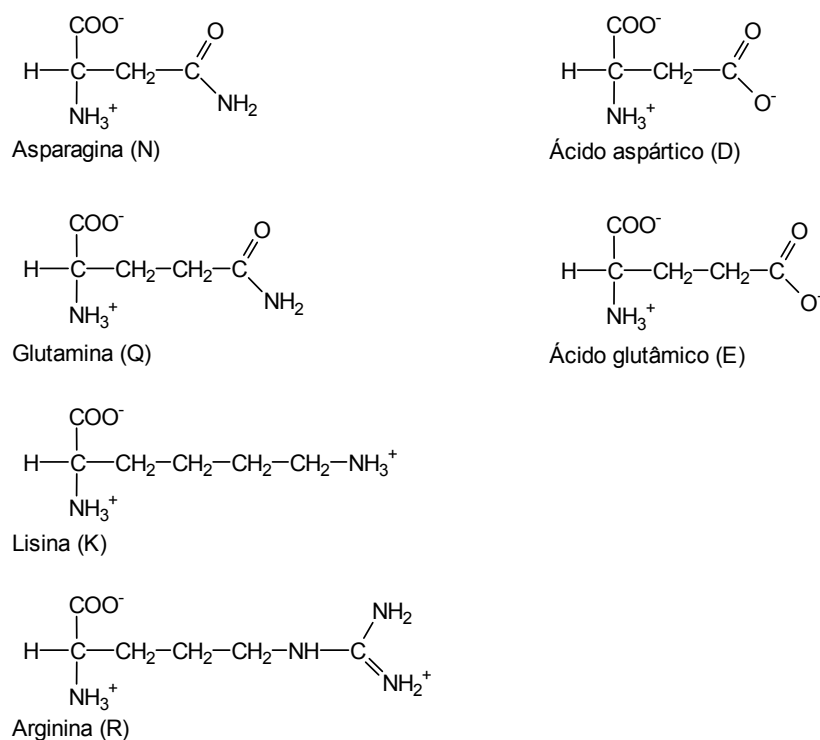


Figura 2.2: Estrutura dos aminoácidos.

A Figura 2.3 ilustra a seqüência primária de aminoácidos de um monômero, onde aqueles que apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos aminas ou amidas estão destacados em lilás e os que apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos carboxílicos são destacados em azul.

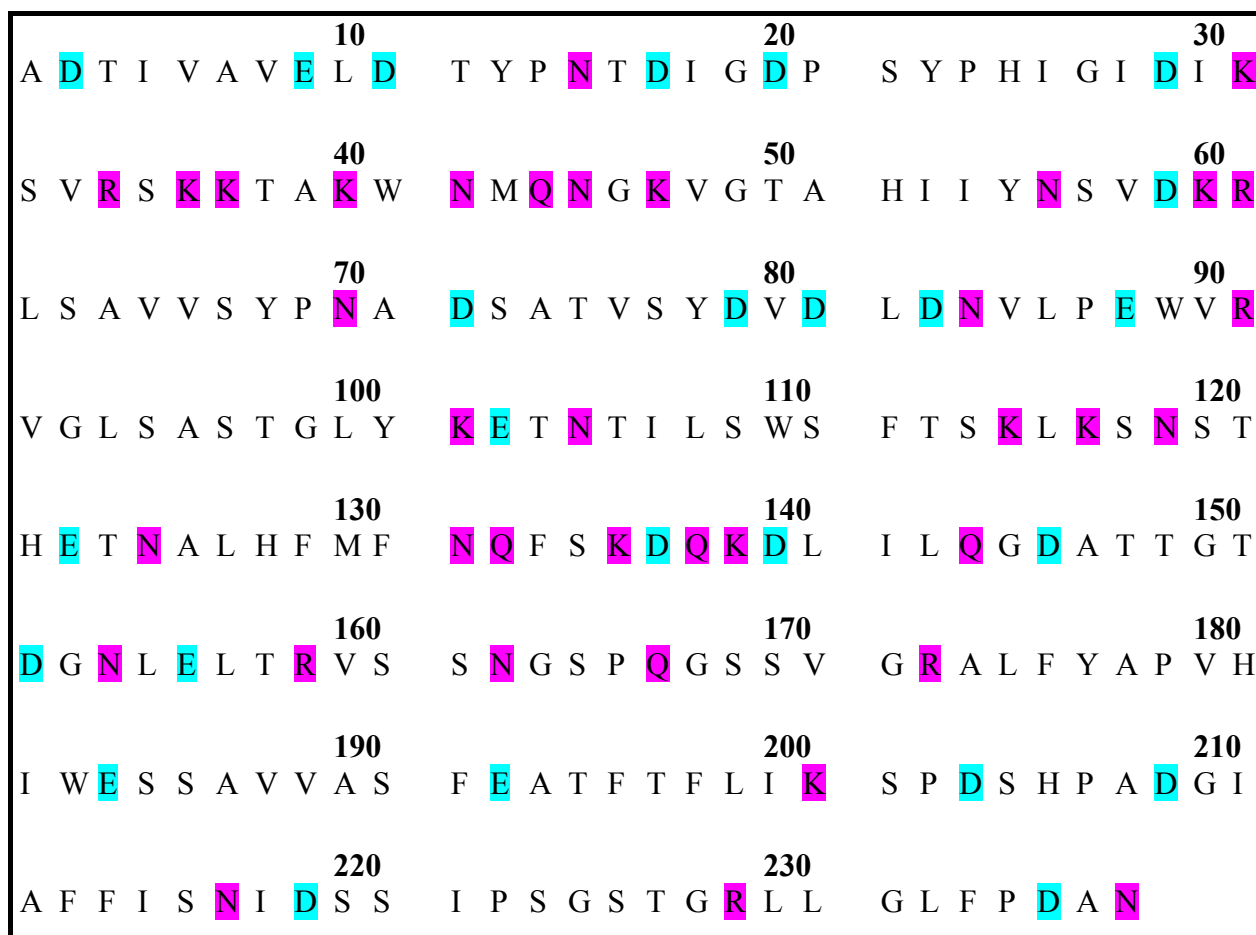


Figura 2.3: Seqüência primária de um monômero de Con A. Em lilás, destaque para os resíduos asparagina (N), glutamina (Q), lisina (K) e arginina (R). Em azul, destaque para os resíduos de ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E).

Conjugou-se o criptato de lantanídeo às cadeias aminas e amidas (148 resíduos) através de reação com glutaraldeído, e testou-se também a conjugação do criptato através da ligação direta aos grupos carboxílicos (100 resíduos). Se todos os resíduos supracitados estivessem estericamente desempedidos, a conjugação a todos eles obedeceria a proporção de 1 mol de Con A para 148 mol de criptato e 1 mol de Con A para 100 mol de criptato para as tentativas de conjugação descritas anteriormente.

Além desta proporção 1:1 (criptato:resíduo de aminoácido), testou-se a conjugação com diferentes quantidades do criptato, para que através do estudo de dicroísmo circular e

de luminescência, fosse possível determinar a quantidade mínima necessária de criptato que ao ser conjugado, não interfira nos sítios de reconhecimento a carboidratos da proteína, nem em sua estrutura terciária e ainda assim, emita um sinal de intensidade suficiente para a detecção e quantificação em monocromador.

Por fim, desenvolveu-se as conjugações em duas situações adicionais: com o bloqueio do sítio de reconhecimento a carboidrato da lectina e sem o bloqueio deste, antes da conjugação. Desta forma pode-se identificar possíveis alterações destes sítios durante a conjugação e assim, concluir a respeito de quaisquer alterações estruturais e manutenção de sua atividade biológica.

2.5.1-Reagentes e solventes utilizados

A Concanavalina A e os padrões cromatográficos fosforilase B, citocromo C, anidrase carbônica e albumina de soro bovino (BSA) foram adquiridos comercialmente na SIGMA. Glutaraldeído, glicose e tampão PBS foram adquiridos via Reagen ou Quimex.

2.5.2-Metodologia de conjugação

A partir de uma solução $1,07 \times 10^{-5}$ molar de Con A em tampão PBS 0,01 M (pH 7,2), foram retiradas alíquotas de 0,2 μ L ($\sim$ 0,2 mg de lectina) para cada conjugação.

Também em tampão PBS, preparou-se uma solução $1,12 \times 10^{-5}$ molar de criptato de európio (**12**), da qual foram retiradas alíquotas com volumes distintos para as diferentes conjugações propostas e descritas nas Tabelas 2.1 e 2.2. As conjugações via cadeias laterais aminas ou amidas, serão denominadas **a**, e as conjugações via cadeias laterais carboxílicas, serão identificadas pela letra **c**.

Para cada proporção (criptato : resíduo de aminoácido) testada, foram destinados 4 *eppendorfs* onde foram colocados 0,5 mL de tampão PBS e a estes, adicionados 0,2 μ L da solução da lectina. Em 2 desses *eppendorfs*, adicionou-se 3,6 mg de glicose, para proteger os sítios de reconhecimento a carboidratos da lectina. A solução lectina-glicose foi deixada em repouso, a temperatura ambiente de 21°C, durante 30 minutos. Estas amostras, cujos sítios da proteína foram inibidos antes da conjugação, serão identificadas pela adição da letra **i**.

Em seguida, adicionou-se o glutaraldeído, a uma amostra protegida e uma não protegida (estas são as tentativas de conjugação via cadeias aminas e amidas), e posteriormente a solução de criptato a todas as amostras, nas proporções descritas nas tabelas abaixo. Após a conjugação, efetuou-se diálise em membrana com poro de abertura de até 14.000 u.m.a., seguida de liofilização. Todo este procedimento baseou-se na metodologia estabelecida por Avrameas e colaboradores [73].

Tabela 2.1: Conjugação de 0,2mg de ConA ($1,9 \cdot 10^{-9}$ mols), sem inibição de seus sítios de reconhecimento, via cadeias laterais com grupamentos aminas e amidas (a) ou carboxilas (c):

PROPORÇÃO RESÍDUO DE AMINOÁCIDO : CRIPTATO	AMOSTRA	CRIPTATO nº. de mol (n_a)	AMOSTRA	CRIPTATO nº. de mol (n_c)
1:0,001	1a	$0,3 \times 10^{-9}$	1c	$0,2 \times 10^{-9}$
1:0,1	2a	$2,8 \times 10^{-8}$	2c	$1,9 \times 10^{-8}$
1:0,25	3a	$0,7 \times 10^{-7}$	3c	$0,475 \times 10^{-7}$
1:0,5	4a	$1,4 \times 10^{-7}$	4c	$0,95 \times 10^{-7}$
1:1	5a	$2,8 \times 10^{-7}$	5c	$1,9 \times 10^{-7}$
1:1,5	6a	$4,2 \times 10^{-7}$	6c	$2,85 \times 10^{-7}$
1:2	7a	$5,6 \times 10^{-7}$	7c	$3,8 \times 10^{-7}$
1:10	8a	$2,8 \times 10^{-6}$	8c	$1,9 \times 10^{-6}$

Tabela 2.2: Conjugação de 0,2mg de ConA ($1,9 \cdot 10^{-9}$ mols), com inibição de seus sítios de reconhecimento, via cadeias laterais com grupamentos aminas e amidas (ai) ou carboxilas (ci):

PROPORÇÃO RESÍDUO DE AMINOÁCIDO : CRIPTATO	AMOSTRA	CRIPTATO nº. de mol (n_a)	AMOSTRA	CRIPTATO nº. de mol (n_c)
1:0,001	1ai	$0,3 \times 10^{-9}$	1ci	$0,2 \times 10^{-9}$
1:0,1	2ai	$2,8 \times 10^{-8}$	2ci	$1,9 \times 10^{-8}$
1:0,25	3ai	$0,7 \times 10^{-7}$	3ci	$0,475 \times 10^{-7}$
1:0,5	4ai	$1,4 \times 10^{-7}$	4ci	$0,95 \times 10^{-7}$
1:1	5ai	$2,8 \times 10^{-7}$	5ci	$1,9 \times 10^{-7}$
1:1,5	6ai	$4,2 \times 10^{-7}$	6ci	$2,85 \times 10^{-7}$
1:2	7ai	$5,6 \times 10^{-7}$	7ci	$3,8 \times 10^{-7}$
1:10	8ai	$2,8 \times 10^{-6}$	8ci	$1,9 \times 10^{-6}$

2.6-Metodologia de caracterização do conjugado

Uma vez obtido o conjugado Con A-criptato, é preciso assegurar que a estrutura terciária da proteína não foi perturbada mantendo, desta forma, sua atividade biológica íntegra. Para isso, tornou-se imprescindível a realização das análises cromatográficas, espectroscópicas e atividade hemaglutinante, descritas a seguir.

2.6.1-Cromatografia por exclusão de tamanho (*Size Exclusion Chromathography – SEC*)

Métodos cromatográficos como troca iônica, filtração molecular, afinidade, interação hidrofóbica utilizando matrizes clássicas e/ou as modernas matrizes rígidas (cerâmica, sílica), bem como cromatografia de fase reversa em HPLC, são utilizados nos procedimentos de purificação e separação de formas nativas, reenoveladas e desnaturadas de proteínas.

Amostras de Con A (0.5 mg/mL) foram eluídas na presença de 0.1 M D-Manose/0.1M D-Glicose, em uma coluna Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia LKB Biotechnology) usando um aparato a ÄKTA Explorer 10 (Pharmacia), equilibrada com tampão, antes de cada injeção. A velocidade de fluxo foi 0,5 mL/min, e a detecção no comprimento de onda 280 nm. Os padrões protéicos (albumina de soro bovino (BSA), anidrase carbônica e citocromo C) foram empregados para a calibração da coluna. Para a coluna Superdex 200 HR 10/30, as soluções padrões foram fosforilase B, albumina de soro bovino (BSA) e citocromo C. As condições foram as mesmas para a Superdex 75.

2.6.2-Dicroísmo circular (*Circular Dichroism – CD*)

A técnica de dicroísmo circular se baseia no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos assimétricos, o carbono alfa da ligação peptídica neste caso. O perfil dos espectros emitidos pode ser associado às transições eletrônicas do carbono em diferentes vizinhanças assimétricas, refletindo a estrutura secundária da proteína permitindo, com a utilização de programas de desconvolução quantificar alfa hélices, folhas e voltas beta, *random* e estruturas desordenadas.

Os espectros de CD na região do UV-distante (195 a 240 nm) foram obtidos como a média de 16 aquisições, em um espectropolarímetro Jasco J715 (Jasco Corporation, Japan), a 20°C, em uma cubeta de quartzo cilíndrica (com caminho óptico de 1 mm), em soluções contendo de 1-2mMolar de Con A, conjugadas ou não.

2.6.3-Fluorescência e fosforescência da proteína

A fluorescência estática e dinâmica, muito usadas para se estudar alterações conformacionais em proteínas, baseiam-se na emissão de radiação eletromagnética devido às transições eletrônicas entre estados eletrônicos excitados e estados de menor energia dos cromóforos intrínsecos, os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina.

As medidas de fluorescência no modo estático foram obtidas a 20°C, em um fluorímetro ISS K2 (ISS Fluorescence, Analytical and Biomedical Instrumentation), usando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. O comprimento de onda para a excitação dos triptofanos foi de 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 305 a 450 nm. Com o intuito de eliminar o sinal da vizinhança, foi feita a medida do tampão e subtraída das intensidades das soluções de proteínas, e um filtro WG295 foi usado no canal de emissão.

Os espectros do criptato, foram medidos como no caso das proteínas, mas com comprimento de onda de excitação de 291 nm e a emissão, monitorada entre 385 e 750 nm

2.6.4-Atividade hemaglutinante

A presença de lectinas é primeiramente detectada através de ensaios de hemaglutinação, onde o extrato da proteína é posto em contato com eritrócitos de animais.

A atividade hemaglutinante foi observada em placas de microtitulação, empregando uma suspensão de 2% de eritrócitos humanos (grupo O, fator RH negativo). A atividade hemaglutinante foi determinada visualmente após repouso do material na placa, a temperatura ambiente, por 40 minutos.

Capítulo.3: Propiedades espectroscópicas

Assim como o anterior, este capítulo encontra-se dividido em duas partes, sendo que a primeira trata das propriedades fotofísicas dos criptatos sintetizados e a segunda parte, trata da caracterização e das propriedades espectroscópicas do conjugado Con A – criptato, que foram testados em ensaios de histoquímica.

PARTE I

3.PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DOS CRIPTATOS DE LANTANÍDEOS

A reação do sal de lantanídeo ($\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) com o macrociclo $[\text{Li}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ originou os complexos $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ ($\text{Ln}=\text{Gd}^{3+}$, Eu^{3+} e Tb^{3+}), os quais foram purificados via HPLC, resultando em sólidos na forma de pó, solúveis em água e solventes orgânicos, como etanol e metanol. As propriedades fotofísicas observadas através da caracterização via absorção no UV-vis e espectroscopia eletrônica de luminescência são relatadas a seguir.

3.1-Espectroscopia eletrônica de absorção no UV-visível

A intensa absorção na região do ultravioleta é, geralmente, característica fundamental dos complexos com elevada luminescência na região do visível. A partir dos dados de espectroscopia eletrônica de absorção, analisamos a formação do composto através do deslocamento dos máximos de absorção e alargamento dos picos. Os espectros dos ligantes e dos criptatos, foram obtidos em solução aquosa com concentração de 10^{-4}M (**11** e **12**) e de 10^{-5}M para os demais.

Os espectros dos ligantes livres, **1** e **6**, são mostrados nas Figuras 3.1 e 3.2. A banda de absorção situada em torno de 215 nm, pode estar associada às transições eletrônicas do ligante **1**. A banda de absorção em 248 nm (Figura 3.1) corresponde às transições eletrônicas $\pi-\pi^*$ da piridina [74, 75]. O produto bipy.bipy possui máximos de absorção em 244 e 286 nm (Figura 3.2), também atribuídos às transições $\pi-\pi^*$ das unidades de bipyridina.

Observou-se que, após a formação do $[\text{Li}-(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (Figura 3.3), houve uma inversão nas intensidades dos máximos das bandas (244 e 298 nm), em relação a **6**, mantendo-se as posições dos deslocamentos (Figura 3.2). Este fato é um indicativo de coordenação dos ligantes ao íon Li^+ . Após a complexação dos íons lantanídeos (Figura 3.4), novamente observa-se a inversão das intensidades dos máximos de absorção, desta vez em relação ao criptato **7**. Detectou-se o surgimento de um ombro na segunda banda de absorção (~ 290 nm), sendo atribuído a um processo de transferência de carga metal $\rightarrow$ ligante [23]. O pequeno deslocamento das bandas de absorção observado após a coordenação a íons lantanídeos foi anteriormente observado por Sabbatini e Guardigli [74].

A Tabela 3.1 reúne os valores dos máximos das principais bandas de absorção eletrônicas dos ligantes **1** e **6** e dos criptatos **7**, **9** e **12**.

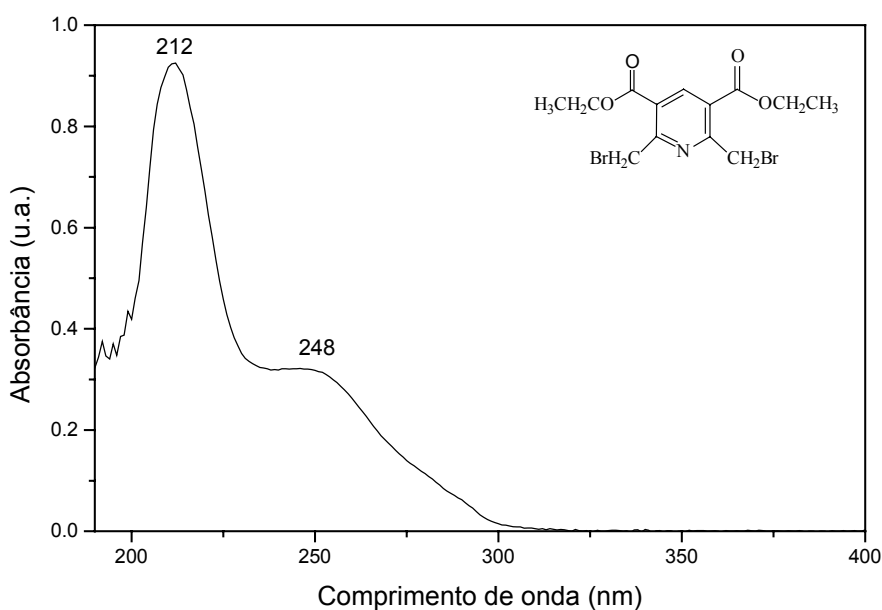


Figura 3.1: Espectro de absorção do 2,6-dibromometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina (**1**).

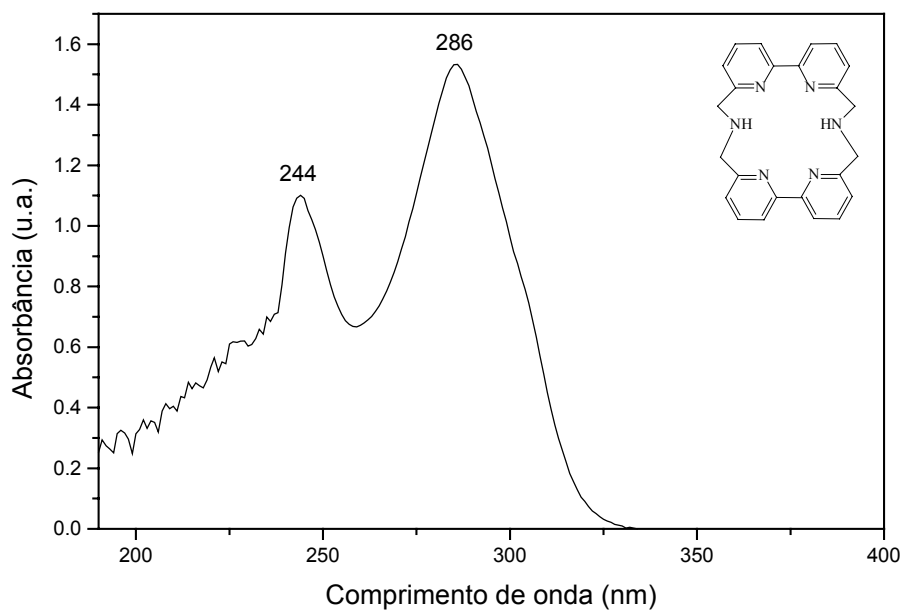
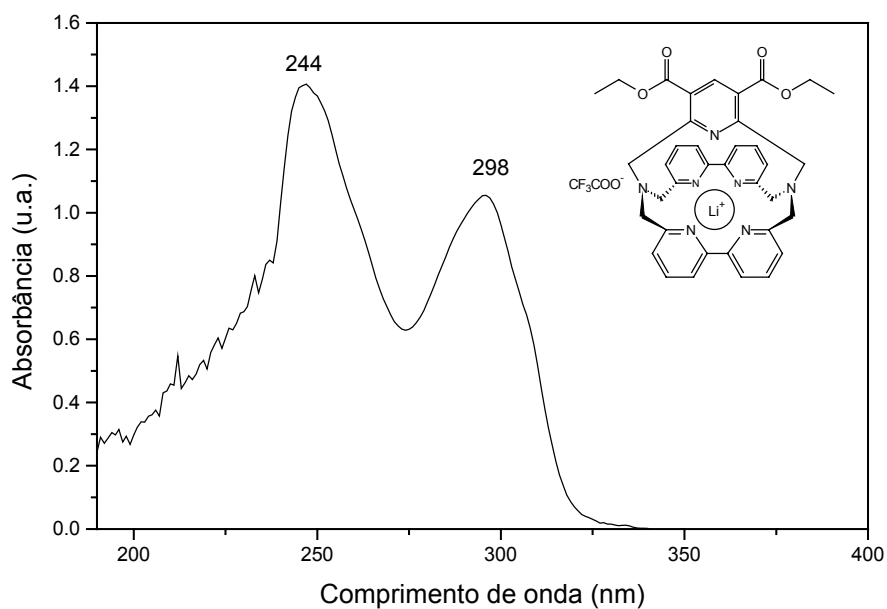


Figura 3.2: Espectro de absorção do bipy-bipy (6)

Figura 3.3: Espectro de absorção do [Li-(bipy)₂py(CO₂Et)₂]⁺ (7).

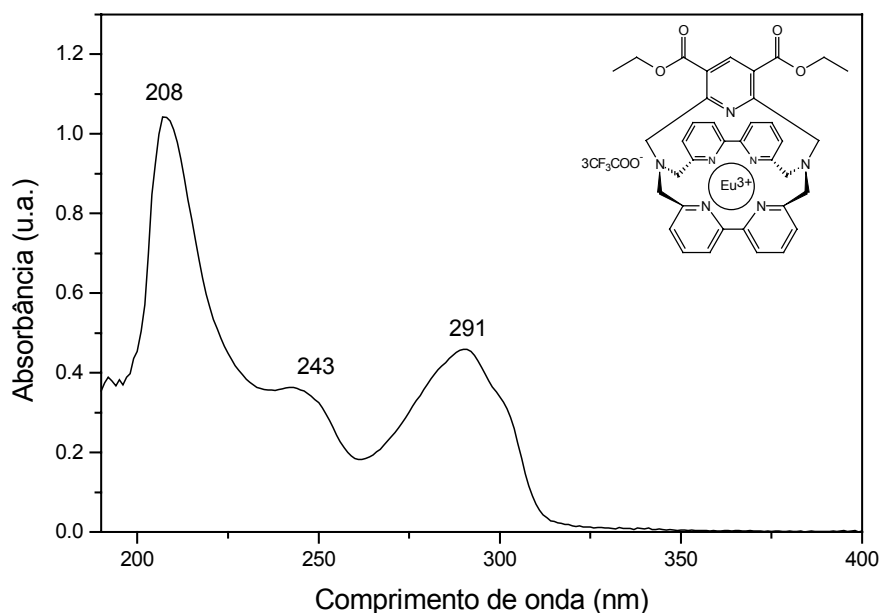


Figura 3.4: Espectro de absorção do $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (**9**)

Tabela 3.1: Máximos das principais bandas de absorção eletrônica dos ligantes e dos criptatos de Li^+ e Eu^{3+} .

Compostos	Comprimento de onda (nm)
Diésterdibromometilpy (1)	248
Bipy.bipy (6)	244, 286
$[\text{Li}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (7)	244, 298
$[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (9)	243, 291
$[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)]^{3+}$ (12)	238, 320

Os espectros de absorção nos criptatos de Tb^{3+} e de Gd^{3+} (**10** e **11**) são semelhantes ao espectro do criptato de Eu^{3+} (**9**), com uma pequena variação nas posições dos picos de maior intensidade [23c].

Os espectros de **12** e **13** reproduzem o aspecto dos seus criptatos de partida (**9** e **10**), no que diz respeito às formas e intensidades das bandas observadas. Os deslocamentos das posições dos máximos dessas bandas são atribuídos à presença de grupos nitrogenados, que contribuem com elétrons desemparelhados no processo de absorção eletrônica.

3.2-Espectroscopia eletrônica de luminescência

Na análise dos espectros de luminescência dos complexos de Eu^{3+} , o qual emite predominantemente na região do vermelho, as transições mais estudadas são as que partem do nível $^5\text{D}_0$, um estado com $J=0$ e não degenerado, que não é desdobrado pelo campo cristalino. As transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$ são geralmente bem separadas e, dentre elas, as mais estudadas são as $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$. A transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ é chamada de “hipersensitiva” por ser muito sensível ao ambiente em que se encontra o íon Eu^{3+} [1a, b].

Assim como nos complexos de Eu^{3+} , os complexos de Tb^{3+} apresentam bandas finas referentes às transições $4f-4f$. São elas: $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_J$ ($J=0,1,2,3,4,5$ e 6), localizadas entre 480 e 640 nm, sendo a mais intensa a $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$ (543 nm, na região do verde) a qual é predominantemente promovida por dipolo magnético [1a, b].

Serão discutidos a seguir os espectros de emissão dos criptatos de Eu^{3+} , Tb^{3+} e Gd^{3+} em solução, obtidos neste trabalho.

3.2.1-Espectroscopia eletrônica de luminescência do $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$

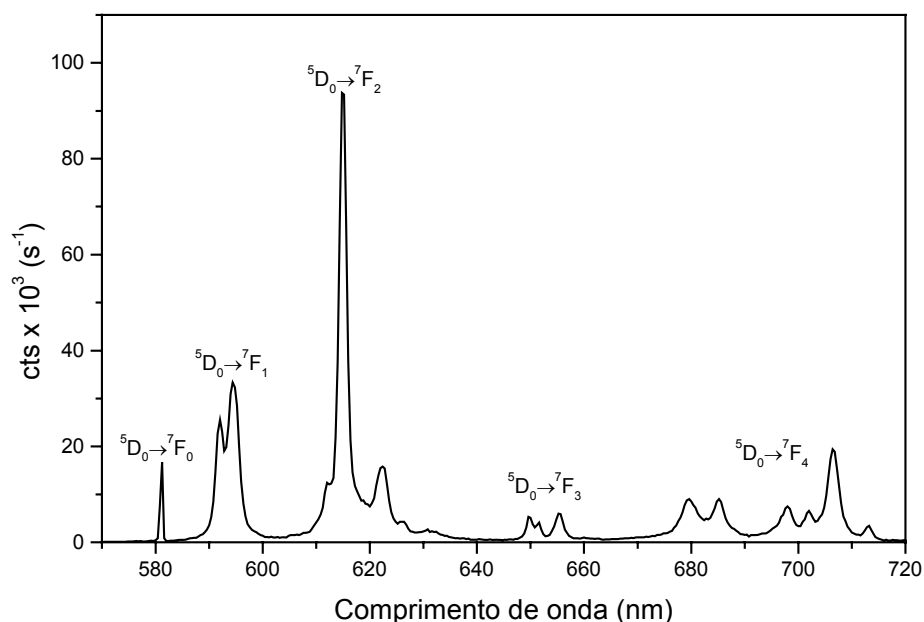
Os espectros de emissão, em H_2O e D_2O , foram obtidos através da excitação das amostras em 320 nm, que permite obter a máxima intensidade de emissão, mantendo-se o mesmo alinhamento das amostras e as fendas utilizadas. O criptato $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ apresenta uma única linha referente à transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$, sugerindo a não existência de isômeros conformacionais [23c, 39, 75].

Como não foi possível obter monocristais dos criptatos, impossibilitando a realização da difração de raios-X, analisou-se as transições do íon Eu^{3+} no criptato **9** ($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$, $J=0,1,2,4$) e, de acordo com a literatura [23c, 39, 76, 77], atribuiu-se a ele a simetria pontual do tipo C_3 (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Comparação do número de linhas nas transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ do criptato Eu^{3+}

	$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	$^5D_0 \rightarrow ^7F_4$
Experimental	1	2	3	6
D_{3h}	0	2	0	0
D_3	0	2	2	4
C_3	1	2	3	6

De acordo com as Figuras 3.5 e 3.6, pode-se observar que os espectros de emissão de **9** em H_2O e D_2O a 298K são idênticos, diferenciando apenas a intensidade de emissão, devido à diminuição dos modos vibracionais O-H das moléculas do solvente. A transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ não apresenta desdobramentos, enquanto as transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$ e $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ desdobram-se em duas bandas de intensidade média, três bandas de intensidade baixa, três de média intensidade e seis bandas de média intensidade, respectivamente.

Figura 3.5: Espectro de emissão do $[\text{EuC}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 298K.

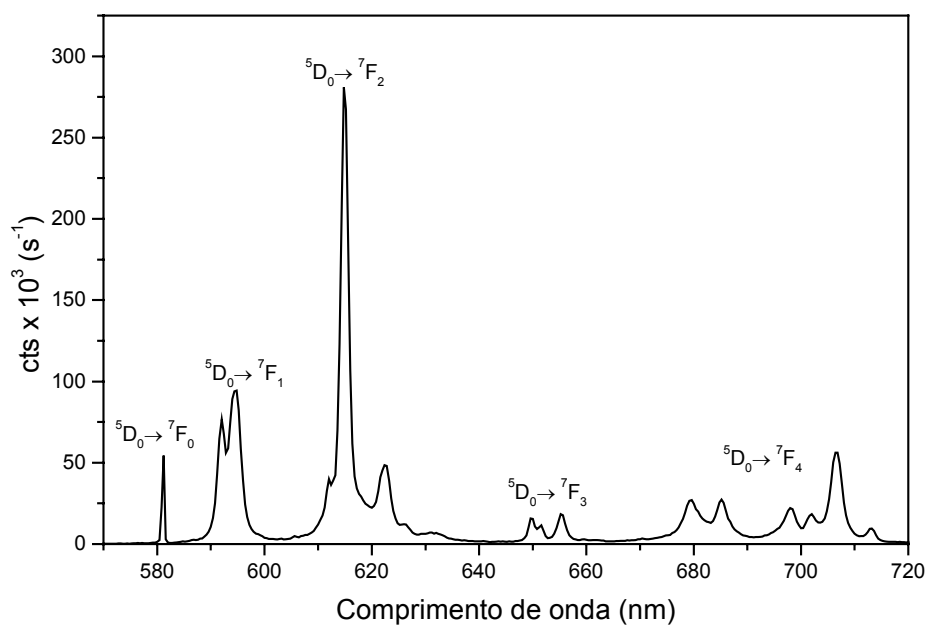


Figura 3.6: Espectro de emissão do $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 298K.

Comparando os espectros do criptato de Eu^{3+} em ambos os solventes, a 298K (Figuras 3.5 e 3.6) e a 77K (Figuras 3.7 e 3.8), verifica-se o aparecimento de linhas adicionais nas transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ e $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$, sugerindo uma mistura de isômeros conformacionais [23c, 39, 75].

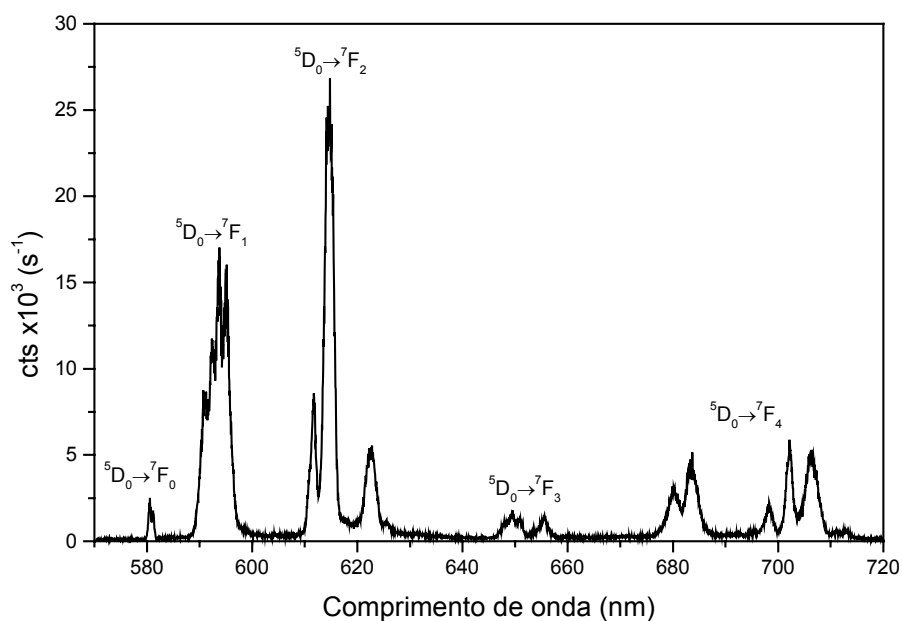


Figura 3.7: Espectro de emissão do $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 77K.

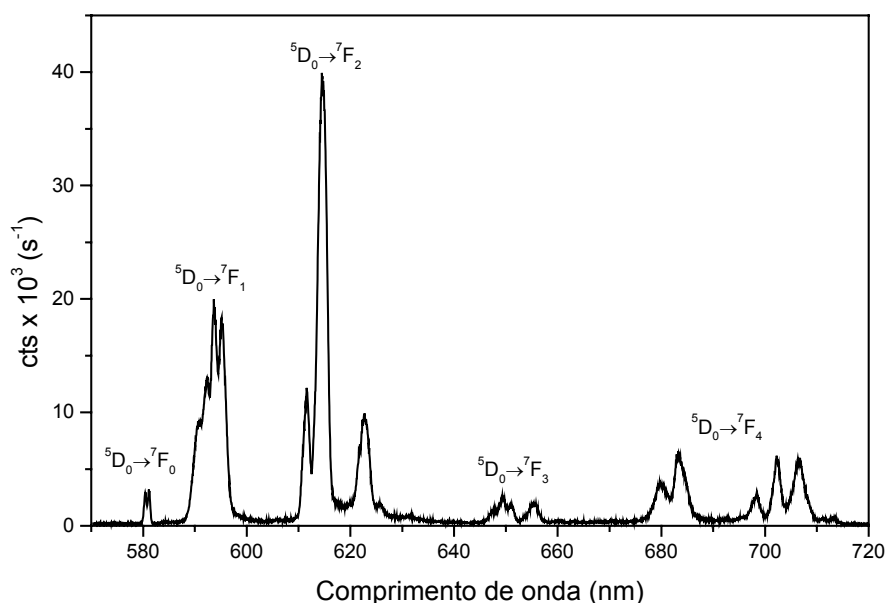


Figura 3.8: Espectro de emissão do $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 77K.

3.2.2-Espectroscopia eletrônica de luminescência do $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$

De modo análogo ao criptato de Eu^{3+} , os espectros do complexo $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ foram obtidos através da excitação em 320 nm, mantendo fixo o alinhamento das amostras e as fendas utilizadas. Nas Figuras 3.9 e 3.10 mostram os espectros realizados a 298K, em H_2O e D_2O . Há uma intensificação da luminescência do composto em D_2O , devida também à diminuição dos modos vibracionais O-H das moléculas do solvente. Os espectros apresentam linhas de emissão características das transições $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_{6,5,4,3}$.

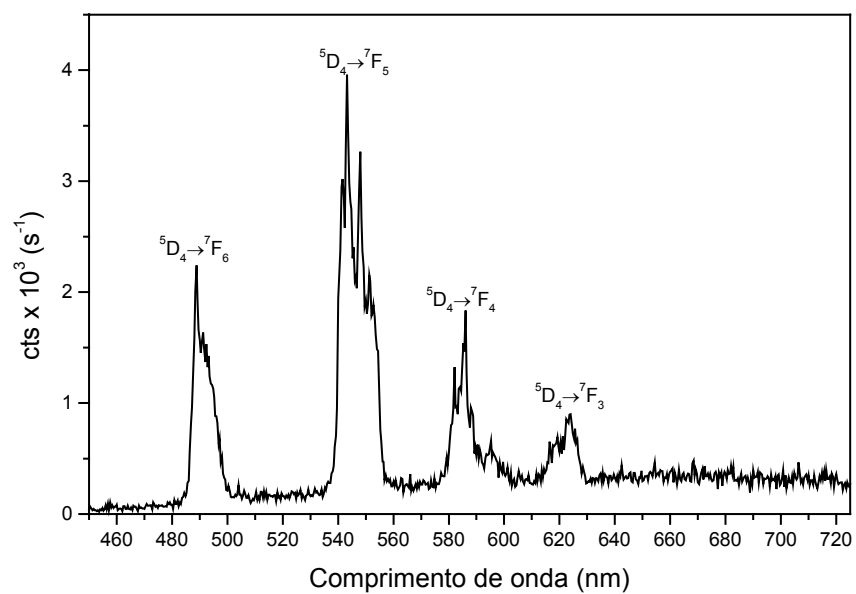


Figura 3.9: Espectro de emissão do $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 298K.

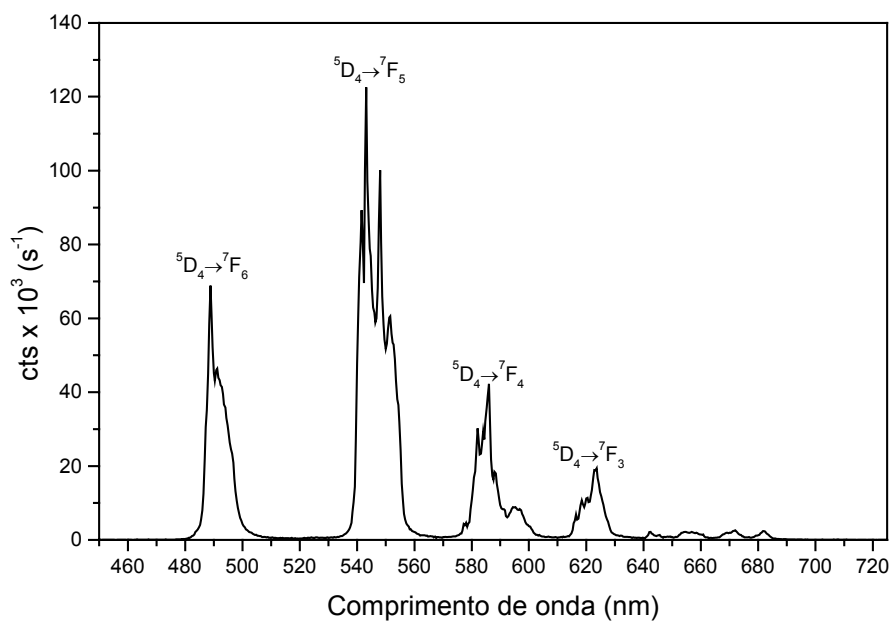


Figura 3.10: Espectro de emissão do $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 298K.

Com relação aos espectros de emissão realizados a 77K para o $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (Figuras 3.11 e 3.12), verifica-se um estreitamento e melhor resolução das linhas anteriormente observadas. Este fenômeno é causado pela diminuição da densidade de ocupação de fônons de baixa frequência [78].

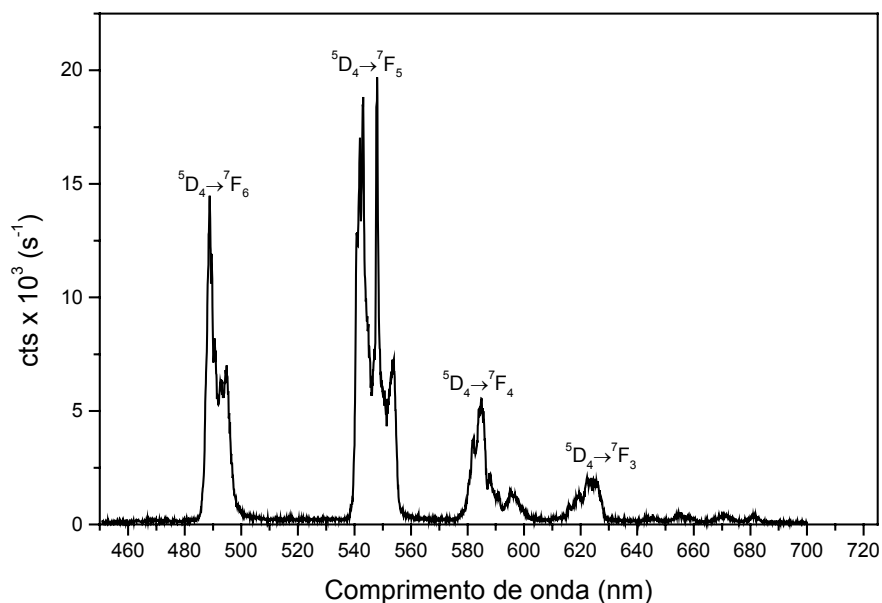


Figura 3.11: Espectro de emissão do $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 77K.

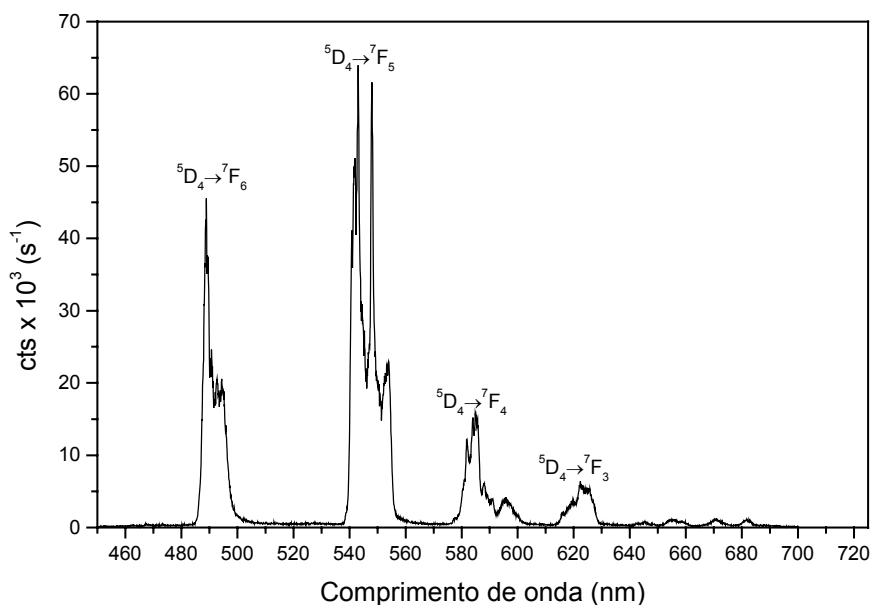


Figura 3.12: Espectro de emissão do $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 77K.

3.2.3-Espectroscopia eletrônica de luminescência do $[\text{Gd}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$

Nesta seção, serão analisados os dados experimentais referentes aos espectros de emissão do $[\text{Gd}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (Figura 3.13), o qual permite determinar a posição dos estados tripleto excitados de menor energia dos ligantes coordenados.

O espectro de luminescência do criptato com os íons Gd^{3+} não mostra linhas referentes às transições do metal, e sim, bandas de emissão dos ligantes. Este resultado é esperado uma vez que os estados excitados do Gd^{3+} estão acima, em energia, dos estados excitados dos criptatos, e por isso a transferência de energia não acontece. Além disso, nestes compostos, não é possível excitar diretamente o íon Gd^{3+} com radiação ultravioleta, porque os criptatos têm uma força de oscilador de absorção bem maior e absorvem na mesma região espectral do íon Gd^{3+} [79].

A posição do nível excitado do ligante, foi estimada no início da cauda da banda de emissão do $[\text{Gd}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (Figura 3.13). O valor correspondente ao estado tripleto (nível excitado do ligante de menor energia) é 23640 cm^{-1} .

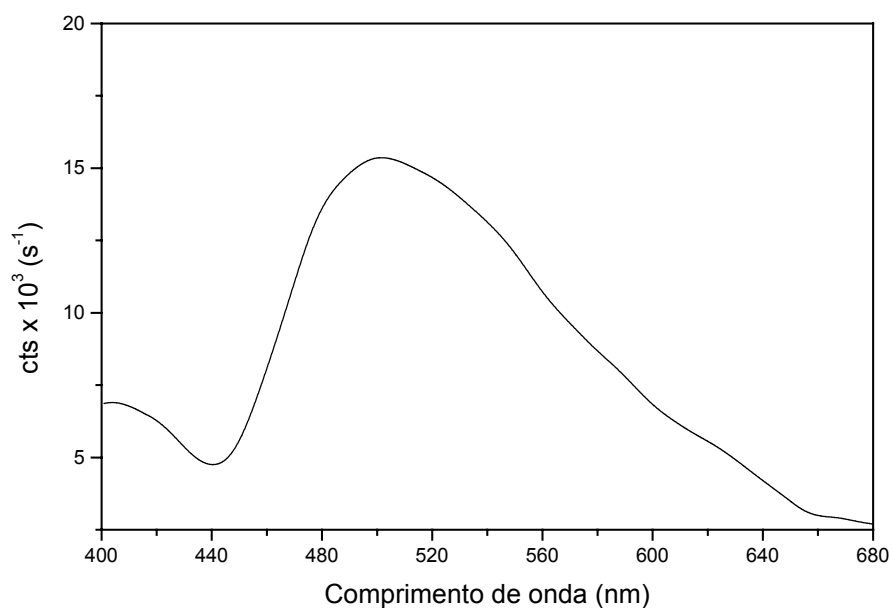


Figura 3.13: Espectro de emissão do $[\text{Gd}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 77K.

3.3-Determinação dos tempos de vida dos estados excitados.

Ao atingir o estado excitado, uma espécie tende a retornar ao estado de mais baixa energia, seja radiativamente com emissão de fótons ou não radiativamente via relaxação multifônon, cruzamento intersistemas, conversão interna, vibrações reticulares (fônons), ou transferência de energia. A taxa com que ocorre o decaimento da intensidade de emissão nesses processos é dada pela equação $\frac{dI}{dt} = -k_1 I$, onde k_1 relaciona-se às constantes de velocidade dos processos envolvidos em primeira ordem ou pseudo primeira ordem e I a intensidade de luz no estado excitado em um tempo t (temos portanto $I = I_0 e^{-k_1 t}$ onde I_0 é a intensidade num tempo $t = 0$). O recíproco do somatório das constantes de velocidade, que pode ser tomada como probabilidade de transição, é chamado de tempo de vida médio ($\tau = 1/k_1$), onde τ representa o tempo para a população de um estado excitado decair a $1/e$ da população original.

O tempo de decaimento dos estados excitados é constituído portanto, de componentes radiativos e não radiativos, podendo ser relacionado as taxas de decaimento radiativos e não radiativos segundo a equação:

$$\tau^{-1} = A_{\text{rad}} + A_{\text{nrad}} \quad (3.1)$$

A taxa de decaimento radiativa (A_{rad}) é relacionada ao coeficiente de emissão espontânea de Einstein (Kr), independentemente da temperatura. A taxa de decaimento não radiativa (A_{nrad}) apresenta contribuição via multifônon (Kmf), cruzamento interno para estados eletrônicos mais baixos (Kci), conversão interna e transferência de energia para íons vizinhos (Krt). A contribuição por transferência de energia para íons vizinhos em complexos envolvendo ligantes volumosos é pouco provável, enquanto as demais contribuições apresentam relativa dependência com a temperatura.

As curvas de decaimento da emissão dos estados excitados 5D_0 e 5D_4 para os criptatos de Eu^{3+} e Tb^{3+} respectivamente foram obtidas a 298K e 77K, monitorando-se o comprimento de onda de máxima emissão ($^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ para o Eu^{3+} e $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ para o Tb^{3+}).

Os tempos de vida do criptato $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ a 298K e 77K (Tabela 3.3) indicam grande dependência com a temperatura, concordando assim com os dados da literatura [74]. O número de moléculas de H_2O , n , na primeira esfera de coordenação foi determinado segundo equação desenvolvida por Horrocks (Equação 3.2) [80], onde $\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ e

τ_{D_2O} , são os tempos de vida do composto em H_2O e D_2O respectivamente e, q é uma constante de valor 1,05 e 4,2 para compostos com íons Eu^{3+} e Tb^{3+} , respectivamente.

$$n = q \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \right) \quad (3.2)$$

Tabela 3.3: Tempos de vida (τ) dos estados excitados dos criptatos de Eu^{3+} e Tb^{3+} , e número de moléculas de H_2O (n)

Composto	$\tau_{H_2O}(298K)$ (ms)	$\tau_{D_2O}(298K)$ (ms)	$\tau_{H_2O}(77K)$ (ms)	$\tau_{D_2O}(77K)$ (ms)	n
$[Tb\subset(bipy)_2py(CO_2Et)_2]^{3+}$	0,85	1,41	2,32	2,65	2
$[Eu\subset(bipy)_2py(CO_2Et)_2]^{3+}$	0,77				

Devido a problemas técnicos, não foi possível a determinação dos parâmetros anteriormente relacionados para o criptato de Eu^{3+} .

3.4-Rendimento Quântico experimental

As medidas de rendimento quântico que utilizam o $Ru(bipy)_3$ e o sulfato de quinina como padrões, baseiam-se em duas etapas: medidas de absorção e medidas da luminescência dos padrões e da amostra investigada. O rendimento quântico q_x da amostra é determinado pela comparação com o rendimento quântico do fósforo padrão q_p , segundo a equação abaixo:

$$q_x = q_p \cdot (A / S)_p \cdot (S / A)_x \quad (3.3)$$

Onde A_x e A_p correspondem a absorbância da amostra e do padrão ($Ru(bipy)_3$ ou sulfato de quinina); os termos S_p e S_x são os fluxos de fótons integrados ($Counts/s^{-1}$) para o padrão e a amostra respectivamente.

Os rendimentos quânticos de emissão do nível 5D_0 do Eu^{3+} e 5D_4 do Tb^{3+} nos criptatos $[Eu\subset(bipy)_2py(CO_2Et)_2]^{3+}$ e $[Tb\subset(bipy)_2py(CO_2Et)_2]^{3+}$ foram determinados utilizando os padrões supracitados. Os valores encontram-se na Tabela 3.4 e em ambos os casos, as medidas foram realizadas com excitação em 320 nm.

Tabela 3.4: Rendimento Quântico dos criptatos de Eu^{3+} e Tb^{3+} em solução aquosa

Composto	Absorbância (A)	Fluxo de fótons integrado (ϕ)	$q_{298}(\%)$ ($\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$)
*[Eu $\subset$ (bipy) $_2$ py(CO $_2$ Et) $_2$] $^{3+}$	0,1575	$5,24 \times 10^6$	14
*Ru(bipy) $_3$	0,1016	$6,86 \times 10^5$	2,8
**[Tb $\subset$ (bipy) $_2$ py(CO $_2$ Et) $_2$] $^{3+}$	0,0385	338	25
**Sulfato de Quinina	0,0485	124	55

* 10^{-4} M, ** 10^{-6} M

O método que utiliza o Ru(bipy) $_3$ e o sulfato de quinina como padrões, apresenta um erro em torno de 10% que é igual ao do método que utiliza o Y $_2$ O $_3$:Eu $^{3+}$ como padrão [81] e ao método desenvolvido por Bril e colaboradores [82], utilizado pelos laboratórios Philips Lighting (Eindhoven-Holanda).

A partir dos espectros de absorção e emissão do criptato de Gd $^{3+}$ (Figura 3.13) foi possível construir um diagrama de níveis de energia para os criptatos de Eu $^{3+}$ e Tb $^{3+}$ (Figura 3.14). O mesmo permite inferir o provável mecanismo de transferência de energia entre os estados excitados 4f do íon Eu $^{3+}$ ou Tb $^{3+}$ e o estado tripleto de mais baixa energia do criptato.

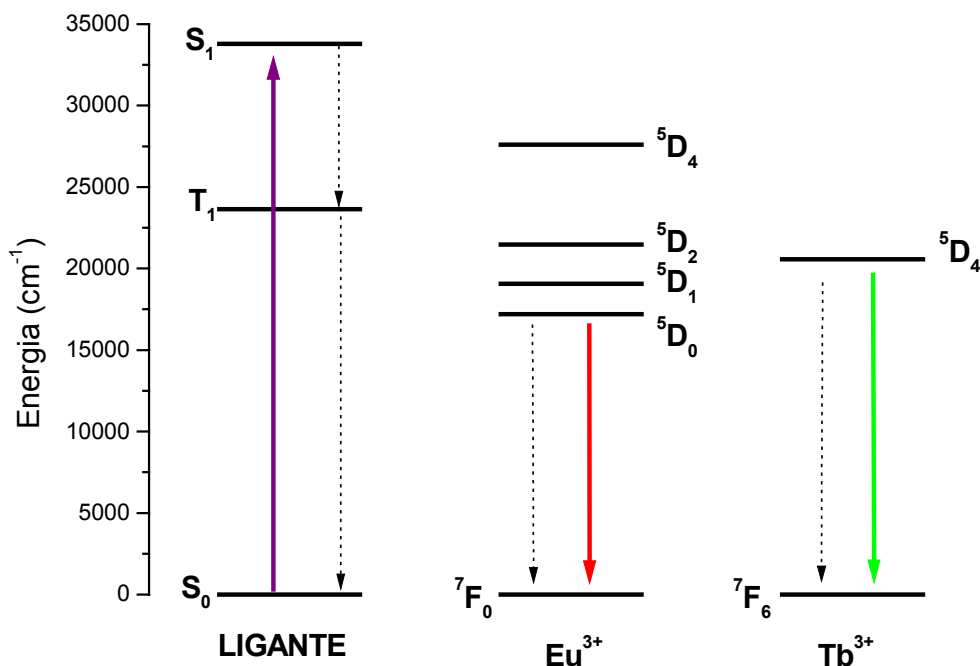


Figura 3.14: Diagramas de níveis de energia do ligante e dos criptatos $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ e $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$. Para simplificação, estão mostrados apenas os estados excitados de interesse e as larguras das transições foram omitidas para melhor visualização.

O maior rendimento quântico de emissão do criptato $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ ($q=25\%$) em relação ao criptato $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ ($q=14\%$), pode ser atribuído a uma melhor transferência de energia $T \rightarrow {}^5D_4$ para o criptato de Tb^{3+} do que $T \rightarrow {}^5D_0$ para o criptato de Eu^{3+} devido às posições dos níveis excitados do Tb^{3+} em relação ao primeiro tripleto do ligante. Podemos sugerir também que a retrotransferência seja maior no criptato de Eu^{3+} .

Para a avaliação das propriedades fotofísicas dos novos criptatos de Tb^{3+} , foram utilizados a princípio, três compostos com estruturas semelhantes (Tabela 3.5). O criptato **10** apresenta um dos rendimentos quânticos mais altos em solução aquosa, já registrado na literatura. A Tabela abaixo mostra que este fato pode ser justificado pelo elevado valor K_r , e baixo valor de $K_{nr}(T)$, mesmo com a contribuição de $K_{nr}(\text{OH})$ sendo significativa devido a presença de moléculas de água na primeira esfera de coordenação do íon metálico, previamente determinado através da Equação 3.2, sessão 3.3.

Tabela 3.5: Dados fotofísicos dos criptatos de Tb³⁺.

Criptato	Kr (s⁻¹)	Knr(T) (s⁻¹)	Knr(OH) (s⁻¹)	T (cm⁻¹)	n	q (%)
[TbC(bipy) ₂ py(CO ₂ Et) ₂] ³⁺	377	332	467	23640	2	25
[TbC(bipy) ₃] ³⁺	263	1325	635	21600	2,7	3
[TbC(bipy).2.2] ³⁺	300	700	280	21950	1,0	6

Onde: **Kr** é a taxa de decaimento radiativo (Equação 3.4); **Knr(T)** é a taxa de decaimento não-radiativo dependente da temperatura (Equação 3.5); **Knr(OH)** é a taxa de decaimento não-radiativo via multifônon, devido a presença de vibrações OH (Equação 3.6); **T** é a posição do nível tripleto do ligante; **n** é o número de moléculas de água na primeira esfera de coordenação, calculado pela Equação 3.2; e **q** é o rendimento quântico experimental [74, 80].

$$Kr = 1/\tau_{D_2O}^{77K} \quad (3.4)$$

$$Knr(T) = 1/\tau_{D_2O}^{300K} - 1/\tau_{D_2O}^{77K} \quad (3.5)$$

$$Knr(OH) = 1/\tau_{H_2O}^{300K} - 1/\tau_{D_2O}^{300K} \quad (3.6)$$

A posição dos tripletos (T) é um dos fatores mais importantes na determinação do rendimento quântico de um criptato. Conforme observado experimentalmente por Latva e colaboradores (Figura 3.15)[83], uma maior distância entre o nível tripleto do ligante e o nível emissor do íon Tb³⁺ implica no aumento do rendimento quântico observado, diferentemente do comportamento observado para os criptatos de Eu³⁺, quando o aumento do rendimento quântico é tanto mais acentuado quanto maior a ressonância entre esses níveis.

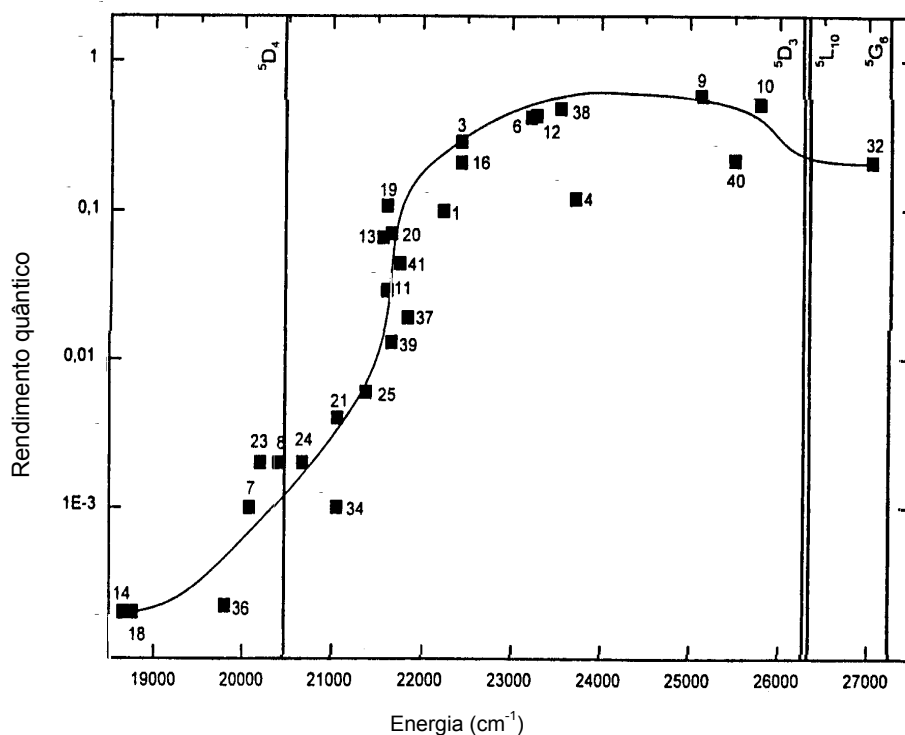


Figura 3.15: Rendimento quântico de luminescência para quelatos de Tb^{3+} , como função da energia do estado tripleto mais baixo do ligante. Os pontos marcados correspondem aos resultados obtidos para distintos quelatos e a curva traçada, é a representação da dependência (rendimento quântico vs energia do tripleto do ligante) proposta por Latva e colaboradores [83].

PARTE II:**3.5-CONJUGADO Con A-CRIPTATO**

Nos estudos de estrutura-função de proteínas, as técnicas cromatográficas e espectroscópicas são usadas de forma complementar para obtenção de informações que permitam correlacionar mudanças conformacionais ou estruturais das proteínas em suas diferentes formas, e ainda com relação aos locais de interação destas com seus ligantes.

3.5.1-Cromatografia por exclusão de tamanho (*Size Exclusion Chromathography – SEC*)

A cromatografia por exclusão efetua separações de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. As moléculas pequenas penetram nos poros e apresentam um maior tempo de retenção, enquanto as maiores são excluídas (Figura 3.16) [84].

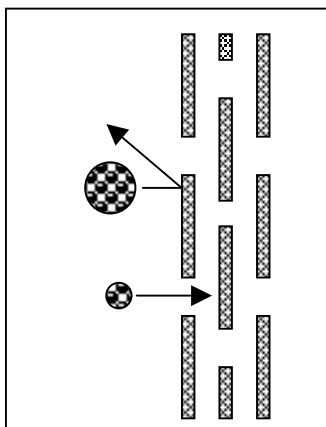


Figura 3.16: Cromatografia por exclusão de tamanho.

Na Figura 3.17 se observa o cromatograma da amostra 7c (conjugação aos grupos carboxílicos; relação de 2 criptatos : resíduo de aminoácido) quando submetida a uma coluna Superdex 75 e monitorada pela absorbância em 280 nm. A seta em vermelho indica o volume de eluição do padrão albumina de soro bovina, que tem peso molecular de 66.000 u.m.a., previamente injetado nessa coluna. A amostra 7c foi eluída em um volume maior que o padrão, apresentando peso molecular menor que 66.000 u.m.a. ou seja, no conjugado, a Con A deve estar na sua forma dimérica e não tetramérica.

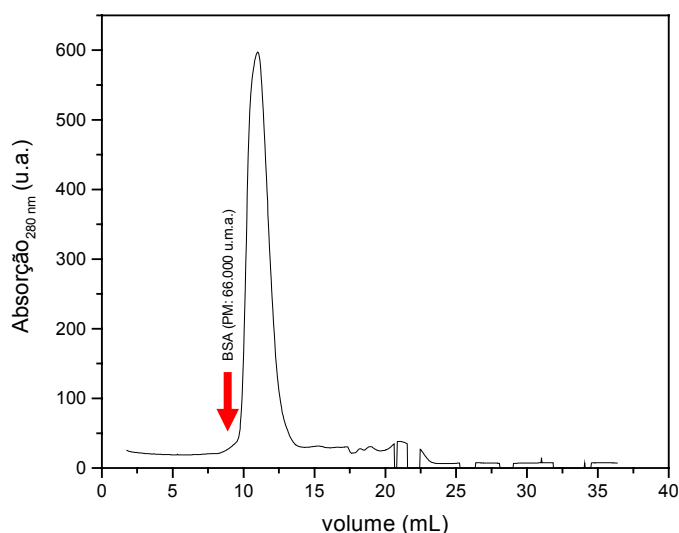


Figura 3.17: Cromatograma da amostra 7c, em coluna de exclusão de tamanho. A seta em vermelho indica o volume observado para o padrão BSA.

A amostra de Con A pura foi eluída, sem ter sofrido qualquer manipulação, em uma coluna Superdex 200 (Figura 3.18). A opção por esta coluna consistiu devido a sua melhor resolução para pesos moleculares da ordem de 200 u.m.a. A seta em azul indica o volume de eluição do padrão fosforilase B, cujo peso molecular é de 97.000 u.m.a. enquanto a seta em vermelho indica o volume de eluição do padrão albumina de soro bovina (66.000 u.m.a.).

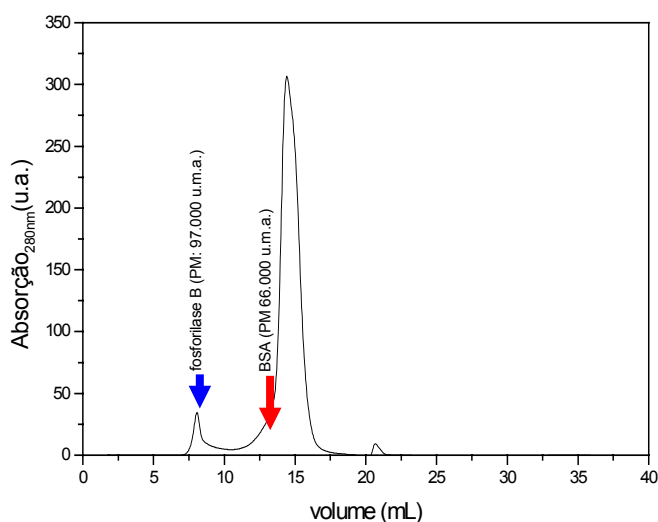


Figura 3.18: Cromatograma da amostra de Con A pura em coluna de exclusão de tamanho. A seta em azul indica o volume de retenção do padrão fosforilase B e a seta em vermelho, o volume de retenção observado para o padrão BSA.

Observa-se a presença de dois picos, o primeiro em 8 mL e o segundo em 14 mL, os quais foram atribuídos às formas tetraméricas e diméricas da Con A, sendo que esta última encontra-se em quantidade superior à primeira.

Porém, a Con A possui sítios de reconhecimento a carboidratos em todos os seus monômeros e o fato de ser encontrada quase que em sua totalidade como um dímero não deve comprometer sua atividade biológica, uma vez que ela mantém sua atividade hemaglutinante e pode ser empregada em testes de histoquímica com lectinas.

3.5.2-Dicroísmo circular (*Circular Dichroism – CD*)

O CD reflete a diferença de absorção dos componentes da radiação circularmente polarizada que incide sobre uma amostra [85]. Esse efeito ocorre sempre que há no analito um cromóforo quiral, seja ele: a) intrínseco, ou b) que esteja covalentemente ligado a um centro quiral ou ainda c) que esteja localizado em uma vizinhança assimétrica. Ao final da medida, o polarímetro detectará a radiação resultante: luz polarizada na forma de elipse. A medida de CD pode ser expressa nas unidades de diferença de absorbância dos componentes L e R da radiação (ΔA) ou em graus, como medida da elipsidade (θ) (Figura 3.19).

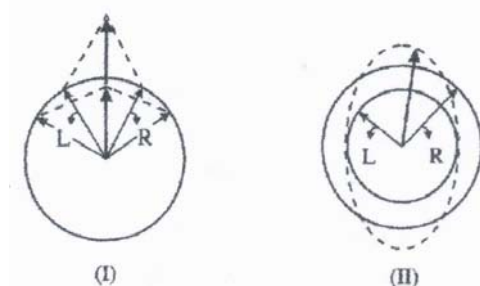


Figura 3.19: Origem do CD. (I) componentes circularmente polarizados L (left) e R (right) do plano de luz polarizada: como os dois componentes possuem a mesma amplitude, quando combinadas resultam na radiação circularmente polarizada; (II) os componentes combinados em diferentes magnitudes resultam em uma radiação elipticamente polarizada.

Vale salientar o fato de que apenas as componentes quirais contribuem para o CD, como pode ser ilustrado no esquema da Figura 3.20.

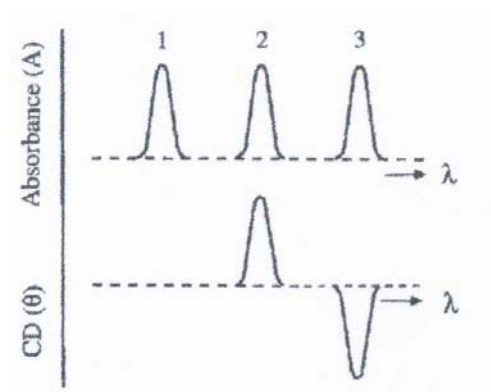


Figura 3.20: Relação entre os espectros de absorção e o de CD. O espectro de absorção de uma amostra com três bandas de absorção. A primeira (1) é proveniente de um componente aquiral e por isso não apresenta sinal em CD; a segunda (2) é proveniente de um componente quiral, que absorveu mais da componente *L* que da *R* e por isso apresenta sinal positivo em CD; a terceira banda (3) é proveniente de um componente quiral, que absorveu mais da componente *R* que da *L* e por isso apresenta sinal negativo em CD.

Desta forma, vários aspectos da estrutura de proteínas podem ser avaliados. Estudos desenvolvidos na região do UV-distante (geralmente na faixa entre 180 ou 190 nm até 240 nm) podem ser empregados para medidas quantitativas a respeito da composição da estrutura secundária da proteína. Nessa região, o principal grupo absorvedor é a ligação peptídica. Há uma larga, mas pouco intensa absorção $n \rightarrow \pi^*$, centrada em torno de 210 nm e uma intensa transição $\pi \rightarrow \pi^*$, centrada em 190 nm.

A partir de espectros de CD obtidos para proteínas com estruturas cristalográficas bem conhecidas foi possível deduzir que contribuições as diferentes formas estruturais fornecem para o espectro final. A Figura 3.21 exemplifica os espectros associados a vários tipos de estruturas secundárias existentes, como nos caso da α -hélice, da folha β -antiparalela e quando há ausência de estrutura ordenada [85a].

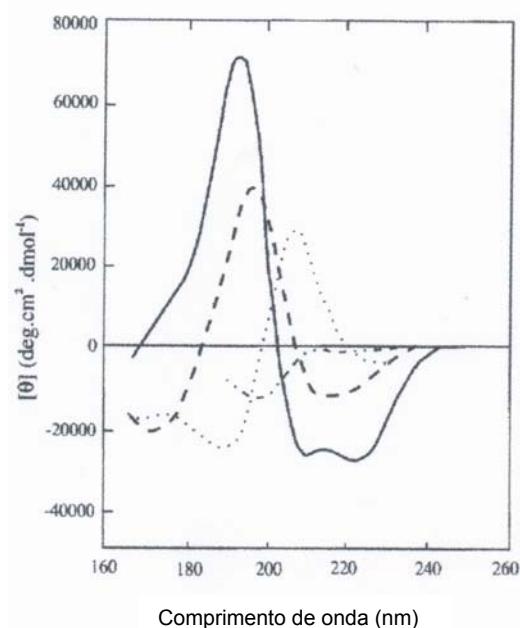


Figura 3.21: Espectro de CD na região do UV-distante. Curva sólida: α -hélice; curva tracejada: folha β -antiparalela; curva pontilhada: β -turns tipo I; curva com pontos e traços alternadamente: estrutura irregular [85a].

Na Figura 3.22 podemos observar as medidas de CD para as amostras Con A nativa e conjugadas 8a, 8ai e 8c, todas em solução PBS 0,01 M, pH 7,2. Na proteína nativa ocorre um máximo positivo em de 197 nm e um mínimo negativo em de 223 nm, perfazendo um espectro característico de folhas β [85]. Quando as lectinas são conjugadas se pode observar que os mínimos e máximos são mantidos mostrando que a estrutura secundária da lectina não foi perturbada pela conjugação.

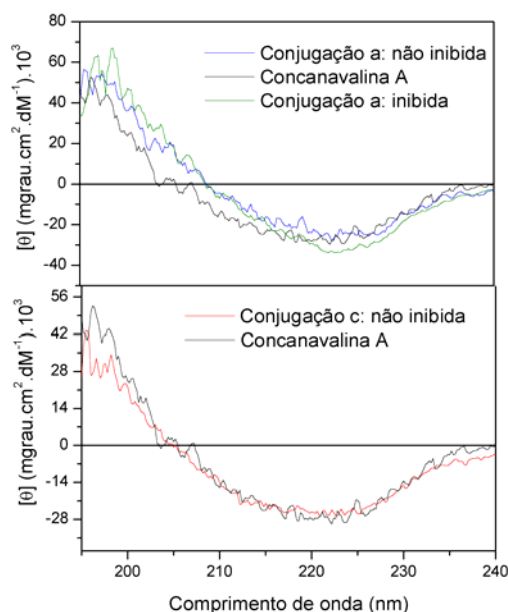


Figura 3.22: Espectro de CD obtido para as amostras de Con A pura, 8a (conjugação **a** não inibida), 8ai (conjugação **a** com inibição) e 8c (conjugação **c** não inibida).

Uma vez que no espectro das conjugações nas quais empregamos o maior excesso de criptato (conjugação 8 = relação 10 criptatos:resíduo de aminoácido ligante) concluímos que a estrutura secundária da proteína não sofreu modificações, nas situações de conjugação com menos criptato, ela certamente se manteria íntegra, o que foi constatado através da análises de CD das demais amostras.

Desta forma se pode afirmar que o método de conjugação desenvolvido, bem como a presença do criptato ligado à proteína, não desestabilizaram sua estrutura secundária.

3.5.3-Fluorescência e fosforescência da proteína

Cada monômero de Con A apresenta em sua estrutura quatro resíduos de triptofano (W) [52]. Estes se encontram parcialmente escondidos no interior da estrutura da lectina, como esquematizado na Figura 3.23. Excitando nossas amostras no comprimento de onda

295 nm e monitorando sua emissão entre 305 e 405 nm, espera-se obter o espectro de fluorescência dos triptofanos na forma de uma banda larga, centrada em 330 nm [86].

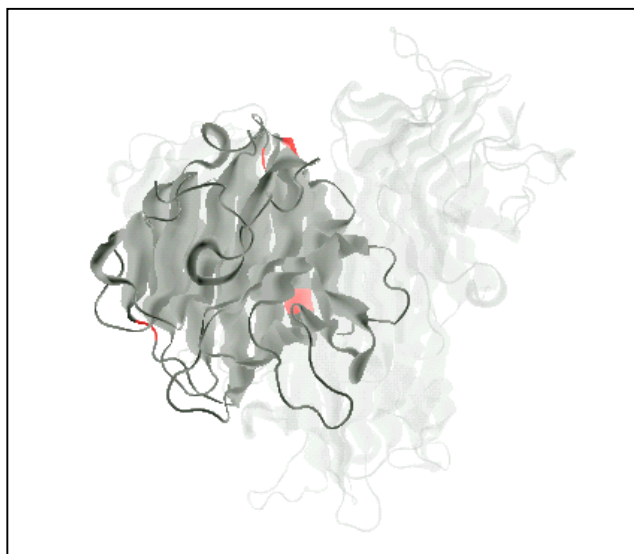


Figura 3.23: Localização dos resíduos de triptofanos, assinalados em vermelho claro, em um monômero de Con A. Os demais monômeros foram parcialmente ocultados para uma melhor visualização.

A Figura 3.24 mostra o espectro de fluorescência intrínseca da Con A em sua forma nativa (Con A). Observa-se um máximo de emissão em torno de 330 nm. Nas amostras conjugadas 7a (não inibida) e 7ai (inibida) nenhum deslocamento pôde ser observado, indicando que não houve mudança nas vizinhanças do triptofano. Esse resultado sugere que a estrutura terciária da proteína não foi essencialmente perturbada pela conjugação.

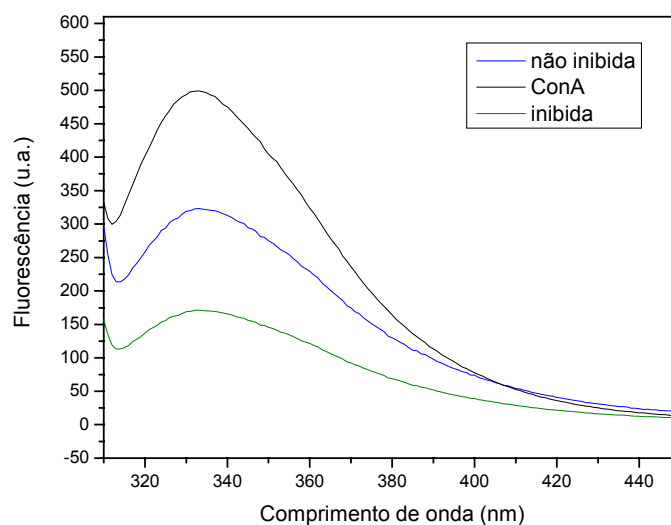


Figura 3.24: Espectro de emissão dos triptofanos das amostras Con A pura, 7a (não inibida) e 7ai (inibida).

Este comportamento foi mantido por todas as demais análises, nas séries estudadas.

Além do monitoramento da vizinhança dos triptofanos, empregou-se medidas de fosforescência para avaliar o grau da conjugação lectina-criptato através da análise conjunta de seus respectivos espectros de emissão. Com isso pretendeu-se determinar em que série a conjugação foi mais efetiva. Para tal, excitou-se as amostras em 291 nm e monitorou-se a emissão no intervalo de 385 a 750 nm. A seguir, são relacionados os resultados obtidos para cada série analisada e posteriormente, fez-se um estudo comparativo.

Série a: conjugação do criptato à lectina via resíduos com cadeias laterais aminas ou amidas.

Obtiveram-se os espectros de emissão das amostras 1a-8a conforme metodologia anteriormente descrita. A Figura 3.25 exhibe o resultado para as amostras 7a e 8a, sendo possível a identificação de transições características do íon Eu^{3+} . Contudo, não se distingue a transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ da $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$, além de se observar um aumento expressivo na intensidade do pico associado a esta última. Isso ocorre porque em torno de 570 nm a Con A apresenta uma banda de fosforescência atribuída aos triptofanos e tirosinas, que vem a se somar aos sinais do íon lantanídeo.

No espectro da amostra 7a, a banda da lectina se sobrepõe às primeiras transições do íon Eu^{3+} uma vez que teremos menos criptato conjugado. Nas demais conjugações (1a-6a), foi possível a detecção apenas do sinal da proteína, não podendo ser identificadas com segurança, as transições do íon Eu^{3+} .

Um fato que deve ser levado em consideração no decorrer dessa conjugação é que uma vez postos em contato os reagentes (lectina, criptato e glutaraldeído), e principalmente para as conjugações que empregaram excesso de criptato, não é possível garantir que todo ele tenha se coordenado única e exclusivamente via glutaraldeído, às cadeias aminas ou amidas. É possível e extremamente viável que parte das moléculas de criptato venham a ligar-se diretamente a resíduos com cadeias laterais carboxílicas.

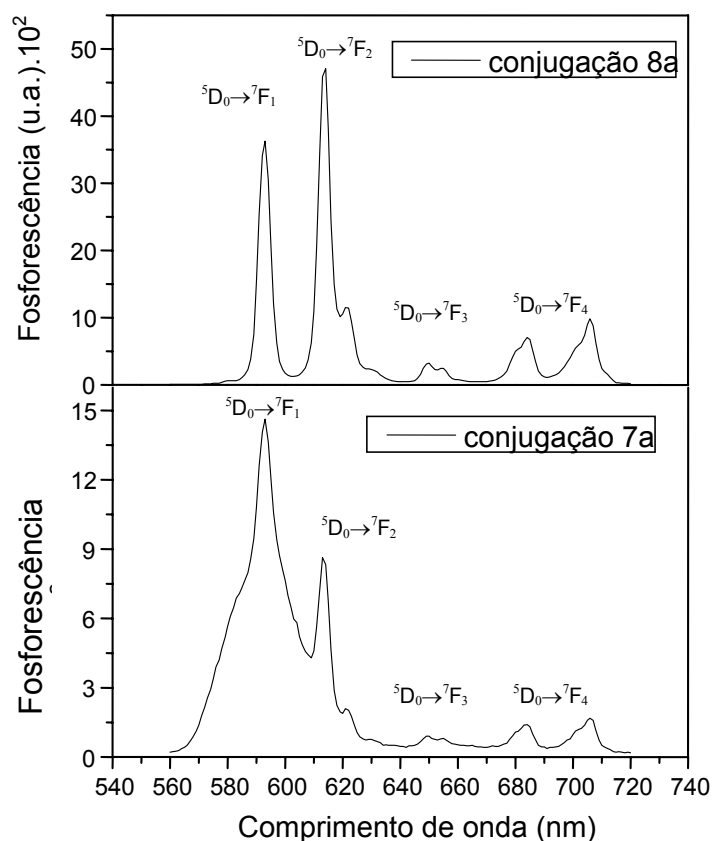


Figura 3.25: Espectros de fosforescência das amostras 7a e 8a.

Série ai: conjugação do criptato à lectina via resíduos com cadeias laterais aminas ou amidas, com prévio bloqueio do sítio de reconhecimento a carboidrato da lectina

Da mesma forma que na série anterior, apenas as amostras 7ai e 8ai forneceram espectros resolvidos, sendo possível a atribuição das transições do íon Eu^{3+} . Contudo, estas amostras apresentaram intensidade de emissão (Figura 3.26) da ordem de dez vezes menor que a respectivas não inibidas 7a e 8a.

Como já determinado através de dados cristalográficos do complexo Con A - carboidrato, o sítio de reconhecimento de açúcares é composto por 8 aminoácidos, sendo que quatro deles são passíveis de conjugação: asparagina (N14), arginina (R 228), ácido aspártico D 16 e D 208. O fato de estarmos bloqueando estes sítios antes da conjugação indisponibiliza estes resíduos de aminoácidos para conjugação com o criptato. Por isso, aparentemente a série **ai** apresenta menos criptato conjugado a lectina em relação à série **a**.

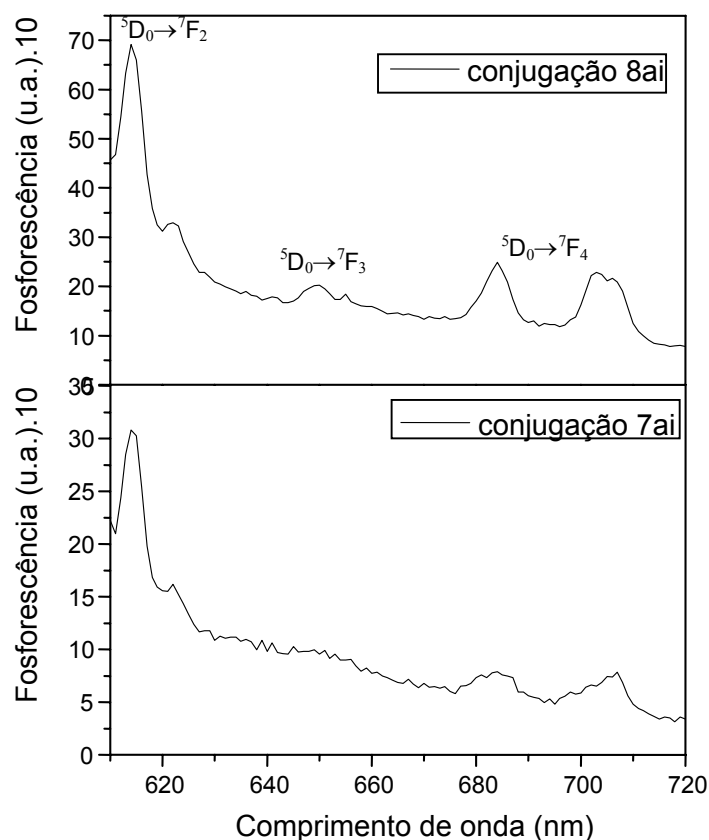


Figura 3.26: Espectros de fosforescência das amostras 7ai e 8ai.

Série c: conjugação do criptato à lectina via resíduos com cadeias laterais carboxílicas.

Procedendo de forma análoga às séries anteriores, foram realizadas as mesmas medidas para as séries c. Neste caso, foi possível observar as transições do íon Eu^{3+} no criptato a partir da conjugação 6c.

A Figura 3.27 apresenta os espectros obtidos para as conjugações 5c-8c. A seta em vermelho salienta a posição e posteriormente o aumento da banda da lectina na conjugação 7c, quando comparada ao espectro da 8c, onde é quase imperceptível.

Essa banda foi ocultada nos espectros de 5c e 6c por extrapolarem em muito a escala do gráfico. Percebe-se também que na amostra 5c, as transições observadas para as demais amostras confundem-se com o ruído da medida, sendo impossível suas atribuições de forma confiável.

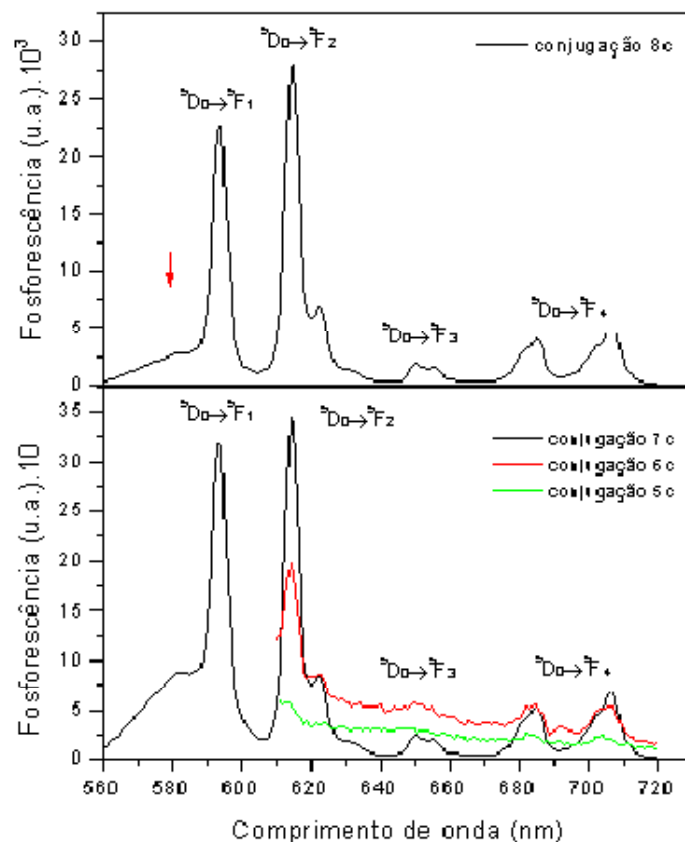


Figura 3.27: Espectros de fosforescência das amostras 5c-8c.

Série ci: conjugação do criptato à lectina via resíduos com cadeias laterais carboxílicas, com prévio bloqueio do sítio de reconhecimento a carboidratos da lectina.

Analogamente à série **c**, pôde-se avaliar a eficiência da conjugação a partir da amostra 6ci. Aparentemente, a inibição aqui também resultou em uma diminuição significativa da emissão dessas amostras, em relação à série **c**, tanto que para a aquisição desses resultados fez-se necessário o aumento da potência da lâmpada de 18 para 23 Ampères.

A Figura 3.28 mostra os espectros das amostras 5ci-8ci, e a seta vermelha marca o sinal proveniente da proteína. Nos espectros das amostras 5ci-7ci esta banda foi extraída pelas mesmas razões que o fizemos na análise da série c.

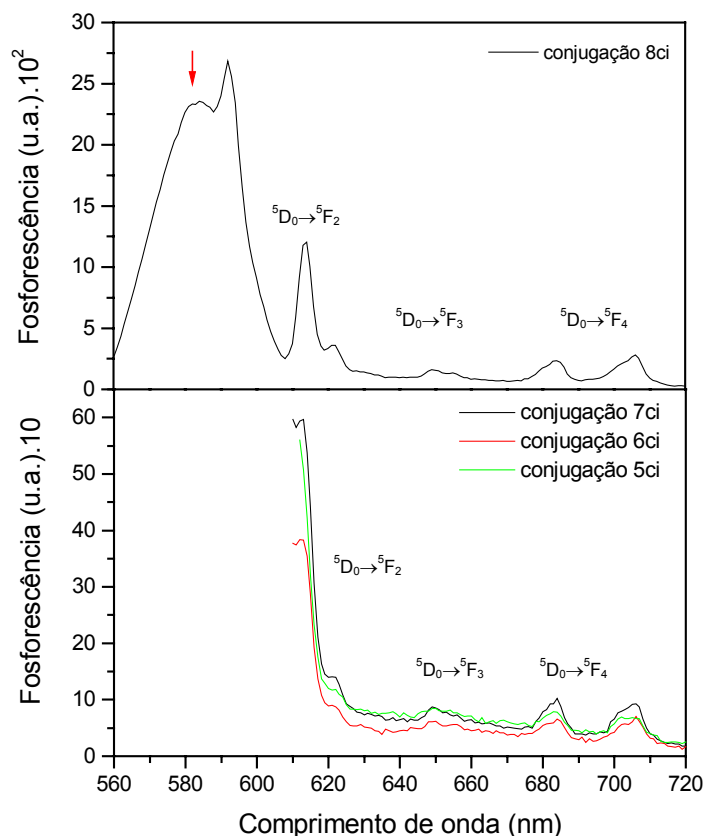


Figura 3.28: Espectros de fosforescência das amostras 5ci-8ci.

Análise Comparativa

Uma vez feitas as considerações anteriores, foi possível inferir sobre a eficiência das conjugações comparativamente. Para isso, reuniu-se em um mesmo gráfico (Figura 3.29), os espectros das amostras 7a, 7ai, 7c e 7ci recém conjugadas, no intervalo de 580 a 740 nm, onde é possível observar a banda de emissão da proteína e as transições atribuídas ao íon Eu^{3+} .

Sabendo-se que o criptato apresenta duas bandas principais de absorção: em 290 e 310 nm e, que a Con A absorve em 295 nm, os espectros das amostras onde ocorreu maior conjugação devem apresentar menor intensidade para a banda da proteína. Isto porque

apresentando banda de absorção próxima à da lectina, o criptato atuará como um supressor de energia.

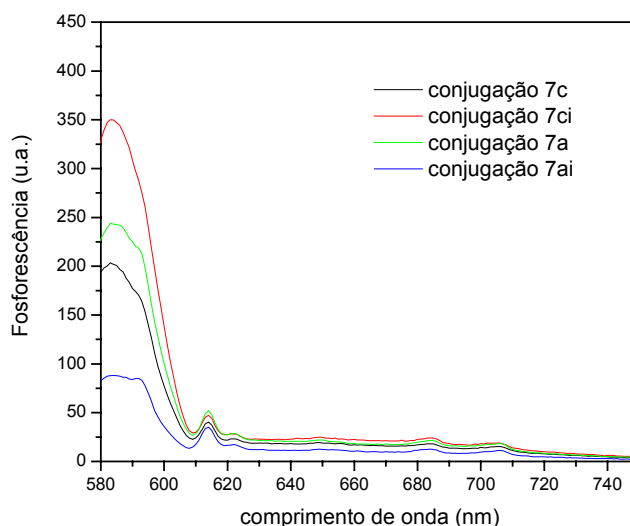


Figura 3.29: Espectros de fosforescência das amostras 7a, 7ai, 7c e 7ci.

Assim sendo, pode-se extrair a seguinte ordem decrescente, de quantidade de criptato conjugado:

$$7ai > 7c > 7a > 7ci,$$

ou seja, a melhor conjugação ocorre na amostra 7ai (duas possibilidades de conjugações), seguida da 7c e da 7a. Este resultado parece contradizer os resultados das Figuras 3.25 e 3.26 e carece de mais atenção. A pior conjugação ocorreu na amostra 7ci já que além de um único meio de conjugação, alguns resíduos se encontravam indisponíveis devido o bloqueio do sítio de reconhecimento a carboidrato da Con A.

Não foi possível concluir sobre a influência do procedimento de bloqueio dos sítios ativos da proteína no processo de conjugação do criptato. Através do gráfico anterior, observamos que para a série **a** e **ai**, o fato da proteção do sítio teria contribuído para uma maior conjugação do criptato na amostra 7ai, enquanto para as amostras 7c e 7ci, observa-se o efeito contrário. Essa observação permanece sob investigação, empregando inclusive a técnica de espectroscopia de compostos paramagnéticos (EPR) para mapear a vizinhança dos sítios de reconhecimento da lectina, através da observação dos sítios que complexam Mn^{2+} .

3.5.4-Atividade hemaglutinante

A forma mais empregada para a detecção da presença de lectinas é o desenvolvimento de testes de hemaglutinação [46]. Uma vez que a Con A possui sítios de reconhecimento a carboidratos em todos os seus monômeros (Figura 3.30), mesmo que ela esteja em sua forma dimérica, é de se esperar que ela continue biologicamente ativa desde que não tenha sofrido perturbações em seus sítios.

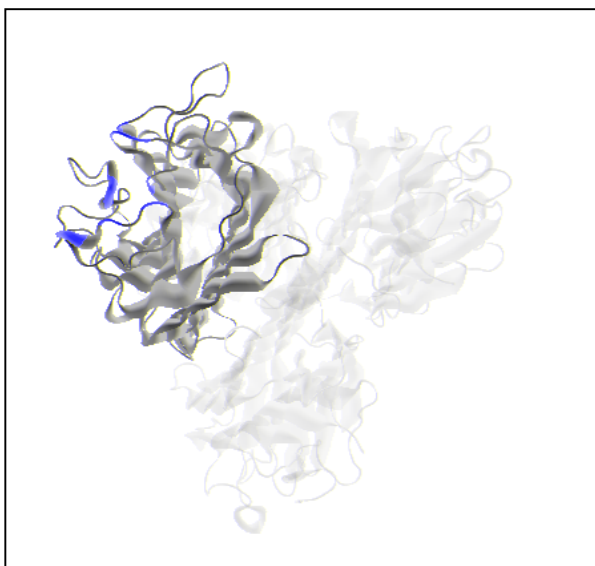


Figura 3.30: Em azul, o sítio de reconhecimento a açúcares em um monômero da Con A. Os demais monômeros foram parcialmente ocultados para uma melhor visualização da estrutura.

Tendo sido testadas, em presença de eritrócitos humanos, as amostras de Con A pura, 7a, 7ai e 7ci, apresentaram atividades hemaglutinantes, na seguinte ordem de decréscimo de atividade:

$$\text{Con A pura} > 7a > 7ai > 7ci;$$

onde pode-se constatar que as séries com bloqueio do sítio de reconhecimento da lectina (**ai** e **ci**) apresentaram atividade um pouco menor que a série sem bloqueio (**a**), através de análise visual. A amostra 7c será testada e esses resultados parciais ainda serão analisados.

Capítulo.4: Aplicações em desenvolvimento

4.1- UTILIZAÇÃO DE CRIPTATOS DE LANTANÍDEOS COMO FERRAMENTA AUXILIAR EM HISTOQUÍMICA COM LECTINAS

Buscando o desenvolvimento de marcadores cada vez mais eficientes na área de diagnósticos e análises médicas, testou-se os criptatos de lantanídeos sintetizados como marcadores em lectinas. Como já discutido na sessão 1.5.3 do capítulo 1, as lectinas são (glico)proteínas que têm sido amplamente empregadas em histoquímica.

O emprego de diferentes lectinas conjugadas à enzima peroxidase tem permitido a identificação de tecidos modificados por diversas patologias, dentre elas vários tipos de câncer [46, 53]. Câncer é uma desordem celular, normalmente manifestada na forma de um tumor, como resultado de uma série de mudanças bioquímicas no ambiente celular, inclusive variações na expressão de carboidratos superficiais, que podem ser avaliadas através da histoquímica com lectinas. A Figura 4.1 ilustra a marcação de um tumor de mama diagnosticado como carcinoma ductal infiltrante pela Con A-peroxidase.

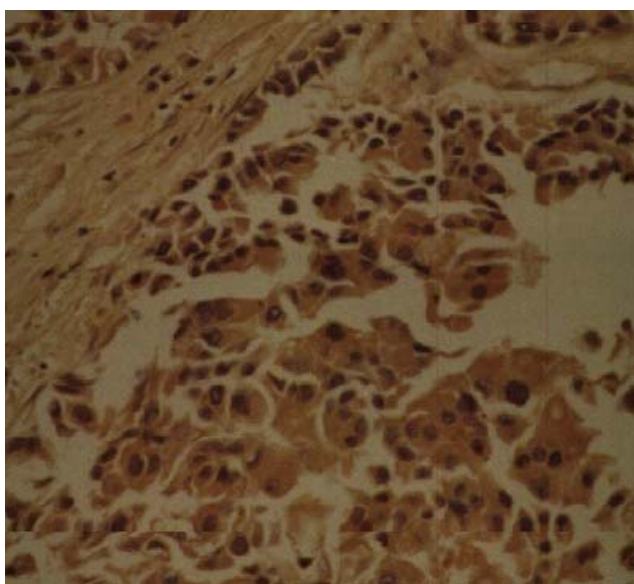


Figura 4.1: Carcinoma ductal infiltrante de mama marcado com o conjugado Con A-peroxidase.

Após a síntese dos criptatos (**12** e **13**), conjugação destes à Con A e caracterização do produto final obtido, foi testada a eficiência do criptato de Tb^{3+} como marcador fluorescente, objetivando uma metodologia mais rápida e que permita quantificar a marcação do tecido através da luminescência dos íons lantanídeos.

O protocolo padrão adotado para marcação do tecido fixado em lâmina de vidro apropriada pode ser resumido nas etapas abaixo:

- Desparafinização e hidratação do tecido com xilol e álcool etílico;
- Tratamento do tecido com solução de tripsina 0,03%, por 3 minutos a 37°C e incubação com metanol;
- Incubação do tecido com o conjugado por 2 horas a 4°C;
- Revelação do conjugado enzimático (peroxidase) com solução de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio;
- Análise da marcação em microscópio óptico.

Empregando como marcador um criptato de lantanídeo obtém-se uma metodologia com menos etapas, pois suprimiu-se as etapas de incubação com metanol e revelação. Isso torna o método também mais seguro por evitar contato com a diaminobenzidina uma substância comprovadamente neurotóxica.

A revelação da marcação é outra importante modificação por permitir a quantificação da emissão do criptato acrescentando mais informações ao analista para um diagnóstico mais completo e menos subjetivo. Através de uma curva de calibração, é possível um diagnóstico quantitativo do tecido analisado.

Resultados

Seguindo o protocolo de conjugação já estabelecido [73], e adotando a metodologia citada anteriormente (série **ai**), incubou-se o tecido de mama (carcinoma ductal infiltrante) com o conjugado Con A-criptato. Realizou-se então o primeiro teste de histoquímica com a lectina marcada com um criptato de lantanídeo.

O gráfico da Figura 4.2 ilustra o resultado obtido após excitação da amostra (aderida em lâmina de vidro) em 310 nm e monitoramento de emissão na região de 400 a 600 nm. A curva em preto revela que o tecido analisado não apresenta emissão detectável nessa região. Na curva em verde, onde tem-se o tecido marcado com a Con A-criptato de Térbio, é possível a identificação das transições atribuídas ao íon metálico. Devido à ausência de filtro apropriado, que permitisse eliminar a interferência do segundo harmônico da lâmpada (fonte de excitação) não foi possível monitorar a transição $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$

(620 nm). Mais experimentos serão realizados no intuito de identificar a origem do sinal com máximo aparente em 400 nm, analisando também tecidos marcados com lectinas sem o criptato.

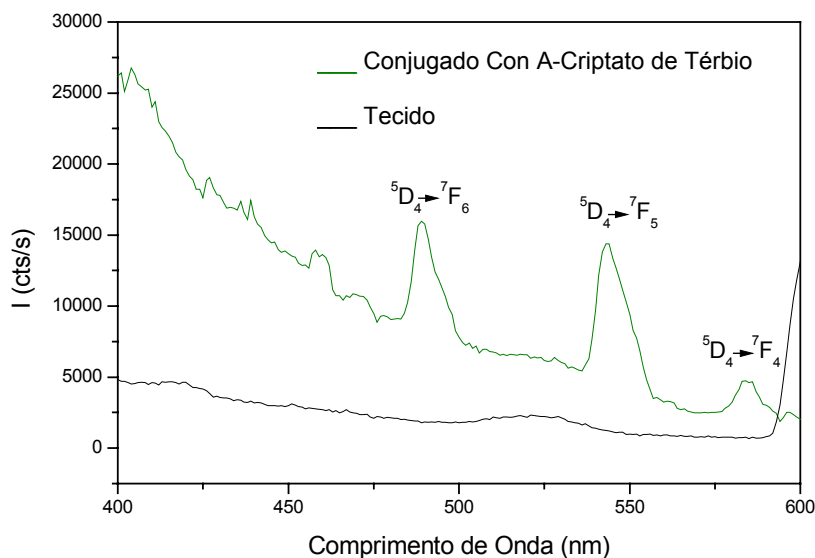


Figura 4.2: Espectro de luminescência do tecido anormal de mama em lâmina de vidro (curva preta) e do tecido extraído da mesma amostra, também depositado em lâmina de vidro, marcado com o conjugado Con A-criptato de térbio.

Ainda vislumbrando a otimização da aquisição de dados do método em desenvolvimento, está sendo projetado um sistema de detecção portátil, que quantifica a emissão do íon lantanídeo em áreas previamente estabelecidas no tecido analisado.

Os primeiros resultados obtidos sugerem a viabilidade do emprego dos criptatos de lantanídeos como marcadores nos testes histoquímicos propostos, impulsionando a criação de um novo grupo multidisciplinar de pesquisa, intitulado *Núcleo Interdisciplinar de Aplicações Biotecnológicas*.

4.2-DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE MICROCISTINA-LR EM ÁGUA

Ficou claro na sessão 1.6 do capítulo 1 a importância do desenvolvimento de novos métodos que permitam a determinação de microcistinas em água. Trabalhando em conjunto com o doutorando do Curso de Ciências Biológicas Eduardo Alécio, planejou-se um método de dosagem imunológica, por competição (sessão 1.3.2 do capítulo 1) onde uma amostra de microcistina-LR produzida em laboratório foi conjugada ao criptato de térbio (**10**).

Consultando metodologia descrita na literatura [61] foi possível conjugar o criptato à toxina em duas etapas: a primeira envolve a funcionalização da microcistina a uma molécula de aminoetanotiol e sua purificação através da técnica HPLC. A segunda etapa consistiu na adição do criptato e conjugação propriamente dita. A purificação do produto final foi efetuada também via HPLC. A Figura 4.3 representa de maneira simplificada a obtenção do produto final [87].

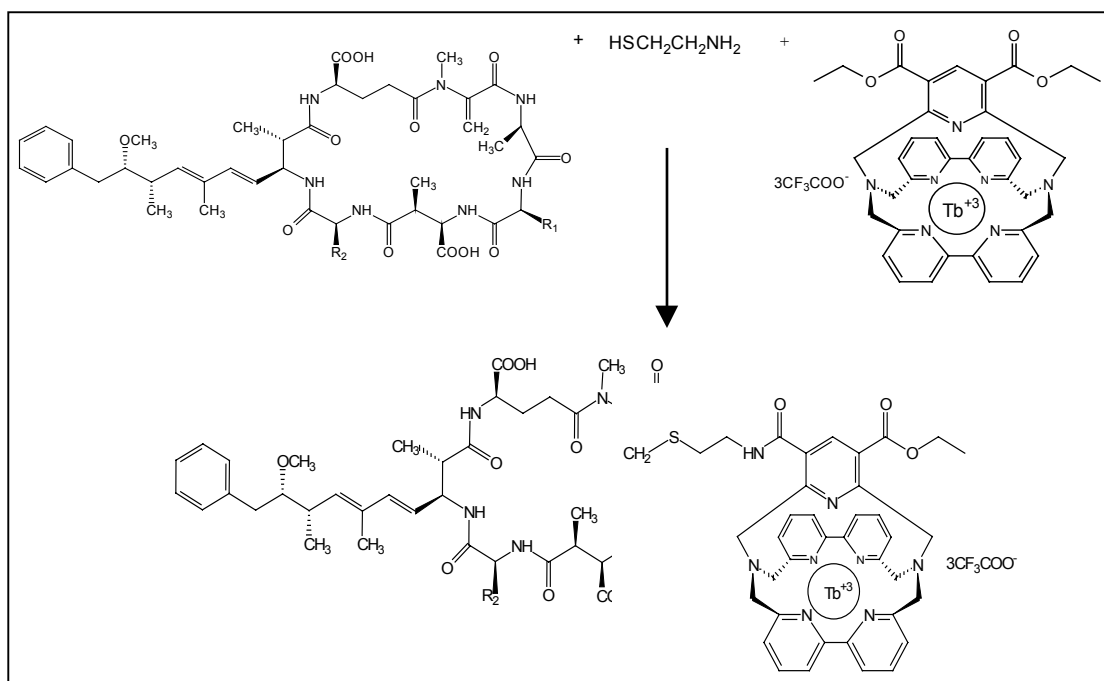


Figura 4.3: Esquema simplificado do processo de conjugação da amostra de microcistina-LR ao criptato de Tb³⁺

Resultados

O acompanhamento da reação de conjugação foi feito através de injeção dos reagentes em separado e após o início da reação, no HPLC [87]. Nenhum pico é observado quando injeta-se 50 μ L do tampão bicarbonato (empregado na reação de conjugação) ou do aminoetanotiol (reagente da conjugação) em coluna analítica durante corrida gradiente, e monitora-se o cromatograma nos comprimentos de onda e 238 nm e 310 nm.

O padrão de microcistina-LR pura apresenta um pico único, em 238 nm (máximo da banda de seu espectro de absorção no UV-vis), com tempo de retenção de 22,6 minutos. Em 310 nm nenhum pico referente a essa amostra é observado.

A injeção de uma mistura de partes iguais do padrão da microcistina-LR e da reação de funcionalização da toxina com aminoetanotiol (após 1h, a 50°C) produziu um cromatograma com dois picos, quando monitorado em 238 nm: um com tempo de retenção 22,6 minutos (pico **2**) e outro com 21,5 minutos (pico **1**), como pode ser observado na Figura 4.4. A injeção em separado da reação da toxina com aminoetanotiol (após 24h do início da reação) confirma o surgimento de um único pico, em 21,5 minutos.

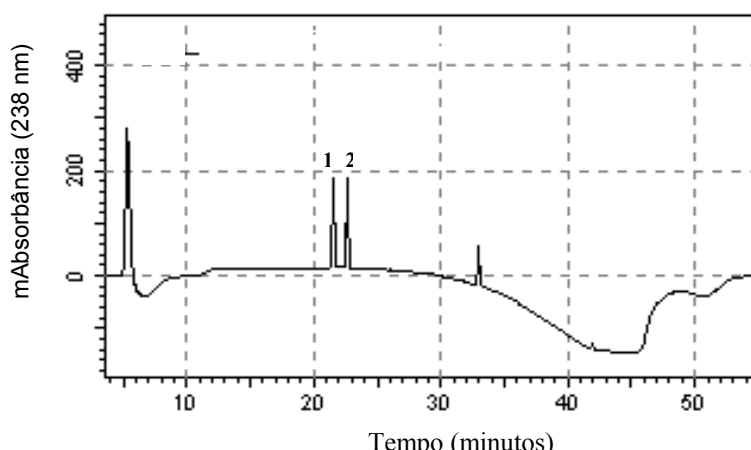


Figure 4.4: Cromatograma, em gradiente de fase reversa no HPLC, da mistura do padrão de microcistina-LR (pico **2**) e da reação com aminoetanotiol (pico **1**). Monitoramento em 238 nm.

Nessas condições de trabalho, o criptato de Tb^{3+} (**10**) dissolvido em tampão $NaHCO_3$ apresenta um pico principal com tempo de retenção de 18,6 minutos, tanto em 238 nm quanto em 310 nm. Este mesmo pico pôde ser observado no início da reação de conjugação do criptato à microcistina-LR-aminoetanotiol (Figura 4.5), bem como o

surgimento de um pequeno pico com tempo de retenção de 15,9 minutos, nos dois comprimentos de onda monitorados.

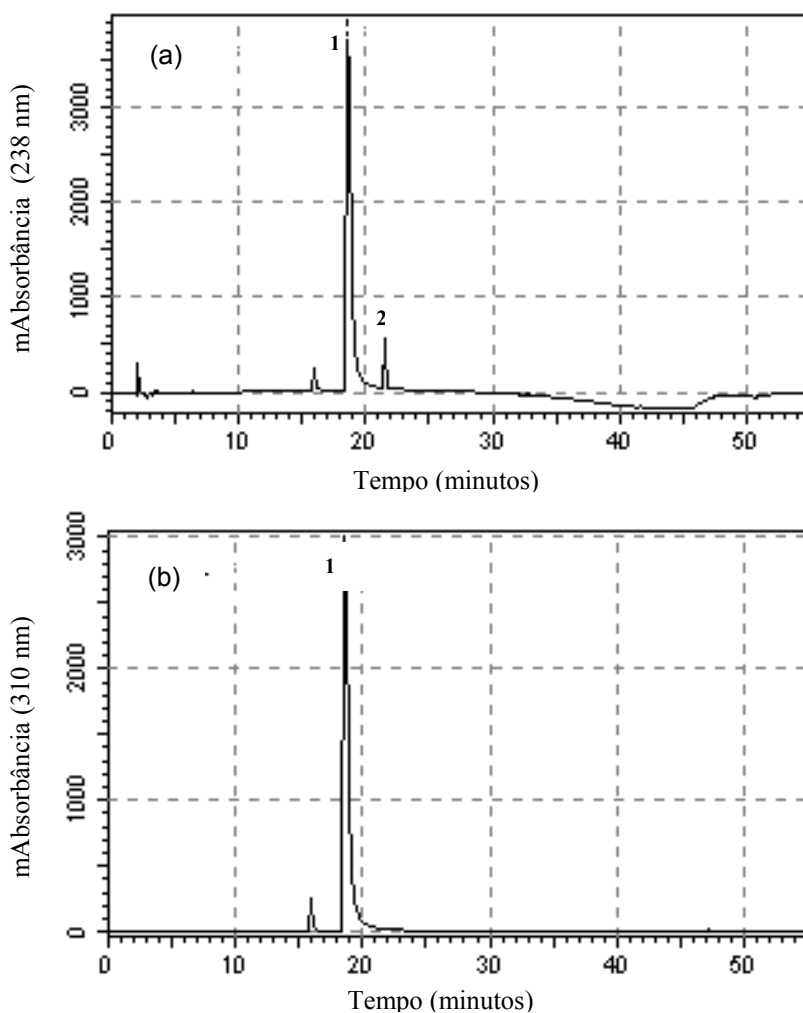


Figure 4.5: Cromatogramas, em gradiente de fase reversa no HPLC, no início da reação de conjugação do criptato de Tb^{3+} à microcistina-LR-aminoetanotiol, em 238 nm (a) e 310 nm (b): (1) criptato de Tb^{3+} e (2) microcistina-LR-aminoetanotiol.

Após 24 horas de reação, observa-se o aumento da intensidade do pico com tempo de retenção de 15,9 minutos e a diminuição de intensidade do pico do criptato (18,9 minutos) como ilustrado na Figura 4.6.

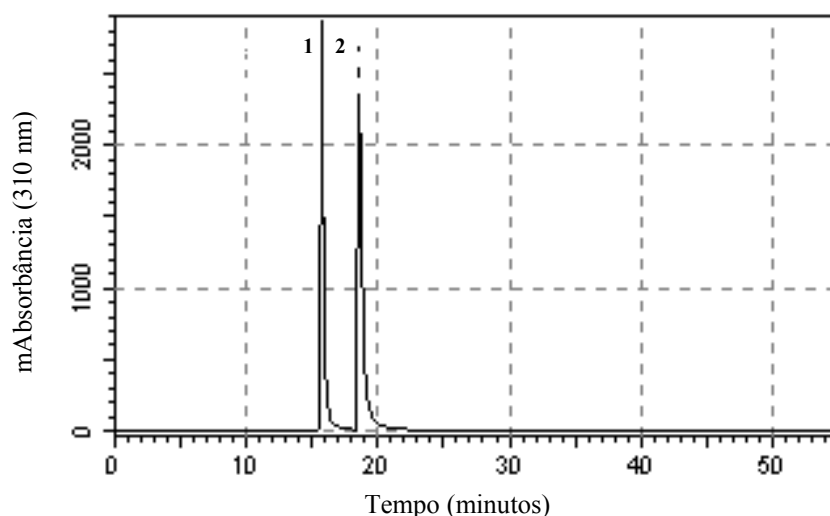


Figure 4.6: Cromatograma, em gradiente de fase reversa no HPLC, ao final de 24 horas da reação de conjugação do criptato de Tb^{3+} à microcistina-LR-aminoetanotiol, em 310 nm: (1) conjugado microcistina-LR-criptato de Tb^{3+} e (2) criptato de Tb^{3+} .

A espectroscopia de luminescência (Figura 4.7) para a fração do conjugado (15,9 minutos) recolhida após purificação via HPLC é característica do íon Tb^{3+} , sendo um indicativo do sucesso da conjugação.

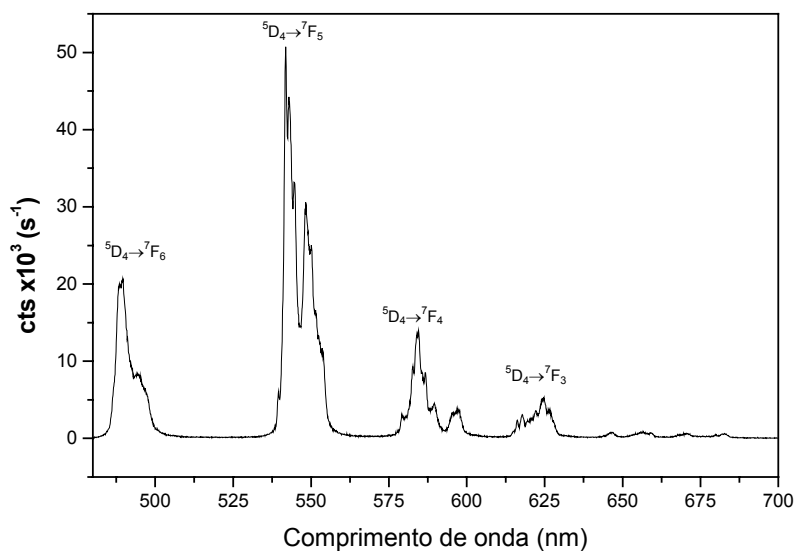


Figure 4.7: Espectro de emissão do conjugado microcistina-LR-criptato de Tb^{3+} , exibindo as transições características do íon metálico. O comprimento de onda de excitação foi de 310 nm.

Através de um ensaio ELISA comercial, é possível a determinação de toxinas diversas, alguns pesticidas, além de serem bastante sensíveis para a detecção de microcistina-LR. Obteve-se por essa técnica a confirmação da presença da microcistina-LR na amostra com tempo de retenção 15,9 minutos. A curva apresentada na Figura 4.8 mostra um bom coeficiente de correlação ($r = 0.9346$) no intervalo de 0,16 $\mu\text{g/L}$ até 10,0 $\mu\text{g/L}$. A fração do conjugado, diluída na proporção de 1:10 apresentou 43,3% de resposta de inibição de anticorpo, enquanto a fração do criptato de Tb^{3+} puro não promoveu qualquer inibição detectável.

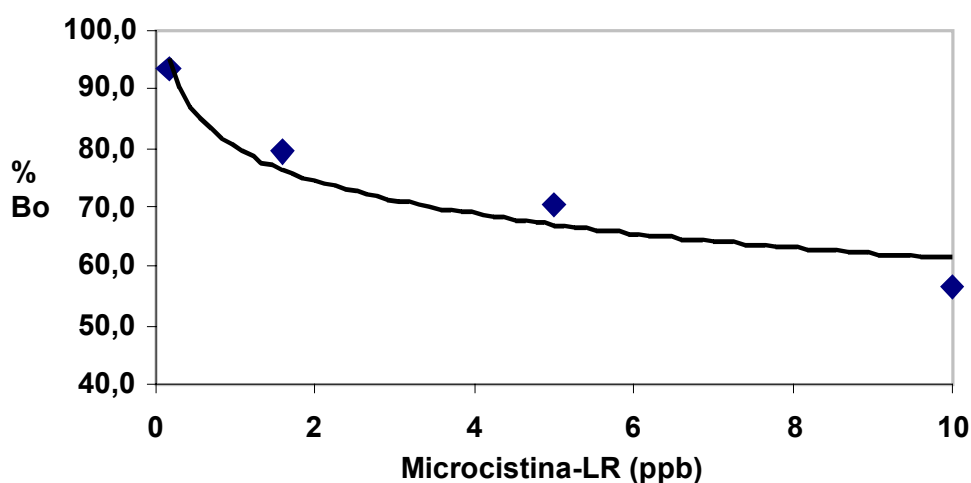


Figure 4.8: ELISA competitivo indireto para uma amostra padrão de microcistina-LR, empregando anti-microcistina-LR-KHL IgG.

A fração do conjugado foi submetida também a um teste de dosagem protéica, com ácido bicinônico, e apresentou resultado positivo. O mesmo não foi observado para uma amostra de criptato puro. Este método é sensível a estruturas que possuam quatro ou mais resíduos de aminoácidos, e como a microcistina-LR possui sete em sua estrutura, é adequado para analisar sua presença.

Tendo obtido esses resultados preliminares, a etapa seguinte será a produção de mais amostra do conjugado microcistina-LR-criptato para a obtenção de quantidade suficiente para a aquisição de um espectro de massas, e a partir dessa amostra bem caracterizada, empregá-la em testes reais e comparar seu desempenho em relação aos métodos já existentes.

Capítulo 5: Conclusões e perspectivas

5.1- CONCLUSÕES

- Foram sintetizados os criptatos do tipo: $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ e $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2]^{3+}$ onde $\text{Ln}=\text{Eu}^{3+}$, Tb^{3+} e Gd^{3+} . O método de acompanhamento das sínteses e purificação destes via HPLC mostrou-se eficiente e reprodutível. Os criptatos apresentaram-se como sólidos solúveis em água e solventes orgânicos como metanol, etanol e acetonitrila.
- As estruturas dos ligantes e criptatos sintetizados foram determinadas a partir dos espectros vibracionais na região do infravermelho, dos espectros de massa e dos espectros de ressonância magnética nuclear.
- A coordenação dos íons lantanídeos aos criptatos foi sugerida pelos espectros eletrônicos de absorção UV-visível e espectros vibracionais na região do IV. A mudança do tempo de retenção do criptato de lítio para os criptatos de lantanídeos, via HPLC, confirma a mudança do íon metálico encapsulado.
- Os espectros de emissão dos criptatos, em H_2O e D_2O , foram obtidos através da excitação das amostras em 320 nm. Analisando as transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$, $J=0,1,2,4$, atribuiu-se ao criptato de Eu^{3+} a simetria pontual do tipo C_3 .
- Os estudos espectroscópicos mostraram que o criptato $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ tem maior rendimento quântico de emissão ($q=25\%$) quando comparado com o criptato de Eu^{3+} ($q=14\%$). Este fato foi atribuído a uma melhor transferência de energia $\text{T} \rightarrow ^5\text{D}_4$ para o criptato de Tb^{3+} do que $\text{T} \rightarrow ^5\text{D}_0$ para o criptato de Eu^{3+} .
- Conjugou-se os criptatos $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2]^{3+}$ onde $\text{Ln} = \text{Eu}^{3+}$ e Tb^{3+} à lectina Con A, empregando-se quatro metodologias diferentes: através das cadeias laterais (dos resíduos de aminoácidos) que possuem função terminal amina ou amida (série **a**); através dessas mesmas cadeias porém inibindo o sítio de reconhecimento a carboidratos da lectina antes da conjugação (série **ai**); através das cadeias laterais (dos resíduos de aminoácidos) que possuem função terminal

carboxílica (série **c**) e através dessas cadeias após inibição do sítio de reconhecimento a carboidratos da lectina (série **ci**).

- O conjugado Con A-criptato foi caracterizado e analisado através de cromatografia por exclusão de tamanho; dicroísmo circular; fluorescência e fosforescência da proteína; atividade hemaglutinante. Estas técnicas permitiram constatar a aparente manutenção das estruturas secundária e terciária da lectina após a conjugação.
- As medidas espectroscópicas das séries **a**, **ai**, **c** e **ci** permitiram inferir sobre o grau de conjugação do criptato à Con A. A atividade hemaglutinante após as conjugações foi mantida.
- Empregou-se o $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2]^{3+}$ conjugado à Con A em um teste histoquímico, onde o criptato atuou como marcado luminescente. O conjugado foi incubado a um tecido de mama (carcinoma ductal infiltrante, aderido em lâmina de vidro) que posteriormente foi submetido a uma análise espectroscópica de luminescência, onde foi possível visualizar transições características do íon Tb^{3+} .
- A partir da conjugação do criptato $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2]^{3+}$ a uma amostra padrão de microcistina-LR, almejou-se um novo método de detecção desta toxina em água.
- Estudos espectroscópicos da amostra microcistina-LR-criptato de Tértio reproduzem o espectro de emissão do íon metálico. A dosagem protéica detectou a presença da microcistina-LR e o teste ELISA, confirmou a presença da toxina, sugerindo a integridade da sua região antigênica.

5.2- PERSPECTIVAS

Visando a continuidade deste trabalho, as perspectivas a serem concretizadas em um futuro próximo são descritas abaixo:

- Concluir as sínteses e caracterizações dos criptatos N-O propostos no capítulo 2, bem como desenvolver todo o estudo fotofísico deles;
- Desenvolver outro método de conjugação do criptato à Con A, via cadeias aminas e amidas. Primeiro o criptato reagirá com o glutaraldeído e só após purificação será conjugado à lectina. Desta forma, será possível avaliar as séries **a** e **ai** sem a interferência das possíveis conjugações através das cadeias carboxílicas presentes em outros resíduos de aminoácidos;
- Concluir e analisar os espectros de EPR das amostras conjugadas por diferentes metodologias, visando o mapeamento do sítio de complexação do íon Mn^{2+} na Con A, a fim de obter informações sobre a manutenção da vizinhança próxima do sítio de reconhecimento a carboidratos da lectina;
- Submeter as amostras conjugadas Con A-criptato a uma titulação calorimétrica, para concluirmos quantitativamente a manutenção ou perturbação do sítio de reconhecimento a carboidratos da lectina, nas diferentes séries de conjugações desenvolvidas;
- Adaptar um monocromador a um microscópio com lâmpada UV-vis para a aquisição de espectros de luminescência das amostras analisadas durante os testes de histoquímica que empreguem o conjugado Con A-criptato;
- Reprodução em maior escala da conjugação da toxina microcistina-LR ao criptato de Tb^{3+} , para obtenção de quantidade de amostra suficiente para a aquisição de um espectro de massas.

- Desenvolver testes em amostras de água, reproduzindo situações reais, para avaliar a eficiência do conjugado microcistina-LR-criptato em relação aos métodos já existentes.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] a) Carnal, W. T. In: Gshneidner Jr, K. A., Eyring, L., Eds. *Handbook on the Physics and Chemistry. of Rare Earths*. North-Holland Publishing Company: Amsterdam, 1979. Cap. 24, p 171; b) Thompson, L. C., *Complexes. ibict*. Cap. 25, p 209; c) Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988; d) Jones, C. J.; *A Química dos Elementos dos Blocos d e f*, Bookman: Porto Alegre, 2002; e) Werst, M. H. V.; *Luminescent Lanthanide Complexes _ Visible light sensitised red and near-infrared luminescence*, Universal Press: Veenendaal, 2000.
- [2] Blasse, G.; Grabmaier, B. C. *Luminescent Materials*, Springer-Verlag: Berlim, 1994.
- [3] a) Judd, B. R. *Phys. Rev.* **1962**, 127, 750; b) Jorgensen, C. K.; Judd, B. R. *Mol. Physical* **1964**, 8, 281; c) Malta, O. L.; de Sá, G. F. *Phys. Rev. Lett.* **1980**, 45, 890; d) Malta, O. L. *Chem. Phys. Lett.* **1982**, 87, 27.
- [4] Kittle, S. F. A. *Coordination Compounds* Ed. London, 1969.
- [5] Allinger, N. L.; Cava, M.P.; Jongh, D. C. D.; Johnson, C. R.; Lebel, N. A.; Stevens, C. L. *Organic Chemistry*, 2^o ed., 1976, p617-619.
- [6] a) Mathis, G.; Socquet, F.; Viguier, M.; Darbouret, B. *Anticancer Research* **1997**, 17, 3011; b) Alpha-Bazin, B.; Bazin, H.; Boissy, L.; Mathis, G. *Analytical Biochemistry* **2000**, 286, 17.
- [7] Gameiro, C. G.; da Silva Jr., E. F.; Alves Jr., S.; de Sá, G. F.; Santa-Cruz, P. A. *Journal Alloys Compounds* **2001**, 323-324, 820.
- [8] a) Lehn, J. -M. *Angew. Chem. Inter., Ed. Engl.* **1990**, 29, 1304, b) Alpha, B.; Ballardini, R.; Balzani, V.; Lehn, J.-M.; Perathoner, S.; Sabbatini, N. *Photochem. and Photobiol.* **1990**, 52 (2), 299.
- [9] Bünzli, J. C. G. *Lanthanides Probes in Life*, Chemical and Earth Sciences, Elsevier, 1979, ch. 7.
- [10] Weber, M. J. In: Gshneidner Jr, K. A.; Eyring, L., Eds. *Handbook on the Physics and Chemistry. of Rare Earths*. North-Holland Publishing Company: Amsterdam, 1979. Cap. 35, p 275.
- [11] Pyo, S. W.; Lee, S. P.; Lee, H. S.; Kwon, O. K.; Hoe, H. S.; Lee, S. H.; Ha, Y. -K.; Kim, Y. K.; Kim, J. S. *Thin Solid Films* **2000**, 363, 232.

- [12] a) Crosby, G. A.; Kasha, M. *Spectrochim. Acta* **1958**, *10*, 377; b) Crosby, G. A.; Whan, R. E.; Alire, R. M. *J. Chem. Phys.* **1961**, *34*, 743; c) Crosby, G. A.; Whan, R. E.; Freeman, J. J. *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 2493.
- [13] a) Lehn, J. -M. *Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspectives*, VHC-Weinheim: New York, 1995; b) Vögtle, F. *Supramolecular Chemistry: an introduction*, Wiley: Chichester, 1993, c) Beer, P. D.; Gale, P. A.; Smith, D. K. *Supramolecular Chemistry*, Oxford University Press. Inc.: New York, 1999, d) Constable, E. C. *Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds*, Oxford University Press. Inc.: New York, 1999.
- [14] Lehn, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89.
- [15] a) Mathis, G. *Clin. Chem.* **1993**, *39* (9), 1953; b) Mathis, G. *Clin. Chem.* **1995**, *41* (9), 1391.
- [16] a) Richardson, F. S. *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 541, b) Bryden, C. C.; Reilley, C. N. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 610, c) Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 19, d) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293.
- [17] a) Dickson, E. F. G.; Pollak A.; Diamandis, E. P. *J. of Photochem. and Photobio. B: Biology* **1995**, *27*, 3, b) Dickson, E. F. G.; Pollak A.; Diamandis, E. P. *Pharmac. Ther.* **1995**, *66*, 207.
- [18] a) Liu, S.; Edwards, D. S. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 7, b) Reicheit, D. E.; Welch, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *212*, 111.
- [19] a) Pietraszkiewicz, M.; Karpiuk, J.; Gasiorowski, R.; Pietraszkiewicz, O.; Rout, A. K. *Acta Physica Polonica A* **1996**, *90*, 207, b) Peterson, J. J.; Pak R. H.; Meares, C. F. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 310.
- [20] a) Kawasaki, N.; Lee, Y. C. *Anal. Biochem.* **1997**, *250*, 260; b) Youn, H. J.; Terpetschinig, E.; Szamacinski, M.; Lakowicz, J. R. *Anal. Biochem.* **1995**, *232*, 24.
- [21] Yao, F.-Jr.; Ge, Q.; Zhon, H.-Q.; Hong, M.; Ci, Y.-X. *Microchemical Journal* **1997**, *55*, 326.
- [22] Takahashi, M.; Hara, Y.; Slume, K. A.; Kurihasa, H.; Oshikawa; T.; Yamashita, M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8485.
- [23] a) Sabbatini, N.; Dellonte, S.; Ciano, M.; Bonazzi, A.; Balzani, V. *Chem. Phys. Lett.* **1984**, *107* (2), 212, b) Sabbatini, N.; Dellonte, S.; Blasse, G. *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *129*

- (6), 541, c) Blasse, G.; Dirksen, G. R.; Van Der Voort, D.; Sabbatini, N.; Perathoner, S.; Lehn, J.-M.; Alpha, B. *Chem. Phys. Lett.* **1988**, 146 (3,4), 347.
- [24] Desreux, J. F.; Renard, A.; Duyckaerts, G. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1977**, 39, 1587.
- [25] a) Fujita, E.; Brunschwig, B. S.; Ogata, T.; Yanagida, S. *Coord. Chem. Rev.*, **1994**, 132, 195; b) Fujita, E.; Creutz, C.; Sutin, N.; Szalda, D. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113 (1), 343.
- [26] a) Wang, Z.; Martell, A. E.; Motekaitis, R. J. *Chem. Comm.* **1998**, 15, 1523; b) Nabeshima, T.; Aoki, T.; Yano, Y. *Tetra. Lett.* **1997**, 38 (48), 8323.
- [27] Platas, C.; Avecilla, F.; de Blas, A.; Rodriguez-Blas, T.; Bunzli, J. C. G. *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.* **1999**, 11, 1763.
- [28] Vogtle, F.; Hochberg, R.; Kochendorfer, F.; Windscheif, P. M.; Volkmann, M.; Jansen, M. *Chemische Berichte* **1990**, 123 (11), 2181.
- [29] Safarowsky, O.; Windish, B.; Mohry, A.; Vogtle, F. *Journal Fur Praktische Chemie-Practical applications and Applied Chemistry* **2000**, 342 (5), 437.
- [30] Li, Q. Y.; Vogel, E.; Parhan, A. H.; Nieger, M.; Bolte, M.; Frohlich, R.; Saarenketo, P.; Rissanen, K.; Vogtle, F. *Eur. Jour. of Org. Chem.* **2001**, 21, 4041.
- [31] Osswald, F.; Vogel, E.; Safarowsky, O.; Schwanke, F.; Vogtle, F. *Adv. Synthesis & Catalysis* **2001**, 343 (3), 303.
- [32] a) Fujita, M.; Ogura, G. *Bull. of the Chem. Soc. of Japan* **1996**, 69(6) 1471; b) Fujita, M.; Ogura, K. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, 148, 249.
- [33] Enomoto, K.; Araki, A.; Nakajima, T.; Ohta, H.; Dohi, K.; Preaudat, M.; Seguin, P.; Mathis, G.; Suzuki, R.; Kominami, G.; Takemoto, H. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, 28 (1), 73.
- [34] a) Brunet, E.; Alonso, M. T.; Juanes, O.; Velasco, O.; Rodríguez-Ubis, J.-C. *Tetrahedron* **2001**, 57, 3105; b) Alonso, M. T.; Brunet, E.; Juanes, O.; Rodríguez-Ubis, J.-C. *J. Photochem. and Photobiol. A: Chemistry* **2002**, 147, 113.
- [35] Alexander, V. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 273.
- [36] Galaup, C. *Tese de Doutorado*, Université Paul Sabatier de Toulouse – França, 1997.
- [37] Alpha, B.; Auklam, E.; Deschenaux, R.; Lehn, J.-M.; Pietraskiewicz, M. *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 1042.
- [38] Dumont, A.; Jacques, V.; Desreux, J. F. *Tetrahedron* **2000**, 56, 2043.
- [39] Azéma, J.; Galaup, C.; Picard, C.; Tisnès, P.; Ramos, P.; Juanes, O.; Rodríguez-Ubis, J.-C.; Brunet, E. *Tetrahedron* **2000**, 56, 2673.

- [40] a) Geiseler, D.; James, W. *Rev. Bras. Anal. Clín.* **1992**, 24 (3), 61; b) Ekins, R. P. *Clin. Chem.* **1998**, 44 (9), 2015, c) Gil, E. de S.; Kubota, L. T.; Yamamoto, Y. I. *Química Nova* **1999**, 22 (6), 874.
- [41] a) Diamandis, E. P. *Clin. Biochem.* **1988**, 21, 139; b) Richau, M. E. N. K. W.; Boni, L. T.; Pflug, L. E.; Robb, R. J.; Popescu, M. C. *Cytokine* **2000**, 12 (11), 1702; c) Clarke, E. E.; Shearman, M. S. *J. of Neuroscience Methods* **2000**, 102, 61; d) Lee, B. H.; Chung, K. H.; Shin, H. S.; Park, Y. J.; Moon, H. J. *J. of Colloid and Interface Science* **1997**, 188, 439.
- [42] a) Lopez, E.; Chypre, C.; Alpha, B.; Mathis, G. *Clin. Chem.* **1993**, 39 (2), 196; b) Prat, O.; Lopez, E.; Mathis, G. *Anal. Biochem.* **1991**, 195, 283.
- [43] Mathis, G. *Immunoanal. Biol. Spéc.* **1996**, 11, 355.
- [44] Barondes, S. H. *Trends Biochem. Sci.* **1988**, 13, 480.
- [45] Boyd, W. C.; Shapleigh, E. *Science* **1954**, 119, 419.
- [46] a) Kennedy, J. F.; Palva, P. M. G.; Coerlla, M. T. S.; Cavalcanti, M. S. M.; Coelho, L. C. B. B. *Carbohydrate Polymers* **1995**, 26, 219, b) Sharon, N.; Lis, H. *The FASEB Journal* **1990**, 4, 3198.
- [47] <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA00E.html>, em Agosto de 2003.
- [48] Cavada, B. S.; Granjeiro, T. B.; Ramos, M. V.; Cordeiro, E. F.; Oliveira, J. T.; Moreira, R. A. R. *Bras. Fisiol. Veg.* **1996**, 8 (1), 31.
- [49] a) Kilpatrick, D. C. *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, 1572, 187, b) Loris, R. *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, 1572, 198.
- [50] Gabius, H. J.; André, S.; Kaltner, H.; Siebert, H.-C. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2002**, 1572, 165.
- [51] Rabinovich, G. A.; Rubinstein, N.; Toscano, M. A. *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, 1572, 274.
- [52] a) Hardman, K. D.; Ainsworth, C. F. *Biochemistry* **1972**, 11 (26), 4910, b) Deacon, A.; Gleishmann, T.; Gilboa, A. J. K.; Price, H.; Raftery, J.; Bradbrook, G.; Yariv, J.; Helliwell, J. R. *J. Chem. Soc, Faraday Trans* **1997**, 93 (24), 4305, c) Voet, D.; Voet, J. *Biochemistry* 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc: New York, 1995.
- [53] a) Beltrão, E. I. C.; Correia, M. T. S.; Figueredo-Silva, J.; Coelho, L. C. B. B. *App. Biochem. and Biotechnology* **1998**, 74, 125, b) Beltrão, E. I. C.; Amaral, T.; Silva, J. F.; Coelho, L. C. B. B.; Carvalho Júnior, L. B. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco* **2001**, 46 (1), 32, c) Beltrão, E. I. C.; Medeiros, P.

- L.; Rodrigues, O. G.; Silva, J. F.; Valença, M. M.; Coelho, L. C. B. B.; Carvalho Júnior, L. B. *European Journal of Histochemistry* **2003**, 47 (2), 139.
- [54] Campo, E.; Condom, E.; Palacín, A.; Quesada, E.; Cardesa, A. *Dis. Colon Rectum* 1988, **31**, 892.
- [55] Zambenedetti, P.; Giordano, R.; Zatta, P. *Experimental Neurology* **1998**, 153, 167.
- [56] Gottschalk, I.; Gustavsson, P.-E.; Ersson, B.; Lundahl, P. *Journal of Chromatography B* **2003**, 784, 203.
- [57] ComuniCampus On Line, nº91, Nov/2001, em Setembro de 2003 (<http://www.ufpe.br/ascom/cconline/017/pesq002.html>).
- [58] a) Danguy, A.; Camby, I.; Kiss, R. *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, 1572, 285, b) Nangia-Makker, P.; Conklin, J.; Hogan, V.; Raz, A. *TRENDS in Molecular Medicine* **2002**, 8 (4), 187.
- [59] a) Wolf, F. A.; Brett, G. M. *Pharmacological Reviews* **2000**, 52 (2), 207; b) Clark, M. A.; Hirst, B. H.; Jepson, M. A. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, 43, 207; c) Yamazaki, N.; Kojima, S.; Bovin, N. V.; André, S.; Gabius, S.; Gabius, H.-J. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, 43, 225.
- [60] a) An, J.; Carmichael, W. W. *Toxicon*, **1994**, 32(12), 1495; b) Harada, K.-I.; Ogawa, K.; Matsuura, K.; Nagai, H.; Murata, H.; Suzuki, M.; Itezono, Y.; Nakayama, N.; Shirai, M.; Kakano, M.; *Toxicon* **1991**, 29 (4/5) 479.
- [61] Mehto, P.; Ankelo, M.; Mikhailov, A.; Eriksson, J. E.; Spoof, L.; Meriluoto, J. *Toxicon* **2001**, 39, 831.
- [62] Lehn, J.-M.; Regnouf de Vains, J.-B. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2209.
- [63] Lehn, J.-M.; Pietraszkiewicz, M.; Karpiuk, J. *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 106.
- [64] March, J. *Advanced Organic Chemistry – Reactions, Mechanisms, and Structure*, Wiley Interscience: New York, 1992.
- [65] Miller, B. *Advanced Organic Chemistry: Reactions and Mechanisms*, Prentice-Hall: New Jersey, 1998.
- [66] Boekelheide, V.; Linn, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 1286.
- [67] Pachter, I. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 3026.
- [68] Rodríguez-Ubis, J. –C.; Alpha, B.; Plancherel, D.; Lehn, J. –M. *Helv. Chim. Acta* **1984**, 67, 2264.
- [69] Newkome, G. R.; Pappalardo, S.; Gupta, V. K.; Fronczek, F. R. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4848.

- [70] Richman, J. E.; Atkins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96 (7), 2268.
- [71] Atkins, T. J.; Richman, J. E.; Oettle, W. F. *Organic Syntheses*, **1978**, 58, 86.
- [72] Análise realizada no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, Universidade Estadual de Campinas, sob a supervisão do Prof. Dr. Marcos Eberlin. Equipamento Qtof Micromass : espectrômetro de massas híbrido com analisadores de massas quadrupolar. Resolução de 7.000 e exatidão de 5 ppm. A técnica foi a ionização por electrospray e para a análise de massas, foi utilizado o modo MS varrendo o TOF.
- [73] Avrameas, S.; Karsenti, E.; Bornes, M.; *Peroxidase-Concanavalina A Method: Application in Light and Electron Microscopy*. In: Brittiger, H.; Schnebli, H. P., Eds. *Concanavalina a as a Tool*. John Wiley and Sons: London, 1976. p 85-93.
- [74] Sabbatini, N.; Guardigli, M. *Coordination Chemistry Reviews* **1993**, 123, 201.
- [75] Galaup, C.; Carrié, M. -C.; Tisnès, P.; Picard, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2165.
- [76] Longo, R.; Silva, F. R. G.; Malta, O. L. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, 328, 67.
- [77] Galaup, C.; Picard, C.; Cathala, B.; Cazaux, L.; Tisnès, P.; Antiero, H.; Aspe, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 543.
- [78] Blasse, G.; Dirksen, G. J.; Sabbatini, N.; Perathoner, S.; Lehn, J. -M.; Alpha, B. *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 2419.
- [79] Donegá, C. M.; Alves-Júnior, S.; de Sá, G. F. *J. of Alloys and Compounds* **1997**, 250, 422.
- [80] Horrocks, W. W.; Sudinck, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 334.
- [81] Donegá, C. M.; Ribeiro, S.J. L.; Blasse, G. *J. Phys. Chem. Sol.* **1996**, 57, 1727.
- [82] Birll, A.; Jager-Veenis, W. *J. Res. Nat. Bureau Stand* **1976**, 80A, 401.
- [83] Latva, M.; Takalo, H.; Mikkala, V.-M.; Matachescu, C.; Rodríguez-Ubis, J. -C.; Kankare, J. *J. of Luminescence* **1997**, 75, 149.
- [84] Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Introdução aos métodos cromatográficos*, 7^a ed. Editora da UNICAMP: Campinas, 1997.
- [85] a) Kelly, S. M.; Price, N. C. *Biochimica et Biophysica Acta* **1997**, 1338, 161; b) Greenfield, N. J. *TRENDS in Analytical Chemistry* **1999**, 18 (4), 236, c) Nahanishi, K.; Belova, N.; Woody, R. W. *Circular Dichroism Principle and Applications*, VHC Publishers, Inc.: New York, 1994.
- [86] Lakovitz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic: New York, 1999.
- [87] Alécio, E. *Tese de doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2003.

Anexo I:

HPLC, IV, RMN-¹H

ANEXO I: CARACTERIZAÇÃO POR HPLC, IV e RMN-¹H

1-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography -HPLC*)

Todas as sínteses foram analiticamente monitoradas e purificadas via colunas analítica e semi-preparativa. Utilizou-se um gradiente com acetonitrina e água (acidificada com ácido trifluoroacético – *TFA*), pré-estabelecido (Tabela A.1) com a finalidade de reconhecer e otimizar os resultados obtidos.

Tabela A.1: Gradiente utilizado no monitoramento das reações.

Tempo (min.)	ACN (CH ₃ CN)	H ₂ O 1% TFA
0	15%	85%
5	15%	85%
35	100%	0
40	100%	0
45	15%	85%
50	15%	85%

O procedimento descrito nas Figuras AI.1-4 ilustra o acompanhamento da síntese do 2,6-dibrometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina (**1**) via HPLC, através da injeção de alíquotas (5µL) recolhidas durante a reação.

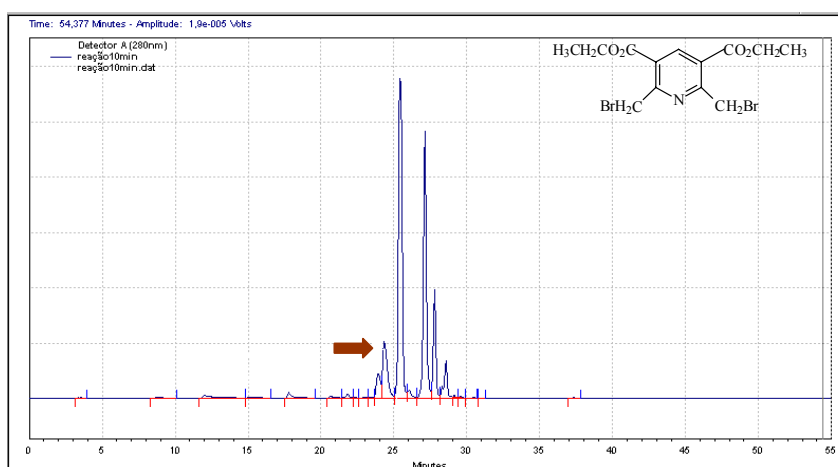


Figura AI.1: Acompanhamento da reação de bromação do 2,6-dimetil-3,5-dicarboxilato de etil piridina (capítulo 2, sessão 2.2, reação 1), após 10 minutos de refluxo. Percentagem de área sobre o pico de interesse=9%.

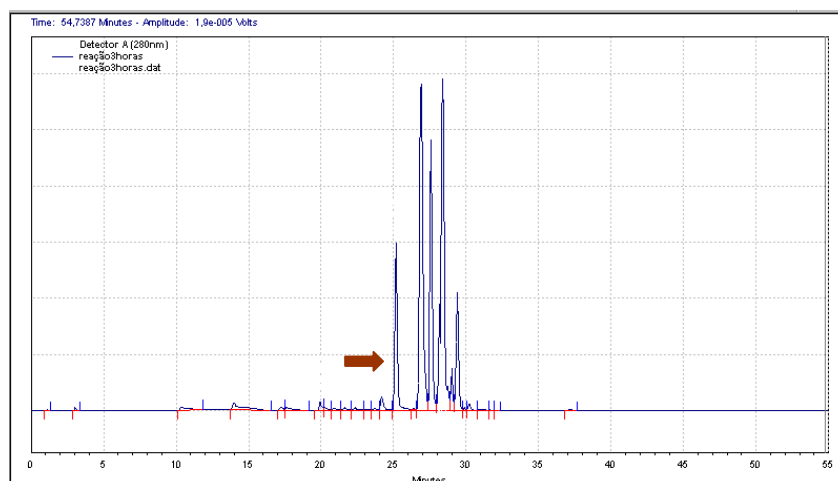


Figura AI.2: Acompanhamento da reação após 1 hora de refluxo. Percentagem de área sobre o pico de interesse=14%.

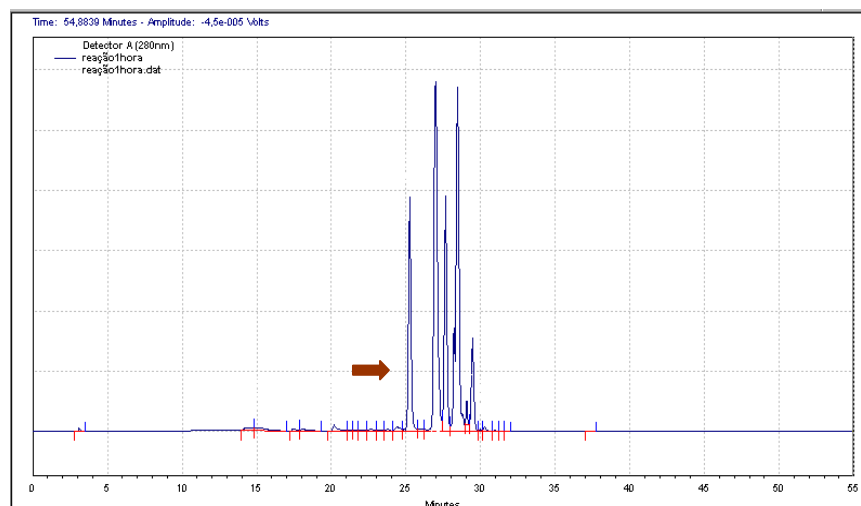


Figura AI.3: Acompanhamento da reação após 2 horas de refluxo. Percentagem de área sobre o pico de interesse=10%.

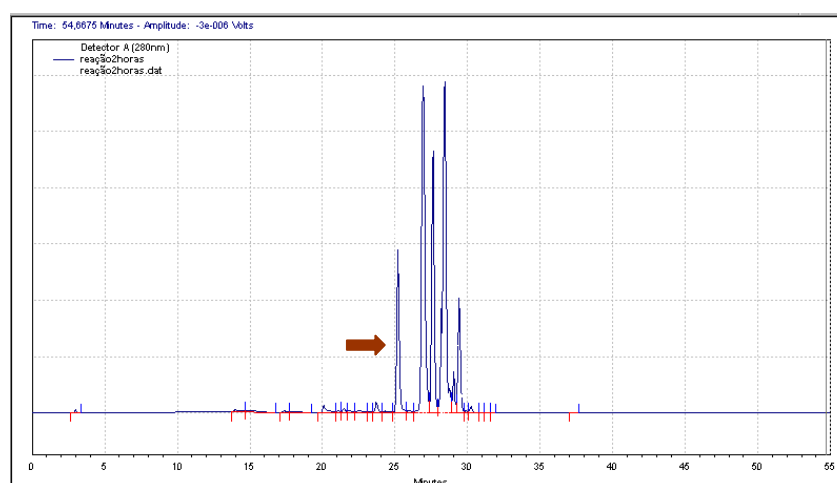


Figura AI.4: Acompanhamento da reação 1, após 3 horas de refluxo. Percentagem de área sobre o pico de interesse=10%.

Foi constatada a gradativa formação de **1** (capítulo 2, sessão 2.2, reação 1), com o decorrer do tempo. Após 1 hora de reação, a área referente ao pico do produto desejado diminui um pouco e após este intervalo de tempo, nenhuma outra alteração significativa pôde ser observada.

Os criptatos de Li^+ , Eu^{3+} , Gd^{3+} e Tb^{3+} (**7-13**), tiveram suas reações acompanhadas por HPLC (coluna analítica) e foram purificados no mesmo equipamento, utilizando-se uma coluna semipreparativa, e o gradiente descrito na Tabela AI.1. Neste caso, o fluxo foi aumentado em 5 vezes para compensar o tamanho da coluna empregada e devido a estas mudanças, os tempos de retenção dos produtos apresentam um pequeno deslocamento em relação aos tempos de retenção observados na coluna analítica. Todos estes valores encontram-se listados na Tabela AI.2.

Tabela AI.2: Tempos de retenção dos produtos.

Produtos	Tempo de retenção (em minutos)	Tempo de retenção (em minutos)
	Coluna analítica	Coluna semi-preparativa
Diésterdibromometilpy (1)	26,8 (Fig. AI.5)	31,3
Dimetilbipy (3)	4,6 (Fig. AI.6)	não injetado
Dibromometilbipy (4)	20,6 (Fig. AI.7)	não injetado
Bipy.bipy-ditos (5)	18,1 (Fig. AI.8)	não injetado
Bipy.bipy (6)	5,3 (Fig. AI.9)	não injetado
$[\text{Li}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (7)	13,5 (Fig. AI.10)	15,5
$[\text{Li}(\text{bipy})_2\text{py NO}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (8)	11,7 (Fig. AI.11)	14
$[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (9)	18,2 (Fig. AI.12)	20,3
$[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (10)	18,2 (Fig. AI.13)	19,9
$[\text{Gd}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (11)	18,1 (Fig. AI.14)	20,0
$[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)]^{3+}$ (12)	11,6 (Fig. AI.15)	14,1
$[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)]^{3+}$ (13)	11,4 (Fig. AI.16)	14,0

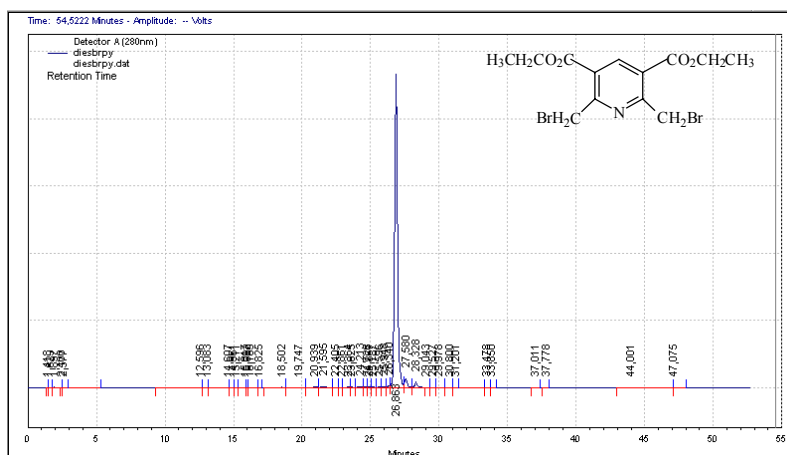


Figura AI.5: Cromatograma do diésterdibromometilpy (**1**), em coluna analítica.

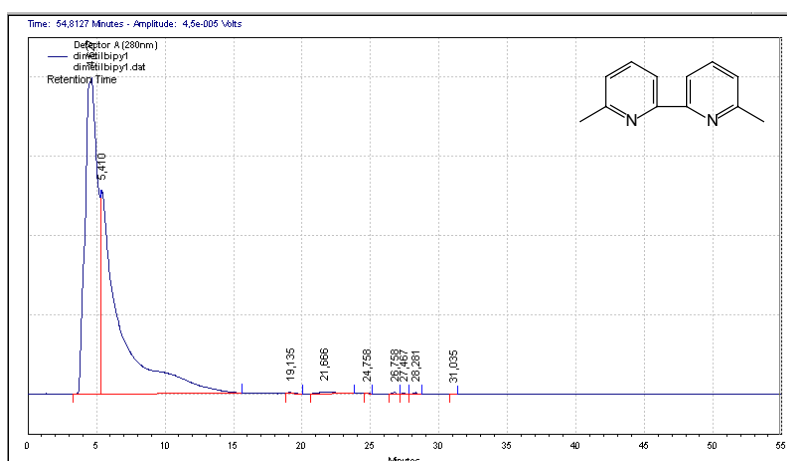


Figura AI.6: Cromatograma do 2,2'-dimetilbipiridina (**3**), em coluna analítica.

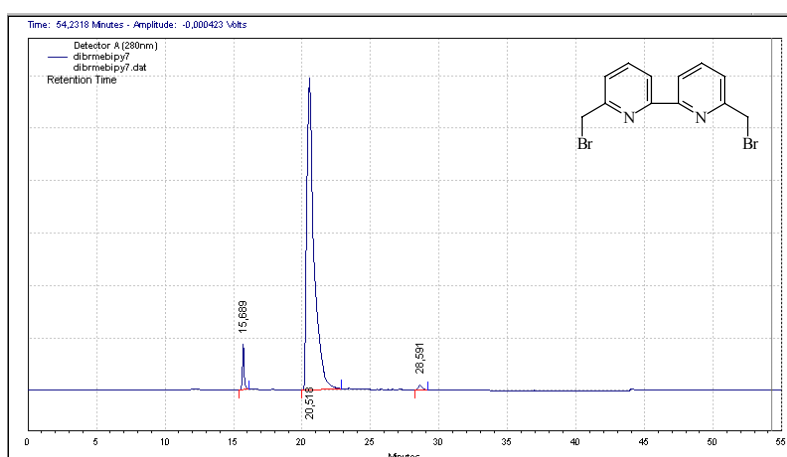


Figura AI.7: Cromatograma do 2,2'-dibromometilbipiridina (**4**), em coluna analítica.

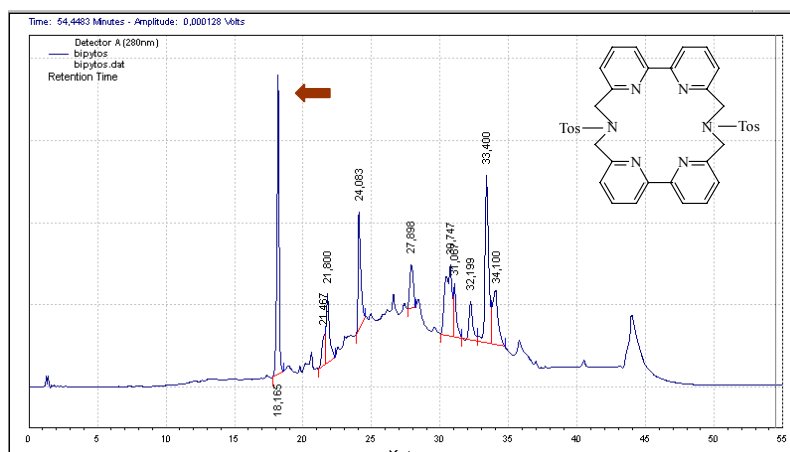


Figura AI.8: Cromatograma do acompanhamento da síntese do ditosil-bipy.bipy (5). A seta destaca o sinal do produto.

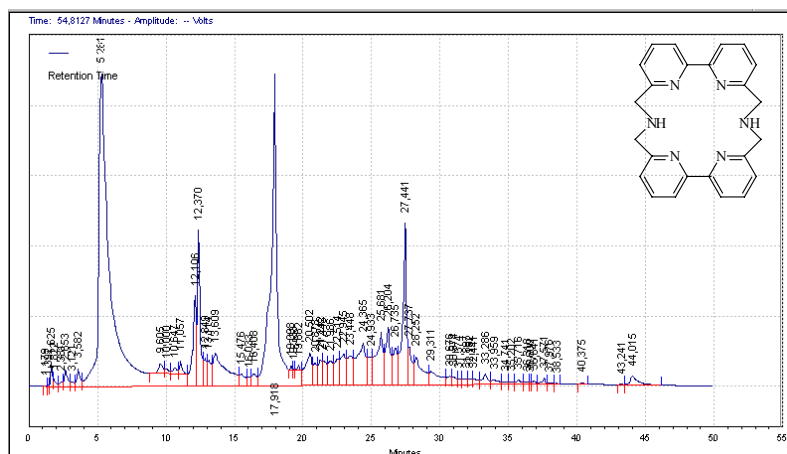


Figura AI.9: Cromatograma do bipy.bipy (6), em coluna analítica.

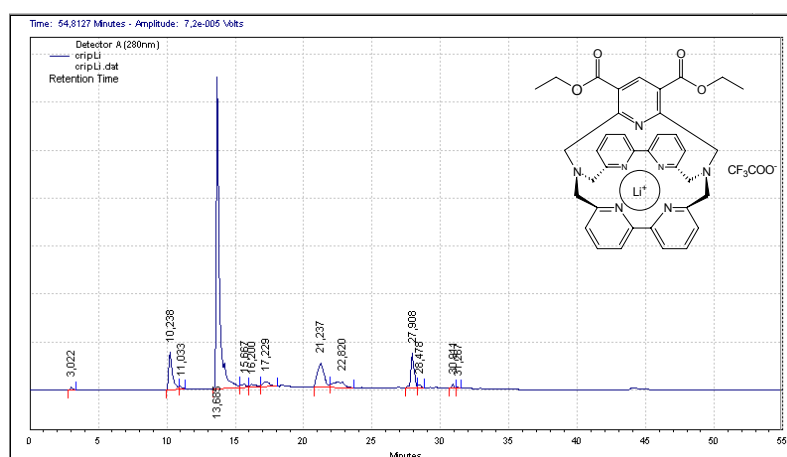


Figura AI.10: Cromatograma do criptato $[\text{Li}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (7).

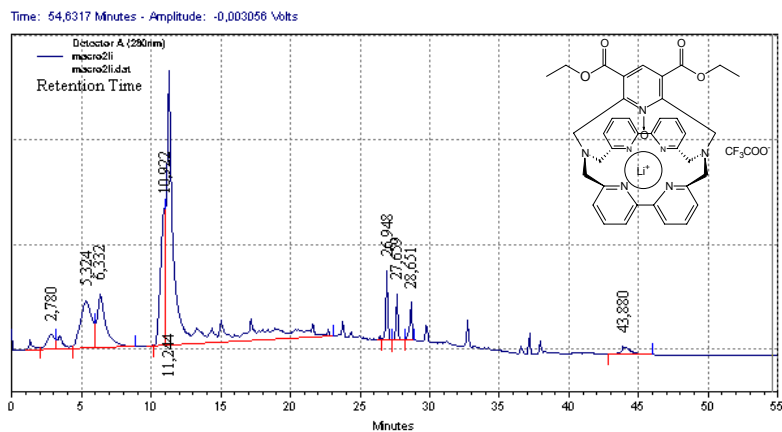


Figura AI.11: Cromatograma do criptato $[\text{LiC}(\text{bipy})_2\text{pyNO}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (**8**).

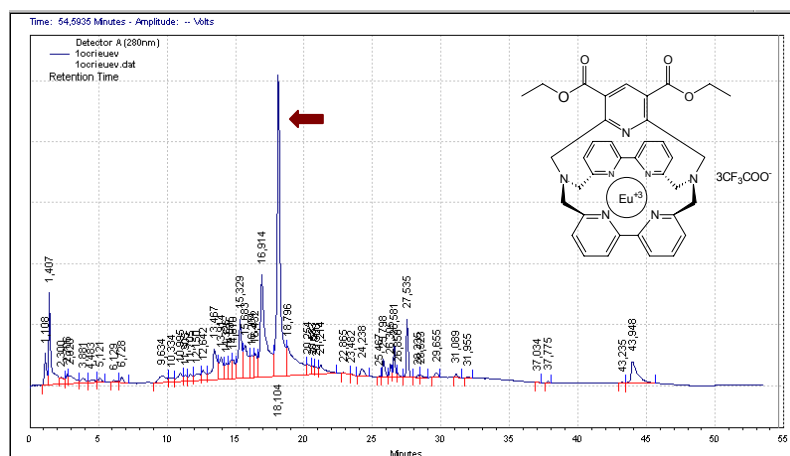


Figura AI.12: Cromatograma de acompanhamento da síntese do criptato $[\text{EuC}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (**9**).

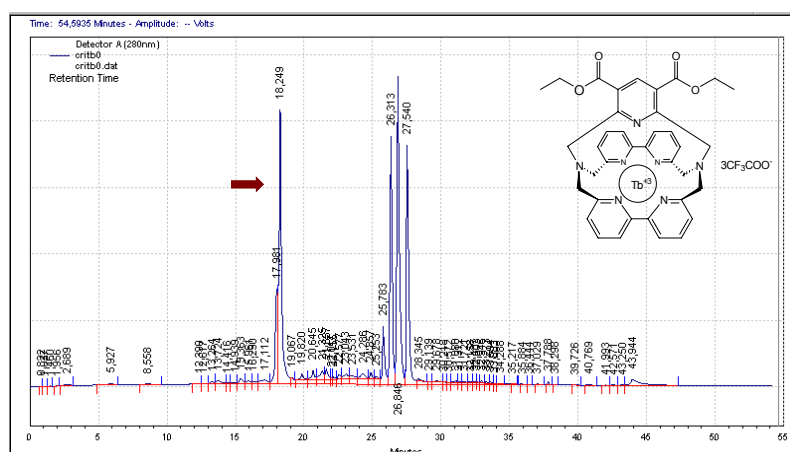


Figura AI.13: Cromatograma de acompanhamento da síntese do criptato $[\text{TbC}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (**10**).

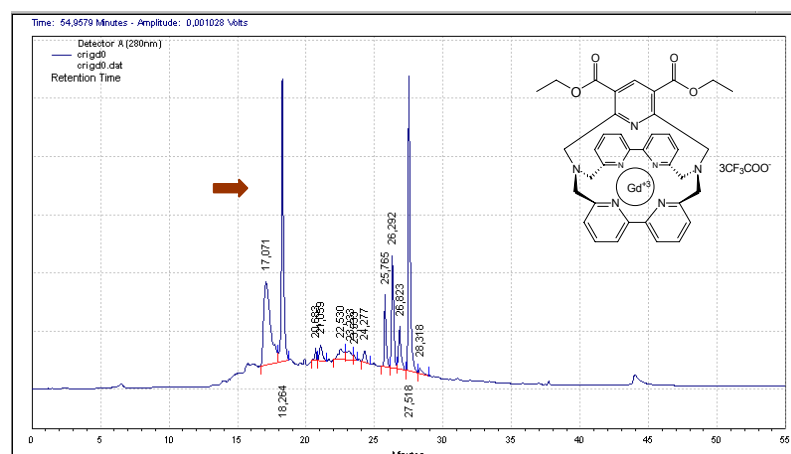


Figura AI.14: Cromatograma de acompanhamento da síntese do criptato $[\text{Gd}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (**11**).

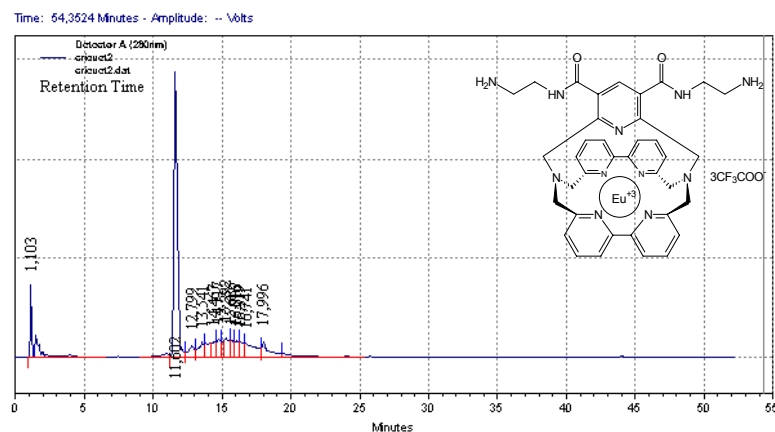


Figura AI.15: Cromatograma de acompanhamento da síntese do criptato $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_3]^{3+}$ (**12**).

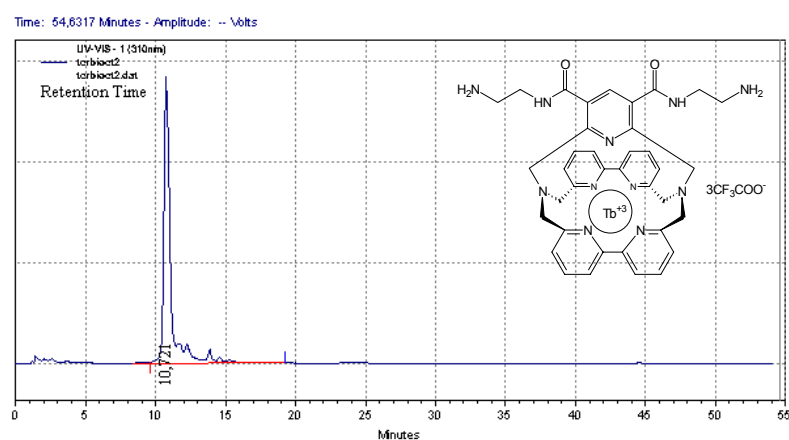


Figura AI.16: Cromatograma de acompanhamento da síntese do criptato $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_3]^{3+}$ (**13**).

O cromatograma do criptato **7** por exemplo, mostrado na Figura AI.10, apresenta 4 picos, onde o produto desejado corresponde ao pico de maior intensidade, com uma percentagem de área 62%. O rendimento final do produto, após purificação, foi de 60%. As purificações dos criptatos (**7-13**), foram efetuadas recolhendo-se os produtos na saída do equipamento, durante o intervalo de tempo em que são registrados no cromatograma.

Diferentemente da cromatografia gasosa onde os analitos precisam ser volatilizados para serem analisados, a cromatografia líquida analisa produtos no estado físico em que ele se encontra, bastando para isso que esteja dissolvido em um solvente apropriado e que se utilize na análise, uma coluna adequada ao grupo funcional do analito em questão [1, 2].

Sem o emprego da técnica de HPLC, seria muito difícil a purificação dos criptatos obtidos, porque complexos ou macromoléculas de íons lantanídeos não apresentam mobilidade em colunas de sílica gel e testes efetuados com alumina não renderam bons resultados.

AI.2 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A espectroscopia vibracional no infravermelho foi utilizada neste trabalho como método de caracterização, por permitir a identificação de grupos funcionais pertencentes às estruturas dos ligantes sintetizados e a indicação da coordenação do ligante - metal.

As Figuras AI.17 e AI.18 reproduzem os espectros de **1** e **6**, precursores do criptato **7**. Pode-se observar que as principais bandas características de cada ligante apresentam-se deslocadas nos espectros dos criptatos de lantanídeos (Figuras AI.19 e AI.20). Uma das bandas atribuídas aos estiramentos C-H e C=N dos ligantes livres **1** e **6** são deslocadas para frequência menores nos criptatos de lantanídeos, sendo um indicativo da coordenação do Nitrogênio do criptato aos íons Ln^{3+} [3-5].

Nos espectros dos criptatos de lantanídeos, a presença de algumas bandas situadas em torno de 3400 cm^{-1} , foram atribuídas aos estiramentos do grupo OH (água de coordenação) e sugerem a existência de moléculas de água na primeira esfera de coordenação dos íons Ln^{3+} . Todos os complexos sintetizados apresentam duas bandas correspondentes ao CO_2 do ar, na região próxima a 2360 cm^{-1} .

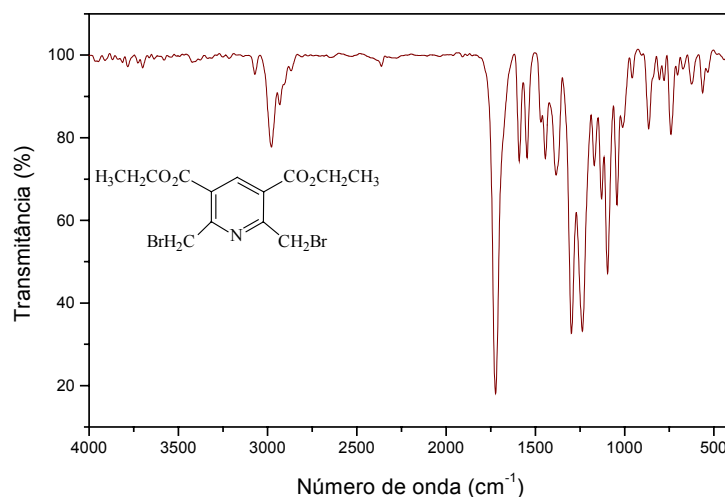


Figura AI.17: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante 1.

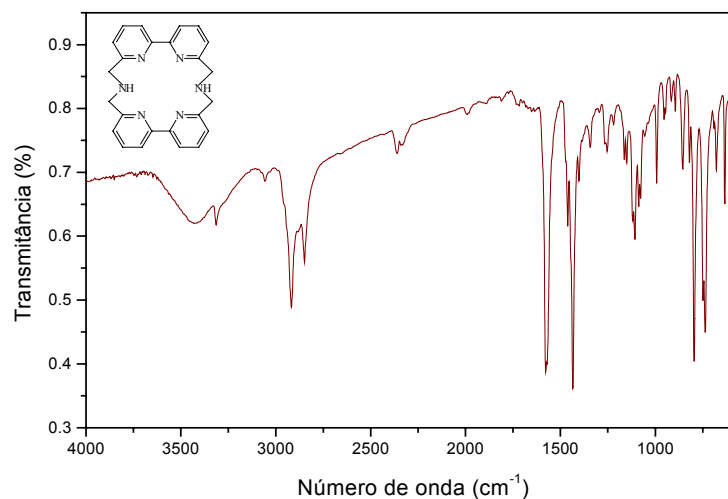
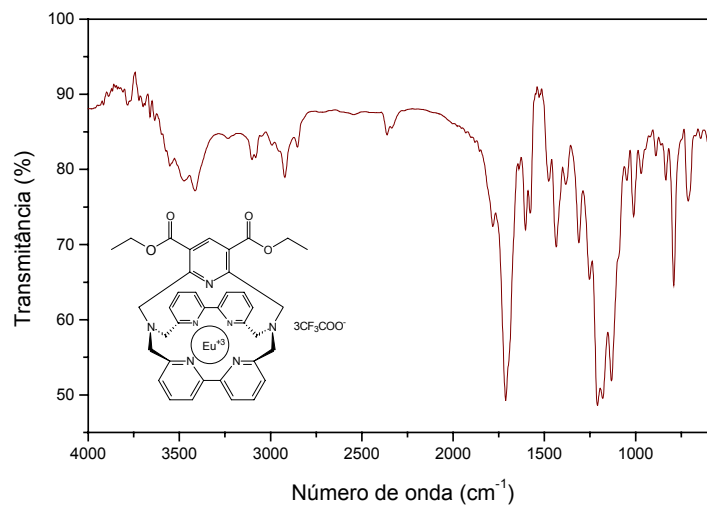
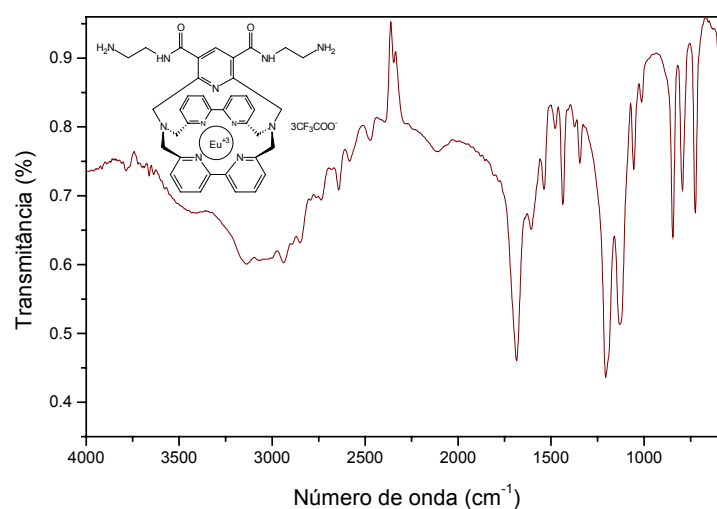


Figura AI.18: Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante 6.

Figura AI.19: Espectro vibracional na região do infravermelho do criptato **9**.Figura AI.20: Espectro vibracional na região do infravermelho do criptato **12**.

Não se pôde identificar o sinal $\nu(\text{=C-H arom})$ em **12** devido a uma baixa resolução da linha de base do espectro, atribuída a umidade do produto ou da pastilha de KBr. Ainda para este criptato, o sinal em $1206,3 \text{ cm}^{-1}$, não foi atribuído ao $\nu(\text{=C-N})$ de uma amina alifática (intensidade média ou fraca) por apresentar intensidade forte [3]. Como ele apresenta-se com forma e deslocamento semelhantes ao $\nu(\text{C-O})$, é um indicativo de que o

contra-íon Cl^- , oriundo da síntese do criptato de Li^+ , foi trocado pelo CF_3COO^- , proveniente da fase móvel aquosa do gradiente empregado na purificação deste criptato.

AI.3- Ressonância Magnética Nuclear de Próton: RMN- ^1H

Os compostos sintetizados foram analisados pela técnica de RMN- ^1H . A seguir descreveremos os resultados obtidos.

A Figura AI.21 corresponde ao espectro obtido para o produto **1** e relaciona os prótons do produto com os sinais observados. Apesar de pequenas impurezas, as integrações reproduzem corretamente os números e os deslocamentos dos prótons.

RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) (**1**): δ 8,80(s, H-py, 1H); 5,01(s, $\text{CH}_2\text{-Br}$, 4H); 4,47(q, $J = 7,2\text{Hz}$, OCH_2 , 4H); 1,45(t, $J = 7,2\text{Hz}$, CH_3 , 6H).

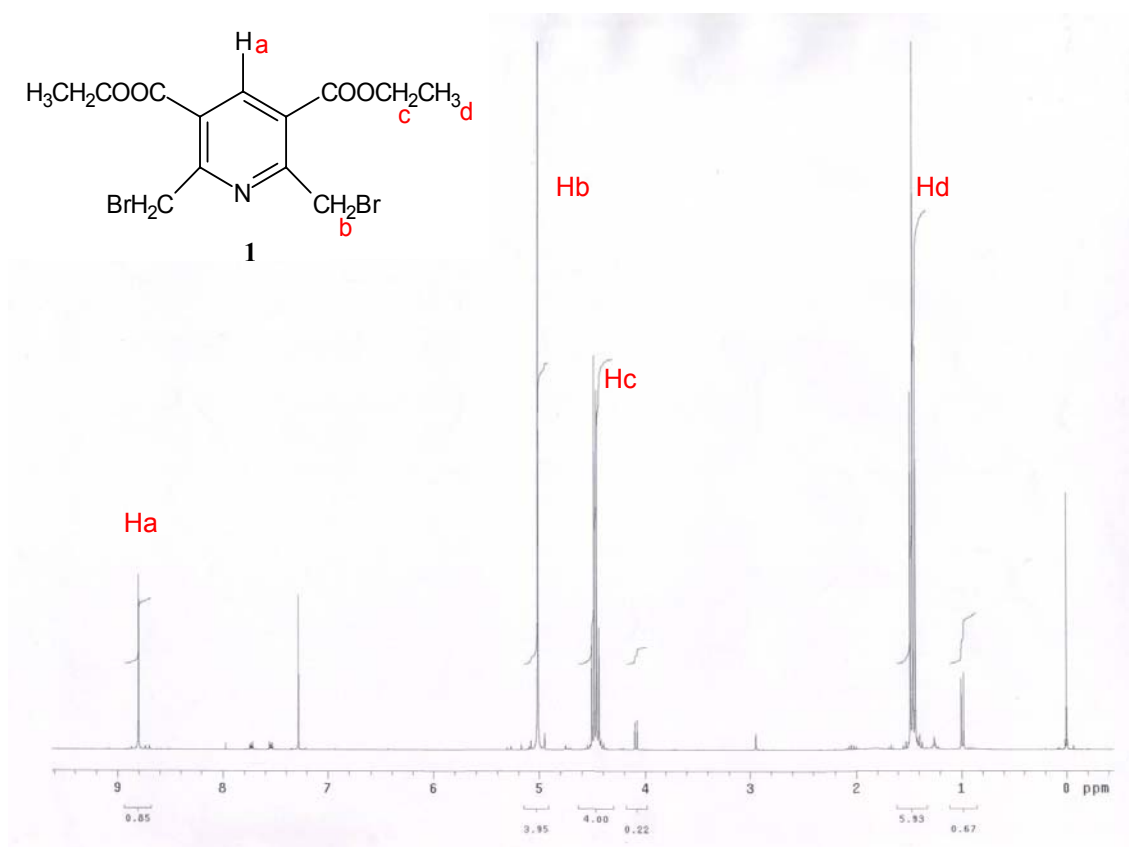


Figura AI.21: Espectro de RMN- ^1H do 2,6-dibromometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina.

O espectro de RMN- ^1H de 6,6'-dibromometil-2,2'-bipiridina (**4**) foi analisado (Figura AI.22) e comparado ao obtido para seu produto de partida 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina (**3**). A diferença entre eles é o deslocamento dos prótons Hd devido à presença dos átomos de Bromo ligados, que deixam os prótons mais desprotegidos.

RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) (**4**): δ 8.38(dd, $J = 7,8$; 0,9Hz, H3-py, 2H), 7,82(t, $J = 7,8$ Hz, H4-py, 2H), 7,47(dd, $J = 7,5$; 0,9Hz, H5-bipy, 2H), 4,62(s, $\text{CH}_2\text{-Br}$, 4H). δ 8,3, dubleto, aromático H-3, 2H; δ 7,8, tripleto, aromático H-4, 2H; δ 7,4, dubleto, aromático H-5, 2H; δ 4,6, singleto, CH_2Br , 4H.

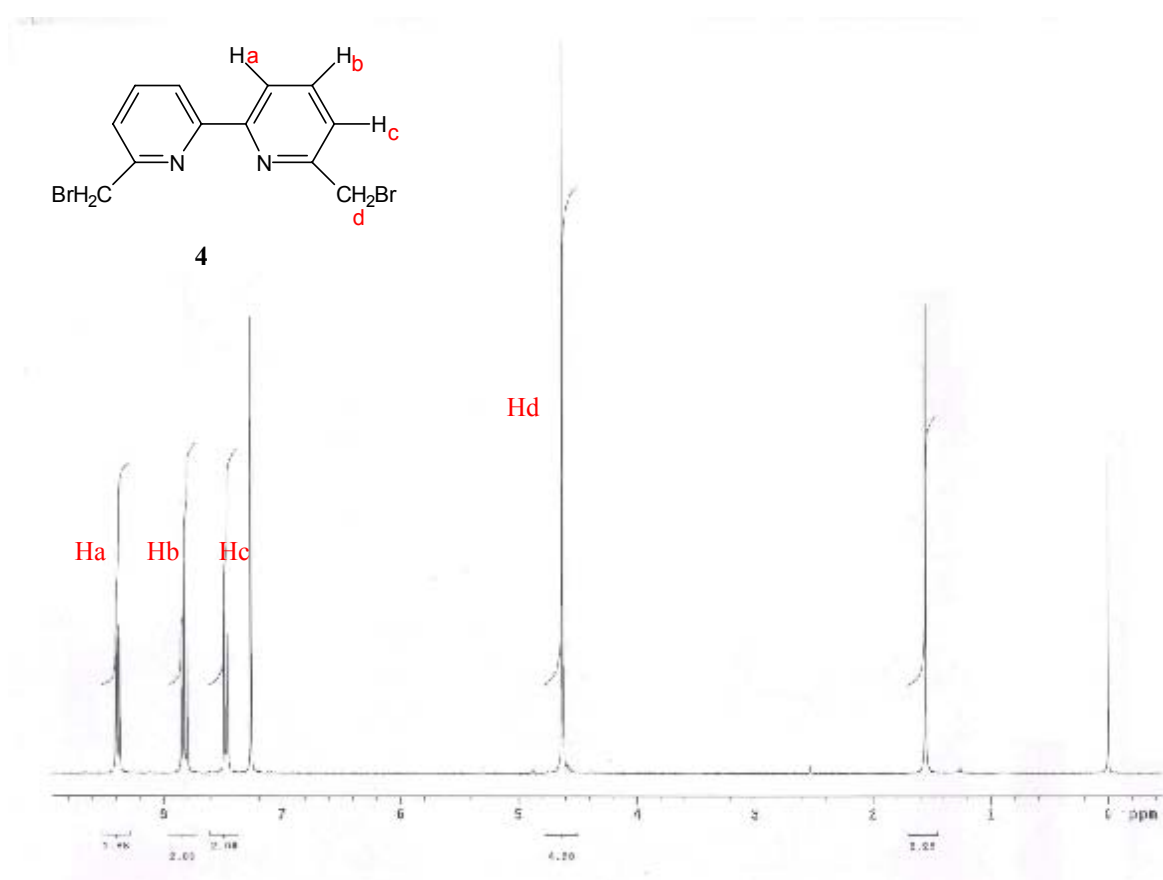
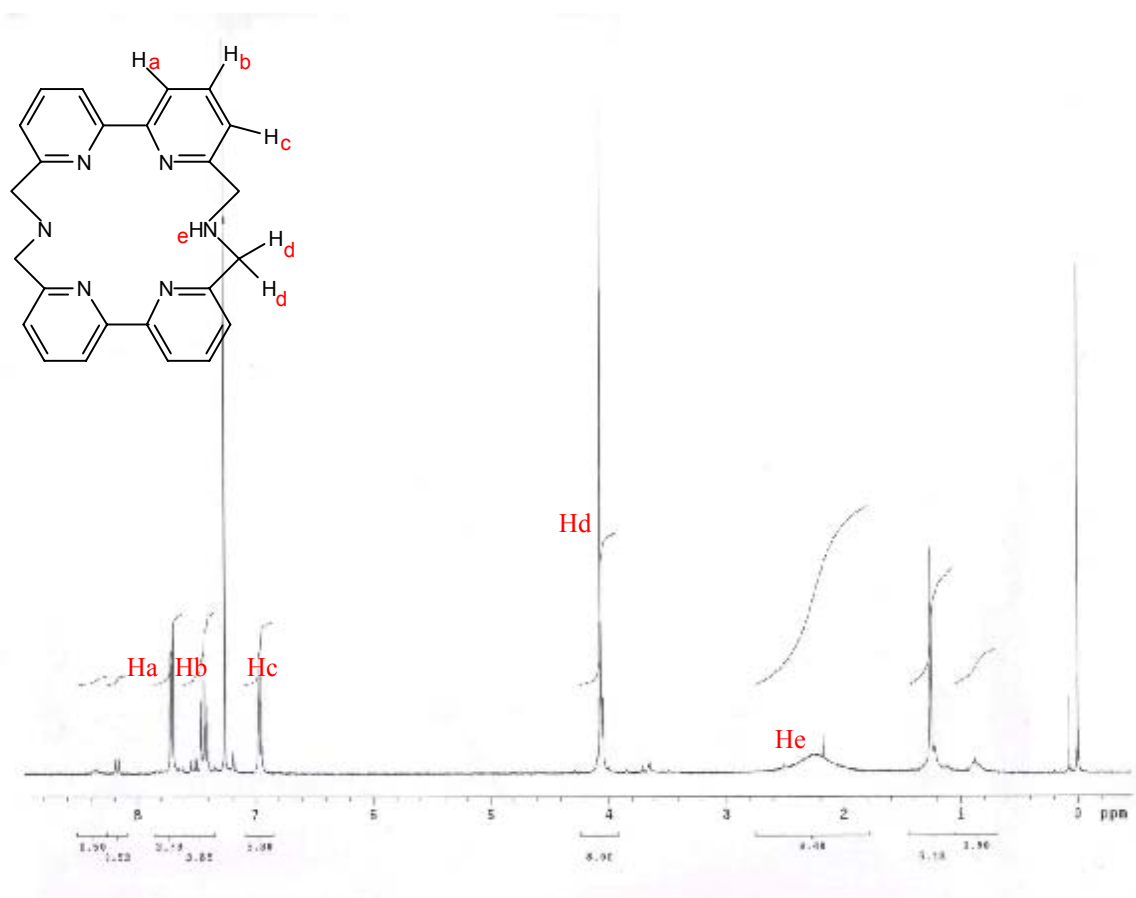


Figura AI.22: Espectro de RMN- ^1H do 6,6'-dibromo-2,2'-bipiridina.

A análise do macrociclo bipy.bipy (**6**), foi realizada com o intuito de se comparar os resultados obtidos neste estudo com os espectros citados na literatura [6]. Na Figura AI.23 são ilustrados os principais deslocamentos dos prótons de **6**.

RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) (**6**): δ 7,71(dd, $J = 7,5$; 1,8Hz, H3-py, 4H), 7,43(t, $J = 7,8$ Hz, H4-py, 4H), 6,95(d, $J = 7,8$ Hz, H5-py, 4H), 4,06(s, CH_2 , 8H), 2,23(ombro largo, NH, 4H).

Figura AI.23: Espectro de RMN- ^1H do bipy-bipy.

Na Figura AI.24, identificamos os prótons do criptato de Li^+ (7). Como este apresenta um grande número de sinais e algumas impurezas, simplificamos a representação do espectro.

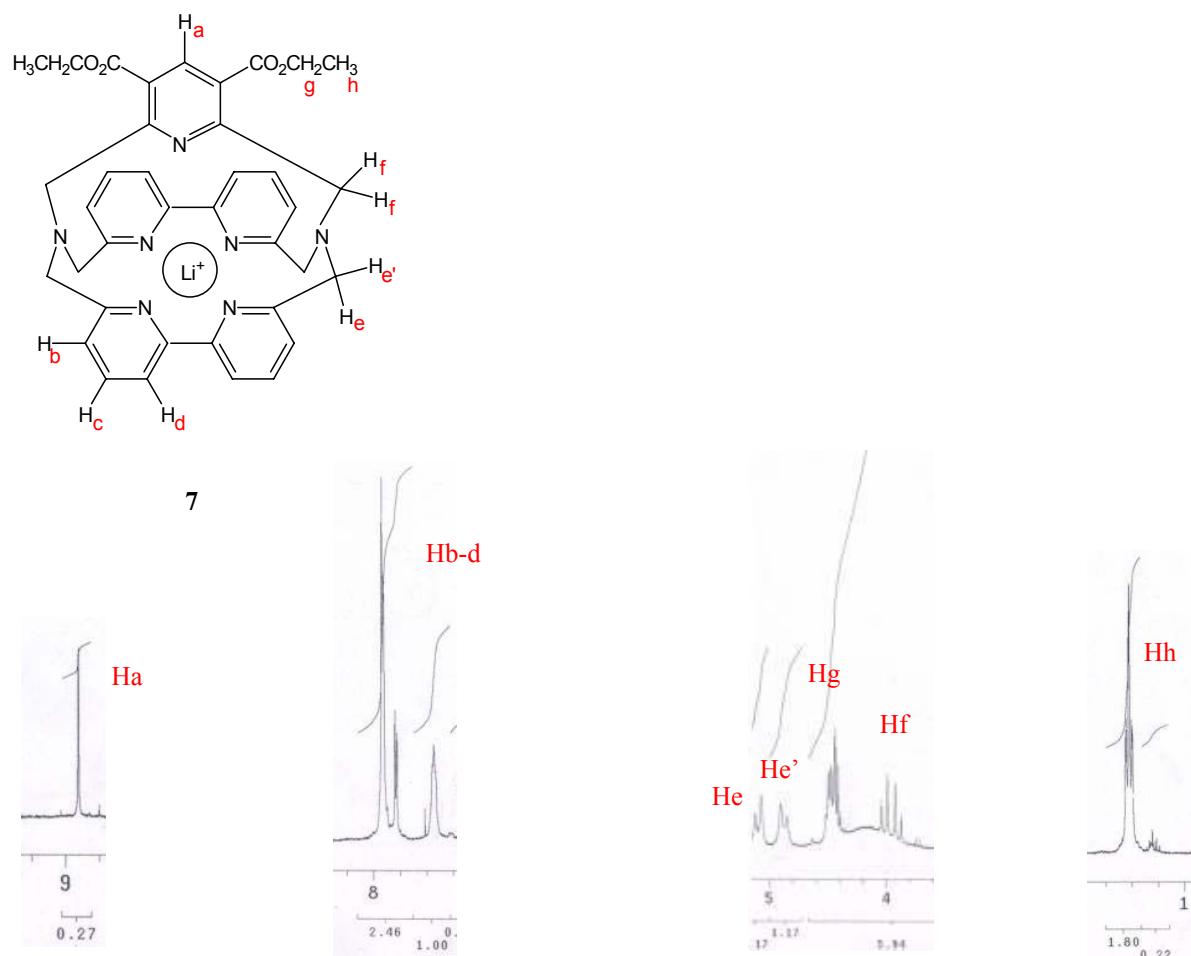


Figura AI.24: Espectro de RMN- ^1H do $[\text{Li}-(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (7).

RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 8,92(s, H-py, 1H), 7,94 - 7,54(conjunto de sinais atribuídos aos prótons aromáticos bipyridínicos, 12H), 5,10(d, $J = 15,3\text{Hz}$, CH-bipy, 4H), 4,87(d, $J = 15\text{Hz}$, CH-bipy, 4H), 4,51 - 4,39(m, OCH_2 , 4H), 4,20(d, $J = 15\text{Hz}$, CH-py, 2H), 3,88(d, $J = 15\text{Hz}$, CH-py, 2H), 1,42(t, $J = 7,2\text{Hz}$, CH_3 , 3H), 1,41(t, $J = 7,2\text{Hz}$, CH_3 , 3H).

Apesar de não termos uma boa resolução dos sinais dos prótons aromáticos, seus deslocamentos e integrações indicam como correta as atribuições feitas. A principal característica deste espectro é a identificação de dois sinais referentes aos prótons He [7]. Estes foram identificados como prótons axiais e equatoriais ligados ao carbono citado. Isto evidencia uma estrutura rígida do criptato obtido, não sendo observado este comportamento nas análises anteriores. Também analisamos os criptatos **9-11** e, como esperado para os compostos paramagnéticos, os sinais sofrem deslocamentos e desdobramentos, apresentando-se muitas vezes sem linha de base ou com sinais negativos.

Desta forma, a obtenção dos espectros dos criptatos com estas características indica a inclusão do lantanídeo na cavidade do criptato [8, 9].

AI.4- Referências bibliográficas

- [1] Ciola, R. *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho - HPLC*, Ed. Edgar Blücher LTDA, 1998.
- [2] McMaster, M. C. *HPLC - A Practical User's Guide*, VCH Publishers, Inc, 1994.
- [3] Shriner, R. L. *The Systematic Identification of Organic Compounds*, Ed. John Wiley & Sons, 1980.
- [4] Joshi, K. C.; Pathak, V. N.; Bhargava, S. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1977**, 39, 803.
- [5] Trikha, A. K.; Dilbagi, K. *J. Fluorine Chemical* **1993**, 02, 139.
- [6] Newkome, G. R.; Pappalardo, S.; Gupta, V. K.; Fronczek, F. R. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4848.
- [7] Caron, A.; Guilhelm, J.; Rich, C.; Pascard, C.; Alpha, B.; Lenh, J. -M.; Rodríguez-Ubis, J. -C. *Helv. Chem. Acta* 1985, 68, 1577.
- [8] Gansow, O. A.; Pruett, D. J.; Triplett, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101 (15), 4408.
- [9] Alpha, B.; Lenh, J. -M.; Mathis, G. *Angew Chem. Int, Ed. Engl.* **1987**, 26 (3), 266.

Anexo II:
Artigos submetidos

Artigo submetido à publicação, no periódico de divulgação científica
Journal of Luminescence

**Study of the luminescence of Eu(III), Tb(III) and Gd(III) cryptates containing
Py(CO₂Et)₂ as ligands**

Suzana P. Vila Nova ^a, Giovannia A.L. Pereira ^a, Rodrigo Q. Albuquerque ^a, G. Mathis ^b,
H. Bazin ^b, G.F. de Sá ^a and S. Alves-Jr. ^{*,a}

^a *Departamento de Química Fundamental, CCEN, UFPE, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil.*

^b *CIS-biointernational / DIVT / Research and New Technologies, BP 175, 30200, Bagnols /cèze-France.*

ABSTRACT

It has been synthesized the cryptates [Ln**▮**bpy.bpy.py(CO₂Et)₂]³⁺, where Ln = Eu, Tb and Gd. These compounds have been characterized through usual methods and their luminescence have been quantified through spectroscopic measurements such as luminescence lifetime, emission spectrum and emission quantum yield, q. The experimental q value obtained for the cryptate [Tb**▮**bpy.bpy.py(CO₂Et)₂]³⁺ has been compared to the one of the cryptate [Eu**▮**bpy.bpy.py(CO₂Et)₂]³⁺, giving q = 25% for the former and q = 14% for the later, both in solution at 77K. The theoretical q value calculated for the Eu(III) cryptate was 19%, being in a very good agreement to the experimental one. The results indicate that the theoretical model which has been used to study the luminescence of complexes can also be satisfactorily used to cryptates and the design of new ligands with high energy triplet states should give very efficient light converting molecular devices when the central ion is the Tb(III).

Keywords: luminescence, emission quantum yield, cryptates

*corresponding author: Tel. +55 81 3271-7475; fax +55 81 3271-8442

E-mail address: salvesjr@ufpe.br

1. Introduction

In recent years lanthanide compounds have been used to make luminescent devices such as luminescent materials [1], UV dosimeters [2] and thin film for optical devices [3]. Among the various lanthanide compounds used as luminescent devices one should emphasize the Eu(III) cryptates, which have been used in fluoroimmunoassays through the TRACE method [4]. The cryptates have the ability to surround the central ion expelling the water molecules from the first coordinating sphere decreasing the quenching of the luminescence by those molecules. The use of organic molecules as ligands such as β -diketones can improve considerably the luminescence of the compound [5]. In such cases the ligands act as antennae, absorbing the UV radiation and transferring the energy non-radiatively to the lanthanide ion. Then it occurs the luminescence, where light in the visible region is emitted by the lanthanide ion. In this process the resonance condition between the emitting level of the lanthanide and the triplet state of the ligand is very important to determine the extension in which the luminescence will occur. The luminescence channels in a given compound can be investigated through the calculation of the emission quantum yield, q , according to well-described methods in literature [6]. In this case the energy transfer and decay rates between electronic states are calculated taking into account only those states which influence the luminescence of the compound.

In this paper we describe the synthesis and spectroscopic study of the new cryptates $[\text{Ln}(\text{bpy.py(CO}_2\text{Et)}_2)]^{3+}$, where $\text{Ln} = \text{Eu, Tb and Gd}$. The emission quantum yield, q , has been measured for the cryptates containing Eu(III) and Tb(III) compounds together with their electronic excited states in order to investigate the factors which influence the luminescence. Although the model described in literature to predict energy transfer rates and q had been applied only to Eu(III) complexes, in this paper we have also applied this model to the new cryptate $[\text{Eu}(\text{bpy.py(CO}_2\text{Et)}_2)]^{3+}$.

2. Experimental

2.1. Synthesis

The labels **1.a**, **1.b** and **1.c** refer to the intermediate compounds shown in Fig. 1.

The synthesis of the cryptates began with the bromination of diethyl 2,6-dimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate (99% Aldrich), via the initiator 1,1'-Azo (cyclohexanecarbonitrile) (98% Aldrich) and N-bromosuccinimide (NBS, 99% Aldrich) under reflux and irradiation by a 100W incandescent lamp to give the 2,6-dibromomethyl-3,5-diethyl-dicarboxylate (**1.a**). The bromination of the 6,6'-dimethyl-2,2'-bipyridine has used benzoyl peroxide associated to the NBS [7,8]. In this procedure the product 6,6'-Bis (bromomethyl)-2,2'-bipyridine (**1.b**) has been obtained in the pure state after recrystalization.

The ring **1.c** has been synthesized following the procedure described in literature [8,9].

The following step was the formation of the cryptate $[\text{Li} \subset \text{bpy} \cdot \text{bpy} \cdot \text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]\text{CO}_3^-$. The product **1.c** was added to $\text{CH}_3\text{CN}_{(\text{aq})}$ under $\text{N}_{2(\text{g})}$ atmosphere. The product **1.a** was dissolved in an aqueous solution of Li_2CO_3 under reflux. The purification of the cryptate formed was done using HPLC. The inclusion of the lanthanide ion in the cryptate has been achieved by the single ionic change between the Li^+ cation and the lanthanides (Eu^{3+} , Tb^{3+} and Gd^{3+}). The lanthanide cryptates have been purified using HPLC.

INSERT FIGURE 1

2.2. Experimental measurements

The emission quantum yields of the cryptates have been obtained using two standard phosphors as reference: commercial $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ (Philips, $\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$, $q = 95\%$) and sodium salicylate (Merck P.A., $\lambda_{\text{exc}} = 220\text{-}380 \text{ nm}$, $q = 60\%$), both at room temperature. The method used in this work provides absolute values while avoiding absolute measurements and is precise within 10% [10]. The following expression has been used:

$$q = \left(\frac{1 - r_{\text{st}}}{1 - r_{\text{x}}} \right) \left(\frac{\Delta\Phi_{\text{x}}}{\Delta\Phi_{\text{st}}} \right) q_{\text{st}} \quad (1)$$

where r_{st} and r_{x} are the amount of exciting radiation reflected by the standard phosphor and by the sample, respectively, and q_{st} is the emission quantum yield of the standard phosphor. The terms $\Delta\Phi_{\text{x}}$ and $\Delta\Phi_{\text{st}}$ in Eq.(1) give the integrated photon flux (photons.s^{-1}) for the sample and the standard phosphor, respectively, and have been determined from the corrected emission spectra, by integrating the emission intensity over the total spectral range. The variables r_{st} and r_{x} , also known as reflection coefficients, were established by scanning the emission monochromator through the excitation wavelength region and integrating the intensity of the spectra thus obtained. In order to have absolute r values it has been used BaSO_4 as the reflectance standard ($r = 91\%$) [10]. The samples and standard phosphors were thoroughly ground to a fine power into an agate mortar in order to minimize grain size differences. All measurements were carried out using a compact powder layer 2mm thick to prevent insufficient absorption and back scattering of the excitation radiation. Three measurements were carried out for each sample in aqueous solution at room temperature.

The compounds have been characterized by elemental analysis (C, N and H), UV-visible absorption spectroscopy and mass spectrometry. The UV-visible spectra were obtained in aqueous solution for low concentrations (μM range) at room temperature using a Perkin Elmer lambda 15 UV/Vis spectrophotometer.

The excitation and luminescence spectra and decay time measurements were obtained in aqueous solution at room temperature and 77K using a LS-50B Perkin-Elmer spectrofluorimeter equipped with a Hamamatsu-R928 photomultiplier tube with the low temperature accessory L2250136 (liquid nitrogen). The samples have been excited at 320nm. The mass spectrometry was carried out in a Finnigan GCQ Mat/quadrupole-ion trap.

3. Results and discussion

3.1. Characterization and spectroscopic measurements

The chemical analytical data of the cryptates and ligands are consistent with the formulae diethyl 2,6-dimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate (Calc/Exp: C 37.87/38.16; H 3.75/3.69; N3.81/3.42) and $[\text{Li} \subset \text{bpy.bpy.py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (Calc/Exp: C 59.60/60.99; H 4.99/4.84; N 13.23/13.45). The proposed formulae of the cryptates synthesized are also with the mass spectrometry results: $[\text{Tb} \subset \text{bpy.bpy.py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (MS m/z (real intensity) 800 (M⁺)) and $[\text{Li} \subset \text{bpy.bpy.py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]\text{Br}$ (MS m/z (real intensity) 728 (M⁺)).

The phosphorescence spectrum of the cryptate $[\text{Gd} \subset \text{bpy.bpy.py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ has been recorded at 77K in aqueous solution and is shown in Fig. 2. The lowest energy triplet has been calculated considering the beginning of the band, giving the value of 23640cm^{-1} ($\lambda = 423\text{nm}$). The position of the lowest excited singlet has been determined through the absorption spectrum of the cryptates and is shown in Fig. 3 for

$[\text{Eu}(\text{bpy}.\text{bpy}.\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2)_2]^{3+}$. Fig. 3 shows a singlet state clearly peaked at 291nm and an elbow probably corresponding to another one smaller in intensity peaked around 300nm. The absorption spectrum for the Tb(III) cryptate is very similar to that of the Eu(III) cryptate, showing only small variations in the relative intensities of the peaks. The luminescence lifetimes (τ) measured for the Eu(III) and Tb(III) cryptates in aqueous solution at room temperature were 0.77 and 0.85ms, respectively.

INSERT FIGURE 2

INSERT FIGURE 3

The emission quantum yields measured in aqueous solution at room temperature for $[\text{Eu}(\text{bpy}.\text{bpy}.\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2)_2]^{3+}$ and $[\text{Tb}(\text{bpy}.\text{bpy}.\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2)_2]^{3+}$ were 14 and 25%, respectively. This difference may be explained through the energy of the triplet state of the ligands ($E_{\text{triplet}} = 23640\text{cm}^{-1}$) which is much more resonant with the emitting level of the Tb(III) ion ($E_{5D_4} = 20560\text{cm}^{-1}$) than with the emitting level of the Eu(III) ion ($E_{5D_0} = 17300\text{cm}^{-1}$). Therefore, the energy transfer from ligand to metal should be much more efficient in the Tb(III) cryptate.

The luminescence spectrum of the cryptate $[\text{Eu}(\text{bpy}.\text{bpy}.\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2)_2]^{3+}$ is shown in Fig. 4. The number of peaks of the transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 0, 1, 2$ and 4) is 1, 2, 3 and 6, respectively, indicating that the symmetry group is likely to be C_3 for this cryptate.

INSERT FIGURE 4

3.2. Theoretical considerations

The coordination geometry of the cryptate $[\text{Eu}(\text{bpy}.\text{bpy}.\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2)_2]^{3+}$ has been optimized using the Sparkle Model for the Calculation of Lanthanide Complexes II (SMLC II) implemented in the MOPAC93r2 program [11]. As this model has been parametrized

only for lanthanide complexes, the convergence criteria adopted was 2.5 Hartree/Å for the gradient norm and some bond angles were hindered. The optimized geometry has been used to predict the absorption spectrum through the INDO/S-CI method implemented in the ZINDO program [12].

The data obtained from the above calculations have been used to predict the energy transfer rates (W_{ET}) between the ligands and the Eu(III) ion through a model well described in literature [13]. For the f-f non-radiative decay rates it has been assigned the value of $10^6 s^{-1}$ [14]. From the ratios between the areas of the transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 0, 1, 2$ and 4) of the luminescence spectrum it has been calculated the total radiative emission rate, A_{rad} , giving a value of $246 s^{-1}$. As the total decay rate (= radiative + non-radiative) from the 5D_0 level can be calculated by $1/\tau$ ($= 1/0.77 ms = 1299 s^{-1}$), it has been calculated the non-radiative decay rate ($k_{nr} = 1053 s^{-1}$), which is more than 4 times the value of A_{rad} . This difference between k_{nr} and A_{rad} together with the poor resonance condition between the 5D_0 level and the triplet state are strongly responsible for the low emission quantum yield observed ($q_{exp} = 14\%$) for $[Eu\subset bpy.bpy.py(CO_2Et)_2]^{3+}$.

The rates involved in the luminescence process have been used to build a system of rate equations, which has been solved through the 4th order Runge-Kutta method [15]. The theoretical emission quantum yield has been calculated by

$$q = \frac{\eta_{5D0} A_{rad}}{\eta_{S0} \phi} \quad (2)$$

where η_{5D0} and η_{S0} are the normalized steady-state populations of the emitting and absorbing levels, respectively, A_{rad} is the total radiative emission rate and ϕ is the pumping rate from ground singlet to excited singlet, taken as $10^4 s^{-1}$ [14]. Eq.(2) can be interpreted as

the ratio between the number of emitted and absorbed photons by the luminescent compound.

The channels involved in the luminescence process are shown in Fig. 5, where the energy transfer and decay rates are represented by arrows. Typical values have been assigned to the intersystem crossing rates and f-f non-radiative decay rates [14]: $k_{21} = 10^5 \text{ s}^{-1}$, $\phi = 10^4 \text{ s}^{-1}$, $k_{32} = 10^8 \text{ s}^{-1}$, $k_{45} = k_{56} = k_{67} = 10^6 \text{ s}^{-1}$. The calculated parameters W_{ET} , A_{rad} , k_{nr} and q_{theor} are shown in Table 1, together with q_{exp} for the cryptate $[\text{Eu}(\text{bpy})_3(\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2)]^{3+}$. According to Table 1, the most efficient luminescence channel is $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow T \rightarrow ({}^5\text{D}_1, {}^5\text{D}_0) \rightarrow {}^7\text{F}_J$, where $J = 0$ to 6 , since the energy transfer from the ligand to the metal via excited singlet is very slow. Although the ${}^5\text{D}_2$ level is more resonant with the triplet state (see Fig. 5), the energy transfer for this level is not so fast as it is for the ${}^5\text{D}_1$ level since in the former case the multipolar mechanism is operative while in the later one the much faster exchange mechanism dominates [13]. The energy transfer rates ${}^5\text{D}_0 \rightarrow \text{Triplet}$, ${}^5\text{D}_1 \rightarrow \text{Triplet}$ and ${}^5\text{D}_4 \rightarrow \text{Singlet}$ are equal to zero and have been omitted from Table 1.

INSERT TABLE 1

INSERT FIGURE 5

4. Conclusions

It has been synthesized the new cryptates $[\text{Ln}(\text{bpy})_3(\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2)]^{3+}$, $\text{Ln} = \text{Eu}$, Tb and Gd . The Tb(III) cryptate has shown a relatively high emission quantum yield in solution ($q = 25\%$), indicating that it can be used as a new Light Converting Molecular Device, LCMD. The low emission quantum yield observed for the Eu(III) cryptate may be explained by the poor resonant condition between the ligand triplet state and the emitting

level and also by the ratio between the non-radiative and radiative decay rates which is relatively high ($k_{nr}/A_{rad} = 4.3$), both factors quenching the luminescence.

The value of q predicted for the cryptate $[Eu\text{c}bpy.bpy.py(CO_2Et)_2]^{3+}$ is in good agreement with the experimental value, indicating the reliability of the model used to describe the luminescence. The calculations have shown that the most probable channels involved in the luminescence process are $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow T \rightarrow (^5D_1, ^5D_0) \rightarrow ^7F_J$. The results have shown that the cryptand used in this work should give more efficient LCMD with the Tb(III) ion, which has energy levels more appropriate to give good resonant conditions with the triplet state of that ligand.

5. Acknowledgements

The authors acknowledge the PRONEX, PROFIX, RENAMI, CNPq and CAPES (Brazilian agencies) for financial support and to Dr. Gerd B. Rocha for the help with the calculations.

6. References

- [1] N. Sabbatini, M. Guardigli, J.-M. Lehn, *Coord. Chem. Rev.* 123 (1993) 201.
- [2] C.G. Gameiro, E.F. da Silva Jr., S. Alves Jr., G.F. de Sá, P.A. Santa-Cruz, *Mater. Sci. Forum* 315/317 (1999) 249.
- [3] G.F. de Sá, S. Alves Jr., B.J.P. da Silva, E.F. da Silva Jr., *Opt. Mater.* 11 (1998) 23.
- [4] B. Alpha, J.-M. Lehn, G. Mathis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 266.
- [5] S. Alves Jr., F.V. de Almeida, G.F. de Sá, C.M. Donegá, *J. Lumin.* 72/74 (1997) 478.
- [6] O.L. Malta, J. Legendziewicz, E. Huskowska, I. Turowska-Tyrk, R.Q. Albuquerque, C. de Mello Donegá, F.R.G. e Silva, *J. Alloys Comp.* 323-324 (2001) 654.
- [7] J.-M. Lehn et J.-B. Regnouf de Vains, *Tetrahedron Lett.* 30 (1989) 2209.

- [8] Juan-Carlos Rodriguez-Ubis, Béatrice Alpha, Dominique Plancherel and Jean-Marie Lehn, *Helv. Chim. Acta* 67 (1984) 2264.
- [9] G.R. Newkome, S. Pappalardo, V.K. Gupta, F.R. Fronczek, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 4848.
- [10] C. de Mello Donegá, S. J. L. Ribeiro, R. R. Gonçalves, G. Blasse, *J. Phys. Chem. Solids* 57 (1996) 1727.
- [11] A.V.M. de Andrade, N.B. da Costa, Jr., A.M. Simas and G.F. de Sá, *Chem. Phys. Lett.* 227 (1994) 349.
- [12] M.C. Zerner, Zindo Package, Quantum Theory Project, Williamson Hall, University of Florida (1990).
- [13] F.R.G. e Silva and O.L. Malta, *J. Alloys Comp.* 250 (1997) 427.
- [14] L. D. Carlos, C. De Mello Donegá, R. Q. Albuquerque, S. Alves Jr., J. F. S. Menezes, O.L. Malta, *Mol. Phys.* 101 (7) (2003) 1037.
- [15] O.L. Malta, F.R.G. e Silva, R. Longo, *Chem. Phys. Lett.* 307 (1999) 518.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Intermediate compounds in the synthesis of the cryptates $[\text{Ln}\subset\text{bpy.bpy.py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$.

Fig. 2. Phosphorescence spectrum of the cryptate $[\text{Gd}\subset\text{bpy.bpy.py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ recorded at 77K in aqueous solution.

Fig. 3. Absorption spectrum of the cryptate $[\text{Eu}\subset\text{bpy.bpy.py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ in aqueous solution at room temperature.

Fig. 4. Luminescence spectrum of the cryptate $[\text{Eu}\subset\text{bpy.bpy.py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ in aqueous solution at room temperature with $\lambda_{\text{exc}} = 320\text{nm}$.

Fig. 5. Energy level diagram showing the most probable channels in the luminescence process for the cryptate $[\text{Eu}\subset\text{bpy.bpy.py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$.

Table 1. Values of the energy transfer rates (W_{ET}), A_{rad} , q_{theor} and q_{exp} for the cryptate $[Eu\text{c}bpy_3py(CO_2Et)_2]^{3+}$.

Energy Transfer Rates (s^{-1})			$A_{rad} (s^{-1})$	$k_{nr} (s^{-1})$	$q_{theor} (\%)$	$q_{exp} (\%)$
W_{ET1}	Singlet $\rightarrow {}^5D_4$	2.50×10^5	246	1053	19	14
W_{ET2}	Triplet $\rightarrow {}^5D_2$	1.08×10^7				
	${}^5D_2 \rightarrow$ Triplet	374				
W_{ET3}	Triplet $\rightarrow {}^5D_1$	4.75×10^8				
W_{ET4}	Triplet $\rightarrow {}^5D_0$	8.61×10^6				

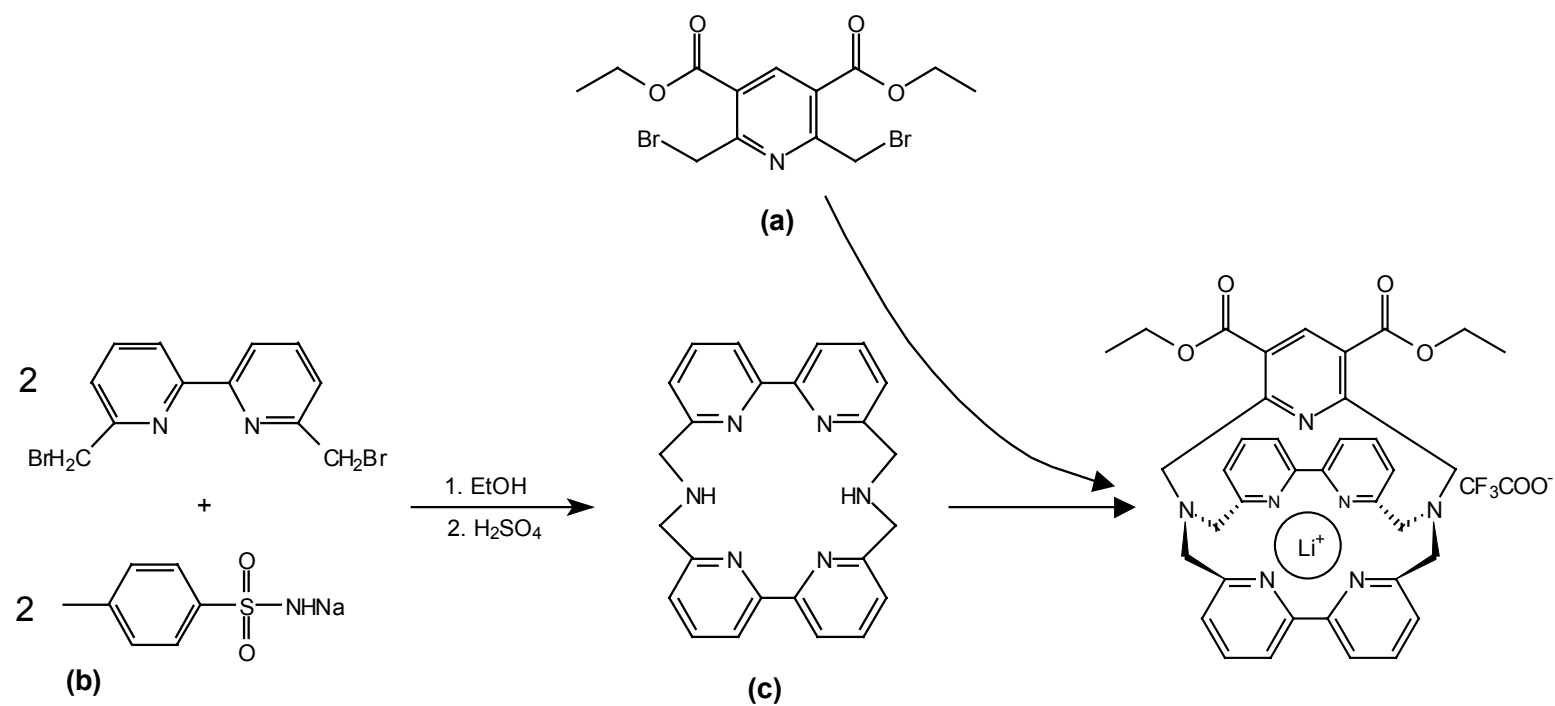


Figure 1

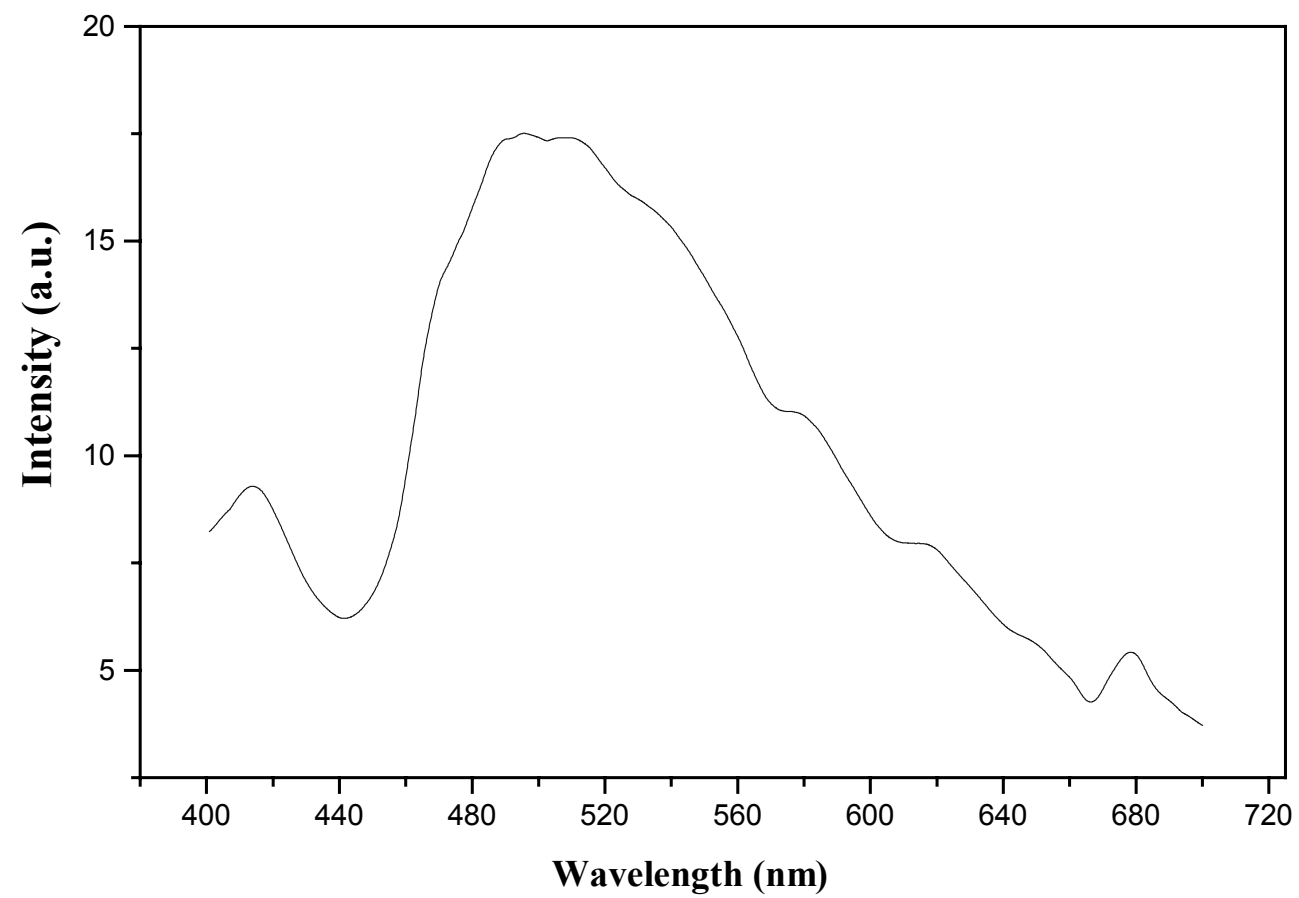
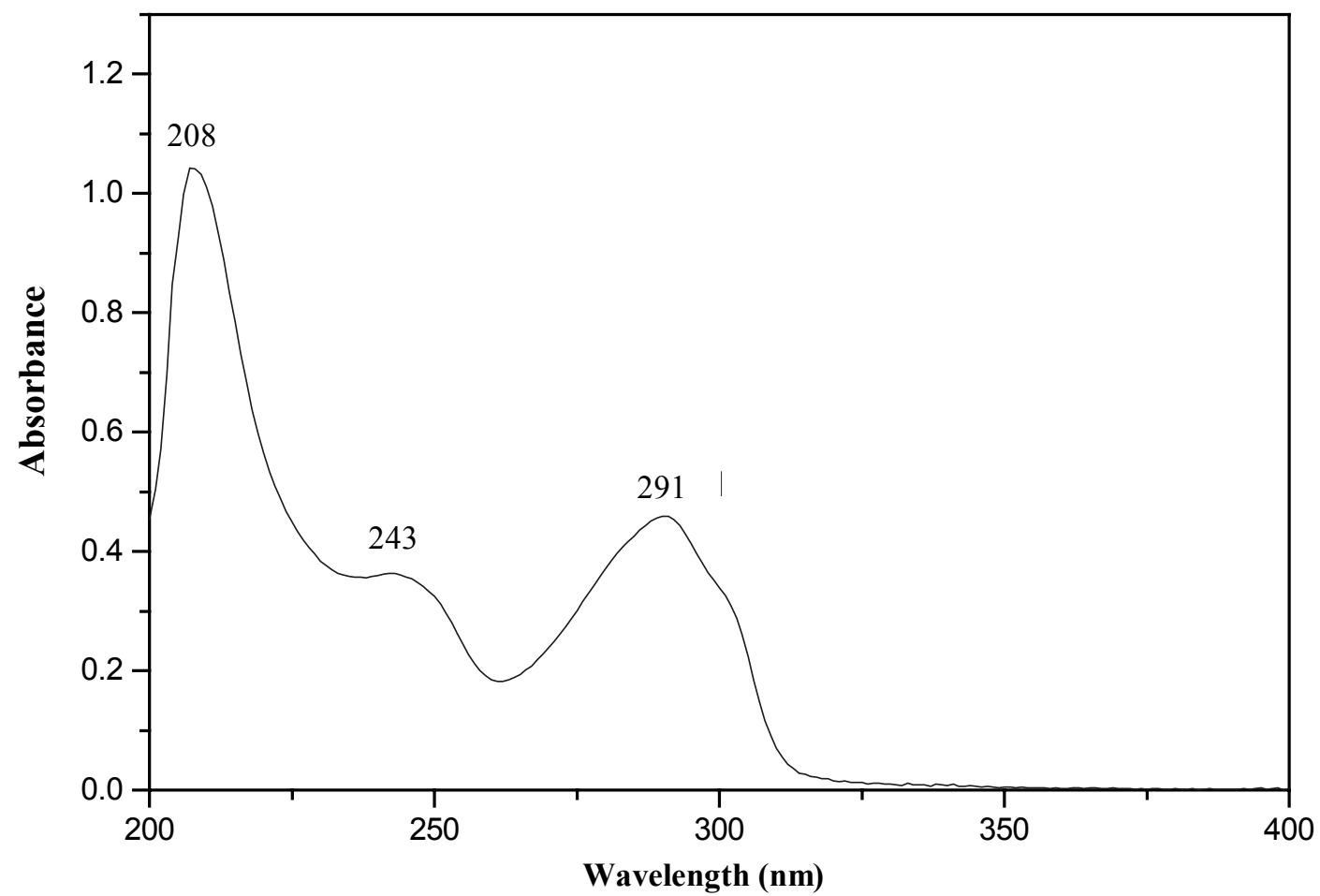


Figure 2

**Figure 3**

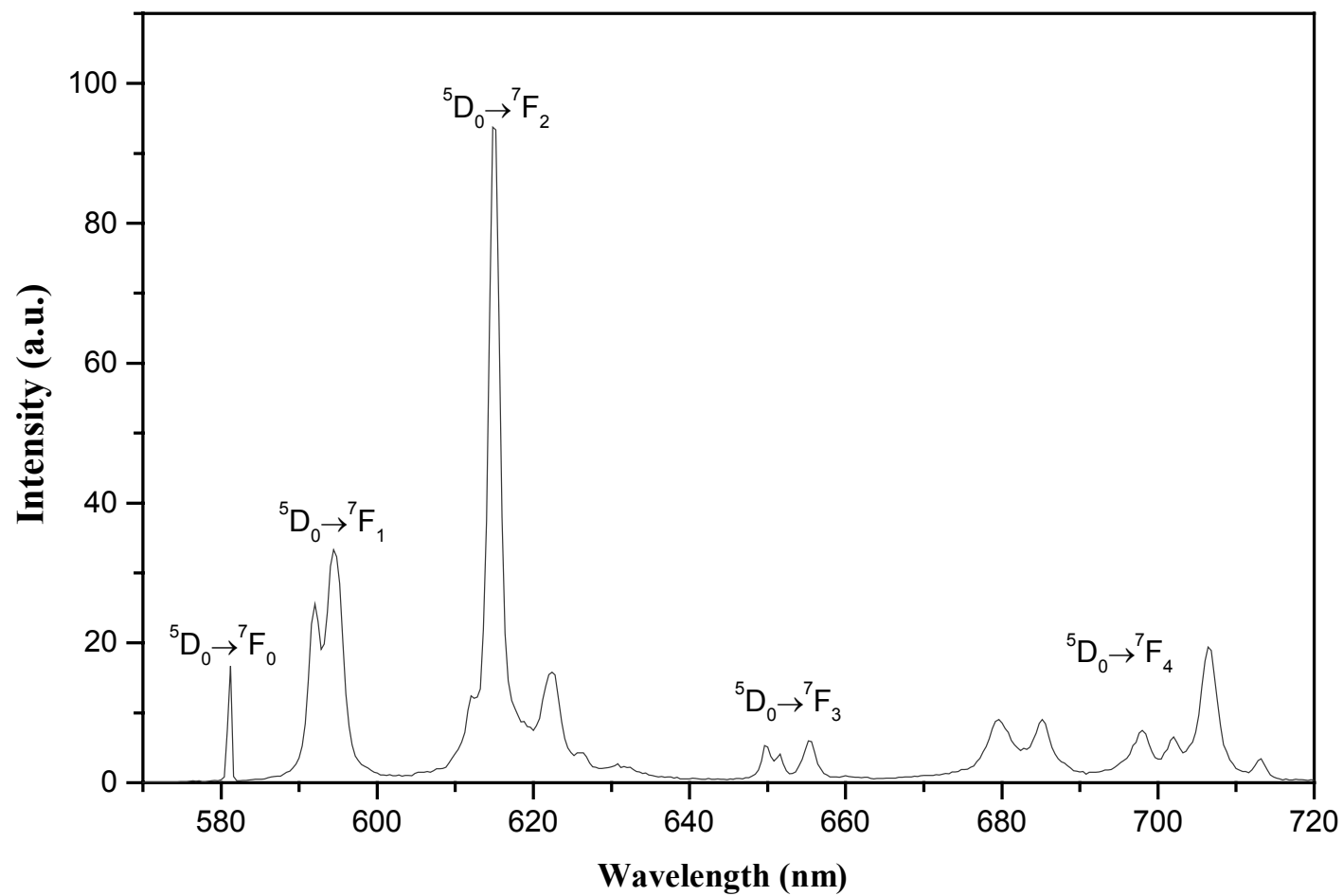


Figure 4

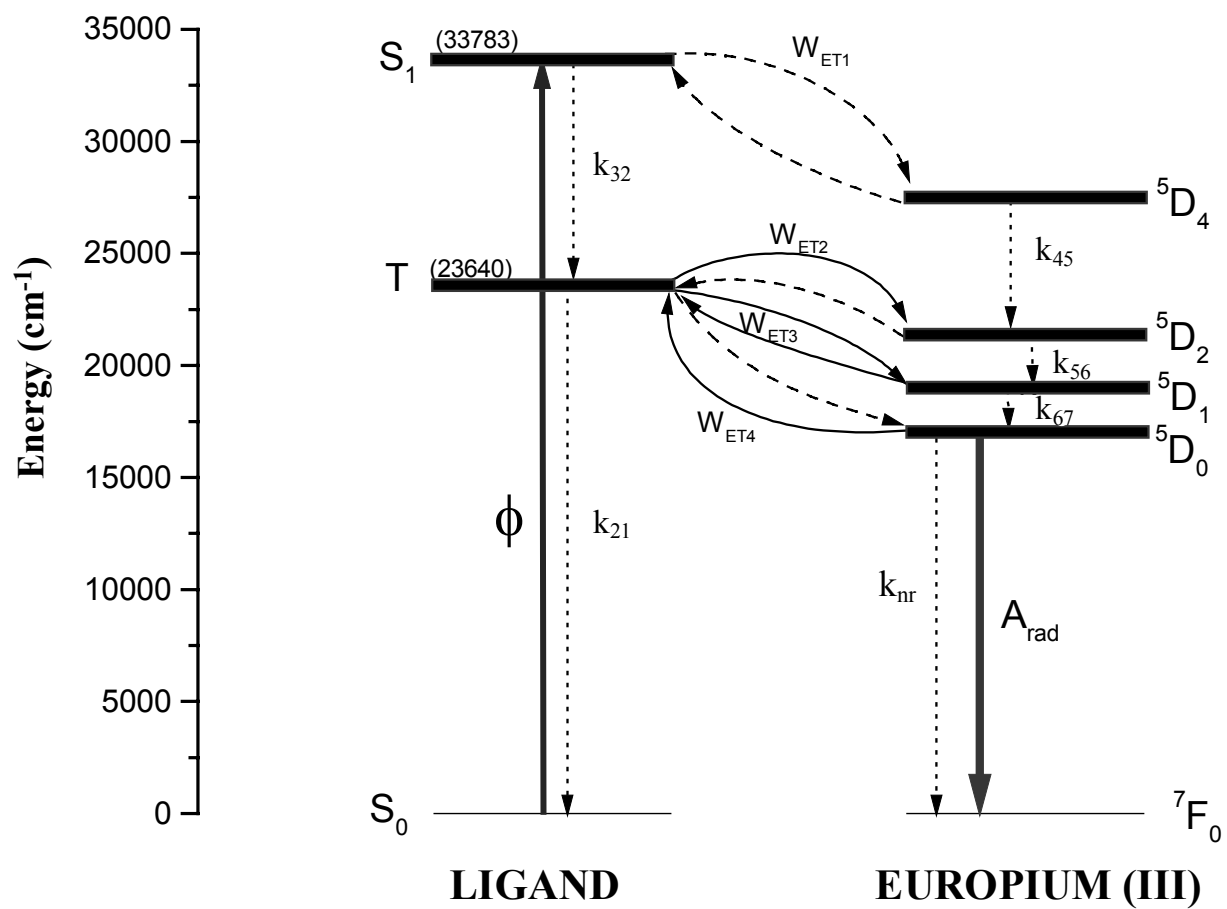


Figure 5

Artigo submetido à publicação, no periódico de divulgação científica
Química Nova

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE
CRIPTATOS DE LANTANÍDEO DO TIPO $\text{Ln} \subset (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2^{3+}$.

S. P. Vila Nova, G. A. de L. Pereira, G. F. de Sá, e S. Alves Júnior*

Departamento de Química Fundamental, CCEN, Universidade Federal de Pernambuco,
Cidade Universitária, 50670-901 Recife–PE, Brasil.

H. Bazin, H. Autiero e G. Mathis

Cis Bio international / DIVT / Research and New Technologies, BP 175, F-30200
Bagnols/cèze-France.

* e-mail: salvesjr@ufpe.br

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE CRIPTATOS DE LANTANÍDEO DO TIPO $\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2^{3+}$.

ABSTRACT

We report on the synthesis, characterization (infrared and proton nmr spectra) and photophysical properties (luminescence spectra and emission quantum yield) of the lanthanide cryptates $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ with $\text{Ln} = \text{Eu}^{3+}$, Tb^{3+} or Gd^{3+} , which can be applied as efficient Light-Conversion-Molecular-Devices. From emission spectra of $\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2^{3+}$ complex we can attribute pontual symmetry C_3 for the metal ion. The spectroscopic study show a higher emission quantum yield ($q=25\%$) for $\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2^{3+}$ in aqueous solution, while the Europium one presents $q=14\%$. This is justified by a more efficient energy transfer between triplet and emission levels of Terbium ($T \rightarrow {}^5D_4$).

KEYWORDS: Lanthanide cryptate, synthesis, emission quantum yield

INTRODUÇÃO

A química de coordenação de ligantes macrocíclicos vem tornando-se uma área de pesquisa fascinante para os químicos inorgânicos de todo o mundo. O interesse contínuo no design de novos ligantes advém do seu amplo potencial de aplicação^{1, 2}, particularmente do encapsulamento de íons lantanídeos em estruturas supramoleculares, originando compostos que atuam como excelentes dispositivos moleculares conversores de luz (DMCLs), os quais absorvem radiação na região do ultravioleta e emitem na região do visível^{3, 4}. Estes DMCLs são testados e utilizados freqüentemente em aplicações médicas e clínicas como radioimunoterapia⁵⁻⁷, tomografia de emissão de pósitron^{8, 9}, agente de aumento de contraste em imagem de ressonância¹⁰⁻¹³, e marcadores luminescentes em fluoroimunoensaios¹⁴⁻¹⁷. Dentre os compostos macrocíclicos mais estudados podemos destacar os criptatos de lantanídeos, devido às suas habilidades de coordenação com antígenos ou anticorpos estarem bem estabelecidas¹⁴⁻¹⁷.

Jean-Marie Lehn^{1, 18}, na década de 60, obteve em um sistema macromolecular a presença de grupos doadores em um arranjo tridimensional, de forma flexível, que permitia que um cátion fosse não apenas complexado, mas também encapsulado. As primeiras espécies que apresentaram esta capacidade foram denominadas criptantes, e seus complexos metálicos, criptatos.

Criptatos com íons lantanídeos apresentam boa solubilidade em água e elevada estabilidade cinética e termodinâmica¹⁹. Os principais estudos fotofísicos mostram que estes criptatos populam eficientemente o nível emissor (⁵D₀ para o európio e ⁵D₄ para o térbio) do íon metálico através de processos não-radiativos, fornecendo assim, altos rendimentos quânticos de emissão, em solução aquosa²⁰. Devido aos criptatos de

lantanídeos apresentarem grande aplicabilidade em sistemas biológicos²¹⁻²³, há uma necessidade crescente de pesquisas de novos criptatos projetados para estes fins.

Dentro de uma visão supramolecular, este trabalho tem como objetivo geral a síntese, a caracterização e o estudo das propriedades espectroscópicas de novos criptatos de lantanídeos (**6-8**) a partir de ligantes piridínico (**1**) e bipyridínicos (**2-4**), visando suas possíveis aplicações em sistemas biológicos.

INSERIR FIGURA 1

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e solventes utilizados

Os reagentes: dietil-2,6-dimetil-3,5-piridinacarboxilato (99%), 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10 fenantrolina (98%), N-bromosuccinimida (99%), 1,1'- azo-bis (ciclohexanocarbonitrila) (98%), ácido 3-cloroperoxibenzóico (77%), peróxido de hidrogênio (30 volumes), peróxido de benzoíla (97%), anidrido trifluoroacético (99+%), p-toluenosulfonamida (98%), cloreto de európio (99,9%), cloreto de térbio (99,9%), cloreto de gadolínio (99,9%), foram adquiridos na Aldrich e utilizados sem purificação prévia;

O reagente 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina foi fornecido como doação pela indústria francesa Cis Bio international;

Os demais reagentes e solventes tem grau de pureza P. A. e foram adquiridos via Nuclear, Fluka, Vetec, Reagen, Pro Analysi, Carlos Erba, Merk e Quimex, sendo

empregados também sem prévia purificação, excetuando-se os casos relacionados no texto.

Metodologia de caracterização

Os pontos de fusão/decomposição foram determinados em um aparelho digital da Electrothermal modelo 9100, série IA 9100/ IA 9200, com resolução de 0,1°C e precisão de 0,5°C. As medidas foram realizadas em tubos capilares de ~ 1mm diâmetro.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho (IV) foram obtidos em pastilhas de KBr, prensadas sob vácuo, utilizando o espectrômetro com transformada de Fourier Bruker modelo IF66 na região entre 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

O acompanhamento e a purificação das reações foram efetuados em um cromatógrafo Shimadzu equipado com duas bombas LC-10AV, detector UV-vis SPD-10AV e integrador SCL-10A. Foram empregadas colunas analíticas RP18 (5 microns, 125mm x 4,6mm) e a coluna semi-preparativa RP18-E (5microns, 250mm x 10,5mm). Empregamos um gradiente com as fases móveis Acetonitrila (ACN) e H₂O acidificada (1% ácido trifluoroacético), onde 0-5min: ACN 15%, 5-35min: ACN 15%-100%, 35-40min: ACN 100%, 40-45min: ACN 100%-15%.

A medida de espectrometria de massas (EM) foi desenvolvida em um equipamento Finnigan MAT com analisador de massa *Ion Trap*, através de inserção direta e ionização por impacto de elétrons.

As análises de RMN-¹H foram obtidas em CDCl₃, utilizando um equipamento VARIAN Unity Plus, com frequência de 300MHz. Os deslocamentos químicos estão expressos em partes por milhão em relação ao pico residual do CDCl₃ (7,26ppm).

Os espectros de absorção dos produtos, em água destilada, foram medidos no espectrofotômetro UV-vis LAMBDA 6 modelo 2688-002, com concentração de 10^{-4} M (6 e 8) e de 10^{-5} M para os demais.

As medidas espectroscópicas de emissão foram obtidas a 298K e 77K em um equipamento Jobin-Yvon Ramonor U-1000 com duplo monocromador. Para excitação foi utilizado um monocromador Jobin-Yvon modelo H-10, usando uma lâmpada de Xe-Hg (150W). Utilizou-se como detector uma fotomultiplicadora RCA C31034RF refrigerada por um sistema peltier. O registro e o processamento do sinal foi feito através de uma interface Spectralink ligada a um microcomputador IBM®.

As medidas dos tempos de decaimento dos estados excitados (τ) foram obtidas utilizando-se um laser Nd:YAG modelo GCR-170 da Spectra-Physics para excitar as amostras em 355nm (3º harmônico). A monitoração do sinal foi feita através de uma fotomultiplicadora acoplada a um boxcar com integrador modelo 4420 e 4422 da EG&G (Princeton Applied Research Corp.), cujo tempo de integração é tipicamente fixado em 20ns.

Sínteses

*Síntese de 2,6-dibromometil-3,5-dicarboxilato de etil piridina (1)*²⁴⁻²⁶: Reagiu-se o 2,6-dimetil-3,5-dicarboxilato de etil piridina (0,50g) com N-bromosuccinimida (NBS; 0,90g) em CCl₄, sob efeito do catalisador 1,1'-Azobis(ciclohexanocarbonitrila (AZOBIS, 4mg). A reação transcorreu sob irradiação de lâmpada de tungstênio (100W), refluxo e agitação por 4 horas e a reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) em placa de sílica e CH₂Cl₂. A reação foi finalizada com banho de gelo e filtração do precipitado. O filtrado foi evaporado e o produto purificado via coluna cromatográfica de sílica gel e

CHCl₃. Obteve-se **1** na forma de um sólido branco com 40% de rendimento. P. f. = 55-60°C; R_f = 0,53 (CHCl₃); Tr (HPLC) = 26,8min; IV(KBr): 2978,9(f, ν C-H saturado); 1723,1(F, νC=O de éster aril); 1590,5 e 1547,0 (m, ν C=C + C=N de anel piridínico); 1444,1(f, δC-H saturado); 1298,0 e 1236,8(F, νC-O de éster aril); 1095,8(F, δC-H de anel piridínico); 865,2(f, δC-H de aromáticos substituídos), 740,9(f, νC-Br); RMN-¹H (300MHz, CDCl₃) δ 8,80(s, H-py, 1H); 5,01(s, CH₂-Br, 4H); 4,47(q, *J* = 7,2Hz, OCH₂, 4H); 1,45(t, *J* = 7,2Hz, CH₃, 6H).

Síntese de 6,6'-dibromometil-2,2'-bipiridina (2)^{25, 27}: Dissolveu-se de 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina (0,30g) em CHCl₃ anidro, sob agitação, a temperatura ambiente. Separadamente, dissolveu-se o mCPBA (0,56g) em CHCl₃ e adicionou-se Na₂SO₄ anidro. Após 30 minutos, filtrou-se o sulfato de sódio e adicionou-se o mCPBA diretamente ao balão reacional. Manteve-se a agitação à temperatura ambiente, por 20 horas. Extraíu-se o excesso de mCPBA em funil de separação, seguida de lavagem com solução saturada de NaHCO₃ (3x20mL). Em seguida, o extrato orgânico foi lavado com uma solução saturada de NaCl (3x15mL) e seco na presença de Na₂SO₄ anidro. O sulfato foi filtrado após 30 minutos e o solvente foi evaporado. O produto obtido foi identificado como sendo o intermediário 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina N, N'-dióxido, sendo utilizado na etapa seguinte sem prévia purificação. Todas estas etapas de reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada em sílica e CH₂Cl₂ (R_f~0,08).

Após secagem do produto N, N'-dióxido (0,18g), este foi dissolvido em CHCl₃ anidro (8mL). Em seguida adicionou-se anidrido trifluoroacético (7,30mL) e manteve-se o refluxo da mistura por 19 horas. Evaporado o solvente da reação, adicionou-se LiBr (0,76g), DMF anidro (135μL) e THF anidro (13,20mL), e a reação foi refluxada, sob

atmosfera de $N_{2(g)}$, por 48 horas. O acompanhamento desta reação foi feito via HPLC e a purificação do produto **2** foi feita por coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando-se a mistura $CH_3Cl/MeOH$ (95/5) como eluente. Rendimento de 20%. P. f. $> 180^\circ C$ (observou-se o escurecimento do produto o que sugere um processo de degradação).

Síntese alternativa de 2^{24, 28}: A mistura de 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina (0,50g) e NBS (1g) em 30ml de CCl_4 , foi refluxada por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se peróxido de benzoíla (6mg), mantendo-se o refluxo por mais 3 horas sob irradiação de lâmpada de tungstênio (100W). Filtrou-se a mistura ainda quente e resfriou-se o filtrado, obtendo-se **2**, que foi recristalizado em CCl_4 . O acompanhamento da reação, nesta etapa, foi feito via HPLC e o rendimento foi de 27%. Tr (HPLC) = 20,6min; IV(KBr): 2925,7(m, ν C-H saturado); 1568,7(m, ν C=C + C=N de anel piridínico); 1462,4(m, δ C-H saturado); 1076,1(m, δ C-H de anel piridínico); 806,7(f, δ C-H de aromáticos substituídos), 744,3(f, ν C-Br); RMN-¹H (300MHz, $CDCl_3$) δ 8. 38(dd, $J = 7,8$; 0,9Hz, H3-py, 2H), 7,82(t, $J = 7,8$ Hz, H4-py, 2H), 7,47(dd, $J = 7,5$; 0,9Hz, H5-bipy, 2H), 4,62(s, CH_2 -Br, 4H).

Síntese de 8, 21-ditosil-8, 21, 27, 28, 29, 30, hexaazapentaciclo[21. 3. 1. 1^{2. 6}, 1^{10. 14}, 1^{15. 19}] triaconta-1(27), 2, 4, 6(30), 10, 12, 14(29), 15, 17, 19(28), 23, 25-dodecaeno (3)^{28, 29}: Primeiramente preparou-se o sal monossódico do p-toluenosulfonamida (tosilato de sódio), pela adição de p-toluenosulfonamida a um sistema sob atmosfera inerte, contendo EtOH anidro, e sódio metálico. Manteve-se refluxo até que todo o sódio metálico fosse consumido. Em seguida evaporou-se o solvente e obteve-se o tosilato de sódio na forma de um pó leve, de coloração amarela clara. Dissolveu-se **2** (0,10g) em EtOH anidro e a este adicionou-se tosilato de sódio (0,11g) dissolvido no mesmo solvente, mantendo refluxo e

agitação por 25 horas. A reação foi colocada em um banho de gelo, o precipitado lavado com água gelada, CHCl_3 e EtOH gelados, alternadamente. Os extratos orgânicos foram evaporados até a secura e reunidos ao sólido do funil. O produto **3** obtido foi empregado na etapa seguinte, sem prévia purificação. O rendimento foi de 50% e o ponto de fusão $> 300^\circ\text{C}$, conforme observado em literatura.

Síntese alternativa de 3: Dissolveu-se **2** (0,10g) em CH_3CN anidra e a este adicionou-se p-toluenosulfonamida (0,11g) e K_2CO_3 (0,09g). Manteve-se a reação sob agitação e a temperatura ambiente por 25h, ao final das quais foi colocada em um banho de gelo. O precipitado foi lavado com água gelada, CHCl_3 e EtOH gelados, alternadamente. Os extratos orgânicos foram reunidos e evaporados. O produto obtido na forma de pó esbranquiçado, foi empregado na etapa seguinte, sem prévia purificação. Rendimento de 30%.

Síntese de 8, 21, 27, 28, 29, 30, hexaazapentaciclo[21. 3. 1. 1^{2. 6}, 1^{10. 14}, 1^{15. 19}] triaconta-1(27), 2, 4, 6(30), 10, 12, 14(29), 15, 17, 19(28), 23, 25-dodecaeno (4)^{28, 29}: Dissolveu-se o produto **3** (0,04g) em H_2SO_4 concentrado (1mL) e manteve-se refluxo por 2 horas. Em seguida, neutralizou-se com solução super-saturada de NaOH, e extraiu-se a mistura com CHCl_3 (4x15mL). Os extratos orgânicos foram secos em presença de Na_2SO_4 anidro. Após filtração e evaporação do solvente, obteve-se o produto na forma de pó esbranquiçado com rendimento de 80%. P. f. $> 300^\circ\text{C}$; EM (EI+) m/z: 394,0 (M^+); RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 7,71(dd, J = 7,5; 1,8Hz, H3-py, 4H), 7,43(t, J = 7,8Hz, H4-py, 4H), 6,95(d, J = 7,8Hz, H5-py, 4H), 4,06(s, CH_2 , 8H), 2,23(ombro largo, NH, 4H).

*Sínteses dos criptatos de 3,5-dicarboxilato de etil piridina ($Li^+ \subset [(bipy)_2py(CO_2Et)_2]CO_3^-$, **5**)^{24, 25, 28}. Em um sistema sob fluxo de $N_{2(g)}$, adicionou-se ao balão de 3 bocas, o produto **4** (0,05g) dissolvido em 100ml de CH_3CN anidra. Em seguida adicionou-se o $LiCO_3$ (0,11g) sob agitação e aquecimento. No início do refluxo, adicionou-se gota-a-gota, o reagente **1** (0,06g) dissolvido em 60ml de CH_3CN anidra. Manteve-se o refluxo por 24h e a reação foi acompanhada via HPLC. Ao término da reação, o balão foi submetido a um banho de gelo e após filtração do precipitado, evaporou-se o solvente. As purificações dos produtos foram efetuadas via HPLC, em coluna semi-preparativa e o produto apresenta-se como pó amarelado. Rendimento de 60%. Tr (HPLC) = 13,5min; RMN- 1H (300MHz, $CDCl_3$) δ 8,92(s, H-py, 1H), 7,94 - 7,54(conjunto de sinais atribuídos aos prótons aromáticos bipyridínicos, 12H), 5,10(d, $J = 15,3Hz$, CH-bipy, 4H), 4,87(d, $J = 15Hz$, CH-bipy, 4H), 4,51 - 4,39(m, OCH_2 , 4H), 4,20(d, $J = 15Hz$, CH-py, 2H), 3,88(d, $J = 15Hz$, CH-py, 2H), 1,42(t, $J = 7,2Hz$, CH_3 , 3H), 1,41(t, $J = 7,2Hz$, CH_3 , 3H).*

*Substituição do íon Li^+ por íons Ln^{3+} ($Ln^{3+} = Eu^{3+}, Tb^{3+}, Gd^{3+}$, **6, 7 e 8**)^{24, 26}. A **5** dissolvido em uma mistura de CH_3CN e MeOH, adicionou-se o cloreto de lantanídeo $LnCl_3 \cdot 6H_2O$ desejado. A mistura foi mantida sob agitação e aquecimento por 3 horas após o início do refluxo. O acompanhamento da reação foi feito via HPLC e ao término, filtrou-se o precipitado após resfriamento. Os extratos orgânicos foram concentrados até a secura e a purificação foi feita através de HPLC, em coluna semi-preparativa. Os produtos finais apresentam-se como sólido amarelado. Rendimento de 90%. Tr (HPLC) = 18,2min; IV(KBr): 3414,2 (f, $\nu O-H$); 2922,2(f, $\nu C-H$ saturado); 1711,8(F, $\nu C=O$ de éster e de ácido); 1603,3 (m, $\nu C=C + C=N$ de anel piridínico); 1434,9(m, $\delta C-H$ saturado);*

1310,8(m, ν C-N amina terciária); 1209,1(F, ν C-O de éster e de ácido); 1132,2(F, ν C-F); 1010,4(m, δ C-H de anel piridínico); 790,9(m, δ C-H de aromáticos substituídos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

As bandas características de deformação (δ) e estiramento (ν) no espectro vibracional dos produtos analisados, permitiu a observação do deslocamento das principais bandas características de cada ligante em relação aos espectros dos criptatos de lantanídeos, como as atribuídas aos estiramentos C-H e C=N dos ligantes livres **1** e **4** são deslocadas para frequência maiores nos criptatos de lantanídeos, sendo um indicativo da coordenação dos átomos de Nitrogênio do criptato aos íons de lantanídeo^{30, 31}.

Nos espectros dos criptatos de lantanídeos, a presença de algumas bandas situadas em torno de 3400cm^{-1} , foram atribuídas aos estiramentos do grupo OH e sugerem a existência de moléculas de água na primeira esfera de coordenação dos íons Ln^{3+} . Todos os complexos sintetizados apresentam duas bandas correspondentes ao CO_2 do ar, na região próxima a 2360cm^{-1} .

Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN – ^1H)

O espectro de RMN- ^1H de 6,6'-dibromometil-2,2'-bipiridina (**2**) foi analisado e comparado ao obtido para seu produto de partida 6,6'-dimetil-2,2'-bipiridina, apresentando

como diferença apenas o deslocamento dos prótons $\text{CH}_2\text{-Br}$, que no produto final encontram-se mais desprotegidos.

A análise do macrociclo bipy.bipy (**4**), foi realizada e comparada aos espectros citados na literatura²⁹, reproduzindo os deslocamentos químicos observados.

Apesar do espectro de RMN- ^1H o criptato de Li^+ , apresentar baixa resolução dos sinais dos prótons aromáticos, seus deslocamentos e integrações indicam como correta as atribuições feitas. A principal característica deste espectro é a identificação de dois sinais referentes aos prótons $\text{CH}_2\text{-piridina}$ e $\text{CH}_2\text{-bipiridina}$ ³². Estes foram identificados como prótons axiais e equatoriais ligados aos carbonos supracitados, evidenciando uma estrutura rígida do criptato obtido. Essa rigidez reflete-se também nos prótons CH_2 e CH_3 da função éster da molécula, os quais apresentam diferentes deslocamentos químicos para a mesma função. Também foram analisados os criptatos **6-8** e, como esperado para os compostos paramagnéticos, os sinais sofrem deslocamentos e desdobramentos, apresentando-se muitas vezes sem linha de base ou com sinais negativos. Desta forma, a obtenção dos espectros dos criptatos com estas características indica a inclusão do lantanídeo na cavidade do mesmo^{33, 34}.

Espectroscopia eletrônica de absorção no UV-Visível (UV-vis)

A intensa absorção na região do ultravioleta é, geralmente, característica fundamental dos complexos com intensa luminescência na região do visível.

Os espectros de absorção de **1** e **4**, apresentam a banda de absorção em 248nm e as bandas em 244 e 286nm, respectivamente, atribuídas, às transições eletrônicas $\pi\text{-}\pi^*$ dos anéis piridínicos^{35, 36}.

Observou-se que, após a formação do $[\text{Li} \subset (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$ (Figura 2), houve uma inversão nas intensidades dos máximos das bandas (244 e 298nm), em relação a **4**, mantendo-se as posições dos deslocamentos. Este fato é um indicativo de coordenação dos ligantes ao íon Li^+ . Após a complexação dos íons lantanídeos, observa-se nova inversão das intensidades dos máximos de absorção, desta vez em relação ao criptato **5** (Figura 3). Detectou-se o surgimento de um ombro na segunda banda de absorção ($\sim 290\text{nm}$), e o pequeno deslocamento das bandas de absorção observado após a coordenação a íons lantanídeos, foi anteriormente observado por Sabbatini e Guardigli³⁵.

INSERIR FIGURA 2

INSERIR FIGURA 3

Os espectros de absorção nos criptatos de Tb^{3+} e de Gd^{3+} (**7** e **8**) são semelhantes ao espectro do criptato de Eu^{3+} (**6**), com uma pequena variação nas posições dos picos de maior intensidade³⁷.

Espectroscopia Eletrônica de Luminescência

Na análise dos espectros de luminescência do complexo de Eu^{3+} , que emite predominantemente na região do vermelho, as transições mais estudadas são as que partem do nível $^5\text{D}_0$, um estado com $J=0$ e não degenerado, que não é desdobrado pelo campo cristalino. As transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$ são geralmente bem separadas e, dentre elas, as mais estudadas são as $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_{0-4}$.

Assim como nos complexos de Eu^{3+} , os complexos de Tb^{3+} apresentam bandas finas referentes às transições 4f-4f. São elas: $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_J$ ($J=0,1,2,3,4,5$ e 6), localizadas entre 480 e 640nm, sendo a mais intensa a $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$ (543nm, na região do verde) a qual é predominantemente promovida por dipolo magnético.

Espectroscopia Eletrônica de Luminescência do $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$

Os espectros de emissão, em H_2O e D_2O , foram obtidos através da excitação das amostras em 320nm, que permite obter a máxima intensidade de emissão, mantendo-se o mesmo alinhamento das amostras e as fendas utilizadas. O criptato $[\text{Eu}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (**6**) apresenta uma única linha referente à transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$, o que indicando a não existência de isômeros³⁶⁻³⁸. Analisando-se as transições do íon Eu^{3+} em **6** ($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$, $J=0,1,2,4$) e, de acordo com a literatura³⁷⁻⁴⁰, atribuiu-se a ele a simetria pontual do tipo C_3 .

Os espectros de emissão de **6** em H_2O e D_2O a 298K são semelhantes, diferenciando apenas a intensidade de emissão. Devido à diminuição dos modos vibracionais O-H das moléculas do solvente, o espectro obtido em D_2O (Figura 4) apresenta três vezes mais contagem de fótons por segundo em relação ao obtido em H_2O . A transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ não apresenta desdobramentos, enquanto as transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$ e $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$ desdobram-se em duas bandas de intensidade média, três bandas de intensidade baixa, três de média intensidade e seis bandas de média intensidade, respectivamente.

INSERIR FIGURA 4

Comparando os espectros do criptato de Eu^{3+} em ambos os solventes, a 298 e a 77K (Figura 5), verifica-se o aparecimento de linhas adicionais nas transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ e $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$, sugerindo uma mistura de isômeros conformacionais³⁶⁻³⁸.

INSERIR FIGURA 5

Espectroscopia Eletrônica de Luminescência do $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$

De modo análogo ao criptato de Eu^{3+} , os espectros do complexo $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ foram obtidos através da excitação em 320nm, mantendo fixo o alinhamento das amostras e as fendas utilizadas. Os espectros obtidos a 298K, em H_2O e D_2O (Figura 6) mostram uma intensificação da luminescência do composto em D_2O , devida também a diminuição dos modos vibracionais O-H das moléculas do solvente. Os espectros apresentam linhas de emissão características das transições $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_{6,5,4,3}$.

Com relação aos espectros de emissão realizados a 77K para o $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ (Figura 7), verifica-se um estreitamento e melhor resolução das linhas anteriormente observadas. Este fenômeno é causado pela diminuição da densidade de ocupação de fônons de baixa frequência¹⁹.

INSERIR FIGURA 6

INSERIR FIGURA 7

Espectroscopia Eletrônica de Luminescência do $[Gd\subset(bipy)_2py(CO_2Et)_2]^{3+}$

A posição do nível excitado do ligante, foi estimada no início da cauda da banda de emissão do $[Gd\subset(bipy)_2py(CO_2Et)_2]^{3+}$ (Figura 8). O valor correspondente ao estado tripleto (nível excitado do ligante de menor energia) é 23640cm^{-1} .

INSERIR FIGURA 8

Determinação dos Tempos de Vida dos estados excitados.

Ao atingir o estado excitado, uma espécie tende a retornar ao estado de mais baixa energia, seja radiativamente com emissão de fótons ou não radiativamente via relaxação multifônon, cruzamento intersistemas, conversão interna, vibrações reticulares (fônons), ou transferência de energia.

As curvas de decaimento da emissão do estado excitado 5D_4 para o criptato de Tb^{3+} foram obtidas a 298K e 77K, monitorando-se o comprimento de onda de máxima emissão ($^5D_4 \rightarrow ^7F_5$).

Os tempos de vida do criptato $[Tb\subset(bipy)_2py(CO_2Et)_2]^{3+}$ a 298K e 77K (Tabela 1) indicam grande dependência com a temperatura, concordando assim com os dados da literatura³⁵. O número de moléculas de H_2O , n , na primeira esfera de coordenação foi determinado segundo equação desenvolvida por Horrocks (Equação I)⁴¹, onde τ_{H_2O} e τ_{D_2O} , são os tempos de vida do composto em H_2O e D_2O respectivamente e, q é uma constante de valor 4,2 para compostos com íons Tb^{3+} .

$$n = q \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \right) \quad (I)$$

Tabela 1: Tempos de vida (τ) do estado excitado do criptato de Tb^{3+} , e número de moléculas de H_2O (n).

Composto	$\tau_{H_2O}(298K)$ (ms)	$\tau_{D_2O}(298K)$ (ms)	$\tau_{H_2O}(77K)$ (ms)	$\tau_{D_2O}(77K)$ (ms)	n
$[Tb\text{-(bipy)}_2\text{py(CO}_2\text{Et)}_2]^{3+}$	0,85	1,41	2,32	2,65	2

Rendimento Quântico experimental

Os rendimentos quânticos de emissão do nível 5D_0 do Eu^{3+} e 5D_4 do Tb^{3+} foram determinados utilizando como padrão $Ru(bipy)_3$ e Sulfato de Quinina para os $[Eu\text{-(bipy)}_2\text{py(CO}_2\text{Et)}_2]^{3+}$ e $[Tb\text{-(bipy)}_2\text{py(CO}_2\text{Et)}_2]^{3+}$ respectivamente. Os valores encontram-se na Tabela 2. Em ambos os casos, as medidas foram realizadas com excitação em 320nm.

Tabela 2: Rendimento Quântico dos criptatos de Eu^{3+} e Tb^{3+} em solução aquosa

Composto	Absorbância (A)	Fluxo de fótons integrado (ϕ)	$q_{298}(\%)$ ($\lambda_{exc} = 320nm$)
$*[Eu\text{-(bipy)}_2\text{py(CO}_2\text{Et)}_2]^{3+}$	0,1575	$5,24 \times 10^6$	14
$*Ru(bipy)_3$	0,1016	$6,86 \times 10^5$	2,8

**[TbC(bipy) ₂ py(CO ₂ Et) ₂] ³⁺	0,0385	338	25
**Sulfato de Quinina	0,0485	124	55
*10 ⁻⁴ M, **10 ⁻⁶ M			

O método que utiliza o Ru(bipy)₃ e o Sulfato de Quinina como padrões, apresenta um erro em torno de 10% que é igual ao do método que utiliza o Y₂O₃:Eu³⁺ como padrão⁴² e ao método desenvolvido por Bril e colaboradores⁴³, utilizado pelos laboratórios Philips Lighting (Eindhoven-Holanda).

A partir dos espectros de absorção e emissão do criptato de Gd³⁺ foi possível construir um diagrama de níveis de energia para os criptatos de Eu³⁺ e Tb³⁺ (Figura 9). O mesmo permite inferir o provável mecanismo de transferência de energia entre os estados excitados 4f do íon Eu³⁺ ou Tb³⁺ e o estado tripleto de mais baixa energia do criptato.

INSERIR FIGURA 9

O maior rendimento quântico de emissão do criptato [TbC(bipy)₂py(CO₂Et)₂]³⁺ (q=25%) em relação ao criptato [EuC(bipy)₂py(CO₂Et)₂]³⁺ (q=14%), pode ser atribuído a uma melhor transferência de energia T→⁵D₄ para o criptato de Tb³⁺ do que T→⁵D₀ para o criptato de Eu³⁺ devido às posições dos níveis excitados do Tb³⁺ em relação ao primeiro tripleto do ligante. Podemos sugerir também que a retrotransferência seja maior no criptato de Eu³⁺.

Sabe-se que a posição dos tripletos (T) é um dos fatores importantes na determinação do rendimento quântico de um criptato. Conforme observado experimentalmente por Latva e colaboradores⁴⁴, uma maior distância entre o nível tripleto

do ligante e o nível emissor do íon Tb^{3+} implica no aumento do rendimento quântico observado, diferentemente do comportamento observado para os criptatos de Eu^{3+} , quando o aumento do rendimento quântico é tanto mais acentuado quanto maior a ressonância entre esses níveis.

CONCLUSÃO

Foram sintetizados novos criptatos $[\text{Ln}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ ($\text{Ln}=\text{Eu}^{3+}$, Tb^{3+} e Gd^{3+}), que atuam como dispositivos moleculares conversores de luz (**DMCL**). A estrutura dos criptatos foi determinada a partir dos espectros vibracionais na região do infravermelho e dos espectros de ressonância magnética nuclear dos ligantes e do criptato de Li^+ ($[\text{Li}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$).

A coordenação dos íons lantanídeos aos criptatos foi sugerida pelos espectros eletrônicos de absorção UV-visível, os quais apresentaram inversão de intensidades nas bandas referentes aos ligantes livres. Nos espectros vibracionais na região do IV, a coordenação também foi sugerida, pelos deslocamentos dos estiramentos C-H e C=N.

Os espectros de emissão dos criptatos, em H_2O e D_2O , foram obtidos através da excitação das amostras em 320nm onde apresentaram a máxima intensidade de emissão. Analisando as transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$, $J=0,1,2,4$, atribuiu-se ao criptato de Eu^{3+} a simetria pontual do tipo C_3 . Os estudos espectroscópicos mostraram que o criptato $[\text{Tb}(\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ tem maior rendimento quântico de emissão ($q=25\%$) quando comparado com o criptato de Eu^{3+} ($q=14\%$). Este fato foi atribuído a uma melhor transferência de energia $\text{T} \rightarrow ^5\text{D}_4$ para o criptato de Tb^{3+} do que $\text{T} \rightarrow ^5\text{D}_0$ para o criptato de Eu^{3+} devido às posições dos níveis excitados destes íons em relação ao nível tripleto de

menor energia do ligante (23640cm^{-1}), o qual foi determinado a partir do espectro de emissão do criptato de Gd^{3+} .

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências brasileiras de financiamento CNPq, CAPES e PRONEX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lehn, J. -M. *Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspectives*, VCH-Weinheim, 1995.
- [2] Alexander, V.; *Chem. Rev.* **1995**, 95, 273.
- [3] Lehn, J. -M.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1304.
- [4] Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Manet, I.; Ungaro, R.; Casnati, A.; Ziessel, R.; Ulrich, G.; Asfari, Z.; Lehn, J. -M.; *Pure & Appl. Chem.* **1995**, 67, 135.
- [5] Klein, J. L.; Lechner, P. K.; Callahan, K. M.; Kopher, K. A.; Order S. E., *Antibody, Immunoconjugates, Radiopharm.* **1988**, 1, 55.
- [6] Parker, D.; Morphy, J. R.; Karl, J.; Jonathan, C.; *Pure & Appl. Chem.* **1989**, 61, 1637.
- [7] Raicle, M. E.; *Adv. Chem. Ser.* **1981**, 197, 419.
- [8] Loch, C.; Maziere, B.; Comar, D.; *J. Nucl. Med.* **1981**, 21, 171.
- [9] Partain, C. L.; James, A. E.; Rollo, F. D.; Price, R. R.; *Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Imaging*, W. B. Saunders, 1983.
- [10] Tweedle, M. F.; Bünzli, J. C.; Choppin, G. R.; *Lanthanide Probes In Life, Chemical, and Science*, Elsevier, 1989.

- [11] Lauffer, R. B.; *Chem. Rev.* **1987**, 87, 901.
- [12] Kumar, K.; Tweedle, M. F.; *Pure & Appl. Chem.* **1993**, 65, 515.
- [13] Taylor, D. L.; Waggoner, A. S.; Murphy, R. F.; Lanni, F.; Birge, R. R.; *Applications of Fluorescence in Biomedical Sciences*, Eds. A. R. Liss Inc, 1986.
- [14] Lopez, E.; Chypre, C.; Alpha, B.; Mathis, G.; *Clin. Chem.* **1993**, 39, 196.
- [15] Mathis, G.; *Clin. Chem.* **1993**, 39, 1953.
- [16] Mathis, G.; *Clin. Chem.* **1995**, 41, 1391.
- [17] Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Manet, I.; Ziessel, R.; Lehn, J. -M.; *Méd. Biol. Environn.* **1995**, 23, 101.
- [18] Lehn, J. -M.; *Acc. of Chem. Res.* **1978**, 11-2, 49.
- [19] Blasse, G.; Dirksen, G. J.; Sabbatini, N.; Perathoner, S.; Lehn, J. -M.; Alpha, B.; *J. Phys Chem.-US.* **1988**, 92, 2419.
- [20] Galaup, C.; Azéma, J.; Tisnes, P.; Picard, C.; Ramos, P.; Juanes, O.; Brunet, E.; Rodríguez-Ubis, J. C.; *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 1613.
- [21] Alpha-Bazin, B.; Bazin, H.; Boissy, L.; Mathis, G.; *Anal. Biochem.* **2000**, 286, 17; Samiotani, M.; Atkowski, M. K.; Ylitalo N.; Landegren, U.; *Anal. Biochem.* **1997**, 253, 156.
- [22] Walter, N. G.; Yang, N.; Burke, J. M.; *J. Mol. Biol.* **2000**, 298, 539; Geyer C. R.; San, D.; *J. Mol. Biol.* **1998**, 275, 483.
- [23] Galaup, C., *Tese de Doutorado*, Université Paul Sabatier, Toulouse – França, 1997.
- [24] Lehn J. -M.; Regnouf de Vains, J. -B.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2209.
- [25] Alpha, B.; Anklam, E.; Deschenaux, R.; Lehn, J.-M.; Pietraskiewicz, M.; *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 2264.
- [26] Lehn, J.-M.; Pietraskiewicz, M.; Karpiuk, J.; *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 106.
- [27] Boekelheide, V.; Linn, W. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 1286.

- [28] Rodríguez-Ubis, J.-C.; Alpha, B.; Plancherel, D.; Lehn, J.-M.; *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 2264.
- [29] Newkome, G. R.; Pappalardo, S.; Gupta, V. K.; Fronczek, F. R.; *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4848.
- [30] Joshi, K. C.; Pathak, V. N.; Bhargava, S.; *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1977**, *39*, 803.
- [31] Trikha, A. K.; Dilbagi, K.; *J. Fluorine Chemistry* **1993**, *62*, 139.
- [32] Caron, A.; Guilhelm, J.; Riche, C.; Pascard, C.; Alpha, B.; Lenh, J. -M.; Rodríguez-Ubis, J. -C.; *Helv. Chem. Acta* **1985**, *68*, 1577.
- [33] Gansow, O. A.; Pruett, D. J.; Triplett, K. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4408.
- [34] Alpha, B.; Lenh, J. -M.; Mathis, G.; *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 266.
- [35] Sabbatini, N.; Guardigli, M.; *Coordination Chemistry Reviews* **1993**, *123*, 201.
- [36] Galaup, C.; Carrié, M. -C.; Tisnès, P.; Picard, C.; *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2165.
- [37] Blasse, G.; Dirksen, G. J.; Van Der Voort, D.; Sabbatini, N.; Perathoner, S.; Lenh, J. -M.; Alpha, B.; *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *146*, 347.
- [38] Azéma, J.; Galaup, C.; Picard, C.; Tisnès, P.; Ramos, P.; Juanes, O.; Rodríguez-Ubis, J. -C.; Brunet, E.; *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2673.
- [39] Longo, R.; Silva, F. R. G.; Malta, O. L.; *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *328*, 67.
- [40] Galaup, C.; Picard, C.; Cathala, B.; Cazaux, L.; Tisnès, P.; Antiero, H.; Aspe, D.; *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 543.
- [41] Horrocks Jr., W. deW.; Sudinck, D. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 334.
- [42] Donegá, C. M.; Ribeiro, S. J. L.; Blasse, G.; *J. Phys. Chem. Sol.* **1996**, *57*, 1727.
- [43] Birll, A.; Jager-Veenis, W.; *J. Res. Nat. Bureau Stand* **1976**, *80A*, 401.
- [44] Latva, M.; Takalo, H.; Mukkala, V. -M.; Matachescu, C.; Rodríguez-Ubis, J. -C.; Kankare, J.; *J. of Luminescence* **1997**, *75*, 149.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ligantes precursores e criptatos sintetizados.

Figura 2: Espectro de absorção do $[\text{Li} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^+$.

Figura 3: Espectro de absorção do $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$.

Figura 4: Espectro de emissão do $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 298K.

Figura 5: Espectro de emissão do $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 77K.

Figura 6: Espectro de emissão do $[\text{Tb} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 298K.

Figura 7: Espectro de emissão do $[\text{Tb} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em D_2O a 77K.

Figura 8: Espectro de emissão do $[\text{Gd} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ em H_2O a 77K.

Figura 9: Diagramas de níveis de energia do ligante e dos criptatos $[\text{Eu} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$ e $[\text{Tb} \llcorner (\text{bipy})_2\text{py}(\text{CO}_2\text{Et})_2]^{3+}$. Para simplificação, estão mostrados apenas os estados excitados de interesse e as larguras das transições foram omitidas para melhor visualização.

FIGURA 1

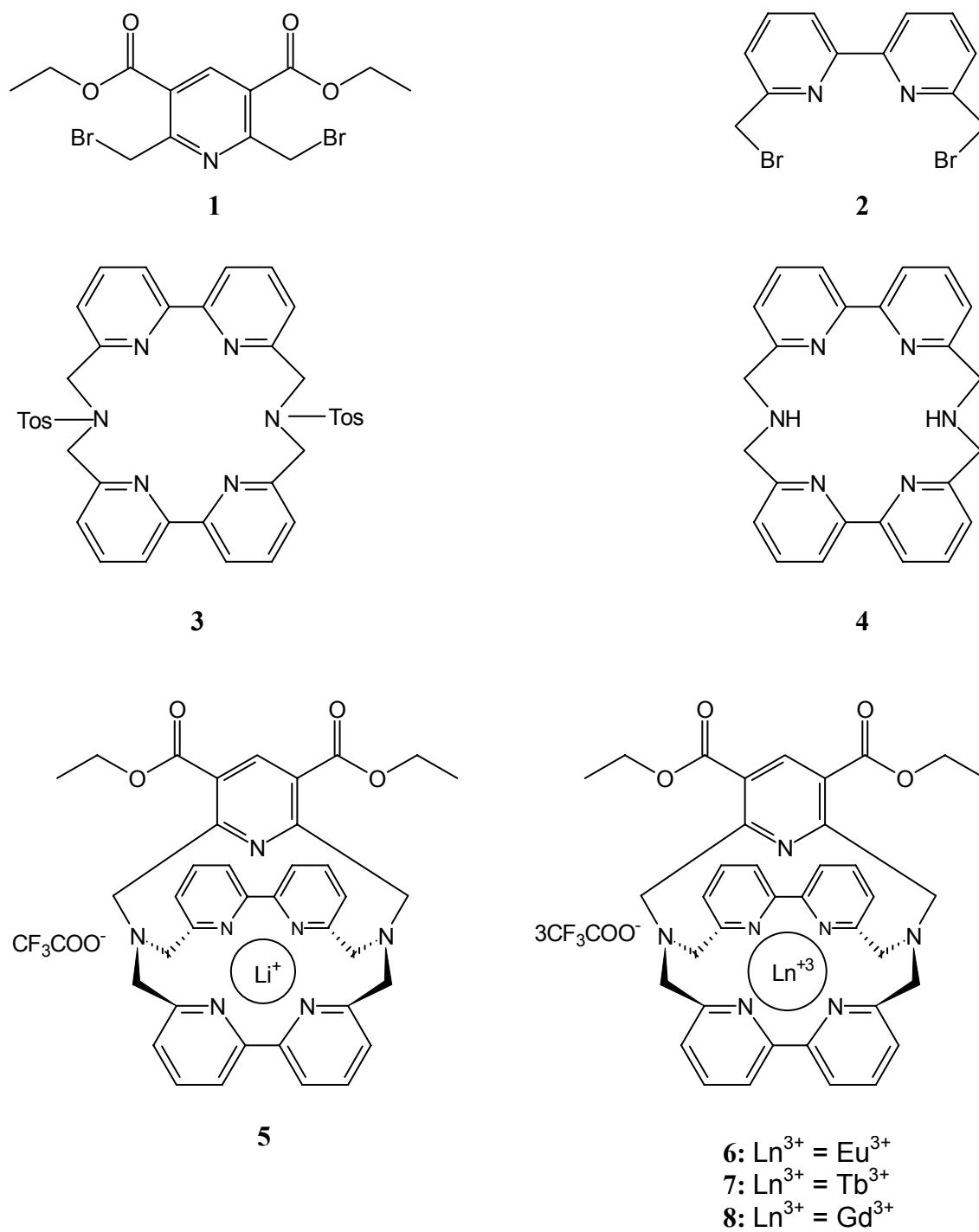


FIGURA 2

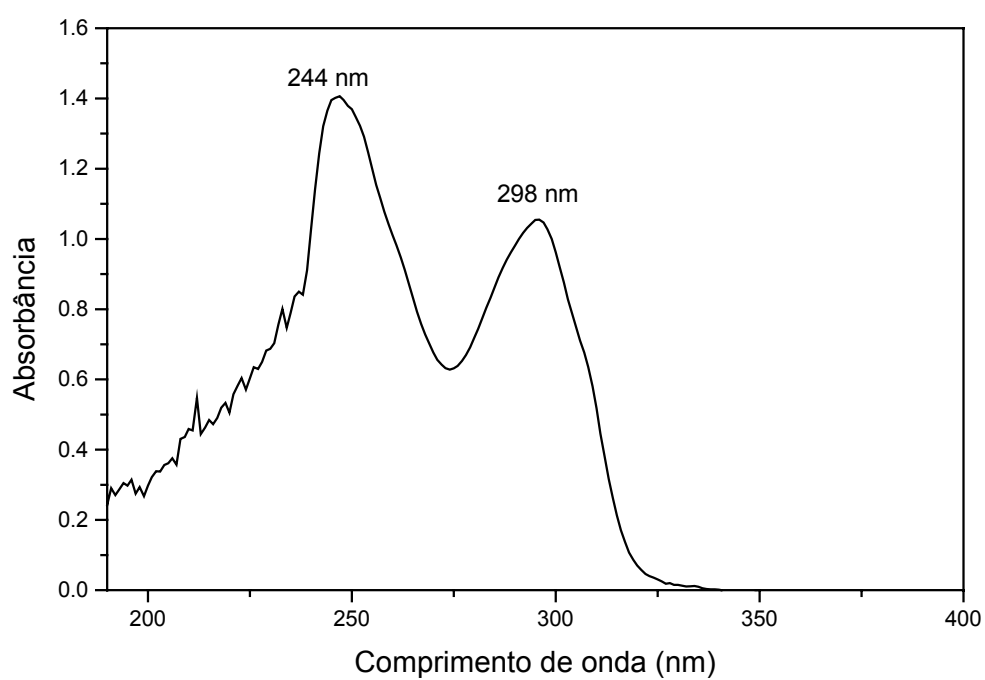


FIGURA 3

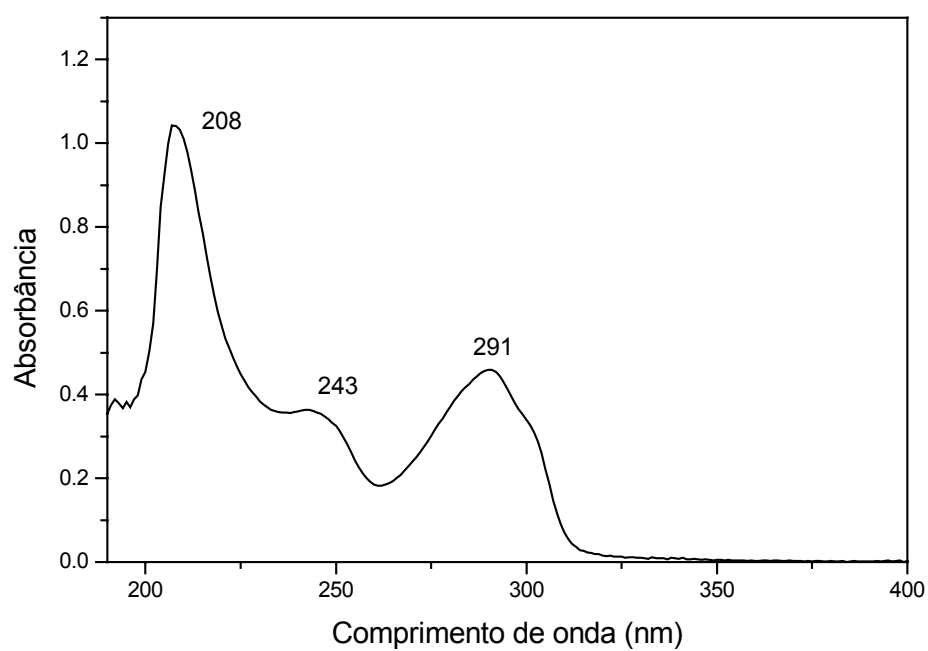


FIGURA 4

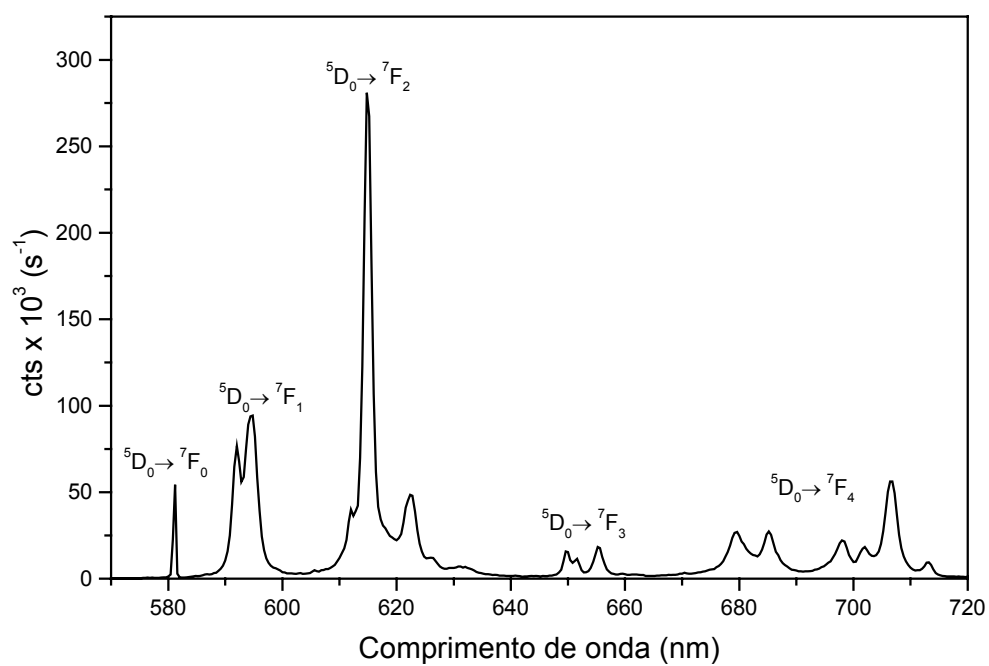


FIGURA 5

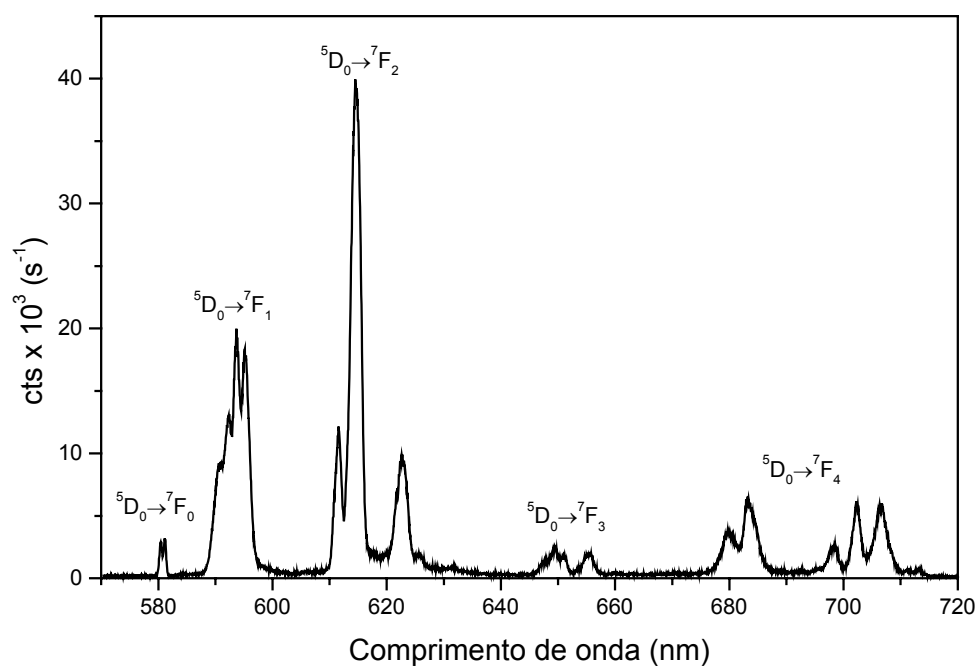


FIGURA 6

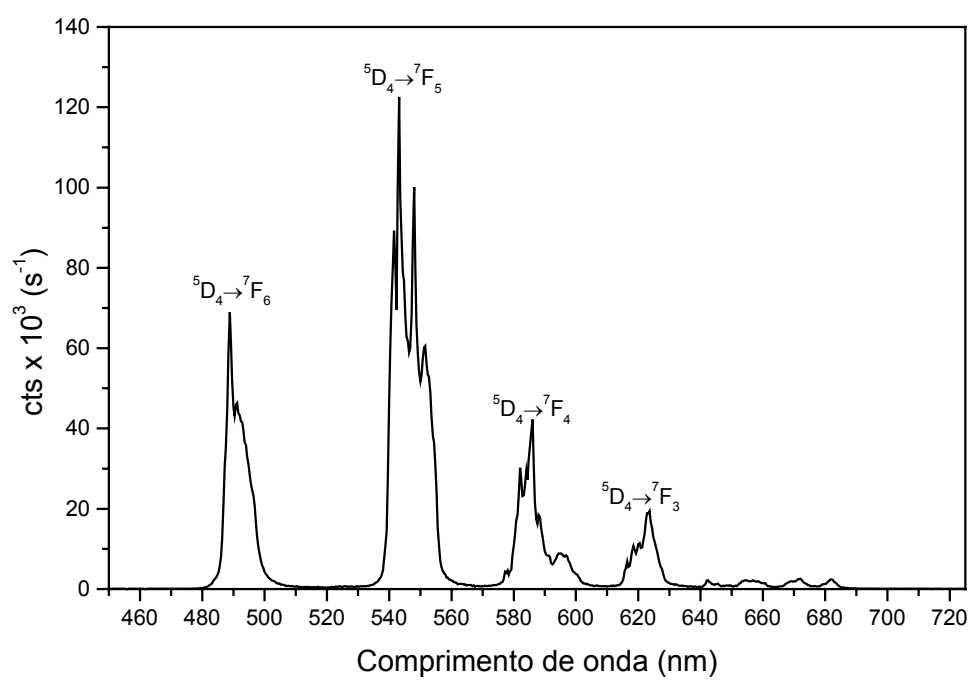


FIGURA 7

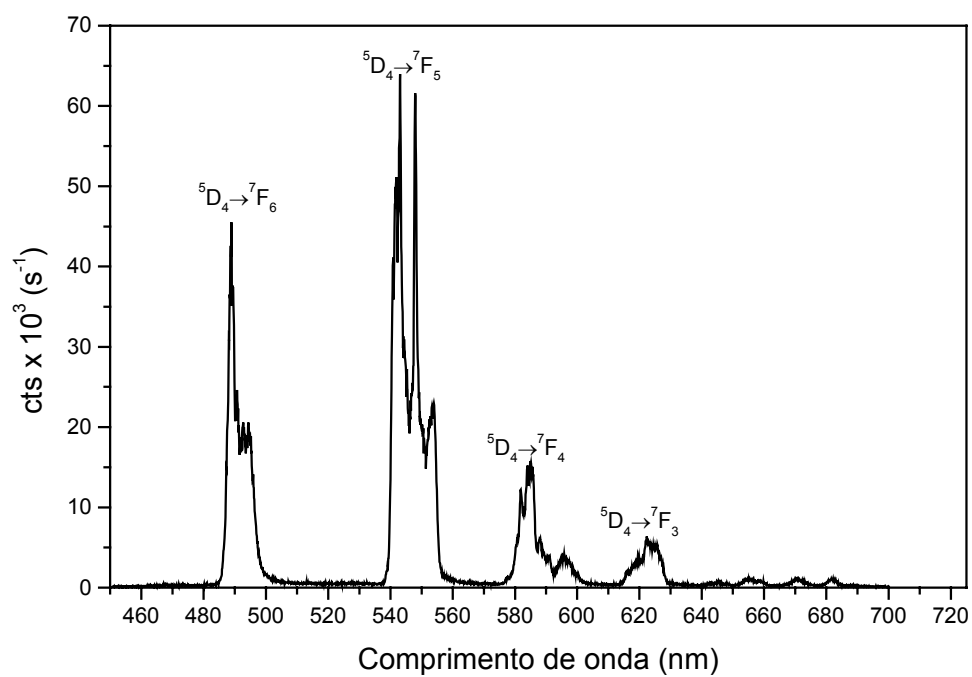


FIGURA 8

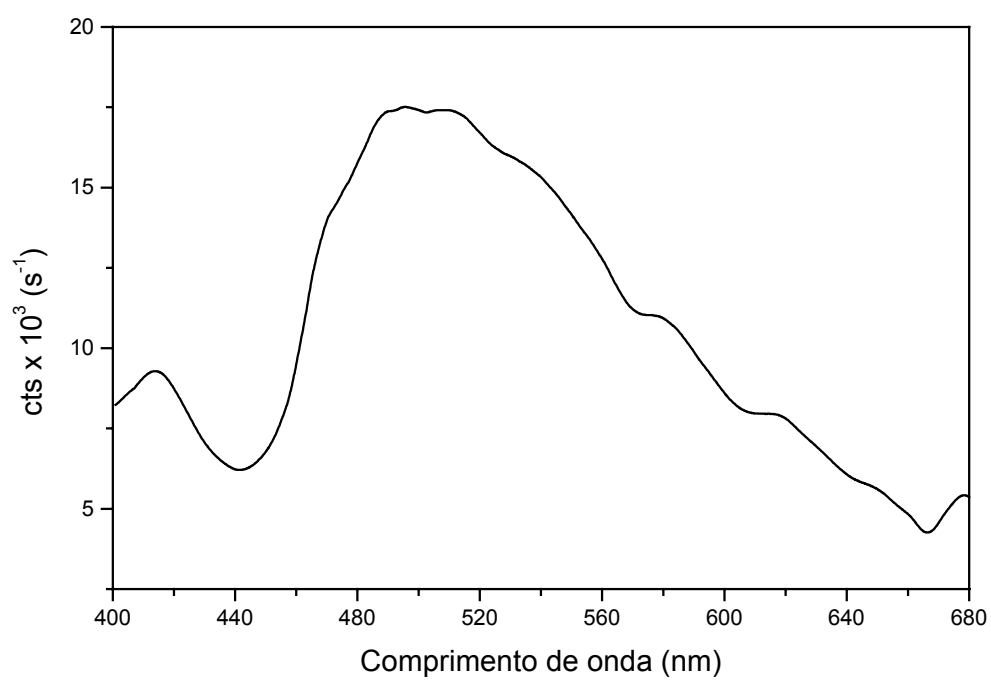


FIGURA 9

