

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer às pessoas que tornaram esta tese possível, que dedicaram o seu tempo e esforço no seu aperfeiçoamento e que me fizeram acreditar que seria possível, nomeadamente a Prof. Sílvia Chaves e a Prof. Maria Amélia Santos. Gostaria de agradecer em particular à minha orientadora, a Prof. Sílvia Chaves, não só por toda a aprendizagem que me proporcionou, como também pela sua disponibilidade, compreensão e amizade.

Em relação à minha experiência internacional, gostaria de agradecer ao meu co-orientador, o Prof. Paolo Zatta, por me ter dado a conhecer um pouco mais acerca da área da biologia. Queria também mencionar o Prof. Plínio di Bernardo, pelos estudos com os lantanídeos, uma parte muito importante da minha tese. O seu apoio e o do seu colaborador (Prof. Luigi Zanonato) foram muito importantes em terras italianas.

É muito importante o reconhecimento de que nada disto seria possível de alcançar sem todos os professores que me leccionaram ao longo destes anos. Entre eles, não poderia deixar de agradecer à professora Matilde, por toda a dedicação ao curso e aos seus alunos.

No laboratório, um especial obrigado à Marta, ao Sérgio e à “Dona” Fernanda, pelos ensinamentos e momentos descontraídos que me proporcionaram.

Aos colegas de curso. Todos aqueles que não estando tão próximos de mim fizeram com que esta experiência fosse única, obrigada.

Aos amigos. Amigos de curso e amigos exteriores ao curso, um muito obrigado. Por me terem abraçado, tanto na alegria como na tristeza. Um especial obrigado à Shrika, Graça, “Joaninha”, Marta, Catarina, Leila, Tânia Ribeiro e Tânia Farinha, ao Carlos, ao Rui e ao Pedro.

Ao Bruno, obrigado. A tua presença foi muitíssima importante.

A minha família é a parte mais importante de tudo isto. Ao meu pai e à minha mãe, não sei como vos agradecer o facto de me terem dado asas para chegar aqui. Não seria nada sem vós. O exemplo que me deram seguir-me-á para sempre.

Ao meu irmão, à sua mulher e aos meus sobrinhos, ao Pedro e à Susana, às minhas avós. A todos estes, obrigado.

Resumo

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos vários esforços no sentido de pesquisar e desenvolver novos agentes quelantes metálicos, para aplicação em medicina, nomeadamente em terapia de quelação e técnicas de diagnóstico. Assim, neste trabalho analisou-se a capacidade quelante de um novo composto – NTP(PrHP)₃, resultante do acoplamento de três unidades 3-hidroxi-4-piridinona a um suporte derivado do ácido nitrilotripropiónico. O composto NTP(PrHP)₃ foi estudado na presença de diversos iões metálicos, tais como o gálio e lantanídeos. Com efeito, este tipo de complexos pode ser usado como agente de contraste em técnicas de radiodiagnóstico PET e SPECT, bem como em MRI.

Foi também avaliado o comportamento *in vivo* do radiocomplexo ⁶⁷Ga/NTP(PrHP)₃, com o objectivo de testar a sua potencial aplicação em SPECT.

Os estudos em solução foram efectuados por potenciometria e espectrofotometria tendo sido determinadas as constantes de estabilidade dos vários complexos formados e os respectivos modos de coordenação.

O ligando demonstrou elevada afinidade pelos metais estudados, formando complexos 1:1 (metal:ligando) e também complexos 1:2 no caso dos iões lantanídios La, Pr e Gd. Em qualquer destes compostos não se verificou a intervenção do átomo de azoto apical na coordenação ao ião metálico, sendo esta exclusivamente feita através das unidades do tipo hidroxipiridinona dos braços do composto.

Os estudos *in vivo* do radiocomplexo de ⁶⁷Ga, demonstraram que existe uma boa excreção do complexo e que passadas 24h após a sua injeção, todos os órgãos se encontravam limpos de composto.

Uma série de compostos bidentados, derivados de hidroxipiridinonas funcionalizadas no átomo de azoto piridínico foram também estudados em células de neuroblastoma humano, em termos da sua toxicidade, interacção com o ADN, capacidade de alteração da morfologia das células ou a fluidez da membrana. Verificou-se que nenhum dos compostos era tóxico, alguns deles induzindo mesmo o aumento da viabilidade celular. Os restantes estudos biológicos efectuados, demonstraram igualmente não existir qualquer alteração do DNA, da morfologia das células ou das propriedades químicas da membrana biológica.

Palavras-chave: 3-hidroxi-4-piridinonas, agentes quelantes, agentes de diagnóstico, Gálio, Lantanídios, estudos biológicos.

Abstract

A considerable research effort has been made in the discovery and development of new chelating agents for medical applications, including chelation therapy and diagnostic imaging techniques. Herein, the chelating capacity of a new compound – NTP/PrHP)₃, resulting from the attachment of three 3-hydroxy-4-pyridinone units in a nitrilopropionic acid skeleton, was evaluated. Complexation studies in the presence of several metals ions, namely gallium and lanthanides was performed by potentiometric and spectrophotometric techniques and the stability constants and coordination modes of the complexes determined. These types of complexes can be used as contrast agents in radiodiagnostic techniques such as PET and SPECT as well as in MRI.

The *in vivo* behaviour of the radiocomplex ⁶⁷Ga/NTP(PrHP)₃ was also tested, in order to estimate his potential application in SPECT.

NTP(PrHP)₃ shows high affinity for the metals studied, forming 1:1 complexes (metal:ligand) and also 1:2 complexes for the lanthanide ions La, Pr and Gd. The interaction to the metal ion is done through the hydroxypyridinone units and does not involve the nitrogen atom of the skeleton.

The *in vivo* studies with ⁶⁷Ga showed a good excretion of the compound after 24h of injection, with almost all the radioactivity being cleared off from tissues and organs.

A series of N-functionalized bidentate 3-hydroxy-4-pyridinone chelators were also biologically evaluated in terms of toxicity, DNA interaction and capacity of altering cells morphology or membrane fluidity. It was found that none of the compounds studied was toxic and by the contrary, some of them increased the cell viability, depending on their chemical and lipophilic proprieties associated to the side chain, strategically added to the hydroxypyridinone structure.

Keywords: 3-hydroxy-4-pyridinones, chelating agents, diagnostic agents, gallium, lanthanides, biological studies.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas	IX
Lista de Abreviaturas	X
1. Introdução	1
1.1. Papel da Química Inorgânica em Medicina.....	1
1.2. Terapia de quelação	2
1.2.1. Pesquisa de agentes quelantes de ferro (III)	2
1.3 Hidroxipiridinonas e a quelação do ferro(III)	3
1.4. Hidroxipiridinonas como agentes anti-oxidantes e anti-neurodegenerativos ...	6
1.5. Complexos de Hidroxipiridinonas como Agentes de Diagnóstico	7
1.5.1. Metais usados em técnicas de diagnóstico	8
1.5.2. Propriedades dos complexos metálicos usados como agentes de radiagnóstico em PET e CG	9
1.5.2.1. Complexos de Gálio	10
1.5.3. Propriedades dos complexos metálicos usados como agentes de contraste em MRI	11
1.5.3.1. Complexos de Gadolínio	12
1.5.3.2. Complexos de outros metais lantanídeos	14
1.6. Âmbito do presente trabalho	14
2. Resultados e Discussão	18
2.1. Estudos de complexação com o ligando NTP(PrHP) ₃	18
2.1.1 Comportamento ácido-base do NTP(PrHP) ₃	18
2.1.2. Complexação com Ga(III)	22
2.1.3. Estudos com ⁶⁷ Ga	25
2.1.4. Complexação com Lantanídeos	28
2.2. Testes Biológicos	36
2.2.1. Ensaio de toxicidade e morfológicos	36
2.2.1.1. Composto (1)	37
2.2.1.2. Composto (2)	38
2.2.1.3. Composto (3)	38

2.2.1.4. Composto (4)	40
2.2.1.5. Composto (5)	40
2.2.1.6. Composto (6)	41
2.2.1.7. Composto (7)	42
2.2.1.8. Composto (8)	43
2.2.1.9. Composto (9)	44
2.2.2. Interação com as moléculas de ADN	46
2.2.3. Alteração das propriedades físicas da membrana plasmática.....	48
2.3. Conclusões	31
3. Parte Experimental	53
3.1. Estudos de complexação do NTP(PrHP)3 com Gálio e Lantanídeos	53
3.1.1. Complexação com Gálio	53
3.1.1.1. Reagentes e Soluções	53
3.1.1.2. Aferição das soluções de HCl e de KOH	53
3.1.1.3. Titulações potenciométricas	53
3.1.1.4. Titulações espectrofotométricas	54
3.1.1.5. Complexos de ⁶⁷ Ga	55
3.1.1.5.1. Reagentes e soluções	55
3.1.1.5.2. Estudos de Biodistribuição e Cintigrafia gama	55
3.1.2. Complexação com Lantanídeos	56
3.1.2.1. Reagentes e Soluções	56
3.1.2.2. Aferição das soluções de HCl e de KOH	56
3.1.2.3. Titulações potenciométricas	56
3.2. Estudos Biológicos	57
3.2.1. Reagentes utilizados	57
3.2.2. Cultura Celular	57
3.2.3. Reposição do meio	57
3.2.4. Ensaio de Toxicidade	58
3.2.4.1. Plantação das células numa placa de "96 Poços"	58
3.2.4.2. Mudança de meio na placa e tratamento com os compostos em estudo	59
3.2.4.3. Dieta MTT	60
3.2.5. Estudos Morfológicos	60
3.2.6. Testes de fragmentação de ADN	61
3.2.7. Estudos de alteração das propriedades físicas da membrana plasmática	63

4. Métodos e programas	64
4.1. Potenciometria	64
4.2. Espectrofotometria de UV/Vis	66
4.3. Cálculo das constantes de equilíbrio	67
4.4. Estudos Biológicos	68
4.4.2. Estudos Morfológicos	69
4.4.3. Estudo da Interação com moléculas de ADN	70
4.4.4. Estudos de alteração das propriedades físicas da membrana plasmática	70
4.5. Programas de aquisição e tratamento de dados experimentais	72
4.5.1. Método de Gran e Programa RESULT	72
4.5.2. Programas PASAT e HYPERQUAD	73
4.5.3. Programa PSEQUAD	74
4.5.4. Programa HYSS	75
5. Bibliografia	76
Anexo	80

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura do sideróforo desferrioxamina-B.	2
Figura 2: Estrutura geral dos compostos do tipo 3-hidroxi-4-piridinona.	4
Figura 3: Reacções ácido base associadas à unidade 3-hidroxi-4-piridinona.	4
Figura 4: Ciclo de formação de radicais hidroxilo.	6
Figura 5: Representação esquemática da estratégia bifuncional.	9
Figura 6: Parâmetros que influenciam a relaxatividade das moléculas de água.	13
Figura 7: Agentes de contraste MRI comerciais, baseados em complexos de Gd(III) com ligandos poli(aminocarboxilato) ⁴⁶	13
Figura 8: Composto tris-hidroxipiridinona em estudo – NTP(PrHP) ₃	15
Figura 9: Curva correspondente à titulação potenciométrica do ligando NTP((PrHP) ₃ (C _L =1×10 ⁻³ M).	19
Figura 10: Diagrama de distribuição de espécies para o composto NTP(PrHP) ₃ e absorvidades molares a 280 e 310 nm (C _L = 5.35 ×10 ⁻⁵ M).	20
Figura 11: Espécies protonadas predominantes do NTP(PrHP) ₃ , para pH entre 5 – 8.	21
Figura 12: Espectros de absorção molecular do ligando NTP(PrHP) ₃ para pH entre 0.8 e 10.	21
Figura 13: Diagrama de distribuição de espécies para o sistema Ga ³⁺ /NTP(PrHP) ₃ e absorvidades molares a 278 e 299 nm. (C _L /C _M = 1, C _L = 5.3 ×10 ⁻⁵ M).	23
Figura 14: Estrutura dos vários complexos de NTP(PrHP) ₃ com Ga(III).	24
Figura 15: Espectros de absorção molecular do ligando NTP(PrHP) ₃ na presença de Ga(III), para pH entre 0.8 e 6 (C _L =5.35×10 ⁻⁵ M, C _L /C _M =1).	25
Figura 16: Imagem de Cintigrafia, obtida 24h após a injeção de [⁶⁷ Ga]-NTP(PrHP) ₃ (ratos Wistar), verificando-se que o composto já se encontra na bexiga.	26
Figura 17: Biodistribuição do complexo [⁶⁷ Ga] – NTP(PrHP) ₃ em ratos Wistar (N=4-6) aos 30 min, 60 min e 24h após injeção intra-venosa de composto. (resultados expressos em percentagem de dose injectada por grama de órgão (%ID/g)).	26
Figura 18: Curvas de actividade/tempo obtidas a partir da aquisição dinâmica de imagens, de diferentes áreas de interesse.	27
Figura 19: Curvas de titulação do ligando sozinho (curva a) e na presença dos iões metálicos na proporção estequiométrica 1:1.	29
Figura 20: Estruturas prováveis para os diferentes complexos de lantanídeos.	30
Figura 21: Diagrama de distribuição de espécies do Sistema La ³⁺ - NTP(PrHP) ₃ 1:2.	31
Figura 22: Diagrama de distribuição de espécies do sistema Gd ³⁺ - NTP(PrHP) ₃ 1:2.	32
Figura 23: Diagrama de distribuição de espécies do sistema Er/tris 1:1.	33
Figura 24: Gráfico de log β _{MHL} dos complexos formados versus r ⁻¹ dos metais lantanídeos em estudo.	34
Figura 25: Imagem obtida por S.E.M., das células tratadas com (1). (C _{composto} = 100µM).	37
Figura 26: Imagem obtida por S.E.M., das células tratadas com (3). (C _{composto} = 100µM).	40
Figura 27: Imagem obtida por S.E.M., das células tratadas com (7). (C _{composto} = 100µM).	43
Figura 28: Imagem obtida por S.E.M., das células tratadas com (8). (C _{composto} = 100µM).	44

Figura 29: Imagens obtidas por S.E.M., das células tratadas com (9) . A imagem da direita corresponde a um zoom da figura A. ($C_{\text{composto}} = 100\mu\text{M}$).....	45
Figura 30: Gel de agarose para os compostos estudados solúveis em: A – água, B – etanol, C – DMSO..	47
Figura 31: Imagem por S.E.M. dos lipossomas usados como modelo da membrana plasmática	48
Figura 32: Representação gráfica da curva de anisotropia de fluorescência dos lipossomas DMPC/DPH na presença dos: composto (2), (4) e (6).....	49
Figura 33: Placa de 96 poços onde se cultivam as células para os ensaios de toxicidade.	59
Figura 34: Placa de 6 poços, onde se plantam as células para os ensaios de S.E.M.	61
Figura 35: Abertura do anel de tretazol da molécula de MTT, devido á acção da succinato-desidrogenase mitocondrial.	68
Figura 36: Estrutura dos fosfolípidos constituintes da membrana dos lipossomas usados como modelo da membrana plasmática.	71
Figura 37: Estrutura da sonda fluorescente DPH.	71
Figura 38: Prato de 96 poços onde foram semeadas as células.....	81
Figura 39: Câmara de Burker, onde se efectuou a contagem do número de células.....	81

Índice de Tabelas

Tabela 1: Valores de pK_{a_1} e pK_{a_2} de alguns compostos derivados de 3,4-HP ²	5
Tabela 2: Valores das constantes de acidez de 1,2-HP, 3,2-HP e 3,4-HP, bem como respectivas constantes de estabilidade dos complexos de Fe(III) (β_{FeL_3}) ²	5
Tabela 3: Constantes de protonação ($\log K_i$) do ligando NTP(PrHP) ₃ , constantes de estabilidade dos respectivos complexos de Gálio ($\log \beta_i$) e pGa.	19
Tabela 4: Valores de pGa para o ligando NTP(PrHP) ₃ e outros compostos,	25
Tabela 5: Constantes de protonação de NTP(PrHP) ₃ e constantes de estabilidades dos complexos com os diferentes iões lantanídeos.	28
Tabela 6: Resultados obtidos nos ensaios de toxicidade com os compostos em estudo. R corresponde ao grupo lateral ligado ao azoto piridínico.	36
Tabela 7: Solventes utilizados na preparação das diferentes soluções dos vários compostos em estudo.	59

Lista de Abreviaturas

A	Absorvância
a	Absortividade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
b	Percurso óptico (cm)
Bq	Becquerel – unidade de radioactividade ($1 \text{ Bq} = 2.70 \times 10^{-11} \text{ Ci}$)
Ci	Curie – unidade de radioactividade ($1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$)
C	Concentração (mol L^{-1})
c.d.o	Comprimento de onda (nm)
C_a	Concentração de ácido
C_b	Concentração de base
CG	Cintigrafia Gama
C_L	Concentração de ligando
C_M	Concentração de metal
CMC	Concentração micelar crítica
DA	Doença de Alzheimer
DFO	Desferrioxamina
DFP	Deferriprona (DMHP)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMPC	dimiristoil-fosfatidilcolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOTA	Tetraza ciclododecano tetracetato
DP	Doença de Parkinson
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DTPA	Dietileno triamina pentacetato
DTPA-BMA	Dietileno triamina pentacetato bismetilamida
E_a	Potencial de assimetria
ECACC	European Collection of Cell Culture
E_{cel}	Potencial da célula electroquímica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracetato
E_{ind}	Potencial do eléctrodo indicador
E_j	Potencial de junção
E^0	Potencial padrão da célula electroquímica
EOB-DTPA	Etoxi benzeno dietileno triamina pentacetato
E_{ref}	Potencial do eléctrodo de referência
F	Constante de Faraday
FBS	Soro fetal bovino
f_i	Actividade de H^+
G	Factor de correcção instrumental

ICP	Emissão de plasma acoplado induzido
ID	Dose injectada
I _{vh}	Intensidade de fluorescência emitida perpendicularmente à direcção de polarização da luz excitante
I _{vv}	Intensidade de fluorescência emitida paralelamente à direcção de polarização da luz excitante
K _a	Constante de acidez
K _i	Constante de protonação da espécie HiL
K _w	Produto iónico da água
L	Ligando
M	Molaridade (mol L ⁻¹)
M	Metal
MAO	Monoamina oxidase
mg	10 ⁻³ g
mM	10 ⁻³ mol L ⁻¹
mmol	10 ⁻³ mol
MRI	Imagiologia por ressonância magnética
MTT	dimetil-tioazolil-difenil-tetrazol
n	Nº de electrões trocados
NAD ⁺	Forma oxidada de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido)
NC	Número de coordenação
NEAA	Aminoácidos não essenciais
nm	nanómetro (10 ⁻⁹ metro)
NTP	Ácido nitrilotripropiónico
NTP's	Nucleótidos tri-fosfato
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo
P	Coeficiente de Partição octanol/água
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Tomografia por emissão de positrões
pm	Picómetro (10 ⁻¹² metro)
q	Nº de moléculas de água na esfera de coordenação interna
Q	Quociente de reacção
r	Raio iónico
R	Constante universal dos gases perfeitos
rpm	Rotações por minuto
S.E.M.	Microscopia electrónica de varrimento
SH-SY5Y	Células de neuroblastoma humano
SPECT	Tomografia de emissão de fotão único

T	Temperatura (K)
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
T_m	Temperatura de transição lipídica
TRIS	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
U.V.	Ultravioleta
V_{eq}	Volume de equivalência
VIS	Visível
V_0	Volume inicial de solução na célula potenciométrica
V_t	Volume total
(Ox)	Espécie oxidada
(Red)	Espécie reduzida
μL	10^{-6} litros
μM	10^{-6} mol L ⁻¹
1,2-HP	1-hidroxi-2-piridinona
3,2-HP	3-hidroxi-2-piridinona
3,4-HP	3-hidroxi-4-piridinona
β^+	Positrão
$\beta_{M_m H_n L_l}$	Constante de estabilidade do complexo $M_m H_n L_l$
γ	Radiação gama
τ_M	Velocidade de permuta entre moléculas de água
τ_R	Velocidade molecular do agente de contraste
τ_S	Tempo de relaxação electrónica do metal

1. Introdução

1.1. Papel da Química Inorgânica em Medicina

A *química orgânica* tem feito inúmeras contribuições para a Medicina, através da descoberta de princípios activos, do planeamento e síntese de fármacos. No entanto, a *química inorgânica* tem igualmente um papel importante, nomeadamente na pesquisa e no desenvolvimento de novos medicamentos cujo mecanismo de acção envolve a interacção de um composto orgânico com um metal. Um dos grandes desafios da química inorgânica medicinal consiste em controlar a reactividade do metal para melhorar a sua especificidade e reduzir a sua toxicidade.

Nos sistemas biológicos, os iões metálicos existem como catiões electro-deficientes, que interagem com moléculas biológicas contendo átomos dadores, tais como as proteínas e o ADN e no que diz respeito ao seu papel a nível biológico, podem ser classificados como essenciais, tóxicos ou benéficos.

Como exemplo dos metais considerados essenciais, existem o cobre, o zinco e o ferro, que desempenham papéis muitíssimo importantes nos centros activos de algumas metaloproteínas e metaloenzimas. Exemplos disso são a *citocromo c oxidase* ou a *superóxido dismutase*, com cobre no centro activo, a *anidrase carbónica* ou a *histona deacetilase* com o zinco, a *catalase* ou a *hidrogenase* com o ferro, entre muitas outras. Por outro lado, o cobre e o ferro são também elementos fundamentais no transporte e na ligação ao O₂ (hemoglobina).

Em relação aos metais tóxicos, podem citar-se exemplos como o mercúrio, o cádmio ou o chumbo, entre outros. No entanto, é também muito importante referir, que mesmo os metais essenciais, quando presentes em concentrações excessivamente elevadas, podem tornar-se tóxicos (ferro, cobre e zinco). Nestas situações de toxicidade provocada por acumulação de metais no organismo, agentes quelantes de metais são utilizados como método de desintoxicação.

No que diz respeito aos metais benéficos, podem considerar-se todos aqueles que são utilizados como agentes de diagnóstico ou terapia. No caso dos compostos usados em diagnóstico, estes são complexos metálicos cujo metal central possui propriedades adequadas que permitem visualizar lesões em tecidos e órgãos através de técnicas específicas, tais como as técnicas MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) (Ex.: Gd, Mn, Fe), PET (*Positron Emission Tomography*) (Ex.: ^{99m}Tc) ou GC (*Gamma Scintigraphy*) (Ex.: ⁶⁷Ga). Em relação aos metalofármacos utilizados em terapia, eles podem ser aplicados como agentes anti-cancerígenos (Ex.: Pt, Ru, Ti), anti-microbianos (Ex.: Zn, Cu, Ag, Hg, Bi), anti-artríticos (Ex.: Au), anti-úlceras (Ex.: Bi), anti-ácidos (Ex.: Al, Mg), entre muitos outros.

1.2. Terapia de quelação

A terapia de quelação surgiu da necessidade de eliminação de determinados metais (tóxicos ou essenciais) em excesso no organismo. Estas acumulações podem resultar de disfunções genéticas que alteram o metabolismo normal desses metais no organismo, tais como a *Hemocromatose* (acumulação de ferro no fígado, pâncreas, coração e hipófise), a *β -talassémia* (redução ou ausência de produção de hemoglobina com consequente acumulação de ferro no organismo devido à necessidade de múltiplas transfusões sanguíneas) ou a doença de *Wilson* (acumulação de cobre), mas também podem resultar de intoxicações por metais exógenos, como por exemplo, por ingestão acidental de chumbo, cádmio ou mercúrio.

Alguns dos compostos quelantes mais utilizados em terapia de quelação são o EDTA (Mg, Ca, Fe, Zn, Co, Cu, Pb, Cd, Ni), a penicilamina (Cu, Fe), a desferrioxamina (Fe, Al) e a deferriprona (Fe).

Dentro dos metais referidos, irá ser dada especial atenção ao ferro por dois motivos essenciais: a sua importância fundamental no organismo e a toxicidade que lhe está associada quando presente em elevadas concentrações, a nível da sua actuação como agente oxidante ou neurodegenerativo.

1.2.1. Pesquisa de agentes quelantes de ferro (III)

O sideróforo natural desferrioxamina B (DFO) (Figura 1) foi identificado em 1963 como sendo uma molécula que forma complexos muito estáveis com o ferro¹, podendo provocar o aumento da excreção deste metal no corpo. Um sideróforo é um composto orgânico de baixo peso molecular, produzido por bactérias, que quando excretado no meio extra-celular, capta o ferro livre com grande facilidade, formando complexos sideróforo-ferro. Estes complexos são posteriormente captados por receptores específicos presentes na superfície bacteriana, penetram a membrana e são quebrados no citoplasma para a libertação do ferro².

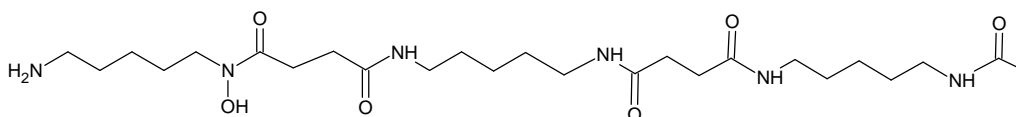


Figura 1: Estrutura do sideróforo desferrioxamina-B.

A utilização terapêutica deste sideróforo demonstrou ser bastante eficiente no tratamento de pacientes intoxicados com ferro ou alumínio, pelo que nos últimos 30 anos ele tem sido produzido e comercializado pela conhecida farmacêutica *Novartis*, sob o nome comercial de *Desferal*. No entanto, esta é uma droga que apresenta algumas desvantagens,

nomeadamente o facto de possuir elevados custos de produção (a sua extracção é feita a partir da *Streptomyces pilosus*³) e não ser biodisponível por via oral, tornando a sua administração somente possível por via intra-venosa ou subcutânea. Este último factor pode conduzir a alguma toxicidade para o doente⁴, devido à necessidade de infusão subcutânea prolongada, para atingir uma concentração adequada deste composto no plasma. Além disso, existe também alguma falta de aceitação deste composto devido às reacções locais dolorosas no local da perfusão.

Durante a pesquisa de um quelante específico e oralmente activo para o ferro que substituísse a desferrioxamina B, muitos esforços foram canalizados para a síntese de catecóis, hidroxamatos e ligandos carboxilato, uma vez que a maioria dos sideróforos naturais contém estes grupos funcionais. No entanto, cada um deste tipo de compostos possui algumas desvantagens em termos de tratamentos clínicos. Os catecóis são rapidamente oxidados no intestino⁵, além de serem de uma maneira geral fracamente absorvidos e formarem complexos de ferro(III) carregados, o que limita a permeabilidade em membranas biológicas. Possuem também uma elevada basicidade ($\log K_a = 13.3$ e 9.22), o que condiciona a sua afinidade pelos iões metálicos a pH's básicos devido á forte competição por H^+ ⁶. Os hidroxamatos são susceptíveis á acção enzimática, tornando-se inactivos quando administrados oralmente, uma vez que são hidrolisados^{7,8}. Têm uma menor afinidade por metais trivalentes do que os catecolatos, no entanto formam complexos neutros ao pH fisiológico, uma grande vantagem em termos de permeabilidade em membranas biológicas. Por fim, os carboxilatos não são suficientemente específicos para o ferro(III). Tendo em conta estas limitações, decidiu-se investigar ligandos que embora de estrutura relacionada com ambos os tipos hidroxamato e catecolato, possuam maior estabilidade relativa sob condições biológicas. Em particular, os ligandos devem ser estáveis a pH fortemente ácido e resistentes tanto á auto-oxidação como á quebra enzimática. Agentes de quelação que incluam estas propriedades são, por exemplo, as hidroxipiridinonas. Estas possuem um grupo hidroxilo em posição *orto* em relação ao grupo cetona e combinam ambas as características de catecol e de ácido hidroxâmico.

1.3 Hidroxipiridinonas e a quelação do ferro(III)

Os compostos do tipo 3-hidroxi-4-piridinona (3,4-HP) (Figura 2) podem ser funcionalizados na 1ª posição, de modo a obter uma maior actividade biológica e menor toxicidade.

A importância desta classe de compostos emergiu após a identificação, em 1982, de um composto oralmente activo pertencente ao grupo das hidroxipiridinonas (Figura 2, $R=CH_3$), a 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridinona (DMHP)⁹, que foi usado como alternativa terapêutica à desferrioxamina B, no tratamento das doenças associadas a um excesso de ferro na corrente sanguínea. A DMHP é comercializada sob o nome de Deferriprona (DFP) ou Ferriprox.

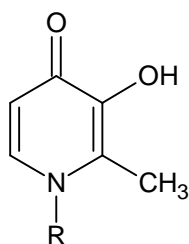


Figura 2: Estrutura geral dos compostos do tipo 3-hidroxi-4-piridinona.

As 3,4-HP's são N-heterociclos mono aniônicos, que actuam como ligandos bidentados, funcionando os dois átomos de oxigénio como bases de Lewis na captação de metais duros, tais como ferro, alumínio ou gálio. Ao contrário da DFO, um ligando hexadentado capaz de formar complexos de ferro na estequiometria 1:1, a DMHP é um quelante bidentado que dá origem a complexos de ferro na estequiometria 1:3 (metal/ligando) ao pH fisiológico.

As 3,4-HP's apresentam ainda a vantagem de poderem ser facilmente N-funcionalizadas com diferentes grupos, sem que as propriedades ácido-base (ver Figura 3 e Tabela 1) e a respectiva capacidade de complexação variem significativamente³⁰.

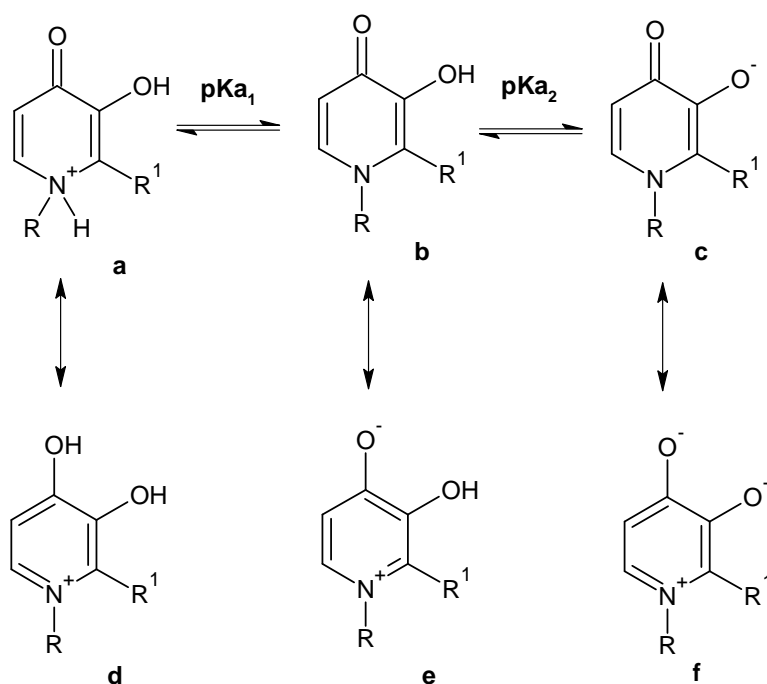
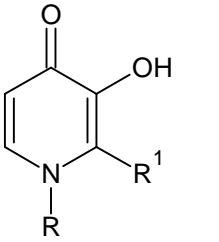


Figura 3: Reacções ácido base associadas à unidade 3-hidroxi-4-piridinona.

Com efeito, a tabela 1 mostra que os valores das constantes de protonação pK_{a1} e pK_{a2} (correspondentes ao azoto piridínico e ao grupo hidroxilo) para uma série de compostos derivados de 3,4-HP^{2,10}, com diferentes grupos R e R¹, não variam significativamente, situando-se os valores de pK_{a1} entre 3 e 3.7 e os valores de pK_{a2} entre 9 e 10.

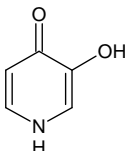
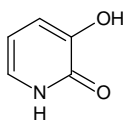
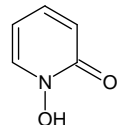
Tabela 1: Valores de pK_{a1} e pK_{a2} de alguns compostos derivados de 3,4-HP².

Unidade principal	R	R ¹	pK_{a1}	pK_{a2}
	H	H	3.34 ¹⁰	9.01 ¹⁰
	Me	H	3.70	9.76
	Me	Me	3.56	9.64
	Me	Et	3.65	9.88
	Me	nPr	3.62	9.92
	Me	nBu	3.62	9.87

O ferro(III) é um catião tripositivo, de simetria esférica e raio 0.65 Å. É classificado como sendo uma espécie dura, devido ao facto de possuir pequenas dimensões e ser fracamente polarizável, o que aumenta a sua tendência para se coordenar a bases duras, como é o caso do átomo de oxigénio. É também por esta razão que a maioria dos sideróforos naturais possuem ligandos dioxo, como no caso do catecol e do hidroxamato.

Em solução, e na presença de ferro(III) e ligando, ocorre a formação de três tipos de complexos: ML , ML_2 e ML_3 . O complexo que existe fundamentalmente a pH neutro é ML_3 , no qual o metal se encontra hexacoordenado e com o qual cada unidade hidroxipiridinona forma um anel quelante de 5 membros. As constantes de estabilidade dos complexos ML_3 são bastante elevadas para as 3,4-HP's, quando comparadas com as de compostos análogos, como 3,2-HP¹¹ e 1,2-HP¹⁰ (tabela 2), atendendo à elevada deslocalização de electrões na estrutura de ressonância f da Figura 3. É também por este motivo, que dentro das três classes de hidroxipiridinonas, a 3,4-HP é de longe a mais estudada.

Tabela 2: Valores das constantes de acidez de 1,2-HP, 3,2-HP e 3,4-HP, bem como respectivas constantes de estabilidade dos complexos de Fe(III) (β_{FeL_3})².

Ligando	pK_{a1}	pK_{a2}	$\log \beta_{FeL_3}$
3-hidroxi-4(1H)-piridinona ¹¹ 	3.6	9.6	36.9
3-hidroxi-2(1H)-piridinona ¹¹ 	----	8.8	32.3
1-hidroxi-2(1H)-piridinona ¹⁰ 	----	5.8	26.9

A grande vantagem da terapia de quelatação do ferro com hidroxipiridinonas reside no facto do ferro(III), em condições fisiológicas, formar complexos de elevada estabilidade e resistência, ficando impedido de actuar quer como agente oxidante no interior das células, provocando estragos a nível biológico, quer como agente neurodegenerativo.

1.4. Hidroxipiridinonas como agentes anti-oxidantes e anti-neurodegenerativos

O ferro desempenha uma importância crítica numa grande variedade de eventos celulares. As suas funções envolvem a coordenação ao O_2 na hemoglobina, o funcionamento como co-factor de importantes enzimas tais como a *citocromo c* e a *ribonucleótido reductase*¹², ou, por exemplo, como centro activo das enzimas *catalase* e *hidrogenase*. Devido à sua química redox simples e à grande afinidade por oxigénio, o processo de oxidação centrado no átomo de ferro pode vir acoplado a um grande leque de reacções metabólicas.

No entanto, muito embora ele seja um elemento essencial para o normal funcionamento das células vivas, o ferro “livre”, quando presente em excesso, torna-se tóxico devido à deposição deste metal em células e diversos órgãos, tais como o fígado, o pâncreas e o coração, resultando em disfunção e morte. Associado ao ferro “livre” nos tecidos, estão reacções redox e um exemplo disso é o ciclo de formação de radicais hidroxilo OH^\bullet , através da reacção de Fenton (figura 4)¹³.

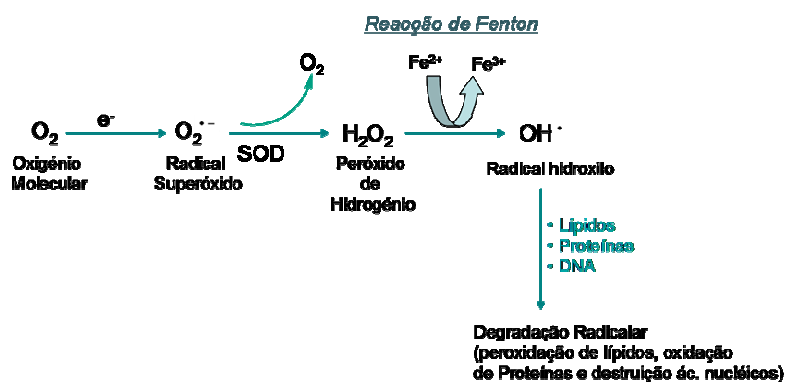


Figura 4: Ciclo de formação de radicais hidroxilo.

Uma vez formados, os radicais hidroxilo são altamente reactivos e capazes de interagir com a maior parte das moléculas biológicas, incluindo açúcares, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, resultando numa danificação dos tecidos. Por outro lado, aliada à reacção de Fenton está também a produção de Fe^{3+} , que será letal para a célula, uma vez que a redução de Fe(III) novamente a Fe(II) irá ocorrer graças a espécies redutoras endógenas no interior da célula, havendo um aumento das espécies oxidantes (como o NAD^+ ou as pontes dissulfeto), levando a danos oxidativos graves e consequente morte celular¹⁴.

Por outro lado, a acumulação de ferro está também associada a doenças de natureza neurodegenerativa, como a doença de Parkinson (DP) e a doença de Alzheimer (DA)¹⁵.

A DP é caracterizada por uma perda selectiva de neurónios dopaminérgicos da substância *nigra pars compacta*. Esta degradação pode ocorrer via auto-oxidação da Dopamina, dando origem a radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e H_2O_2 , ou por metabolização via enzimática, através da enzima monoamina oxidase (MAO), gerando H_2O_2 ¹⁶. Posteriormente, a existência de ferro “livre” em excesso no cérebro, levará à reacção de Fenton, provocando danos graves. De facto, num cérebro saudável, o nível de ferro na substância *nigra* é mais elevado do que nas outras regiões cerebrais, verificando-se um aumento significativo em doentes com a doença¹⁷, pelo que o processo de degradação neuronal ocorre com maior velocidade.

Em relação à DA, esta resulta na perda irreversível de neurónios de diversas regiões cerebrais. Como causas principais da doença estão a acumulação de proteína β -amilóide nos espaços intracelulares, interferindo na capacidade de comunicação entre as células e numa diminuição do desempenho cerebral, acoplada à formação de emaranhados neurofibrilares da proteína *tau*, dentro das células nervosas, resultando em neurodegeneração. Outro factor agravante na DA é a acumulação de iões metálicos no cérebro (Zn, Cu, Fe e Al), que alteram a agregação e conformação das plaquetas de β -amilóide, aumentando os seus efeitos neurotóxicos^{18,19}. Também está provado que a proteína β -amilóide, quando na forma complexada com o alumínio, é muito mais citotóxica do que quando não complexada. O complexo afecta a permeabilidade da barreira hematoencefálica, conseguindo um acesso directo ao interior das células cerebrais, o que não acontece com a proteína sozinha^{20,21}.

Tendo em conta as doenças genéticas associadas à acumulação de ferro e a doença de Parkinson, que também pode ser associada a um excesso deste metal no cérebro, e uma vez que o homem não possui nenhum mecanismo fisiológico de eliminação do ferro em excesso, a terapia de quelação surge como um tratamento eficaz para a remoção deste metal do corpo e, entre os possíveis agentes quelantes encontram-se as hidroxipiridinonas com as vantagens já apontadas anteriormente em relação a outro tipo de ligandos. No tratamento da acumulação de metal nos tecidos, uma vez que o ferro e o alumínio partilham algumas características, tais como a carga, o raio iónico, a afinidade por oxigénio e a ligação a proteínas, as hidroxipiridinonas, usadas na quelação de Ferro(III), podem também ser utilizadas como potenciais agentes quelantes do Alumínio(III)²², no combate à DA.

1.5. Complexos de Hidroxipiridinonas como Agentes de Diagnóstico

O uso de complexos metálicos como agentes de diagnóstico é uma área relativamente nova da medicina e que tem vindo a ser bastante explorada nos últimos 50 anos^{23,24}. De facto, hoje em dia, já existe uma grande variedade de radionuclídeos e dos seus respectivos complexos radiometálicos, usados em Cintigrafia Gama (CG) e em Tomografia por Emissão de

Positrões (PET)²⁵. Um ainda mais recente desenvolvimento em medicina está em usar complexos metálicos paramagnéticos para obter imagens de contraste em Imagiologia por Ressonância Magnética (MRI)²⁶.

A CG requer um radiofármaco que contenha um átomo que emita radiação gama (γ) e uma câmara gama ou uma câmara SPECT. SPECT é uma técnica de tomografia computadorizada por emissão de fóton único, em que uma câmara calcula a concentração e a posição dos radionuclídeos introduzidos no corpo do paciente, fazendo girar um detector de fótons em torno do mesmo. É uma técnica que utiliza a radiação ionizante dos raios gama para elaborar imagens tipicamente apresentadas como cortes transversais e sagitais do paciente.

O objectivo da técnica PET é o mesmo que o da técnica SPECT, mas em PET é necessário um radionuclídeo emissor de positrões (β^+) e uma câmara PET para formar a imagem do paciente. O decaimento de um positrão resulta na emissão de dois fótons de 511 keV de energia, emitidos em direcções opostas (ângulo das trajectórias de 180°), características estas que os permite serem especificamente detectados pelo scanner PET.

Por último, a técnica de diagnóstico por MRI explora as diferenças no tempo de relaxação dos prótons da água nos tecidos, traduzindo-os em informação anatómica a três dimensões, da distribuição de água *in vivo*.

1.5.1. Metais usados em técnicas de diagnóstico

Uma das propriedades do metal a utilizar nas técnicas de radiodiagnóstico por imagem consiste em este ter um tempo de meia vida suficientemente longo para ser possível efectuar a síntese química do radiofármaco. Por outro lado, este tempo não pode ser demasiado longo, de modo a que o metal se torne tóxico para o paciente. Os radionuclídeos usados para formar complexos de coordenação em técnicas PET e CG têm em média tempos de meia vida entre os 10 minutos (ex.: ^{62}Cu) e vários dias (ex.: ^{67}Ga), estando este valor também dependente do tempo necessário que leva o radiofármaco a localizar o tecido alvo. Nas técnicas de radiodiagnóstico são tipicamente usados metais de transição de alto peso molecular, como por exemplo o radioisótopo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. São também utilizados outros metais, como é o caso dos radioisótopos de gálio (^{67}Ga e ^{68}Ga) e ainda o ^{111}In ,

Outro importante factor na escolha do radionuclídeo está na sua disponibilidade e custo. São por isso muitas vezes usados radionuclídeos que resultam do decaimento de outros radionuclídeos que se encontram mais disponíveis. Um exemplo conhecido disso é a utilização de ^{99}Mo para gerar $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

No caso da técnica de imagiologia por MRI²⁶, não há utilização de isótopos radioactivos mas sim de metais paramagnéticos, com um elevado tempo de relaxação, que sirvam de agentes de relaxação para os prótons da água. Hoje em dia, 40 a 50% dos agentes de contraste utilizados em MRI baseiam-se em complexos com lantanídeos, nomeadamente o gadolínio.

1.5.2. Propriedades dos complexos metálicos usados como agentes de radiagnóstico em PET e CG

Inicialmente, a aplicação de complexos radiometálicos para radiodiagnóstico envolvia moléculas de pequena dimensão, cuja biodistribuição e capacidade de alcançar o tecido alvo dependiam da lipofilicidade, do tamanho e da carga do complexo. Mais recentemente, desde a descoberta dos receptores peptídicos e da síntese laboratorial de pequenos peptídeos biologicamente activos, o design de radiofármacos incorpora também propriedades bioquímicas que resultam num aumento da especificidade do radiofármaco, aquando da sua administração *in vivo*²⁷. A grande vantagem está em submeter o paciente a menores níveis de radiação, uma vez que a deposição ocorre apenas nos locais afectados pela doença. Tendo em conta isto, um radiofármaco deverá ter a capacidade de alcançar as células tumorais em quantidade suficiente e ser rapidamente eliminado do sangue e outros órgãos, de modo a minimizar os danos provocados nos tecidos saudáveis, devido à radiação. Assim, o desenvolvimento de radiofármacos para alvos específicos, através da conjugação de radionuclídeos com biomoléculas, tem tido bastante sucesso em medicina nuclear. O tamanho do complexo metálico, a distância à qual este se encontra da biomolécula e a estabilidade global do radiofármaco são factores importantes no design destes compostos. O objectivo é interferir ao mínimo com a molécula receptora alvo, ao mesmo tempo que se limita a decomposição do agente através de processos de troca de ligandos *in vivo*.

Uma das estratégias mais abordadas no design deste tipo de radiofármacos é a estratégia bifuncional²⁸ (Figura 5). Nesta, o metal radioactivo encontra-se ligado a uma biomolécula, mediante um agente quelante bifuncional, constituído por uma parte que se coordena ao radionuclídeo e outra parte, situada no lado oposto, que contém um grupo funcional para se ligar à biomolécula. Esta ligação é feita geralmente através da formação de ligações amida, tioureia, ureia, etc. É importante referir, que nesta estratégia existe um espaçador entre o segmento molecular quelante e a parte bioactiva, com o objectivo de impedir que ocorram interferências tanto na função quelante como no reconhecimento do radiofármaco por parte do receptor biológico.

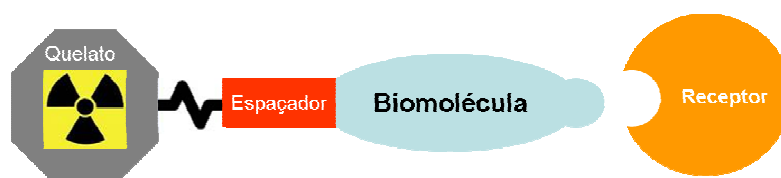


Figura 5: Representação esquemática da estratégia bifuncional

Por outro lado, o órgão ou tecido alvo irá ditar as características do composto, pelo que o aumento da selectividade dos agentes de contraste levará a uma maior sensibilidade do método e a uma detecção mais precisa. Por exemplo, sabe-se que compostos carregados

negativamente são utilizados nos rins, enquanto os carregados positivamente são usados no coração e, se o objectivo é ultrapassar a barreira hemato-encefálica, um composto neutro é necessário. Por outro lado, se o composto for lipofílico, então será mais adequada a sua aplicação no fígado e em tecidos gordos²³.

A estabilidade do complexo pode ser avaliada através do estudo dos complexos metálicos com isótopos não radioactivos, que quando posteriormente comparada com a estabilidade dos complexos com os principais ligandos endógenos, ajuda a prever o seu comportamento *in vivo*.

1.5.2.1. Complexos de Gálio

No gálio, o estado de oxidação mais comum em solução aquosa é +3. Este é também o estado mais importante na química radiofarmacêutica. A complexação do Ga(III) é dominada por ligandos contendo átomos doadores de oxigénio ou azoto, uma vez que ele é considerado um metal duro (o seu raio iónico é 62 pm²⁹ e está entre o raio iónico do Alumínio e do Ferro, também eles átomos considerados duros). Os números de coordenação possíveis nos complexos de Gálio, dependendo do ligando em causa, são 3, 4, 5 e 6, correspondendo ao Ga(III) hexacoordenado o complexo mais estável *in vivo*²³.

Sendo o potencial de ionização, raio iónico e número de coordenação do Ga(III) muito semelhantes aos do Fe(III) (e aos do Al(III)), as hidroxipiridinonas podem também ser utilizadas como quelantes do Gálio, de forma a obter complexos metálicos como agentes de contraste em radiodiagnóstico^{30,31,32}.

Existem três radioisótopos de Gálio, cujas características de decaimento são as adequadas para aplicação em CG ou PET. O ⁶⁷Ga tem um T_{1/2} de 78h e decai emitindo radiação γ , sendo usado em técnicas de CG. O ⁶⁸Ga, de T_{1/2} 68 minutos, é produzido a partir do ⁶⁸Ge, e quando ele próprio decai, emite positrões (β^+), sendo usado em técnicas PET. Por último, o isótopo ⁶⁶Ga, de T_{1/2} igual a 9.4h, emite radiação β^+ e pode ser aplicado em diagnóstico por PET mas, no entanto, é o isótopo menos utilizado dos três³³.

Existem dois requisitos no uso de complexos de Gálio como radiofármacos: estabilidade à hidrólise e maior estabilidade do que os complexos de Ga com ligandos endógenos, tais como o complexo Ga(III)-transferrina³⁴.

Em solução aquosa, o Ga(III) livre e hidratado é estável em condições ácidas, ocorrendo hidrólise e formação de Ga(OH)₃ à medida que o pH aumenta. Entre pH 3 e 9.5, o composto insolúvel produto da hidrólise forma-se mais rapidamente do que o complexo, se a velocidade com que os ligandos se coordenam ao Ga(III) for baixa. Sendo assim, o procedimento normal em ensaios clínicos passa por inicialmente utilizar um complexo do tipo GaCl₃ e, ainda a pH inferior a 3, preparar um composto de coordenação muito estável, de forma a haver uma captação total do Gálio livre em solução e não ocorrer a hidrólise do mesmo à medida que o pH sobe²³.

Devido à elevada constante de estabilidade do complexo Ga(III)-transferrina ($\log K_1=20.3$)³⁵, os radiofármacos de gálio devem também ser resistentes à troca com esta proteína no plasma. No entanto, existem complexos radiometálicos clinicamente aprovados, que tiram partido desta troca *in vivo* entre o ⁶⁷Ga e a transferrina, como é o caso do ligando citrato. O complexo ⁶⁷Ga-citrato foi utilizado pela primeira vez em 1969³⁶ e, inicialmente, pensava-se que o metal permanecia ligado ao citrato *in vivo*, no entanto, mais tarde, ficou provado que em condições biológicas o gálio se encontrava ligado à transferrina³⁷. Hoje em dia, o complexo ⁶⁷Ga-citrato/transferrina continua a ser bastante utilizado no diagnóstico de certos tipos de doenças oncológicas, tais como a doença de *Hodgkin*, o cancro do pulmão, o melanoma maligno e a leucemia²³. No que diz respeito ao complexo de ⁶⁸Ga-citrato/transferrina, o facto do ⁶⁸Ga possuir um tempo de meia vida mais pequeno do que ⁶⁷Ga, faz com que este complexo seja utilizado em outras áreas, como por exemplo a quantificação da permeabilidade vascular pulmonar através de PET³⁸.

1.5.3. Propriedades dos complexos metálicos usados como agentes de contraste em MRI

Uma ferramenta bastante utilizada actualmente no campo da medicina de diagnóstico é imagem de ressonância magnética (MRI)²⁶, uma técnica não radioactiva, como no caso das técnicas PET e CG.

As imagens de ressonância magnética resultam da polarização e excitação dos núcleos dos átomos de hidrogénio das moléculas de água constituintes dos tecidos humanos, resultando numa imagem a três dimensões da distribuição da água *in vivo*, permitindo diferenciar os tecidos saudáveis dos tecidos doentes.

Os resultados obtidos podem ser optimizados recorrendo a iões metálicos com características apropriadas, como o caso dos lantanídeos. As propriedades electrónicas destes metais e, em particular do Gd(III), com os seus momentos magnéticos elevados ($\mu^2=63\mu_B^2$)²⁷, são bastante adequadas na obtenção de imagens MRI. No entanto, na ausência de um ligando apropriado, os metais não fisiológicos, como o caso dos lantanídeos, podem hidrolisar-se, acumular-se nos tecidos ou serem excretados demasiado rápido para permitir a sua utilização como agentes de contraste. Posto isto, o ligando desempenha um papel muito importante na minimização da toxicidade, enquanto assegura um tempo de meia vida do metal no plasma suficientemente longo que permita a sua aplicação.

Um agente de contraste será tanto melhor quanto maior for a velocidade de relaxação dos prótons de água nos tecidos, sendo que este efeito inclui tanto as moléculas de água directamente coordenadas ao metal (esfera interna de coordenação) como aquelas que apenas se encontram próximas dele (esfera externa de coordenação)³⁹.

Um dos pressupostos mais rigorosos para a utilização de um complexo como agente de contraste é a sua estabilidade termodinâmica. Primeiramente, pensava-se que a

estabilidade de um complexo com um metal lantanídeo era apenas conseguida introduzindo dois ou mais grupos carboxilo em várias posições do ligando. Consequentemente, poucos estudos eram efectuados com ligandos contendo grupos hidroxilo, como é o caso dos ligandos hidroxipiridinona. A principal razão para isto acontecer tem a ver com a fraca acidez dos prótons do grupo hidroxilo da unidade hidroxipiridinona ($pK_a \sim 9-10$). Uma vez que na maioria dos casos, os iões lantanídeos são também eles fracos ácidos de Lewis, não seriam suficientemente competitivos em comparação com os iões H^+ , na ligação ao grupo fenol. Como tal, impedidos de formar complexos estáveis, haveria uma tendência para a formação de hidroxocomplexos em solução. No entanto, esta ideia perdeu a sua validade quando ficou demonstrado que a introdução de grupos fenol numa estrutura pré-organizada como, por exemplo, uma estrutura composta por mais de uma unidade hidroxipiridinona, permite ao ligando a formação de complexos estáveis com lantanídeos⁴⁰.

1.5.3.1. Complexos de Gadolínio

O ião $Gd(III)$, com sete electrões desemparelhados e um tempo de relaxação electrónico bastante longo, torna-se um excelente candidato a agente de relaxação. No entanto, a elevada toxicidade da espécie $[Gd(H_2O)_8]^{2+}$ requer que seja complexado por um quelante forte de modo a poder ser aplicado *in vivo*^{41,42}.

Sendo assim, este metal precisa de formar um complexo com elevada estabilidade termodinâmica e, por outro lado, o ligando deve permitir que uma posição de coordenação fique livre para ser ocupada por uma molécula de água, de modo a obter um sinal de MRI.

Nos complexos de gadolínio, a relaxação das moléculas de água na esfera interna de coordenação resulta primeiramente de interações espaciais associadas a flutuações aleatórias do campo eléctrico, que podem ser descritas pela equação de Solomon-Bloembergen-Morgan^{39, 43}. Esta teoria prevê que, para obter uma relaxatividade mais elevada, existem uma série de parâmetros que devem ser optimizados, incluindo o número de moléculas de água na esfera interna de coordenação (q), o aumento da velocidade de permuta entre moléculas de água directamente coordenadas ao metal (τ_M), o tempo de relaxação electrónica do metal (τ_S) e a diminuição da velocidade molecular do agente de contraste (τ_R), enquanto se mantêm a estabilidade termodinâmica suficientemente elevada (Figura 6). Considerando todas estas características o design dos ligandos torna-se um grande desafio.

Considerando as propriedades anteriormente anunciadas, existem uma série de complexos de gadolínio clinicamente aprovados como agentes de contraste MRI, baseados em ligandos poli(amino-carboxilicos) octadentados⁴⁴, largamente utilizados na detecção de anomalias na barreira hemato-encefálica⁴⁵ (ver exemplo na figura 7). Estes complexos possuem um número de coordenação 9, em que o ligando ocupa 8 locais de ligação ao centro metálico e o 9º local de coordenação é ocupado por uma molécula de água do solvente⁴⁶.

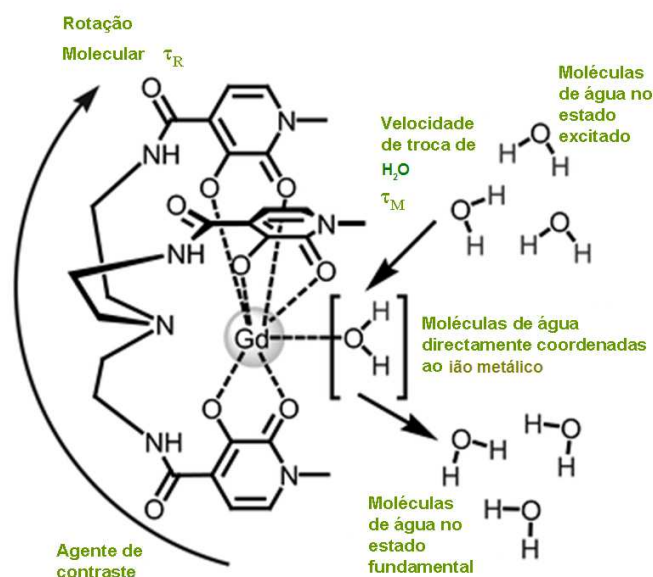


Figura 6: Parâmetros que influenciam a relaxatividade das moléculas de água⁴⁷.

Estes agentes de contraste são termodinamicamente estáveis, mas exibem uma relaxatividade dos prótons da água relativamente baixa, devido à existência de apenas uma molécula de água coordenada ao metal, que efectua trocas muito lentas com as moléculas de água do solvente, limitando assim a captação de uma boa imagem de contraste em MRI^{48,49}.

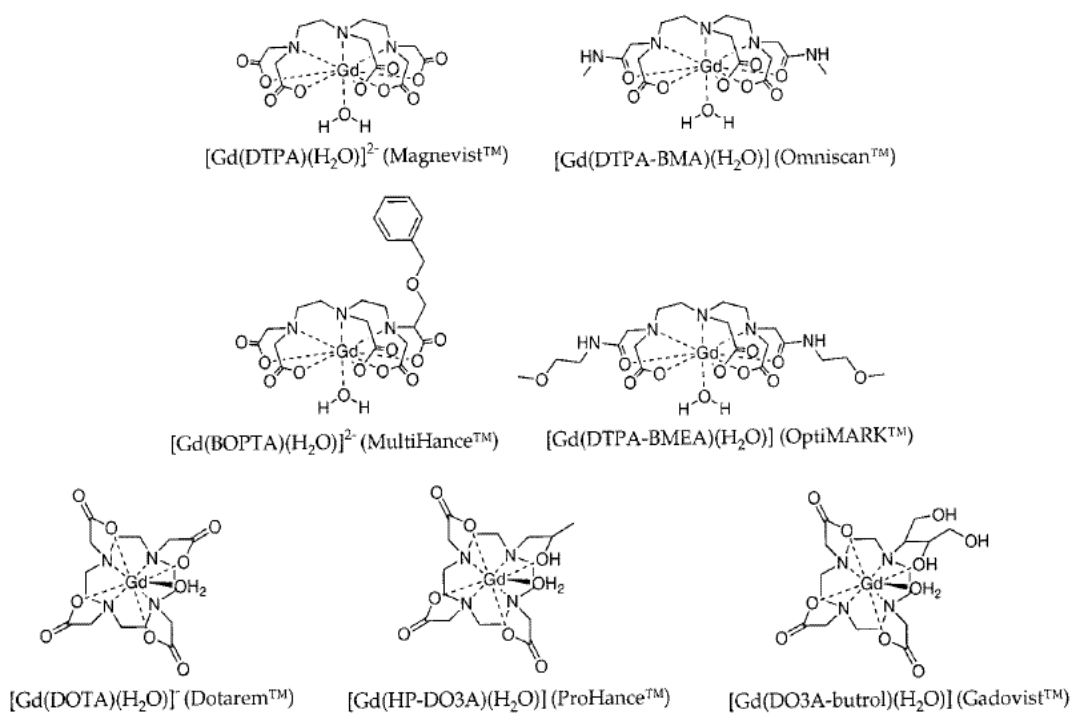


Figura 7: Agentes de contraste MRI comerciais, baseados em complexos de Gd(III) com ligandos poli(aminocarboxilato)⁴⁶.

As tentativas de aumento da relaxatividade dos complexos de gadolínio levaram o grupo de Raymond^{47,50}, ao desenvolvimento de uma nova família de agentes MRI, baseados em complexos de Gd^{3+} com ligandos do tipo hidroxipiridinona, complexos esses que possuem duas moléculas de água na esfera de coordenação. Estes compostos possuem elevada relaxatividade, devido não só ao facto de possuírem duas moléculas de água na esfera de coordenação, como também à troca entre ambas se dar com grande velocidade, tornando-os potenciais agentes de contraste.

1.5.3.2. Complexos de outros metais lantanídeos

Mais recentemente, o número de estudos relacionados com outros metais lantanídeos que não o gadolínio tem aumentado. No entanto, a sua aplicação continua a não ser muito comum.

O lantânio, cério, praseodímio, disprósio, itérbio e lutécio foram investigados, juntamente com o ligando EOB-DTPA, como agentes de contraste específicos para o fígado⁵¹. Porém, não mostraram vantagens em relação aos compostos de gadolínio normalmente utilizados.

O európio(III), por ser um ião emissor de fosforescência, é frequentemente utilizado como marcador em ensaios fluorimétricos de tempo resolvido⁵². Em MRI, o quelato Eu^{3+} -DTPA foi utilizado como marcador de células alvo⁵³.

O disprósio foi também proposto, sob a forma do complexo Dy^{3+} -DTPA-BMA, como agente em investigações ao nível do miocárdio⁵⁴ e como potencial marcador da integridade de membranas celulares⁵⁵.

O radioisótopo de itérbio, ^{169}Yb , é usado como agente de diagnóstico em Cintigrafia^{56,57}.

1.6. Âmbito do presente trabalho

A procura de novas drogas com potencial aplicação farmacológica, fez com que o grupo em que estagiei desenvolvesse uma série de compostos derivados de 3-hidroxi-4-piridinona. No geral, foram abordadas duas estratégias no design e desenvolvimento destes agentes quelantes do tipo 3,4-HP. A “target approach” e a “ligand approach”. A primeira, envolveu a funcionalização do azoto no anel, de forma a alterar as propriedades físico-químicas e biológicas da molécula, permitindo a sua adequada biodistribuição até determinados órgãos específicos e/ou a sua capacidade para serem reconhecidos molecularmente em locais biológicos específicos. A segunda abordagem envolveu um estudo de polidentidade desta classe de compostos, através do acoplamento de duas ou mais unidades 3,4-HP a um determinado esqueleto, resultando num agente quelante tetra ou hexadentado, cuja vantagem está em funcionar como uma espécie de âncora para o metal,

aumentando a sua eficácia quelante.

Neste momento, o grande desafio, está em combinar as duas estratégias (target-ligand approach), de forma a obter ligandos ainda mais específicos e potentes. Como resultados obtém-se compostos polidentados e extrafuncionalizados, que unem na mesma entidade ambas as propriedades de maior eficácia quelante e maior reconhecimento a nível molecular. Neste sentido, o meu trabalho baseou-se no estudo das propriedades quelantes de um ligando tris-hidroxi-piridinona (Figura 8), que resulta do acoplamento de três unidades aminopropil-hidroxi-piridinona a um esqueleto NTP (ácido nitrilotripropiónico), resultando num ligando hexadentado^{58,59,60}. Apesar da limitação associada ao seu elevado peso molecular (> 500 g mol⁻¹), quando comparado com um ligando mono-3,4-HP bidentado, existem vantagens bastantes significativas⁶⁰, nomeadamente, o seu baixo coeficiente de partição (-1.24), o que pode levar a uma excreção mais rápida do metal no corpo (a sua baixa lipofilicidade indica que é solúvel em água e portanto fracamente retido no corpo). Outra vantagem é o facto de ele possuir menos problemas de toxicidade, uma vez que é necessária uma quantidade muito menor de ligando, para atingir os mesmos resultados de um ligando bidentado.

Além disso, esperam-se obter complexos muito estáveis com iões metálicos duros tripósitivos, como por exemplo o ferro ou os metais do grupo III, nomeadamente o Gálio, sendo que este último pode ser aplicado em técnicas de radiodiagnóstico por imagem PET e CG e foi aquele, sobre o qual se incidiu no presente estudo.

Em relação á técnica MRI, sabe-se que complexos hidroxi-piridinona com metais lantanídeos, mais especificamente com o Gadolínio, possuem potencial aplicação como agentes de imagem para ressonância magnética⁴⁷. Sendo assim, uma vez que o composto estudado deriva de três unidades hidroxi-piridinona, prevê-se que também ele, na presença de metais lantanídeos(III), forme complexos estáveis. No presente trabalho não foram apenas estudados complexos de Gd³⁺, mas também de La³⁺, Pr³⁺, Er³⁺ e Lu³⁺. O facto de terem sido avaliados vários elementos ao longo desta série teve como objectivo o estudo da relação entre a afinidade do ligando para com estes metais e o conhecido “efeito de contracção” que eles sofrem, à medida que se avança no grupo dos lantanídeos.

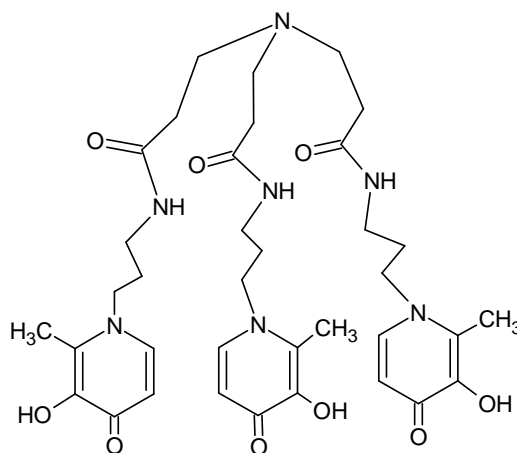


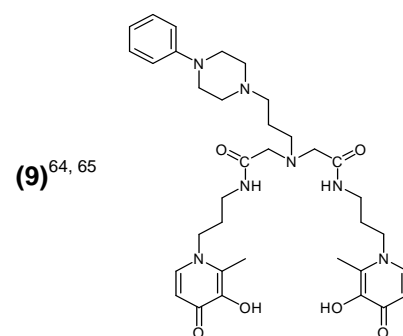
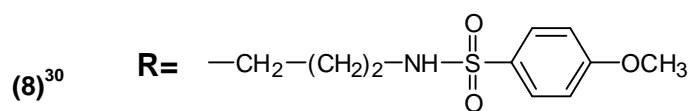
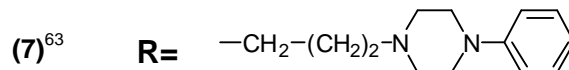
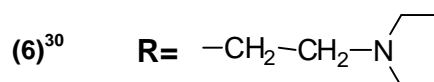
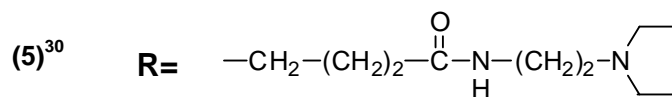
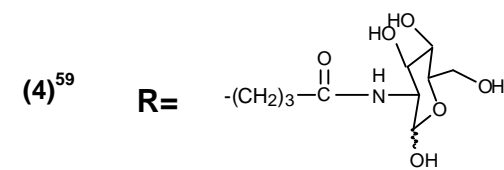
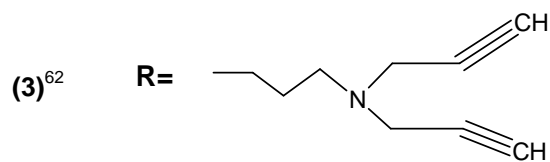
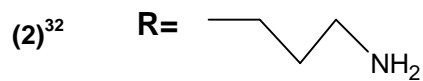
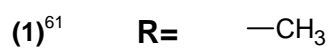
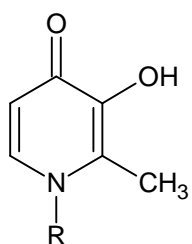
Figura 8: Composto tris-hidroxi-piridinona em estudo – NTP(PrHP)₃.

No âmbito do presente trabalho, foram também efectuados alguns estudos biológicos de uma série de compostos derivados de hidroxipiridinonas, que tal como já foi referido anteriormente, sofreram N-derivatização com o intuito de obter uma resposta mais efectiva a nível biológico e uma diminuição da toxicidade do composto (ver esquema 1). Tendo isto em conta, a avaliação biológica destes compostos teve como principal objectivo:

1. Análise e caracterização da toxicidade dos compostos em meio celular;
2. Análise da alteração morfológica das células, na presença do composto orgânico;
3. Análise da sua interacção com as moléculas de ADN;
4. Análise da capacidade dos compostos para alterar as propriedades físicas da membrana biológica.

Como modelos celulares na realização dos estudos biológicos foram utilizadas células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, obtidas a partir de tumores. Estas são células diferenciadas e muito resistentes, que se manipulam em laboratório e servem para simular o comportamento destes compostos a nível cerebral, no combate às doenças anti-neurodegenerativas. A vantagem da sua utilização reside no facto de serem células humanas e oferecerem uma população celular muito homogénea, ao contrário do que acontece com as culturas primárias.

As estruturas dos compostos estudados a nível biológico vêm descritas no esquema a baixo, no entanto, torna-se importante referir que respeitante ao composto **(9)**, este não corresponde a um ligando bidentado, mas sim tetradentado, que também foi incluído nestes estudos.



Esquema 1: Série de compostos estudados a nível biológico, no presente trabalho.

2. Resultados e Discussão

Os estudos efectuados no âmbito deste trabalho envolveram duas partes distintas. Numa primeira parte foram efectuados estudos em solução do ligando $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$ com Gálio(III) e uma série de metais lantanídeos (La^{3+} , Pr^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} e Lu^{3+}), utilizando técnicas de potenciometria e de espectrofotometria. Determinaram-se as constantes de estabilidade, os modos de coordenação e as curvas de distribuição dos respectivos sistemas metal/ligando, com vista à sua potencial aplicação em Radiodiagnóstico (CG e PET) e MRI, respectivamente. Na segunda parte do trabalho efectuaram-se estudos biológicos em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, na presença de uma série de compostos derivados de hidroxipiridinona (Esquema 1), nomeadamente testes de toxicidade, estudos morfológicos, testes de fragmentação e interacção com o ADN e ainda experiências de anisotropia de fluorescência. Este último tipo de experiências foi realizado com três dos compostos que obtiveram melhores resultados nos testes de toxicidade e de morfologia (compostos **(2)**, **(4)** e **(6)**).

2.1. Estudos de complexação com o ligando $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$

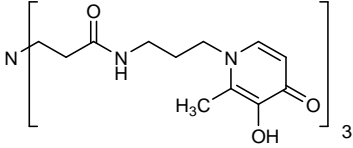
2.1.1 Comportamento ácido-base do $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$

Os valores das constantes de protonação do ligando $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$ foram determinadas potenciométricamente, através do programa HYPERQUAD⁶⁶. A curva de titulação potenciométrica encontra-se representada no gráfico da figura 9 e as respectivas constantes de protonação bem como as constantes de estabilidade globais dos correspondentes complexos de Gálio(III) encontram-se resumidas na tabela 3, juntamente com o valor de pGa ($-\log[\text{Ga}^{3+}]$) ao pH fisiológico.

A análise aos valores de pK_a , permite verificar que estes estão de acordo com o previsto. De facto, os valores correspondentes à protonação do azoto de cada um dos anéis de piridinona, nomeadamente $\log K_5$, $\log K_6$ e $\log K_7$, estão em conformidade com os valores da literatura para compostos análogos, derivados de 3-hidroxi-4-piridinonas. Por exemplo, no caso do composto comercial DFP⁶⁷ e do composto 1-(3'-aminopropil)-3-hidroxi-2-metil-4-piridinona³², eles possuem valores de constantes de protonação do azoto piridínico bastante próximas daquelas aqui obtidas, ou seja, 3.7⁶⁸ e 3.2³², respectivamente. Por outro lado, ao comparar com uma estrutura tri-funcionalizada análoga aquela aqui em estudo, o $\text{Kemp}(\text{PrHP})_3$ ⁶⁹, em que apenas o esqueleto onde assentam as três unidades HP varia, verifica-se que as três constantes de protonação, $\log K_4$, $\log K_5$ e $\log K_6$, dos azotos das unidades piridinona são 3.98, 3.25 e 2.91, respectivamente, o que é bastante semelhante aos resultados que se obtiveram. Os baixos valores destas constantes ($\log K_i$, $i=5, 6$ e 7) resultam da elevada acidez do protão do azoto piridínico, devido à deslocalização por ressonância aromática do par de electrões não

partilhado do azoto.

Tabela 3: Constantes de protonação ($\log K_i$) do ligando NTP(PrHP)₃, constantes de estabilidade dos respectivos complexos de Gálio ($\log \beta_i$) e pGa.

 NTP(PrHP)₃				
H _i L	$\log K_i$	(m,h,l)	$\text{Log } \beta_{M_mH_hL_l}$	pGa ^a
HL	9.946(9)	1,5,1	46.68(1)	27.2
H ₂ L	9.84(1)	1,3,1	42.98(3)	
H ₃ L	9.091(8)	1,1,1	37.88(2)	
H ₄ L	6.77(1)	1,0,1	33.00(2)	
H ₅ L	3.81(1)			
H ₆ L	3.14(1)			
H ₇ L	2.76(2)			

^a Os valores de pGa foram obtidos a pH=7.4 ($C_M = 10^{-6}$ M, $C_L/C_M = 10$).

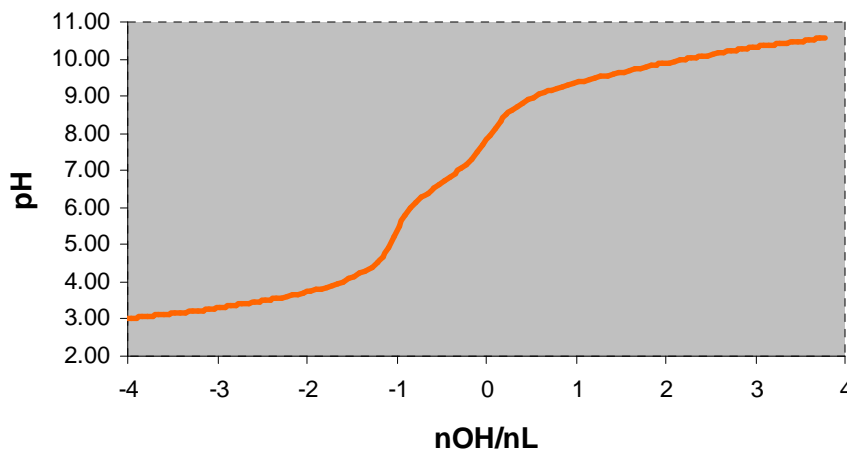


Figura 9: Curva correspondente à titulação potenciométrica do ligando NTP(PrHP)₃ ($C_L=1 \times 10^{-3}$ M).

No caso das constantes $\log K_1$, $\log K_2$ e $\log K_3$, correspondentes à protonação dos átomos de oxigénio do grupo hidroxilo, conclui-se que estes também estão de acordo com os resultados da literatura. Para os mesmos exemplos apresentados no caso anterior, em relação à DFP e ao 1-(3'-aminopropil)-3-hidroxi-2-metil-4-piridinona, estes possuem $\log K_{O-H}$ de 9.86 e 10.07, respectivamente, o que se insere na gama de valores obtida; Kemp(PrHP)₃, possui $\log K_1$, $\log K_2$ e $\log K_3$ de 10.07, 9.89 e 9.18, respectivamente, resultados muito semelhantes com

os de $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$.

Por ultimo, em relação a $\log K_4$, este valor é intermédio relativamente às constantes associadas aos azotos dos anéis de piridinona e aos oxigénios dos grupos hidroxilo. Esta constante corresponde à protonação do azoto terciário que faz parte do esqueleto-base da estrutura do ligando $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$. O valor da literatura⁷⁰ para a constante de protonação do azoto apical da estrutura NTP (ácido nitrilotripropiónico) é 9.30, evidenciando um pronunciado abaixamento deste valor ao comparar com o da estrutura do ligando $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$. Isto pode sugerir a existência de uma eventual interação por pontes de hidrogénio intramoleculares do tipo $\text{CONH}\cdots\text{N}$, entre o grupo amida e o azoto terciário do esqueleto NTP.

Relativamente à curva de titulação potenciométrica obtida (Figura 9), verificam-se três patamares que confirmam o que foi dito anteriormente, ou seja, o 1º patamar, a cerca de pH 3, corresponde à titulação das espécies H_7L e H_6L e H_5L , o patamar intermédio, a pH ~ 7 corresponde à titulação da espécie H_4L e, por ultimo, a pH entre 9 e 10 tem-se a titulação das espécies H_3L , H_2L e HL .

Foi analisado o diagrama de distribuição de espécies do ligando em estudo, em função do pH. Este diagrama foi obtido através do programa HYSS⁷¹ e no gráfico da figura onde ele foi representado (Figura 10), foram também apresentados os valores de absorvidade molar do ligando em solução, calculados a 280 nm e 310 nm, através do programa PSEQUAD⁷².

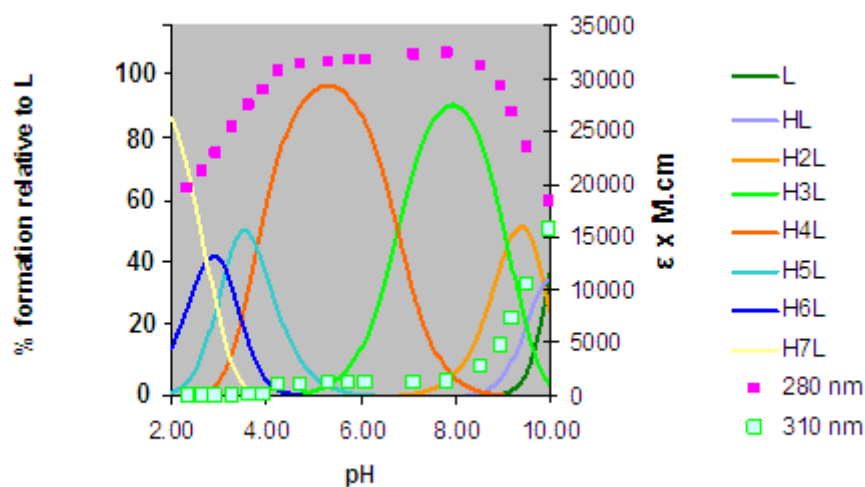


Figura 10: Diagrama de distribuição de espécies para o composto $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$ e absorvidades molares a 280 e 310 nm ($C_L = 5.35 \times 10^{-5}$ M).

Verificou-se que para a gama de pH entre 4 e 6 e para $C_L = 5.35 \times 10^{-5}$ M, a espécie mais abundante corresponde a H_4L , existindo numa percentagem superior a 90% em solução. Esta espécie corresponde ao ligando monopositivo, protonado nos átomos de oxigénio dos grupos hidroxilo e no átomo de azoto terciário do esqueleto-base (Figura 11). Já na região de pH entre 7.5 e 8.5, verifica-se que aproximadamente 90% de ligando está sob a forma de H_3L , espécie que corresponde ao ligando neutro, em que apenas os oxigénios dos grupos hidroxilo dos anéis de piridinona se encontram protonados (Figura 11).

Note-se que a pH 7 predominam as duas espécies em solução, com aproximadamente 50% de cada uma delas, e que a pH fisiológico (pH 7.4) o ligando encontra-se na sua maioria neutro, sob a forma H_3L .

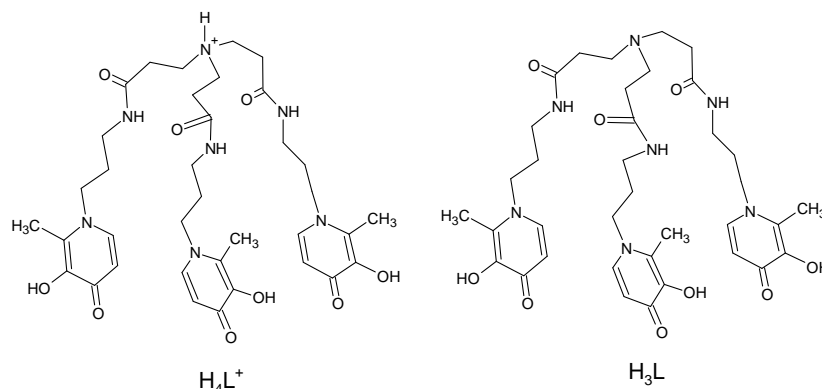


Figura 11: Espécies protonadas predominantes do $NTP(PrHP)_3$, para pH entre 5 – 8.

Em relação aos valores de absorvidade molar apresentados no gráfico da figura 10, pode concluir-se que ao comprimento de onda 310 nm a espécie absorvente corresponde à espécie L, ou seja, o ligando completamente desprotonado. Por outro lado, ao comprimento de 280 nm ambas as espécies H_4L e H_3L absorvem. Tal como já foi visto anteriormente, estas espécies são as mais abundantes na gama de valores de pH entre 4 e 8.

Uma vez que não foi possível efectuar o estudo de complexação com Ga(III) por potenciometria, mas sim por espectrofotometria na zona do UV, houve necessidade de fazer previamente uma titulação espectrofotométrica do ligando (250 - 340 nm), para a $pH \leq 2$ e $pH > 2$, uma vez que também ele absorve nessa gama de comprimentos de onda. Os resultados foram tratados no programa PSEQUAD⁷², onde se fixaram os valores das constantes de protonação obtidas potenciometricamente, determinando assim os espectros de absorção das espécies L e H_iL ($i=1-7$). Na Figura 12 encontram-se representados os espectros traçados na gama de pH entre 0.8 e 10, durante a titulação espectrofotométrica do ligando.

Verifica-se que a absorvância aumenta (indicação "1") à medida que se formam sucessivamente as espécies H_4L e H_3L .

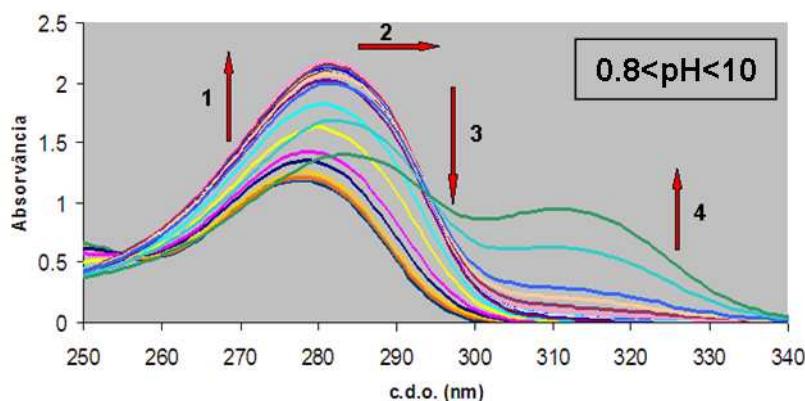


Figura 12: Espectros de absorção molecular do ligando $NTP(PrHP)_3$ para pH entre 0.8 e 10 ($C_L = 5.35 \times 10^{-5}$ M).

Posteriormente, com o aumento do pH ao longo da titulação, ocorre um desvio batocrômico da banda de absorção (indicação “2”), correspondente ao aumento da concentração do ligando desprotonado, L, em solução. Este desvio está associado a um aumento da deslocalização electrónica conjugada π nos anéis de hidroxipiridinona, com a formação da espécie L (indicação “4”).

2.1.2. Complexação com Ga(III)

Tal como já foi referido anteriormente, a determinação das constantes de estabilidade dos complexos de Ga(III) com o ligando NTP(PrHP)₃ foi feita espectrofotometricamente, devido à formação de complexos a pH bastante ácido (pH<2), impossibilitando a sua determinação por potenciometria. Foi então realizada uma titulação espectrofotométrica 1:1 Ga(III)/L, entre 250 e 340 nm, para pH≤2 (titulação por pontos) e para pH>2. Posteriormente, os espectros de absorção do ligando foram introduzidos no ficheiro de resultados referente à titulação espectrofotométrica Ga/L a pH≤2, donde se retirou a constante de estabilidade da espécie mais protonada, isto é, GaH₅L, e o seu respectivo espectro de absorção. Ao conjugar todos estes dados no programa PSEQUAD correspondente à titulação Ga/L a pH>2, ou seja, o espectro de absorção e constante de estabilidade do complexo GaH₅L e os espectros de absorção e constantes de protonação do ligando, determinaram-se as constantes de estabilidade dos complexos GaH₃L, GaHL e GaL. Estes valores encontram-se resumidos na Tabela 3.

Na determinação das constantes de estabilidade foi considerada a formação de hidroxocomplexos de Gálio⁷³, com constantes fixas: $\log \beta(\text{MH}_{-1}) = -2.46$, $\log \beta(\text{MH}_{-2}) = -5.92$, $\log \beta(\text{MH}_{-3}) = -10.63$, $\log \beta(\text{MH}_{-4}) = -16.88$.

O diagrama de distribuição de espécies de gálio com NTP(PrHP)₃ em função do pH encontra-se representado na Figura 13 e foi obtido através do programa HYSS⁷¹. A sua análise permite confirmar o que já foi dito anteriormente, ou seja, que a formação de complexos começa a pH<2, o que sugere que este ligando possui uma elevada afinidade para com o Ga(III). A pH 2 observa-se que as espécies GaH₅L e GaH₃L são as mais abundantes e na gama de pH entre 3 e 4.5, o complexo GaHL existe numa percentagem superior a 90%. A pH 5 ambas os complexos GaHL e GaL existem em solução e numa percentagem de aproximadamente 50% cada. À medida que o pH sobe verifica-se a predominância da espécie neutra GaL, até pH~6, valor a partir do qual se observou a formação de um precipitado, provavelmente correspondente à espécie ML e que ocorreu nas condições usadas neste estudo.

Na Figura 14 apresentam-se as estruturas hipotéticas dos quatro complexos de Ga(III) que se formam em solução, aos diferentes valores de pH, permitindo compreender melhor o modo de coordenação do íão Gálio com o ligando NTP(PrHP)₃.

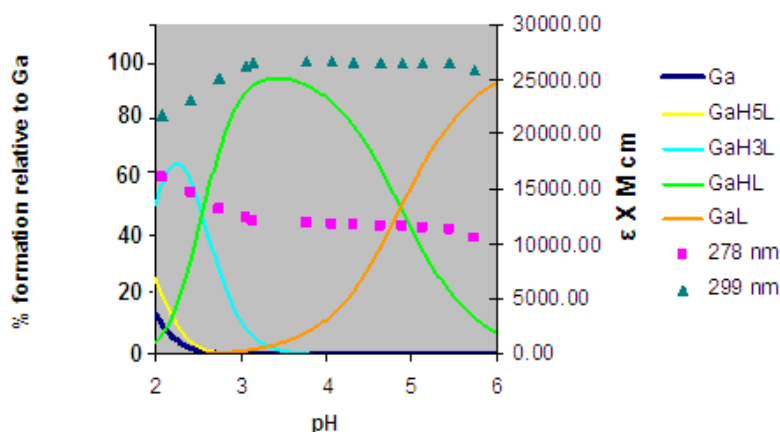


Figura 13: Diagrama de distribuição de espécies para o sistema $Ga^{3+}/NTP(PrHP)_3$ e absorvidades molares a 278 e 299 nm. ($C_L/C_M = 1$, $C_L = 5.3 \times 10^{-5} M$).

A pH 2, tal como foi visto anteriormente pelo diagrama de distribuição de espécies, os complexos predominantes em solução são GaH_5L e GaH_3L . No primeiro, o metal encontra-se bicoordenado, apenas com uma unidade HP a interagir com o metal e no segundo, admite-se que o metal se encontra tetracoordenado, ficando apenas uma unidade HP totalmente protonada e excluída da coordenação ao gálio.

Na estrutura $GaHL$, o $Ga(III)$ encontra-se hexacoordenado e este complexo predomina em solução, ao longo de uma gama de pH entre 3.5 e 5. Para valores superiores a 5, existe a espécie correspondente ao complexo neutro GaL em solução, também ela com o metal hexacoordenado.

No diagrama de distribuição de espécies $Ga^{3+}/NTP(PrHP)_3$ está representado o perfil de absorvidades molares a 278 e 299 nm. Ao comprimento de 299 nm as espécies que absorvem em solução são o $GaHL$ e o GaL , ambos hexacoordenados (ver Figura 14). A 278 nm a absorvância da solução é menor e aparentemente a espécie que dá origem a este máximo corresponde à espécie mais protonada, ou seja, GaH_5L .

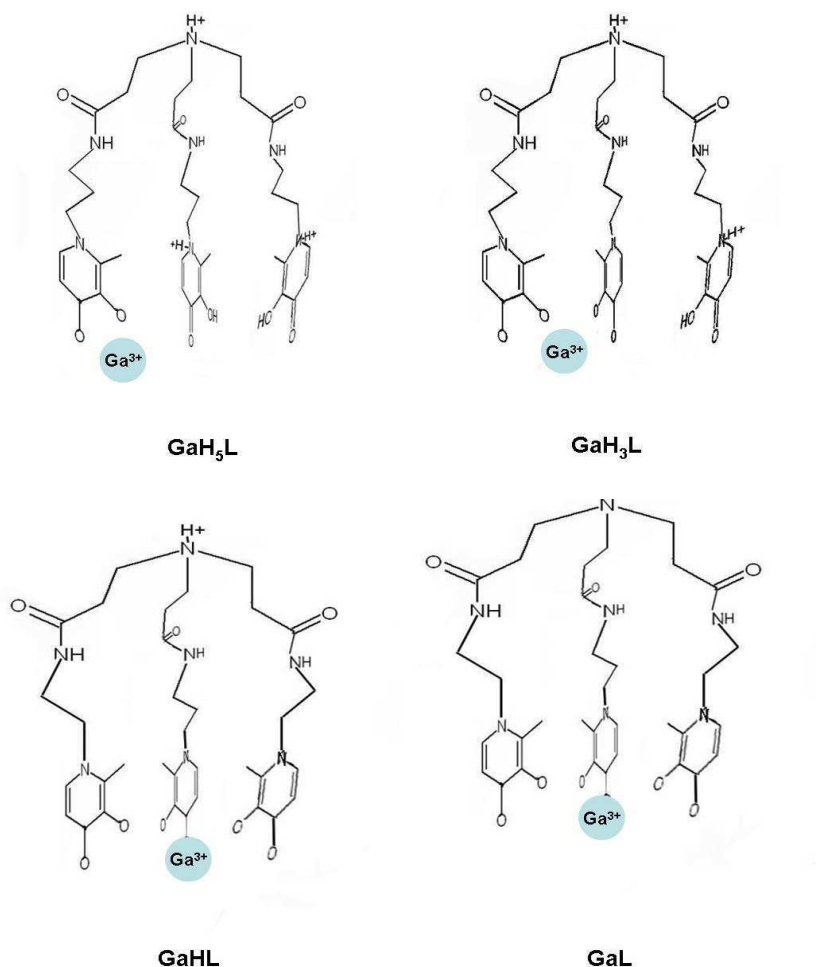


Figura 14: Estrutura dos vários complexos de NTP(PrHP)₃ com Ga(III).

Na Figura 15 encontram-se os espectros de absorção obtidos na titulação espectrofotométrica do ligando na presença de Ga(III), na estequiometria 1:1 e para uma gama de pH entre 0.8 e 6. No início da titulação (pH~1), tem-se um máximo de absorção, que corresponde a 278 nm. Uma vez que estamos a um pH extremamente baixo, este máximo corresponde á espécie mais protonada em solução. Posteriormente, à medida que a titulação avança e vai ocorrendo formação da espécie GaH₃L, a absorvância da solução vai diminuindo. A partir de pH 2.5 ocorre um desvio batocrómico e a formação de uma banda de absorção a 299 nm, que vai aumentando de intensidade à medida que se forma a espécie GaHL. Com o aumento do pH vai ocorrer a formação do complexo neutro GaL. No entanto, o seu máximo de absorção é o mesmo que o da espécie GaHL, isto é, 299 nm. De facto, o tipo de coordenação nestes dois complexos é idêntica, sendo a única diferença a protonação do átomo de azoto do esqueleto, que em GaL já se encontra desprotonado. Tendo isto em conta, parece ficar claro que este átomo de azoto não intervém na coordenação ao ião metálico.

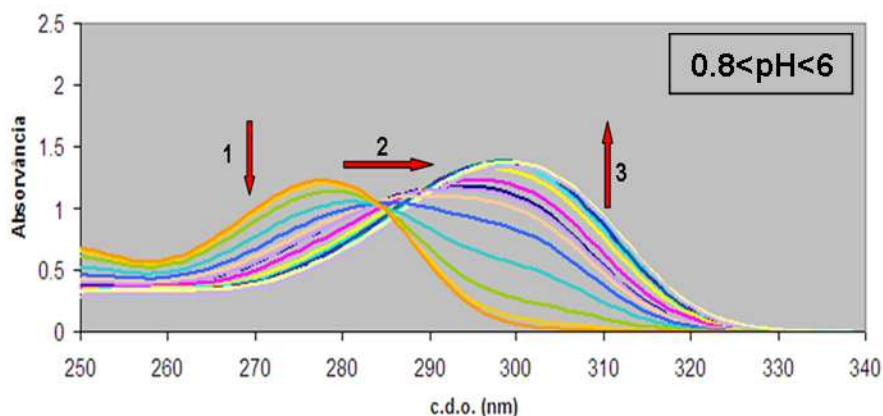


Figura 15: Espectros de absorção molecular do ligando NTP(PrHP)₃ na presença de Ga(III), para pH entre 0.8 e 6 ($C_L=5.35 \times 10^{-5}$ M, $C_L/C_M=1$).

Examine-se agora o valor de pGa ($-\log [Ga^{3+}]$) deste ligando. Ao comparar este valor, com o pGa de outros compostos indicados na tabela 4, pode concluir-se que o ligando aqui em estudo, possui a vantagem de a pH fisiológico ter uma maior afinidade pelo gálio do que a dos ligandos usados como comparação. É importante referir que os ligando da tabela 4, excepto o NTP(PrHP)₃, são compostos comerciais utilizados em terapia de quelação e os seus complexos de metais radioactivos podem ser também usados em técnicas de radiodiagnóstico.

Note-se que pM é um parâmetro adequado para a avaliação da capacidade quelante de um ligando, uma vez que contabiliza as diferentes constantes de protonação e denticidades, permitindo uma comparação directa com outros compostos quelantes.

Tabela 4: Valores de pGa para o ligando NTP(PrHP)₃ e outros compostos, (pH=7.4, $C_M = 10^{-6}$ M e $C_L/C_M=10$).

Ligando	pGa
NTP(PrHP) ₃	27.2
EDTA ⁷⁴	20.2
DTPA ⁷⁴	22.5
DOTA ⁷⁴	18.8
DFO ⁷⁴	22.4
DFP ³¹	17.8

2.1.3. Estudos com ⁶⁷Ga

Foram efectuados estudos de biodistribuição e de imagiologia gama utilizando o complexo radioactivo [⁶⁷Ga] – NTP(PrHP)₃, de forma a caracterizar a sua actividade e possível actuação como agente de diagnóstico e imagem, em técnicas de radiodiagnóstico SPECT. Estes estudos foram gentilmente cedidos pelo Professor Carlos Gerales, do Centro de

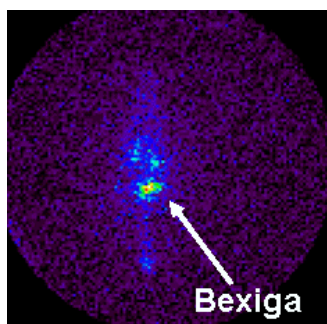


Figura 16: Imagem de Cintigrafia, obtida 24h após a injeção de $[^{67}\text{Ga}]\text{-NTP(PrHP)}_3$ (ratos Wistar), verificando-se que o composto já se encontra na bexiga.

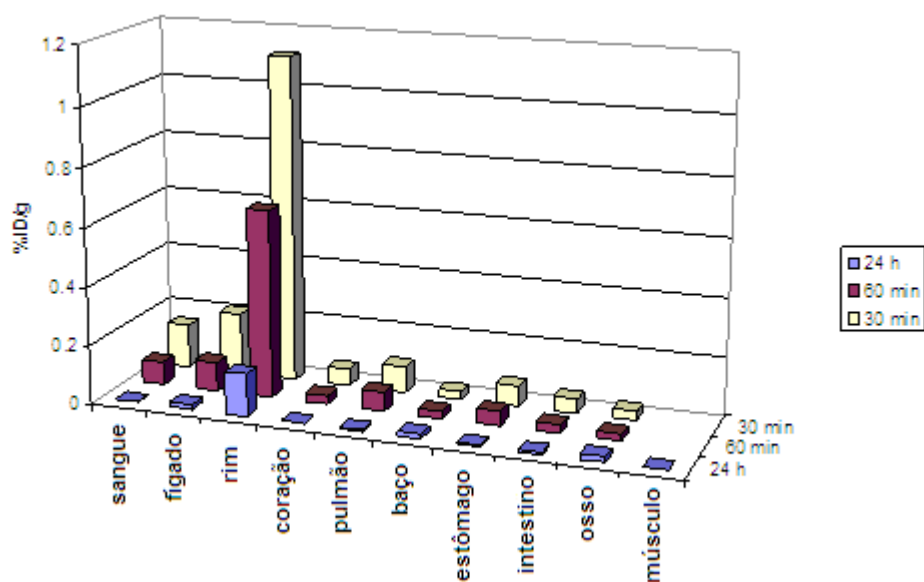


Figura 17: Biodistribuição do complexo $[^{67}\text{Ga}]\text{-NTP(PrHP)}_3$ em ratos Wistar (N=4-6) aos 30 min, 60 min e 24h após injeção intra-venosa de composto. (resultados expressos em percentagem de dose injectada por grama de órgão (%ID/g)).

As imagens de Cintigrafia Gama (Figura 16) em conjunto com os resultados de biodistribuição (Figura 17), demonstram claramente que a maior quantidade de complexo se encontra localizada nos rins e na bexiga, órgãos que se encontram no percurso de excreção deste composto hidrofílico ($\log P = -1.24$). De facto, 24h após a injeção, pode observar-se pelo gráfico de biodistribuição que todos os órgãos se encontram limpos de complexo à excepção dos rins. Note-se que os resultados de biodistribuição estão em termos de percentagem de dose injectada por grama de órgão (%ID/g), em ratos Wistar (N=4-6), aos 30 e 60 minutos e após 24h decorridas da injeção intra-venosa de composto.

Existe também uma pequena fracção de actividade localizada no fígado aos 30 e 60 minutos, que está possivelmente relacionada com alguma captação de composto por parte do fígado, em conjunto com a actividade sanguínea.

Foram traçadas curvas de actividade/tempo deste complexo $[^{67}\text{Ga}]\text{-NTP(PrHP)}_3$,

obtidas a partir da aquisição dinâmica de imagens (Figura 18). As curvas foram ajustadas e normalizadas em relação ao máximo de actividade obtida. Mais uma vez é possível observar que o composto é excretado nos rins, pois este é o órgão que possui maior quantidade de actividade. Pode também concluir-se que existe maior actividade no fígado do que no tórax, o que está de acordo com os resultados de biodistribuição, de que ocorre alguma captação de complexo por parte do fígado.

Estes resultados biológicos permitem concluir que a radioactividade proveniente do agente de contraste injectado é quase eliminada na sua totalidade dos tecidos e órgãos após 24h e que apenas uma pequena quantidade de deposição (cerca de 0.02%) é encontrada nos ossos, fígado e baço.

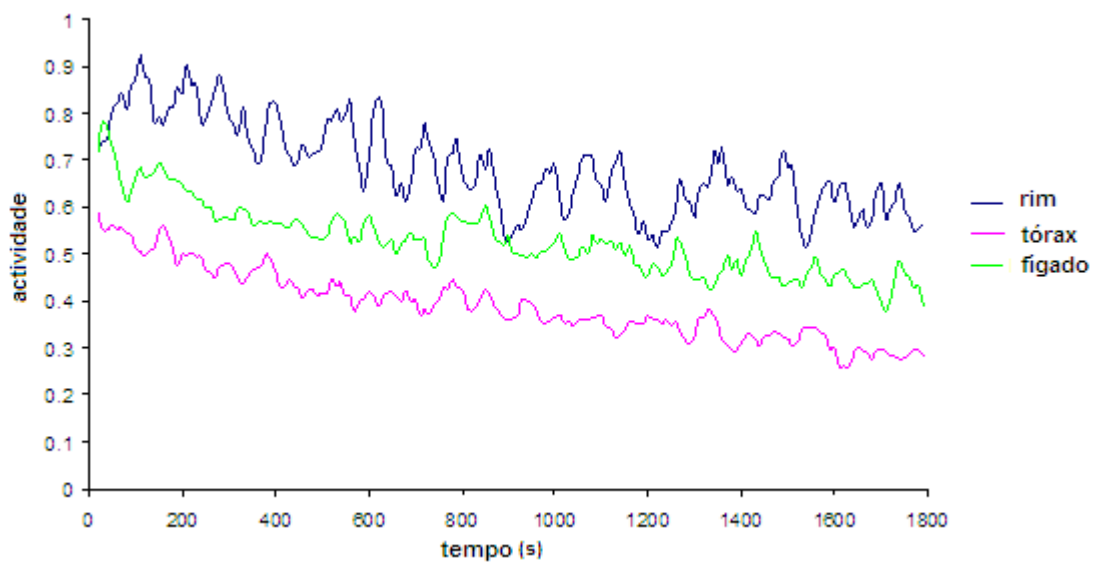


Figura 18: Curvas de actividade/tempo obtidas a partir da aquisição dinâmica de imagens, de diferentes áreas de interesse.

2.1.4. Complexação com Lantanídeos

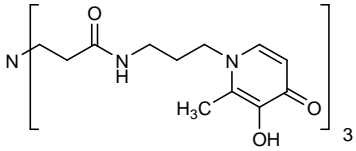
As constantes de estabilidade globais dos complexos lantanídeo(III) – NTP(PrHP)₃, encontram-se resumidas na Tabela 5.

Os valores incluídos na tabela 5 foram determinados por potenciometria, usando o programa HYPERQUAD⁶⁶ no tratamento dos resultados experimentais.

Foram estudados os íons La³⁺, Pr³⁺, Gd³⁺, Er³⁺ e Lu³⁺, especificamente escolhidos de forma a analisar o efeito da “contração dos lantanídeos”. O La³⁺ e o Pr³⁺ ocupam o extremo esquerdo da série dos Lantanídeos, o Gd³⁺ está posicionado a meio da série e, por fim, os íons Er³⁺ e Lu³⁺ estão posicionados no extremo direito.

Verificou-se que todos eles formam complexos 1:1 (metal:ligando) e que, no caso dos três primeiros, ocorre também a formação de complexos 1:2 (metal:ligando).

Tabela 5: Constantes de estabilidades dos complexos com os diferentes íons lantanídeos.

 NTP(PrHP)₃					
(m,h,l)	Log β _{M_mH_hL_l} ^a				
	La ³⁺	Pr ³⁺	Gd ³⁺	Er ³⁺	Lu ³⁺
(1,5,1)	43.81(7)	44.1(1)	44.0(1)	43.1(1)	44.77(5)
(1,4,1)	40.27(5)	40.64(8)	40.50(7)	40.26(7)	41.28(3)
(1,3,1)	35.36(5)	36.09(9)	36.57(8)	36.3(1)	37.77(5)
(1,2,1)	29.0(3)	30.80(8)	31.91(8)	32.43(5)	33.68(4)
(1,1,1)	23.44(4)	25.31(7)	27.10(7)	27.42(5)	29.64(4)
(1,5,2)	63.60(7)	65.6(1)	66.7(1)		
(1,3,2)	50.0(1)	52.6(1)	53.5(1)		

^a Valores determinados no laboratório de química inorgânica do departamento de química inorgânica, organometálica e analítica da Universidade de estudos de Padova, Itália, sob a orientação do professor Plínio Di Bernardo.

Verificou-se que os metais lantanídeos Er³⁺ e Lu³⁺ não formam o complexo 1:2 (metal:ligando), o que pode ser explicado devido ao seu pequeno raio iónico (Er³⁺ - 103 pm e Lu³⁺ - 100 pm). Sendo assim, quando comparados com o raio iónico do La³⁺ (117 pm), sendo ambos menores, provavelmente não existem com NC>6.

A Figura 19 compara as curvas de titulação em termos de $n_{OH}/n_{Ln^{3+}}$ (número de moles de NaOH por mol de Ln^{3+}), para cada sistema $Ln^{3+} - NTP(PrHP)_3$ (1:1). A curva **a** representa a curva de titulação potenciométrica do ligando sozinho (que é, como seria de prever, bastante idêntica à já anteriormente reportada nos estudos com Ga(III)). Qualitativamente, estas curvas dão-nos as seguintes indicações: (i) o ligando possui uma afinidade considerável para com os iões lantanídeos, como se pode ver pelas curvas de titulação dos complexos, cujo formato se altera significativamente na presença ou ausência do metal; (ii) a formação dos complexos é nítida nestas curvas para $pH \sim 3$.

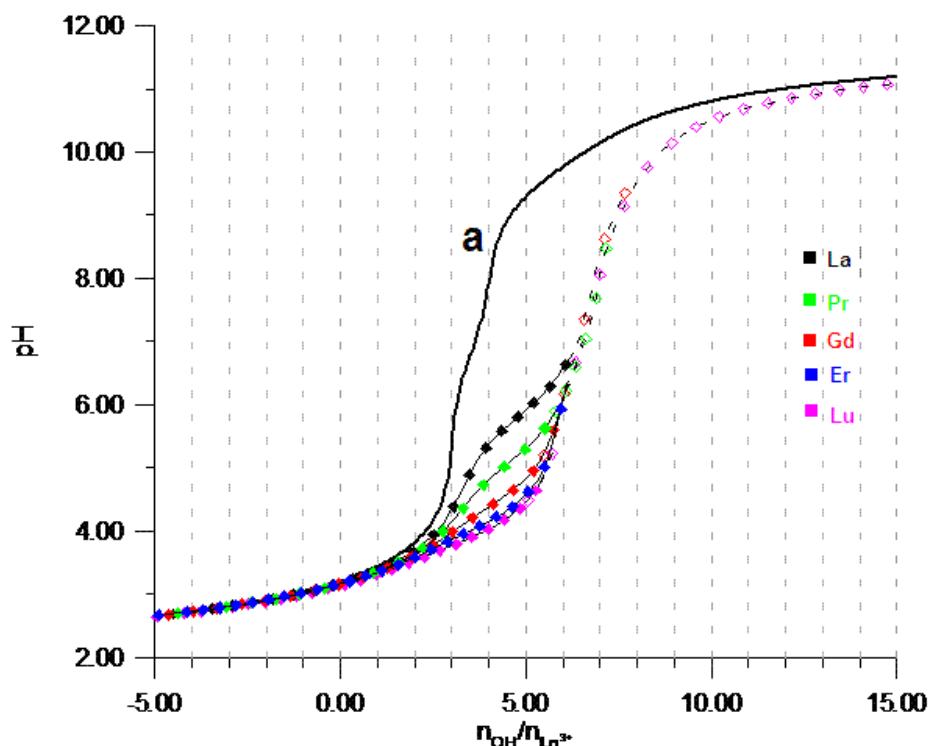


Figura 19: Curvas de titulação do ligando sozinho (curva **a**) e na presença dos iões metálicos na proporção estequiométrica 1:1.

Verificou-se que todos os lantanídeos formam complexos com estequiometria MH_5L , MH_4L , MH_3L , MH_2L e MHL , cujas prováveis estruturas se encontram representadas na Figura 20.

No complexo MH_5L , o metal está coordenado apenas a uma unidade 3,4-HP, mantendo as outras duas estruturas HP não coordenadas e completamente protonadas. Em MH_4L e MH_3L , o metal continua coordenado apenas a uma unidade HP, no entanto, as HP's adicionais encontram-se parcialmente protonadas. Propõem-se duas estruturas correspondentes à espécie MH_3L . Note-se que na estrutura MH_3L – Hipótese B, o ligando está tetracoordenado ao ião metálico e a unidade HP não ligada encontra-se duplamente protonada. A análise das constantes de estabilidade não permite, neste momento, retirar uma conclusão definitiva acerca destas duas hipóteses para a estrutura MH_3L , pelo que isto poderia ser tema para um próximo estudo.

Os complexos MH_2L e MHL formam-se quando os prótons dos grupos hidroxilo abandonam o ligando, formando um complexo tetra e hexacoordenado, respectivamente. Note-se que ocorre formação do complexo hexacoordenado, mesmo quando a amina do esqueleto principal está protonada, tal como já aconteceu no caso da complexação com gálio.

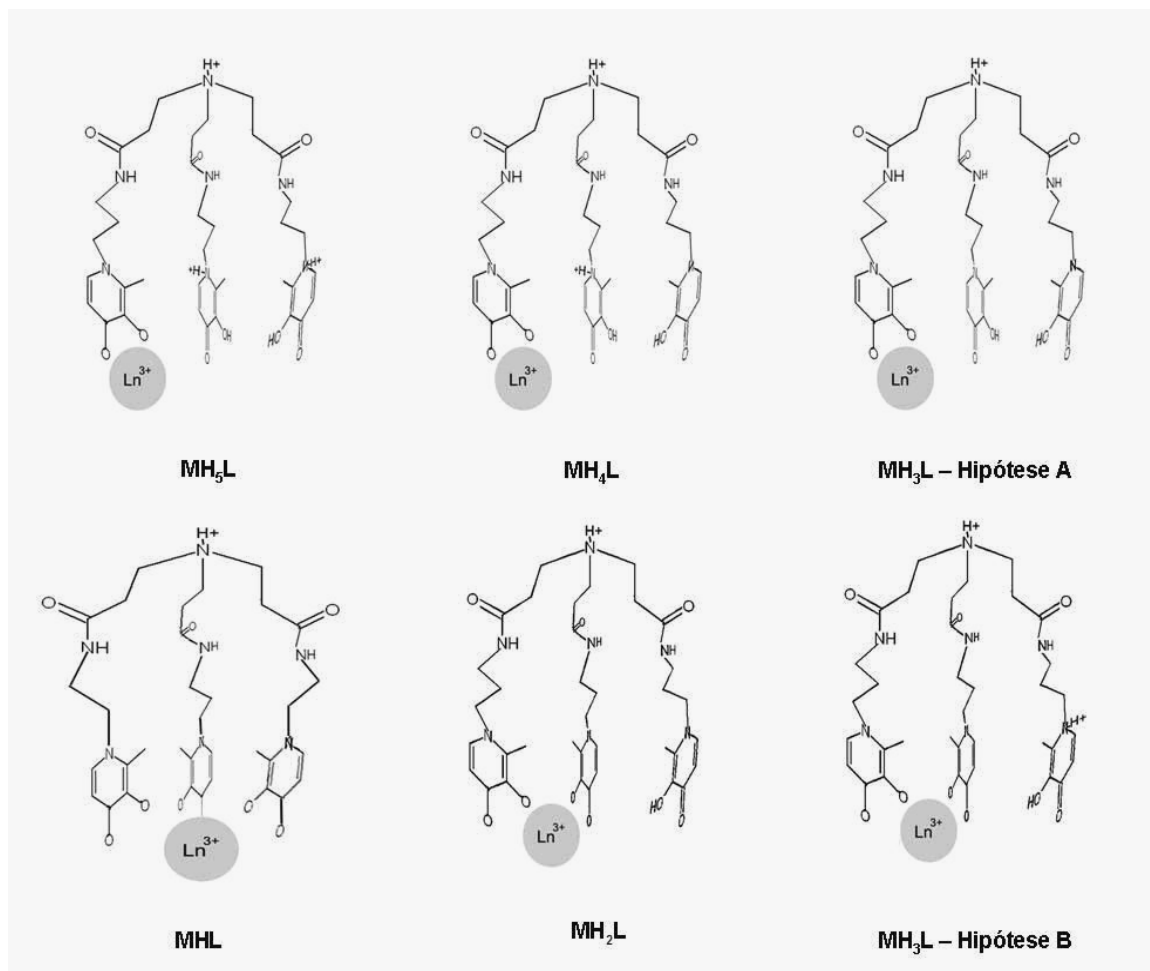


Figura 20: Estruturas prováveis para os diferentes complexos de lantanídeos.

Analise-se agora o diagrama de distribuição de espécies para o ião Lantânio (Figura 21). Neste caso, a formação de complexos ocorre a partir de pH 2, enquanto que no caso do gálio tinha início a $pH < 2$. Este facto também já tinha sido confirmado pela comparação das curvas de titulação do ligando na presença e ausência do ião metálico.

A pH 3, a espécie MH_5L é a mais abundante em solução, com ~ 30% de formação, sendo o restante, excesso de metal e uma pequena percentagem de MH_4L . A pH 4, já 50% da solução é composta pelo complexo bidentado MH_4L e a pH 5, tem-se MH_3L em maior percentagem. A partir de pH 5.5 têm-se as espécies MH_2L , MHL , MH_5L_2 e MH_3L_2 , todas em solução. Pela % de formação de cada um destes complexos, verifica-se que existe maior tendência para a formação dos complexos 1:2, do que dos complexos 1:1.

A pH fisiológico, existe 60% de MH_3L_2 formado em solução. Este é um complexo de

elevada estabilidade termodinâmica (tal com o se pode ver pelo seu valor de β_i), onde o metal se encontra “preso” e protegido dentro da cavidade formada pelos ligandos.

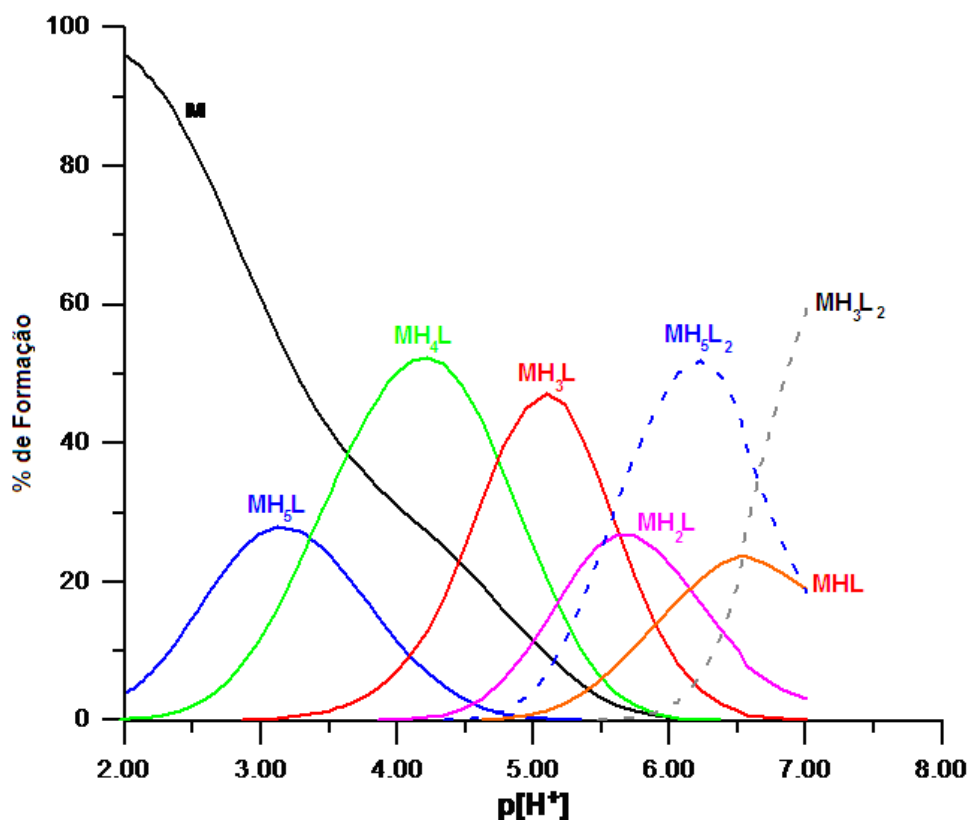


Figura 21: Diagrama de distribuição de espécies do Sistema La³⁺ - NTP(PrHP)₃ 1:2.

Por norma, o mais elevado número de coordenação é 8, no entanto a química dos metais do bloco f (lantânídeos e actínídeos) indica-nos que eles são uma excepção. De facto, no caso dos catiões de metais do bloco f, com carga e dimensão suficientemente elevadas para atraírem um número elevado de aniões e permitir a sua coordenação sem excessiva repulsão inter-ligandos, ou com orbitais f acessíveis e vazias, necessárias à formação de elevado número de ligações, o número de coordenação pode chegar a 16.

No caso deste lantânídeo em específico e nos complexos 1:2 que ele forma, verifica-se que o mais alto número de coordenação é 10. O complexo MH₅L₂, ao possuir 5 prótons indicando-nos que os dois átomos de azoto terciários, pertencentes os esqueletos dos dois ligandos estão protonados, que uma unidade hidroxipiridinona está totalmente protonada e outra, apenas parcialmente protonada, pelo que nenhuma das duas últimas participa na ligação ao lantânio. Isto dá origem a um complexo com número de coordenação 8.

No caso do complexo MH₃L₂, os dois azotos dos dois esqueletos dos ligandos encontram-se protonados e uma unidade hidroxipiridinona possui o oxigénio protonado, pelo que apenas uma unidade HP não está ligada ao metal e há a formação de um complexo com

numero de coordenação 10.

Em nenhuma destas hipóteses foi considerada a desprotonação dos átomos de azoto apicais de ambas as estruturas de $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$, o que se deveu ao facto de, por estes se encontrarem mais longe do metal, provavelmente, a sua desprotonação torna-se menos favorável do que a desprotonação dos átomos mais próximos deste (azoto e oxigénio). Torna-se também importante referir que a geometria proposta para estes complexos (MH_5L_2 e MH_3L_2) é apenas uma hipótese, uma vez que na ausência de informação suplementar, nomeadamente NMR, não é possível fazer uma previsão mais concreta.

No que diz respeito ao comportamento dos complexos de Praseodímio na presença do ligando $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$, verifica-se que este é idêntico em relação ao caso do lantânio, motivo pelo qual estes resultados não serão aqui discutidos.

Em relação ao Gadolínio, este é um dos iões paramagnéticos mais aplicados em técnicas de diagnóstico por imagem MRI. Com sete electrões desemparelhados e um elevado tempo de relaxação electrónica é ideal para aplicação como agente de imagem. Analise-se o seu gráfico de distribuição de espécies (Figura 22).

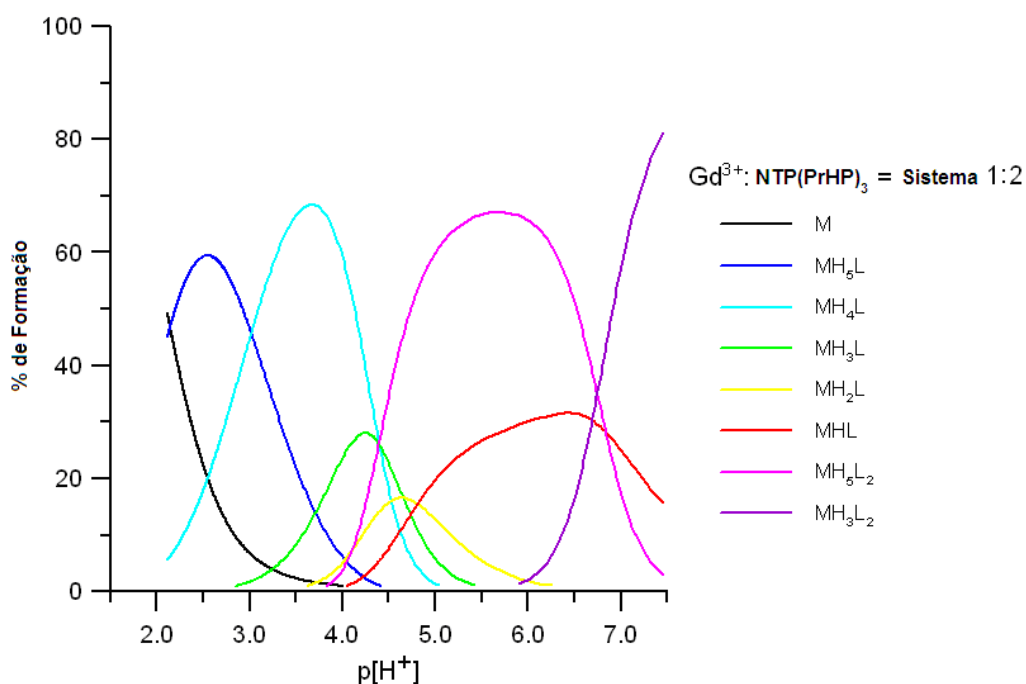


Figura 22: Diagrama de distribuição de espécies do sistema $\text{Gd}^{3+} - \text{NTP}(\text{PrHP})_3$ 1:2.

Este elemento encontra-se numa posição aproximadamente central na série dos Lantanídeos e o seu raio iónico é de 107.8 pm. Ao analisar o diagrama de distribuição de espécies de gadolínio, verifica-se um padrão muito semelhante em relação aos casos anteriores (La e Pr). No entanto, a formação de complexos de gadolínio começa a pH mais baixo, com a presença da espécie MH_5L em solução mesmo antes de se atingir pH 2. Isto indica uma maior afinidade deste metal pelo ligando em estudo, o que também é confirmado

pelo perfil da curva de titulação com Gd(III) em relação à curva de La(III), no gráfico da figura 19.

A partir de pH 4 ocorre a formação da espécie MH_5L_2 , cuja % é superior a 50% ao longo de toda a gama de pH que vai deste 4.5 até 6.5.

A pH fisiológico, a espécie que predomina em solução é MH_3L_2 , que tal como já foi referido anteriormente, considera-se que pode corresponder a um complexo com número de coordenação 10.

Em relação aos iões Er^{3+} e Lu^{3+} , que se situam no extremo direito da série dos lantanídeos, o comportamento deles é bastante semelhante. Os resultados para o caso do érbio vêm descritos de seguida (Figura 23).

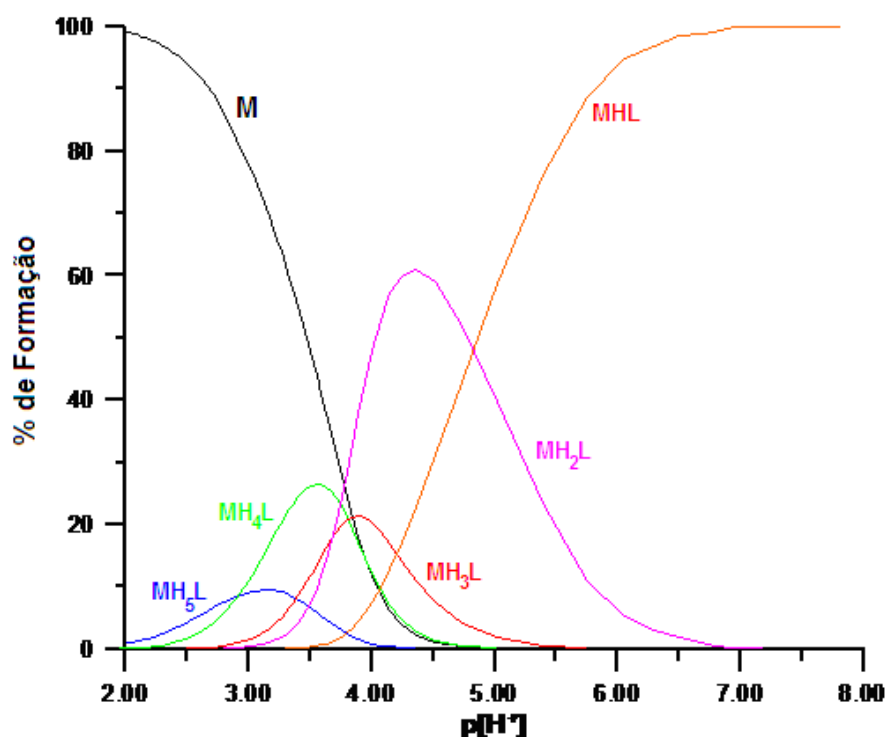


Figura 23: Diagrama de distribuição de espécies do sistema Er/tris 1:1.

Para este sistema érbio(III)/NTP($PrHP$)₃, existe um teor excessivo de metal em solução, que só atinge 0% após a formação do complexo tetradentado MH_2L , a partir de pH 4. Este complexo atinge a sua % de formação máxima a pH 4.5, altura a partir da qual se começa a formar a espécie MHL, correspondente ao ligando hexadentado. A pH fisiológico 100% do complexo está sob a forma de MHL.

Tal como já foi referido anteriormente, no caso destes dois lantanídeos não há formação de complexos 1:2.

Um dos objectivos do estudo de complexos com estes quatro iões metálicos

lantanídeos diferentes, posicionados estrategicamente nesta série da tabela periódica, foi a análise da “contração dos lantanídeos”. Verifique-se de seguida este feito de contração, através de uma análise detalhada do gráfico de $\log \beta_{MHL}$ versus r^{-1} , sendo r o raio iónico dos iões Lantanídeos em estudo (Figura 24).

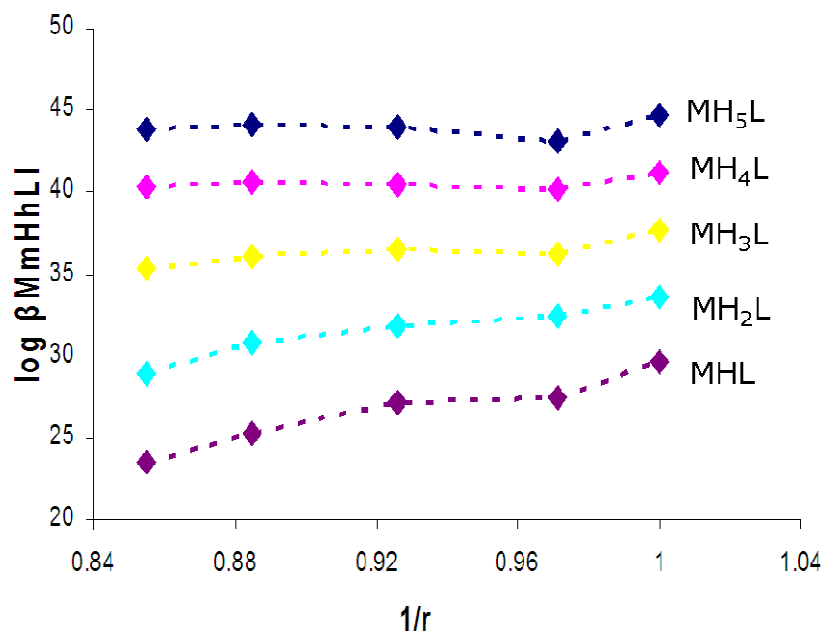


Figura 24: Gráfico de $\log \beta_{MHL}$ dos complexos formados versus r^{-1} dos metais lantanídeos em estudo.

A tendência de $\log \beta_{MH_iL}$ no caso das espécies MH_5L , MH_4L e MH_3L , é quase paralela para todos os metais estudados. De facto, os valores das constantes de estabilidade da espécie MH_5L para cada um dos metais estudados são muito semelhantes entre si, verificando-se aproximadamente o mesmo comportamento no caso das espécies MH_4L e de MH_3L . Isto indica que o mecanismo responsável pela estabilidade dos complexos é independente da densidade de carga do ião metálico. Normalmente, os gráficos de $\log \beta$ em função de $1/r$ (r = raio iónico) seguem uma tendência ondulatória: os valores são elevados para os primeiros elementos e tendem a diminuir à medida que se avança para o meio da série, até que aumentam novamente para os elementos mais pesados. Este comportamento é interpretado como reflectindo alterações na esfera de solvatação dos iões, durante a complexação. A tendência quase paralela destes valores de $\log \beta_{MH_iL}$ ($i=3-5$) para os diferentes metais da série, sugere que não ocorrem alterações significativas na esfera de solvatação do metal aquando da formação dos complexos acima mencionados. Já no caso das constantes de estabilidade de formação dos complexos MH_2L e MHL , estas aumentam significativamente à medida que se avança de La^{3+} até ao Lu^{3+} , sugerindo a dependência da densidade de carga do átomo aceitador, ou seja, do lantanídeo. O ião Lu^{3+} é o que possui maior densidade de carga em relação a todos os outros e também aquele cujos complexos MH_2L e MHL são mais estáveis.

Este facto pode ser confirmado pelas curvas de titulação potenciométrica (ver figura 19). Estas mostram que a afinidade dos lantanídios(III) pelo ligando depende significativamente do seu raio iónico. Por exemplo, a pH próximo de 4, cinco protões são removidos do ligando devido à formação dos complexos de Lu^{3+} , Er^{3+} e Gd^{3+} , enquanto que o ião La^{3+} forma complexos deste tipo apenas a pH ~ 6.



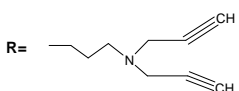
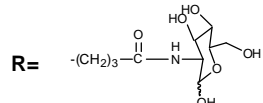
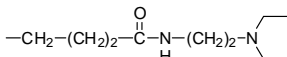
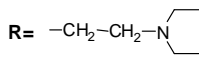
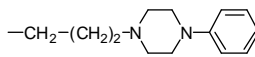
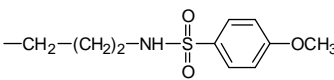
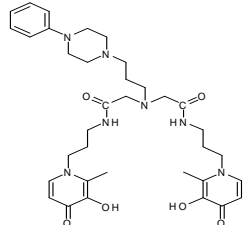
Torna-se importante referir que nestes sistemas, tal como aconteceu com os complexos de Gálio(III), houve formação de um precipitado, a partir de pH ~ 7. Supõe-se que, provavelmente, e tal como aconteceu no sistema $\text{Ga(III)/NTP(PrHP)}_3$, este precipitado corresponda à espécie neutra ML.

Tal como já foi referido na introdução teórica, estudos efectuados por Raymond et al^{47,50}, indicam que quanto maior o número de moléculas de água coordenadas directamente ao metal, mais eficiente se torna o agente de contraste. Sendo assim, neste caso, tendo em conta os complexos que se formam com o ligando em estudo e os vários lantanídeos, seria interessante avaliar o número de moléculas de água eventualmente coordenadas ao metal, pelo menos no caso dos complexos de gadolínio. Esta análise poderia ser feita efectuando estudos, por exemplo, de obtenção das estruturas de Raio-X destes complexos.

2.2 Testes Biológicos

2.2.1 Ensaios de toxicidade e morfológicos

Tabela 6: Resultados obtidos nos ensaios de toxicidade com os compostos em estudo. R corresponde ao grupo lateral ligado ao azoto piridínico.

Concentração (μM)		% de Vitalidade Celular na presença do composto (X)							
		Controlo	100	10	1	0.5	0.1	0.01	0.001
(1) ⁶¹	R = 	100	99 \pm 10	97 \pm 9	103 \pm 8	102 \pm 3	108 \pm 8	114 \pm 13	116 \pm 7
(2) ³²	R = 	100	95 \pm 8	103 \pm 13	103 \pm 5	109 \pm 16	93 \pm 11	103 \pm 13	109 \pm 5
(3) ⁶²	R = 	100	85 \pm 4	96 \pm 14	87 \pm 11	93 \pm 13	90 \pm 14	90 \pm 12	90 \pm 10
(4) ^{59,60}	R = 	100	92 \pm 8	108 \pm 10	108 \pm 4	105 \pm 6	110 \pm 10	99 \pm 12	105 \pm 8
(5) ³⁰	R = 	100	104 \pm 4	102 \pm 10	104 \pm 10	106 \pm 9	105 \pm 9	108 \pm 13	102 \pm 5
(6) ³⁰	R = 	100	101 \pm 10	104 \pm 9	109 \pm 12	108 \pm 13	102 \pm 14	108 \pm 11	105 \pm 10
(7) ⁶³	R = 	100	99 \pm 6	104 \pm 10	116 \pm 4	115 \pm 13	111 \pm 2	117 \pm 5	120 \pm 5
(8) ³⁰	R = 	100	70 \pm 2	102 \pm 3	103.0 \pm 0.3	102 \pm 2	118 \pm 4	113 \pm 4	112 \pm 3
(9) ^{64,65}		100	96 \pm 13	94 \pm 3	105 \pm 11	104 \pm 21	102 \pm 13	106 \pm 23	105 \pm 14

2.2.1.1 Composto (1)

Este é um composto comercial bem conhecido, 1,2-dimetil-3-hidroxi-piridin-4-ona (DFP), usado no tratamento das doenças associadas a um excesso de ferro na corrente sanguínea (terapia de quelação). O seu coeficiente de partição ($\log P$) octanol/água é $-1,03^{61}$.

Os ensaios com **(1)** foram efectuados com o intuito de confirmar a sua não toxicidade e de comparar com os outros compostos aqui em estudo, uma vez que ele já é um produto comercial. Posto isto, pode verificar-se (ver tabela 6) que a vitalidade celular de células tratadas com DFP, quando comparando com o controlo, é máxima, mesmo à mais elevada concentração em estudo. Por outro lado, consegue-se perfeitamente observar que a tendência é para haver um aumento de vitalidade à medida que a concentração de composto no meio diminui, pelo que a concentração à qual ele possui maior actividade na célula deve rondar os $0.001 \mu\text{M}$.

Devido à sua elevada capacidade quelante, ao captar o ferro(III), este composto poderá prevenir reacções de oxidação dentro da célula, tal como referido anteriormente na introdução teórica deste trabalho.

Na figura 25 estão representadas as imagens obtidas por SEM, das células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas com **(1)**. Verifica-se que estas possuem uma morfologia muito semelhante às células do controlo, o que indica não haver nenhuma alteração morfológica aquando do tratamento com este composto.

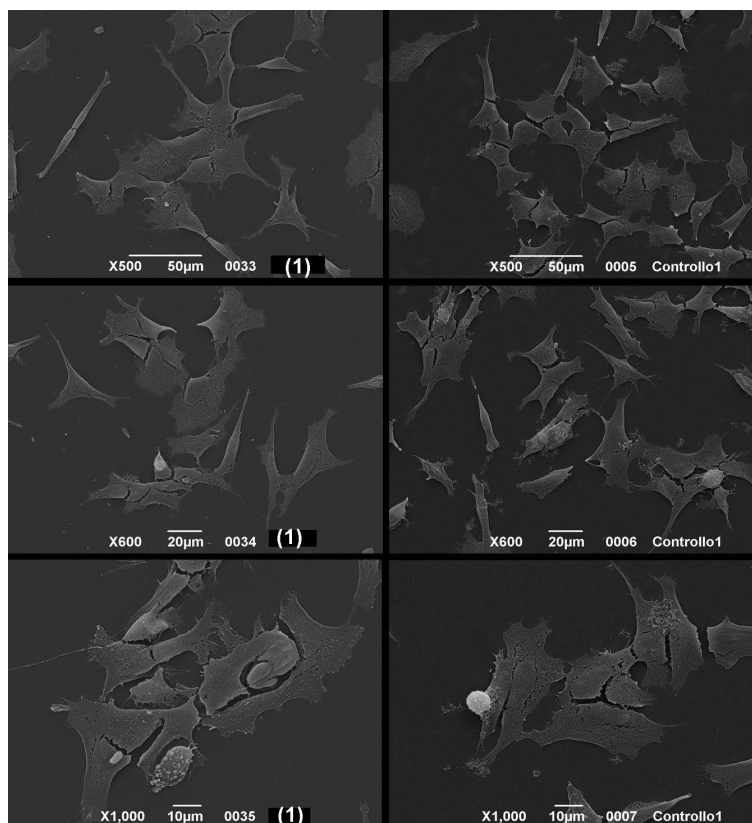


Figura 25: Imagem obtida por S.E.M., das células tratadas com **(1)**. ($C_{\text{composto}} = 100 \mu\text{M}$).

2.2.1.2 Composto (2)

O composto 1-(3'-aminopropil)-3-hidroxi-2-metil-4-piridinona é um derivado amina e foi sintetizado a partir de uma unidade DMHP em que na posição 1 foi inserido um grupo funcional amina primária (aminopropil). O composto **(2)** foi sintetizado com o principal objectivo de servir como intermediário na preparação de outros derivados. O seu coeficiente de partição (log P) octanol/água é 0.03³².

Em relação aos testes de toxicidade em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, os resultados obtidos e respectivo erro padrão, encontram-se resumidos na Tabela 6. Para todas as concentrações, verificou-se que os valores estão muito próximos de 100% de vitalidade, o que significa que esta molécula não produz qualquer toxicidade para a célula.

No que diz respeito ao maior valor de concentração (100 µM), a vitalidade celular é menor, o que seria de esperar, uma vez que as células estão a ser invadidas por composto que, ao interagir com outras moléculas no interior da célula, podem provocar danos. Para as concentrações seguintes, verificou-se que a vitalidade celular aumenta, acima mesmo do controlo, o que para além de significar que este composto não é prejudicial para as células, significa que também aumenta a sua vitalidade.

O facto do coeficiente de partição deste derivado amina ser elevado (0.03), significa que é lipofílico e tem capacidade para ultrapassar a membrana biológica e alcançar os locais intracelulares onde há acumulação de ferro. Posteriormente, tal como explicado para o caso do composto **(1)**, ele poderá funcionar como agente anti-oxidante e quelante de iões ferro em excesso na célula.

No que diz respeito às imagens obtidas por SEM o resultado é bastante semelhante ao verificado em **(1)** (Figura 25), no entanto, foram identificados alguns pontos brancos, que podem eventualmente significar a presença de células em apoptose, o que neste caso é normal, uma vez à concentração de 100µM, já tinha sido verificado que a vitalidade celular diminui.

2.2.1.3 Composto (3)

O composto 1-(3'-(di-prop-2-inil)aminopropil)-3-hidroxi-2-metil-piridin-4-ona foi estrategicamente pensado e sintetizado de forma a ser bifuncional e actuar em duas frentes no combate às doenças neurodegenerativas, nomeadamente as doenças de Parkinson e Alzheimer. Ou seja, por um lado inibir a enzima MAO-B (responsável pela degradação oxidativa do neurotransmissor Dopamina e consequente aceleração da degeneração cerebral num doente com Parkinson) e por outro lado, captar iões metálicos que se acumulam no cérebro, sendo estes responsáveis pelo aceleração de ambas as doença de Parkinson e Alzheimer.

Derivado de uma deferriprona e funcionalizado com uma amina di-propargilada, este

composto é um quelante bidentado e um inibidor da enzima monoaminooxidase. De facto, está provado que o grupo propargilo funciona como inibidor desta enzima^{75,76,77}.

Em relação aos testes de toxicidade, os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 6, onde se verifica que, em relação ao controlo, à concentração de 100 μM , a vitalidade celular é de apenas 85 ± 4 , ou seja, o composto é um pouco tóxico. À medida que a concentração vai diminuindo, a vitalidade aumenta para aproximadamente 100%. Em conclusão, este composto não induz qualquer toxicidade celular para concentrações inferiores a 100 μM , tendo sido 10 μM a concentração que produziu melhores resultados.

O seu coeficiente de partição octanol/água ($\log P = -0.13^{62}$) evidencia uma maior lipofilicidade em relação ao composto comercial utilizado em terapia de quelação, o composto **(1)** ($\log P = -1.03^{61}$), facto justificado através do carácter hidrofílico do grupo amina, que é compensado pelo carácter lipofílico dos seus dois substituintes alquila. Isto torna-se uma grande vantagem em termos de biodisponibilidade e permeabilidade à barreira hematoencefálica (Blood Brain Barrier), dois dos requisitos principais a uma potencial droga anti-neurodegenerativa.

Sendo assim, a vitalidade quase total no caso da concentração 10 μM , pode ser explicada tendo em conta as hipóteses de que a neuroprotecção em doenças neurodegenerativas requer uma droga permeável, que combine propriedades de anti-oxidante, de quelante do ferro e neste caso, especificamente, de inibição da enzima MAO, responsável pela degradação de neurotransmissores Dopamina.

No que diz respeito às imagens de SEM (figura 26), verifica-se que para a concentração de 100 μM , existem algumas células em apoptose, pelo mesmo motivo que para o composto **(2)**. Em relação à morfologia, não se evidencia qualquer alteração entre as células tratadas e as células do controlo.

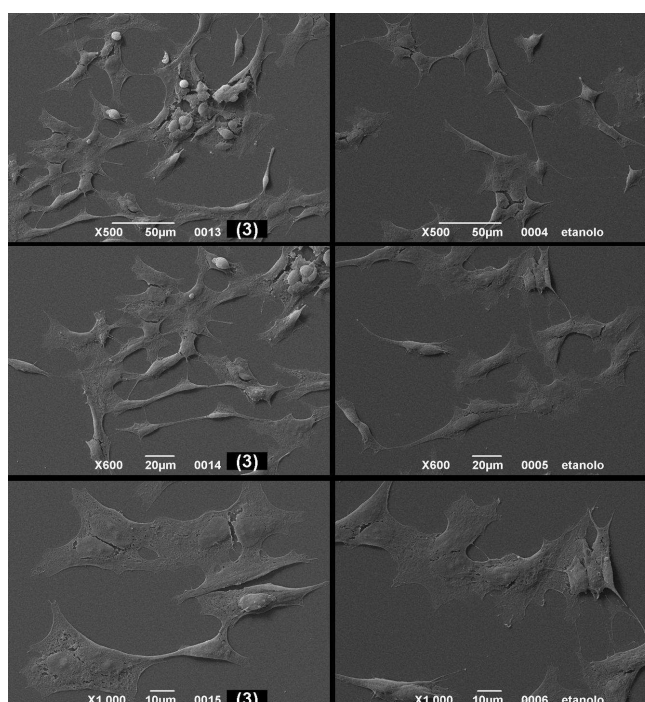


Figura 26: Imagem obtida por S.E.M., das células tratadas com **(3)**. ($C_{\text{composto}} = 100\mu\text{M}$).

2.2.1.4 Composto (4)

O composto **(4)** resulta do acoplamento entre uma unidade DMHP, um grupo propilamida e um açúcar. É um análogo do composto Feralex-G, no entanto espera-se que as suas propriedades lipofílicas e quelantes sejam superiores. Existe um grande interesse na estrutura 3,4-hidroxipiridinona glicosídica por dois motivos principais. Um dos motivos consiste na sua interacção específica com células hiperfosforiladas da matriz cerebral⁷⁸, interrompendo a agregação de proteínas que levam á formação de emaranhados fibrilares e ao mesmo tempo removendo Alumínio e Ferro acumulados em cérebros com Alzheimer⁷⁹. O segundo motivo é a interacção do grupo açúcar com transportadores específicos de glucose, super-expressos em certo tipo de tumores. Sendo assim, em relação a este ultimo caso, a produção de um complexo radiometálico com o ligando **(4)**, pode ter uma potencial aplicação em medicina, nomeadamente como agente de radiodiagnóstico⁸⁰, tendo em conta a abordagem bifuncional, tal como já foi referido na introdução teórica a este trabalho (ver 1.5.2).

Os testes de toxicidade realizados em células de neuroblastoma humano (Tabela 6), revelaram que este derivado da glicose é bastante eficiente dentro da célula, uma vez que a vitalidade de células tratadas a uma concentração de composto inferior a 100 μM é aproximadamente 100%.

A glicose é hidrossolúvel, pelo que a sua hidrofília faz com que a passagem pela membrana por difusão seja lenta e não representativa das necessidades constantes de glicose para gerar energia á célula, no entanto, a glicose irá entrar na célula por transporte activo ou ligada a transportadores de glicose específicos. O composto em estudo, ao possuir uma unidade glicose, pode interagir com os transportadores de glicose na superfície das células de neuroblastoma humano e atravessar a membrana com maior facilidade. Uma vez lá dentro funciona como quelante de metais e como agente anti-oxidante.

Também foi verificado que a concentração à qual existe melhor vitalidade é 0.1 μM de composto no meio.

Nas imagens SEM observou-se uma cultura homogénea de células morfológicamente inalteradas, um comportamento semelhante ao já verificado no caso do composto **(1)** (Figura 25). Nesta imagem os neurónios encontram-se aplanados e dispersos ao longo da lamela, uma imagem muito semelhante ao respectivo tratamento feito com água.

2.2.1.5 Composto (5)

O composto 1-[N-(2-dietilamino-etil)propilamida]-3-hidroxi-2-metil-piridin-4-ona deriva de uma hidroxipiridinona extra-funcionalizada com um grupo propilamida e uma dietilamina. O seu interesse reside no grupo dietilamina, uma vez que existem dados que indicam que este grupo possui bastante afinidade para com os receptores sigma, os quais são encontrados no

cérebro com relativa abundância e super expressos por certos tumores sólidos^{81,82,83}. Sendo assim, ele pode funcionar como agente de radiagnóstico tumoral e ao mesmo tempo como agente quelante de iões metálicos, tal como o composto anterior.

O seu coeficiente de partição (log P) octanol/água é -1.9^{30} .

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade (Tabela 6) permitem afirmar que este derivado dietilamina não induz qualquer toxicidade para as células e, nem mesmo à mais elevada concentração em estudo, ocorre diminuição da vitalidade celular.

As imagens SEM para as células de neuroblastoma humano tratadas com **(5)** são semelhantes às da figura 25, correspondente às células tratadas com **(1)**. Sendo assim, não se verificou qualquer alteração morfológica e aparentemente as células encontravam-se saudáveis.

2.2.1.6. Composto (6)

O composto **(6)**, 1-(2-dietilamino-etil)-3-hidroxi-2-metil-piridin-4-ona, foi N-derivatizado com um grupo dietilamino-etil. Tal como já foi referido para o caso do composto **(5)**, os grupos dietilamina possuem um elevado potencial para serem reconhecidos pelos receptores sigma^{81,82,83}, pelo que este composto, quando complexado com um radionuclídeo, pode também ser utilizado como agente de contraste bifuncional em técnicas de radiodiagnóstico.

O seu coeficiente de partição (log P) octanol/água é -0.6^{30} .

A diferença entre este composto e o anterior reside na unidade de espaçamento entre a 3,4-hidroxipiridinona e o grupo dietilamina. No caso do composto **(5)** existia uma propilamida e, neste caso, apenas existe uma cadeia carbonada (etilo), que é o suficiente para aumentar a lipofilicidade (log P) deste composto de -1.9 para -0.6 , respectivamente.

Em relação aos testes de toxicidade em células SH-SY5Y, os resultados obtidos e respectivo erro padrão resumidos na Tabela 6, parecem mostrar que o facto de **(6)** ser mais lipofílico do que **(5)** faz com que os resultados do presente composto apareçam um pouco mais elevados. Com efeito, por ser mais lipofílico, não só tem a capacidade de ultrapassar com maior facilidade a barreira hematoencefálica, como também a barreira biológica, de modo a captar iões metálicos em locais específicos dentro e fora da célula, como também para interagir com os receptores sigma devido ao seu grupo dietilamina. O único problema, tanto deste como do composto anterior, é que ao pH fisiológico ambos estão sob forma H_2L^+ , que corresponde á amina protonada, podendo existir uma maior resistência à sua passagem pela membrana³⁰.

Os resultados de SEM demonstraram a inexistência de qualquer alteração na morfologia das células, pelo que as imagens obtidas são semelhantes a **(1)** (figura 25).

2.2.1.7. Composto (7)

O composto em causa, (3-hidroxi-2-metil-1-[3-(4-fenil-piperazin-1-il)-propil]-1H-piridin-4-ona (Pip-HP), foi obtido por N-funcionalização do azoto do anel de piridinona com um grupo

1,4-arilpiperazina. Este grupo, tal como o grupo propilamida existente na estrutura dos compostos **(5)** e **(6)**, é facilmente reconhecido por receptores sigma^{81,82,83}, os quais são super-expressos em tumores sólidos. Por este motivo, **(7)** também poderia ser aplicado como agente revelador tumoral. Devido ao seu carácter bifuncional, pode por um lado funcionar como agente quelante de metais através da unidade HP e, por outro lado, ser mais facilmente reconhecido a nível biológico através do grupo arilpiperazina.

Por outro lado, os compostos que na sua constituição possuem grupos arilpiperazina são conhecidos por terem como alvo os receptores de Serotonina (5-HT_{1A}), moléculas que desempenham um papel importante em perturbações psíquicas (estes receptores actuam no SNC, onde induzem os fenómenos de inibição neuronal e controlam o comportamento, ou seja, o sono, a alimentação, a termo-regulação, a agressão e a ansiedade)⁸⁴. Os antagonistas dos receptores de Serotonina encontraram aplicação farmacológica no tratamento de disfunções no SNC, tal como a doença de Alzheimer⁸⁵.

O Pip-HP é um composto de interesse pois possui uma elevada retenção a nível do cérebro^{30,59,63}, sugerindo que este grupo arilpiperazina pode favorecer a passagem de **(7)** através da barreira hematoencefálica. A razão pela qual isto acontece deve-se, provavelmente, ao seu carácter anfílico e elevado coeficiente de partição ($\log P$ (octanol/água) = 1.06⁶³), indicando a sua elevada lipofilicidade.

No que diz respeito aos testes de toxicidade em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, os resultados obtidos e respectivo erro padrão (tabela 6), demonstram que a vitalidade das células tratadas com **(7)**, quando comparada com a dos outros ligandos já aqui discutidos, vem mais elevada. Também se verifica que, a partir da concentração 1 μ M, a vitalidade celular cresce bastante, mais ainda do que para o composto comercial deferriprona (ver 2.2.1.1.).

A presença de um anel aromático provoca um aumento do carácter ácido dos protões da piperazina, pelo que ao pH fisiológico, a forma neutra deste composto (HL) é a mais predominante (84%)⁶³. Por outro lado, o grupo arilo induz um esperado aumento do carácter hidrofóbico do ligando. Posto isto, a capacidade deste composto para ultrapassar a membrana biológica e funcionar como agente quelante e antioxidante dentro da célula será, aparentemente, mais elevada.

Os resultados anteriores podem ser confirmados através das imagens obtidas por SEM (Figura 27). De facto, consegue-se ver um pequeno aumento da densidade celular quando se passa do meio tratado com composto para o meio correspondente ao controlo. A morfologia das células também não é alterada.

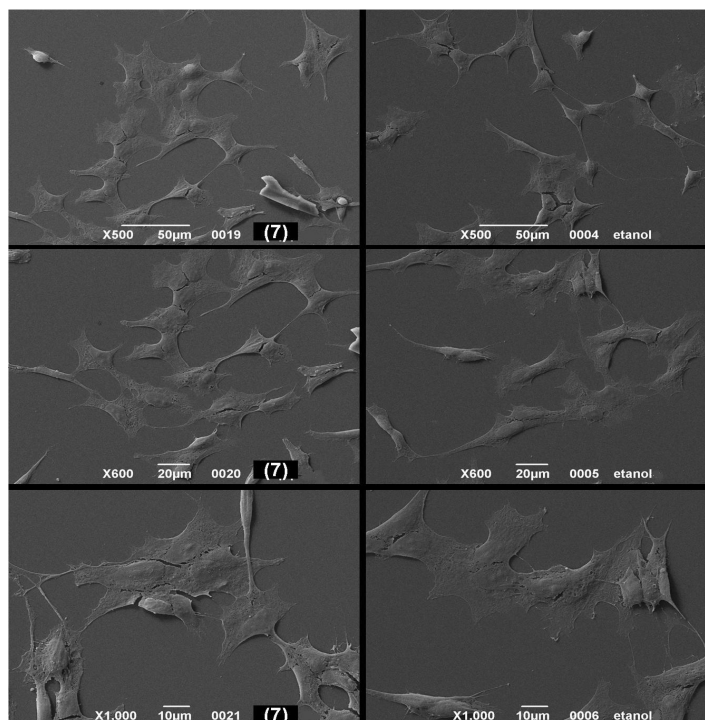


Figura 27: Imagem obtida por S.E.M., das células tratadas com (7). ($C_{\text{composto}} = 100\mu\text{M}$).

2.2.1.8. Composto (8)

O composto 1-(4-metoxibenzeno-sulfonamida-propil)-3-hidroxi-2-metil-piridin-4-ona é um derivado sulfanamida e foi preparado via reacção entre um grupo lateral amina primária e o correspondente cloreto de aril sulfonilo.

Os resultados de toxicidade (Tabela 6) revelaram que à concentração de 100 μM o composto induz alguma toxicidade às células SH-SY5Y, uma vez que a % de vitalidade celular corresponde a apenas 70 ± 2 . A partir da concentração 10 μM verifica-se um aumento da vitalidade, ocorrendo o seu valor máximo à concentração de 0.1 μM de composto.

A presença de um grupo sulfonilo e do substituinte $-\text{OCH}_3$ do anel aromático induz alguma lipofilicidade ao composto ($\log P$ octanol/água $- 0.3^{30}$). No entanto, ao pH fisiológico, a espécie mais abundante (99%)³⁰ é a espécie monocarregada H_2L^+ . Este factor pode afectar a sua passagem através da membrana biológica e eventualmente, fará com que a vitalidade celular induzida nas células venha inferior aquela obtida nos outros casos aqui discutidos.

Em relação às imagens obtidas por SEM, estas confirmam a tendência descrita acima, ou seja, alguma toxicidade deste composto derivado de aril sulfonilo à concentração de 100 μM (Figura 28).

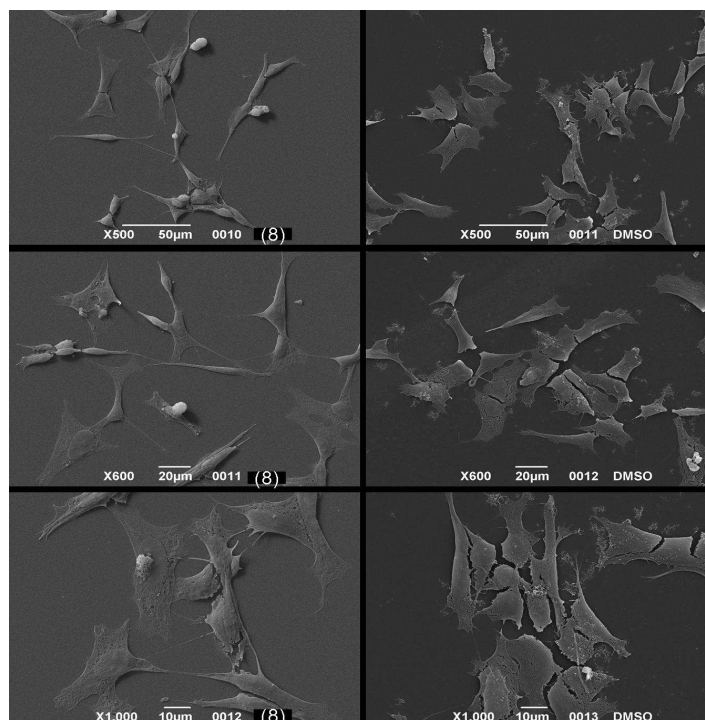


Figura 28: Imagem obtida por S.E.M., das células tratadas com **(8)**. ($C_{\text{composto}} = 100\mu\text{M}$).

Na imagem **A**, correspondente ao tratamento com **[9]**, consegue-se verificar que existem algumas células eventualmente em apoptose (aglomerados brancos) e que a morfologia das mesmas se encontra ligeiramente alterada. Comparando com o controlo, as células não se encontram tão aplanadas e distendidas.

2.2.1.9. Composto [9]

Tendo em conta a estratégia combinada *target-ligand* que foi usada no design deste ligando, produziu-se um composto tetradentado por acoplamento de duas unidades 3,4-HP e extra-funcionalizado com um grupo propilamida, por N-derivatização de um esqueleto IDA (ácido iminodiacético) com um grupo funcional arilpiperazina. Tal como já foi dito anteriormente para o caso do composto **(7)**, as 1,4-piperazinas di-substituídas apresentam elevada afinidade para com os receptores sigma, sugerindo a potencial aplicação deste composto como agente de revelação tumoral. Por outro lado, as arilpiperazinas também podem funcionar como antagonistas dos receptores de serotonina, contra a doença de Alzheimer^{84,85}.

No entanto, existe um problema associado a este composto, ou seja, o facto de possuir uma estrutura consideravelmente grande e elevado peso molecular, faz com que em termos de biodisponibilidade e acessibilidade a compartimentos intracelulares específicos e pontos de acumulação de ferro, este composto pode não ser tão vantajoso. O seu coeficiente de partição (log P) octanol/água é - 0.31⁶⁵.

No que diz respeito aos resultados dos ensaios de toxicidade (Tabela 6), os valores

obtidos indicam que o composto não é tóxico para as células de neuroblastoma humano, uma vez que a vitalidade celular é aproximadamente igual à vitalidade das células de controlo, isto é, 100%. No entanto os respectivos erros associados são um pouco elevados.

Nas imagens obtidas por SEM das células tratadas com **(9)** (Figura 29), a morfologia não se encontra alterada. No entanto, verificou-se a existência de contaminação bacteriana na solução. Com o objectivo de determinar a origem desta contaminação, incubou-se apenas o composto no meio de cultura normal (DMEM) e, decorridos três dias, verificou-se ao microscópio a existência de uma grande contaminação bacteriana em toda a solução de **(9)**. A contaminação é bastante evidente no zoom sobre a imagem **A** (Figura 29), em que as células bacterianas aparecem rodeadas, evidenciando-se a sua estrutura de bacilos.

A contaminação bacteriana pode ser uma explicação para o facto da vitalidade celular vir superior a 100% nas concentrações de composto inferiores a 1 μM , inclusive. Quando se efectua a leitura de absorvância para medir a vitalidade celular, não só as células de neuroblastoma absorvem, como também as restantes células presentes em solução, que neste caso correspondem a células bacterianas, dando origem a um valor de % celular erróneo e superior ao que existe na realidade. É provavelmente também por este motivo que os erros associados aos valores obtidos são ligeiramente mais elevados do que o normal.

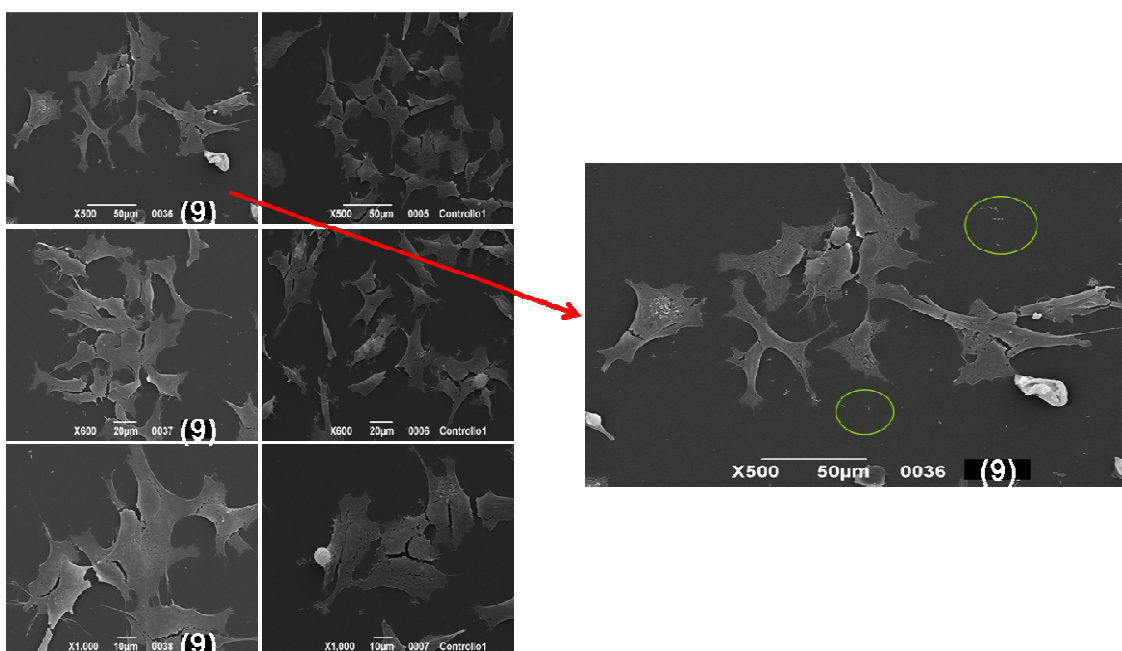


Figura 29: Imagens obtidas por S.E.M., das células tratadas com **(9)**. A imagem da direita corresponde a um zoom da figura A. ($C_{\text{composto}} = 100\mu\text{M}$).

Uma possível explicação para este facto pode ter a ver com a necessidade das bactérias adquirirem ferro. Uma vez que este composto é um potente agente quelante, ele irá captar ferro existente no meio, logo, estando junto a ele, as bactérias poderão sobreviver com maior facilidade.

Estes resultados merecem um estudo posterior sobre a eventual acção do composto

(9) como sideróforo e determinação do respectivo mecanismo de acção.

2.2.2. Interação com as moléculas de ADN

Foi estudada a interacção dos compostos com o ADN de células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y, de modo a verificar se ocorria fragmentação.

Em relação à demonstração dos resultados (figura 30), os géis de agarose foram separados consoante o solvente utilizado. Sendo assim, foram agrupados os compostos **(1)**, **(2)**, **(4)**, **(6)** e **(9)** (solúveis em H₂O), os compostos **(3)**, **(5)** e **(7)** (solúveis em ETOH) e o único composto solúvel em DMSO, **(8)**.

Nos géis, não só foi representado o DNA tratado com os compostos, como também o gene da β -Globina. Este gene, presente na cadeia de ADN das células de neuroblastoma, foi amplificado por PCR (ver 4.2.6) e a sua separação no gel serviu para confirmar os resultados de interacção dos compostos com o ADN. Sendo assim, se ocorrer fragmentação do ADN e simultaneamente do gene da β -Globina, então pode concluir-se que o composto interage negativamente com o ADN. Por outro lado, se apenas o gene vier fragmentado, significa que ocorreu uma alteração na cadeia de ADN na presença dos compostos em estudo. Note-se que também foi representado o controlo (ADN sem tratamento), o controlo do solvente (ADN tratado apenas com o solvente) e o controlo do gene da β -Globina.

No caso dos compostos solúveis em água, verificou-se que nenhum interage negativamente com a molécula de ADN das células de neuroblastoma, visto que a banda correspondente ao DNA tratado aparece ao mesmo nível do ADN do controlo. O facto desta mancha estar ao início do gel, mesmo antes do primeiro fragmento do padrão de fragmentação, significa que aquela é uma molécula de elevado peso molecular e que tem dificuldade em atravessar os poros do gel, até ao extremo oposto.

Por outro lado, também se verificou que o fragmento correspondente ao gene da β -Globina permanece ao mesmo nível do fragmento no controlo da β -Globina e que esse valor de pares de bases também corresponde a um fragmento específico no padrão de fragmentação do ADN.

Portanto, os compostos **(1)**, **(2)**, **(4)**, **(6)** e **(9)** não provocam qualquer alteração no ADN, o que seria de prever uma vez que já foi visto anteriormente que não são tóxicos para as células e não alteram a sua morfologia.

Em relação aos restantes compostos, solúveis em etanol ou DMSO, o comportamento é idêntico. Sendo assim, nenhum dos compostos **(3)**, **(5)**, **(7)** e **(8)** interage com o DNA das células de neuroblastoma humano.

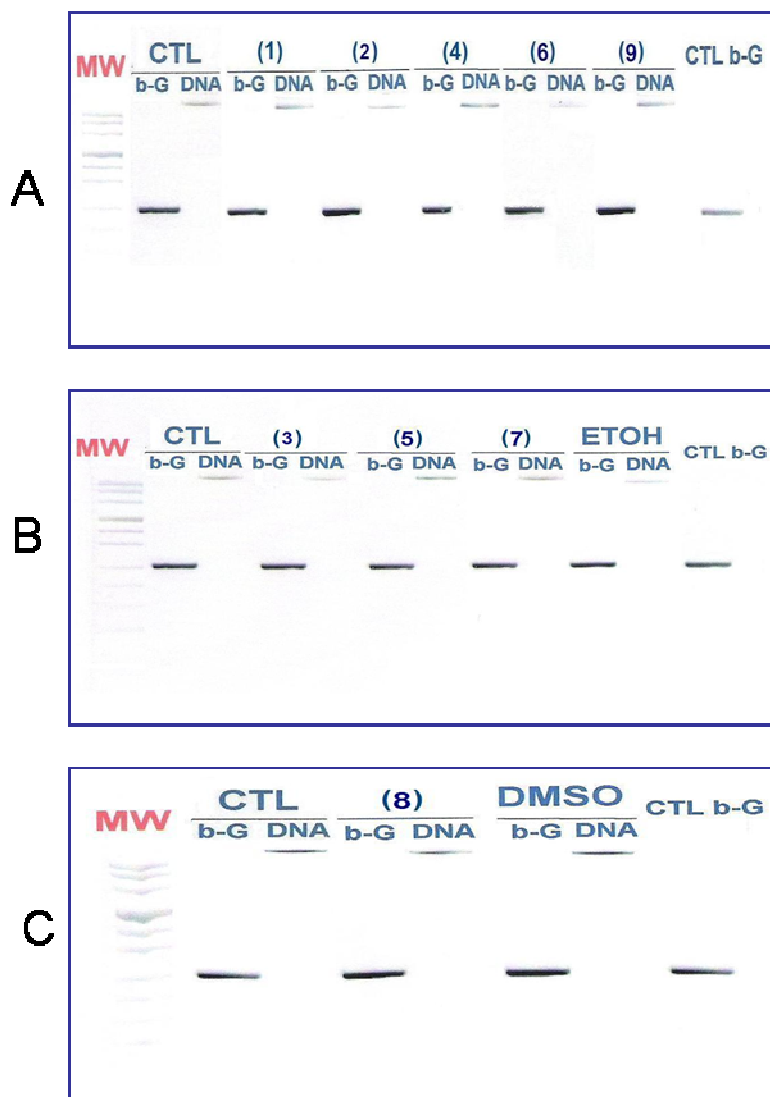


Figura 30: Gel de agarose para os compostos estudados solúveis em: **A** – água, **B** – etanol, **C** – DMSO. (C=100µL).

2.2.3. Alteração das propriedades da membrana de lipossomas

Foi estudada a interação entre a membrana plasmática e os compostos derivados de hidroxipiridinonas **(2)**, **(4)** e **(6)**.

Como modelo da membrana plasmática, utilizaram-se lipossomas produzidos em laboratório, compostos por fosfolípidos DMPC, nos quais se introduziu um fluoróforo, DPH, em meio tampão TRIS, através do procedimento descrito na parte experimental deste trabalho. Foram captadas imagens por SEM dos lipossomas formados, de forma a confirmar a sua estrutura correcta e a homogeneidade da solução (Figura 31).

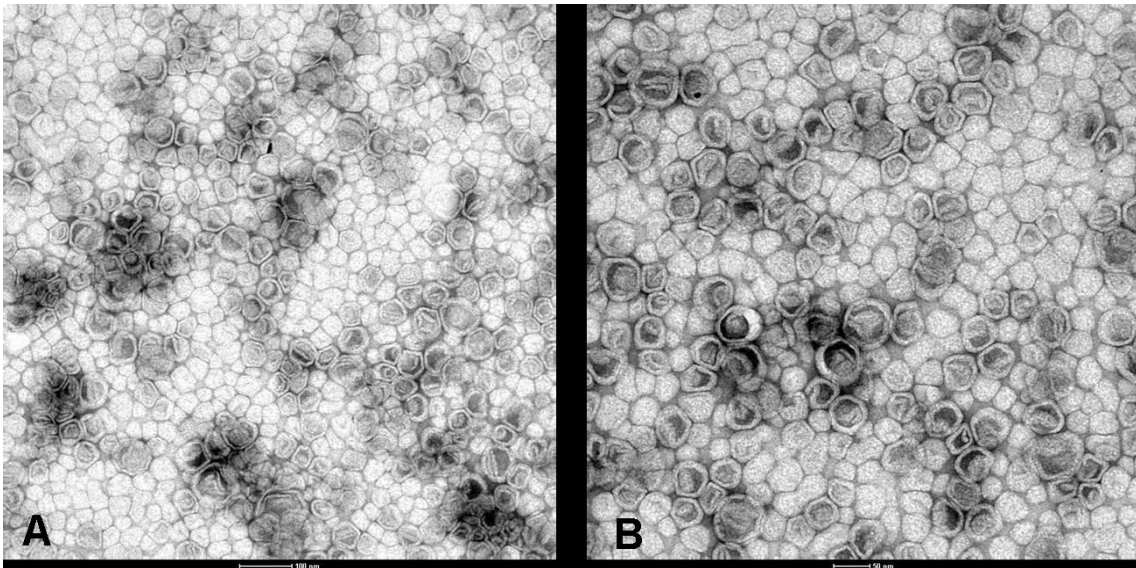


Figura 31: Imagem por S.E.M. dos lipossomas usados como modelo da membrana plasmática.

Os fluoróforos incorporados nos lipossomas permitem medir a anisotropia de fluorescência da solução lipossomática quando na presença dos compostos em estudo, concluindo assim acerca da maior ou menor fluidez da membrana, ao longo de uma escala crescente de temperaturas. A propriedade que nos permite concluir acerca das possíveis alterações na membrana é a temperatura de transição de fase lipídica (T_m). Nos gráficos de anisotropia versus temperatura, o valor de T_m é dado pelo ponto de inflexão da curva.

A temperatura de transição depende dos lipídios utilizados na formação dos lipossomas e, neste caso, ela corresponde a aproximadamente 23°C (ponto de inflexão da curva), tal como se pode observar pelo gráfico da figura 32.

Foi examinada a interação dos compostos com os lipossomas DMPC/DPH, a uma concentração de 100 μM de composto no meio para cada um dos compostos **(2)**, **(4)** e **(6)** (Figura 32).

Os resultados obtidos com os lipossomas modelo indicam que os compostos estudados não alteram a estrutura lipídica dos lipossomas nem as suas propriedades físicas e químicas, devido às quase inalteráveis curvas de anisotropia em relação ao controlo e à temperatura de transição de fase lipídica, que em todos permaneceu igual a 23°C. Este resultado está de acordo com o facto de estes compostos também não serem tóxicos para a célula.

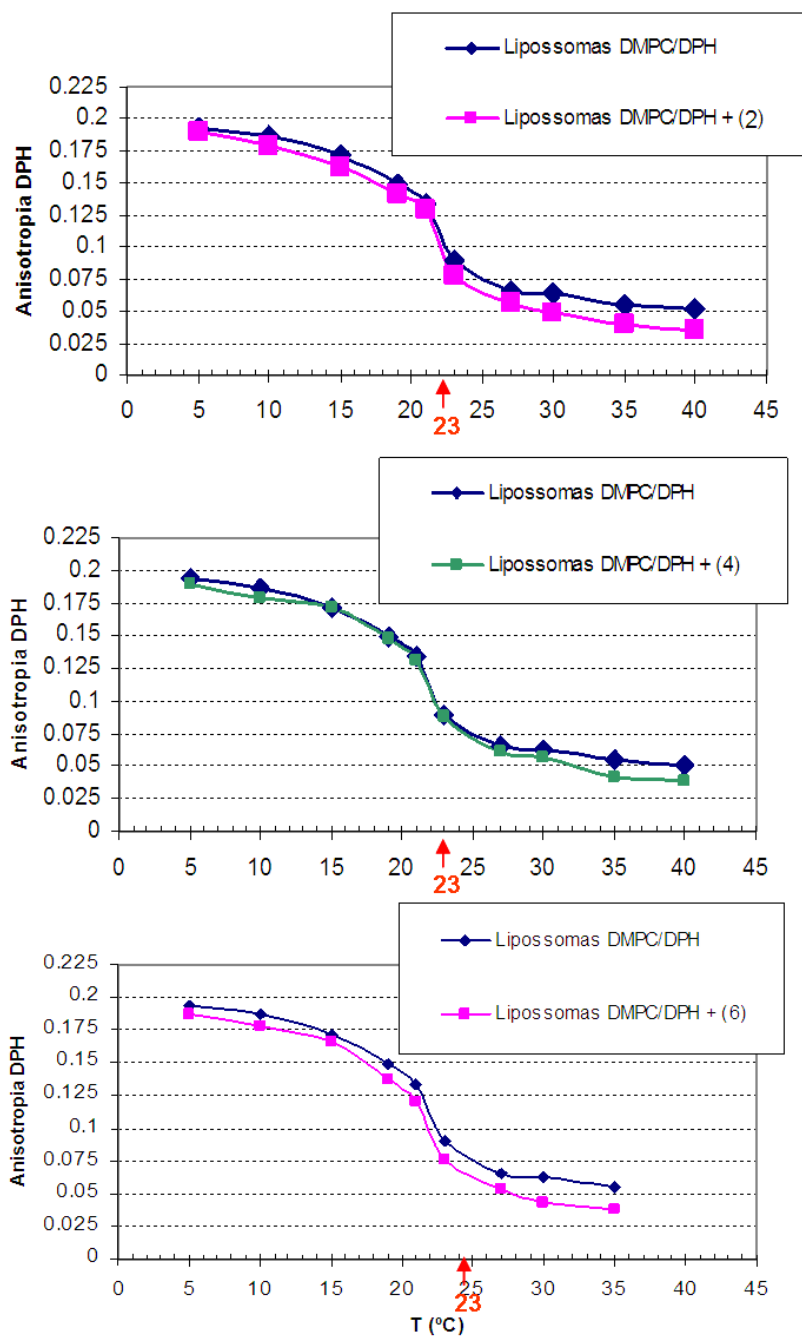


Figura 32: Representação gráfica da curva de anisotropia de fluorescência dos lipossomas DMPC/DPH na presença dos: composto (2), (4) e (6).

Os lipossomas são considerados excelentes veículos de libertação controlada de medicamentos ou substâncias biologicamente activas dentro da célula, devido à sua flexibilidade estrutural, composição e fluidez da bicamada lipídica, tal como devido à sua capacidade de incorporar uma grande variedade de compostos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos.

Por outro lado, um dos grandes problemas associados ao tratamento de doenças relacionadas com o excesso de metais, por terapia de quelação, é a pobre penetração das

moléculas quelantes no interior das células. Devido à sua grande actividade *in vivo*^{86,87}, lipossomas são potenciais meios de libertação de agentes quelantes nos locais de armazenamento de metais. Sendo assim, uma vez que os três compostos estudados não induziram alterações nas propriedades da membrana dos lipossomas, os mesmos poderão estar habilitados a este tipo de transporte até ao interior da célula.

2.3. Conclusões

Os estudos de complexação de Ga(III) com o ligando NTP(PrHP)₃ demonstraram a formação das espécies GaH₅L, GaH₃L, GaHL e GaL em solução aquosa, com constantes de estabilidade consideravelmente elevadas. Com efeito, o valor de pGa para NTP(PrHP)₃ é maior do que o de outros ligandos, tais como o EDTA, o DTPA, o DOTA e o DFO, indicando a elevada eficácia quelante deste ligando hexadentado para com o gálio. Por outro lado, os estudos de biodistribuição realizados indicaram que o radiocomplexo ⁶⁷Ga/NTP(PrHP)₃ não se acumulava no organismo e, que para além de ser excretado por via renal, decorridas 24h da exposição à radiação já não existia vestígio significativo deste composto no corpo. Estes estudos sugerem a potencial aplicação do NTP(PrHP)₃ em radiodiagnóstico (CG e PET).

No que diz respeito à complexação deste ligando com lantanídeos, verificou-se que os metais La, Pr e Gd não só formam complexos 1:1 (metal:ligando), como também 1:2 em solução aquosa. No entanto, no caso dos metais Er e Lu, apenas ocorre a formação do complexo 1:1, o que se deve a uma diminuição do raio iónico destes dois últimos, quando comparando com o dos iões La, Pr e Gd. Em relação à afinidade do ligando NTP(PrHP)₃ pelos lantanídeos, conclui-se que esta é menor do que no caso dos complexos de gálio, uma vez que a formação de complexos começou a pH aproximadamente 3 e no caso do gálio a pH menor do que 2. Isto deve-se eventualmente ao facto dos iões lantanídeos serem fracos ácidos de Lewis e portanto, pouco competitivos em relação aos iões H⁺, pelos átomos de oxigénio.

A pH fisiológico, no caso dos iões La, Pr e Gd, predomina a espécie MH₃L₂ e no caso dos iões Er e Lu, a espécie MHL. Neste tipo de complexos, o metal pode eventualmente estar disponível para se coordenar a moléculas de água, factor que melhora de forma significativa a sua capacidade de actuar como agente de imagem em MRI. No entanto, seriam necessários mais estudos, como por exemplo de Raios-X, que permitissem confirmar esta hipótese.

Também se concluiu acerca da relação entre o efeito de contracção dos iões lantanídeos e a afinidade destes para com o ligando em estudo. Foi verificado que as constantes de estabilidade dos complexos MH₂L e MHL aumentam, com a diminuição do raio do ião. Sendo assim, o ião Lu(III), por estar situado no extremo da classe dos metais lantanídeos, possuir o menor raio iónico e a maior densidade de carga, é também aquele que forma complexos mais estáveis para com o ligando NTP(PrHP)₃.

A série de compostos avaliados biologicamente, são estruturas estáveis a pH ácido e resistentes tanto à hidrólise como à oxidação, características que aliadas à elevada eficácia quelante, os torna potenciais agentes quelantes de metais duros (Fe, Al, Ga). Estes compostos foram estrategicamente extrafuncionalizados de modo a possuírem características específicas em termos de lipofilicidade e interacção com proteínas, entre outros. Verificou-se que nenhum dos compostos da série de derivados de hidroxipiridinonas aqui estudados é tóxico para as células, nem alteram a sua morfologia. No entanto, na maior parte dos casos, a partir de 100

μM de concentração de composto no meio, a viabilidade celular diminui.

Os estudos de fragmentação e de interação com o ADN, bem como as experiências de anisotropia de fluorescência efectuadas com alguns dos compostos ((**2**), (**4**) e (**6**)) demonstraram igualmente não haver alterações no ADN, nem alterações na estrutura lipídica dos lipossomas que possam comprometer a sua respectiva fluidez.

Os resultados biológicos parecem demonstrar que esta série de compostos bidentados derivados de hidroxipiridinonas, por não apresentarem toxicidade, poderão corresponder a potenciais agentes quelantes de metais duros, com eventual efeito neurodegenerativo.

3. Parte Experimental

3.1. Estudos de complexação do NTP(PrHP)3 com Gálio e Lantanídeos

3.1.1. Complexação com Gálio

3.1.1.1. Reagentes e Soluções

O titulante (KOH – 0.1M) foi preparado a partir de uma solução standard de KOH, livre de carbonato (Aldrich, Titrisol).

A solução de HCl foi preparada a partir de uma ampola Titrisol e o electrólito de suporte foi uma solução KCl 1M, preparada a partir do respectivo sal.

A solução de GaCl_3 4.16×10^{-3} M foi preparada em meio 0.1M HCl (para evitar a hidrólise), a partir do respectivo sal de gálio e a sua concentração em gálio aferida através de emissão de plasma acoplado induzido (ICP). A concentração de HCl na solução de GaCl_3 foi determinada através de uma titulação com HCl 0.1 M, pelo método de adição padrão.

3.1.1.2. Aferição das soluções de HCl e de KOH.

A solução de titulante KOH foi aferida com uma solução padrão de ftalato ácido de potássio, o que permitiu determinar a concentração exacta de base, a partir do ramo ácido da curva.

Uma vez determinada a concentração exacta de titulante (C_b), determinou-se a concentração exacta da solução de HCl, a partir da equação 1, em que V_{eq} é a média dos volumes de equivalência obtidos a partir de três calibrações ácidas consecutivas e V_{HCl} é o volume de ácido adicionado à célula em cada uma dessas calibrações.

$$C_{HCl} = \frac{C_b \times V_{eq}}{V_{HCl}} \quad \text{Equação 1}$$

3.1.1.3. Titulações potenciométricas

Nas titulações potenciométricas foi utilizado um medidor de pH Crison MicropH 2002, um eléctrodo de vidro Metrohm 6.0133.500 e um eléctrodo de referência Orion 90-00-11 Ag/AgCl. A base foi adicionada através de uma bureta Crison microBU 2031. As medições foram realizadas em soluções termostalizadas a (25.0 ± 0.1) °C e exclui-se o CO_2 atmosférico no interior da célula reaccional fazendo borbulhar N_2 no topo da solução antes e durante o ensaio. Todas as titulações foram antecedidas de calibrações ácidas do eléctrodo em meio

iónico KCl 0.1M, de modo a encontrar os valores dos parâmetros da equação de Nernst, Q e E^0 .

Trabalhou-se com uma quantidade de ligando na célula reaccional ($V_t=20$ mL) de 0.02 mmol (14.5 mg), de modo a retardar a precipitação do complexo neutro ML. Inicialmente foi efectuada a titulação do ligando sozinho, com a solução de titulante (KOH 0.1M), de forma a serem determinadas as suas constantes de protonação. Para isso, adicionou-se á célula reaccional 4.5 equivalentes de HCl 0.1M e utilizou-se um meio iónico KCl 0.1M.

No estudo da complexação com gálio, fez-se a titulação do ligando na presença de ião metálico na proporção molar 1:1 (ião metálico/ligando).

3.1.1.4. Titulações espectrofotométricas

Uma vez que não foi possível efectuar por potenciometria a determinação das constantes de estabilidade dos complexos de Ga^{3+} com o ligando NTP(PrHP)₃, recorreu-se á técnica de titulação espectrofotométrica.

Na obtenção dos espectros electrónicos do ligando e respectivos complexos em solução, utilizou-se um espectrofotómetro *Perkin-Elmer Lambda 9 UV/VIS/NIR* com célula termostaticada a (25 ± 0.1) °C, com o auxílio de um termóstato Grant W6 e células de quartzo de 1 cm de percurso óptico. Recorreu-se a uma bureta Crison microBU 2031 para adicionar o titulante (KOH 0.1M) e os valores de pH foram medidos através de um medidor de pH Crison MicropH 2002.

Primeiro, traçou-se a linha de base no espectrofotómetro, recorrendo a duas células contendo apenas o meio iónico KCl 0.1 M. A solução inicial de ligando foi preparada adicionando a uma célula potenciométrica 1 mL de uma solução 1.22×10^{-3} M de NTP(PrHP)₃ (1.22×10^{-3} mmol), 2 mL KCl 1M, 1 mL HCl 0.1M e o restante em água desionizada até perfazer o volume final de 20 mL. A solução de titulante (KOH 0.1M) foi adicionada de modo a ter incrementos de pH de cerca de 0.4 unidades e cada uma destas soluções era imediatamente colocada numa célula do espectrofotómetro e lida. Após cada medição no espectrofotómetro, o conteúdo da célula era novamente adicionado à solução mãe e uma nova adição de base era efectuada.

Os valores de absorvância foram recolhidos através do programa de aquisição L9.

Após a medição da absorvância das soluções de ligando na ausência do metal aos diversos valores de pH ($2 < \text{pH} < 10$), fez-se a medição na presença do Ga^{3+} numa proporção estequiométrica de 1:1 (metal:ligando). Para isso, foi adicionado à célula potenciométrica 250µL de uma solução de Ga^{3+} 4.16×10^{-3} M (1.04×10^{-3} mmol), 1 mL de uma solução 1.22×10^{-3} M de NTP(PrHP)₃, 2 mL KCl 1M, 1 mL HCl 0.1M e o restante em água desionizada até perfazer o volume final de 20 mL.

Todas as medições no espectrofotómetro foram efectuadas na região de comprimento de onda de 250-400 nm (zona do ultravioleta).

Também se efectuaram titulações espectrofotométricas das soluções de ligando na presença e ausência de metal (1:1), para valores de $\text{pH} \leq 2$. Neste caso, como não é possível usar o método potenciométrico para medir o pH, recorreu-se a uma titulação espectrofotométrica por pontos. Cada ponto corresponde a uma solução contida num frasco com um volume de 4 mL de solução. O ajuste de pH destas soluções foi feito por cálculo, adicionando uma quantidade de solução padrão de ácido (0.1 ou 1M de HCl) a cada frasco, para obtenção de valores de pH respectivamente de 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6 e 1.8.

3.1.1.5 Complexos de ^{67}Ga

Estes estudos foram gentilmente cedidos pelo Professor Carlos Geraldês, do Centro de Neurociências e Biologia Celular, da Universidade de Coimbra.

3.1.1.5.1. Reagentes e soluções

O composto comercial [^{67}Ga] – Citrato, foi adquirido através da Mallinckrodt Medical (Petten, the Netherlands). O método de preparação do complexo [^{67}Ga] – NTP(PrHP)₃ consistiu em dissolver 1g de ligando NTP(PrHP)₃ em 200 μL de tampão HEPES 0.1M (pH 5) e adicionar 1 mCi (1 Ci = 3.7×10^{10} Bq) de [^{67}Ga] – Citrato. O rádio-complexo foi obtido com um grau de pureza final, superior a 98%.

3.1.1.5.2. Estudos de Biodistribuição e Cintigrafia gama

Os estudos de biodistribuição foram feitos em grupos de 4 a 6 animais (Ratos Wistar, machos, pesando cerca de 200g cada), que foram anestesiados com Ketamina (50 mg/ml) / Clorpromazina (2.5%), numa proporção 10:3 e injectados na veia caudal (para biodistribuição após 24h), ou na veia femoral (para estudos de biodistribuição e imagem logo após à injeção), na presença de 100 μCi do rádio-complexo e sacrificados 30 minutos, 60 minutos e 24h mais tarde. Os órgãos principais foram removidos, pesados e devidamente tratados.

Nos estudos de imagiologia gama, foi utilizada uma câmara gama (GE 400 GenieAcq, de General Electric, Milwaukee, WI, USA) na aquisição e pré-processamento. Na câmara gama, os animais foram posicionados sobre o detector, na forma *decubitus* dorsal. Deu-se início à aquisição de imagem imediatamente após a injeção do radiodetector e foram captadas sequências de 180 imagens (de 10 segundos cada) em matrizes de 64x64. As imagens foram posteriormente processadas recorrendo a um programa baseado na ferramenta IDL (Interactive Data Language, Research Systems, Boulder, CO, USA). Analisou-se o transporte do radiodetector ao longo do tempo, em três regiões de interesse (ROI), o tórax, o fígado e o rim

esquerdo. A partir destas três regiões obtiveram-se as curvas de tempo/actividade.

3.1.2. Complexação com Lantanídeos

3.1.2.1. Reagentes e Soluções

Nos estudos com os lantanídeos e o ligando NTP(PrHP)₃, as condições de preparação das soluções standard de KOH e HCl foram iguais às efectuadas nos ensaios com Gálio.

O meio iónico utilizado foi igualmente KCl 0.1 M.

Foram preparadas soluções stock para os seguintes elementos: Lantânio, Praseodímio, Gadolínio, Érbio e Lutécio. A preparação foi semelhante para todos os elementos e consistiu em introduzir num copo de 100 mL, 1.2 g do óxido do lantanídeo correspondente (Aldrich, > 99% puro), 7.36 mL de HCl 1 M e 25 mL de água destilada. Agitou-se a solução até dissolver todo o sólido e aqueceu-se. Deixou-se evaporar lentamente uma parte da água de modo a concentrar a solução e filtrou-se. Com as águas de filtração, preparou-se uma solução aferida num balão de 100 mL.

Para determinar a concentração exacta de lantanídeo (Ln^{3+}) em cada solução stock, fez-se a titulação das soluções com EDTA 49,7 mM. Na titulação adicionou-se também um tampão acético aproximadamente 0,5 M e o indicador laranja de xilenol.

3.1.2.2. Aferição das soluções de HCl e de KOH

O procedimento para a determinação exacta das concentrações de HCl e de KOH foi semelhante ao já descrito em 3.1.1.2.

3.1.2.3. Titulações potenciométricas

Nas titulações potenciométricas foi utilizado um medidor de pH AMEL modelo 338 pH meter, um eléctrodo combinado de vidro Metrohm Ref. 6.0259.100, incorporado com um eléctrodo de referência Ag/AgCl. A base foi adicionada através de uma bureta Metrohm 765 Dosimat. As medições foram realizadas em soluções termostatizadas a $(25.0 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$ e excluiu-se o CO_2 atmosférico no interior da célula reaccional fazendo borbulhar Ar no topo da solução antes e durante o ensaio. Todas as titulações foram antecedidas de calibrações ácidas do eléctrodo, de modo a encontrar os valores dos parâmetros Q e E^0 .

Inicialmente foram tituladas as soluções dos vários lantanídeos, com uma solução KOH (51.71 mM) e meio iónico KCl 0,1 M, para determinar a concentração de ácido presente nestas

soluções.

Foi efectuada a titulação do ligando NTP(PrHP)₃ na ausência de metal, com uma solução de KOH (51.37 mM), de forma a serem determinadas as suas constantes de protonação. Trabalhou-se com uma concentração de ligando na célula reaccional ($V_i = 5$ mL) de 1.040 mM (0.0052 mmol), em meio iónico de KCl 0.1 M.

Fizeram-se as titulações de ligando na presença dos vários metais lantanídeos em estudo, na proporção 1:1 ($C_L=1.04 \times 10^{-3}$ M) e posteriormente 1:2 ($C_L=2.08 \times 10^{-3}$ M) (ião metálico/ligando).

3.2. Estudos Biológicos

3.2.1. Reagentes utilizados

Os reagentes brometo de dimetil-tioazolil-difenil-tetrazol (MTT), isopropanol absoluto, etanol absoluto, HCl, Dimetil sulfóxido (DMSO), brometo de etídeo, L- α -DMPC (dimiristoil-fosfatidilcolina), DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) e o tampão TRIS (2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) foram todos adquiridos através *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO).

3.2.2. Cultura Celular

Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, adquiridas através da ECACC (*European Collection of Cell Culture*, Salisbury, UK), foram cultivadas em meio DMEM/F12 (*Gibco*, Carlsbad, CA USA) contendo 15% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO), 100 unidades/mL de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina (*Gibco*, Carlsbad, CA USA), 1% de uma solução de aminoácidos não essenciais (NEAA, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO) e mantidas a 37°C, 5% de CO₂ e 90% humidade. O meio foi repostado de 2 em 2 dias.

3.2.3. Reposição do meio

A cada dois dias, o meio antigo contendo a cultura celular líquida, foi removido e repostado por um novo.

Após a remoção do meio antigo adicionaram-se 5 mL (se frasco de 75 mL), ou 3 mL (se frasco de 25 mL) de tampão fosfato salino (PBS, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO) tendo-se retirado o mesmo passado alguns segundos. O PBS serviu para eliminar os resíduos de meio antigo. Adicionaram-se 6 mL (se frasco de 75 mL), ou 3 mL (se frasco de 25 mL) de tripsina-EDTA 0,25% (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO) e incubou-se o frasco durante 5 minutos a 37°C,

5% CO₂ e 90% humidade. A 37°C a tripsina é activada. Nesta etapa, as células que aderiram à superfície do frasco, por interacções electrostáticas entre a superfície e o vidro, vão libertar-se com o auxílio da tripsina, estabelecendo-se uma matriz polimérica contendo as células de neuroblastoma.

Removeu-se a tripsina e colocou-se o meio num tubo de 15 mL, contendo previamente 2 mL de DMEM (serviu para inactivar a tripsina). Centrifugou-se a solução (3500 rotações/minuto) durante 5 minutos. Removeu-se o líquido sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 1 mL de DMEM. Homogeneizou-se a solução, de modo a todas as células ficarem bem distribuídas no meio.

Num frasco adicionou-se meio de cultura fresco, 14 mL (se frasco de 75 mL), 7 mL (se frasco de 25 mL), ou 19 mL (se frasco de 75 mL e fim-de-semana) e 1 mL da solução homogeneizada contendo as células de neuroblastoma humano. Incubou-se o frasco a 37°C, 5% CO₂ e 90% humidade.

3.2.4. Ensaios de Toxicidade

3.2.4.1. Plantação das células numa placa de “96 Poços”

Numa placa de “96 poços” semearam-se as células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (figura 33). Para isso, foi necessária a contagem do número de células existentes em 1 mL de cultura celular (ver Anexo: Contagem do número de células). Em cada prato foram preenchidos 27 poços (9x3), uma vez que tínhamos nove condições e cada uma delas foi efectuada em triplicado. As condições usadas foram: controlo, controlo do solvente e as concentrações 100, 10, 1, 0.5, 0.1, 0.01 e 0.001 µM de composto.

Sabendo que para um crescimento normal das células não podem ser semeadas mais do que 80.000 por poço e sabendo o número de poços a preencher (27), o número total de células a semear foi 2.160.000 (27 poços x 80.000). Posteriormente, dividiu-se este valor pelo número de células existentes em 1 mL de cultura e determinou-se o volume a retirar da solução de 1 mL, correspondente ao total de células a semear. Por fim, calculou-se o volume total correspondente aos 27 poços da placa e cada um destes locais foi preenchido com células e meio, tendo em conta que por razões de homogeneidade, o volume em cada poço não pode ultrapassar os 120 µL.

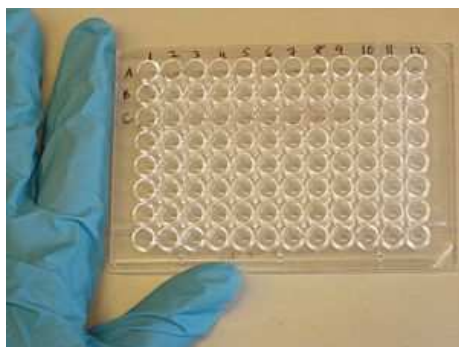


Figura 33: Placa de 96 poços onde se cultivam as células para os ensaios de toxicidade.

3.2.4.2 Mudança de meio na placa e tratamento com os compostos em estudo

Um dia após a plantação das células na matriz, mudou-se o meio existente em cada poço da placa e adicionou-se um dos compostos em estudo (esquema 1) às várias concentrações desejadas. Para isso removeu-se o meio antigo e adicionaram-se 120 μL de um novo meio contendo apenas 2% FBS e 5 μL da solução de composto, às várias concentrações, referidas no ponto anterior. Cada poço na placa, não deve conter uma % de composto superior a 4%. Incubaram-se as placas durante 24h, a uma temperatura de 37°C, a 5% de CO_2 e 90% humidade.

No caso dos compostos solúveis em ETOH ou DMSO, foi adicionada somente uma percentagem de 2% de solvente ao meio, o que correspondeu a adicionar 2,5 μL de cada uma das soluções contendo o composto.

Os solventes utilizados na preparação das várias soluções de cada um dos compostos em estudado, encontram-se resumidos na tabela 7.

Tabela 7: Solventes utilizados na preparação das diferentes soluções dos vários compostos em estudo.

Composto	Solvente
(1)	H_2O
(2)	H_2O
(3)	ETOH
(4)	H_2O
(5)	ETOH
(6)	H_2O
(7)	ETOH
(8)	DMSO
(9)	H_2O

3.2.4.3 Dieta MTT

Decorridas 24h após a mudança de meio na placa, introduziram-se 12 μL de uma solução stock de MTT de concentração 5 mg/mL em meio DMEM, a cada poço da placa. Incubou-se o prato a 37°C durante 3h, de modo a activar a enzima mitocondrial das células. Após este tempo, a solução de MTT foi cuidadosamente decantada e o formazan (ver métodos e programas – secção 4.4.1) extraído das células com 110 μL de uma solução stock de isopropanol ácido, que se adicionou a cada poço⁸⁸. Para isso foi preparada uma solução stock de 40 mL e concentração 0,04 M HCl em isopropanol absoluto, o que correspondeu a adicionar 1,6 mL HCl 1M a 38,4 mL de isopropanol.

Transferiram-se as soluções existentes em cada local da matriz para um novo prato de 96 poços e levou-se o mesmo a um espectrofotómetro Microplate SPECTRAMax[®], a um comprimento de onda de 550 nm, onde se mediu a absorvância de cada solução.

Calculou-se a % de vitalidade celular e fizeram-se os gráficos de dosagem vs citotoxicidade, em relação ao controlo.

3.2.5. Estudos Morfológicos

Células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y foram semeadas em placas de vidro de 6 poços (figura 34) e tratadas com os compostos em estudo (Esquema 1) á concentração de 100 μM , após 24h de incubação. Os locais na placa onde as células foram semeadas continham duas lamelas, que serviram posteriormente como suporte para desidratar e visualizar as células no aparelho de SEM. Para cada composto foi feito um duplicado, tal como para o controlo e para o controlo dos solventes H₂O, DMSO e ETOH.

Neste ensaio, para um crescimento normal das células, não se devem semear mais do que 400.000 células por poço. A contagem celular e a plantação das células em cada local da placa foram efectuadas de forma semelhante ao já descrito para os ensaios de toxicidade, no entanto, neste caso, o volume máximo a adicionar em cada poço são 2 mL.

No dia seguinte á plantação das células, o meio foi repostado por um meio contendo apenas 2% de FBS e adicionaram-se os compostos em estudo, de modo a que a concentração final em cada poço fosse 100 μM . Por outro lado, consoante o solvente foi H₂O, ETOH ou DMSO, a percentagem de composto em cada poço foi de 4%, 2% e 0,2%, respectivamente. Sendo assim, foram preparadas soluções stock de 2.5 mM para todos os compostos, nos respectivos solventes, e feitos cálculos para o volume a adicionar consoante a % permitida de composto em cada poço da placa.

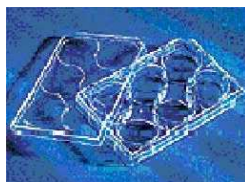


Figura 34: Placa de 6 poços, onde se plantam as células para os ensaios de S.E.M.

Um dia após a incubação com os compostos em estudo, as células foram fixadas às lamelas com formaldeído a pH 7,4 e desidratadas. A desidratação foi feita através da lavagem com diversas soluções de ETOH a percentagens crescentes, de modo a não ser uma desidratação demasiado violenta para o tecido celular. Sendo assim, começou por se remover o meio existente nas placas, lavando-se posteriormente com 2 mL de PBS de modo a remover os vestígios de meio em cada poço. Adicionaram-se 2 mL de formaldeído a pH 7,4 e guardaram-se as placas até ao dia anterior a efectuar SEM, que não deverá ultrapassar 2 dias após o tratamento com formaldeído.

Um dia antes de efectuar SEM lavaram-se as placas três vezes com PBS e efectuou-se o seguinte procedimento:

1. Duas lavagens de 5 minutos, com ETOH a 20%
2. Duas lavagens de 5 minutos, com ETOH a 35%
3. Duas lavagens de 5 minutos, com ETOH a 50%
4. Duas lavagens de 5 minutos, com ETOH a 70%
5. Duas lavagens de 5 minutos, com ETOH a 90%
6. Duas lavagens de 5 minutos, com ETOH a 100% (ETOH Abs.)

Mantiveram-se as células em ETOH absoluto e no dia de SEM escolheu-se ao microscópio a lamela que se encontrava mais uniformemente povoada de células. Já no laboratório de SEM, o etanol foi removido das células e substituído por CO₂ líquido a alta pressão até ao ponto crítico, num aparelho HCP-2 Hitachi 2 Critical Point Dryer. Posteriormente foi-lhes aplicada uma cobertura de ouro, de forma a obter a condutividade necessária para serem examinadas sob o aparelho JEDL JSM-6490 Scanning Electron Microscope, às resoluções de 10, 20 e 50 μm , pressão de 10^{-4} Torr e temperatura de 5 °C.

3.2.6. Testes de fragmentação de ADN

Células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y foram semeadas em 12 frascos de 25 mL, que foram repartidos pelos 9 compostos em estudo (Esquema 1) e respectivos controlos, ou seja, água, ETOH e DMSO.

Neste ensaio, para um bom crescimento celular, não se podem semear mais do que

1.800.000 células por frasco. A contagem celular e a plantação das células foi feita de forma semelhante ao já descrito nos ensaios de toxicidade e morfológicos, com a diferença de que neste caso, o volume final em cada frasco não deve ultrapassar os 6 mL.

No dia seguinte à plantação das células houve reposição do meio, por um meio contendo apenas 2% de FBS e adicionaram-se os compostos em estudo à concentração de 100 μ M. Em cada frasco existia uma percentagem de 4%, 2% e 0,2% de composto, consoante o solvente utilizado foi H₂O, ETOH ou DMSO, respectivamente. Para isso, tal como nos ensaios morfológicos, foram preparadas soluções stock de 2.5 mM para todos os compostos, nos respectivos solventes, e calculado o volume a adicionar de composto a cada frasco, corresponde à percentagem admitida do mesmo no meio.

Um dia após a incubação com os compostos em estudo, os frascos foram lavados com 3 mL de PBS, 5 mL de tripsina e as células centrifugadas em 2 mL de meio DMEM. Após centrifugação e remoção do líquido sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio normal e transferidas para um ependorf de 1.5 mL. Congelaram-se os ependorf's contendo as células tratadas com os diferentes compostos orgânicos, até ao dia dos testes de fragmentação de ADN.

Já no laboratório de análises, após o descongelamento dos ependorf's, centrifugaram-se as amostras durante 3 minutos (13.000 rpm). Removeu-se o líquido sobrenadante e adicionou-se 180 μ L de uma solução de surfactante a cada ependorf, de modo a destruir a membrana celular, por destruição das forças de atracção entre os fosfolípidos da estrutura celular. Deixaram-se as amostras durante 1h30 num agitador Vortex e à temperatura de 50°C. Após este tempo foram adicionados 200 μ L de surfactante a cada uma das amostras e estas incubadas durante 10 minutos a uma temperatura de 70°C. De seguida juntou-se 210 μ L de etanol a cada ependorf e transferiu-se o conteúdo dos mesmos para novos ependorf's incorporados com um filtro de poros de pequenas dimensões. Centrifugaram-se as amostras durante 10 minutos e no final removeu-se o sobrenadante. Efectuaram-se várias lavagens, ao fim das quais e devido ao filtro incorporado no ependorf, obteve-se somente a molécula de ADN e eliminaram-se todos os produtos da lise celular (tecidos, proteínas, organelos, etc).

Efectuou-se a reacção de PCR (Polymerase Chain Reaction) ao ADN tratado com os diferentes compostos orgânicos em estudo, de modo a replicar um gene específico, o gene da β -Globina, que vai servir para confirmar os resultados de interacção dos compostos com o ADN. Se ocorrer fragmentação do ADN e o gene da β -Globina vier também ele fragmentado então o composto interage negativamente com o ADN. Por outro lado, se o gene da β -Globina for mal replicado, significa que a reacção de PCR não correu bem pois o ADN foi alterado na presença dos compostos em estudo. Os reagentes necessários a esta reacção foram: amostra de ADN, iniciadores ("primers") do gene da β -Globina, dNTP's, solução tampão e a enzima Taq polimerase.

A programação do aparelho (*Thermal Cycler model PTC-100 MJ Research*) foi: um minuto à temperatura de 95°C, seguido de três ciclos de um minuto cada, a 95, 55 e 72°C respectivamente e por final cinco minutos à temperatura de 72°C.

Após a reacção de amplificação do gene da β -Globina, deu-se início à electroforese em gel de agarose, a 90 volts de corrente eléctrica. O gel foi previamente preparado a partir de 3 g de agarose, 100 mL de tampão acetato e 20 μ L de Brometo de Etídio.

3.2.7. Estudos de alteração das propriedades físicas da membrana plasmática

Como modelo de membrana plasmática utilizaram-se lipossomas produzidos em laboratório, compostos por fosfolípidos L- α -DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), nos quais se introduziu um fluórofo, DPH (1,6-diphenil-1,3,5-hexatrieno), em meio tampão TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol). Para isso foram preparadas três soluções stock de DMPC 21.1 mM, TRIS 0.1 M (pH 7,4) e DPH 2 mM. As duas primeiras foram preparadas em meio aquoso e a solução de DPH em meio de etanol absoluto.

A preparação dos lipossomas consistiu em, numa seringa de 1 mL introduzir 375 μ L DMPC e 2.5 μ L DPH e depois foram lentamente injectados à temperatura de 35°C, em 5 mL de tampão TRIS. A temperatura de CMC, ou seja, a temperatura á qual o DMPC forma estruturas micelares é 21°C. Após a injeccção, deixou-se arrefecer a solução lipossómica até á temperatura ambiente.

Para se efectuarem as leituras de anisotropia de fluorescência, foi utilizado um espectrofotómetro Perkin-Elmer LS 50, munido de um termóstato HAAKE DC3, de um polarizador incorporado (Perkin-Elmer, Monza, Italy) e ligado a um computador que seguiu automaticamente o espectro, calculou os vários parâmetros de anisotropia e devolveu um valor já calculado. Os parâmetros usados no aparelho foram:

$$\lambda_{\text{EXCITAÇÃO}} = 360 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{EMIÇÃO}} = 540 \text{ nm}$$

Slit: 7/8

Stirrer: High

Foram feitas leituras a vários valores crescentes de temperatura, nomeadamente 5, 10, 15, 18.5, 19, 21, 23, 27, 30 e 35°C.

Numa cuvete especial para U.V., de quatro faces transparentes e 2.5 mL de volume (semi-micro), introduziram-se 285 μ L de lipossomas DMPC/DPH e 15 μ L de H₂O, para traçar a linha de base. Foi também introduzido um pequeno agitador magnético na cuvete. É importante referir que foi usada água para obter a linha de base e não os solventes etanol ou DMSO, porque os compostos testados nesta fase do trabalho (compostos **(2)**, **(4)** e **(6)**) eram todos solúveis em água.

Após o traçado da linha de base, deu-se início á medição da anisotropia dos lipossomas na presença dos compostos **(2)**, **(4)** e **(6)**, á concentração de 100 μ M.

4. Métodos e programas

4.1. Potenciometria

A determinação das constantes de protonação de $\text{NTP}(\text{PrHP})_3$ e das constantes de formação dos seus complexos com lantanídeos foi efectuada a partir do tratamento de titulações potenciométricas ácido-base. Em solução, está presente o ligando (na sua forma totalmente protonada) ou o ligando na presença do ião metálico e a titulação ocorre com uma base como titulante. As constantes de protonação e de estabilidade são determinadas através do programa HYPERQUAD⁶⁶, de tratamento dos resultados experimentais.

No presente trabalho, mediu-se a diferença de potencial entre um eléctrodo de vidro e um eléctrodo de referência (Ag/AgCl). O eléctrodo indicador, ou de trabalho, deve responder especificamente à concentração de uma espécie química, que neste caso, sendo o eléctrodo de vidro, corresponde à concentração dos iões H^+ em solução. O eléctrodo de referência deve possuir um potencial pelo menos aproximadamente constante ao longo do tempo, reversível e obedecer à equação de Nernst.

O potencial de uma célula electroquímica é dado pela diferença de potencial entre estes dois eléctrodos (Equação 2).

$$E_{\text{cel}} = E_{\text{Ind}} - E_{\text{Ref}} \quad \text{Equação 2}$$

Em que E_{cel} é o potencial da célula electroquímica, E_{Ind} é o potencial do eléctrodo de vidro e E_{Ref} é o potencial do eléctrodo de referência.

Por outro lado, a lei de Nernst dá-nos uma relação entre o potencial da célula electroquímica e as actividades das espécies oxidada (Ox) e reduzidas (Red) intervenientes no processo (Equação 3).

$$E_{\text{Electrodo}} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(\text{Ox})}{(\text{Red})} \quad \text{Equação 3}$$

No caso do eléctrodo de trabalho ser um eléctrodo de vidro, a expressão de Nernst correspondente é dada pela equação 4, que inclui o potencial de assimetria do eléctrodo (E_a):

$$E_{\text{Ind}} = E^0 + \frac{RT}{F} \ln(\text{H}^+) + E_a \quad \text{Equação 4}$$

No potencial da célula electroquímica ainda tem de se ter em conta a parcela correspondente ao potencial de junção líquida (E_J) (Equação 5):

$$E_{\text{cel}} = E^0 + \frac{RT}{F} \ln(\text{H}^+) - E_{\text{Ref}} + E_J + E_a \quad \text{Equação 5}$$

O potencial de junção líquida resulta de uma distribuição desigual dos cátions e aniões, devido a diferentes velocidades de difusão das espécies, na interface entre duas soluções de constituição e concentração diferentes, mais concretamente, na superfície de contacto entre a solução a medir e a solução de enchimento do eléctrodo de referência. O seu efeito pode ser minimizado introduzindo um electrólito de suporte com concentração constante e elevada ao longo da experiência, constituído por iões de mobilidades idênticas, como é o caso do KCl.

O potencial de assimetria do eléctrodo de vidro depende da composição e possíveis irregularidades do vidro adquiridas durante o seu fabrico e de outras condições que podem provocar desvios significativos com o tempo. Tendo isto em conta, têm de se considerar as desidratações do vidro devido à imersão prolongada em solventes orgânicos, a ter sido guardado seco, a possíveis ataques mecânicos e químicos (ex.: ataque por soluções muito alcalinas no fim de uma titulação) e modificação da capacidade de troca iónica dos hidrogeniões, devido á adsorção de iões estranhos pelo vidro, de películas de gordura, de proteínas, ou de agentes tensoactivos.

Uma vez que E^0 e E_{Ref} são constantes e assumindo que E_j e E_a variam lentamente, tendo alterações desprezáveis num intervalo de tempo razoável (superior ao tempo de um ensaio), desde que as condições experimentais se mantenham, pode simplificar-se a Equação 5, sob a forma da Equação 6:

$$E_{cel} = E^{0'} + Q \log(H^+) \quad \text{Equação 6}$$

$$\text{Em que } E^{0'} = E^0 + E_a - E_{Ref} + E_j \text{ e } Q = \frac{RT \ln 10}{F}.$$

A actividade de H^+ pode exprimir-se através da sua concentração e do seu coeficiente de actividade f_i através de:

$$(H^+) = f_i[H^+] \quad \text{Equação 7}$$

Para um meio de força iónica constante e concentração elevada do electrólito de suporte, f_i também se mantém constante, pelo que pode escrever-se:

$$E_{cel} = E^{0''} + Q \log[H^+] \quad \text{Equação 8}$$

Esta equação demonstra um comportamento linear entre E_{cel} e $\log[H^+]$, podendo ser utilizada para calcular $[H^+]$, desde que se tenham determinado os parâmetros $E^{0''}$ e Q através de uma calibração ácida do sistema.

É importante referir que, regra geral, o método potenciométrico só deve ser utilizado para efectuar medições na zona de pH entre 2 e 12, uma vez que fora deste domínio o eléctrodo de vidro apresenta uma resposta não linear. Com efeito, em soluções que contenham concentrações hidrogeniónicas muito baixas ($\text{pH} > 9$), normalmente os eléctrodos de vidro

respondem não só a variações na concentração hidrogeniónica, como também á concentração dos iões alcalinos que possam existir em solução (o vidro é ligeiramente solúvel em água, originando soluções alcalinas devido á libertação de Na⁺). Por outro lado, para soluções a pH<2 o eléctrodo de vidro exhibe também erros e as leituras de pH tendem a ser demasiado elevadas. Ainda hoje estas causas não são bem compreendidas, mas pensa-se que são devidas à penetração de ácidos na camada de gel hidratado do vidro⁸⁹.

4.2. Espectrofotometria de UV/Vis

A espectrofotometria de Ultravioleta/Visível (UV 200-400 nm: Vis 400-800 nm) resulta das transições electrónicas que ocorrem devido à absorção de radiação por ligações ou grupos funcionais específicos na molécula. O comprimento de onda de absorção é uma medida da energia necessária para a referida transição, enquanto que a intensidade é função da probabilidade da ocorrência da transição. Ou seja, obtêm-se bandas de absorção correspondentes às transições electrónicas do estado fundamental a um estado excitado.

No presente trabalho, a espectrofotometria foi utilizada por dois motivos diferentes: a determinação das constantes de estabilidade de complexos por titulação espectrofotométrica na zona do UV e a determinação da absorvância de diversas soluções, na gama do visível, para quantificação da vitalidade celular na presença de uma série de compostos (Esquema 1).

A espectrofotometria UV/VIS é uma técnica quantitativa, uma vez que a radiação absorvida por uma espécie (absorvância) depende directamente da sua concentração na amostra, relação descrita pela *lei de Beer* (Equação 9), onde A é a absorvância, a é a absortividade molar da espécie ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b é o percurso óptico (cm) e C é a concentração (mol L^{-1}).

$$A = a.b.C \qquad \text{Equação 9}$$

No caso das titulações espectrofotométricas, estas foram realizadas com o objectivo de determinar as constantes de estabilidade dos complexos de gálio(III) com o ligando NTP(PrHP)₃ (Figura 8). Foi utilizada esta técnica e não a titulação potenciométrica, uma vez que se verificou que a pH menor que 2 os complexos de gálio nas suas formas protonadas estavam formados, tornando-se impossível a sua determinação pelo método potenciométrico. Sendo assim, foi feita uma titulação espectrofotométrica 1:1 Ga(III)/L ($250 \leq \lambda \leq 340$) para pH \leq 2 e para pH>2. O método consiste em fazer uma aquisição, ponto por ponto, de vários espectros na zona de comprimento de onda previamente seleccionada, e numa dada zona de pH, em que se tem a formação das espécies em estudo. O programa de aquisição dos espectros de absorção é o programa L9.

No caso das soluções a pH \leq 2, recorreu-se a uma titulação espectrofotométrica por pontos. Nesta, cada ponto corresponde a uma solução contida num frasco com um volume de solução conhecido e a um pH específico.

O tratamento posterior destes espectros de absorção é feito através do programa PSEQUAD⁷², que permite determinar os valores das constantes de estabilidade dos vários complexos em solução.

No caso dos ligandos, as bandas correspondem a transições de electrões em orbitais não ligantes n , ou ligantes π , para as orbitais anti-ligantes ($n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$). No que diz respeito aos complexos, a absorção de radiação Ultravioleta ou visível pode ser resultante de uma ou mais das seguintes transições: transição nas orbitais $d-d$ do ião metálico, transição entre orbitais do ligando (referida anteriormente) ou transição de transferência de carga ligando-ião metálico. Estas transições dependem do ião metálico, do ligando, dos átomos envolvidos na coordenação e da geometria do complexo.

No caso do presente estudo, a absorção dos complexos Ga(III)/NTP(PrHP)₃ resulta de transições entre orbitais do ligando, uma vez que este absorve na zona do ultravioleta. Por esse motivo, houve também necessidade de efectuar uma titulação espectrofotométrica do ligando, na ausência do metal, para $\text{pH} \leq 2$ e para $\text{pH} > 2$ ($250 \leq \lambda \leq 340$).

Nos estudos biológicos realizados no presente trabalho, nomeadamente, nos ensaios de toxicidade em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y na presença de uma série de compostos derivados de hidroxipiridinonas (Esquema 1), a medição da absorvância permitiu identificar a presença de uma molécula orgânica em solução, o formazan. Neste caso, a absorvância da solução, determinada pela lei de Beer (Equação 8), será tanto maior quanto mais elevada a concentração desta molécula em solução, dando a indicação acerca da toxicidade do composto hidroxipiridinona em causa.

4.3. Cálculo das constantes de equilíbrio

As constantes de protonação do ligando NTP(PrHP)₃ (K_i), definidas pela equação 10, foram determinadas por ajuste das curvas de titulação potenciométrica ou por ajuste dos espectros de absorção obtidos por titulação espectrofotométrica, utilizando os programas HYPERQUAD⁶⁶ ou PSEQUAD⁷², respectivamente.

$$K_i = \frac{[H_i L]}{[H_{i-1} L][H]} \quad \text{Equação 10}$$

As constantes de formação globais, β_i , definidas pela equação 11, foram calculadas por ajuste das curvas de titulação na presença do respectivo ião metálico na estequiometria 1:1. Para este cálculo foi utilizado um dos programas de aquisição de dados HYPERQUAD ou PSEQUAD, consoante o tipo de titulação efectuada e introduzindo as espécies protonadas e as respectivas constantes de protonação determinadas anteriormente.

$$\beta_{M_m H_h L_l} = \frac{[M_m H_h L_l]}{[M]^m [H]^h [L]^l}$$

Equação 11

Na determinação das constantes de estabilidade dos complexos 1:2, para o caso dos lantanídeos, mantiveram-se constantes os valores de β_{MHL} para os complexos 1:1. No último passo, quando estavam reunidos todos os valores para ambos os complexos 1:1 e 1:2, as constantes foram refinadas todas em conjunto.

As espécies hidrolíticas dos iões metálicos foram consideradas no cálculo das constantes de estabilidade^{73,90,91} e as curvas de distribuição de espécies foram adquiridas através do programa HYSS⁷¹.

Os erros explicitados correspondem aos desvios standard associados às constantes determinadas pelos programas de aquisição de dados experimentais.

4.4. Estudos Biológicos

4.4.1. Ensaio de Toxicidade (Ensaio MTT)

O ensaio MTT é um teste quantitativo e do tipo colorimétrico, muito utilizado *in vitro* como revelador da proliferação celular^{92,93,94} e no presente trabalho foi usado para avaliar a citotoxicidade dos compostos analisados (Esquema 1). O MTT (brometo de dimetil-tioazolil-difenil-tetrazol) é um sal de tetrazol, capaz de atravessar a membrana plasmática. A célula metabolicamente activa tem a capacidade de converter este sal de cor amarelo pálido, num composto violeta, graças à acção da succinato-desidrogenase mitocondrial, que catalisa a abertura do anel de tetrazol da molécula de MTT, formando uma molécula de formazan (Figura 35).

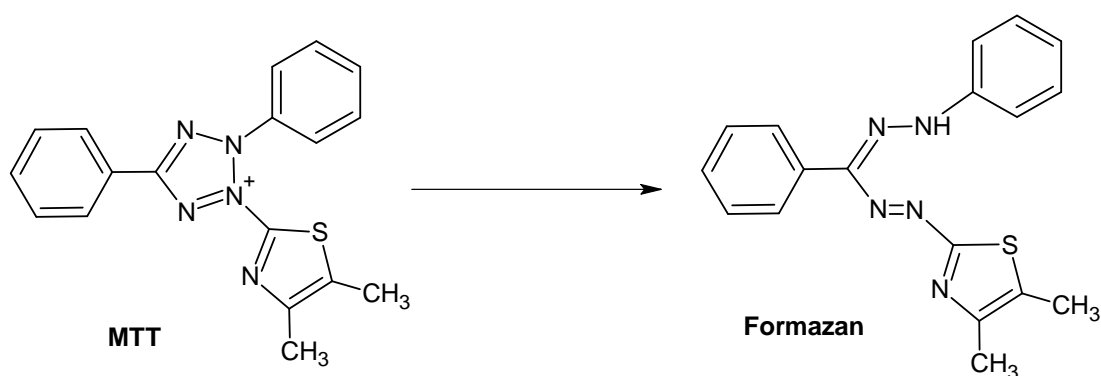


Figura 35: Abertura do anel de tetrazol da molécula de MTT, devido à acção da succinato-desidrogenase mitocondrial.

O formazan é um composto insolúvel, incapaz de atravessar a membrana plasmática, pelo que se acumula no interior do citoplasma das células activas presentes na cultura.

Posteriormente, ao tratarem-se as células com uma solução de isopropanol ácido, vai

ocorrer lise da membrana celular, com libertação e solubilização do formazan na solução alcoólica ácida. O lisado celular terá uma cor violeta, cuja intensidade será tanto maior, quanto mais activa tenha sido a metabolização do sal de MTT. A leitura da absorvância desta solução é proporcional á quantidade de células viáveis que existiam em solução e a percentagem de vitalidade celular é dada pela Equação 12, determinada a um comprimento de onda de 550 nm.

$$\% \text{ Vitalidade Celular} = \frac{\text{Abs. da Solução, a Concentração X}}{\text{Abs. do Controlo}} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

4.4.2. Estudos Morfológicos

Células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y foram tratadas com os vários compostos em estudo a uma concentração elevada, 100 μM , de forma a verificar as alterações morfológicas induzidas nas células, como consequência da sua interacção com os químicos injectados. Para analisar esta alteração recorreu-se ao microscópio electrónico de varrimento (SEM).

O SEM é um tipo de microscópio electrónico que emite a imagem da superfície da amostra por varrimento (scan) desta com um feixe de electrões de alta energia. Os electrões interagem com os átomos constituintes da amostra, produzindo sinais que contêm informação acerca da topografia da sua superfície, da sua composição e de outras propriedades como a condutividade eléctrica⁹⁵.

A observação de uma espécie biológica por SEM requer uma fixação química da amostra antes de efectuar o scan de forma a preservar a sua estrutura original. Isso é realizado por incubação da amostra numa solução de formalina tamponizada (solução saturada de formaldeído⁹⁶ (37%), metanol (6-13%) e H_2O). O tecido fixado é depois desidratado, por substituição da água dentro da célula por um solvente orgânico como por exemplo o etanol ou a acetona. Este solvente orgânico é novamente removido e substituído por um fluido de transição, o dióxido de carbono líquido de alta pressão. Este é então aquecido até ao ponto em que a sua pressão ultrapassa o ponto crítico, a tensão superficial na interface líquido/gás da amostra é reduzida a zero e esta é seca sem qualquer dano a nível de estrutura celular. A espécie é depois revestida por uma capa de ouro, de modo a ficar condutora e termicamente protegida. Após o processo de metalização, estão reunidas as condições para iniciar a observação num microscópio electrónico de varrimento.

No microscópio electrónico, a amostra biológica é submetida a uma pressão de 10^{-4} Torr. O feixe de radiação incidente é originado a partir de um filamento de tungsténio e possui um diâmetro de 3-4 nm. Os electrões do feixe de radiação são direccionados para um ponto da amostra pelas lentes electromagnéticas do microscópio. A interacção electrões/amostra, neste caso, é uma interacção fraca envolvendo apenas electrões superficiais (electrões secundários), que irão gerarem um conjunto de sinais. São estes electrões que contêm a informação morfológica que queremos avaliar e podem ser detectados por aparelhos adequados a este

tipo de electrões de baixa energia. Os sinais obtidos são convertidos em correntes eléctricas de maior ou menor intensidade, que vão modular a intensidade do feixe de electrões e que formam a imagem no tubo de raios catódicos. A imagem é obtida em 2D e *on live*, na escala do cinzento (do preto ao branco).

4.4.3. Estudo da Interação com moléculas de ADN

As células de neuroblastoma humano SH-SY5Y são tratadas com os vários compostos em estudo (Esquema 1) com o objectivo de analisar a sua interacção com o ADN, resultante da fragmentação deste.

Para este efeito, usa-se o método de electroforese em gel de agarose, em que a molécula de ADN migra ao longo de um gel, devido a uma diferença de potencial criada em cada um dos extremos da placa de gel. Quanto maior o peso molecular do ácido nucléico, menor a distância que ele percorre. Se a molécula de ADN sofrer fragmentação devido á acção de algum dos compostos em estudo, verificar-se-á no gel um padrão de fragmentação, onde os vários pedaços de ácido nucléico se encontrarão separados por ordem decrescente de pesos moleculares, ao longo do gel.

4.4.4. Estudos de alteração das propriedades físicas da membrana plasmática

A técnica de polarização por fluorescência (ou de anisotropia de fluorescência) pode dar indicações muito úteis acerca da estrutura e dinâmica das proteínas e da membrana lipídica, através do estudo do seu movimento rotacional e, em particular, do estudo do movimento rotacional da molécula. Mesmo sendo um método indirecto, este apresenta diversas vantagens em relação a outras técnicas espectroscópicas, como a elevada sensibilidade e imediata interpretação dos resultados. A principal desvantagem deste método, factor comum também aos outros métodos biofísicos, reside no facto de o meio da membrana lipídica ser muito heterogéneo, pelo que a informação obtida deve considerar-se como uma média das diferentes situações estruturais. De facto, na maior parte dos sistemas biológicos, á temperatura fisiológica, os lipídios encontram-se no seu estado fluído definido como “liquido cristalino”, mas também podem existir alguns aglomerados de lipídios (clusters), de estrutura rígida, formando uma espécie de “gel sólido”. O meio lipídico heterogéneo observa-se também na membrana modelo usada, que neste caso é a membrana de lipossomas, formada por fosfolípidos L- α -DMPC (1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina) (Figura 36).

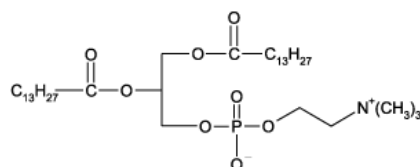


Figura 36: Estrutura dos fosfolípidos constituintes da membrana dos lipossomas usados como modelo da membrana plasmática.

A interpretação dos resultados pode ser facilitada incorporando sondas fluorescentes na membrana modelo, cuja característica base é a sua lipofilicidade, que faz com que se consigam distribuir por todo o domínio específico da membrana.

A sonda fluorescente utilizada neste trabalho é o DPH (Difenil-hexa-trieno)^{97,98}, que se distribui essencialmente entre os carbonos C10 e C12 da cadeia fosfolipídica, na membrana celular (Figura 37).

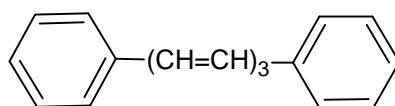


Figura 37: Estrutura da sonda fluorescente DPH.

A teoria na qual se baseia a anisotropia de fluorescência é simples. Em solução, a molécula de fluoróforo encontra-se posicionada aleatoriamente, pelo que as possíveis direcções de rotação da molécula são igualmente prováveis (distribuição isotrópica do fluoróforo). Na presença de luz polarizada assiste-se a uma foto-selecção, em que apenas são excitadas aquelas moléculas de fluoróforo que se encontram em posição paralela em relação ao plano de polarização da luz (distribuição anisotrópica do fluoróforo). Do mesmo modo, toda a molécula foto-seleccionada vai re-emitir uma radiação polarizada, num plano paralelo ou perpendicular aquele em que ocorreu a absorção. Se no período de tempo que decorre entre a absorção e a emissão, a molécula sofrer uma reorientação espacial aleatória, a foto-selecção é perdida e não se observará anisotropia de fluorescência. Se este intervalo de tempo for muito breve, a molécula foto-seleccionada pode adquirir uma disposição não completamente aleatória, pelo que neste caso ainda pode existir alguma orientação paralela ao plano da luz e pode observar-se um certo grau de anisotropia.

Em solução aquosa e à temperatura ambiente não se observa geralmente polarização por fluorescência. No entanto, ao se incorporar um fluoróforo numa proteína ou num extracto lipídico, devido a interacções que se estabelecem ao longo da membrana, este vai encontrar-se limitado rotacionalmente pelo que vai existir emissão de fluorescência. Esta será tanto mais evidente, quanto mais forte for a estrutura incorporante.

Sendo assim, a polarização aumenta com o aumento da viscosidade do sistema, logo, com o abaixamento da temperatura, ocorrendo um abrandamento do movimento browniano das moléculas de fluoróforo, ou seja, a sua possibilidade de rotação fica limitada.

O valor de anisotropia é definido pela equação de Van der Merr (1988)⁹⁹:

$$A = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad \text{Equação 13}$$

Em que A é a anisotropia do sistema; I_{VV} é a intensidade de fluorescência emitida, que é paralela à direcção de polarização de luz excitante; I_{VH} é a intensidade de fluorescência emitida, que é perpendicular à direcção de polarização de luz excitante e G é o factor de correcção instrumental, dado que os instrumentos não reflectem uma medida exacta dos componentes perpendiculares e paralelos da luz de emissão.

Neste trabalho foi medida a anisotropia de fluorescência de lipossomas, na presença de três compostos em estudo, derivados de 3-hidroxi-4-piridinonas: **(2)**, **(4)** e **(6)**.

A propriedade que nos permite concluir acerca das possíveis alterações na membrana é a temperatura de transição de fase lipídica (T_m), desde o estado gel (sólido) até ao estado liquido-cristalino (fluido). Esta temperatura corresponde ao ponto de inflexão da curva de anisotropia em função de T e é um valor característico dos lipídios utilizados na constituição da membrana. Se este valor variar de um ensaio para outro, significa que a constituição da membrana foi alterada. Se, por outro lado, um dos ensaios tiver sido feito na presença de composto, então significa que o composto está de alguma forma envolvido na alteração destas propriedades.

4.5. Programas de aquisição e tratamento de dados experimentais

4.5.1. Método de Gran e Programa RESULT

No método potenciométrico começa-se por efectuar uma calibração do eléctrodo. Normalmente, a calibração é feita na zona de pH ácido (antes do ponto de equivalência), que é onde o eléctrodo dá uma resposta mais exacta. A calibração ácida tem como objectivo a determinação rigorosa dos parâmetros $E^{0'}$ e Q da equação de Nernst (equação 8) e os seus erros associados, verificando se o eléctrodo se encontra em bom funcionamento. Uma calibração só é aceite se o erro associado ao valor de $E^{0'}$ não for superior a 0.5 mV e se o valor de Q estiver próximo do valor teórico (a 25°C, 59.15 mV). Os parâmetros determinados podem posteriormente ser usados na titulação em estudo que decorrer de seguida.

O método que permite calcular estes parâmetros é o método de Gran¹⁰⁰, através de uma titulação do tipo ácido forte/base forte, onde as concentrações C_a e C_b são ambas conhecidas e por linearização da curva de titulação.

O método de Gran permite a determinação do volume no ponto de equivalência (V_{eq}), de $E^{0'}$ e Q, a partir do ramo ácido da curva de titulação.

Para calcular a % de carbonatação da base e o produto iónico da água (K_w), é

necessário efectuar uma calibração total, ou seja, que envolve ambos os ramos ácido e básico de uma curva de titulação ácido forte/base forte.

Obtém-se a partir da zona básica o volume equivalente (V_{eq}'), Q e $E^{0''}$, bem como K_w . A partir da Equação 14 pode-se determinar o grau de carbonatação da base.

$$\% \text{ Carbonatação} = \frac{V_{eq}' - V_{eq}}{2 \times V_{eq}} \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

No caso de existir carbonatação da base, esta não deverá ser superior a 0.5%.

O programa utilizado no tratamento dos resultados da curva de calibração ácido forte/base forte é o programa RESULT, que utilizando o método de Gran, permite retirar os valores de $E^{0''}$, Q , K_w , V_{eq} e V_{eq}' é o programa RESULT.

4.5.2. Programas PASAT e HYPERQUAD

O programa de aquisição de dados usado nas titulações potenciométricas automáticas é o programa PASAT. Neste programa define-se: o incremento de volume de titulante, o volume final de titulante adicionado, a concentração da base, o intervalo de tempo entre leituras, o valor do desvio padrão entre dois valores médios de leitura consecutivos, o desvio de leitura permitido para o eléctrodo e o número máximo de médias que o programa efectua antes de uma nova adição de titulante. A primeira média é feita ao fim de dez leituras e cada média seguinte é feita por inclusão da última leitura. Quando o desvio padrão entre dois valores médios consecutivos e o desvio de leitura do eléctrodo estão dentro dos parâmetros estabelecidos, o programa regista o valor obtido de potencial e efectua nova adição de titulante. Quando atinge o número máximo de médias de leituras a efectuar, mas o desvio padrão e/ou o desvio de leitura do eléctrodo não se encontram dentro do estabelecido, o programa efectua nova adição de titulante e regista a última média determinada com a indicação de que não convergiu.

Os dados experimentais obtidos através do programa PASAT são depois tratados pelo programa HYPERQUAD¹⁰¹.

O programa HYPERQUAD resulta de uma evolução do programa SUPERQUAD¹⁰², que permite a determinação por cálculo iterativo de constantes de equilíbrio partindo de dados experimentais potenciométricos, no sentido em que, a versão mais recente também inclui a possibilidade de correr a partir de dados espectrofotométricos. Bastante versátil e de fácil utilização, o programa HYPERQUAD decorre em ambiente Windows e permite, no limite, tratar sistemas contendo até 4 reagentes independentes e calcular até 18 constantes de equilíbrio, em simultâneo.

O programa faz uso do método de Newton-Raphson para resolver a matriz do balanço de massas e o ajuste é feito entre os valores experimentais e os resultados calculados com

base no modelo de equilíbrio químico proposto. Por outro lado, este ajuste assenta em alguns pressupostos. Designadamente, que a cada espécie química existente em solução corresponde uma constante de formação definida pela equação 15 (em que A, B e C são os reagentes e [A], [B] e [C] são as concentrações dos reagentes livres), que o eléctrodo apresenta um comportamento pseudo-Nernstiano, como definido anteriormente pela equação 8 e que os erros sistemáticos foram minimizados ao longo da titulação, nomeadamente os que envolvem a calibração do eléctrodo, as pesagens e diluições, as variações de temperatura e a qualidade da água.

$$\beta_{abc} = \frac{[A_a B_b C_c]}{[A]^a [B]^b [C]^c} \quad \text{Equação 15}$$

As constantes de equilíbrio são refinadas utilizando o método de Gauss-Newton⁷⁰.

O programa utiliza como variáveis independentes os volumes de titulante adicionado e como variáveis dependentes os potenciais medidos (ou valores de pH), considerando um erro que engloba a correcção da leitura do potencial do eléctrodo, se este for afectado por um pequeno erro no volume de titulante.

A vantagem da utilização destes programas (SUPERQUAD e HYPERQUAD) prende-se essencialmente com o facto de permitir a determinação do grau de pureza do ligando, permitir a rejeição de pontos específicos das curvas experimentais sem necessidade de construção de um novo ficheiro de entrada, permitir ver as curvas de titulação e o respectivo ajuste, para além das curvas de distribuição dos resíduos, e permitir também refinar os parâmetros E^0 , C_b , C_a , mmol de metal, de ligando ou de H^+ , o que só deve ser feito se não existir nenhum método químico exacto para a sua determinação, ou quando se pretende testar a influencia destes parâmetros nos resultados.

O programa necessita da introdução como dados para o cálculo das constantes, das quantidades iniciais dos reagentes em solução (milimoles de ligando, H^+ e metal), dos valores de $E0''$, K_w , C_b , V_0 (volume inicial de solução na célula potenciométrica), da temperatura, dos erros estimados para as leituras de potencial e adições de volume, dos resultados experimentais da titulação e das estimativas iniciais das constantes de formação a calcular.

4.5.3. Programa PSEQUAD

O tratamento dos dados obtidos a partir das titulações espectrofotométricas foi feito através do programa de aquisição PSEQUAD⁷². Tão versátil como o programa HYPERQUAD permite tanto o tratamento de dados potenciométricos como espectrofotométricos, refinando não só as constantes de formação dos complexos bem como as absorvidades molares das espécies responsáveis pela absorção.

O programa funciona em ambiente DOS, partindo de um ficheiro de entrada onde, e de uma forma resumida, se introduzem as concentrações analíticas dos componentes, os valores de pH ou de potencial para cada adição de titulante e/ou as absorvâncias medidas a cada pH

e, por último, a matriz representativa do modelo de especiação a refinar, ou a utilizar no cálculo dos espectros para cada uma das espécies, contendo todas as espécies envolvidas.

É possível seleccionar espécies que se pretende ignorar do sistema ou constantes que se pretende fixar, com o objectivo de obter uma melhor estimativa das constantes de estabilidade mal definidas. No tratamento de dados espectrofotométricos, o PSEQUAD permite fixar espectros de espécies conhecidas, quer determinadas experimentalmente, quer obtidas de um cálculo anterior.

As principais desvantagens do programa prendem-se com a formatação do ficheiro de entrada e com o facto da construção deste mesmo ficheiro ser algo demorada.

O seu funcionamento é muito semelhante ao do programa HYPERQUAD, pelo que a descrição matemática do sistema de complexos em equilíbrio baseia-se em balanços de massas, em que a cada espécie corresponde uma equação. Para a resolução dos balanços de massas utiliza o método de Newton-Raphson e para refinar os valores das constantes de equilíbrio e as absorvidades molares utiliza o método de Gauss-Newton. O balanço de massas é depois ajustado à curva de titulação experimental utilizando o modelo químico proposto.

Após convergência, o programa indica os valores calculados das constantes de formação e/ou as absorvidades das espécies e respectivos desvios padrão, valores dos resíduos e os cálculos de especiação⁷⁶.

4.5.4. Programa HYSS

O programa HYSS é um programa desenvolvido pelos mesmos autores do programa HYPERQUAD⁷¹, que tem como funções principais: permitir realizar a simulação das curvas de titulação potenciométricas e a simulação de diagramas de distribuições de espécies. No presente trabalho, apenas a segunda funcionalidade do programa HYSS foi utilizada.

Para obter a simulação das curvas de distribuição de espécies é necessário introduzir as concentrações totais de ligando e ião metálico e gama de pH, tal como introduzir o modelo de especiação previamente calculado pelos programas HYPERQUAD ou PSEQUAD.

O algoritmo envolve a resolução das equações de balanço de massa pelo método de Newton-Raphson, tal como no caso do programa HYPERQUAD. A interfuncionalidade entre estes dois programas é reforçada pela possibilidade de utilizar o ficheiro com extensão .par, que contém o modelo químico que se define e refina no HYPERQUAD, directamente no HYSS.

5. Bibliografia

- ¹ Andereg, G.; L'Eplattenier, F. and Schwarzenbach, G., *Helv. Chim. Acta* **1963**, 46, 1400.
- ² Dobbin, P. S.; Hider, R. C.; Hail, A. D.; Taylor, P. D.; Sarpong, P.; Porter, J. B.; Xiao, G.; Helm, D., *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2448.
- ³ Bickel, H.; Hall, G.E.; Keller-Schierlein, W.; Prclg, V.; Vischer, E.; Wettstein, A.; *Helv. Chim. Acta* **1960**, 43, 2129.
- ⁴ Kontoghiorghes, G.J.; Kolnagou, A.; *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 2695
- ⁵ Hider, R.C.; Mohd-Nor, A. R.; Silver, J.; Morrison, I. E. G.; Rees, L. V. C., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1981**, 2, 609.
- ⁶ Motekaitis, R. J.; Martell, A. E., *Inorg. Chim. Acta* **1991**, 183, 71.
- ⁷ Summers, J. B.; Carter, G. W. et al, *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 3.
- ⁸ Coussens, L. M.; Fingleton, B.; Matrisian, L. M., *Science* **2002**, 295, 2387.
- ⁹ Hider, R.C.; Kontoghiorghes, G.; Silver, J.; Stockham M.A., UK Patent 2117766, **1982**.
- ¹⁰ Scarrow, R. C.; Riley, P. E.; Abu-Dari, K.; White, D. L.; Raymond, K. N., *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 952.
- ¹¹ Streater, M.; Taylor, P. D.; Hider, R. C.; Porter, J. B., *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1749.
- ¹² Crichton, R. R., *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: from Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*, Wiley, Chichester, **2001**.
- ¹³ Liu, Z. D.; Hider, R. C., *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 151.
- ¹⁴ Smith, M. A.; Harris, P. L.; Sayre, L. M.; Perry, G., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1997**, 94(18), 9866.
- ¹⁵ R.R. Crichton, R.J. Ward, *Metal-based Neurodegeneration*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **2006**, p. 62.
- ¹⁶ Maker, H. S.; Weiss, C.; Silides, D. J.; Cohen, G., *J. Neurochem.* **1981**, 36(2), 589.
- ¹⁷ Ben-Shachar, D.; Riederer, P.; Youdim, M. B., *J. Neurochem.* **1991**, 57(5), 1609-14.
- ¹⁸ Ricchelli, F.; Drago, D.; Filippi, B.; Tognon, G. & Zatta, P., *Cell. Mol. Life Sc.* **2005**, 62, 1724.
- ¹⁹ Bush, A. I., *Trends Neuros.* **2003**, 26, 207.
- ²⁰ Drago, D.; Bettella, M.; Bolognin, S.; Cendron, L.; Scancar, J.; Milacic, R.; Ricchelli, F.; Casini, A.; Messori, L.; Tognon, G.; Zatta, P., *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **2008**, 40, 731.
- ²¹ Banks, W. A.; Niehoff, M. L.; Drago, D.; Zatta, P., *Brain Res.* **2006**, 1116, 215.
- ²² Santos, M. A., *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 228, 187.
- ²³ Reichert, D. E.; Lewis, J. S.; Anderson, C. J., *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 3.
- ²⁴ Liu, S., *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 22, 445.
- ²⁵ Anderson, C. J.; Welch, M. J., *Chem. Rev.* **1999**, 184, 291.
- ²⁶ Thunus, L.; Lejeune, R., *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 125.
- ²⁷ Storr, T.; Thompson, K. H.; Orvig, C., *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 534.
- ²⁸ Delgado, R.; Félix, V.; Lima, L. M.; Price, D. W., *Dalton Trans.* **2007**, 2734.
- ²⁹ Shannon, R. D., *Acta Cryst. A* **1976**, A32, 751.
- ³⁰ Santos, M. A.; Gil, M.; Gano, L.; Chaves, S., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, 10, 564.

-
- ³¹ Santos, M. A.; Gil, M.; Marques, S.; Gano, L.; Cantinho, G.; Chaves, S., *J. Inorg. Chem.* **2002**, 92, 43.
- ³² Santos, M. A.; Grazina, R.; Neto, A.Q.; Cantinho, G.; Gano, L.; Patrício, L., *J. Inorg. Biochem.* **2000**, 78, 303.
- ³³ Daube-Witherspoon, M. E.; Green, S. L.; Plascjak, P.; Wu, C.; Carson, R. E.; Brechbiel, M.; et al., *J. Nucl. Med.* **1997**, 38, 200P.
- ³⁴ Harris, W. R.; Messori, L., *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 228, 237.
- ³⁵ Green, M. A.; Mathias, C. J.; Neumann, W. L.; Fanwick, P. E.; Janick, M.; Deutsch, E. A. *J. Nucl. Med.* **1993**, 34, 228.
- ³⁶ Edwards, C. L.; Hayes, R. L., *J. Nucl. Med.* **1969**, 22, 292.
- ³⁷ Green, M. A.; *J. Lab. Comp. Radioph.* **1986**, 23, 1227.
- ³⁸ Mintun, M. A.; Dennis, D. R.; Welch, M. J.; Mathias, C. J.; Schuster, D. P., *J. Nucl. Med.* **1987**, 28, 1704.
- ³⁹ Lauffer, R. B., *Chem. Rev.* **1987**, 87, 901.
- ⁴⁰ Caravan, P.; Hedlund, T.; Liu, S.; Sjoberg, S.; Orvig, C., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11230.
- ⁴¹ Wedeking, P.; Kumar K.; Tweedle, M. F., *Mag. Res. Im.* **1992**, 10, 641.
- ⁴² Cacheris, W. P.; Quay, S. C.; Rocklage, S. M., *Mag. Res. Im.* **1990**, 8, 467.
- ⁴³ Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Paoletti, S.; Anelli, P. L.; Uggeri, F.; et al., *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 4707.
- ⁴⁴ Schaefer, M.; *Met. Bas. Drugs* **1997**, 4, 159.
- ⁴⁵ Parker, D. L.; Tsuruda, J. S.; Goodrich, K. C.; Alexander, A. L.; Buswell, H. L.; *Inv. Rad.* **1998**, 33, 560.
- ⁴⁶ Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B., *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293.
- ⁴⁷ Raymond K. N.; Pierre, V. C., *Bioconj. Chem.* **2005**, 16, 3.
- ⁴⁸ Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A. E.; Hedinger, R.; Hegetschweiler, K.; Janossy, A., *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 4104.
- ⁴⁹ Toth, E.; Merbach, A. E., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Wiley, Chichester, **2001**.
- ⁵⁰ Jocher, C. J.; Botta, M.; Avedano, S.; Moore, E.; Xu, J.; Aime, S.; Raymond, K. N., *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 4796 / Pierre, V.; Botta, M.; Aime, S.; Raymond, K. N., *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 8355 / Puerta, D. T.; Botta, M.; Jocher, C. J.; Werner, E. J.; Avedano, S.; Raymond, K. N.; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2222 / Werner, E. J.; Avedano, S.; Botta, M.; Hay, B. P.; Moore, E. G.; Aime, S.; Raymond, K. N., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1870.
- ⁵¹ Krause, W.; Schuhmann-Giampieri, G.; Bauer, M.; Press, W. R.; Muschick, P., *Inv. Rad.* **1996**, 31, 502.
- ⁵² Akimoto, S.; Ohki, T.; Ichikawa, T.; Akakura, K.; Shimazaki, J., *Hinyokika Kyo- Jpn. J. urol.* **1994**, 40, 987.
- ⁵³ Pacifici, R.; Di Carlo, S.; Bacosi, A.; Altieri, I.; Pichini, S.; Zuccaro, P., *J. Imm. Meth.* **1993**, 161, 135.

-
- ⁵⁴ Nilsson, S.; Wikstrom, G.; Ericsson, A.; Wikstrom, M.; Oksendal, A.; Waldenstrom, A.; Hemmingsson, A., *Acta Radiol.* **1996**, 37, 27.
- ⁵⁵ Ericsson, A.; Bach-Gansmo, T.; Niklasson, F.; Hemmingsson, A., *Acta Radiol.* **1995**, 36, 41.
- ⁵⁶ Kukulski, K.; Liniecki, J.; Brykalski, D.; Zadrozna, O.; Kapuscinski, J., *Nucl. Med. Comm.* **1995**, 16, 747.
- ⁵⁷ Franke, W. G.; Schmiedel, T.; Grundmann, A.; Popel, U.; Schomacker, K., Gossel, J.; *Nuklearmed.* **1993**, 32, 188.
- ⁵⁸ Santos, M. A.; Grazina, R.; Gano, L.; Gama, S., *Patent PT 102660* (2001).
- ⁵⁹ Santos, M. A., *Coord. Chem. Rev.* **2008**, 252, 1213.
- ⁶⁰ Chaves, S.; Marques, S. M.; Gano, L.; Santos, M. A., *unpublished results*, **2008**.
- ⁶¹ Yokel, R.; Datta, AK.; Jackson, EG., *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1991**, 257, 100.
- ⁶² Arduíno, D.; Silva, D.; Cardoso, S.; Chaves, S.; Oliveira, C. R.; Santos, M. A., *Front. Biosc.* **2008**, 13, 6763.
- ⁶³ Chaves, S.; Gil, M.; Marques, S.; Gano, L.; Santos, M. A., *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 97, 161.
- ⁶⁴ Gama, S.; Gil, M.; Gano, L.; Farkas, E.; Santos, M. A., *Met. Ions in Biol. & Med* **2006**, 9, 105.
- ⁶⁵ Santos, M. A.; Gama, S.; Gil, M.; Gano, L., *Hemoglobin* **2008**, 32, 147.
- ⁶⁶ Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A., *Talanta* **1996**, 43, 1739.
- ⁶⁷ Hider, R.C.; Kontoghiorghes, G.; Silver, J.; Stockham M.A., *UK Patent 2117766*, **1982**
- ⁶⁸ Clevette, D. J.; Lyster, D. M.; Nelson, W. O., Rihela, T.; Webb, G. A., *Inor. Chem.* **1990**, 29, 667.
- ⁶⁹ Grazina, R.; Gano, L.; Sebestik, J.; Santos, M. A., *J. Inorg. Biochem.* **2008**, in press.
- ⁷⁰ Martell, A. E., *Organic Sequestering agents*, Wiley: New York, **1959**.
- ⁷¹ Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A., *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 311.
- ⁷² Zekany, L.; Nagypal, I, in D.J. Leggett (Ed.), *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, Plenum Press: New York, 1985, p. 291.
- ⁷³ Baes, C. F.; Mesmer, R. E., *The Hydrolysis of Cations*, Wiley: New York, **1976**.
- ⁷⁴ Martell, A. E.; Smith, R. M.; Motekaitis, R. J., *Critically selected stability constants of metal complexes database*, Wiley: New York , **1997**.
- ⁷⁵ Moussa, B. H.; Youdim & Y.S.Bakhle, *Brit. J. Pharm.* **2006**, 147, S287.
- ⁷⁶ Hubálek, F.; Binda, C.; Li, M.; Sterling, J.; Edmondson, D. E.; Mattevi, A., *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1767.
- ⁷⁷ Youdim, M. B. H.; Bakhle, Y. S., *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147, 287
- ⁷⁸ Kruck, T. P. A.; Burrow, T. E., *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 88, 19.
- ⁷⁹ Shin, R. W.; Kruck, T. P. A.; Murayama, H.; Kitamoto, K., *Brain Res.* 2003, 961, 139.
- ⁸⁰ Green, D. E.; Ferreira, C. L.; Stick, R. V.; Patrick, B. O.; Adam, M. J.; Orvig, C., *Bioconj. Chem.* **2005**, 16, 1597.
- ⁸¹ John, CS; Vilmer, BJ; Geyer, BC; Moody, T.; Bowen, W. D., *Cancer Res.* **1999**, 59, 4578.
- ⁸² de Costa, BR; Radesca, L.; Di Paolo, L.; Bowen, WD, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 38.

-
- ⁸³ Kawamura, K.; Ishiwata, K.; Tajima, H.; Ishii, S.; Matsuno, K., Homma, Y; Senda, M., *Nucl. Med. & Biol.* **2000**, 27, 255.
- ⁸⁴ L´opez Rodriguez, M. L.; Ayala, D.; Benham´u, B.; Morcillo, M. J.; Viso, A., *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 443.
- ⁸⁵ Boast, C.; Bartolomeo, A. C.; Morris, H.; Moyer, J. A., *Neurobiol. Learn. Membr.* **1999**, 71, 259.
- ⁸⁶ Gregoriadis, G.. *New Scientist* **1973a**, 60, 890.
- ⁸⁷ Gregoriadis, G., (1973b). *FEBS Lett.* **1973b**, 36, 292.
- ⁸⁸ Shearman, M. S.; Hawtin, S. R.; Tailor, V. J., *J. Neurochem.* **1995**, 65, 218.
- ⁸⁹ Quiram, E. R., *Anal. Chem.* **1955**, 27, 274.
- ⁹⁰ Inoue, M.; Fernando, Q., *J. Chem. Ed.* **2001**, 78, 1132.
- ⁹¹ Ohman, L. O.,Forschling, W., *Acta Chem. Scand. A* **1981**, 35, 795.
- ⁹² Denizot, F.; Lang, R., *J. Imm. Meth.* **1986**, 89, 271-7.
- ⁹³ Hansen, M. B.; Nielson, S. E.; Berg, K., *J. Imm. Meth.* **1989**,119, 203.
- ⁹⁴ Mosmann, T., *J. Imm. Meth.* **1983**, 65, 55.
- ⁹⁵ Jeffree, C. E.; Read, N. D. (**1991**). "Ambient- and Low-temperature scanning electron microscopy", in Hall, J. L.; Hawes, C. R.: *Electron Microscopy of Plant Cells*. London: Academic Press, 313.
- ⁹⁶ Kiernan, J. A., *Micr. Today* **2000**, 1, 8.
- ⁹⁷ Kuhry, J. G.; Duportail, G.; Bronner, C.; Laustriat, G., *Bioch. et Bioph Acta* **1985**, 845, 60.
- ⁹⁸ Lentz, B. R., *Chem. Phys. Lipids* **1993**, 64, 99.
- ⁹⁹ Van der Meer, B. W., *Subcell. Biochem.* **1988**, 13, 1.
- ¹⁰⁰ Rossotti, F. J. C.; Rossotti, H., *J. Chem. Ed.* **1965**, 42, 375.
- ¹⁰¹ Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A., *Talanta* **1996**, 43, 1739.
- ¹⁰² Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 1195.

ANEXO: Contagem do número de Células

A contagem do número de células é feita para garantir que todas as culturas possuem aproximadamente o mesmo número de células. Neste processo é usado o corante celular Trypan Blue (TB, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO).

Numa matriz (figura 38), colocou-se em B3 40 μL de TB e em D3 45 μL deste mesmo corante. Em I3, colocou-se 100 μL de uma solução contendo as células SH-SY5Y (solução contendo 1 mL de meio DMEM + células, após tratamento com PBS, tripsina e centrifugação) e deu-se início ao processo de contagem. Para isso: transferiu-se 10 μL da solução contendo as células para B3, 5 μL deste para D3 e por final 25 μL de D3 para uma câmara de *Burker* (figura 39). Esta contém uma graduação bastante particular, ou seja, 9 grandes quadrantes delimitados por linhas triplas e dentro de cada um destes, 16 quadrantes delimitados por linhas simples. A contagem das células é por convenção, feita nos grandes quadrantes 1-5-7-8-9.

O número de células na solução de 1 mL, será dado pela equação 16.

$$\text{N}^\circ \text{ de células em 1 mL} = \left(\frac{\text{n}^\circ \text{ células na câmara de burker}}{5 \text{ quadrantes}} \right) \times (50 \times 10^4) \quad \text{Equação 16}$$

Em que 50 é o factor de diluição do meio celular e 10^4 é o factor multiplicativo.

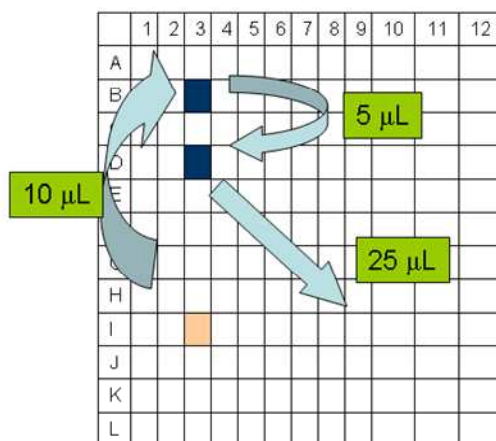


Figura 38: Prato de 96 poços onde foram semeadas as células.

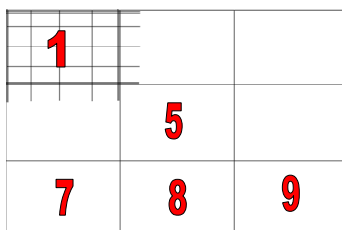


Figura 39: Câmara de Burker, onde se efectuou a contagem do número de células.