

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Joana Rita Mendes Brás

**SÍNTESE DE DERIVADOS LIPOFÍLICOS DE GD-
DOTA PARA USO EM IMAGIOLOGIA DE
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA
CARACTERIZAÇÃO DA SUA INTERAÇÃO COM
BIOMEMBRANAS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, na área de especialização em Química Avançada e Industrial orientada pela Professora Doutora Maria João Pedrosa Ferreira Moreno Silvestre e pela Professora Doutora Marta Piñero Gomez e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021

Joana Rita Mendes Brás

**SÍNTESE DE DERIVADOS LIPOFÍLICOS DE GD-
DOTA PARA USO EM IMAGIOLOGIA DE
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA
CARACTERIZAÇÃO DA SUA INTERAÇÃO COM
BIOMEMBRANAS**

**Dissertação apresentada para provas do Mestrado em Química
na Área de especialização em Química Avançada e Industrial**

Orientação:

Professora Doutora Maria João Pedrosa Ferreira Moreno Silvestre
Professora Doutora Marta Piñero Gomez

Outubro de 2021

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Há seis anos começava uma das etapas mais desafiadoras e bonitas, a minha vida académica. Hoje, essa etapa culmina com este projeto que tanto me ensinou e me fez ter a certeza de que fiz a escolha certa. Foram muitos os momentos de frustração e desmotivação, mas sempre acompanhada de pessoas que nunca me fizeram desistir, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional. Tenho para com todas elas um sentimento de gratidão.

À Professora Doutora Maria João Moreno, orientadora deste trabalho, por todos os conhecimentos transmitidos, disponibilidade, paciência e rigor. Obrigada por nunca desistir e me fazer continuar, mesmo quando os resultados não eram encorajadores. Mostrando-me que investigação é mesmo isto, são muitos os momentos de desânimo, mas no final o trabalho é recompensador e vale a pena toda o esforço.

À Professora Doutora Marta Piñero, minha co-orientadora, agradeço por todos os ensinamentos, pela pronta disponibilidade e ajuda prestada ao longo deste último ano.

Ao Professor Doutor Carlos Gerales, agradeço pela disponibilidade e pelas conversas em que se bebe sabedoria.

À Professora Doutora Margarida Castro, obrigada por partilhar comigo os seus conhecimentos e pelo auxílio nos estudos de relaxometria.

À Doutora Patrícia Martins, o meu muito obrigada por toda a ajuda prestada e acompanhamento laboratorial no início deste projeto.

Ao mestre Alexandre Oliveira, obrigada pela paciência e acompanhamento ao longo deste projeto.

A todos os meus colegas do grupo de investigação de Química Biológica. Obrigada pelo ambiente agradável e saudável com que trabalhamos, pela ajuda, pelas conversas e pelas pausas divertidas.

Aos amigos que já são família e que me acompanharam em toda esta caminhada. Ao Amílcar, à Carolina, ao João, à Maria, ao Pedro, à Rita, ao Santos e ao Tiago. Um obrigada pela presença, por todas as partilhas e discussões, todos os brindes e amizade. Sem vocês do meu lado o caminho teria sido mais difícil. À Andreia, embora não tão presente neste último ano, agradeço a amizade e companheirismo demonstrados. Ao Rui, um amigo que se tornou muito, agradeço por toda a paciência e palavras de incentivo ao longo dos últimos meses, consegui!

Por último, tendo a plena consciência que sozinha nada disto seria possível concretizar, dirijo um agradecimento ao motor de toda a minha existência. Obrigada, Mãe! Obrigada, Pai! Por todo o apoio incondicional, incentivo, amizade e paciência. Por sempre estarem disponíveis e me permitirem concretizar os meus sonhos e deixarem-me voar.

Índice Geral

Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas	VII
Resumo	IX
Abstract	XI
Abreviaturas	XIII
Capítulo 1: Introdução	1
1.1 Importância das Membranas Biológicas	3
1.1.1 Lípidos Constituintes da Membrana	3
1.1.2 Bicamada Lipídica	4
1.1.3 Bicamadas Lipídicas como Sistemas Modelo para Membranas Biológicas.....	6
1.2 Propriedades da Barreira Hematoencefálica	8
1.2.1 Permeabilidade da BBB.....	8
1.3 Imagiologia de Ressonância Magnética.....	10
1.3.1 Agentes de contraste em MRI.....	11
1.3.2. Complexos de Gadolínio como agentes de contraste	13
1.4 Objetivo deste trabalho	14
Capítulo 2: Materiais e Métodos	15
2.1.1 Síntese do DOTA-C4.....	17
2.1.3 Síntese do DOTA-C4 assistida por radiação micro-ondas	19
2.2 Síntese dos complexos	19
2.3 Método de Evans.....	20
2.4 Teste do Laranja de Xilenol.....	22

2.5	Preparação e caracterização dos lipossomas	23
2.6	Otimização da Experiência de Permeação	23
2.7	Experiência de Permeação	24
2.7.1	Preparação das amostras para a caracterização da velocidade de saída do complexo encapsulado nos LUVs	25
2.7.2	Análise por ICP-MS.....	25
2.7.3	Caracterização da velocidade de permeação	26
2.8	Determinação do Coeficiente de Partição	27
2.8.1	Calorimetria de Titulação Isotérmica	27
2.8.2	Relaxometria.....	28
2.8.3	Anisotropia de Fluorescência	29
2.9	Dispersão Dinâmica de Luz.....	30
2.10	Estudo Preliminar da Quantificação do Gd-DOTA.....	31
Capítulo 3: Resultados e Discussão		33
3.1.1	Síntese do DOTA-C4.....	35
3.1.3	Síntese do DOTA-C4 assistida por radiação micro-ondas.....	39
3.2	Estudo de Permeação da CBF.....	41
3.3	Permeação do Gd-DOTA	45
3.4	Caracterização da Partição do Gd-DOTA-C8.....	47
3.4.1	Calorimetria de Titulação Isotérmica	47
3.4.2	Determinação dos tempos de relaxação T_1 e T_2	50
3.4.3	Efeito na temperatura de transição de fase da membrana.....	51
3.5	Diâmetro e Potencial Zeta dos LUVs.....	53
3.6	Estudo Preliminar para a Quantificação de Gd^{3+}	55
Capítulo 4: Conclusão		65
Capítulo 5: Bibliografia.....		69

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação esquemática das três famílias de lípidos constituintes da membrana biológica. A) Fosfatilcolina, um glicerofosfolípido; B) Glicolípido; C) Esterol. (adaptado da referência 3).....	4
Figura 1.2 - Representação das transições de fase de bicamadas lipídicas. As setas a tracejado correspondem a uma diminuição da temperatura e as sólidas a um aumento. (adaptado da referência 7).....	5
Figura 1.3 – Estruturas químicas dos lípidos utilizados ao longo deste trabalho. A) POPC; B) DPPC; C) DDAB. Estruturas desenhadas com o programa MarvinSketch.....	5
Figura 1.4 - Esquema dos diferentes tipos de lipossomas, vesícula unilamelar pequena (SUV), vesícula unilamelar grande (LUV), vesícula unilamelar gigante (GUV) e vesícula multilamelar (MLV). Adaptado da referência 8.....	7
Figura 1.5 - Diagrama esquemático dos mecanismos de transporte de moléculas ao longo da BBB. (adaptado da referência 17).....	9
Figura 1.6 - A) Ilustração de uma ponderação em T_1 e em T_2 numa sequência deMRI; B) Imagem ponderada em T_1 de um cérebro, antes (esquerda) e após (direita) a injeção de um agente de contraste paramagnético C) Imagem ponderada em T_2 do fígado, antes (esquerda) e após (direita) a injeção de nanopartículas de óxido de ferro. (adaptado da referência 21)	12
Figura 1.7 - Estruturas e nome comercial de agentes de contraste de gadolínio usados clinicamente em MRI. (adaptado da referência 33).....	13
Figura 2.1 - Esquema sintético do DOTA-C4, partindo do DOTA-anidrido.....	18
Figura 2.2 - Esquema sintético do DOTA-C8, partindo do DOTA-anidrido.....	18
Figura 2.3 - Esquemas sintéticos das reações de complexação do DOTA, DOTA-C4 e DOTA-C8, $n = 3$ e 7	20
Figura 2.4 - Estrutura química do corante laranja de xilenol.....	22
Figura 3.1 - Espectro de RMN ^1H do Gd-DOTA-C4.....	36
Figura 3.2 - Espectro de RMN ^{13}C do Gd-DOTA-C4.....	36
Figura 3.3 - Espectro de RMN bidimensional HSQC do DOTA-C4. O mapa de isolinhas corresponde à correlação entre os átomos de carbono e hidrogénio ligados covalentemente. Os espectros de ^1H - e ^{13}C - RMN encontram-se na abcissa e na ordenada, respetivamente.	37

Figura 3.4 - Espectro de RMN bidimensional HMBC do DOTA-C4. O mapa de isolinhas corresponde às correlações a longa distância entre os átomos de carbono e hidrogênio. Os espectros de ¹ H- e ¹³ C- encontram-se na abcissa e na ordenada, respectivamente.	38
Figura 3.5 - Espectro de RMN ¹ H do DOTA-C8.....	39
Figura 3.6 - Espectros de RMN ¹ H do DOTA-C4 referente à síntese assistida por radiação MO (azul) sobreposto com o obtido na síntese convencional (laranja).	40
Figura 3.7 - Intensidade de fluorescência da CBF em função do volume de PBS adicionado, após aplicação de 120 µL de LUV's com CBF (●) ou de 120 µL de CBF em PBS (■), a colunas de exclusão Sephadex G-25 de 0.5 mL.	41
Figura 3.8 - Evolução da quantidade de CBF encapsulada no interior dos LUVs (gráfico A, ●) e a CBF na fase aquosa exterior (gráfico B, ●), com o tempo de incubação dos LUVs a 60 °C. As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 2, conduzindo aos valores de constante de velocidade de permeação indicados na figura.....	42
Figura 3.9 - Evolução da quantidade de CBF encapsulada no interior dos LUV's, a diferentes concentrações e temperatura de encubação de 60 °C (gráfico A, ●). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 2, conduzindo aos valores de constante de velocidade de permeação indicados na tabela 3.1. Variação das velocidades de permeação obtidas pelo ajuste do gráfico A em função da concentração de CBF (gráfico B, ●).	43
Figura 3.10 - Evolução da quantidade de CBF encapsulada no interior dos LUV's, a diferentes temperaturas de incubação (gráfico A, ●). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 2, conduzindo aos valores de constante de velocidade de permeação indicados na tabela 3.2. Regressão linear da equação de Arrhenius dos dados obtidos no gráfico A) e extrapolação para 37°C (gráfico B, ●).	44
Figura 3.11 - Evolução temporal da % do Gd-DOТА encapsulado nos LUV's de POPC quando incubado à temperatura de 40, 50 ou 60 °C (gráfico A, ●). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 3 (secção 2.7.3), conduzindo aos valores de constante de velocidade de permeação indicados na tabela 3.3. Regressão linear da equação de Arrhenius dos dados obtidos no gráfico A e extrapolação para 37°C (gráfico B).	45
Figura 3.12 - Termograma obtido na titulação de 0.2 mM de Gd-DOТА-C8 com 20 mM de POPC+DDAB, representando as trocas de calor associadas às injeções da mistura de lípidos na célula contendo o complexo metálico.	48
Figura 3.13 – Variação do calor de diluição de uma solução de Gd-DOТА-C8 a 37°C. A) Termograma obtido, representando as trocas de calor associadas a injeções consecutivas de	

Gd-DOTA-C8 na célula contendo PBS; B) Ajuste do calor por injeção obtido a partir da integração do termograma mostrado em A, após subtração do calor de diluição observado nas últimas injeções.....	49
Figura 3.14 - Regressão linear dos valores obtidos para os valores de $1/T_1$ (A) e $1/T_2$ (B). O declive das retas corresponde ao valor da relaxividade (r_1 e r_2) para o complexo Gd-DOTA-C8.....	50
Figura 3.15 - Estrutura do DPH. Adquirida através do software MarvinSketch.	51
Figura 3.16 - Anisotropia de fluorescência do DPH em 0.5 mM DPPC e tampão HEPES, numa proporção sonda lípido de 1:99. A concentração de Gd-DOTA-C8 foi de 0.5 mM. 52	
Figura 3.17 - Resultados obtidos para a distribuição de tamanho de uma solução contendo LUVs de POPC a uma concentração de lípido de 0.1 mM, e 1 mM de Gd-DOTA-C8.	54
Figura 3.18 - Espectros de absorção das soluções com diferentes concentrações de $GdCl_3$ e cerca de 20 μM de XO.	55
Figura 3.19 - Variação da absorção do XO em função da concentração de $GdCl_3$, (gráfico A, ●). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 9 aos valores de absorvância obtidos para os comprimentos de onda de 440 nm e 570 nm, em função da concentração total de $GdCl_3$. B) Variação da soma dos desvios quadrados obtidos para o ajuste dos resultados apresentados em A para diferentes valores da constante de dissociação do XO-Gd (gráfico B).....	56
Figura 3.20 - Variação da absorção do XO em função da concentração de $GdCl_3$ na ausência (gráfico A) e na presença de DOTA (gráfico B). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 9 aos valores de absorvância obtidos para os comprimentos de onda de 440 nm e 570 nm, em função da concentração total de $GdCl_3$	57
Figura 3.21 - Cinética da transferência do Gd^{3+} do complexo Gd-XO para o complexo Gd-DOTA a uma temperatura de 37 °C (●) e 25 °C (▲), observada através da variação da concentração do Gd-XO medida pela sua absorvância a 570 nm. As linhas correspondem ao melhor ajuste de uma equação mono-exponencial (equação 2, secção 2.6).	58
Figura 3.22 - Cinética da transferência do Gd^{3+} do complexo Gd-XO para o complexo Gd-DOTA a uma concentração de 50 μM (gráfico A, ●) e 100 μM de $GdCl_3$ e DOTA (gráfico B, ●), observada através da variação da concentração do Gd-XO medida pela sua absorvância a 570 nm. As linhas correspondem ao melhor ajuste de uma equação mono-exponencial (equação 2, secção 2.6).	59
Figura 3.23 - Cinética da transferência do Gd^{3+} do complexo Gd-XO para o complexo Gd-DOTA a uma concentração de 100 μM de $GdCl_3$ e DOTA (●), observada através da variação	

da concentração do Gd-XO medida pela sua absorvância a 570 nm. As linhas correspondem ao melhor ajuste de uma equação mono-exponencial (equação 2, secção 2.6)..... 60

Figura 3.24 - Espectros de absorção das diferentes soluções de 50 μM de GdCl_3 e 18.2 μM de XO, variando-se o pH com adição de HCl e diferentes volumes de tampão MES..... 61

Figura 3.25 - Espectros de absorção das soluções com diferentes concentrações de Gd-DOTA, obtidos após estarem a pH ácido durante 1 h e posterior adição de XO em tampão MES de forma a originar um pH final igual a 5 e uma concentração de XO igual a 20 μM .
..... 62

Figura 3.26 - Espectros de absorção das soluções com diferentes concentrações de GdCl_3 e 20 μM de XO em água (gráfico A) e em tampão PBS (gráfico B)..... 63

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Valores da velocidade de permeação para as diferentes concentrações em estudo, em h-1 e s-1 e respectivo desvio padrão.....	43
Tabela 3.2 - Valores obtidos das velocidades de permeação da CBF às diferentes temperaturas de incubação.	44
Tabela 3.3 – Valores da velocidade de permeação do Gd-DOTA às diferentes temperaturas de incubação.	46
Tabela 3.4 - Comparação dos valores de relaxividade obtidos para o Gd-DOTA-C8 com os presentes na literatura para o Gd-DOTA, à mesma temperatura.....	50
Tabela 3.5 – Valores do diâmetro e potencial zeta obtidos para soluções contendo diferentes concentrações de Gd-DOTA-C8 e 0.1 mM de POPC em tampão HEPES.....	53

Resumo

A permeabilidade dos solutos através da barreira hematoencefálica (BBB) é dependente do seu peso molecular, carga, lipofilicidade, anfifilicidade e tamanho da molécula. O Gd-DOTA é muito utilizado em Imagiologia de Ressonância Magnética como agente de contraste positivo, na detecção de tumores cerebrais. No entanto, a sua passagem para o Sistema Nervoso Central apenas ocorre quando a BBB se encontra comprometida, devido à sua elevada hidrofiliicidade.

De modo a contornar esta problemática foram sintetizados dois derivados do Gd-DOTA, através da adição de uma cadeia alquílica de quatro e oito carbonos ao anel do macrociclo.

A velocidade de permeação do Gd-DOTA foi determinada por ICP-MS. Com este objetivo, o complexo metálico foi encapsulado em vesículas unilamelares grandes (LUV's) de POPC, e o composto que permeou a membrana foi separado do que ainda se encontrava encapsulado utilizando cromatografia de exclusão. A permeabilidade do Gd-DOTA foi caracterizada às temperaturas de 40, 50 e 60 °C, obtendo-se por extrapolação um coeficiente de permeabilidade através da membrana igual a 5.8×10^{-13} cm/s a 37 °C.

A interação de um dos novos complexos metálicos sintetizados (Gd-DOTA-C8) com as membranas lipídicas, foi estudada através da determinação do coeficiente de partição com recurso a diferentes técnicas: Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC), relaxometria, efeito na temperatura de transição de fase do lípido, variação no tamanho dos LUVs (por dispersão dinâmica de luz, DLS) e variação na carga dos LUVs (através da medição do potencial zeta). Nenhuma das abordagens permitiu caracterizar com rigor a afinidade do Gd-DOTA-C8 para as membranas lipídicas, os estudos forneceram, no entanto, alguma informação importante. Os estudos de ITC mostraram que o complexo forma agregados quando em solução aquosa em concentrações na ordem dos mM, tendo-se obtido o valor de 0.11 mM para concentração crítica de agregação em tampão fosfato salino a 37 °C. Com os estudos de relaxometria, obtiveram-se os valores das velocidades de relaxação longitudinal e transversal do novo complexo sintetizado, sendo ligeiramente superiores às observadas para o Gd-DOTA. Estes resultados sugerem que os agregados formados pelo Gd-DOTA-C8 são de pequenas dimensões. Observou-se ainda que o Gd-DOTA-C8 não influencia significativamente a temperatura de transição de fase de membranas de DPPC. No entanto, a adição de concentrações crescentes do complexo a lipossomas de POPC, conduz a um aumento no tamanho das partículas em solução e a uma variação no seu potencial zeta que se torna mais negativo.

Foram ainda efetuados estudos preliminares para uma possível quantificação do ião Gd^{3+} em soluções contendo Gd-DOTA, utilizando o corante laranja de xilenol.

Abstract

The permeability of solutes across the blood-brain barrier (BBB) is dependent on their molecular weight, charge, lipophilicity, amphiphilicity and molecule size. Gd-DOTA is widely used in Magnetic Resonance Imaging as a positive contrast agent in the detection of brain tumors. However, its passage to the Central Nervous System only occurs when a BBB is compromised, due to its high hydrophilicity.

To get around this problem, two Gd-DOTA derivatives were synthesized, through the addition of an alkyl chain of four and eight carbons to the macrocycle ring.

The permeation rate of Gd-DOTA was provided by ICP-MS. For this purpose, the metal complex was encapsulated in large unilamellar vesicles (LUV's) of POPC, and the compound that permeated the membrane was separated from what was still encapsulated using exclusion chromatography. The permeability of Gd-DOTA was characterized at temperatures of 40, 50 and 60 °C, obtaining by extrapolation of the permeability coefficient through the membrane a equal to 5.8×10^{-13} cm/s at 37 °C.

The interaction of one of the new synthesized metal complexes (Gd-DOTA-C8) with lipid membranes was studied by determining the partition coefficient using different techniques: Isothermal Titration Calorimetry (ITC), relaxometry, effect on temperature of lipid phase transition, change in size of LUVs (by dynamic light scattering, DLS) and change in charge of LUVs (through measurement of zeta potential). None of the methodologies accurately characterize the affinity of Gd-DOTA-C8 for lipid membranes, the studies provided, however, some important information. ITC studies differentiated that the complex forms aggregates when in aqueous solution in accordance with the order of mM, having a predicted value of 0.11 mM for critical aggregation concentration in phosphate buffered saline at 37°C. As relaxometry studies, the values of the longitudinal and transversal relaxation variations of the new synthesized complex were obtained, very light to those observed for Gd-DOTA. These results obtained that the aggregates formed by Gd-DOTA-C8 are of small dimensions. It was further observed that Gd-DOTA-C8 does not evolve at the phase transition temperature of DPPC membranes. However, the addition of complex enhancers to POPC liposomes leads to an increase in the size of the particles in solution and a variation in their zeta potential which becomes more negative.

Preliminary studies were also carried out for a possible quantification of the Gd³⁺ ion in solutions containing Gd-DOTA, using the xylenol orange dye.

Abreviaturas

Abs – Absorvância

BBB – Barreira HematoEncefálica, do Inglês Blood-Brain-Barrier

CAC – Concentração de Agregação Crítica

CBF – Carboxifluoresceína

DDAB - Brometo de didodecildimetilamônio

DLS – Dispersão Dinâmica de Luz

DMF – Dimetilformamida

DPH - 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno k

DOTA - 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-ácido tetraacético

DPPC - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

DTPA - Ácido dietilenotriaminopentacético

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazinaetanosulfônico)

ICP-MS – Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente

I_F – Intensidade de Fluorescência

MRI – Imagiologia de Ressonância Magnética Nuclear, do Inglês Magnetic Resonance Imaging

ITC – Calorimetria de Titulação Isotérmica

K_p – Coeficiente de partição

LUV – Vesícula Unilamelar Grande

MES – Ácido 2-morfolinoetanosulfônico

MLV – Vesículas Multilamelares

MO – Micro-ondas

PBS – Tampão fosfato

POPC - 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

r_1 – relaxividade longitudinal

r_2 – relaxividade transversal

RF – Radiofrequência

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SNC – Sistema Nervoso Central

T_1 – Tempo de relaxação longitudinal

T_2 – Tempo de relaxação transversal

TJs – do Inglês “Tight Junctions”

TLC – Cromatografia em Camada Fina, do Inglês “Thin Layer Chromatography”

T_m – Temperatura de transição do lípido, do Inglês “Melting Temperature”

XO – Corante Laranja de Xilenol

r – Anisotropia

Capítulo 1:

Introdução

1.1 Importância das Membranas Biológicas

As membranas biológicas desempenham um papel essencial na proteção celular, formando uma barreira hidrofóbica natural que separa o meio interno do externo. São compostas maioritariamente por lípidos e proteínas, tendo como principal função delimitar os diferentes compartimentos biológicos, como células e organelos celulares. É uma barreira física com permeabilidade baixa e específica, que fornece transporte de moléculas para dentro e para fora do meio celular. Os principais mecanismos que ocorrem nas membranas são reconhecimento celular, adesão celular, fusão da membrana e catálise enzimática. Existem vários tipos de membranas plasmáticas especializadas e muitos outros tipos distintos de membranas que criam diferentes organelos intracelulares. Estes tipos de membrana diferem na composição lipídica e proteica.^{1,2}

1.1.1 Lípidos Constituintes da Membrana

As membranas biológicas são constituídas por três famílias principais de lípidos: fosfolípidos, glicolípidos e esteróis. Os fosfolípidos consistem em duas cadeias de ácidos gordos ligadas ao glicerol e a um grupo fosfato, denominados glicerofosfolípidos. Um exemplo comumente encontrado nas membranas biológicas é a fosfatidilcolina (PC), que possui uma molécula de colina ligada ao grupo fosfato (figura 1.1 A). A serina e a etanolamina podem substituir a colina, esses lípidos denominam-se de fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE), respetivamente. Os fosfolípidos podem ainda incluir esfingofosfolípidos, diferenciando-se dos glicerofosfolípidos pelo seu grupo hidrófobo, que neste caso é a ceramida. Os glicolípidos podem conter glicerol ou esfingosina e possuem sempre um açúcar na sua composição no lugar do grupo fosfato dos fosfolípidos (figura 1.1 B). Os esteróis estão ausentes na maioria das membranas bacterianas, mas são um componente importante nas membranas animais e vegetais. O colesterol tem uma estrutura muito diferente da dos fosfolípidos e glicolípidos, possui um grupo hidroxilo (parte hidrofílica), uma cadeia de esteróis e uma cadeia curta de hidrocarbonetos (figura 1.1 C).^{3,4}

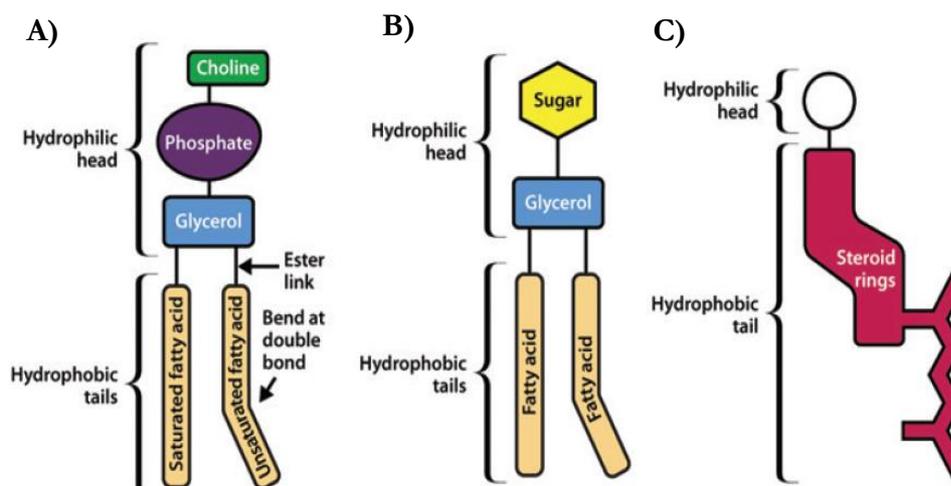


Figura 1.1 - Representação esquemática das três famílias de lipídios constituintes da membrana biológica. A) Fosfatilcolina, um glicerofosfolípido; B) Glicolípido; C) Esterol. (adaptado da referência 3).

1.1.2 Bicamada Lipídica

O modelo do mosaico fluido proposto por Jonathan Singer e Garth Nicolson em 1972 descreve a natureza da biomembrana como uma estrutura dinâmica e fluída.⁵ Esta propriedade dinâmica é baseada nas interações entre os lipídios da bicamada e a sua mobilidade individual, devido a não estarem ligados covalentemente entre si. A bicamada lipídica consiste em duas camadas opostas de fosfolípidos anfífilicos, em que as cabeças polares e hidrofílicas são direcionadas para a fase aquosa e as caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicos são orientadas para o interior da bicamada. A formação das bicamadas ocorre espontaneamente devido à presença de água, sendo o efeito hidrofóbico o maior parâmetro termodinâmico estabilizador dos agregados lipídicos. A agregação dos lipídios deve-se à presença de forças estabilizadoras, como as de Van Der Waals entre as cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos e ligações de hidrogênio entre as cabeças polares.^{6,7}

Dependendo da temperatura, a bicamada lipídica pode se encontrar em duas fases distintas, a fase gel e a fase líquida. A baixas temperaturas as cadeias acilo dos lipídios da bicamada são caracterizadas por uma alta razão conformacional *trans*/*gauche*. As cadeias acilo encontram-se distendidas paralelamente umas às outras e perpendiculares ao plano da bicamada, apresentando um elevado grau de ordem conformacional, rotacional e transversal. Estas bicamadas encontram-se na fase gel, com menor fluidez. Em algumas bicamadas ordenadas, com o aumento da temperatura é possível encontrar a fase *ripple*, caracterizada por uma inclinação das cadeias acilo relativamente ao

plano da bicamada. A transição de fase em bicamadas lipídicas ordenadas ocorre a temperaturas características que dependem do lípido e do comprimento da cadeia acilo. A conversão da fase ordenada ou de gel na fase líquida ocorre quando a temperatura ultrapassa a temperatura de transição do lípido, T_m . A fase líquida é caracterizada por uma maior fluidez membranar, relação conformacional trans/gauche baixa e ordem conformacional, rotacional e translacional baixa. ^{8,9}

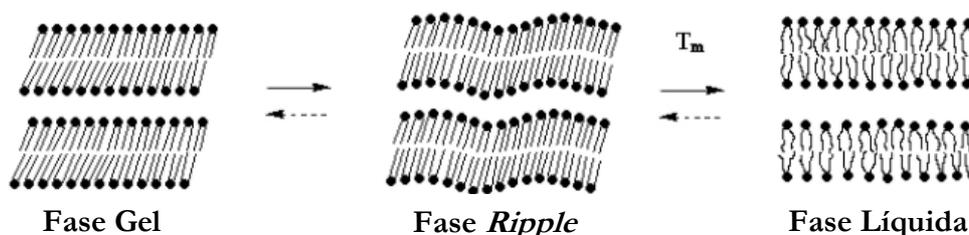


Figura 1.2 - Representação das transições de fase de bicamadas lipídicas. As setas a tracejado correspondem a uma diminuição da temperatura e as sólidas a um aumento. (adaptado da referência 7).

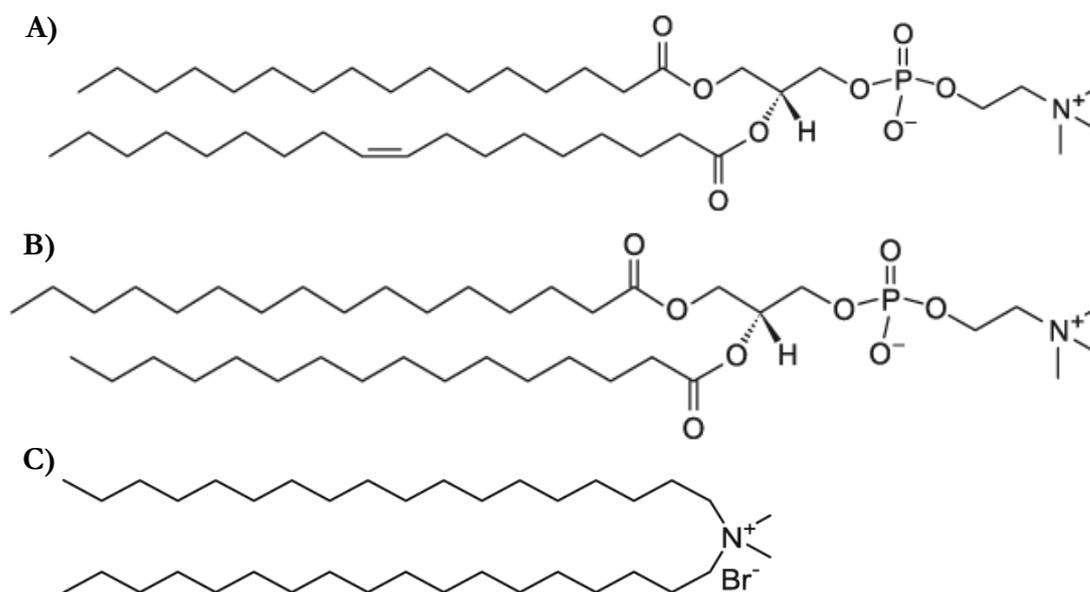


Figura 1.3 – Estruturas químicas dos lípidos utilizados ao longo deste trabalho. A) POPC; B) DPPC; C) DDAB.

No decorrer deste trabalho foram utilizados três tipos diferentes de lípidos: 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) e Brometo de didodecildimetilamônio (DDAB). À temperatura das experiências o POPC e o DDAB

encontram-se na fase líquida^{10,11}, por outro lado o DPPC foi utilizado a diferentes temperaturas, encontrando-se na fase gel, ripple ou líquida.^{1,12}

1.2.3 Bicamadas Lipídicas como Sistemas Modelo para Membranas Biológicas

Do ponto de vista biofísico, as membranas biológicas são estruturas anisotrópicas e não homogêneas com propriedades semelhantes aos cristais líquidos do tipo esméctico. O estudo das propriedades das biomembranas é comprometido pela sua complexidade estrutural, pequeno tamanho, pouca espessura, anisotropia e heterogeneidade. Além disso, é difícil separar as propriedades da bicamada lipídica e a influência da presença de proteínas. Assim, de modo a uma melhor compreensão dos fenômenos que ocorrem nas biomembranas, é necessário reduzir a complexidade do sistema aos seus componentes básicos. Desta forma, diversos modelos de biomembranas foram desenvolvidos, como micelas, monocamadas lipídicas, multicamadas, membranas lipídicas de bicamada, vesículas multicamada e unilamelares e filmes de lípido em suporte sólido.

Os sistemas modelo mais simples são compostos por apenas um lípido e a complexidade destes pode aumentar com a adição de diferentes lípidos, colesterol e lípidos carregados ou com a incorporação de proteínas periféricas ou integrais. Desta forma, as membranas modelo podem ser utilizadas para mimetizar a estrutura e as propriedades das biomembranas.^{13,14}

Os lipossomas são vesículas lipídicas que encapsulam determinado volume de meio aquoso, preparados a partir da hidratação de lípidos da membrana, sendo utilizados como modelos das membranas biológicas. Estes podem ser classificados em: vesículas multilamelares, (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) com diâmetros inferiores a 100 nm, vesículas unilamelares grandes (LUV) com diâmetros compreendidos entre 100 nm e 1000 nm e vesículas unilamelares gigantes (GUV) que possuem diâmetros superiores a 1 μm .¹⁵

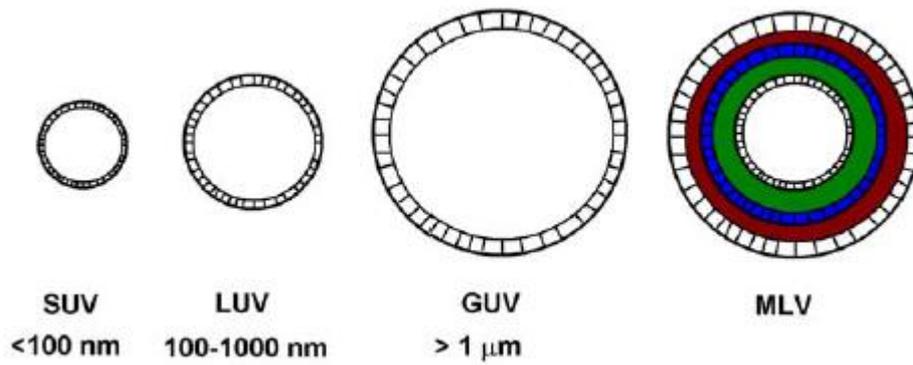


Figura 1.4 - Esquema dos diferentes tipos de lipossomas, vesícula unilamelar pequena (SUV), vesícula unilamelar grande (LUV), vesícula unilamelar gigante (GUV) e vesícula multilamelar (MLV). Adaptado da referência 8.

Na generalidade, os MLV's não são muito utilizados no estudo das membranas biológicas, devido à complexidade de possuir muitos volumes internos, tornando a interpretação difícil. Por esse motivo, vesículas unilamelares são mais comumente utilizadas devido à sua homogeneidade.¹⁶ Neste trabalho, foram utilizados LUV's com 100 nm de diâmetro para o estudo das biomembranas.

1.2 Propriedades da Barreira Hematoencefálica

O cérebro e o sistema nervoso central (SNC) requerem um nível de homeostase e proteção contra as toxinas circulantes no sangue maior do que a maioria dos outros órgãos do corpo. A complexa função neuronal é protegida por barreiras fisiológicas que separam o sangue do fluido intersticial em três interfaces: a barreira hematoencefálica (BBB, do Inglês Brain-Blood-Barrier), o epitélio do plexo coróide (barreira do líquido cefalorraquidiano) e o epitélio aracnóide.^{6,17}

A BBB é formada por células endoteliais cerebrais que, devido à sua função especializada, distinguem-se das restantes células endoteliais do corpo. Estas apresentam proteínas específicas, de modo a controlar a entrada e saída de metabolitos através das células (via transcelular); possuem tight junctions que limitam a permeação de solutos polares através das vias difusionais paracelulares (via paracelular)¹⁸; têm ausência de fenestrações, ou seja, de poros que permitam a troca rápida de moléculas entre o sangue e o tecido e apresentam baixa velocidade de transporte vesicular (transcitose), de forma a prevenir o transporte de grandes moléculas hidrofílicas para o SNC.¹⁹ As células endoteliais encontram-se polarizadas em duas partes da membrana plasmática, a apical, voltada para o sangue, e a basolateral, voltada para o cérebro.^{20,21}

As principais funções da BBB são o controlo do transporte molecular, impedindo a entrada de toxinas para o SNC; a homeostase iónica, de modo a que a sinalização sináptica decorra de forma ideal; manter o ambiente do SNC baixo em proteínas, de modo a limitar a proliferação e preservar a conectividade neuronal; separar os neurotransmissores centrais e periféricos, permitindo a sinalização não sináptica no SNC e vigiar a resposta imunológica, de modo a que haja o mínimo de inflamação e danos celulares.²²

1.2.1 Permeabilidade da BBB

As moléculas podem cruzar a BBB por duas vias: paracelular e transcelular. Na via paracelular, os iões e os solutos polares atravessam a BBB por difusão passiva entre as células endoteliais, a favor do seu gradiente de concentração. Por outro lado, a via transcelular abrange diferentes mecanismos de transporte, como difusão passiva, transporte mediado por transportadores e transcitose (mediada por receptores ou devido à adsorção à superfície da membrana).²³ O transporte ao longo da BBB é dependente de fatores físico-químicos que influenciam a permeabilidade dos solutos através da membrana, como o peso molecular, a carga, a lipossolubilidade, a anfifilicidade e

o tamanho da molécula. Para além disto, a permeabilidade da BBB é influenciada por fatores fisiológicos, como transportadores de efluxo (glicoproteína-P, por exemplo), atividade enzimática, ligação a proteínas plasmáticas e fluxo sanguíneo cerebral.²⁴

Pequenas moléculas lipofílicas, como o O₂ e o CO₂, conseguem difundir-se livremente através da membrana do endotélio. A presença de transportadores específicos nas membranas apical e basolateral regula o transporte de pequenas moléculas hidrofílicas, permitindo a entrada de nutrientes essenciais e excluindo ou transportando de volta para o sangue vários compostos que por não serem reconhecidos como essenciais são potencialmente tóxicos. Grandes moléculas hidrofílicas são geralmente excluídas, a menos que consigam ser transferidas por transcitose.^{25,26}

Aquando da ocorrência de algumas condições patológicas (acidente vascular cerebral, esclerose múltipla, doença de Parkinson e doença de Alzheimer, por exemplo) a integridade da BBB é comprometida, aumentando a permeabilidade a moléculas grandes e polares.²⁷ O comprometimento da BBB pode ser visualizado *in vivo* através de ressonância magnética, com o auxílio da injeção de um agente de contraste como por exemplo complexos de gadolínio.²³

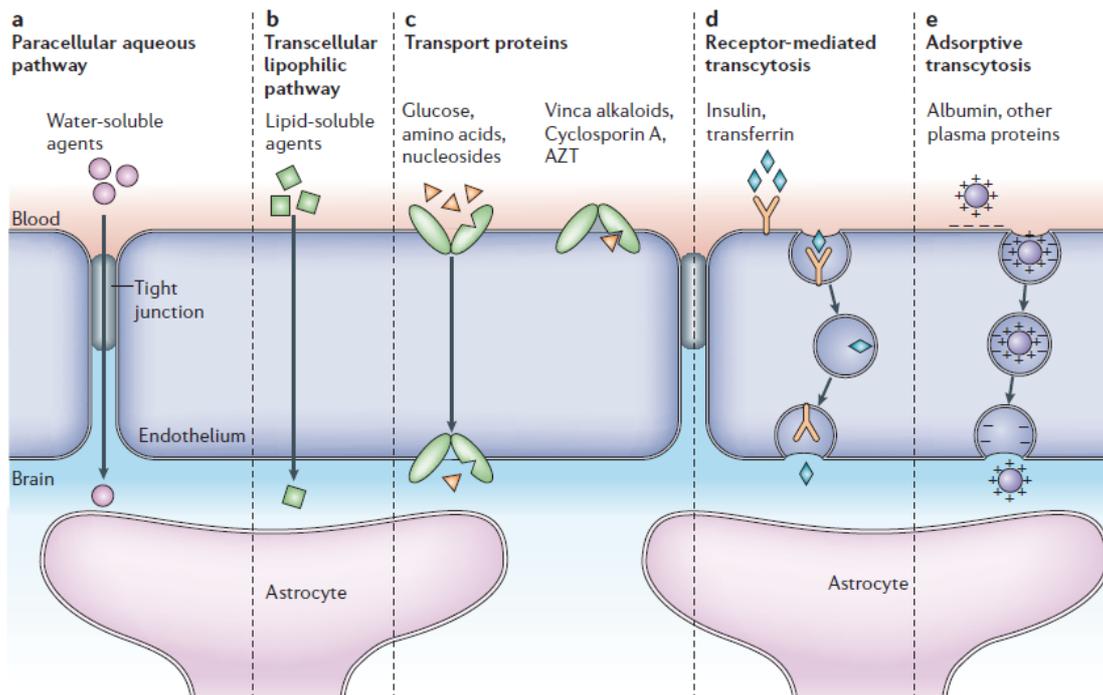


Figura 1.5 - Diagrama esquemático dos mecanismos de transporte de moléculas ao longo da BBB. (adaptado da referência 17).

1.3 Imagiologia de Ressonância Magnética

A Imagiologia de Ressonância Magnética (MRI) é uma técnica amplamente utilizada em diagnósticos clínicos pois permite a detecção e caracterização de diferentes tecidos moles, como por exemplo tumores cerebrais.²⁸ Ao contrário da radiografia Raio-X e Tomografia Computorizada, não faz uso de radiação ionizante, apresenta tempos de varrimento mais curtos e conduz a imagens de alta resolução. No entanto, possui menor sensibilidade quando comparada aos métodos nucleares Tomografia por Emissão de Positrões (PET) e Tomografia Computorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT).²⁹

A MRI é uma técnica não invasiva que deriva diretamente do fenómeno de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), dependendo de duas propriedades principais dos núcleos atômicos: carga e spin. Os núcleos com spin diferente de zero (^1H , ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P , por exemplo) são ativos em RMN, estes possuem momento magnético não nulo e tendem, por isso, a estar alinhados com um campo magnético. Na grande maioria das experiências de MRI, o foco está no átomo ^1H , devido à sua grande abundância natural.^{30,31} As imagens de MRI são adquiridas através do alinhamento dos spins nucleares em resposta a um campo magnético externo, perturbado por um pulso de radiofrequência (RF). Após a excitação através do pulso de RF, a magnetização nuclear retorna ao equilíbrio por meio de relaxamento. Este é caracterizado por dois tempos de relaxação: o tempo spin-rede ou longitudinal (T_1), que descreve a recuperação exponencial do equilíbrio; e o tempo spin-spin ou transversal (T_2), que corresponde à diminuição exponencial da precessão da magnetização e, desta forma, à diminuição do sinal de RMN.³⁰ O contraste de imagem pode ser obtido através da diferença nos tempos de relaxação dos núcleos dos prótons da água nos diferentes tecidos. Propriedades dos diferentes tecidos tais como a sua viscosidade, conduzem a diferentes tempos de relaxação dos prótons da água o que gera contraste entre os diferentes tecidos permitindo obter uma imagem sem a introdução de agentes externos. O contraste pode ser melhorado manipulando os tempos de relaxação dos prótons da água fazendo uso de agentes de contraste.³²

1.3.1 Agentes de contraste em MRI

Ao contrário dos agentes de contraste utilizados na Tomografia Computadorizada de Raios-X e na medicina nuclear, em MRI não são estes que são visualizados diretamente na imagem, mas sim os seus efeitos nos tecidos.³³ Um bom agente de contraste deve ser biocompatível, ter alta solubilidade em água, estabilidade em condições aquosas, baixo potencial osmótico quando está em solução e possuir rápida excreção renal.²⁹ O contraste é resultado da variação que o agente causa nos tempos de relaxação dos prótons da água e, conseqüentemente, na intensidade do sinal de RMN. A intensidade do sinal de RMN decorre em grande parte do valor local da velocidade de relaxação longitudinal ($1/T_1$) e da velocidade de relaxação transversal ($1/T_2$). O sinal tende a aumentar com o aumento de $1/T_1$ e a diminuir com o aumento de $1/T_2$. Os agentes de contraste aumentam $1/T_1$ e $1/T_2$ em vários graus, dependendo da sua natureza e do campo magnético aplicado.^{29,34} Agentes paramagnéticos aumentam ambas as velocidades de relaxação em quantidades aproximadamente semelhantes, mas são melhores para imagens ponderadas em T_1 , uma vez que a variação percentual em $1/T_1$ no tecido é muito maior que em $1/T_2$. Por outro lado, as nanopartículas de ferro levam geralmente a um aumento muito superior em $1/T_2$ do que em $1/T_1$. Os agentes de contraste que afetam T_1 são chamados de positivos, sendo adquiridas imagens mais claras nas zonas onde os agentes são captados, Figura 1.6 A. Isto deve-se ao agente de contraste paramagnético se acumular no tumor, fazendo com que estes apareçam mais brilhantes em imagens ponderadas em T_1 , como representado na Figura 1.6 B. Contrariamente, os agentes que afetam T_2 são conhecidos como negativos e produzem imagens mais escuras, Figura 1.6 A. Estes agentes de contraste são utilizados para detectar tumores no fígado e no baço, sendo absorvidos pelo sistema reticuloendotelial, mas não pelo tumor. Desta forma, o tumor aparecerá brilhante em imagens ponderadas em T_2 , contrastando com a coloração mais escura do órgão onde se encontra, Figura 1.6 C.^{34,35}

A velocidade de relaxação é também denominada por relaxividade (r) e é o inverso do tempo de relaxação longitudinal (r_1) e transversal (r_2). A proporção entre os dois valores de relaxividade (r_2/r_1) é um parâmetro importante na distinção dos agentes de contraste ponderados em T_1 e em T_2 . Os agentes de contraste positivos têm uma relaxividade longitudinal superior, apresentando uma proporção r_2/r_1 menor que os agentes de contraste negativos.

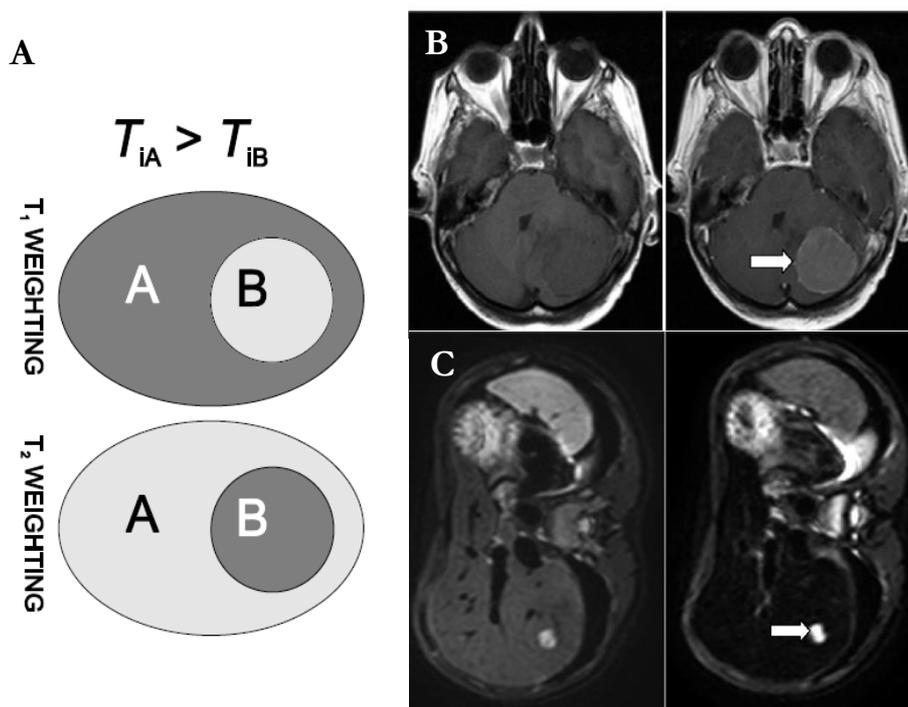


Figura 1.6 - A) Ilustração de uma ponderação em T₁ e em T₂ numa seqüência de MRI; B) Imagem ponderada em T₁ de um cérebro, antes (esquerda) e após (direita) a injeção de um agente de contraste paramagnético C) Imagem ponderada em T₂ do fígado, antes (esquerda) e após (direita) a injeção de nanopartículas de óxido de ferro. (adaptado da referência 21)

A classe mais utilizada de agentes de contraste para MRI é baseada no mecanismo de relaxação longitudinal, pois apresentam um contraste de imagem superior ao mecanismo de relaxação transversal. Isto deve-se à interação da esfera interna e externa do metal com as moléculas de água circundantes, sendo que o componente da esfera externa é resultado da difusão translacional das moléculas de água perto dos íons metálicos. O valor da relaxividade é a soma das relaxividades da esfera interna e externa. Ao introduzirmos moléculas que contêm elétrons desemparelhados, estas desencadearão o retorno ao equilíbrio dos prótons da água com muito mais eficácia, devido ao momento magnético do elétron ser muito mais forte do que o do próton.³⁶ Para além disso, cada elétron desemparelhado irá interagir com as moléculas de água, havendo um aumento do valor de r_1 e, conseqüentemente, um melhor contraste positivo na imagem.^{37,38}

1.3.2. Complexos de Gadolínio como agentes de contraste

O gadolínio (^{64}Gd) pertence ao grupo dos lantanídeos e possui sete elétrons desemparelhados. Possuindo assim fortes propriedades paramagnéticas, facilitando a relaxação dos prótons das moléculas de água circundantes. O gadolínio na sua forma iônica livre é altamente tóxico, devido ao raio iônico do Gd^{3+} (107,8 pm) ser próximo ao do Ca^{2+} (114 pm), sendo um bloqueador inorgânico de muitos tipos de canais de cálcio. Consequentemente, inibe os processos fisiológicos que dependem do influxo de Ca^{2+} (contração do músculo liso, esquelético e cardíaco, transmissão do influxo nervoso, coagulação do sangue, etc). Neste sentido, os íons Gd^{3+} são complexados com ligandos quelantes, formando complexos cineticamente inertes e termodinamicamente estáveis, de modo a garantir a inocuidade do íon desde a sua administração até à sua excreção. ^{33,39,40}

Os agentes de contraste com base em Gd^{3+} são categorizados em dois grupos principais: quelatos lineares, como o ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), e quelatos macrocíclicos, como o 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-ácido tetraacético (DOTA), Figura 1.7. De modo geral, os quelatos macrocíclicos apresentam maior estabilidade termodinâmica e cinética de dissociação mais lenta do que os quelatos lineares.^{28,41} A instabilidade química do quelato e/ou uma ligação fraca entre o Gd^{3+} e o quelato pode levar a que ocorra transmetalção, ou seja, troca com outros íons metálicos endógenos (Zn^{2+} , Cu^{2+} ou Ca^{2+} , por exemplo) havendo liberação do íon Gd^{3+} .^{32,40}

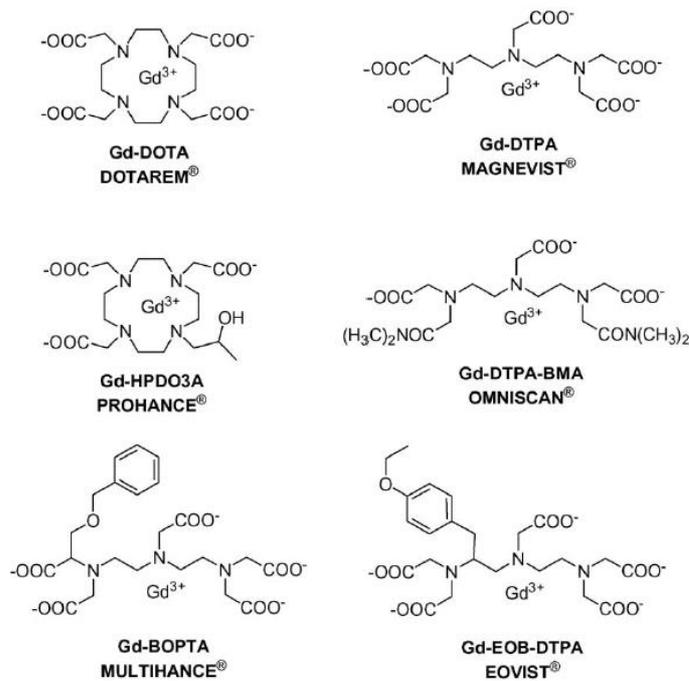


Figura 1.7 - Estruturas e nome comercial de agentes de contraste de gadolínio usados clinicamente em MRI. (adaptado da referência 33)

1.4 Objetivo deste trabalho

Como já referido anteriormente, o Gd-DOTA é um quelato macrocíclico muito utilizado como agente de contraste positivo em MRI. No entanto, devido à sua elevada hidrofilicidade, não é possível a sua passagem por difusão passiva através da BBB. Porém, aquando da ocorrência de uma neoplasia cerebral a membrana fica comprometida, permitindo a passagem do complexo metálico para o SNC. Desta forma, o Gd-DOTA é largamente utilizado em neurorradiologia como agente de contraste, a fim de detetar a presença de tumores cerebrais. A passagem do agente de contraste através da BBB intacta irá permitir o diagnóstico precoce de tumores bem como de outras patologias. Com este objetivo têm sido introduzidas várias alterações na estrutura do grupo DOTA.^{42,43}

Ao longo deste trabalho foram sintetizados dois derivados do DOTA, o macrociclo foi modificado com a introdução de uma cadeia alquílica de 4 e 8 carbonos (DOTA-C4 e DOTA-C8, respetivamente), a fim de aumentar a sua lipofilicidade e biodisponibilidade.

O objetivo deste trabalho é a caracterização quantitativa da permeação dos diferentes complexos de gadolínio através de membranas de POPC, uma fosfatidilcolina utilizada como modelo para uma primeira aproximação das biomembranas da BBB. Os resultados obtidos permitirão uma comparação quantitativa entre o Gd-DOTA e os novos complexos sintetizados, facilitando a otimização racional da estrutura de complexo com maior disponibilidade no cérebro.

Capítulo 2:

Materiais e Métodos

2.1 Síntese dos ligandos DOTA-C4 e DOTA-C8

Os derivados do DOTA foram sintetizados partindo do DOTA-anidrido, adquirido à Chematech. As aminas octilamina, butilamina e trietilamina foram adquiridas à Sigma-Aldrich e o solvente dimetilformamida (DMF) à Merck. O metanol deuterado adquirido à VWR. Todos os reagentes e solventes foram utilizados sem purificações adicionais.

2.1.1 Síntese do DOTA-C4

Preparou-se uma solução contendo 200 mg de DOTA-anidrido (Figura 2.1), 43 μ L de butilamina (1 equivalente) e 60 μ L de trietilamina (3 equivalentes) em 4 mL de DMF, colocou-se sob agitação durante 24 horas, à temperatura de 70 °C. A reação foi seguida através de cromatografia em camada fina (TLC), utilizando-se acetato de etilo e hexano (2:1) como eluente. Após arrefecimento à temperatura ambiente, realizou-se extração líquido-líquido com éter dietílico (5x10 mL) e água. A fase aquosa evaporou-se e procedeu-se à purificação através de cromatografia por coluna de fase reversa, utilizando-se sílica RP-18 como fase estacionária.⁴⁴ Como eluente utilizou-se uma solução de acetonitrilo e água, variando-se a proporção dos dois componentes ao longo do procedimento (0:100, 10:90 e 25:75 acetonitrilo/água). Passou-se pela coluna 25 mL de cada mistura de solventes, num total de 75 mL de eluente. A recuperação do composto foi seguida através de TLC de fase reversa, revelada em câmara de iodo, tendo-se verificado a sua eluição aquando da passagem do eluente acetonitrilo /água (10:90). Diluiu-se o composto obtido no método de purificação em água a pH 9 e procedeu-se à sua liofilização, obtendo-se o produto final com um rendimento entre 10-20 %.

O composto foi caracterizado por espectroscopia de RMN, adquirindo-se os espectros de ¹H, ¹³C, HSQC (do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy*) e HMBC (do inglês *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), num espectrofotómetro Bruker-Avance III (400 MHz). As soluções analisadas por RMN foram preparadas em metanol deuterado.

¹H RMN (400 MHz, MeOD): δ , ppm = 0.95 (3H, t, J = 7.3Hz); 1.37 (2H, m); 1.50 (2H, m); 1.86-2.95 (24H, m); 3.18 (4H, m); 3.41 (1H, dd, J = 10.3 Hz, J = 2.84 Hz);

¹³C RMN (400 MHz, MeOD): δ , ppm = 14.2; 21.2; 32.6; 35.8; 40.2; 47.2; 59.7; 60.2; 60.4; 64.9; 176.1; 179.9.

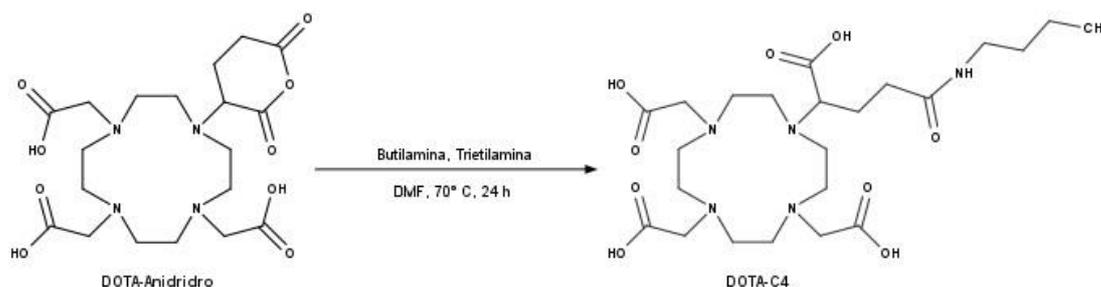


Figura 2.1 - Esquema sintético do DOTA-C4, partindo do DOTA-anidrido.

2.1.2 Síntese do DOTA-C8

Para a síntese do derivado DOTA-C8 partiu-se de 200 mg de DOTA-anidrido (Figura 2.2), 72 μ L de octilamina (1 equivalente) e 60 μ L de trietilamina (3 equivalentes) em 4 mL de DMF, a 70 °C durante 24 horas, sob agitação. De modo a obter o composto pretendido, procedeu-se de igual forma ao apresentado na secção 2.1.1. Apenas se alterou a proporção dos componentes do eluente ao longo da cromatografia por coluna de fase reversa (25:75, 50:50, 75:25 acetonitrilo: água), verificando-se a eluição do composto com a proporção 50% acetonitrilo e 50% água. Após o processo de liofilização, obteve-se o composto pretendido com rendimento de 30-50%.

¹H RMN (400 MHz, MeOD): δ , ppm = 0.92 (3H, t, J = 8 Hz); 1.32 (10H, dd, J = 7.3 Hz, J = 3.7 Hz); 1.51 (2H, m); 1.91-3.06 (24H, m); 3.21 (4H, m); 3.50 (1H, s).

¹³C RMN (400 MHz, MeOD): δ , ppm = 14.5; 23.7; 30.4; 30.5; 33.0; 40.6; 59.4.

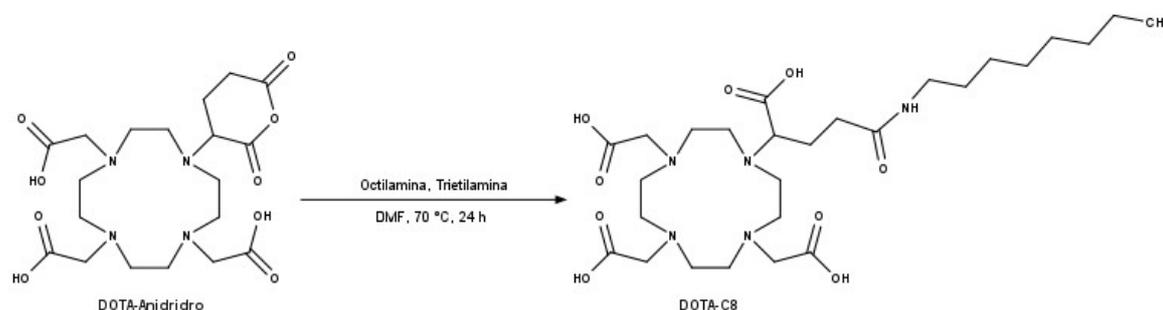


Figura 2.2 - Esquema sintético do DOTA-C8, partindo do DOTA-anidrido

2.1.3 Síntese do DOTA-C4 assistida por radiação micro-ondas

Na síntese convencional, a monitorização da temperatura é realizada por aquecimento condutor com fontes de calor externas (banho de parafina, por exemplo). Este é um método comparativamente lento e ineficiente para transferir energia para o sistema, dependendo da condutividade térmica dos vários materiais, sendo a temperatura do balão da reação superior à da solução. Em contraste, a irradiação por micro-ondas (MO) produz aquecimento interno eficiente por interação da radiação de MO com as moléculas presentes na solução. Este tipo de aquecimento reduz o tempo de reação, aumenta o rendimento do produto e facilita o seu processo de purificação, havendo uma redução de reações secundárias indesejadas em comparação com os métodos de síntese convencional.⁴⁵

Para a síntese do complexo DOTA-C4 assistida com radiação micro-ondas, preparou-se uma solução de 50 mg de DOTA-anidrido, 6 µL de butilamina e 15 µL de trietilamina, dissolvidos em 1 mL de DMF num vaso de MO de 10 mL. Esta solução foi sujeita a irradiação MO durante 30 minutos, com uma temperatura de 70 °C e potência inicial de 100 W. A reação foi realizada no aparelho CEM-Discover S-Class e seguida através de TLC. Após arrefecimento, realizou-se extração líquido-líquido com éter dietílico e água. Posto isto, evaporou-se os solventes e liofilizou-se o produto retido na fase aquosa, obtendo-se o composto final com um rendimento de 64,98% do crude de reação. Por último, realizou espectrometria RMN, tendo-se adquirido o espectro ¹H.

2.2 Síntese dos complexos

Através dos ligandos DOTA, DOTA-C4 e DOTA-C8, sintetizou-se complexos metálicos utilizando o ião lantanídeo Gd³⁺. O ligando DOTA foi adquirido à Chematech e os ligandos DOTA-C4 e DOTA-C8 foram sintetizados consoante o descrito nas secções 2.1.1 e 2.1.2, respetivamente.

Preparou-se uma solução *stock* do ião metálico, dissolvendo-se o sal cloreto de gadolínio (III) hexahidratado (adquirido à Merck), em água desionizada, com o pH ajustado para 2 através de uma solução de HCl 1 M, de forma a prevenir a formação do hidrato de gadolínio e precipitação do sal a pH mais elevado. Esta solução foi quantificada através do método de Evans, com uso da suscetibilidade magnética em massa (BMS, do inglês *Bulk Magnetic Shift*) de uma referência inerte, tert-butanol (adquirido à Merk), determinado por ¹H RMN (procedimento descrito na secção 2.3).⁴⁶

A síntese dos complexos foi realizada através de uma mistura das soluções de cloreto de gadolínio e de ligando (Figura 2.3). De modo a garantir a ausência de metal livre em solução, usou-se um excesso de ligando, cerca de 5% superior à quantidade molar de metal. A reação de complexação realizou-se a pH 5.5 e a uma temperatura de 60 °C, com agitação. À medida que a reação de complexação ocorre, o pH da solução diminui devido à desprotonação do ligando, desta forma, o pH foi monitorizado e ajustado continuamente com uma solução de NaOH 10 mM. Após a estabilização do valor do pH a 5.5, deixou-se a reagir durante 24 horas. Findo este tempo, realizou-se o teste com o corante laranja de xilenol (XO) para confirmar a presença ou ausência de gadolínio livre (ver secção 2.4). Quando se observou existir gadolínio livre em solução, adicionou-se pequenas quantidades de ligando, até o teste do corante ser negativo para a presença do íon livre. Posto isto, procedeu-se à liofilização do produto da reação obtendo-se os complexos Gd-DOTA, Gd-DOTA-C4 e Gd-DOTA-C8.

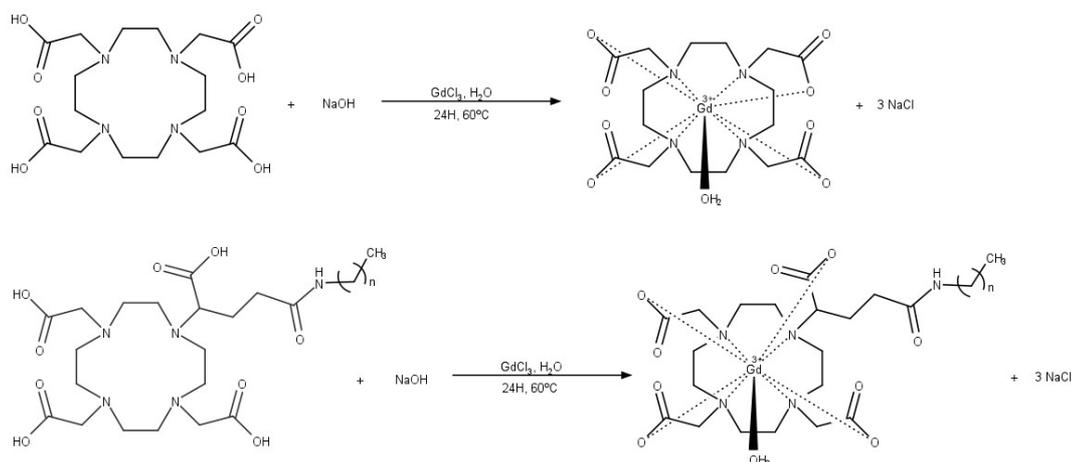


Figura 2.3 - Esquemas sintéticos das reações de complexação do DOTA, DOTA-C4 e DOTA-C8, $n = 3$ e 7.

2.3 Método de Evans

O gadolínio é um metal com elevado paramagnetismo, podendo influenciar os spins nucleares ao induzir alterações no desvio químico e/ou aumentando a velocidade de relaxação. Uma substância paramagnética pode induzir um deslocamento químico nas frequências de ressonância magnética através de três mecanismos: hiperfino, diamagnético e BMS. O deslocamento hiperfino pode ocorrer por duas vias, a contribuição escalar e a dipolar. Ambas as contribuições requerem

interação química entre o centro paramagnético e os núcleos dos átomos do ligando. Os deslocamentos diamagnéticos estão relacionados, por norma, com os deslocamentos induzidos nos núcleos de um ligando durante a reação de complexação com um íon paramagnético, devido às alterações conformacionais. A contribuição por BMS deve-se ao alinhamento parcial dos momentos magnéticos da espécie paramagnética com o campo magnético externo, sendo afetada a suscetibilidade magnética de toda a amostra. Desta forma, apenas a contribuição BMS é necessária para determinar a influência que o composto paramagnético terá no desvio químico de uma substância inerte. O desvio provocado é dado em função da concentração da espécie paramagnética, através da seguinte equação:

$$\Delta_x = \frac{4\pi c s}{T} \left(\frac{\mu_{eff}}{2.84} \right)^2 \times 10^3 \quad (1),$$

em que c corresponde à concentração do soluto paramagnético em mol l^{-1} , s depende da forma da amostra e da sua posição no campo magnético ($s = 1/3$ para um cilindro paralelo ao campo, $s = -1/6$ para um cilindro perpendicular ao campo e $s = 0$ para uma esfera), T é a temperatura absoluta e μ_{eff} corresponde ao momento magnético efetivo de determinado composto paramagnético e é um valor que se encontra tabelado.⁴⁷ Para o íon metálico de gadolínio o seu valor é $7.94 \mu_B$.⁴⁸

De modo a quantificar a solução de cloreto de gadolínio preparada na secção 2.2, determinou-se o valor de Δ_x . Para tal, utilizou-se um tubo de RMN de 5mm de diâmetro com um tubo co-axial no seu interior. No tubo interno colocou-se uma massa conhecida de tert-butanol, 10.4 mg, e 80 μL da solução do composto paramagnético e no tubo externo colocou-se 8.3 mg de tert-butanol e 400 μL de água deuterada 99.9%. Adquiriu-se o espectro de 1H de RMN, tendo-se visualizado a presença de dois sinais correspondentes aos prótons do tert-butanol de ambos os tubos. O desvio químico correspondente ao tubo interno foi superior relativamente ao do tubo externo, devido ao deslocamento provocado pelo íon paramagnético. Com a diferença, em ppm, dos desvios químicos dos dois tubos obteve-se o valor do deslocamento provocado pelo efeito BMS que, ao ser substituído na equação 2.1, permitiu calcular a concentração da solução de cloreto de gadolínio.

2.4 Teste do Laranja de Xilenol

Como já referido anteriormente (secção 1.2.2) o ião Gd^{3+} é altamente tóxico na sua forma livre. De modo a contornar esta problemática, é necessário garantir que aquando da complexação dos quelatos de gadolínio não haja ião livre em solução, mas sim que este esteja todo complexado. Para tal, é usado um indicador complexométrico, ou seja, um corante que apresenta uma coloração diferente na presença e na ausência de metal livre. Para os iões lantanídeos, o indicador mais comumente utilizado é o laranja de xilenol.

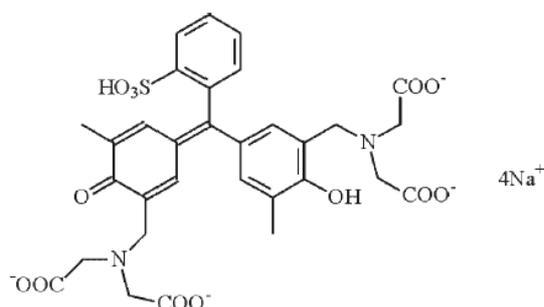


Figura 2.8 - Estrutura química do corante laranja de xilenol.

A cor deste não depende apenas da presença de metal, mas também do pH. A pH ácido/neutro a solução é amarela e para valores básicos a solução é violeta. Isto deve-se à desprotonação do grupo hidroxilo do fenol, levando a uma deslocalização eletrónica e, por sua vez, a uma alteração do comprimento de onda de absorção. A coordenação com o metal causa o mesmo efeito no corante que a variação de pH, levando a uma coloração amarela na ausência de metal e violeta na presença de ião livre, respetivamente. Tendo em conta estas considerações, o pH da solução de corante tem de ser controlado, este deve ser ligeiramente ácido ou neutro, mas não pode ser básico, de modo que a solução não apresente coloração violeta na ausência de metal livre.

Desta forma, dissolveu-se uma determinada quantidade de XO em tampão ácido acético/acetato de sódio 50 mM, a pH 5.8 e com a concentração de corante ajustada para 200 μ M. Para a confirmação qualitativa da existência /ausência de Gd^{3+} em solução, adicionou-se 20 μ L da solução de corante a 200 μ L da solução de complexo, de modo que a concentração final de XO seja de aproximadamente 18 μ M. ⁴⁹

2.5 Preparação e caracterização dos lipossomas

Como sistema modelo para o estudo da partição para e permeação através das biomembranas da BBB, utilizaram-se vesículas unilamelares grandes (LUV's) de POPC. Foram também efetuados alguns estudos com a inclusão de 10% de um lípido catiónico (DDAB) com o objetivo de aumentar a afinidade dos derivados de Gd-DOTA, dado que estes apresentam uma carga global negativa.

Partindo da solução stock de POPC (adquirido à Avanti Polar Lipids), preparada numa mistura azeotrópica de Clorofórmio:Metanol (87.4:12.6 (v/v)), retirou-se o volume necessário de acordo com a concentração e volume final pretendidos. Evaporou-se o solvente agitando a solução num vórtex, sob a incidência de um fluxo de ar quente na parte externa do tubo de vidro e de um fluxo de azoto na boca do tubo. Colocou-se o tubo num exsiccador sob vácuo durante 5 a 16 horas, de forma a eliminar todos os vestígios de solvente. Findo este tempo, hidratou-se o filme de lípido com uma solução aquosa (solução de complexo de gadolínio, tampão fosfato (PBS) ou tampão HEPES) e colocou-se a estabilizar num banho a 40 °C, tornando a bicamada mais fluida e facilitando a sua hidratação. O tubo foi submetido a ciclos de agitação até a solução estar totalmente hidratada e, em seguida, transferiu-se para um tubo de plástico (tipo falcon). O falcon foi previamente lavado com tampão PBS, congelando esta solução três vezes em azoto líquido e descongelando num banho a 40 °C (*freeze/thaw*). Isto é necessário para que não haja contaminações nos lipossomas, removendo-se os ftalatos e outras moléculas pequenas que se possam libertar do plástico durante o processo de congelamento/descongelamento.

A suspensão hidratada de MLV's sofreu um processo de extrusão, utilizando-se dois filtros de policarbonato com poros de 100 nm (Whatman Nucleopore) e um extrusor Lipex Biomembranes. A solução lipídica foi submetida a três ciclos de *freeze and thaw*, seguida de mais três ciclos de *freeze and thaw* com vórtex e passagem no extrusor entre cada ciclo. Após estas três passagens, realizou-se mais dez extrusões, com agitação prévia. Posto isto, armazenou-se a solução de LUV's a 4 °C.

2.6 Otimização da Experiência de Permeação

O protocolo referido na secção seguinte, 2.7, foi previamente otimizado através do estudo da permeação da carboxifluoresceína (CBF). A escolha da CBF deve-se ao facto de esta apresentar descritores moleculares semelhantes aos complexos de gadolínio (nomeadamente a sua carga global negativa e baixa lipofilicidade) sendo assim previsível que a velocidade de permeação seja semelhante.

Foram preparados LUV's com diferentes concentrações de CBF encapsulada (1, 2, 5 e 10 mM) segundo o procedimento descrito na secção 2.5, tendo-se incubado alíquotas de LUV's contendo CBF à temperatura de 40 °C, 50 °C e 60 °C. A quantificação das amostras de CBF foi realizada através da análise da intensidade de fluorescência (I_F) das diferentes amostras, após rotura dos LUV's por adição do surfactante Triton X-100 à concentração final de 1 w/v %. Este último passo é necessário pois a elevadas concentrações a intensidade de fluorescência da CBF é diminuída devido a auto-supressão. A rotura dos LUV's conduz a uma diluição da CBF por um fator superior a 100x, passando assim a sua fluorescência a ser diretamente proporcional à sua concentração. Para garantir a linearidade entre a intensidade de fluorescência e a concentração de CBF, a absorção ao comprimento de onda de excitação foi mantida em valores inferiores a 0.1. Os espectros de absorção UV-Vis foram geralmente obtidos através de um espectrofotómetro Unicam UV530 e os espectros de emissão de fluorescência foram efetuados num fluorímetro Cary Eclipse. Alternativamente foi também utilizado o leitor de placas SpectraMax iD5, neste caso com placas de 96 poços com um fundo transparente para permitir a leitura da absorção e paredes negras adequadas à leitura de fluorescência.

Para o cálculo das diferentes velocidades de permeação, realizou-se o ajuste da equação 2 aos resultados experimentais obtidos.

$$I_F(t) = I_F(\infty) + \{I_F(0) - I_F(\infty)\}e^{-kt} \quad (2),$$

2.7 Experiência de Permeação

Para o estudo da permeação dos complexos de gadolínio sintetizados, utilizou-se os LUV's com o complexo pretendido encapsulado. Para tal, aquando da preparação dos lipossomas, estes foram hidratados com uma solução de 1 mM de complexo.

Para a obtenção de LUV's contendo apenas complexo encapsulado no seu conteúdo aquoso interior, após o processo de extrusão apresentado na secção 2.5, os LUV's foram passados por duas colunas de exclusão Sephadex G-25 de 5 mL em série, previamente equilibradas com tampão PBS (10 mM de Na_2HPO_4 , 150 mM de NaCl ambos adquiridos à Sigma Aldrich e 0.02% de NaN_3 adquirida à Fluka, com pH ajustado a 7.4).

Com o auxílio de uma seringa de 1 mL, injetou-se a solução de LUV's na coluna. A amostra eluída foi recolhida em tubos de vidro. Através desta técnica cromatográfica, as moléculas menores, neste caso o complexo não encapsulado, ficam retidas nos poros da fase estacionária, enquanto as moléculas de maiores dimensões, ou seja, os LUV's contendo complexo encapsulado são excluídos primeiramente da coluna. Após a recolha dos LUV's, dilui-se esta fração até perfazer o volume necessário às restantes etapas desta experiência.

2.7.1 Preparação das amostras para a caracterização da velocidade de saída do complexo encapsulado nos LUVs

A solução de LUV's contendo complexo encapsulado foi dividida em várias alíquotas de 200 μ L em eppendorfs de 1.5 mL. Estas foram incubadas a diferentes temperaturas (40 °C, 50 °C e 60 °C), retirando-se uma alíquota a determinado tempo, durante aproximadamente duas semanas. As alíquotas retiradas foram sujeitas a cromatografia de exclusão, utilizando-se colunas Sephadex G-25 de 0.5 mL. Aplicou-se 120 μ L da solução de LUV's na coluna e centrifugou-se a 1500 g durante 2 minutos. À primeira fração recolhida deu-se o nome de fração L, esta continha os LUV's com complexo encapsulado, ou seja, o complexo que não permeou as membranas. Seguidamente, adicionou-se 120 μ L de tampão fosfato, recolhendo-se a fração intermédia entre a saída dos LUV's e do complexo que permeou a membrana. As frações correspondentes ao complexo que permeou a membrana, nomeadas de fração X Y e Z, foram recolhidas adicionando-se 3 alíquotas de 300 μ L de tampão PBS à coluna. De acordo com a otimização da separação das colunas com a CBF, as duas frações mais relevantes para a quantificação do composto são a L e a X. Desta forma, estas foram analisadas por ICP-MS.

2.7.2 Análise por ICP-MS

A técnica analítica ICP-MS analisa múltiplos elementos recorrendo a espectrometria de massa utilizando plasma acoplado indutivamente como método de ionização. O plasma formado é de Árgon e encontra-se a elevadas temperaturas. Este irá ionizar os elementos da amostra após dessolvatação, vaporização e atomização destes. Os iões são separados de acordo com a sua razão

carga/massa e quantificados através do detetor, obtendo-se a sua concentração na amostra. A fonte de íons do aparelho de ICP-MS é muito sensível à concentração de sais, pois pode ocorrer entupimento do cone e danificar o aparelho, tolerando-se apenas concentrações até 100 mmol/L destes na amostra. De modo a favorecer a dissolução do metal em análise e a estabilização das amostras é adicionada a cada solução 2% de ácido nítrico.^{50,51}

A calibração para a análise das diferentes amostras é efetuada através de soluções padrão preparadas previamente com uma concentração conhecida. Para este trabalho, o padrão utilizado para detetar a concentração dos íons de gadolínio em cada amostra é conhecido como terras raras, tendo-se preparado seis soluções com uma concentração conhecida deste. As amostras para análise foram preparadas em falcons de 15 mL. Às frações L e X recolhidas após a centrifugação no processo de separação dos LUVs e solução aquosa externa (ver seção 2.7.1) adicionou-se água desionizada até perfazer um volume de 5 mL e 102 µL de HNO₃ ultrapuro. A concentração de gadolínio presente em cada amostra obteve-se através da análise por ICP-MS, utilizando um aparelho iCAP Q.

2.7.3 Caracterização da velocidade de permeação

A velocidade de permeação (k) foi calculada a partir do ajuste da equação 3 à variação no tempo para a concentração de Gd encapsulado e na solução aquosa externa dos LUV's (frações L e X, respetivamente) das soluções de LUV's com complexo encapsulado incubadas a diferentes temperaturas:

$$C(t) = C(\infty) + \{C(0) - C(\infty)\}e^{-kt} \quad (3),$$

onde $C(0)$, $C(t)$ e $C(\infty)$ correspondem à concentração de Gd no início da experiência, ao tempo t e quando se atinge o equilíbrio. Esta equação parte do princípio de que todos os LUV's são equivalentes, ou seja, que têm todos o mesmo tamanho e que possuem apenas uma bicamada lipídica.

2.8 Determinação do Coeficiente de Partição

Como o objetivo de estudar a interação dos compostos sintetizados com as membranas biológicas, foram realizadas várias técnicas. As diferentes metodologias permitem a determinação da constante de partição entre a fase aquosa e bicamadas lipídicas (K_p), tendo sido utilizadas vesículas unilamelares grandes (LUV's) como sistemas modelo de biomembranas.

2.8.1 Calorimetria de Titulação Isotérmica

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica analítica utilizada para medir o calor associado a interações moleculares, ou seja, o calor absorvido ou libertado devido à interação. Uma das vantagens desta técnica é a possibilidade de obter através de uma única experiência o valor da constante de associação e a variação da entalpia (ΔH) associada à interação, sendo assim possível determinar o perfil termodinâmico completo do processo de ligação. As interações mais comumente estudadas através desta técnica são proteína-proteína, proteína-ligando, proteína-DNA, proteína-lípido e enzima-inibidor. Para o objetivo em estudo nesta dissertação, a interação estudada foi lípido-ligando. Uma vez que o lípido não possui locais de ligação específicos, ao contrário das proteínas, é possível obter-se a variação de entalpia de partição e a constante de partição através de modelos matemáticos.^{52,53}

O aparelho possui duas células idênticas, uma para a referência e outra para a amostra, revestidas por uma câmara adiabática, e uma seringa de precisão para injetar a solução na célula da amostra. Ambas as células são monitorizadas de forma a manter o equilíbrio térmico ao longo da titulação, ou seja, de forma que a diferença de temperatura entre as duas células seja próxima de zero. A experiência de titulação ocorre titulando a solução da seringa para a solução que se encontra na célula. A injeção da solução na célula e consequente interação entre as moléculas leva a que ocorra uma diferença de temperatura entre a célula que contém a amostra e a de referência. O calor trocado durante a interação corresponde à energia que é necessária para o equipamento repor o equilíbrio térmico após a injeção.⁵⁴

Durante este trabalho todas as titulações foram realizadas num aparelho VP-ITC da MicroCal™, com um volume de 1436 μL na célula de reação. A temperatura das titulações foi de 37 °C, a velocidade de injeção de 1 $\mu\text{L s}^{-1}$, a velocidade de agitação foi de 307 rpm e a potência da

referência de 10 $\mu\text{cal s}^{-1}$. A primeira injeção foi de 4 μL e as restantes de 10 μL , perfazendo um total de 29 injeções.

Todas as amostras tituladas foram desgasificadas durante 15 minutos, de modo a torná-las livres de bolhas de ar. As amostras de Gd-DOTA foram colocadas na célula e as de lípido na seringa.

Os termogramas adquiridos nas diferentes titulações foram posteriormente integrados utilizando o software *Origin 7.0* com a extensão da *MicroCal*. O calor previsto $q(i)$ no passo (i) da titulação foi calculado através da equação 4,

$$q(i) = \Delta H \left(n_{\text{Gd-DOTA}}^i - n_{\text{Gd-DOTA}}^{i-1} \left(1 - \frac{V_i}{V_{\text{cell}}} \right) \right) + q_{\text{dil}} \quad (4),$$

em que V_i corresponde ao volume injetado, V_{cell} é o volume da célula, ΔH é a entalpia molar da interação, n^i é o número de moles de complexo ligado após a injeção i e q_{dil} corresponde ao calor de diluição.

O melhor ajuste do modelo aos resultados experimentais foi realizado através da minimização do quadrado dos desvios entre o calor obtido experimentalmente e o previsto, tendo em consideração todas as injeções da titulação, à exceção da primeira.

2.8.2 Relaxometria

O estudo da contribuição paramagnética para as velocidades de relaxação T_1 e T_2 foi realizado num relaxómetro Bruker Minispec mq20 (20 MHz, $B_0=0.47$ T), a 37 °C. Foram adquiridos os tempos de relaxação dependendo da concentração de ligando em tampão PBS 10 mM a pH=7.4, obtendo-se o valor da velocidade de relaxação longitudinal e transversal.

Para a determinação do K_p realizaram-se duas experiências independentes, tendo-se calculado o valor T_1 e T_2 para todas as amostras em estudo. A concentração de complexo manteve-se ao longo de ambas as experiências, uma em 0.1 mM e outra em 0.2 mM, tendo-se variado a concentração de LUV's. Para a concentração de Gd-DOTA-C8 0.1 mM, as concentrações de LUV's foram de 0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM e 5 mM. Quando a concentração de complexo foi de 0.2 mM, as concentrações de LUV's foram de 0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM. Estas foram realizadas inicialmente com LUV's de POPC e, posteriormente, com LUV's com 90% POPC e 10% DDAB.

2.8.3 Anisotropia de Fluorescência

O processo de luminescência é caracterizado pela emissão de radiação de uma determinada substância quando esta regressa do seu estado excitado ou seu estado fundamental. O regresso ao estado fundamental pode ocorrer por duas vias diferentes, relaxação não radiativa e relaxação radiativa. A relaxação radiativa do estado singleto excitado para o estado singleto fundamental denomina-se por fluorescência.

A anisotropia de fluorescência (r) é uma propriedade que depende da orientação e mobilidade dos fluoróforos. Quando estes apresentam uma elevada mobilidade, a sua orientação muda significativamente durante a permanência no estado excitado, e a anisotropia de fluorescência é próxima de zero. Por outro lado, se estes não mudarem de orientação durante o tempo de vida do estado excitado, a anisotropia de fluorescência é elevada, podendo apresentar valores positivos ou negativos conforme a orientação relativa da transição electrónica de excitação e de emissão. Para um dado fluoróforo, a anisotropia de fluorescência depende assim da viscosidade do meio em que se encontra e do tamanho da estrutura/macromolécula à qual está associado. Esta técnica é utilizada para caracterizar interações do fluoróforo com proteínas ou membranas lipídicas, podendo também ser utilizada para caracterizar a fluidez das membranas. Nas experiências de anisotropia a amostra é excitada com luz polarizada verticalmente. O vetor eléctrico da radiação de excitação é orientado paralelamente ao eixo dos zz e a intensidade de emissão é medida após passagem por um polarizador. Quando o polarizador de emissão é orientado paralelamente ao vetor eléctrico de excitação, a intensidade observada é designada por I_{\parallel} . Por outro lado, quando o polarizador se encontra orientado perpendicularmente ao vetor eléctrico de excitação, a intensidade é denominada de I_{\perp} . Através dos valores de intensidade é calculado o valor de anisotropia pela seguinte equação:

$$r = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}} \quad (6),$$

em que G corresponde ao fator geométrico dependente da sensibilidade do equipamento à luz polarizada vertical e horizontalmente. Este é definido como $G=I_{\parallel}/I_{\perp}$.

A anisotropia é uma medida adimensional independente da intensidade total da amostra. Isto ocorre porque a diferença $I_{\parallel} - I_{\perp}$ é normalizada pela intensidade total, $I_T=I_{\parallel} + 2I_{\perp}$.^{55,56}

O estudo de anisotropia de fluorescência foi realizado com LUV's de DPPC, preparados de acordo com o procedimento descrito na secção 2.5, os MLV's foram hidratados com tampão HEPES (4-(2-hidroxiétil)-1-piperazinaetanosulfónico ácido). A sonda de fluorescência utilizada foi o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), numa proporção sonda lípido de 1:99.

Antes de se iniciar o estudo da anisotropia a diferentes temperaturas, calculou-se o fator G, obtendo-se um valor de 1.16 ao par de comprimentos de onda de excitação/emissão, xxx/425 nm. Para cada amostra realizaram-se três rampas de temperatura, duas de aquecimento e uma de arrefecimento, tendo-se variado a temperatura entre 39 °C e 45 °C. Os valores obtidos foram ajustados utilizando uma distribuição normal e a equação de uma reta:

$$r(T) = (C^{te} + mT) + \omega \times \int \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\left(\frac{T-\mu}{2\sigma^2}\right)^2} \quad (7),$$

Onde o termo mT representa a variação da anisotropia com a temperatura para membranas lipídicas numa determinada fase, μ e σ são o valor médio e a largura de uma distribuição normal, representando a temperatura de transição e a largura da transição de fase que ocorre na membrana lipídica quando a temperatura é alterada. As variáveis C^{te} e ω são parâmetros de escala que permitem à função de ajuste uma adaptação ao caso em estudo, representando respectivamente a anisotropia para $T=0$ e a amplitude de variação de anisotropia devido à transição de fase.

As medições de anisotropia foram realizadas num fluorímetro Cary Eclipse, com polarizadores automáticos.

2.9 Dispersão Dinâmica de Luz

A Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) é uma técnica não invasiva que permite medir o tamanho das partículas ou moléculas em suspensão. Esta mede a velocidade das partículas em movimento Browniano, ou seja, o movimento aleatório contínuo das partículas em suspensão. A velocidade é dependente do tamanho das partículas, sendo tanto maior quanto mais pequena for a partícula em suspensão.

O potencial zeta é considerado como o potencial eletrocinético em sistemas coloidais, ou seja, o potencial entre a camada dupla interfacial e o meio de dispersão. A dupla camada é formada quando uma partícula com carga superficial suspensa num fluido é rodeada de contra iões de carga oposta à da superfície da partícula. À medida que a partícula se vai movendo na solução, o plano além do qual os contra iões não se movem junto com a partícula é designado como plano deslizante. O potencial zeta corresponde ao potencial elétrico no plano deslizante.^{57,58}

Com o objetivo de caracterizar a interação do complexo metálico com as membranas lipídicas, foi avaliado o seu efeito no tamanho e potencial zeta dos lipossomas. Foram realizados vários ensaios com 0.1 mM de POPC e diferentes concentrações de Gd-DOTA-C8 em tampão HEPES.

O diâmetro dos LUV's e o potencial zeta foram caracterizados por DLS utilizando o equipamento Malvern Nano ZS.

2.10 Estudo Preliminar da Quantificação do Gd-DOTA

Com o objetivo de quantificar o íon Gd^{3+} complexado com DOTA através de técnicas mais acessíveis e presentes no laboratório do grupo de Química Biológica, como por exemplo absorção UV-visível, foram realizados vários ensaios com o corante XO. O objetivo destes ensaios foi avaliar se era possível dissociar o complexo em Gd^{3+} livre mais DOTA conseguindo assim a quantificação do Gd^{3+} por associação ao XO. Assim, o pH das soluções contendo complexo Gd-DOTA foi acidificado por adição de HCl, sendo posteriormente acertado para pH=5.5 já na presença de XO. A associação do Gd^{3+} ao DOTA é termodinamicamente mais estável que a associação ao XO, sendo de esperar que no equilíbrio o complexo Gd-DOTA seja predominante. No entanto, é de esperar que a interação com o DOTA ocorra mais lentamente, podendo assim observar-se a formação de Gd-XO para tempos intermédios.

Nestes o tampão ácido acético/acetato de sódio foi substituído pelo tampão de pH MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) por este apresentar uma melhor capacidade tampão ao valor de pH final pretendido, pH=5.5.

Numa primeira abordagem, foram efetuadas várias experiências para a quantificação do complexo Gd-XO, nomeadamente o efeito de uma acidificação prévia da solução. Foi também seguido o desaparecimento do complexo Gd-XO devido à adição de DOTA, obtendo assim informação relativamente à velocidade de dissociação do Gd-XO e de associação do Gd com o DOTA. Os resultados obtidos foram ajustados com o valor da constante de dissociação obtido através da seguinte equação 9.

$$K_d = \frac{1}{K_b} = \frac{[Gd][XO]}{[Gd-XO]} \quad (8),$$

$$[Gd-XO]^2 - [Gd-XO]([XO]_T + [Gd]_T + K_d) + [XO]_T[Gd]_T = 0 \quad (9),$$

Capítulo 3:

Resultados e Discussão

3.1 Síntese dos ligandos DOTA-C4 e DOTA-C8

Os ligandos DOTA-C4 e DOTA-C8 foram sintetizados e purificados consoante o procedimento descrito nas secções 2.1.1 e 2.1.2, respetivamente. Os espetros de RMN a seguir analisados foram adquiridos após terem sido encontradas as condições ideais de concentração, pH e solvente da amostra.

Os dados obtidos confirmam terem sido sintetizados os derivados do DOTA pretendidos. Devido ao facto de os dois derivados possuírem uma estrutura semelhante, apenas diferenciando-se pelo número de carbonos da cadeia alquílica, os espetros de RMN conseqüentemente serão similares. Desta forma, faremos uma discussão mais pormenorizada apenas para o DOTA-C4.

3.1.1 Síntese do DOTA-C4

Pela análise do espetro de ^1H (Figura 3.1) do ligando DOTA-C4, verificou-se a presença de um tripleto na zona de maior blindagem, a δ 0.95 ppm, referente à ressonância dos prótons do grupo CH_3 da cadeia alquílica. O duplete presente a δ 3.41 ppm corresponde à ressonância do próton da abertura do anel anidrido. O multiplete a δ 3.18 ppm é referente aos CH_2 que se encontram entre o grupo carboxílico e o carbono carbonilo. Os desvios característicos do anel do DOTA e o do grupo CH_2 próximo à amina encontram-se entre δ 1,86 e 2.95 ppm. Esta ideia foi corroborada através da comparação dos espetros obtidos com o trabalho de Bernhard et al.⁴⁴

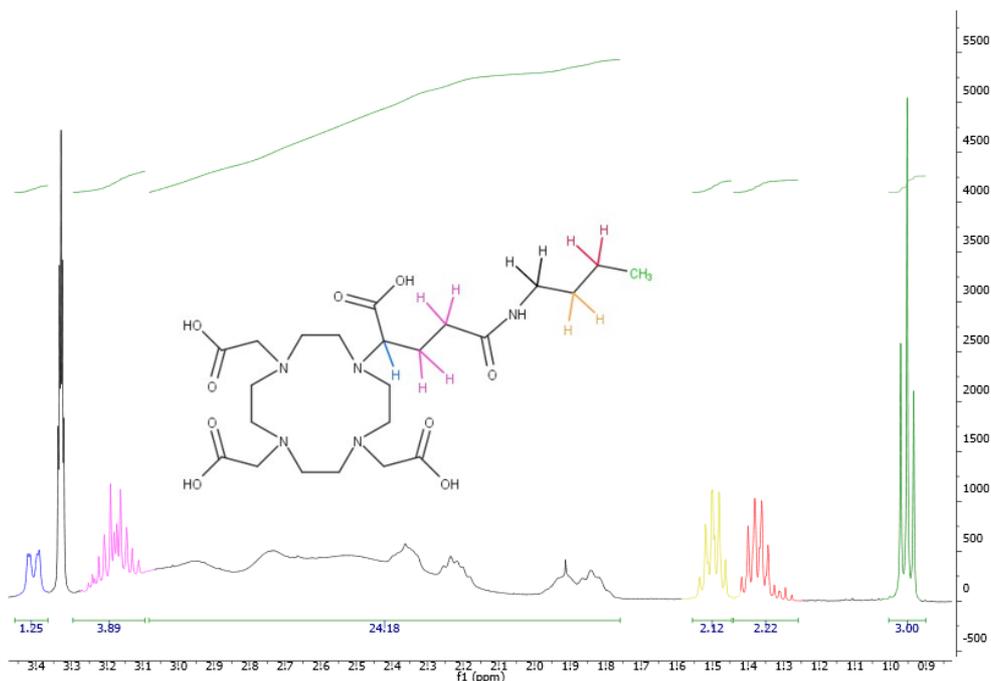


Figura 3.1 - Espectro de RMN ¹H do Gd-DOTA-C4.

Através da análise do espectro de RMN ¹³C (Figura 3.2) foi possível visualizar os picos característicos dos carbonos dos ácidos carboxílicos numa zona de maior desblindagem, a δ 179.89 ppm. O carbono carbonilo junto ao grupo amina apresenta desvio químico de δ 176.37 ppm. Os picos referentes aos carbonos da cadeia alquílica encontram-se com desvios químicos em campo baixo. Os carbonos relativos ao anel do DOTA estão presentes na zona de δ 50-60 ppm.

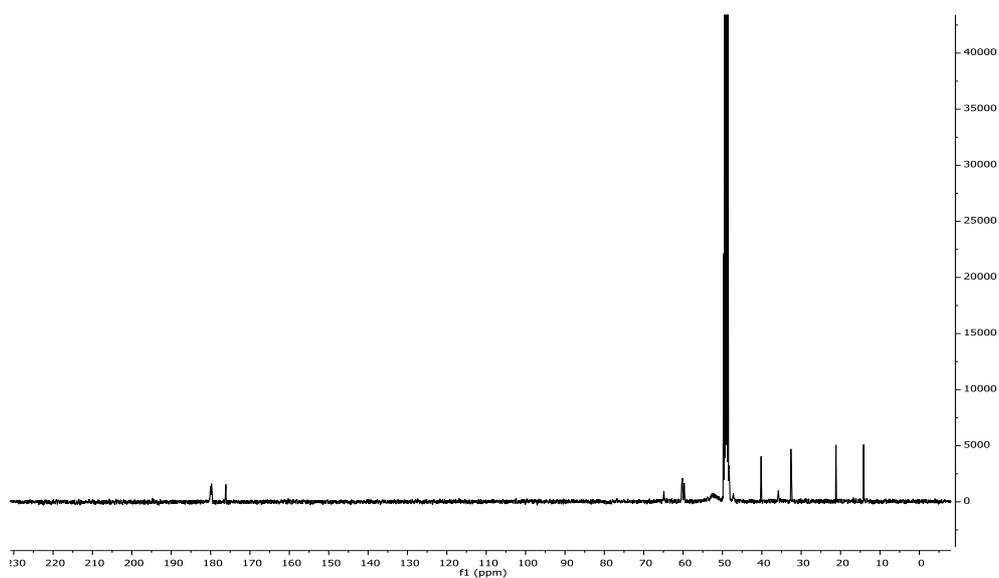


Figura 3.2 - Espectro de RMN ¹³C do Gd-DOTA-C4.

De modo a confirmar a estrutura do composto e a aquisição realizada anteriormente, foram obtidos os espectros bidimensionais HSQC e HMBC.

Com a obtenção do espectro HSQC foi possível visualizar os acoplamentos diretos $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$. Através da figura 3.3 observou-se os acoplamentos da cadeia alquílica numa zona de campo alto, à exceção do grupo CH_2 próximo ao grupo amina que se encontra numa zona mais desprotegida. Relativamente aos grupos CH_2 que se encontram entre o carbono carbonilo e o grupo carboxílico, verificou-se que estes se encontram ligados diretamente, com desvio químico próximo de δ 3.18 ppm no espectro de ^1H . O duplete a δ 3.41 ppm encontra-se diretamente ligado ao carbono com desvio químico a δ 63.5 ppm, que se encontra próximo ao grupo carboxílico e ao anel do DOTA.

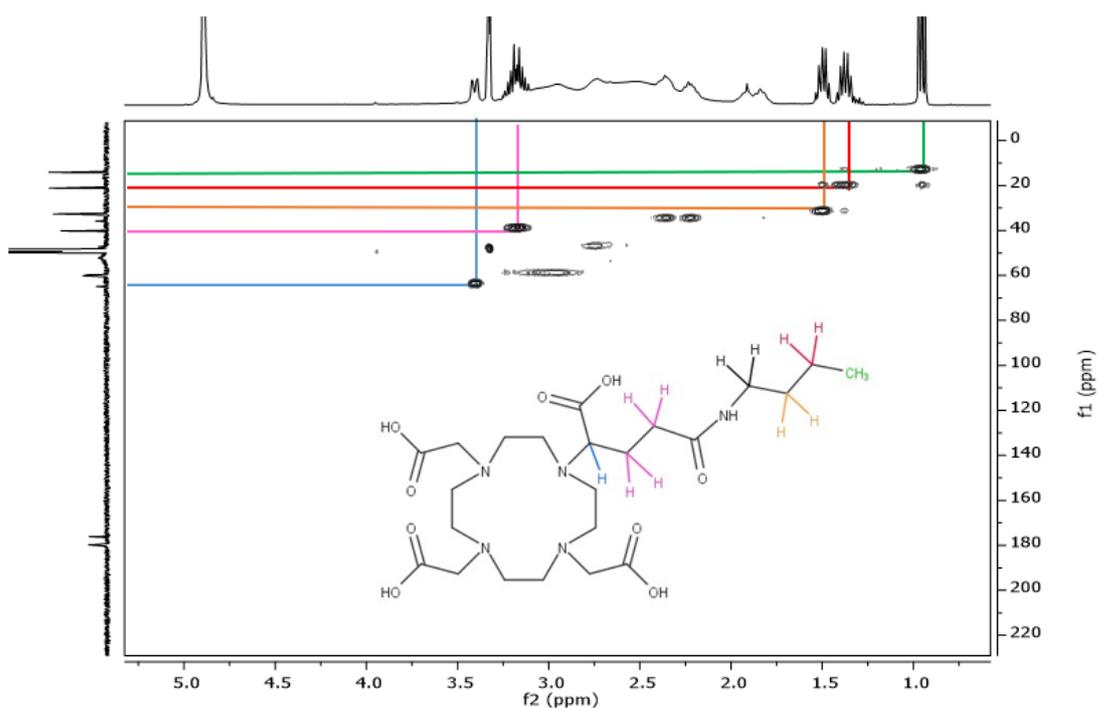


Figura 3.3 - Espectro de RMN bidimensional HSQC do DOTA-C4. O mapa de isolinhas corresponde à correlação entre os átomos de carbono e hidrogénio ligados covalentemente. Os espectros de ^1H - e ^{13}C - RMN encontram-se na abcissa e na ordenada, respetivamente.

Com a obtenção do espectro HMBC, foi possível verificar os acoplamentos $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ numa distância até três ligações. Através da figura 3.4 observou-se os acoplamentos dos grupos CH_2 com o carbono carbonilo junto à amina.

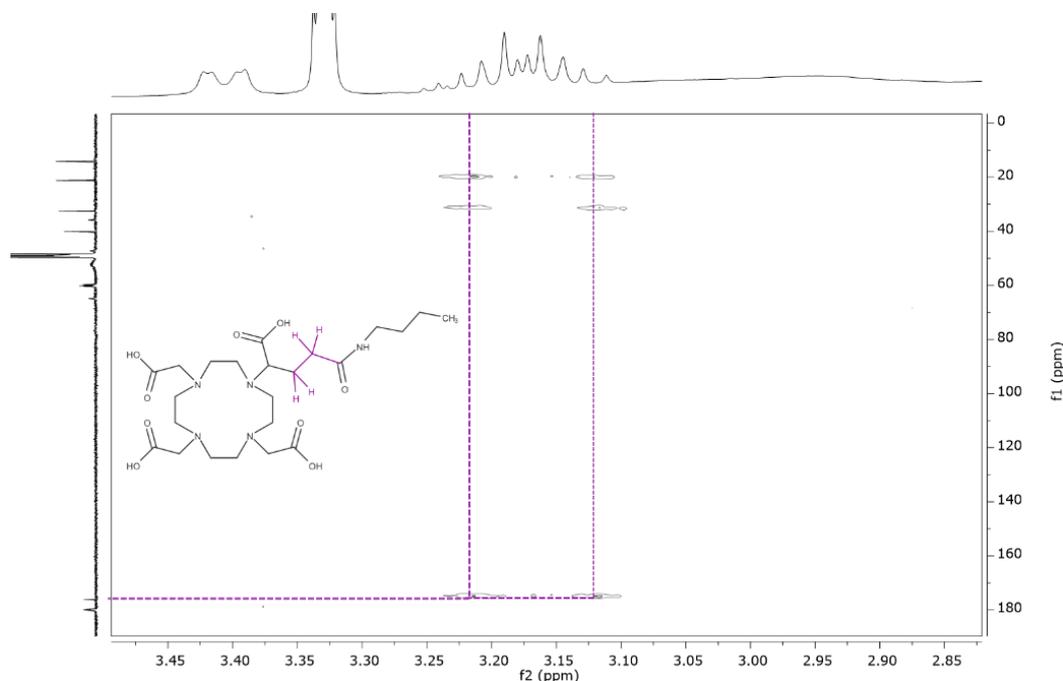


Figura 3.4 - Espectro de RMN bidimensional HMBC do DOTA-C4. O mapa de isolinhas corresponde às correlações a longa distância entre os átomos de carbono e hidrogênio. Os espectros de ^1H - e ^{13}C - encontram-se na abcissa e na ordenada, respetivamente.

3.1.2 Síntese do DOTA-C8

Tendo por base a aquisição realizada anteriormente para o DOTA-C4, analisou-se o espectro de RMN ^1H do DOTA-C8 (figura 3.5). Através deste é possível observar os prótons característicos da cadeia alquílica, numa zona de menor blindagem. O singleto a δ 3.5 ppm corresponde ao pico característico do próton da abertura do anel anidrido. O multiplete em δ 3.21 ppm refere-se aos prótons dos grupos CH_2 entre o grupo carboxílico e o carbono carbonilo. Os prótons do anel do DOTA encontram-se entre δ 1.91 e 3.06 ppm. Desta forma, concluiu-se que a reação ocorreu e originou o ligando pretendido.

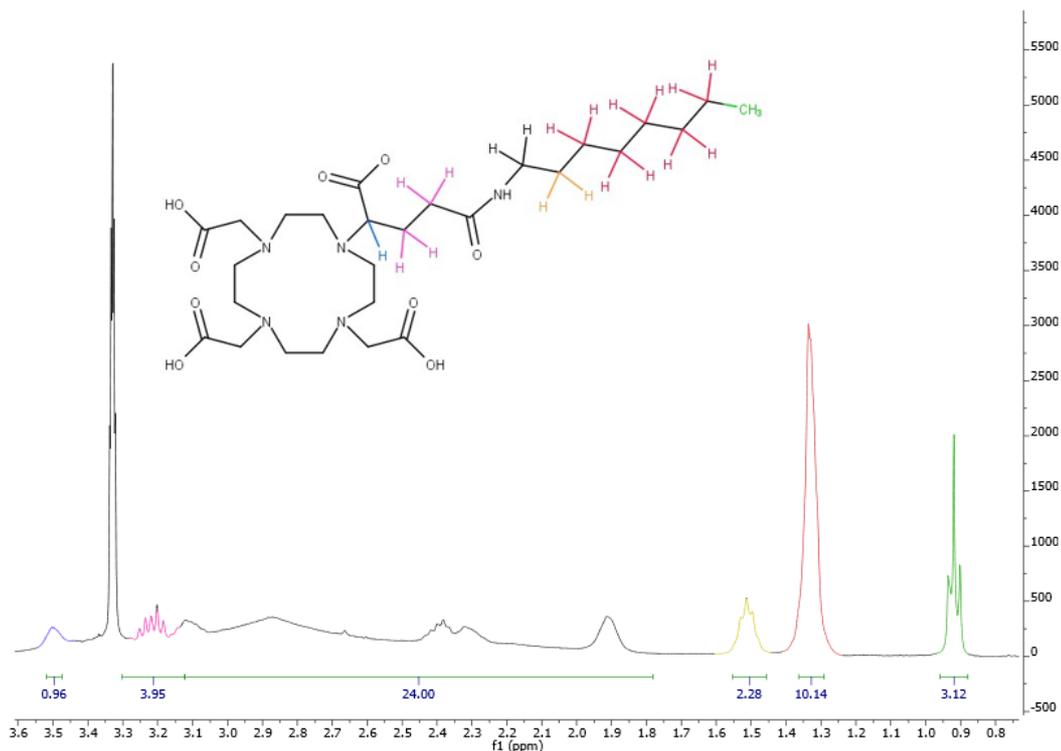


Figura 3.5 - Espectro de RMN ^1H do DOTA-C8.

3.1.3 Síntese do DOTA-C4 assistida por radiação micro-ondas

Realizou-se a síntese do DOTA-C4 assistida por radiação micro-ondas (MO) de forma a aumentar o rendimento e diminuir o tempo de reação face à síntese convencional. Após a realização da reação de síntese, obteve-se o espectro de RMN ^1H em metanol deuterado (figura 3.6, espectro a azul). Comparando este último com o espectro de RMN ^1H obtido na síntese convencional, verificou-se que o produto da reação não é o mesmo. Através da figura 3.6 observou-se os picos característicos da cadeia alquílica em ambos os espectros. No entanto, na síntese assistida por radiação MO (espectro azul) não se observou o singuleto característico da abertura do anel anidrido. Os grupos CH_2 entre o grupo carboxílico e carbono carbonilo também não se observam neste espectro. Ou seja, a abertura do anel pode não ter ocorrido e a butilamina poderá ter-se ligado a um ácido carboxílico do anel do DOTA.

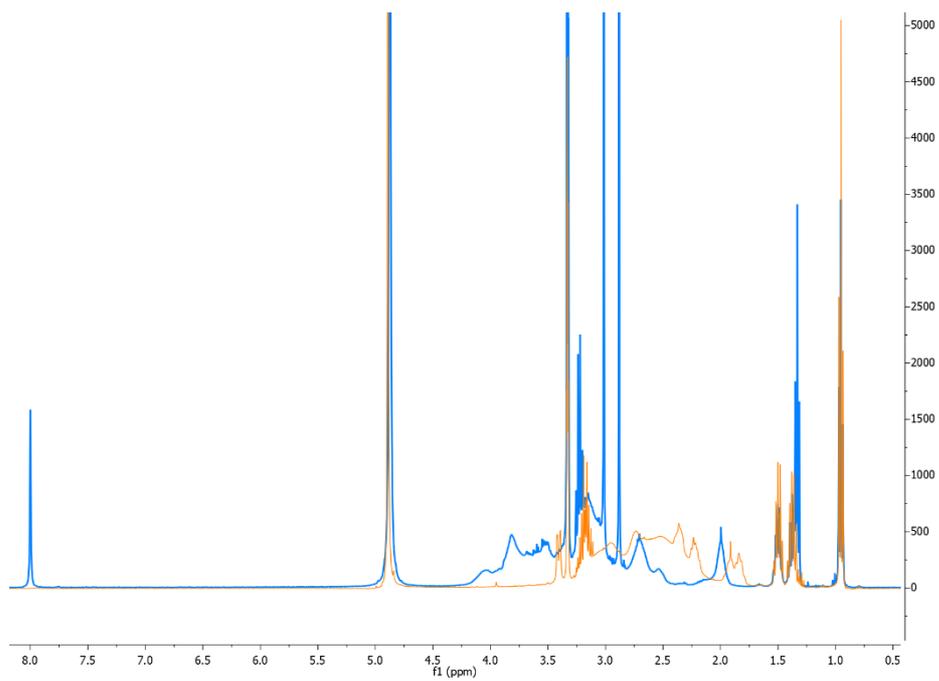


Figura 3.6 - Espectros de RMN ¹H do DOTA-C4 referente à síntese assistida por radiação MO (azul) sobreposto com o obtido na síntese convencional (laranja).

3.2 Estudo de Permeação da CBF

Como já referido na secção 2.6, a carboxifluoresceína (CBF) apresenta carga global negativa e baixa lipofilicidade semelhante ao Gd-DOTA, sendo espectável que ambos apresentem baixas velocidades de permeação. Desta forma, realizaram-se diversos estudos com esta sonda e as membranas biológicas, com o objetivo de otimizar o protocolo a seguir na caracterização da permeação do Gd-DOTA e derivados sintetizados neste trabalho. Como a permeação é lenta, é possível fazer a separação entre o compartimento interno e externo dos LUVs, permitindo assim seguir a permeação da molécula de interesse.

Começou-se por obter o perfil de separação entre os LUVs e a fase aquosa externa utilizando colunas de exclusão (figura 3.7). A um dos ensaios foi adicionado LUV's contendo CBF na fase aquosa interna e externa, com a adição de 1 w/v % de Triton-X após a centrifugação, e num outro ensaio apenas CBF livre. As diferentes alíquotas analisadas correspondem a centrifugações sucessivas após a adição de tampão PBS, conforme descrito na secção 2.7.1.

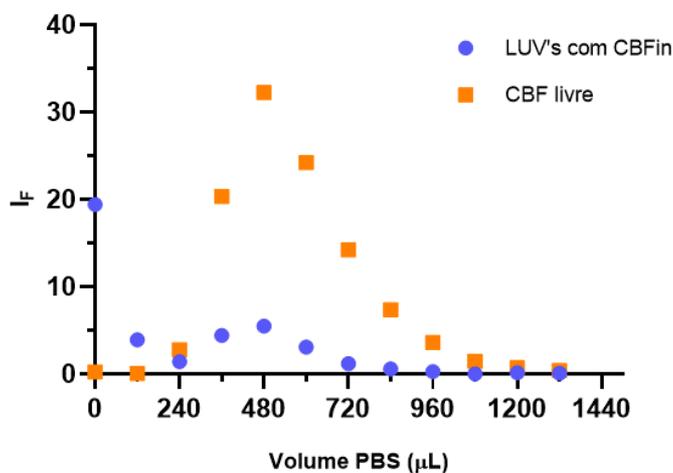


Figura 3.7 - Intensidade de fluorescência da CBF em função do volume de PBS adicionado, após aplicação de 120 μL de LUV's com CBF (●) ou de 120 μL de CBF em PBS (■), a colunas de exclusão Sephadex G-25 de 0.5 mL.

Através da figura 3.7 foi possível visualizar que, como previsto, os LUV's são excluídos da coluna maioritariamente na primeira centrifugação (volume 0, correspondendo apenas ao volume de amostra adicionado à coluna), havendo uma pequena quantidade a sair após a segunda centrifugação. A CBF livre começou a sair da coluna apenas após a adição de 240 μL de tampão PBS, sendo que a maior quantidade de sonda é eluída com a adição de 480 μL de tampão PBS.

Desta forma, foi possível delinear a experiência de permeação sabendo que através destas colunas seria possível separar a CBF que permeou a membrana da que ainda se encontrava

encapsulada nos LUV's. Permitindo uma posterior análise de ambas as frações e a determinação da velocidade de permeação da CBF.

A primeira experiência de permeação foi realizada com uma concentração de CBF de 10 mM em LUV's preparados com 10 mM de POPC. Várias alíquotas de LUVs em que foi previamente removida a CBF na fase aquosa exterior, foram incubados à temperatura de 60 °C, e a tempos pré-selecionados uma alíquota foi retirada e caracterizada relativamente à fração de CBF encapsulada e na fase aquosa exterior.

Na figura 3.8 estão representados os resultados obtidos para a CBF encapsulada nos LUV's (gráfico A, ●) e a CBF na fase aquosa exterior (gráfico B, ●). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 2. Após a separação na coluna de exclusão, as amostras de LUVs foram incubadas com o detergente Triton X-100 de forma a romper as membranas e libertar a CBF. Este processo é necessário pois a concentração local de CBF no interior dos LUVs é muito elevada conduzindo a extinção da fluorescência da CBF.

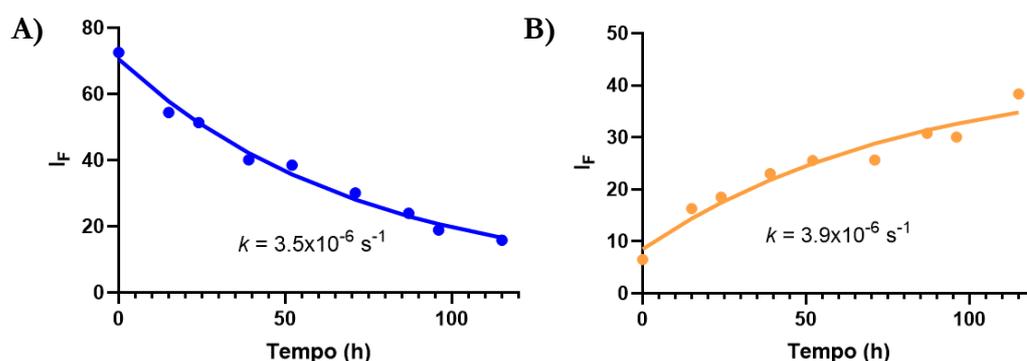


Figura 3.8 - Evolução da quantidade de CBF encapsulada no interior dos LUVs (gráfico A, ●) e a CBF na fase aquosa exterior (gráfico B, ●), com o tempo de incubação dos LUVs a 60 °C. As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 2, conduzindo aos valores de constante de velocidade de permeação indicados na figura.

Após o ajuste dos resultados obtidos com a equação 2, obteve-se o valor da constante de velocidade de permeação quando o processo é seguido através de ambas as frações. Como se verifica pela figura 3.8, os valores obtidos para as constantes de velocidade são semelhantes. Deste modo, para as restantes condições discutir-se-ão apenas os resultados da fração que continha os LUV's com a CBF encapsulada (denominada de fração L), uma vez que apresenta um melhor ajuste da equação.

Com o mesmo procedimento, uma segunda experiência foi realizada com diferentes concentrações de CBF (1 mM, 2 mM, 5 mM e 10 mM) encapsulada em LUV's de 10 mM de POPC, a uma temperatura de incubação de 60 °C. Na figura 3.9 A encontram-se representados os resultados obtidos da variação da quantidade de CBF encapsulada ao longo do tempo para as diferentes

concentrações em estudo. A figura 3.9 B e na tabela 3.1 correspondem aos valores obtidos da velocidade de permeação em função das concentrações de CBF.

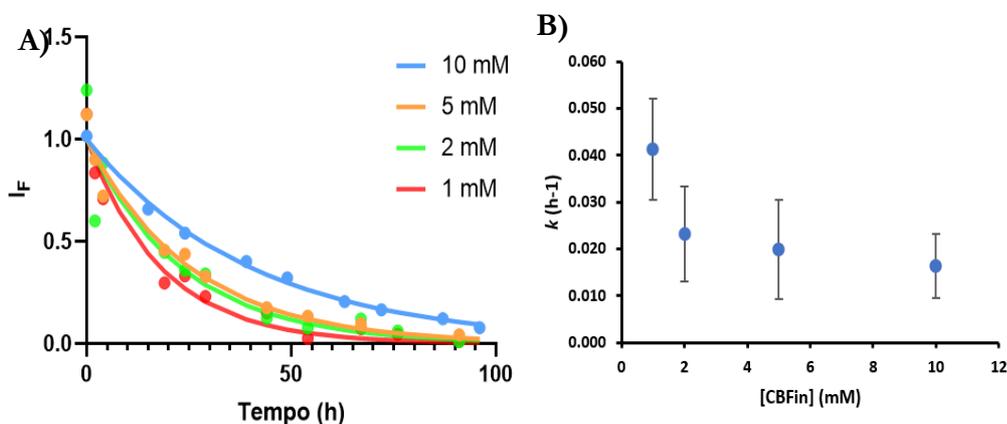


Figura 3.9 - Evolução da quantidade de CBF encapsulada no interior dos LUV's, a diferentes concentrações e temperatura de incubação de 60 °C (gráfico A, ●). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 2, conduzindo aos valores de constante de velocidade de permeação indicados na tabela 3.1. Variação das velocidades de permeação obtidas pelo ajuste do gráfico A em função da concentração de CBF (gráfico B, ●).

Tabela 3.1 - Valores da velocidade de permeação para as diferentes concentrações em estudo, em h-1 e s-1 e respetivo desvio padrão.

Concentração de CBF (mM)	k (10^{-2} h^{-1})	k (10^{-6} s^{-1})	Desvio Padrão
1	4.1	11	0.011
2	2.3	6.4	0.023
5	2.0	5.5	0.020
10	1.6	4.5	0.016

Através da figura 3.9 e da tabela 3.1 observa-se que velocidade de permeação variou consoante a concentração de CBF incubada nos LUV's. De acordo com os valores obtidos, verificou-se que há uma diminuição da velocidade de permeação com o aumento de concentração de CBF, isto poderá dever-se à formação de agregados em concentrações superiores da sonda fluorescente.

Foi realizado um segundo estudo em que se manteve a concentração de CBF constante (10 mM) e variou-se a temperatura de incubação, tendo-se incubado as alíquotas a 40 °C, 50 °C e 60 °C. Os resultados encontram-se representados na figura 3.10 e na tabela 3.2.

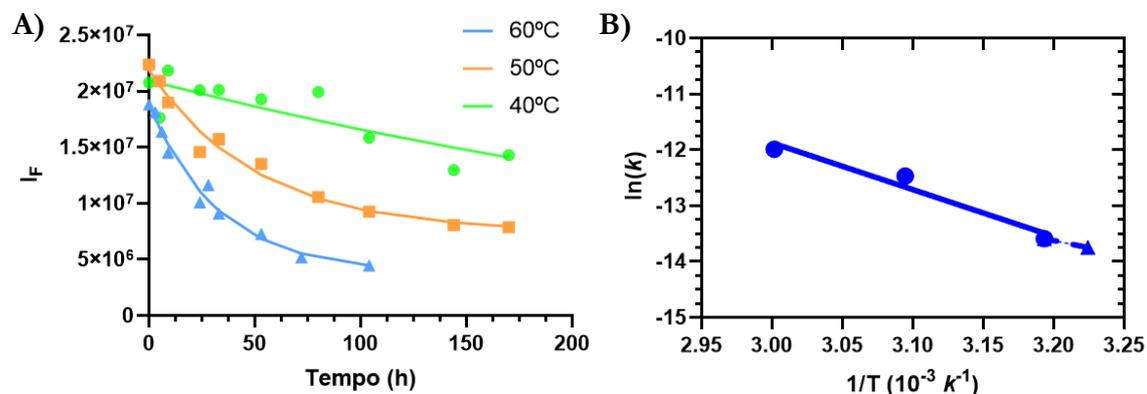


Figura 3.10 - Evolução da quantidade de CBF encapsulada no interior dos LUV's, a diferentes temperaturas de incubação (gráfico A, ●). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 2, conduzindo aos valores de constante de velocidade de permeação indicados na tabela 3.2. Regressão linear da equação de Arrhenius dos dados obtidos no gráfico A) e extrapolação para 37 °C (gráfico B, ●).

Tabela 3.2 - Valores obtidos das velocidades de permeação da CBF às diferentes temperaturas de incubação.

Temperatura (°C)	k (10^{-6} s^{-1})
60	4.5
50	3.3
40	2.1
37	1.1

De acordo com os resultados apresentados na figura 3.10 e na tabela 3.2, verificou-se para temperaturas mais altas a CBF permeou a membrana com uma velocidade superior, havendo uma diminuição da velocidade de permeação para valores mais baixos de temperatura. Através da regressão linear com a equação de Arrhenius foi possível extrapolar o valor da constante para a

temperatura de 37 °C, obtendo-se um valor de $1.1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Os resultados apresentados na figura 3.10 e na tabela 3.2 foram obtidos em colaboração com uma aluna de rotação do Mestrado em Química Medicinal.

Com este procedimento foi possível otimizar o método de separação das colunas de exclusão utilizadas, permitindo uma maior certeza para a delimitação do estudo da permeação do Gd-DOTA e seus derivados.

3.3 Permeação do Gd-DOTA

O estudo da permeação do Gd-DOTA foi realizado mantendo constante a concentração do complexo encapsulado nos LUVs (1 mM) e variando a temperatura de incubação. As diferentes alíquotas foram incubadas a 40 °C, 50 °C e 60 °C, tendo-se posteriormente extrapolado o valor da constante de permeação para a temperatura de 37 °C. Os resultados apresentados na figura 3.11 correspondem à fração L, ou seja, à que contém Gd-DOTA encapsulado em LUVs de POPC. A concentração do complexo metálico foi quantificada através da técnica analítica ICP-MS.

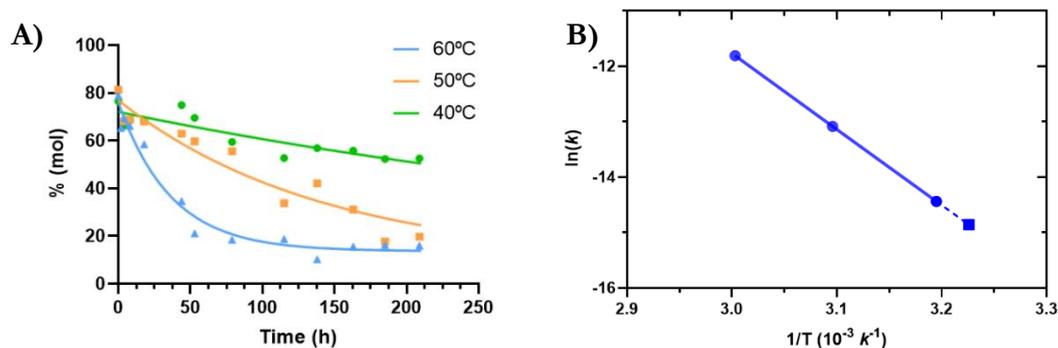


Figura 3.11 - Evolução temporal da % do Gd-DOTA encapsulado nos LUV's de POPC quando incubado à temperatura de 40, 50 ou 60 °C (gráfico A, ●). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 3 (secção 2.7.3), conduzindo aos valores de constante de velocidade de permeação indicados na tabela 3.3. Regressão linear da equação de Arrhenius dos dados obtidos no gráfico A e extrapolação para 37 °C (gráfico B).

Tabela 3.3 – Valores da velocidade de permeação do Gd-DOTA às diferentes temperaturas de incubação.

Temperatura (°C)	k (10^{-6} s^{-1})
60	7.4
50	2.1
40	0.54
37	0.35

Tal como esperado e observado no estudo da permeação da CBF, a velocidade de permeação aumenta com a aumento de temperatura. O valor da velocidade de permeação obtido para o Gd-DOTA foi mais baixo que para a CBF. Isto poderá dever-se à hidrofobicidade de ambos os compostos, o valor do LogD para o DOTA é de -13.83, enquanto para a CBF o LogD é -7.42, ambos a pH=7.4. Para além disso, a elevada densidade de carga do ião gadolínio tem efeito no aumento da polaridade do complexo, levando a uma baixa lipofilicidade do Gd-DOTA (LogP = -4.5). Os valores de LogD e Log P foram determinados para pH=7.4 com o auxílio do software MarvinSketch.

Futuramente será relevante repetir este procedimento com os derivados do DOTA sintetizados, de modo a perceber se com a introdução da cadeia alquílica e aumento da lipofilicidade, se verifica um aumento na velocidade de permeação dos novos complexos. Estas experiências não foram possíveis de realizar devido a uma avaria no aparelho de ICP-MS nos meses antecedentes à entrega desta dissertação. Tentou-se encontrar uma metodologia alternativa para a quantificação do Gd-DOTA, consoante descrito na secção 2.10, no entanto esta não foi bem sucedida conforme discutido na secção 3.6.

A partir da constante de velocidade obtida para a permeação e do raio médio dos LUV's, é possível calcular o coeficiente de Permeabilidade (P_{app}), equação 10:⁵⁹

$$P_{app} = \frac{kr}{3} \quad (10),$$

Desta forma, para a temperatura de 37°C, o coeficiente de permeabilidade obtido é de $5.8 \times 10^{-13} \text{ cm/s}$. Este valor é bastante baixo, revelando a dificuldade do composto em permear a

bicamada. Como comparação, para um fármaco ser eficientemente absorvido ao nível intestinal, o seu coeficiente de permeabilidade através das membranas celulares deve ser superior a 10^{-7} cm/s.⁶⁰

3.4 Caracterização da Partição do Gd-DOTA-C8

Com o objetivo de estudar a afinidade dos compostos sintetizados na secção 2.1 com as membranas biológicas, utilizaram-se diferentes metodologias. Começou-se pelo estudo do Gd-DOTA-C8, uma vez que é o que tem uma maior lipofilicidade, esperando-se que seja o que apresente uma maior afinidade para com a bicamada.

3.4.1 Calorimetria de Titulação Isotérmica

O estudo da interação do complexo sintetizado Gd-DOTA-C8 com LUVs de POPC e de uma mistura de POPC e DDAB numa proporção de 99:1 foi primeiro realizado utilizando a técnica de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). Para tal, realizaram-se diversas titulações com diferentes concentrações de ligando (0.2 mM ou 0.5 mM de Gd-DOTA-C8) na célula do ITC, e com uma concentração de lípido de 20 mM na seringa do ITC. Os LUVs vão funcionar como titulante, sendo que a sua concentração na célula vai aumentando ao longo da titulação. Nos termogramas obtidos verificou-se que o calor libertado aquando das injeções de LUVs na solução de Gd-DOTA era muito pequeno (figura 3.12), indicando que ou a afinidade do complexo para com a membrana é muito baixa ou a interação não é acompanhada de uma variação significativa de calor. Seja qual for a razão não foi possível determinar o valor do K_p .

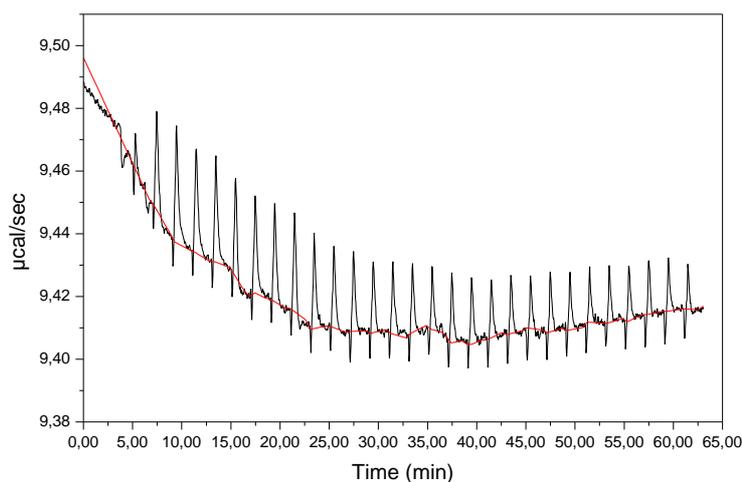


Figura 3.12 - Termograma obtido na titulação de 0.2 mM de Gd-DOTA-C8 com 20 mM de POPC+DDAB, representando as trocas de calor associadas às injeções da mistura de lípidos na célula contendo o complexo metálico.

Na figura 3.12 encontra-se representado o termograma da titulação de 0.2 mM de Gd-DOTA-C8 com LUV's contendo uma mistura de lípidos de 90% POPC e 10% DDAB. A adição de um lípido catiónico ao POPC, que é zwitteriônico, teve como objectivo aumentar a afinidade do Gd-DOTA-C8, pois este tem uma carga global negativa.

Uma das razões possíveis para a baixa afinidade observada é a formação de agregados de complexo às concentrações utilizadas nas titulações, 0.2 e 0.5 mM. Desta forma, calculou-se a variação do calor de diluição do complexo com a concentração do mesmo, realizando-se uma titulação em que se colocou tampão PBS na célula e 5 mM de Gd-DOTA-C8 na seringa. O termograma obtido e o respetivo ajuste utilizando a equação 5 encontram-se representados na figura 3.13.

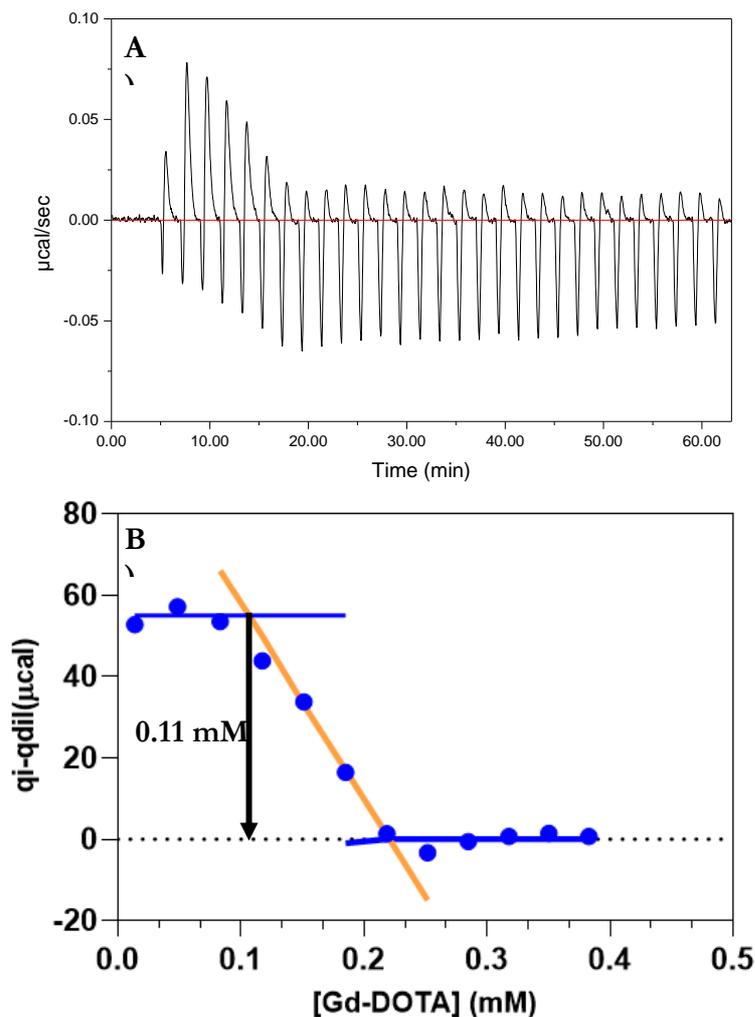


Figura 3.13 – Variação do calor de diluição de uma solução de Gd-DOTA-C8 a 37 °C. A) Termograma obtido, representando as trocas de calor associadas a injeções consecutivas de Gd-DOTA-C8 na célula contendo PBS; B) Ajuste do calor por injeção obtido a partir da integração do termograma mostrado em A, após subtração do calor de diluição observado nas últimas injeções.

Através do termograma da figura 3.13 A, observou-se que nas primeiras injeções a adição de complexo conduz a um aumento da potência fornecida pelo equipamento para manter a temperatura constante, o que indica que a interação foi endotérmica. À medida que se aumenta a concentração de complexo na célula (aumento do volume injetado), ocorre uma diminuição do calor absorvido durante a injeção, até que a partir da sétima injeção este manteve-se constante. Na figura 3.13 B encontra-se representado o calor correspondente a cada injeção de complexo, após a subtração do calor de diluição constante obtido nas últimas injeções, em função da concentração de Gd-DOTA-C8. Através do ajuste dos resultados obtidos foi possível determinar a concentração de agregação crítica (CAC), ou seja, a concentração a partir da qual o complexo Gd-DOTA-C8 forma

agregados. O valor obtido para a CAC foi de 0.11 mM, indicando que de facto o complexo estaria agregado nas experiências de titulação com os LUVs.

3.4.2 Determinação dos tempos de relaxação T_1 e T_2

Através da contribuição paramagnética de T_1 e T_2 do complexo Gd-DOTA-C8 estudou-se a interação deste com a biomembrana de POPC e DDAB, 99:1, variando a concentração de complexo e a de lípido. Os resultados obtidos, para as duas experiências independentes, não apresentaram uma variação significativa do valor da relaxividade com a adição de LUV's, não permitindo o cálculo do valor do K_p .

Calculou-se o valor de T_1 e T_2 para diferentes concentrações de complexo em PBS e a 37 °C, obtendo-se o valor da velocidade de relaxação para cada concentração. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 3.14 e na tabela 3.4.

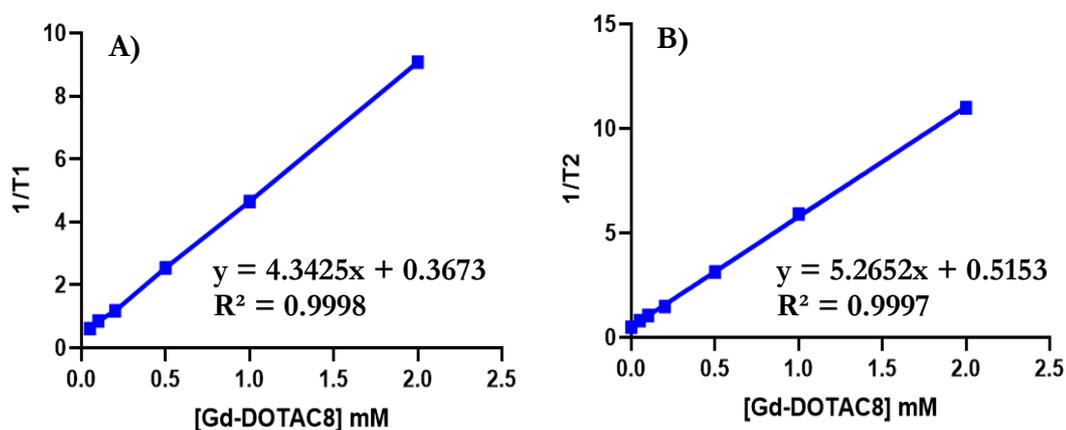


Figura 3.14 - Regressão linear dos valores obtidos para os valores de $1/T_1$ (A) e $1/T_2$ (B). O declive das retas corresponde ao valor da relaxividade (r_1 e r_2) para o complexo Gd-DOTA-C8.

Tabela 3.4 - Comparação dos valores de relaxividade obtidos para o Gd-DOTA-C8 com os presentes na literatura para o Gd-DOTA, à mesma temperatura.

Complexo	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Gd-DOTA	3.3 ⁶¹	4.1 ⁶²
Gd_DOTA-C8	4.3	5.3

Comparando os valores obtidos de relaxividade do Gd-DOTA-C8 com o valor da relaxividade do Gd-DOTA, verificou-se um aumento de ambos os valores, longitudinal e transversal, para o complexo sintetizado, estando de acordo com o aumento de tamanho da molécula. Este aumento pode dever-se simplesmente à presença do grupo alquilo ou devido à formação de pequenos agregados por parte do Gd-DOTA-C8. Estes estudos mostram, no entanto que os eventuais agregados não podem ter um tamanho muito grande, mesmo para concentrações muito superiores à CAC obtida por ITC. Ou seja, os agregados formados são provavelmente de pequenas dimensões e, ao contrário do equipamento de ITC, o relaxómetro não tem sensibilidade suficiente para os detetar.

3.4.3 Efeito na temperatura de transição de fase da membrana

Uma outra técnica utilizada para a determinação do valor do K_p foi através do efeito da presença de soluto no valor da temperatura de fusão (T_m) da membrana. Este parâmetro pode ser determinado por anisotropia de fluorescência. A sonda utilizada neste estudo foi o DPH (figura 3.15), cujo fluoróforo se localiza na região das cadeias acilo da membrana lipídica.⁶³

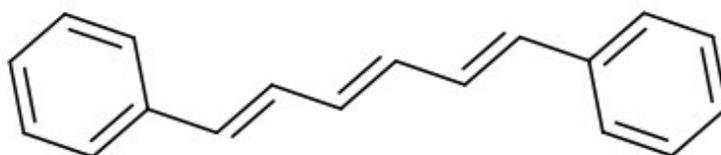


Figura 3.15 - Estrutura do DPH. Adquirida através do software MarvinSketch.

A rampa de temperatura representada na figura 3.15 mostra a comparação entre a variação da anisotropia de fluorescência do DPPC – DPH (0.5 mM) na presença e ausência de complexo Gd-DOTA-C8. O decréscimo acentuado do valor de anisotropia observado corresponde à transição da fase gel para a fase líquida do DPPC. Os resultados obtidos permitiram calcular o valor da T_m para ambas as soluções, através do ajuste da equação 7 (secção 2.8.3).

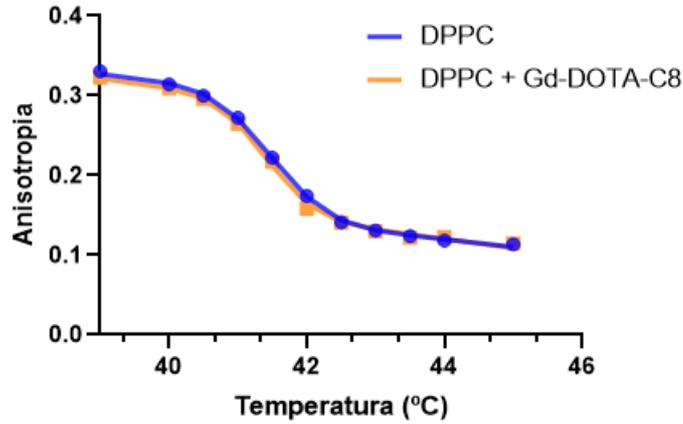


Figura 3.16 - Anisotropia de fluorescência do DPH em 0.5 mM DPPC e tampão HEPES, numa proporção sonda lípido de 1:99. A concentração de Gd-DOTA-C8 foi de 0.5 mM.

De acordo com os resultados obtidos, não se observou diferenças muito significativas na transição de fase da biomembrana na presença do complexo metálico. O valor da T_m para o DPPC foi de 41.5 °C o que está de acordo com os valores apresentados na literatura.⁶⁴ Na presença de Gd-DOTA-C8 obteve-se o valor de 41.4 °C. Apesar da diferença ser muito pequena e ter por isso uma elevada incerteza associada, procurou-se calcular a que valor de K_p correspondente a esta diminuição de 0.1 °C. Para isso foi usada a equação 11, que se baseia na equação de van't Hoff para o abaixamento do ponto de fusão devido à presença de substâncias estranhas:⁶⁵

$$\Delta T = - \frac{RT_m^2}{\Delta H_m^0} \frac{K^{\frac{n}{N}}}{[H_2O] + K^{\frac{n}{N}}[DPPC]} [Gd - DOTA - C8] \quad (11),$$

onde T_m e ΔH_m corresponde à temperatura de transição e entalpia de transição do lípido na ausência de soluto, respetivamente, e $K^{\frac{n}{N}}$ é coeficiente de partição do soluto em termos de fração molar. Calculou-se o valor de $K^{\frac{n}{N}}$ através da equação 11 obtendo-se um valor de 522, sabendo-se que a ΔH_m para o DPPC é de 3.4 kJ/mol.⁶⁶

O valor da constante de partição em termos do volume da fase aquosa e lipídica (K_p) pode ser calculado a partir da razão das frações molares do complexo presente na membrana e na fase aquosa ($K^{\frac{n}{N}}$), através da equação 12:

$$K^{\frac{n}{N}} = \frac{\frac{n_{AL}}{n_L}}{\frac{n_{AW}}{n_W}} = \frac{\frac{n_{AL}}{V_L} \bar{V}_L}{\frac{n_{AW}}{V_W} \bar{V}_W} = K_p \frac{\bar{V}_L}{\bar{V}_W} \approx K_p \bar{V}_L \times 55.6 \quad (12),$$

em que L corresponde ao DPPC, A ao Gd-DOTA-C8 e W à água.

Desta forma, obteve-se um valor para o K_p de ~ 18 , indicando uma baixa afinidade do complexo Gd-DOTA-C8 para as membranas de DPPC. De notar que incerteza associada a este valor é muito grande, pois tem por base uma diminuição de apenas 0.1 °C na temperatura de transição da membrana de DPPC. Para além disso, a utilização de concentrações de complexo mais elevadas (até 2 mM) não conduziu a maior abaixamento da temperatura de transição.

3.5 Diâmetro e Potencial Zeta dos LUVs

A dispersão dinâmica de luz (DLS) é uma técnica não evasiva que permite determinar o tamanho de partículas em suspensão. Conjugado com a aplicação de uma diferença de potencial à solução, esta técnica permite também determinar o potencial zeta das partículas em suspensão. Desta forma, foi possível seguir estes dois parâmetros com o aumento da concentração de Gd-DOTA-C8 na presença de LUVs de POPC, permitindo perceber se o complexo se está a associar aos LUVs alterando as suas propriedades. Os estudos foram efetuados em tampão HEPES não salino a pH=7.4, a não inclusão de sais tem por objetivo uma maior sensibilidade para a determinação do potencial zeta. Este estudo foi realizado utilizando LUV's de POPC, preparados por extrusão através de filtros com poros de 100 nm de diâmetro. A concentração de POPC foi mantida a 0.1 mM. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Valores do diâmetro e potencial zeta obtidos para soluções contendo diferentes concentrações de Gd-DOTA-C8 e 0.1 mM de POPC em tampão HEPES.

[Gd-DOTA-C8] (mM)	Diâmetro (nm)	Potencial Zeta (mV)
0	110	-9.4
0.1	131	-9.2
0.5	126	-12.9
1	123	-15.0
2	132	-21.5
3	140	-26.6
4.5	127	-21.6

Na ausência de Gd-DOTA-C8, tanto o tamanho como o potencial zeta do POPC encontravam-se dentro dos valores espectáveis. Com a adição de Gd-DOTA-C8 em solução, verificou-se um aumento do tamanho e o potencial zeta tornou-se mais negativo. O aumento de tamanho para as concentrações mais baixas de Gd-DOTA-C8 sugere que houve alguma interação deste com as membranas, esta variação não é linear com o aumento da concentração do complexo, o que se poderá dever a uma saturação da bicamada. A diminuição do potencial zeta com o aumento da concentração de complexo, também sugere associação do Gd-DOTA-C8 (com uma carga global de -1) à membrana, levando a que as membranas apresentem valores mais negativos de potencial zeta.

Apesar dos resultados promissores apresentados acima, quando se caracterizou a solução mais concentrada de Gd-DOTA-C8, verificou-se a presença de agregados com um diâmetro de 644.9 nm e um potencial zeta de -24.6 mV. Fica assim a dúvida se a tendência observada no tamanho e potencial zeta das partículas em solução se deve à interação do Gd-DOTA-C8 com os LUVs ou se corresponde a uma média para os diferentes tipos de partículas em solução (LUVs e agregados de Gd-DOTA-C8).

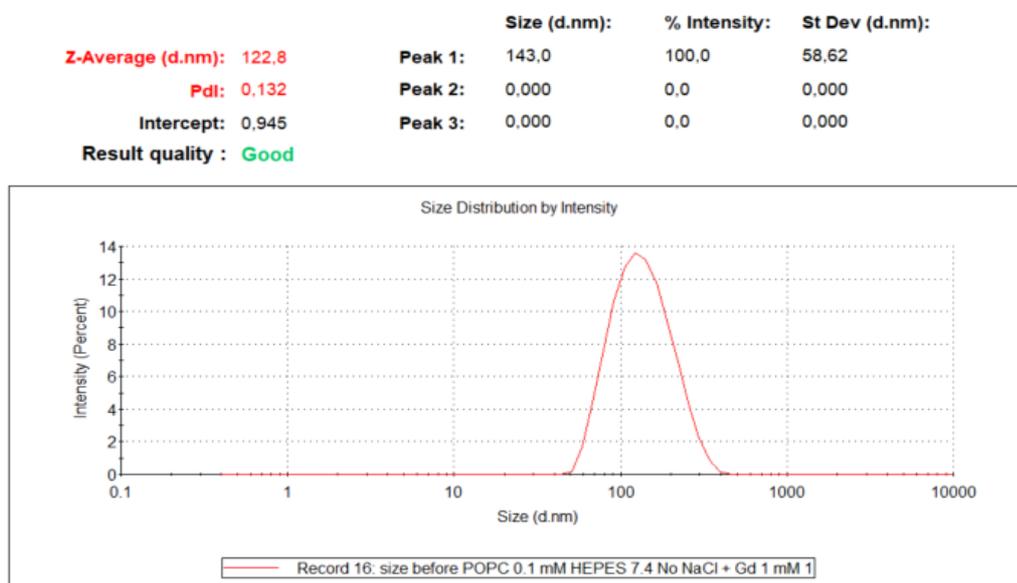


Figura 3.17 - Resultados obtidos para a distribuição de tamanho de uma solução contendo LUVs de POPC a uma concentração de lípido de 0.1 mM, e 1 mM de Gd-DOTA-C8.

3.6 Estudo Preliminar para a Quantificação de Gd^{3+}

O ião Gd^{3+} não absorve radiação na zona do UV-Visível, não sendo desta forma possível quantificá-lo através de técnicas de absorção e fluorescência presentes no laboratório do grupo de Química Biológica. No estudo da permeação do complexo de DOTA, quantificou-se o ião lantanídeo através de ICP-MS (secção 3.3), no entanto esta técnica não está disponível no dia a dia laboratorial e tem um elevado custo. Para além disso o equipamento de ICP-MS disponível na plataforma tecnológica da Universidade de Coimbra avariou encontrando-se indisponível desde o verão deste ano. Desta forma, tentou-se adaptar o método de quantificação do Gd^{3+} com o corante XO utilizado aquando da reação de complexação (secção 2.4) para a quantificação de complexos de Gadolínio. Nestes ensaios utilizou-se tampão MES ($pK_a=6.15$) ao invés de tampão ácido acético ($pK_a=4.75$) / acetato de sódio, por este apresentar melhor capacidade tampão a $pH=5.5$.

Começou-se por realizar um ensaio com diferentes concentrações de $GdCl_3$ mantendo-se a concentração de XO próxima de $20 \mu M$. Os espectros de absorção das soluções de XO com $GdCl_3$ encontram-se apresentadas na figura 3.18.

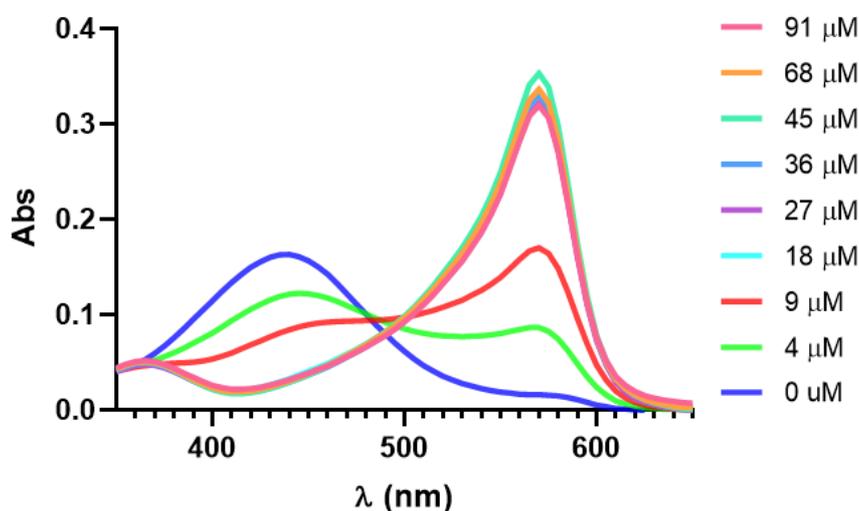


Figura 3.18 - Espectros de absorção das soluções com diferentes concentrações de $GdCl_3$ e cerca de $20 \mu M$ de XO.

Através dos espectros da figura 3.18, observou-se duas bandas com máximos a dois comprimentos de onda, 440 nm e 570 nm. Verificou-se um aumento da absorvância (Abs) ao comprimento de onda de 570 nm e uma diminuição desta a 440 nm, com o aumento da concentração de $GdCl_3$. Isto porque a banda ao comprimento de onda de 440 nm corresponde ao XO livre em solução e a de 570 nm ao XO ligado ao $GdCl_3$.⁴⁹

A variação da absorvância aos dois comprimentos de onda está representada na figura 3.19, juntamente com o melhor ajuste da equação 9 (secção 2.10) que foi obtido para uma constante de dissociação do complexo XO-Gd igual a $K_d=7.6 \times 10^{-3}$.

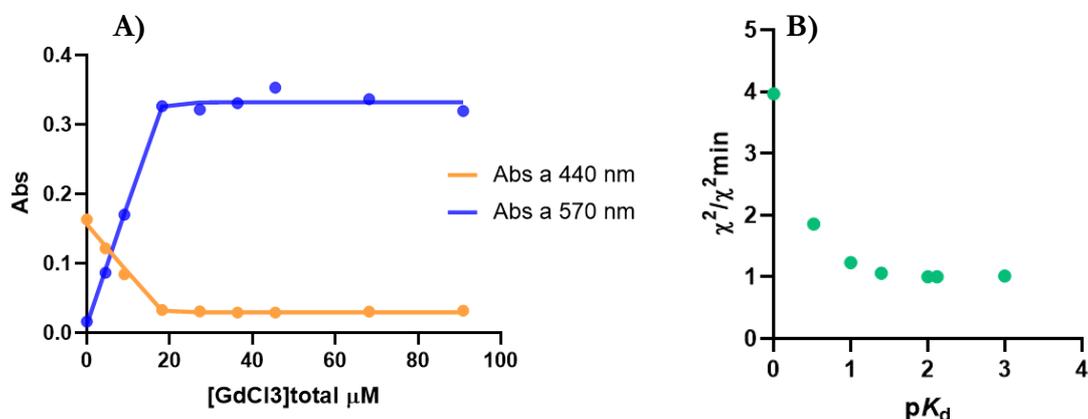


Figura 3.19 - Variação da absorção do XO em função da concentração de GdCl₃, (gráfico A, ●). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 9 aos valores de absorvância obtidos para os comprimentos de onda de 440 nm e 570 nm, em função da concentração total de GdCl₃. B) Variação da soma dos desvios quadrados obtidos para o ajuste dos resultados apresentados em A para diferentes valores da constante de dissociação do XO-Gd (gráfico B).

Pela figura 3.19, verificou-se que a partir de concentrações de GdCl₃ acima de cerca de 20 μM o valor de Abs se manteve constante para ambos os comprimentos de onda. Com isto, concluiu-se que o GdCl₃ se ligou ao XO estequiometricamente, ou seja, para concentrações de GdCl₃ mais altas que as de XO não se verificaram diferenças no valor de Abs, pois não havia mais XO disponível em solução para se ligar ao Gd³⁺. Os resultados apresentados no gráfico A mostram também que a concentração de XO-Gd é essencialmente igual à concentração do composto em menor concentração (GdCl₃ para baixas concentrações ou XO para concentrações elevadas), indicando que o complexo se forma com uma elevada afinidade (baixa constante de dissociação). Para ter uma indicação da confiança associada ao valor de K_d obtido a partir do melhor ajuste, foi feito um estudo da variação da qualidade do ajuste em função do valor de K_d (gráfico B). Os resultados obtidos mostram que a qualidade do ajuste não é significativamente alterada para valores de K_d inferiores a 10⁻² μM ($pK_d > 2$).

O objectivo destes ensaios é avaliar se o XO consegue competir com o DOTA para a ligação ao Gd³⁺. Desta forma repetiu-se este procedimento, mas com a adição de DOTA (em concentração igual à do Gd³⁺) uns minutos antes da adição do XO. Para comparação foi repetida a experiência de

adição do XO ao Gd^{3+} na ausência de DOTA mantendo exatamente todas as restantes condições experimentais. Os resultados encontram-se representados na figura 3.20.

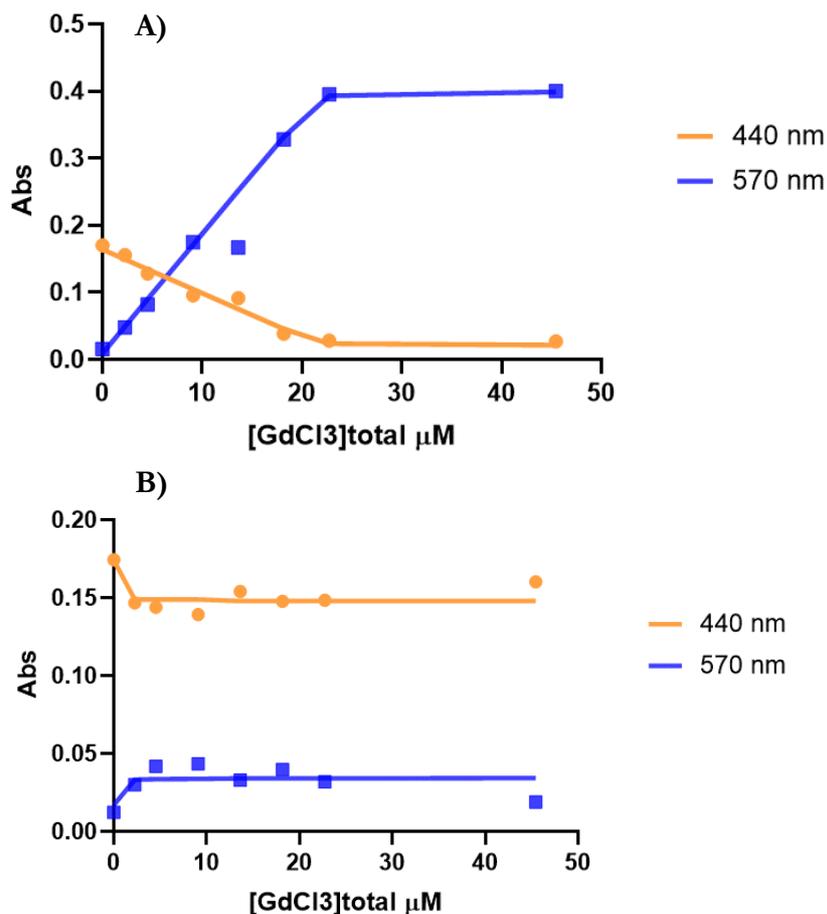


Figura 3.20 - Variação da absorção do XO em função da concentração de $GdCl_3$ na ausência (gráfico A) e na presença de DOTA (gráfico B). As linhas correspondem ao melhor ajuste da equação 9 aos valores de absorvância obtidos para os comprimentos de onda de 440 nm e 570 nm, em função da concentração total de $GdCl_3$.

Os resultados obtidos na ausência de DOTA são equivalentes ao referido anteriormente para a figura 3.19 A.

Na figura 3.20 B observou-se que na presença de baixas concentrações de DOTA o XO compete com este para a ligação ao $GdCl_3$. Para a concentração mais baixa de $GdCl_3$ e DOTA, verificou-se que algum Gd^{3+} se ligava ao XO, havendo a formação de Gd-XO, devido a este se encontrar numa concentração muito superior às dos outros dois compostos. No entanto, para concentrações mais altas de Gd^{3+} e DOTA os valores de absorvância do XO mantiveram-se constantes, indicando que ocorreu a ligação do $GdCl_3$ ao DOTA havendo a formação do complexo Gd-DOTA.

Conforme descrito na secção 2.2, para a reação de complexação foram necessárias ter em atenção diversas condições e um tempo de reação de 24 horas para obter a complexação do Gd^{3+} pelo DOTA. No entanto, nesta experiência verificou-se que a complexação estava a ocorrer em apenas alguns minutos.

Desta forma, tentou-se perceber a cinética de ligação do Gd^{3+} ao DOTA. Começou-se por juntar $GdCl_3$ e XO, adicionando posteriormente DOTA. A experiência foi efetuada a duas temperaturas diferentes, 25 e 37 °C. Os resultados encontram-se representados na figura 3.21.

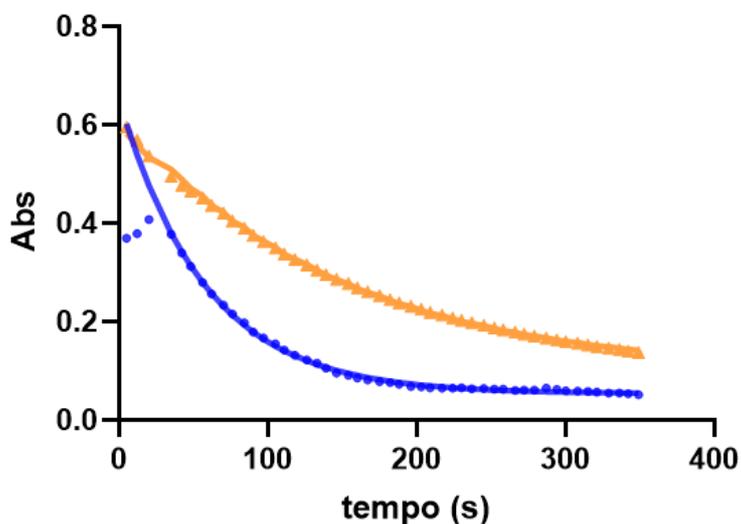


Figura 3.21 - Cinética da transferência do Gd^{3+} do complexo Gd-XO para o complexo Gd-DOTA a uma temperatura de 37 °C (●) e 25 °C (▲), observada através da variação da concentração do Gd-XO medida pela sua absorvância a 570 nm. As linhas correspondem ao melhor ajuste de uma equação mono-exponencial (equação 2, secção 2.6).

Ambas as medições da variação de Abs foram seguidas ao comprimento de onda de 570 nm, visto ser o que apresentava uma maior sensibilidade para a ligação de XO ao gadolínio.

À temperatura de 37 °C a ligação do Gd^{3+} ao DOTA ocorreu mais rapidamente que a 25°C, como já seria espectável. Verificou-se que na experiência a 37 °C houve um aumento da Abs aos primeiros segundos da experiência devido à formação de algum Gd-XO. Esta experiência foi realizada para uma concentração de $GdCl_3$ e DOTA de 50 μM e 20 μM de XO.

Repetiu-se esta experiência com diferentes concentrações de DOTA e de $GdCl_3$ em solução. Mediu-se a cinética de ligação com 50 μM e 100 μM de DOTA e de $GdCl_3$, tendo-se adicionado o DOTA à solução de $GdCl_3$ e 20 μM de XO. Estes estudos foram também seguidos com a adição de água em vez de DOTA, para observar a estabilidade do sinal ao longo do tempo. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 3.22.

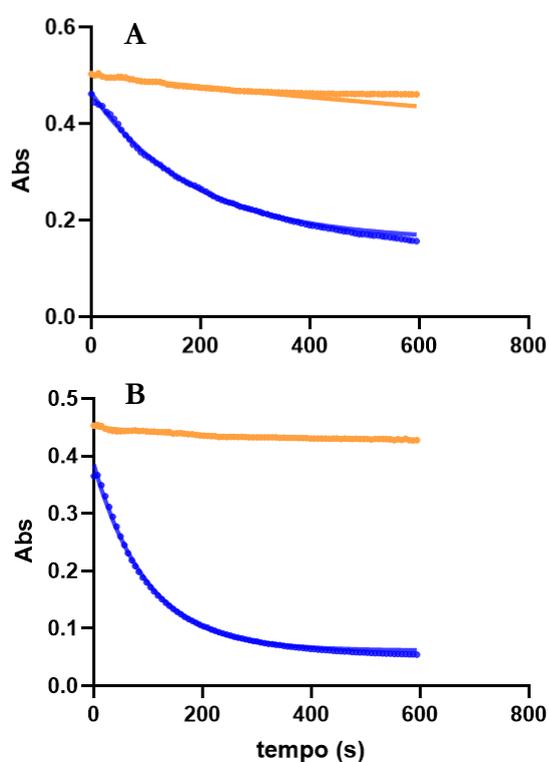


Figura 3.22 -Cinética da transferência do Gd^{3+} do complexo Gd-XO para o complexo Gd-DOTA a uma concentração de 50 μM (gráfico A, ●) e 100 μM de $GdCl_3$ e DOTA (gráfico B, ●), observada através da variação da concentração do Gd-XO medida pela sua absorvância a 570 nm. As linhas correspondem ao melhor ajuste de uma equação mono-exponencial (equação 2, secção 2.6).

Através da figura 3.22 verificou-se que o valor de Abs a 570 nm diminuiu mais acentuadamente para a solução que continha maior concentração de $GdCl_3$ e DOTA. Com o ajuste

da equação 2 foi possível obter o valor da velocidade de formação de Gd-DOTA para a experiência A e B, obtendo-se respectivamente $5.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $4.39 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Com estes valores verifica-se que a formação de complexo metálico ocorre mais rapidamente na presença de maiores concentrações das duas espécies, como seria de esperar.

Uma vez que a dissociação do complexo Gd-DOTA ocorre a pH's ácidos, estudou-se se a acidificação inicial do meio influenciaria a quantificação do íon metálico. Para isso, repetiu-se a experiência A mas acidificando a solução de XO a $\text{pH} = 2$ com HCl, a esta solução foi adicionado $100 \mu\text{M}$ de GdCl_3 e de DOTA. Com o auxílio do injetor incorporado no leitor de microplacas, adicionou-se a esta solução $100 \mu\text{L}$ de tampão MES $\text{pH}=7.4$, de forma que a experiência ocorra a um pH final de 5.5. Os resultados obtidos encontram-se na figura 3.23.

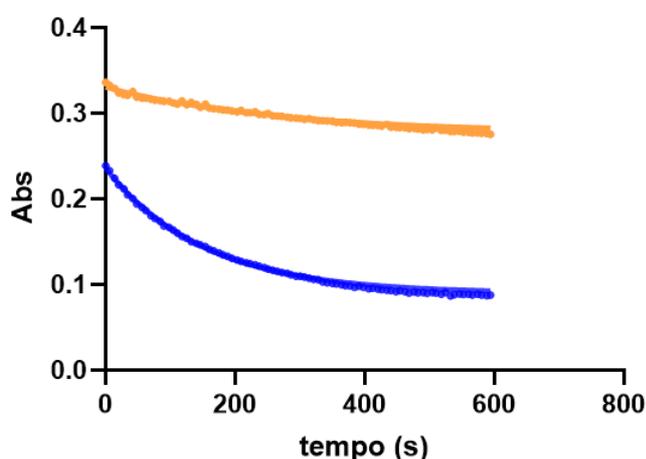


Figura 3.23 - Cinética da transferência do Gd^{3+} do complexo Gd-XO para o complexo Gd-DOTA a uma concentração de $100 \mu\text{M}$ de GdCl_3 e DOTA (●), observada através da variação da concentração do Gd-XO medida pela sua absorvância a 570 nm . As linhas correspondem ao melhor ajuste de uma equação mono-exponencial (equação 2, secção 2.6).

Através do ajuste da equação 2 foi possível obter a velocidade de ligação do Gd-DOTA para esta experiência, tendo-se obtido um valor de $3.74 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Em comparação com o valor obtido para a experiência anterior A, com a acidificação inicial do meio a ligação do Gd^{3+} ao DOTA ocorre mais rapidamente. Para além disso, a $t = 0$, verifica-se que o valor da Abs diminuiu em comparação com o representado na figura 3.22 A. Isto poderá dever-se à protonação do DOTA, facilitando a ligação ao metal. Desta forma, aquando da adição de MES e análise das amostras, algum Gd^{3+} já se havia ligado ao quelato.

Um outro fator estudado foi a influência do valor de pH da solução na ligação de GdCl_3 ao XO. Tendo-se preparado diferentes soluções de $50 \mu\text{M}$ de GdCl_3 e $20 \mu\text{M}$ de XO a $\text{pH} = 2$. O valor do pH da solução foi acertado com HCl, tendo-se posteriormente adicionado diferentes volumes de

tampão MES às diferentes soluções, com o auxílio do injetor do leitor de microplacas, obtendo-se diferentes valores de pH como representado na figura 3.24.

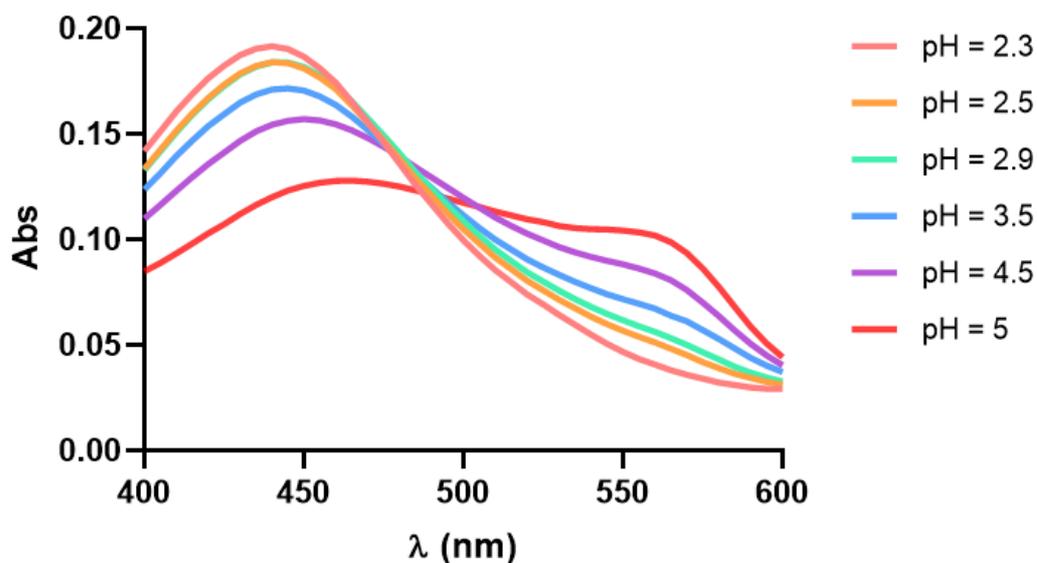


Figura 3.24 - Espectros de absorção das diferentes soluções de 50 μM de GdCl_3 e 18.2 μM de XO, variando-se o pH com adição de HCl e diferentes volumes de tampão MES.

De acordo com a figura 3.24, concluiu-se que para valores de pH mais ácidos a ligação XO-Gd não ocorreu. À medida que o pH aumenta a afinidade do Gd^{3+} ao XO também aumenta, isto observou-se através da diminuição da Abs a 440 nm e do aumento desta a 570 nm, à medida que o pH da solução se torna menos ácido.

Estes resultados foram encorajadores e, posto isto, avançou-se para a experiência de quantificação do íon lantanídeo previamente complexado com DOTA, sendo o objetivo principal desta otimização.

Para tal, prepararam-se soluções com diferentes concentrações de Gd-DOTA em PBS a pH=2 acidificando-se com HCl. Utilizou-se o PBS como tampão de pH pois foi o tampão utilizado para a experiência de permeação do Gd-DOTA. Deixou-se as soluções de Gd-DOTA a este pH durante 1 hora, de forma a ocorrer a descomplexação do metal. Findo este tempo, adicionou-se XO e tampão MES, de modo que o pH final fosse 5. Obtiveram-se os espectros de absorção para as diferentes amostras, como representado na figura 3.25.

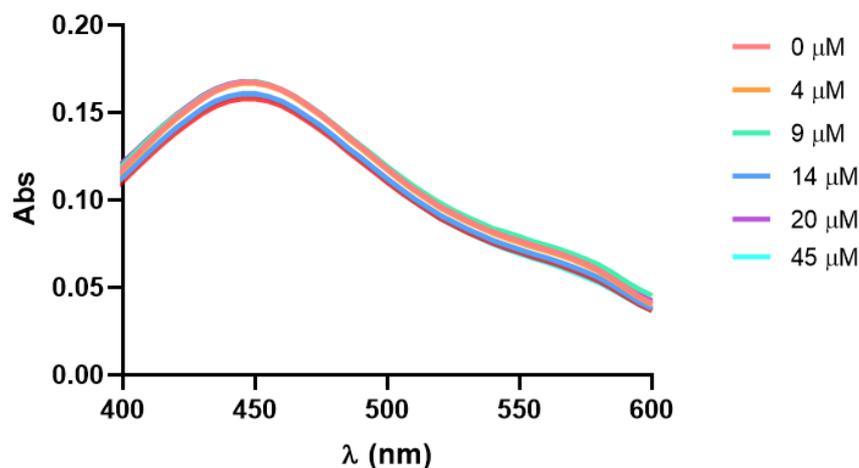


Figura 3.25 - Espectros de absorção das soluções com diferentes concentrações de Gd-DOTA, obtidos após estarem a pH ácido durante 1 h e posterior adição de XO em tampão MES de forma a originar um pH final igual a 5 e uma concentração de XO igual a 20 μM.

Através dos espectros obtidos, observou-se que não ocorreram alterações no valor da Abs em nenhum dos comprimentos de onda em estudo. Isto mostra que não ocorreu a formação de Gd-XO. No entanto, este resultado pode ser devido a uma descomplexação ineficiente do Gd-DOTA. De facto, de acordo com a literatura, a dissociação completa do complexo Gd-DOTA leva cerca de 24 horas quando a pH's próximo de zero.⁶⁷

Uma outra hipótese colocada foi a influência do tampão fosfato em solução. Desta forma, realizou-se um último conjunto de experiências com diferentes concentrações GdCl₃ em tampão PBS ou em água, tendo as amostras sido acidificadas por adição de HCl sendo o pH alterado para 5.5

aquando da adição do XO em tampão MES. Os espectros de absorção obtidos encontram-se representados na figura 3.26.

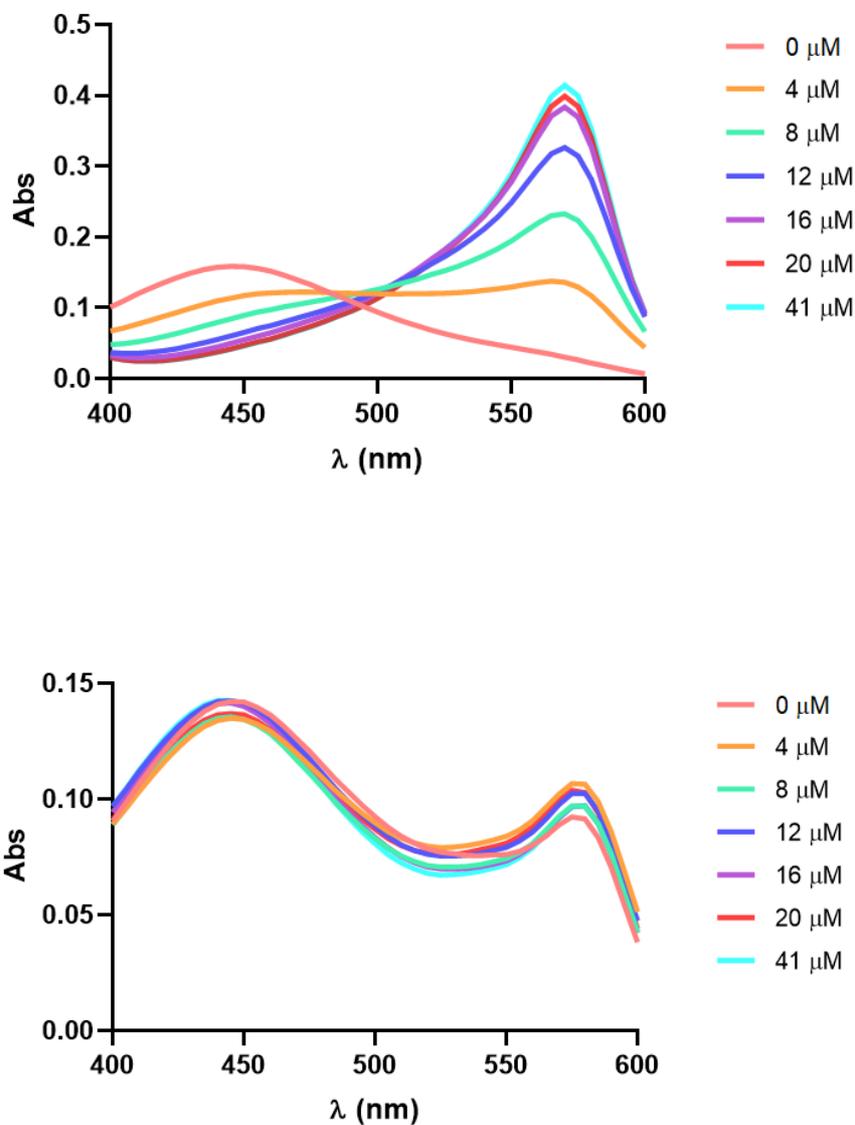


Figura 3.26 - Espectros de absorção das soluções com diferentes concentrações de GdCl₃ e 20 μM de XO em água (gráfico A) e em tampão PBS (gráfico B).

Através da figura 3.26 verificou-se que a presença de tampão PBS também afeta a ligação XO-Gd, não havendo alterações significativas no valor da Abs para as diferentes concentrações de lantanídeo. Isso pode dever-se à formação de um quelato de Gd³⁺ com o grupo fosfato quando a pH ácido.⁶⁸⁶⁸⁶⁸

Desta forma, concluiu-se que às condições a que se realizou as experiências não foi possível quantificar o íon Gd^{3+} . Futuramente seria interessante realizar as mesmas com o Gd-DOTA em tampão HEPES ao invés do tampão PBS, e aumentar o tempo de incubação do complexo a pH ácido.

Capítulo 4:

Conclusão

Ao longo da elaboração de todo o trabalho apresentado nesta dissertação, foram surgindo algumas conclusões e considerações pertinentes.

O Gd-DOTA é um quelato macrocíclico com baixa afinidade para as membranas biológicas, apresentando baixa permeabilidade devido à sua elevada hidrofilicidade. De modo a aumentar a lipofilia do agente de contraste sintetizaram-se dois novos ligandos, Gd-DOTA-C4 e Gd-DOTA-C8, os resultados obtidos por RMN revelaram que se sintetizou os complexos pretendidos, no entanto, aguardamos os resultados de espectrometria de massa para confirmação.

A permeação do Gd-DOTA através de bicamadas lipídicas foi seguida pela variação da quantidade de complexo encapsulado em vesículas de POPC e quantificação do complexo por ICP-MS. O valor da constante de permeação e do coeficiente de permeabilidade obtidos para o Gd-DOTA revelaram-se bastante baixos, sendo necessários vários dias para ocorrer a permeação de uma fração significativa do complexo. Este estudo apenas foi realizado para o Gd-DOTA, não tendo havido possibilidade de fazer o mesmo procedimento para os complexos sintetizados. Futuramente, seria de interesse o estudo da permeação dos compostos Gd-DOTA-C4 e Gd-DOTA-C8, permitindo uma comparação das três constantes de permeação, a fim de perceber se com a introdução da cadeia alquílica e aumento da lipofilia dos complexos, a sua permeabilidade ocorre mais rapidamente.

Utilizaram-se três técnicas distintas para tentar obter o valor da constante de partição do Gd-DOTA-C8 para bicamadas lipídicas. Não foi possível uma caracterização quantitativa, mas os resultados sugerem que a afinidade do complexo para com as membranas é muito baixa. Através dos estudos de ITC percebeu-se que o problema poderia estar na agregação do complexo, obtendo-se um valor de 0.11 mM para a CAC. Nos estudos dos tempos de relaxação do composto, conseguiu-se calcular a velocidade de relaxação longitudinal e transversal, observando-se um aumento nos valores obtidos quando comparados com os do Gd-DOTA. Estes valores estão em conformidade com um aumento de tamanho da molécula e são compatíveis com a formação de agregados de pequenas dimensões. Não foi, no entanto, observada uma variação significativa na velocidade de relaxação quando na presença de vesículas lipídicas, indicando que o complexo ou não se associa com as membranas ou a acessibilidade da água ao gadolínio diminui compensando um eventual aumento da relaxividade devido ao aumento do tamanho das partículas.

Estes estudos da determinação da constante de partição foram apenas realizados para o complexo Gd-DOTA-C8, por à partida ser o que iria apresentar uma interação mais forte com a membrana. No entanto, seria relevante repetir estes procedimentos para o outro complexo sintetizado, o Gd-DOTA-C4.

A otimização do método de quantificação com o corante XO, permitiu tirar algumas conclusões relevantes para o estudo destes complexos. Tal como já referido pela literatura, a ligação do XO ao gadolínio é dependente do pH da solução, tendo apenas ocorrido para pH's superiores a 5. Para além disso, verificou-se que apesar do gadolínio ter uma interação mais forte com o DOTA que com o XO, a transferência do Gd^{3+} do XO para o DOTA é um processo relativamente lento que ocorre na escala dos minutos. Este facto deixa em aberto a possibilidade de utilizar o XO na quantificação do Gd^{3+} total em soluções de Gd-DOTA, sendo para isso necessário primeiro acidificar a solução para a dissociação do Gd-DOTA. Por último, conclui-se que a presença de fosfato em solução a pH ácido impede a formação do complexo Gd-XO quando novamente ao valor de pH adequado (pH~5.5). Esta interferência pode ser devida à formação de agregados de fosfato e ligação do gadolínio aos mesmos. Esta problemática poderá estar na origem dos agregados detetados nas experiências anteriores. Futuramente será relevante continuar com este estudo, alterando o tampão de pH utilizado.

Capítulo 5:

Bibliografía

- 1 van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 112-124, doi:10.1038/nrm2330 (2008).
- 2 Kucerka, N., Gallova, J. & Uhrikova, D. The membrane structure and function affected by water. *Chemistry and physics of lipids* 221, 140-144, doi:10.1016/j.chemphyslip.2019.04.002 (2019).
- 3 Watson, H. Biological membranes. *Essays in biochemistry* 59, 43-69, doi:10.1042/bse0590043 (2015).
- 4 Marc Eeman, M. D. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 14, 719-736, ISSN: 1370-6233 (2010).
- 5 Vereb, G. *et al.* Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8053-8058, doi:10.1073/pnas.1332550100 (2003).
- 6 Griep, L. M. *et al.* BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function. *Biomed Microdevices* 15, 145-150, doi:10.1007/s10544-012-9699-7 (2013).
- 7 Gerle, C. Essay on Biomembrane Structure. *The Journal of membrane biology* 252, 115-130, doi:10.1007/s00232-019-00061-w (2019).
- 8 Vaz, W. L. C. Lipid Bilayers: Properties. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, doi:10.1002/9780470048672.webcb281 (2008).
- 9 A, E. K., Phoebe. Differential Scanning Calorimetry Studies of Phospholipid Membranes: The Interdigitated Gel Phase. *Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry* Chapter 8, 407-444, doi:10.5772/51882 (2013).
- 10 Feitosa, E., Adati, R. D. & Alves, F. R. Thermal and phase behavior of didodecyldimethylammonium bromide aqueous dispersions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 480, 253-259, doi:10.1016/j.colsurfa.2015.01.086 (2015).
- 11 Sum, S. L. a. A. K. Molecular Characterization of Gel and Liquid-Crystalline Structures of Fully Hydrated POPC and POPE Bilayers. *The Journal of Physical Chemistry* 111, 6026-6033, doi:10.1021/jp0686339 (2007).
- 12 Attwood, S. J., Choi, Y. & Leonenko, Z. Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *International journal of molecular sciences* 14, 3514-3539, doi:10.3390/ijms14023514 (2013).
- 13 Killian, J. A. & Nyholm, T. K. Peptides in lipid bilayers: the power of simple models. *Current opinion in structural biology* 16, 473-479, doi:10.1016/j.sbi.2006.06.007 (2006).
- 14 Chiranjeevi Peetla, A. S., and Vinod Labhasetwar. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics* 6, 1264-1276, doi:10.1021/mp9000662 (2009).

- 15 Rajabi, M. & Mousa, S. A. Lipid Nanoparticles and their Application in Nanomedicine. *Current pharmaceutical biotechnology* 17, 662-672, doi:10.2174/1389201017666160415155457 (2016).
- 16 Warschawski, D. E. *et al.* Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1808, 1957-1974, doi:10.1016/j.bbamem.2011.03.016 (2011).
- 17 Abbott, N. J., Ronnback, L. & Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 41-53, doi:10.1038/nrn1824 (2006).
- 18 Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R. & Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease* 37, 13-25, doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030 (2010).
- 19 Saunders, N. R., Liddelow, S. A. & Dziegielewska, K. M. Barrier mechanisms in the developing brain. *Frontiers in pharmacology* 3, 46, doi:10.3389/fphar.2012.00046 (2012).
- 20 Saxena, D., Sharma, A., Siddiqui, M. H. & Kumar, R. Blood Brain Barrier Permeability Prediction Using Machine Learning Techniques: An Update. *Current pharmaceutical biotechnology* 20, 1163-1171, doi:10.2174/1389201020666190821145346 (2019).
- 21 Kealy, J., Greene, C. & Campbell, M. Blood-brain barrier regulation in psychiatric disorders. *Neuroscience letters* 726, 133664, doi:10.1016/j.neulet.2018.06.033 (2020).
- 22 Abbott, N. J. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of inherited metabolic disease* 36, 437-449, doi:10.1007/s10545-013-9608-0 (2013).
- 23 Dong, X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics* 8, 1481-1493, doi:10.7150/thno.21254 (2018).
- 24 Banks, W. A. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC neurology* 9, S3, 1-5, doi:10.1186/1471-2377-9-S1-S3 (2009).
- 25 Abbott, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of Anatomy*, 200(206): 629-638, doi:10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x (2002).
- 26 Arvanitis, C. D., Ferraro, G. B. & Jain, R. K. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nature reviews. Cancer* 20, 26-41, doi:10.1038/s41568-019-0205-x (2020).
- 27 Malkiewicz, M. A. *et al.* Blood-brain barrier permeability and physical exercise. *Journal of neuroinflammation* 16, 15, doi:10.1186/s12974-019-1403-x (2019).
- 28 Zhou, Z. & Lu, Z. R. Gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance cancer imaging. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 5, 1-18, doi:10.1002/wnan.1198 (2013).
- 29 Bottrill, M., Kwok, L. & Long, N. J. Lanthanides in magnetic resonance imaging. *Chemical Society reviews* 35, 557-571, doi:10.1039/b516376p (2006).
- 30 Richardson, J. C., Bowtell, R. W., Mader, K. & Melia, C. D. Pharmaceutical applications of magnetic resonance imaging (MRI). *Advanced drug delivery reviews* 57, 1191-1209, doi:10.1016/j.addr.2005.01.024 (2005).

- 31 Liu, T. T. MRI in systems medicine. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 12, e1463, doi:10.1002/wsbm.1463 (2020).
- 32 Pujales-Paradela, R. *et al.* Gadolinium(III)-Based Dual (1) H/(19) F Magnetic Resonance Imaging Probes. *Chemistry* 25, 4782-4792, doi:10.1002/chem.201806192 (2019).
- 33 Aime, S. *et al.* High sensitivity lanthanide(III) based probes for MR-medical imaging. *Coordination Chemistry Reviews* 250, 1562-1579, doi:10.1016/j.ccr.2006.03.015 (2006).
- 34 Peter Caravan, J. J. E., Thomas J. McMurry, and Randall B. Lauffer. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chemical Reviews* 99, 2293-2352 (1999).
- 35 Yves, G., Aline, H., Pierre, G. & Lam, V. Q. Physics of magnetic resonance imaging: from spin to pixel. *Journal of Physics D: Applied Physics* 43, 213001, doi:10.1088/0022-3727/43/21/213001 (2010).
- 36 Merbach, A., Helm, L. & Tóth, É. The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging. 16-20, ISSN: 978-1-119-99176-2 (2013).
- 37 Botta, M. Second Coordination Sphere Water Molecules and Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Implications for MRI Contrast Agents. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2000, 399-407, doi:10.1002/(sici)1099-0682(200003)2000:3<399::aid-ejic399>3.0.co;2-b (2000).
- 38 Jeon, M., Halbert, M. V., Stephen, Z. R. & Zhang, M. Iron Oxide Nanoparticles as T1 Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: Fundamentals, Challenges, Applications, and Prospectives. *Advanced materials* 33, doi:10.1002/adma.201906539 (2021).
- 39 Natalin, R. A., Prince, M. R., Grossman, M. E., Silvers, D. & Landman, J. Contemporary applications and limitations of magnetic resonance imaging contrast materials. *The Journal of urology* 183, 27-33, doi:10.1016/j.juro.2009.09.029 (2010).
- 40 Idee, J. M. *et al.* Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundamental & clinical pharmacology* 20, 563-576, doi:10.1111/j.1472-8206.2006.00447.x (2006).
- 41 Perazella, M. A. Current status of gadolinium toxicity in patients with kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 4, 461-469, doi:10.2215/CJN.06011108 (2009).
- 42 Martins, A. F., Morfin, J. F., Geraldes, C. F. & Toth, E. Gd(3+) complexes conjugated to Pittsburgh compound B: potential MRI markers of beta-amyloid plaques. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 19, 281-295, doi:10.1007/s00775-013-1055-8 (2014).
- 43 Martins, A. F. *et al.* Interaction of PiB-derivative metal complexes with beta-amyloid peptides: selective recognition of the aggregated forms. *Chemistry* 21, 5413-5422, doi:10.1002/chem.201406152 (2015).
- 44 Bernhard, C. *et al.* DOTAGA-anhydride: a valuable building block for the preparation of DOTA-like chelating agents. *Chemistry* 18, 7834-7841, doi:10.1002/chem.201200132 (2012).
- 45 Kappe, D. D. a. C. O. Microwave-Assisted Synthesis in Water as Solvent. *Chemical Reviews* 107, 2563-2591, doi:10.1021/cr0509410 (2006).

- 46 Evans, D. F. The determination of the paramagnetic susceptibility of substances in solution by nuclear magnetic resonance. *Journal of the Chemical Society*, 2003, doi:10.1039/jr9590002003 (1959).
- 47 Corsi, D. M., Platas-Iglesias, C., Bekkum, H. v. & Peters, J. A. Determination of paramagnetic lanthanide(III) concentrations from bulk magnetic susceptibility shifts in NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry* 39, 723-726, doi:10.1002/mrc.922 (2001).
- 48 Sakai, N. *et al.* Synthesis of Gd₂O₃ nanoparticles for MRI contrast agents. *Journal of Physics: Conference Series* 352, 2008-2012, doi:10.1088/1742-6596/352/1/012008 (2012).
- 49 Barge, A., Cravotto, G., Gianolio, E. & Fedeli, F. How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. *Contrast media & molecular imaging* 1, 184-188, doi:10.1002/cmml.110 (2006).
- 50 Ammann, A. A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of mass spectrometry : JMS* 42, 419-427, doi:10.1002/jms.1206 (2007).
- 51 Wilschefski, S. C. & Baxter, M. R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *The Clinical biochemistry Reviews* 40, 115-133, doi:10.33176/AACB-19-00024 (2019).
- 52 Moreno, M. J., Bastos, M. & Velazquez-Campoy, A. Partition of amphiphilic molecules to lipid bilayers by isothermal titration calorimetry. *Analytical biochemistry* 399, 44-47, doi:10.1016/j.ab.2009.11.015 (2010).
- 53 Ma, W., Yang, L. & He, L. Overview of the detection methods for equilibrium dissociation constant KD of drug-receptor interaction. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 8, 147-152, doi:10.1016/j.jpfa.2018.05.001 (2018).
- 54 Kabiri, M. & Unsworth, L. D. Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: peptide self-assembly and protein adsorption case studies. *Biomacromolecules* 15, 3463-3473, doi:10.1021/bm5004515 (2014).
- 55 Pallicer, J. M. & Kramer, S. D. Evaluation of fluorescence anisotropy to assess drug-lipid membrane partitioning. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 71, 219-227, doi:10.1016/j.jpba.2012.08.009 (2012).
- 56 Gradinaru, C. C., Marushchak, D. O., Samim, M. & Krull, U. J. Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells. *The Analyst* 135, 452-459, doi:10.1039/b920242k (2010).
- 57 Smith, M. C., Crist, R. M., Clogston, J. D. & McNeil, S. E. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and bioanalytical chemistry* 409, 5779-5787, doi:10.1007/s00216-017-0527-z (2017).
- 58 Domingues, M. M., Santiago, P. S., Castanho, M. A. & Santos, N. C. What can light scattering spectroscopy do for membrane-active peptide studies? *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 14, 394-400, doi:10.1002/psc.1007 (2008).
- 59 Filipe, H. A. L., Cardoso, R. M. S., Loura, L. M. S. & Moreno, M. J. Interaction of Amphiphilic Molecules with Lipid Bilayers: Kinetics of Insertion, Desorption and Translocation. *Membrane Organization and Dynamics* 20, 49-89, doi:10.1007/978-3-319-66601-3_4 (2017).

- 60 Karlsson, P. A. a. J. Correlation Between Oral Drug Absorption in Humans and Apparent Drug Permeability Coefficients in Human Intestinal Epithelial (CACO-2) Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175, 880-885, doi:10.1016/0006-291x(91)91647-u (1991).
- 61 Benjamin Lemasson *et al.* Monitoring Blood-Brain Barrier Status in a Rat Model of Glioma Receiving Therapy: Dual Injection of Low-Molecular-Weight and Macromolecular MR Contrast Media. *Radiology* 257, 342-352, doi:10.1148/radiol.10092343 (2010).
- 62 Laurent, S., Elst, L. V. & Muller, R. N. Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast media & molecular imaging* 1, 128-137, doi:10.1002/cmml.100 (2006).
- 63 do Canto, A. *et al.* Diphenylhexatriene membrane probes DPH and TMA-DPH: A comparative molecular dynamics simulation study. *Biochimica et biophysica acta* 1858, 2647-2661, doi:10.1016/j.bbame.2016.07.013 (2016).
- 64 Almeida, P. F. A simple thermodynamic model of the liquid-ordered state and the interactions between phospholipids and cholesterol. *Biophysical journal* 100, 420-429, doi:10.1016/j.bpj.2010.12.3694 (2011).
- 65 Yoshixoh Kam/noh *, C. k. T., Hirosh/Kamaya and Issaku Erda. Depression of phase-transition temperature by anesthetics: nonzero solid membrane binding. *Biochimica et Biophysica* 946, 215-220, doi:10.1016/0005-2736(88)90395-1 (1988).
- 66 Rumiana Koynova, M. C. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et biophysica acta* 1376, 91-145, doi:10.1016/S0304-4157(98)00006-9 (1998).
- 67 Eva Tóth, E. B., . Istvhn Lhzhr, and Imre Tdth. Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide(III)-DOTA Complexes. *Inorganic Chemistry* 33, 4070-4076, doi:10.1021/ic00096a036 (1994).
- 68 László Burai, V. H., Róbert Király, Éva Tóth, Ernő Brucher. Stability Constants and ¹H Relaxation Effects of Ternary Complexes Formed Between Gd-DTPA, Gd-DTPA-BMA, Gd-DOTA, and Gd-EDTA and Citrate, Phosphate, and Carbonate Ions. *Magnetic Resonance in Medicine* 38, 146-150, doi:10.1002/mrm.1910380120 (1997).