

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

FLÁVIO VINÍCIUS CRIZÓSTOMO KOCK

ANÁLISE RELAXOMÉTRICA PARA COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO

CONTENDO ÍONS PARAMAGNÉTICOS EM SOLUÇÃO

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos-SP

2017

Flávio Vinícius Crizóstomo Kock

Análise relaxométrica para compostos de coordenação contendo íons
paramagnéticos em solução

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Dr. Luiz Alberto Colnago

São Carlos-SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Química de São Carlos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Rita e Olendino (in memoriam), aos meus irmãos Fabrycio e Fabyo e à minha amada esposa Camila.

AGRADECIMENTOS

Agradecer corresponde a um ato de enorme gratidão, que nos possibilita recordarmos de pessoas que contribuíram de algum modo para o sucesso desta longa jornada. Desta forma, é imprescindível realizar os devidos reconhecimentos,

À minha família, aos meus pais Rita e Olendino (*in memoriam*) e aos meus irmãos Fabrycio e Fabyo que apesar da distância, sempre estiveram muito próximos ao meu coração.

À minha amada esposa Camila, que ao longo desta jornada sempre esteve fisicamente ao meu lado, tanto nos momentos de alegria (com inúmeras comemorações) quanto nos momentos mais difíceis e de dúvidas, sempre com o seu imprescindível otimismo me impulsionando a seguir em frente.

Ao meu orientador Dr. Luiz Alberto Colnago, por me ensinar muito além da RMN, mas como ser sempre uma pessoa ética e justa através do seu próprio exemplo. Uma pessoa ímpar que transcende qualquer fronteira da generosidade e amabilidade...simplesmente irei admirá-lo por toda a minha trajetória pessoal e profissional.

A todo o grupo de pesquisa em RMN da Embrapa *Instrumentação*, por toda a amizade e momentos passados juntos. De igual modo, os meus sinceros agradecimentos a todo corpo técnico desta instituição, que não medem esforços para prover um atendimento perfeito.

Ao grupo de pesquisa em RMN do Molecular Biotechnology Center (MBC) vinculado à *Università degli Studi di Torino*, Itália, por todo o conhecimento transmitido a mim, pelos momentos de alegria e amizade que serão sempre recordados.

Ao Dr. Silvio Aime pelo seu exemplo de profissionalismo e de acolhimento, sempre generoso e disposto ajudar-me em todas as minhas dúvidas e questionamentos, por mais simples que as fossem perante o seu consolidado conhecimento e posição.

À Dra. Eliana Gianolio e Dra. Rachele Stefania por me ensinarem pacientemente todos os fundamentos e prática da RMN em campo variável e síntese orgânica e inorgânica, respectivamente. Mas acima de tudo, muito obrigado pelo carinho que me receberam.

Enfim, à FAPESP (proc. 2012/23169-8 e 2015/16624-9) que proporcionou todo o suporte financeiro que esta pesquisa exigiu.

Muito Obrigado!!!

“Fai nuovo, Fai meglio”

RESUMO

Neste trabalho analisou-se por ressonância magnética nuclear em baixa (RMN-BR) e em alta resolução (RMN-AR), compostos de coordenação contendo íons paramagnéticos em solução. Demonstrou-se que estas são importantes ferramentas para o estudo destas espécies em meio aquoso, visando aplicações tanto em química analítica quanto em química inorgânica e bioinorgânica. Os estudos iniciais foram realizados com o ligante EDTA (Y^4), clássico agente quelante, e seus complexos com os íons Cu^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} . Os resultados demonstraram que a RMN-BR (20 MHz para o 1H) torna-se uma eficiente alternativa à espectrofotometria, principalmente para o estudo de complexos que não absorvem radiação no visível, como por exemplo, o quelato $[Mn-Y]^{2-}$. A relaxometria por RMN-BR também foi usada para estudar soluções de quitosana (Chi) e seus complexos com os mesmos íons paramagnéticos previamente abordados para o EDTA. Os resultados demonstraram a eficiência da relaxometria tanto para os estudos de agregação polimérica em função do pH quanto para os estudos de complexação. Foram também abordados complexos de sorbitol com íons Cu^{2+} tanto por relaxometria quanto por RMN-AR (600 MHz para o 1H). Neste caso, os resultados apresentaram uma alta complementariedade, permitindo inferir tanto acerca da troca de ligantes em solução e do pH ótimo para a complexação, quanto do surgimento de espécies macromoleculares com baixos coeficientes de autodifusão ($D \approx 1,58 \times 10^{-10} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) em meio alcalino (pH ≈ 12). Além do mais, foram avaliados novos complexos de Gd^{3+} com relevância biológica (agentes de contrastes), derivados do ligante AAZTA (6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepina). Os resultados demonstraram que as relaxividades paramagnéticas (r_{1p}) foram de $7,44 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $9,41 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para os derivados funcionalizados lateralmente com os ácidos propanoico e pentanoico, respectivamente, em comparação ao ligante precursor, $7,10 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Os estudos relaxométricos *in vitro* mostraram que estes novos derivados são menos susceptíveis à transmetalção com íons endógenos (Zn^{2+} e Ca^{2+}), quando comparado ao AAZTA, possibilitando projetar o seu uso como agentes de contraste em tomografia por ressonância magnética (MRI). Aplicações relaxométricas *in vivo* foram realizadas utilizando o derivado contendo o ácido pentanoico conjugado ao peptídeo FibPep, apto a se ligar à proteína fibrina (presente em células tumorais). Os resultados demonstraram uma alta habilidade deste complexo para o assinalamento precoce e inequívoco do câncer de próstata (linhagem tumoral PC-3) em camundongos.

Palavras-chave: RMN, relaxometria, paramagnetismo, complexos.

ABSTRACT

Low-resolution (LR) and high-resolution (HR) nuclear magnetic resonance (NMR) was used in this work for study coordination compounds containing paramagnetic ions in solution. It was demonstrated that these spectroscopies are important tools for the study of these species in aqueous medium, aiming applications in both, analytical chemistry and inorganic and bioinorganic chemistry. The initial studies were conducted using the EDTA (Y^{4-}) ligand, classical complexant, and its chelate with the paramagnetic ions, among them Cu^{2+} , Fe^{3+} and Mn^{2+} . The results demonstrated that LR-NMR (20 MHz to 1H) becomes an efficient alternative to spectrophotometry, mainly for the study of complexes that do not absorb visible radiation, such as $[Mn-Y]^{2-}$ chelate. The LR-NMR relaxometry was also used to study chitosan (Chi) solutions and their complexes with the same paramagnetic ions previously discussed for EDTA. The results demonstrated the efficiency of the relaxometry for studies involving complexation and polymer aggregation as a function of the pH. Complexes of sorbitol with cupric ions were also addressed by relaxometry and HR-NMR (600 MHz to 1H). In this case, the results showed a high complementarity, allowing to infer about the ligand exchange and the optimum pH for the complexation reaction occurs. Besides, this study showed the appearance of species with low auto diffusion coefficients ($D \approx 1.58 \times 10^{-10} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) in alkaline mediums (pH ≈ 12), as consequence of the macromolecular character of this complex in this environment. In addition, new biologically relevant Gd^{3+} complexes (contrast agents) derived from AAZTA (6-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine) ligand were evaluated. The results demonstrated that the paramagnetic relaxivities (r_{1p}) were $7.44 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and $9.41 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for derivatives laterally functionalized with propanoic and pentanoic acids, respectively, in comparison to precursor ligand, $7.10 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. In vitro relaxometric studies demonstrated that these new derivatives are less susceptible to transmetallation reactions towards to endogenous ions (Zn^{2+} and Ca^{2+}), in comparison to AAZTA (precursor ligand), becoming possible to design their use as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI) tomography applications. *In vivo* studies were conducted using the pentanoic acid derivative conjugated to FibPep peptide, able to bind to fibrin protein (present in tumor cells). The results for this study demonstrated a high ability of this complex for the early and unequivocal signaling for prostate cancer (PC-3 tumoral cell line) in mice.

Keywords: NMR, relaxometry, paramagnetism, complexes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1** - Representação dos mecanismos de relaxação na esfera interna (IS) e externa (OS) para um complexo contendo um íon paramagnético em solução. Nesta figura τ_M corresponde ao tempo de permanência de uma molécula de água ligada ao centro paramagnético, q ao número de moléculas de água coordenadas ao metal e τ_R ao tempo de correlação rotacional do complexo.....32
- Figura 2.1** - a) Diagrama da sequência de pulsos CWFP com n pulsos de 90° separados por um tempo T_p e b) Sequência de pulsos CP-CWFP, com um pulso de 90° para refocalização, separado por um tempo $T_p/2$ entre o primeiro e o segundo pulso.....38
- Figura 2.2** - a) Sinal CWFP para uma amostra com $T_1/T_2 = 5$. b) Sinal CP-CWFP para uma amostra com $T_1/T_2 = 1$39
- Figura 2.3** - a) Variação da absorbância máxima (■), T_1 (★) e T_2 (○) medidos com a sequência de pulsos CP-CWFP para a solução aquosa de Cu(II)-EDTA e T_2 (□) para a solução aquosa de Cu^{2+} , em função do pH. Em todos os experimentos, a inicial da espécie Cu^{2+} foi de $3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. b) Variação de T_1 (Δ) e T_2 (○) para as soluções estudadas na figura 2.3(a), contudo empregando as sequências IR e CPMG, respectivamente. As linhas sólidas correspondem à ajustes polinomiais de 6º ordem e a linha tracejada corresponde a um ajuste sigmoide. Estes ajustes foram empregados unicamente para guiar a análise dos dados obtidos experimentalmente.....41
- Figura 2.4** – Possíveis estruturas assumidas em solução para as espécies complexas $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ (esquerda), Cu(II)-EDTA (centro) e o hidroxocomplexo (direita) acima de pH 10 (início da hidrólise alcalina) em relação a faixa de pH e os valores obtidos para o tempo de relaxação transversal, T_242
- Figura 2.5** - (a) Variação de T_1 (★) e T_2 (○) medidos simultaneamente pela sequência de pulsos CP-CWFP para uma solução aquosa de Mn(II)-EDTA e T_2 (□) para uma solução aquosa de Mn^{2+} , em função do pH. Em todos os experimentos, a concentração inicial do Mn^{2+} foi $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As linhas sólidas e tracejadas correspondem ao ajuste sigmoide para os dados relaxométricos obtidos. (b) Possível estrutura química para o complexo Mn(II)-EDTA em meio aquoso, em consonância com Oakes & Smith, 1981 e Islam et al., 2017.....44

Figura 2.6 - a) Variação dos valores para absorvância máxima (■), T_1 (★) e T_2 (○) medidos com a sequência de pulsos CP-CWFP para uma solução aquosa de Cu(II)-EDTA, na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 mol.L^{-1}), em função do pH. A concentração inicial de Cu^{2+} foi de $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. b) Variação dos valores de T_1 (Δ) e T_2 (○) para as soluções da figura 2.6(a), contudo obtida empregando as sequências de pulsos IR e CPMG, respectivamente. As linhas sólidas correspondem a um ajuste polinomial de 6° ordem dos dados experimentais, somente para guiar a análise dos dados experimentais obtidos.....45

Figura 2.7 – Possíveis estruturas assumidas em solução e em função do pH, para as espécies complexas envolvidas no estudo relaxométrico para uma mistura de ligantes...46

Figura 3.1 - Esquema para a sequência de pulsos com alternância de fases CP-CWFP_{x-x} empregada nesta tese, onde t_p corresponde ao tempo entre pulsos.....51

Figura 3.2 - Valores para T_1 (■) e T_2 (○) obtidos através da sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x} para uma solução de quitosanas nas concentrações de (a) $2,2 \times 10^{-2}$, (b) $2,2 \times 10^{-1}$, e (c) $2,2 \text{ g.L}^{-1}$. As linhas sólidas correspondem a um ajuste sigmoide para os dados experimentais obtidos, somente para guiar a análise dos resultados.....53

Figura 3.3 - Comparação entre a titulação turbidimétrica (■) – medida a 420 nm – e a titulação relaxométrica T_2 (○) para uma solução de quitosanas na concentração de $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ em função do pH. As linhas sólidas correspondem ao fitting sigmoide para os dados experimentais obtidos.....55

Figura 3.4 - Perfis relaxométricos obtidos a partir de T_1 (■) e T_2 (○) para os íons paramagnéticos na presença do polissacarídeo quitosana. a) Chi- Fe^{3+} e o respectivo sobrenadante (b). As linhas sólidas e pontilhadas correspondem ao fitting sigmoide dos dados experimentais obtidos.....58

Figura 3.5 - Prováveis estruturas químicas para o complexo entre quitosana e as espécies paramagnéticas, Fe^{3+} , em solução, em consonância com (HERNANDÉZ et al., 2008). Nesta representação foi demonstrada apenas a complexação do ponto de vista da unidade monomérica glicosamina, para efeitos de simplificação.....59

Figura 3.6 - Perfis relaxométricos obtidos a partir de T_1 (★) e T_2 (O) para os íons paramagnéticos Cu^{2+} na presença do polissacarídeo quitosana (a) Chi-Cu^{2+} e o respectivo sobrenadante (b). As linhas sólidas e pontilhadas correspondem ao ajuste sigmoide para os dados experimentais obtidos.....60

Figura 3.7 - Possíveis estruturas químicas assumidas para o complexo Chi-Cu^{2+} em solução, em consonância com (MODRZEJEWSKA, 2013; PESTOV; BRATSKAYA, 2016), assumindo a conformação ponte (esquerda) e pedante (direita). Nesta representação foi demonstrada apenas a complexação do ponto de vista da unidade monomérica glicosamina, para efeitos de simplificação.....61

Figura 3.8 - Perfis relaxométricos obtidos a partir de T_1 (★) e T_2 (O) para os íons paramagnéticos na presença do polissacarídeo quitosana. a) Chi-Mn^{2+} e o respectivo sobrenadante (b). As linhas sólidas e pontilhadas correspondem ao fitting sigmoide dos dados experimentais obtidos.....62

Figura 4.1 - Estrutura do complexo $[\text{Cu-sorb}]^{2+}$ proposta por (KLUFERS; SCHUHMACHER, 1995) a partir de difratometria de raios-X. (a) Visão lateral do complexo, onde os átomos de cobre, oxigênio e carbono estão representados em azul, vermelho e amarelo, respectivamente. (b) Visão superior do complexo, onde as esferas hachuradas, brancas e pretas correspondem aos átomos de cobre, carbono e oxigênio, respectivamente.....66

Figura 4.2 – Valores de T_1 (■) e T_2 (■) em função do pH, determinados simultaneamente com a sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x}. (a) Valores de T_1 e T_2 para as soluções aquosas contendo íons cúpricos e sorbitol na proporção de 3:1 (a), 2:1 (b), 1:1 (c) e 1:2 (d), respectivamente.....70

Figura 4.3 - Espectros de EPR obtidos para o sistema contendo íons cúpricos. Em (a) estão os espectros de EPR do sulfato de cobre (298 K) em solução em pH 4 (linha preta) e a 77K (linha vermelha). Em azul está o espectro de EPR do precipitado de CuSO_4 em pH 12 a 298 K. Em (b) estão os espectros EPR para os íons na presença de sorbitol, a 77 K, em pH 4 (linha preta) e pH 12 (linha vermelha).....72

Figura 4.4 - (a) Espectros de ^1H -RMN obtidos a 600 MHz e a 25 °C para o sorbitol (linha preta) solubilizado em uma solução 90% H_2O e 10% D_2O e na presença de íons Cu^{2+} , em função do pH 1 (vermelho), pH 4 (azul), pH 7 (rosa), pH 10 (verde) e pH 12 (azul marinho). Para a aquisição destes espectros foram empregando um capilar contendo uma solução de TMS como referência. (b) Estrutura do sorbitol. (c) Expansão do espectro na região entre -2.0 e -5.0 ppm e em (d) Espectro de ^1H -RMN entre 80 e 200 ppm, do complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ na proporção 1:1 em pH 12.....74

Figura 4.5 - Espectro HMQC para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ em pH 12 e a 298K, demonstrando experimentalmente a correlação obtida para o ^1H em -4,94 ppm com o núcleo de ^{13}C em -110 ppm (círculo vermelho).....76

Figura 4.6- Espectro DOSY para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ em pH 12 e a 298K.....77

Figura 4.7 - Estrutura proposta por intermédio da combinação dos resultados obtidos por relaxometria e RMN-AR para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ em pH 12.....78

Figura 5.1 - Estruturas químicas para os ligantes desenvolvidos e aplicados neste capítulo.....82

Figura 5.2 - Esquema para a síntese do ligante AAZTA.....83

Figura 5.3 - Perfis relaxométricos em função do pH para novos derivados do complexo $[\text{Gd-AAZTA}]^-$ (●), para $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ (■) e para $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ (○). Todos os perfis relaxométricos foram realizados obtendo-se os valores correspondentes a taxa de relaxação longitudinal observável ($R_{1\text{obs}}$) a 21MHz, 25 °C e na faixa de pH 1-14, empregando uma concentração em $[\text{Gd}^{3+}]$ de 0,24 mM para o derivado C_2 e 0,70 mM para o derivado C_4 . Os resultados foram normalizados para a concentração de 1 mM para facilitar a comparação entre eles.....87

Figura 5.4 - (a) Comparação entre os perfis relaxométricos obtidos por ^{17}O -RMN para a taxa de relaxação transversal (R_{2p}) em função da temperatura para os derivados $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ (■), $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ (O) e $[\text{Gd-AAZTA}]^-$ (●) não modificado, obtido a 14.09 T e em pH neutro (b e c). O fitting dos dados experimentais obtidos para $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ e $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ foi realizado empregando as equações modificadas de Swift-Connick, levando em consideração a presença de duas espécies diferentes, em consonância com (KARIMI et al., 2016).....89

Figura 5.5 - Espectro obtido a 600 MHz e a 25°C para o complexo Eu^{3+} -AAZTAC₂COOH.....90

Figura 5.6 - Perfis relaxométricos obtidos em função do campo magnético na faixa de 0,01 MHz até 80 MHz para uma solução 1mM de $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ (a) e $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ (b) a pH ≈ 7 e 25°C (■) e 37°C (O).....92

Figura 5.7- Avaliação da taxa de relaxação longitudinal relativa (R_1/R_0) para o complexo $[\text{Gd-AAZTA}]^-$ (■), $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ (●) e $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ (▲) na presença de um excesso de CaCl_2 (esquerda) e ZnCl_2 (direita). Os experimentos foram realizados em tampão fosfato, pH 7, 37°C e 21 MHz, durante 3 dias.....93

Figura 6.1 - Estrutura química para o peptídeo Fib-Pep conjugado com o tetrâmero dL- $(\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH})_4$, perfazendo o agente de contraste macromolecular.....100

Figura 6.2 - Comparação entre os perfis relaxométricos obtidos em função do campo magnético para o tetrâmero dL- $(\text{GdAAZTA})_4$ (O) e o complexo macromolecular, denominado peptídeo-dL- $(\text{GdAAZTAC}_4\text{COOH})_4$ (■). Estes perfis foram obtidos a 25°C com o campo magnético variando entre 0,01 MHz e 80 MHz.....101

Figura 6.3 - Estudo *in vitro* referente a interação entre o complexo peptídeo-dL- $(\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH})_4$ com a fibrina.....103

Figura 6.4 - Imagens MRI de camundongos com câncer de próstata: antes (esquerda) e após 6,0 min (centro) e 20 min (direita) da administração do agente de contraste peptídeo-dL- $(\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH})_4$ na dose de 0,02 mmol Gd/kg do animal.....103

Figura 6.5 - Análise quantitativa realizadas a partir das imagens de MRI para o agente de contraste Peptídeo-dL-(Gd-AAZTAC₄COOH)₄ (preto), próstata saudável (azul) e o tetrâmero dL-(GdAAZTA)₄ (verde).....105

Figura 6.6 - Análise da concentração residual *post-mortem* de gadolínio nos camundongos.....105

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Principais parâmetros relaxométricos obtidos a partir dos ajustes realizados nos gráficos provenientes dos experimentos em função do campo magnético e ^{17}O -RMN.....	91
Tabela 6.1 - Principais parâmetros relaxométricos obtidos em função do campo magnético para os derivados abordados neste capítulo.....	102

LISTA DE ABREVIACOES

AAZTA –  cido 6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepina tetra acético

AAZTAC₂COOH –  cido 6-amino-6-(2-carboxietil)perhidro-1,4-diazepina tetra acético

AAZTAC₄COOH –  cido 6-amino-6-(4-carboxibutil)perhidro-1,4-diazepina tetra acético

BBI – Broad Band Inverse

BBO – Broad Band Observe

Chi – Quitosanas

CWFP – Continuous Wave Free Precession

CP-CWFP – Carr-Purcell – Continuous Wave Free Precession

CP-CWFP_{x-x} – CP-CWFP com alternância de fase

CPMG – Carr-Purcell-Meiboom-Gill

DOSY – Diffusion ordered spectroscopy

DOTA –  cido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra acético

DTPA –  cido dietilenotriaminopentac tico

EDTA –  cido etliendiaminotetraac tico

EPR – Ressonância paramagnética eletrônica

FBS – Fetal calf serum

FID – Free Induction Decay

FFC – Fast Field Cycling

HMDB – Human Metabolome Database

HMQC – Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation

HP-DO3A – Ácido 10-(2-hidroxiopropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético

HSA – Human Serum Albumin

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence

IR – Inversão Recuperação

IS – Esfera interna

K_{ps} – Constante do produto de solubilidade

MBC – Molecular Biotechnology Center

MSE – Multi-Slice Multi-Echo

MRI – Magnetic Resonance Imaging

OS – Esfera externa

RMN-AR – Ressonância Magnética Nuclear em Alta Resolução

RMN-BR – Ressonância Magnética Nuclear em Baixa Resolução

R₁ – Taxa de relaxação longitudinal

R_{1OBS} – Taxa de relaxação longitudinal observável

R_{1p} – Taxa de relaxação longitudinal paramagnética

Sorb – Sorbitol

SSFP – Steady State Free Precession

TMSP – TriMetilsililPropionato de sódio 2,2,3,3-d₄

LISTA DE SÍMBOLOS

B_0 – Campo magnético externo

M_0 – Magnetização líquida no equilíbrio térmico

M_{ss} – Magnetização líquida no estado estacionário

Q_{ss} – Estado quase estacionário

q – Numero de moléculas de água diretamente coordenadas ao centro paramagnético

q_{ss} – Numero de moléculas de água na segunda esfera de coordenação do complexo

T_1 – Constante de tempo da relaxação longitudinal

T_2 – Constante de tempo da relaxação transversal

T_2^* – Constante de tempo da relaxação sob o efeito da heterogeneidade do campo magnético

T^* – Constante de tempo para o decaimento do sinal SSFP

τ_M – Tempo de residência das moléculas de água na primeira esfera de coordenação

τ_R – Tempo de correlação rotacional

μ_{ef} – Momento magnético efetivo

γ_p – Razão magnetogírica para o próton

η – Viscosidade da solução

κ – Constante de Boltzmann

R_1 – Taxa de relaxação longitudinal

r_{1p} – Relaxividade paramagnética

$S_{(t)}^{post}$ – Intensidade do sinal após a aplicação do agente de contraste

$S_{(t)}^{PRE}$ – Intensidade do sinal antes da aplicação do agente contraste

$\% T_{1(t)}^{enh}$ – Aumento percentual do contraste

LISTA DE PUBLICAÇÕES

Artigos

1. TRIPEPI, M.; CAPUANA, F.; KOCK, F.V.C.; GIANOLIO, E.; PAGOTO, A.; STEFANIA, R.; DIGILIO, G.; AIME, S. Synthesis of high relaxivity gadolinium AAZTA tetramers as building blocks for bioconjugation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, p.1428-1437, 2018.
2. KOCK, F. V. C.; MACHADO, P.M.; COLNAGO, L. A.; BRANDÃO, G.P.; BARBOSA, L.L. Quantification of paramagnetic ions in solution using time domain NMR. Pros and cons to optical emission spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 137, p. 204-207, 2018
3. KOCK, F. V. C.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. A. Time-domain NMR relaxometry as an alternative method for analysis of chitosan -paramagnetic ion interactions in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 228-232, 2017.
4. SANTOS, P.M.; KOCK, F.V.C.; SANTOS, M.S.; LOBO, C.M.S.; CARVALHO, A.S.; COLNAGO, L.A. Non-invasive detection of adulterated olive oil in full bottles using time-domain NMR relaxometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 385-390, 2017.
5. KOCK, F. V. C.; COLNAGO, L. A. Rapid method for monitoring chitosan coagulation using low-field NMR relaxometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 1-4, 2016.
6. KOCK, F. V. C.; COLNAGO, L. A. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ions complexes in solution: An alternative to spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v. 122, p. 144-148, 2015.
7. SILVA, S. R.; DUARTE, E. C.; RAMOS, G. S.; KOCK, F. V. C.; ANDRADE, F. D.; FRÉZARD, F.; COLNAGO, L. A.; DEMICHELII, C. Gadolinium(III) Complexes with N-Alkyl-N-methylglucamine Surfactants Incorporated into Liposomes as Potential MRI Contrast Agents. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2015, p. 1-8, 2015.
8. KOCK, F. V. C.; HIGUEIRA-PADILHA, A. R.; SANTOS, M.S.; COLNAGO, L. A. D-sorbitol-Cu²⁺ macromolecular structure in solution characterized by magnetic resonance spectroscopies. **(Em preparo)**
9. KOCK, F. V. C.; STEFANIA, R.; GIANOLIO, E.; AIME, S. Relaxometric study of a novel Gd-AAZTA derivative with improved relaxivity and transmetallation inertness. **(Em preparo)**
10. KOCK, F.V.C.; HIGUEIRA-PADILHA, A. R.; COLNAGO, L.A. Kinetics studies by low-resolution NMR for the Cu²⁺-D-sorbitol macromolecular complexes. **(Em preparo)**
11. KOCK, F.V.C.; COLNAGO, L.A. Low-resolution NMR fast pulse sequences applied to coordination compounds in solution. **(Em preparo)**

Resumos

1. KOCK, F. V. C.; COLNAGO, L. A.; STEFANIA, R.; GIANOLIO, E.; AIME, S. Metal chelation in medicine: Evaluation of the macromolecular contrast agent FibPep-(GdAAZTAC₄COOH)₄ for the precece cancer diagnostics. In: International Conference on Polymers and Advanced Materials, Huatulco-MEX, 2017.
2. KOCK, F. V. C.; COLNAGO, L. A.; STEFANIA, R.; GIANOLIO, E.; AIME, S. Synthesis and relaxometric characterization of novel contrast agents for MRI applications. In: 16° Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting, Angra dos Reis-RJ, 2017.
3. KOCK, F. V. C.; COLNAGO, L. A.; STEFANIA, R.; GIANOLIO, E.; AIME, S. Synthesis and evaluation of a novel macromolecular MRI probe sensible to fibrin. In: 16° Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting, Angra dos Reis-RJ, 2017.
4. PADILLA, A.R.H.; KOCK, F.V.C.; COLNAGO, L.A. Study of copper-sorbitol complexation by high field NMR. In: 16° Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting, Angra dos Reis-RJ, 2017.
5. STEFANIA, R.; CAPUANA, F.; TRIPEPI, M.; GIANOLIO, E.; PAGOTO, A.; KOCK, FLÁVIO V. C.; DIGILIO, G.; AIME, S. Tetrameric [Gd(AAZTA)] system for high sensitivity molecular imaging. In: European Molecular Imaging Meeting - EMIM, Cologne-GER, 2017.
6. KOCK, F. V. C.; AIME, S.; GIANOLIO, E. A Relaxometric study of a novel Gd-AAZTA derivative with improved relaxivity and transmetallation inertness. In: International Summer School – Nanoscience Meets Metrology. Torino-ITA, 2016.
7. KOCK, FLÁVIO V. C.; COLNAGO, L. A. TD-NMR Relaxometry: A faster method to study chitosan coagulation. In: Panic - Practical Applications of NMR in Industry Conference, Houston-EUA, 2016.
8. KOCK, FLÁVIO V. C.; COLNAGO, L. A. Relaxometric studies of paramagnetic ions complexes in solution using TD-NMR. In: 15° Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting, Angra dos Reis – RJ, 2015.
9. MONTES, L.F.; KOCK, F.V.C.; CASTRO, E.V.R.; BARBOSA, L.L. RMN de baixo campo: Uma nova alternativa aos métodos ASTM para predição de propriedades físico-químicas de destilados de petróleo. In: V Encontro Capixaba de Química (V ENCAQUI), Vitória – ES, 2015.
10. KOCK, FLÁVIO V. C.; COLNAGO, L. A. Development and applications of spectroelectrochemistry cell to study the influence of chitosan in electrodeposition of copper. In: VII Biennial Meeting of the Nuclear Magnetic Resonance Group of the Spanish Royal Society of Chemistry /IV Iberian NMR Meeting/ VI Ibero-American NMR Meeting (GERMN2014), Alcalá de Henares – ESP, 2014.
11. KOCK, FLÁVIO V. C.; COLNAGO, L. A. Influência da quitosana na formação de eletrodépósitos de cobre obtidos por eletroquímica acoplada à ressonância magnética nuclear no domínio do tempo. In: XIII Jornada Brasileira de Ressonância Magnética Nuclear (XIII AURENM), Pirenópolis - GO, 2014.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE PUBLICAÇÕES

CONTEXTUALIZAÇÃO	24
Capítulo 01 - Relaxometria aplicada à compostos de coordenação.....	25
1 Introdução.....	28
2 Aplicação da relaxometria ao estudo de compostos de coordenação em solução.....	29
2.1 Efeito dos íons paramagnéticos sobre a relaxação do solvente.....	29
2.2 Estado da arte para o mecanismo de relaxação paramagnética.....	31
Capítulo 02 – Análise relaxométrica de complexos de EDTA com íons paramagnéticos em solução aquosa.....	34
1 Introdução.....	35
2 Materiais e métodos.....	36
2.1 Reagentes.....	36
2.2 Métodos.....	37
2.2.1 Medidas de pH.....	37
2.2.2 Espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-Vis).....	37
2.2.3 Medidas de relaxometria (RMN-BR).....	37
2.2.3.1 Aquisição de T ₁ (IR) e T ₂ (CPMG).....	37
2.2.3.2 Sequências de pulsos rápidas (CWFP e CP-CWFP).....	38
3 Resultados e discussão.....	40
Considerações finais.....	46

Capítulo 03 - Análise relaxométrica para compostos de coordenação macromoleculares.....	47
1 Introdução.....	49
2 Materiais e métodos.....	49
2.1 Reagentes.....	49
2.2 Métodos.....	50
2.2.1 Medidas de pH.....	50
2.2.2 Titulação turbidimétrica.....	51
2.2.3 Ensaio relaxométricos.....	51
3 Resultados e discussão.....	52
4 Considerações finais.....	63
Capítulo 04 – Análise relaxométrica e por RMN em alta resolução de compostos de coordenação entre sorbitol e íons cúpricos.....	64
1 Introdução.....	65
2 Materiais e métodos.....	66
2.1 Materiais.....	66
2.2 Métodos.....	67
2.2.1 Medidas de pH.....	67
2.2.2 Ensaio espectrofotométricos.....	67
2.2.3 Ensaio relaxométricos.....	67
2.2.4 Experimentos de RMN em alta resolução.....	67
2.2.5 Análise por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	69
3 Resultados e discussão.....	69
4 Considerações finais.....	79
Capítulo 05 - Desenvolvimento de sondas paramagnéticas para MRI: Uma abordagem relaxométrica <i>in vitro</i>.....	80
1 Introdução.....	81
2 Materiais e métodos.....	83
2.1 Síntese dos ligantes.....	83
2.2 Preparação dos complexos de Gd ³⁺	83

2.3	Análise relaxométrica.....	84
2.4	Aquisição do espectro de ^1H -RMN para o complexo Eu^{3+} -AAZTAC ₂ COOH.....	84
2.5	Relaxometria por ^{17}O -RMN.....	85
2.6	Experimentos de transmetalção com íons endógenos.....	85
2.7	Determinação das constantes de estabilidade para os complexos.....	85
2.8	Análise dos dados.....	86
3	Resultados e discussão.....	86
4	Considerações finais.....	94
Capítulo 06 - Desenvolvimento de sondas paramagnéticas para MRI: Uma abordagem relaxométrica <i>in vivo</i>.....		95
1	Introdução.....	96
2	Materiais e métodos.....	97
2.1	Obtenção do complexo macromolecular FibPep-dL-(Gd-AAZTAC ₄ COOH) ₄	97
2.2	Análise relaxométrica.....	97
2.3	Estudos <i>in vitro</i> da interação entre o macrocomplexo e fibrina.....	98
2.4	Cultura das células.....	98
2.5	Procedimento cirúrgico para implantação do tumor.....	98
2.6	Geração e processamento de imagens por MRI.....	99
2.7	Análise <i>post-mortem</i>	100
3	Resultados e discussão.....	100
4	Considerações finais.....	106
CONCLUSÕES		107
PERSPECTIVAS.....		109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		111
MATERIAL SUPLEMENTAR.....		125

CONTEXTUALIZAÇÃO

Nesta tese, o estudo de complexos contendo íons paramagnéticos em solução por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) é realizado. Este trabalho foi dividido em um capítulo de revisão da literatura (capítulo 01) focado principalmente nos aspectos históricos que circundam este tema de pesquisa e a teoria básica de relaxação paramagnética. Deste modo, este capítulo possibilita a obtenção do embasamento teórico necessário para a compreensão dos subsequentes cinco capítulos, organizados de acordo com o complexo e a aplicação proposta.

O capítulo 02 apresenta os primeiros resultados provenientes do estudo relaxométrico para compostos de coordenação contendo íons paramagnéticos em meio aquoso. Estes dados experimentais são confrontados com a espectrofotometria no UV-Vis, técnica padrão para o estudo de complexos em solução. Para alcançar estes objetivos, os experimentos são realizados empregando o clássico ligante EDTA, amplamente estudado tanto do ponto de vista experimental quanto teórico. Os resultados obtidos demonstram que a relaxometria é uma técnica viável para o estudo destas espécies, mesmo para complexos incolores. Portanto, é possível inferir que estes resultados possuem uma relevância significativa para a química analítica e inorgânica, pois permitem estudos futuros acerca, por exemplo, do monitoramento de reações químicas envolvendo compostos de coordenação que não possuem a capacidade de absorverem radiação no visível.

O capítulo 03 apresenta os resultados referentes aos estudos realizados para o polissacarídeo quitosana, uma macromolécula com propriedades quelantes. Ao longo deste capítulo, primeiramente são descritos os estudos realizados em solução contendo somente o polissacarídeo e a influência desta macromolécula, em função do pH, sobre os tempos de relaxação. Estes resultados tornam possível o aumento da compreensão acerca do arranjo molecular assumido por este polímero em função da alcalinidade ou acidez do meio. Além do mais, é possível estimarmos de um modo rápido em comparação à metodologia tradicional (turbidimetria) e com uma razoável segurança, o pKa dos grupamentos amino responsáveis pela complexação dos íons metálicos em solução. Dentro deste âmbito, estudos relaxométricos acerca da interação entre quitosanas e íons paramagnéticos são realizados. Os resultados indicam que a relaxometria é uma técnica eficiente para o estudo dos complexos formados em meio aquoso, permitindo inferir sobre o modo de ação deste biopolímero na biosorção de espécies metálicas.

O capítulo 04 apresenta os resultados obtidos para o complexo formado entre o poliálcool sorbitol e íons cúpricos. A relevância deste estudo, situa-se no fato desta espécie ter sido analisada majoritariamente apenas em fase sólida, empregando métodos como a difração de raios-X. Contudo as principais aplicações para este complexo, como por exemplo o revestimento de eletrodos, ocorrem em solução, o que torna a compreensão neste ambiente, um tema de pesquisa de extrema relevância. Neste sentido, os estudos são conduzidos empregando abordagens relaxométricas e de RMN em alta resolução, além de ressonância paramagnética eletrônica. Os resultados demonstram além do pH ideal para a reação de complexação ocorrer, a presença de uma estrutura macromolecular em meios fortemente alcalinos, que não haviam sido descritas até então na literatura.

O capítulo 05 apresenta os resultados acerca da caracterização relaxométrica *in vitro* para os complexos $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ e $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ que demonstram alto potencial para serem usados como agentes de contrastes, fornecendo deste modo, uma substancial contribuição à química bioinorgânica. Os métodos empregados para este estudo consistem no uso de técnicas relaxométricas a campo fixo e variável, RMN em alta resolução, além de experimentos em função do pH. Os resultados alcançados a partir desta abordagem *in vitro* permitem inferir que estes novos complexos apresentam alta relaxividade paramagnética (r_{1p}) em comparação ao complexo precursor $[\text{Gd-AAZTA}]^-$, além de uma baixa reatividade frente a importantes íons endógenos, como por exemplo, os íons Ca^{2+} e Zn^{2+} , permitindo projetá-los como promissores agentes de contraste.

Por fim, o capítulo 06 apresenta os resultados provenientes da aplicação *in vivo* das espécies previamente caracterizadas no capítulo anterior para o diagnóstico precoce do câncer de próstata em camundongos por tomografia de RMN. Dentro deste âmbito, o complexo $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ foi bioconjugado ao peptídeo FibPep, presente em anticorpos aptos a se ligarem à proteína fibrina, que se encontra em alta concentração em regiões afetadas por um crescimento de massa tumoral. Os resultados demonstram que este macrocomplexo apresenta uma elevada relaxividade paramagnética ($r_{1p} = 79,12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), sendo capaz de assinalar inequivocadamente a região afetada pelo câncer de próstata (linhagem tumoral PC-3) e posteriormente sendo majoritariamente eliminado via excreção renal, conforme confirmado por ensaios *post-mortem*.

Capítulo 01

Relaxometria aplicada à compostos de coordenação

1 Introdução

Quando um íon metálico está em solução ele não se encontra isolado, mas sim em interação com as moléculas do solvente e de outros solutos, formando estruturas denominadas compostos de coordenação, complexos metálicos ou simplesmente complexos. Esta classe de compostos é de grande interesse não apenas para a química analítica e inorgânica, mas também para outras áreas, dentre as quais, química orgânica, físico-química, química ambiental, bioquímica, biologia e medicina. Sendo assim, o estudo de complexos em solução possui elevada relevância, por exemplo, na identificação e quantificação de metais pesados em titulações complexométricas e de precipitação (SKOOG et al., 2006), na produção de eletrodepósitos mais aderentes e com menor granulometria (BARBANO et al., 2014) e no desenvolvimento de novos fármacos mais específicos e personalizados (AIME et al., 1998).

Dentro deste âmbito, compostos de coordenação que possuem íons paramagnéticos assumem especial relevância, por exemplo, em pesquisas que visam o desenvolvimento de novos métodos em química analítica (COBRA et al., 2015), o tratamento clínico de doenças relacionadas ao excesso de metais tóxicos no organismo (GYURCSIK; NAGY, 2000), em pesquisas acerca de sensores eletroquímicos (COUTINHO et al., 2009), produção de eletrodepósitos menores e mais firmemente aderidos a superfície do eletrodo (BARBOSA et al., 2005; de OLIVEIRA et al., 2005), em estudos petroquímicos (BARBOSA et al., 2014) e no desenvolvimento de agentes de contrastes para aplicações em MRI (do inglês, *Magnetic Resonance Imaging*) (GUANCI et al., 2015).

Portanto, o principal objetivo desta tese foi a pesquisa de compostos de coordenação contendo íons paramagnéticos em solução aquosa por relaxometria de RMN em baixa resolução. Os estudos de relaxometria por RMN foram realizados empregando sequências de pulsos no estado estacionário, do tipo CWFP (do inglês, *Continuous Wave Free Precession*), que medem simultaneamente as relaxações T_1 (constante de tempo para a relaxação longitudinal) e T_2 (constante de tempo para a relaxação transversal), de maneira rápida, simples e eficiente. Com esta técnica foram analisados desde complexos amplamente estudados com outras técnicas analíticas, para demonstrar a potencialidade da relaxometria de RMN em química analítica e bioinorgânica, até complexos macromoleculares de relevância biológica e interesse médico.

2 Aplicação da relaxometria ao estudo de compostos de coordenação em solução

Nos experimentos de RMN, após a excitação, os spins passam por dois processos de relaxação simultâneos e distintos. Estes processos são conhecidos como relaxação longitudinal, que corresponde ao retorno da magnetização resultante ao eixo-z e transversal, que corresponde ao desaparecimento desta magnetização no plano transversal (xy). Estes mecanismos de relaxação, longitudinal e transversal, são caracterizados pelas constantes de tempo T_1 e T_2 , respectivamente.

Estas constantes dependem, dentre outros fatores, da mobilidade molecular e da presença de íons ou substâncias paramagnéticas. Dentre os mecanismos, o causado por entidades paramagnéticas é o mais eficiente e dominante na maioria das vezes em que se encontra presente. Este efeito se deve ao campo magnético local (\mathbf{B}_{loc}), altamente eficiente originado pelos elétrons desemparelhados destas espécies, que possuem momento magnético centenas de vezes maiores que o momento magnético nuclear (GIL; GERALDES, 1986).

2.1 Efeito dos íons paramagnéticos sobre a relaxação do solvente

Em 1946, Bloch, Hansen e Packard, analisando uma solução aquosa contendo íons férricos, fizeram a primeira observação do efeito dos íons paramagnéticos sobre a relaxação dos prótons pertencentes ao solvente.

Em 1948, Bloembergen, Purcell e Pound propuseram que a forte redução do tempo de relaxação longitudinal para os hidrogênios do solvente seja causada pelo movimento browniano do momento magnético dos elétrons desemparelhados pertencentes aos íons paramagnéticos, de acordo com a equação 1.1.

$$\frac{1}{T_1} = \frac{12\pi\gamma_p^2\mu_{ef}^2N_{ion}\eta}{5kT} \quad (1.1)$$

Nesta equação, T_1 corresponde ao tempo de relaxação longitudinal, γ_p à razão magnetogirica do próton, μ_{ef} ao momento magnético nuclear efetivo para o íon paramagnético em estudo, N_{ion} ao número de íons paramagnéticos por centímetro cúbico da solução, η à viscosidade da solução, κ à constante de Boltzmann e T à temperatura em Kelvins.

Em 1952, Conger e Selwood avaliaram a relação de proporcionalidade entre os momentos magnéticos eletrônicos e os tempos de relaxação T_1 e T_2 , para uma série de íons paramagnéticos. Todas as medidas foram realizadas empregando soluções com elevada concentração para o íon metálico. Estes autores observaram uma correlação entre o momento magnético do íon paramagnético e a relaxação dos prótons pertencentes ao solvente.

Em 1953, Zimmerman publicou o primeiro artigo sobre o efeito de complexos contendo íons paramagnéticos sobre a relaxação dos prótons pertencentes ao solvente. Ele estudou a complexação de V^{3+} em diversas concentrações de ácido oxálico. Neste estudo, ele observou que a razão T_1/T_2 aumenta quando o número de coordenação do metal é atingido.

Em 1954, o mesmo autor estudou o comportamento relaxométrico de soluções aquosas contendo íons Mn^{2+} . Ele propôs que a forte redução sobre os tempos de relaxação do solvente ocorre devido a formação da espécie $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$, a qual possui hidrogênios capazes de serem trocados rapidamente pelos hidrogênios do solvente.

Em 1956, Bloembergen analisou a variação anômala da razão T_1/T_2 do Mn^{2+} (próximo a 7,1) e Gd^{3+} (próximo a 2,5) em solução, em comparação aos íons Fe^{3+} e Cu^{2+} que possuem esta razão próxima à unidade. Ele atribuiu essas discrepâncias, especialmente em alto campo, aos tempos de relaxação associados aos spins dos elétrons, que diminuem os valores de T_2 e consecutivamente aumentam a razão T_1/T_2 .

Em 1959, Morgan & Nolle estudaram a influência da frequência do campo magnético sobre a relaxação dos hidrogênios das soluções contendo Cr^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} e Gd^{3+} . Estes autores concluíram que os valores para os tempos de relaxação são menores em campos magnéticos mais elevados, sugerindo que o momento magnético efetivo, o tempo de relaxação para o spin proveniente do elétron, e a taxa de troca entre os spins provenientes do próton e do elétron sejam dependentes do campo.

Em 1973, Schluter & Weiss propuseram as primeiras aplicações em química analítica. Estes autores usaram a correlação linear entre as taxas de relaxação longitudinal ($1/T_1$) e transversal ($1/T_2$) e a concentração de íons paramagnéticos em solução para titulação de íons paramagnéticos e na titulação indireta de íons diamagnéticos (SCHLUTER; WEISS, 1973).

Outras aplicações envolvendo o uso da relaxometria no estudo de íons paramagnéticos em química analítica foram recentemente introduzidas. Nunes et al. (2012) demonstraram que a relaxometria de RMN em aparelhos de baixo campo (20 MHz para o ^1H) pode ser usada para monitorar *in situ* a eletrodeposição de cobre. Gomes et al. (2014) demonstraram que o campo magnético do espectrômetro de RMN de baixo campo interfere na velocidade da reação de eletrodeposição de cobre, quando esta é analisada *in situ*. Finalmente, em 2015, Cobra et al. demonstraram que a relaxometria pode ser um método analítico rápido e eficiente para a determinação da constante do produto de solubilidade (K_{ps}) para íons paramagnéticos em solução, e desta forma monitorar a sua precipitação em função do pH da solução.

2.2 Estado da arte para o mecanismo de relaxação paramagnética

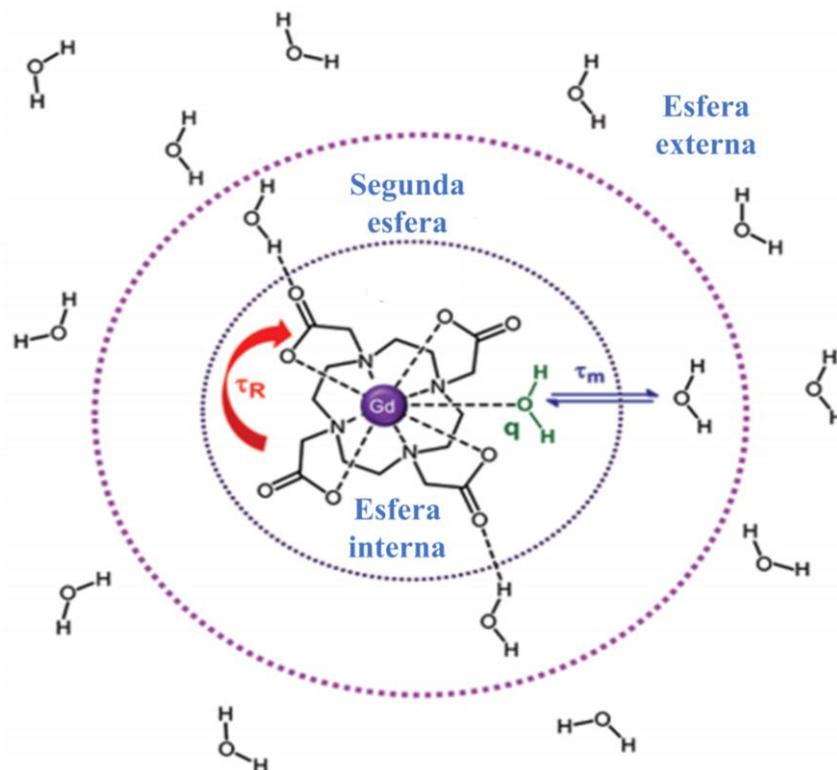
Na presença de um agente paramagnético em solução, a taxa de relaxação observada experimentalmente, $(1/T_{i,obs})$, depende tanto da contribuição diamagnética, $(1/T_i)d$, quanto da paramagnética, $(1/T_i)p$, de acordo com a equação 1.2 (LAUFER, 1987).

$$(1/T_{i,obs}) = (1/T_i)d + (1/T_i)p \quad i = 1, 2 \quad (1.2)$$

Como o momento magnético eletrônico gera um campo magnético local intenso nas vizinhanças do centro paramagnético, a relaxação paramagnética corresponde ao principal mecanismo de relaxação para os hidrogênios (ou prótons) envolvidos em sua solvatação. Uma vez que estes campos diminuem rapidamente com a distância ($1/r^3$), seu efeito sobre a relaxação dos hidrogênios pertencentes às outras moléculas do solvente ocorre pela troca química entre os hidrogênios ligados aos íons solvatados e da solução, pela difusão das moléculas do solvente e do complexo, bem como por intermédio de interações químicas específicas que mantêm as moléculas do solvente ligadas ao centro metálico (GIL; GERALDES, 1986).

Deste modo, o processo de relaxação paramagnética pode ser explicado, a princípio, por dois mecanismos que geram contribuições distintas: O mecanismo de relaxação na esfera interna, IS, (do inglês, *Inner Sphere*) e na esfera externa, OS, (do inglês, *Outer Sphere*) conforme apresentado na figura 1.1.

Figura 1.1 - Representação dos mecanismos de relaxação na esfera interna (IS) e externa (OS) para um complexo contendo um íon paramagnético em solução. Nesta figura τ_M corresponde ao tempo de permanência de uma molécula de água ligada ao centro paramagnético, q ao número de moléculas de água coordenadas ao metal e τ_R ao tempo de correlação rotacional do complexo.



Fonte: MANÚS, L.M. et al., Analytical Methods for Characterizing Magnetic Resonance Probes. *Analytical Chemistry*, 84, 6278-6287, 2012. (Adaptada e traduzida).

O mecanismo na esfera interna refere-se à troca química em que uma ou mais moléculas de água deixam a primeira esfera de coordenação do íon paramagnético e são substituídas por outras moléculas. O tempo no qual ocorre esta troca é denominado tempo de residência, simbolizado por τ_M . Outro parâmetro que afeta diretamente o mecanismo da esfera interna, corresponde ao número de moléculas de água diretamente coordenadas ao centro metálico, representado pela letra q . De forma ampla, quanto maiores os valores associados aos parâmetros τ_M e q , mais eficiente será a relaxividade do complexo contendo o íon paramagnético em solução (Manús et al., 2012).

A segunda contribuição para a relaxação paramagnética advém do mecanismo de relaxação na esfera externa (OS). Este mecanismo, por sua vez, refere-se à interação dipolar (através do espaço) a longa distância entre o spin do elétron pertencente ao íon

paramagnético e o spin nuclear dos hidrogênios pertencentes ao solvente. De forma mais precisa, esta contribuição pode ser dividida, levando-se em consideração às moléculas de água que não estão diretamente coordenadas ao íon paramagnético, mas encontram-se fortemente atreladas ao complexo por interações de hidrogênio, com por exemplo, os grupamentos carboxílicos pertencentes aos ligantes. A esta parcela de contribuição ao mecanismo OS, denomina-se contribuição devido a relaxação na segunda esfera de coordenação.

Capítulo 02

Análise relaxométrica de complexos de EDTA com íons paramagnéticos em solução aquosa

Capítulo baseado em:

KOCK, F. V. C.; COLNAGO, L. A. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ions complexes in solution: An alternative to spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v. 122, p. 144-148, 2015.

1 Introdução

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido uma poderosa ferramenta utilizada para estudar a estrutura e a dinâmica de compostos orgânicos e inorgânicos (ROLLA et al., 2013; FUSARO et al., 2014; KOYLU et al., 2009). No entanto, a maioria destas aplicações usam espectrômetros de alta resolução caros e sofisticados, baseados em ímãs supercondutores, inviabilizando análises de rotina quando comparada com as espectroscopias no ultravioleta e visível (UV-Vis) e infravermelho.

Nas últimas décadas, espectrômetros de bancada baseados em ímãs permanentes foram desenvolvidos para aplicações em média e baixa resolução (ZALESSKIY et al., 2014). Recentemente, espectrômetros de bancada de média resolução de 40 a 80 MHz ($B_0 = 1$ a 2 T) foram fabricados por várias empresas e estão abrindo uma nova era para a análise de rotina envolvendo a RMN (ZIENTEK et al., 2014). Estas análises em média resolução são normalmente baseadas no espectro no domínio da frequência, usando deslocamento químico, acoplamento spin-spin e área de sinal, semelhante à análise de RMN em alta resolução (KOOS et al., 2016).

Espectrômetros de RMN em baixo campo, normalmente de 0,05 a 0,50 T (2 a 20 MHz para ^1H), apresentam baixa homogeneidade ($\Delta B_0 > 10$ ppm), usam ímãs permanentes e são rotineiramente aplicados em análises quantitativas (de ANDRADE et al., 2011; AZEREDO et al., 2000). Nestes espectrômetros todas as amostras fornecem um único e amplo sinal no domínio das frequências, e desta forma as análises são realizadas com o sinal no domínio do tempo, usando para esta finalidade o decaimento livre de indução (FID, do inglês *Free Induction Decay*) ou sinais de spin-eco (de ANDRADE et al., 2011; AZEREDO et al., 2000). Esta espectroscopia de RMN é conhecida como RMN no domínio do tempo ou RMN em baixa resolução (RMN-BR) (PEREIRA et al., 2015).

Os experimentos envolvendo a RMN-BR são muito mais simples e diretos comparados aos experimentos empregando a técnica em média e alta resolução. Os métodos envolvendo a relaxometria por RMN-BR têm sido empregados em processos industriais e acadêmicos há mais de quatro décadas (CONWAY; EARLE, 1963), substituindo métodos laboriosos e tradicionais, por exemplo em pesquisas de alimentos (de ANDRADE; COLNAGO, 2012; COLNAGO et al., 2007) e petroquímica (BARBOSA et al., 2013; SILVA et al., 2012).

Adicionalmente ao uso do FID e das amplitudes provenientes dos ecos, as análises por RMN-BR podem ser realizadas utilizando os tempos de relaxação longitudinal (T_1), transversal (T_2) e medidas de difusão (COLNAGO et al., 2007; SONG et al., 2009). No entanto, T_1 raramente é utilizado, uma vez que a sequência de aquisição padrão, denominada inversão-recuperação (IR), é longa (dezenas de minutos) quando comparada aos poucos segundos necessários para a aquisição de T_2 , por intermédio da aplicação da sequência de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (COLNAGO et al., 2014). Deste modo, frequentemente as informações que poderiam ser adquiridas por intermédio de T_1 não são contempladas em uma análise relaxométrica, o que pode levar certamente a uma perda significativa de informação acerca de um sistema.

No intuito de se contornar esta limitação, recentemente, foram introduzidos alguns métodos rápidos de aquisição simultânea para os tempos de relaxação T_1 e T_2 em um único experimento (de ANDRADE, 2011; AZEREDO et al., 2000) baseados no regime de precessão livre no estado estacionário, SSFP (do inglês, *Steady State Free Precession*), como as sequências CWFP (do inglês, *Continuous Wave Free Precession*) e CP-CWFP (do inglês, *Carr Purcell Continuous Wave Free Precession*). Estas sequências de pulsos possibilitam uma rápida aquisição de ambos os tempos de relaxação, proporcionando uma análise relaxométrica completa em campo fixo para um sistema aquoso.

Portanto, o principal objetivo deste capítulo foi demonstrar a potencialidade das sequências de pulsos no estado estacionário para o estudo de compostos de coordenação contendo íons paramagnéticos em solução aquosa. Os resultados com o clássico ligante EDTA demonstram que o emprego da relaxometria com RMN-BR é uma alternativa rápida, simples e eficiente para o estudo de complexos paramagnéticos em solução se comparado a outros métodos analíticos usados para esse fim, como a espectrofotometria e titulação potenciométrica.

2 Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Os reagentes EDTA, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ com 98% de pureza mínima foram adquiridos da SIGMA-ALDRICH. O $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi adquirido da Mallinckrodt chemical com 97 % de pureza mínima, o $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ da Synth com 98 % de pureza mínima, o HCl e NaOH foram adquiridos da Vetec Química Fina, com 37 % e 99% de

pureza mínima, respectivamente. A água foi originada em uma unidade de purificação Milli-Q, Millipore Corporation, com 18,00 M Ω de condutividade elétrica.

2.2 Métodos

2.2.1 Medidas de pH

As medidas de pH foram realizadas usando um pHmetro, GEHAKA, modelo PG1800. Antes da realização das análises, o pHmetro foi calibrado com soluções pH 4 (biftalato de potássio), 7 (fosfato de potássio/fosfato de sódio) e 10 (bicarbonato de potássio/carbonato de sódio), tendo o seu eletrodo de vidro, sempre limpo com água milli-Q. Para estas medidas, um volume de 3mL da solução contendo o complexo a ser analisado foi inicialmente colocado em um tubo Falcon. O pH foi ajustado para o valor desejado. Após esta operação, o sistema foi diluído até 5 mL, e o pH novamente checado, antes de ser analisado por relaxometria. Deste modo, a concentração para o complexo em cada ponto experimental foi mantida constante.

2.2.2 Espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-Vis)

As análises de UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro, Perkin-Elmer, modelo LAMBDA 25. As medidas foram realizadas usando cubetas de plástico com 1 cm de caminho óptico. Os espectros foram obtidos entre 1000 a 500 nm com uma velocidade de 480 nm/min. Para fins de correlacionar com os valores obtidos por relaxometria, foram sempre coletados os resultados referentes a absorbância máxima, para cada complexo, em cada valor de pH.

2.2.3 Medidas de relaxometria (RMN-BR)

Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro de 0,23 T (9,00 MHz para o ^1H) modelo SLK 100, Spinlock e em um espectrômetro de 0,47 T (19,90 MHz para o ^1H) modelo minispec mq20, BRUKER. As análises foram realizadas a 28.0 ± 0.1 °C.

2.2.3.1 Aquisição de T_1 (IR) e T_2 (CPMG)

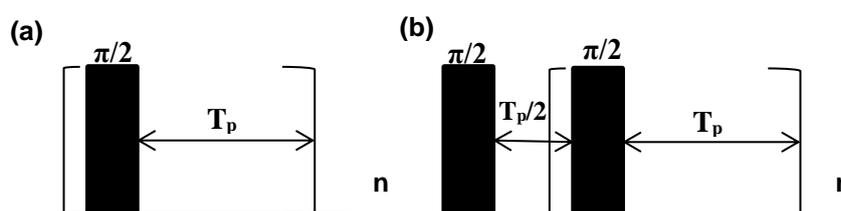
Os valores para os tempos de relaxação longitudinal (T_1) foram obtidos usando a sequência de pulsos padrão inversão-recuperação (IR) com pulsos π e $\pi/2$, de 4,68 e 2,34 μs , respectivamente. T_1 foi calculado usando 36 experimentos de IR, com o tempo entre pulsos distribuídos logaritmicamente entre 0,1 a 10 ms. Os tempos de relaxação

transversal (T_2) foram obtidos com a sequência de pulsos padrão CPMG, aplicando pulsos π e $\pi/2$, de 4,68 e 2,34 μs , respectivamente; tempo de eco de 0,80 ms, tempo de reciclagem de 5 s, 4 scans e 2500 (para soluções contendo íons Mn^{2+}) e 30000 (para soluções contendo os íons Fe^{3+} e Cu^{2+}) ecos. Tanto os valores de T_1 quanto os valores de T_2 foram obtidos pelo ajuste monoexponencial das curvas de decaimento do sinal de RMN em função do tempo (τ), usando o software Origin[®], versão 9.0.

2.2.3.2 Sequências de pulsos rápidas (CWFP e CP-CWFP)

O método CWFP consiste em uma variação das sequências de pulsos de precessão livre no estado estacionário, SSFP (do inglês, *Steady State Free Precession*). O regime CWFP é alcançado quando um trem de pulsos de radiofrequência igualmente espaçado com um tempo de pulso $T_p < T_2^*$ (figura 2.1a) é aplicado ao sistema de spin (AZEREDO et al., 2000; VENÂNCIO et al., 2005).

Figura 2.1 - a) Diagrama da sequência de pulsos CWFP com n pulsos de 90° separados por um tempo T_p e b) Sequência de pulsos CP-CWFP, com um pulso de 90° para refocalização, separado por um tempo $T_p/2$ entre o primeiro e o segundo pulso.



Fonte: KOCK. F.V.C.; COLNAGO. L.A. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ions complexes in solution: An alternative to spectrophotometry. **Microchemical Journal**, V. 122, p. 144-148, 2015. Imagem reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier, copyright: 4190380966183.

A figura 2.2 apresenta a magnitude do sinal de RMN-CWFP submetido a um trem de pulsos de 90° , $T_p < T_2^*$ e um ângulo de precessão $\psi = (2n+1)\pi$, onde n é um número inteiro (Azeredo et al., 2000). Após o primeiro pulso, a amplitude do sinal é proporcional a M_0 . A partir do segundo pulso, a amplitude do sinal oscila a cada novo pulso e decai até um estado quasi-estacionário, QSS (do inglês, *Quasi-Stationary State*). O estado QSS é observado quando a oscilação entre os pulsos desaparece. A partir do estado QSS, o sinal decai continuamente com uma constante de tempo T^* até atingir uma amplitude constante M_{ss} (do inglês, *Steady State*) que consiste no estado estacionário. A amplitude de M_{ss} e T^* dependem de ambos os tempos de relaxação de acordo com as equações 1.1 e 1.2:

$$M_{SS} = \frac{M_0 \times T_2}{(T_1 + T_2)} \quad (1.1)$$

$$T^* = \frac{2 \cdot T_1 \cdot T_2}{T_1 + T_2} \quad (1.2)$$

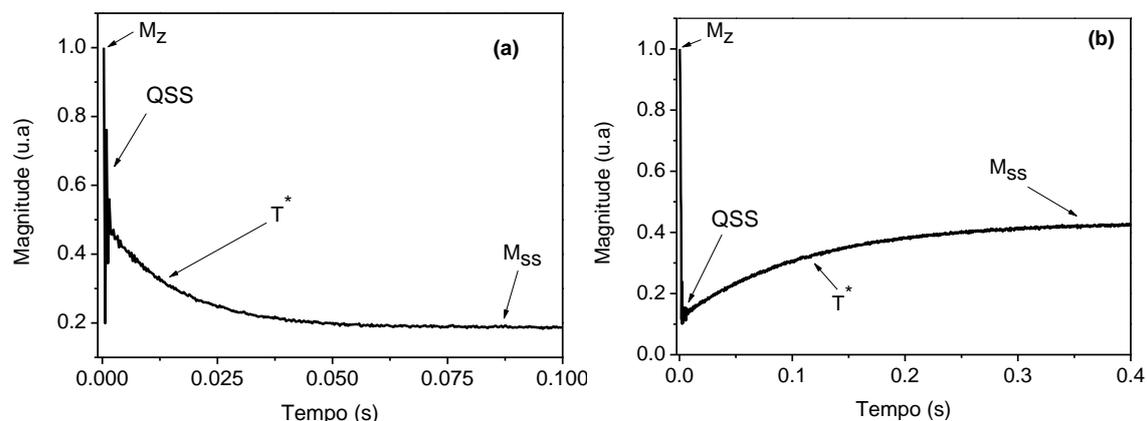
Ao rearranjarmos as expressões acima, podemos obter as equações 1.3 e 1.4:

$$T_1 = \frac{\frac{T^*}{2}}{\frac{M_{SS}}{M_0}} \quad (1.3)$$

$$T_2 = \frac{T^*/2}{1 - (M_{SS}/M_0)} \quad (1.4)$$

Com os valores de M_0 , M_{SS} e T^* obtidos a partir do sinal de CWFP (figura 2.2a), os valores de T_1 e T_2 podem ser obtidos simultaneamente usando as equações 1.3 e 1.4, respectivamente.

Figura 2.2 - a) Sinal CWFP para uma amostra com $T_1/T_2 = 5$. b) Sinal CP-CWFP para uma amostra com $T_1/T_2 = 1$.



Fonte: Kock, F.V.C.; Colnago, L.A. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ions complexes in solution: An alternative to spectrophotometry. *Microchemical Journal*, V. 122, p. 144-148, 2015. Imagem reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier, copyright: 4190380966183.

A sequência CWFP não é indicada para a medida dos tempos de relaxação, quando $T_1 \sim T_2$, pois a diferença na amplitude entre os estados QSS e M_{SS} é mínima, o que dificulta o ajuste exponencial empregado para a determinação de T^* (de ANDRADE et al., 2012). Para esta situação, o emprego da sequência de pulsos conhecida como CP-CWFP é mais recomendada. Esta sequência difere da CWFP somente pelo uso de um intervalo $T_p/2$ entre o primeiro e o segundo pulso (figura 2.1b). O intervalo de tempo após o segundo pulso é igual à T_p , como ocorre na sequência CWFP. A figura 2.2b mostra o sinal CP-

CWFP para uma amostra com $T_1 \sim T_2$ com uma grande faixa dinâmica entre QSS e M_{ss} , tornando melhor o ajuste para a obtenção de T^* .

Na sequência de pulsos CWFP utilizou-se um trem de pulsos de 90° com duração de $2,32 \mu\text{s}$, separados por um intervalo de tempo T_p de $300 \mu\text{s}$, uma frequência de offset de 5 KHz , equivalente a um ângulo de precessão $\psi = 3\pi$, 5 s de tempo de reciclagem, 4 scans e 2500 (para soluções contendo íons Mn^{2+}) e 30000 (para soluções contendo os íons Fe^{3+} e Cu^{2+}) ecos. Por sua vez, os parâmetros para a sequência CP-CWFP foram idênticos aos empregados na sequência CWFP, com exceção do tempo entre o primeiro e o segundo pulso, que foi de $150 \mu\text{s}$.

Os valores de T_1 e T_2 foram calculados empregando as equações 1.3 e 1.4 e as magnitudes dos sinais de ressonância após o primeiro pulso (M_0) e no estado estacionário (M_{ss}). O valor de T^* foi obtido com o ajuste monoexponencial do decaimento do sinal entre QSS e M_{ss} usando para esta finalidade o software Origin[®], versão 9.0.

3 Resultados e discussões

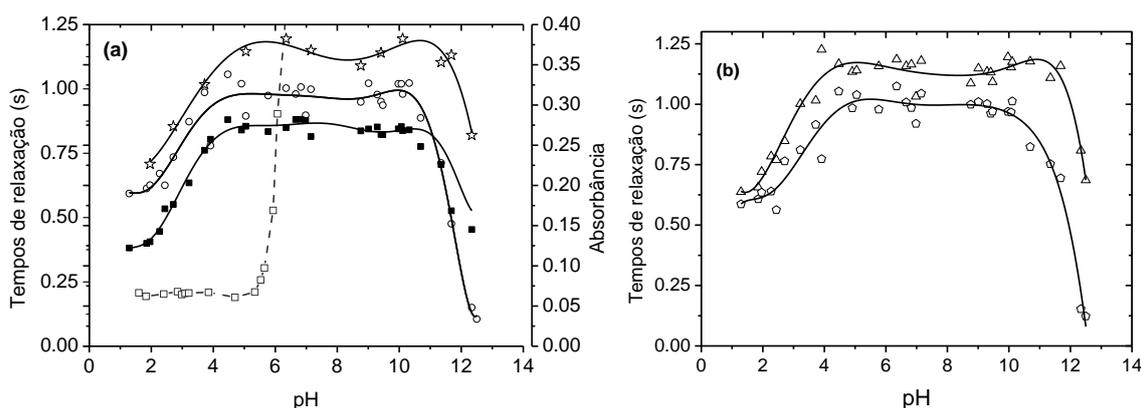
O primeiro ligante estudado foi o EDTA, por este ser um dos principais agentes complexantes aplicado em diversas finalidades na química analítica (SKOOG et al., 2006) e eletroquímica (BARBANO et al., 2015; BARBOSA et al., 2005). Estudou-se o efeito da interação EDTA-íons paramagnéticos sobre os valores de T_1 e T_2 para o solvente (água) em função do pH, em campo magnético e temperaturas fixas.

A figura 2.3(a) apresenta a variação da absorvância máxima (■), T_1 (★) e T_2 (○) medidos simultaneamente pela sequência de pulsos CWFP e CP-CWFP para uma solução aquosa contendo o complexo Cu(II)-EDTA e T_2 (□) para uma solução aquosa de Cu^{2+} , em função do pH. As linhas sólidas correspondem à ajustes polinomiais de 6° ordem, e são empregadas apenas para demonstrar o comportamento dos dados obtidos experimentalmente. A linha tracejada corresponde a um ajuste sigmoide para os valores de T_2 obtidos para a solução aquosa contendo apenas íons cúpricos. A figura 2.3(b) apresenta a variação de T_1 (Δ) e T_2 (○) obtidos com as sequências tradicionais IR e CPMG, para a mesma solução abordada na figura 2.3(a) para fins apenas de comparação.

A partir da análise destes dados experimentais, é possível notar que a absorvância apresenta um aumento de $0,12$ a $0,28$, entre o pH 1 e 4 , respectivamente, o que pode ser atribuído a uma progressiva mudança de ligantes, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ para Cu(II)-EDTA, na esfera interna de coordenação da espécie paramagnética Cu^{2+} . Posteriormente, a

absorbância se mantém praticamente constante entre o pH 4 e 10, indicando que o quelato Cu(II)-EDTA apresenta alta estabilidade nesta faixa de pH. Aumentando a alcalinidade, a absorbância diminui de aproximadamente 0,26 para 0,14 em pH 12. Além do mais, foi também observado que os valores correspondentes a absorbância em pH alcalino são próximos aos valores obtidos em meio ácido, pH 1. A baixa absorbância em pH elevado tem sido explicada pela hidrólise alcalina do complexo em solução, e possivelmente da concomitante formação da estrutura, $[\text{CuEDTA}(\text{OH})]^{3-}$, conhecida como hidroxocomplexo (BHAT; KRISHNAMURTHY, 1976).

Figura 2.3 - a) Variação da absorbância máxima (■), T_1 (★) e T_2 (○) medidos com a sequência de pulsos CP-CWFP para a solução aquosa de Cu(II)-EDTA e T_2 (□) para a solução aquosa de Cu^{2+} , em função do pH. Em todos os experimentos, a concentração inicial da espécie Cu^{2+} foi de $3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. b) Variação de T_1 (△) e T_2 (○) para as soluções estudadas na figura 2.3(a), contudo empregando as sequências IR e CPMG, respectivamente. As linhas sólidas correspondem à ajustes polinomiais de 6º ordem e a linha tracejada corresponde a um ajuste sigmoide. Estes ajustes foram empregados unicamente para guiar a análise dos dados obtidos experimentalmente.



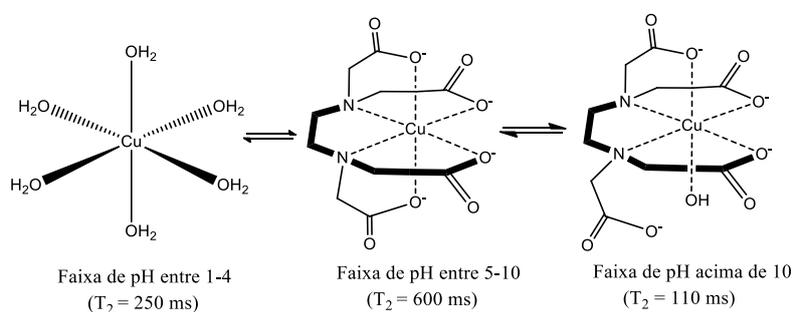
Fonte: Kock, F.V.C.; Colnago, L.A. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ions complexes in solution: An alternative to spectrophotometry. **Microchemical Journal**, V. 122, p. 144-148, 2015. Imagem reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier, copyright: 4190380966183.

Tanto os valores de T_1 quanto de T_2 para o complexo Cu(II)-EDTA, em função do pH, obtidos pelos métodos CWFP ou CP-CWFP (figura 2.3a) quanto aqueles obtidos com a utilização das sequências convencionais (figura 2.3b) foram similares. Contudo, os métodos CWFP ou CP-CWFP fornecem ambos os tempos de relaxação em um tempo consideravelmente menor se comparado com as medidas de IR, que podem levar dezenas de minutos. Desta forma, fica evidente a vantagem em se aplicar sequências de pulsos de aquisição simultâneas no estado estacionário para o estudo de complexos em solução.

Adicionalmente, os perfis relaxométricos obtidos a partir de T_1 e T_2 (figuras 2.3a e 2.3b) mostram variações similares ao perfil obtido a partir dos estudos realizados com

a metodologia padrão (UV-Vis). T_1 aumenta de 71 a 1150 ms e T_2 aumenta de 59 a 890 ms, entre os pH 1 e 5. Tanto os valores de T_1 quanto de T_2 , são praticamente constantes entre os pH 5 e 10 e diminuem para 820 e 110 ms em pH 12, respectivamente. Estes resultados são consistentes com a hipótese de mudança na estrutura do complexo em decorrência da troca de ligantes em solução e da hidrólise em meio alcalino, formando a estrutura denominada hidroxocomplexo em consonância com (BHAT; KRISHNAMURTHY, 1976). Além do mais, em baixos valores de pH, o tempo de relaxação para a solução de Cu^{2+} é próximo a metade ($T_2 = 250$ ms) da solução na presença do ligante EDTA ($T_2 = 600$ ms). Esta observação pode ser atribuída ao equilíbrio entre o complexo Cu(II)-EDTA e o complexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ em solução. Devido ao efeito quelato, o Cu^{2+} adquire maior estabilidade ligando-se ao EDTA ($\beta = 6,3 \times 10^{-18}$) (SKOOG et al., 2006). Deste modo, é possível inferir que a estrutura resultante apresenta uma menor quantidade de moléculas de água coordenadas diretamente ao centro paramagnético, aumentando, portanto, os valores para o tempo de relaxação observado, conforme esquematizado na figura 2.4. Nesta figura também é possível notar que a coordenação do grupamento hidroxila, resultante do princípio de hidrólise alcalina, ao centro paramagnético, proporciona uma redução sobre os valores correspondente a T_2 , uma vez que a taxa de troca química entre este grupamento e o meio (que apresenta alta concentração para esta espécie) é muito eficiente, além de proporcionar em casos mais extremos, a quebra do complexo.

Figura 2.4 – Possíveis estruturas assumidas em solução para as espécies complexas $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (esquerda), Cu(II)-EDTA (centro) e o hidroxocomplexo (direita) acima de pH 10 (início da hidrólise alcalina) em relação a faixa de pH e os valores obtidos para o tempo de relaxação transversal, T_2 .



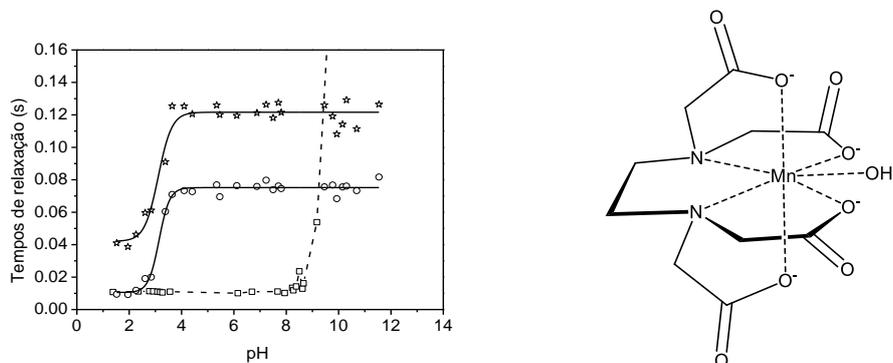
Fonte: Autoria própria.

A figura 2.5 apresenta os valores de T_1 (★) e T_2 (○) obtidos com a sequência de pulsos CP-CWFP para uma solução aquosa contendo o complexo Mn(II)-EDTA e T_2 (□)

para uma solução aquosa de Mn^{2+} , em função do pH. As linhas sólidas e tracejadas correspondem ao ajuste sigmoide para os dados de T_1 e T_2 obtidos para as soluções contendo o complexo Mn(II)-EDTA e $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$, respectivamente. Esses resultados demonstram o potencial da relaxometria para o estudo de compostos de coordenação em solução para complexos que não podem ser estudados por espectrofotometria, pois não absorvem no visível.

Os valores de T_1 e T_2 para a solução do complexo Mn(II)-EDTA apresentam uma rápida faixa de transição entre os valores de pH 2 ($T_1 = 400$ ms e $T_2 = 100$ ms) e 4 ($T_1 = 130$ ms e $T_2 = 70$ ms). Estes aumentos de T_1 e T_2 podem ser atribuídos a remoção da água na esfera interna de coordenação do complexo $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ em decorrência de sua reação com o ligante EDTA, para gerar a espécie Mn(II)-EDTA, conforme discutido previamente. Os valores de T_1 e T_2 foram praticamente constantes para todos os outros valores de pH, indicando que após a complexação com o ligante EDTA, o quelato resultante não apresenta uma hidrólise alcalina ou mesmo a formação de um hidroxocomplexo, mesmo em elevados valores de pH. Além do mais, é importante destacar que os baixos valores obtidos tanto para T_1 ($\approx 0,12$ s) quanto para T_2 ($\approx 0,07$ s) em uma faixa tão ampla de pH, é um forte indicativo de que existem moléculas de água diretamente coordenadas ao íon paramagnético e em uma intensa troca química com o solvente. Portanto, é possível sugerir que complexos envolvendo a espécie paramagnética Mn^{2+} (configuração eletrônica d^5), apresentam elevados momentos magnéticos eletrônicos que podem resultar em uma eficiente interação dipolar com o momento magnético associado aos prótons do solvente. Estas observações experimentais estão em consonância com a literatura (ROLLA et al., 2013) e refletem também a capacidade deste íon de formar complexos com um alto número de coordenação devido ao tamanho iônico para este cátion ser maior quando comparado aos íons cúpricos. Portanto, os íons Mn^{2+} possivelmente assumem uma conformação heptacoordenada, com uma molécula de água ocupando a sétima posição no quelato, conforme proposto na figura 2.5(b) (OAKES; SMITH, 1981; SMITH et al., 2017). Contudo, é imprescindível cautela neste ponto, especialmente por se tratar de meios aquosos, no qual evidentemente a existência de equilíbrios entre espécies com diferentes estados de hidratação e conseqüente número de coordenação é factualmente possível.

Figura 2.5 - (a) Variação de T_1 (★) e T_2 (○) medidos simultaneamente pela sequência de pulsos CP-CWFP para uma solução aquosa de Mn(II)-EDTA e T_2 (□) para uma solução aquosa de Mn^{2+} , em função do pH. Em todos os experimentos, a concentração inicial do Mn^{2+} foi $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As linhas sólidas e tracejadas correspondem ao ajuste sigmoide para os dados relaxométricos obtidos. (b) Possível estrutura química para o complexo Mn(II)-EDTA em meio aquoso, em consonância com Oakes & Smith, 1981 e Islam et al., 2017.



Fonte: Kock, F.V.C.; Colnago, L.A. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ions complexes in solution: An alternative to spectrophotometry. **Microchemical Journal**, V. 122, p. 144-148, 2015. Imagem reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier, copyright: 4190380966183.

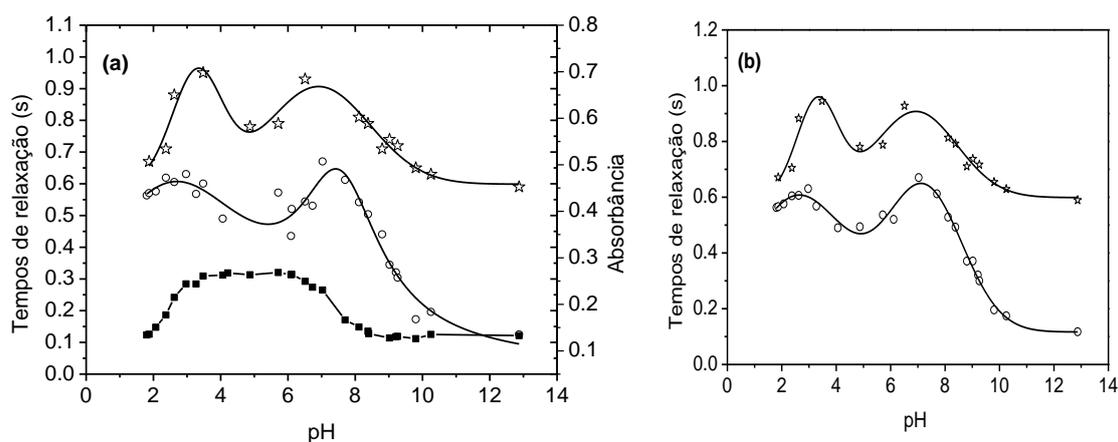
Na figura 2.6 encontra-se uma comparação entre o perfil obtido com as medidas de absorvância e a relaxometria para uma situação mais complexa, desta vez, envolvendo uma mistura de ligantes dentro de um único sistema. A figura 2.6(a) apresenta a variação do valor máximo da absorvância (□) e os valores para T_1 (★) e T_2 (○) obtidos com o emprego da sequência de pulsos CP-CWFP para soluções de $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$, Cu(II)-EDTA e $(NH_4)_2SO_4$ nas concentrações iniciais de $3,3 \times 10^{-3}$, $6,6 \times 10^{-3}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, em função do pH. A figura 2.6(b) apresenta a variação para os tempos de relaxação T_1 (★) e T_2 (○) obtidos com as sequências tradicionais, para o mesmo sistema descrito anteriormente. As linhas sólidas correspondem ao ajuste polinomial de 6º ordem para os dados obtidos experimentalmente, somente para guiar a análise dos resultados.

A absorvância apresenta um aumento de 0,13 para 0,24, entre os valores de pH 1 e 3, respectivamente. Este aumento pode ser atribuído a mudança de ligantes na esfera interna de coordenação para o íon Cu^{2+} , de $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ para Cu(II)-EDTA. Conforme apresentado na figura 2.3(a), a absorvância é praticamente constante entre os pH 4 e 6, confirmando a presença da estrutura complexa estável Cu(II)-EDTA, em solução. Acima de pH 6, a absorvância diminui de aproximadamente 0,26 para 0,13 em pH 10 e posteriormente permanece constante até pH 12. Este decaimento nos valores de

absorbância em pH 6, pode estar associado a formação de estruturas amínicas complexas, como $[\text{CuEDTA.NH}_3]^{2-}$, em consonância com a literatura (BHAT; KRISHNAMURTHY, 1976).

Interessantemente, os valores de T_1 e T_2 obtidos com a aplicação da sequência de pulsos CP-CWFP (figura 2.6(a)) e com IR e CPMG (figura 2.6(b)) demonstram a presença de dois picos em função do pH. Estes dois picos, podem ser relacionados a diferentes estruturas complexas conforme descritas previamente. O primeiro pico, entre o pH 3 ($T_1 = 1,00$ s e $T_2 = 0,81$ s) e 4 ($T_1 = 1,17$ s e $T_2 = 1,05$ s) corresponderia a formação da espécie Cu(II)-EDTA, em solução. Estes resultados estão em acordo com o patamar obtido a partir dos dados de absorbância na faixa compreendida entre os valores de pH 3 e pH 6, e pode ser comprovado com base nos dados obtidos a partir da espectroscopia eletrônica, como o aumento da absorbância (figura 2.6(a)) e o deslocamento de comprimento de onda de 800 nm para 600 nm. Após o pH 4, os tempos de relaxação decaem e um segundo pico em pH 7 ($T_1 = 1,18$ s e $T_2 = 1,04$ s) atribuído a gradual presença do ligante amino na esfera interna de coordenação do Cu^{2+} é formado.

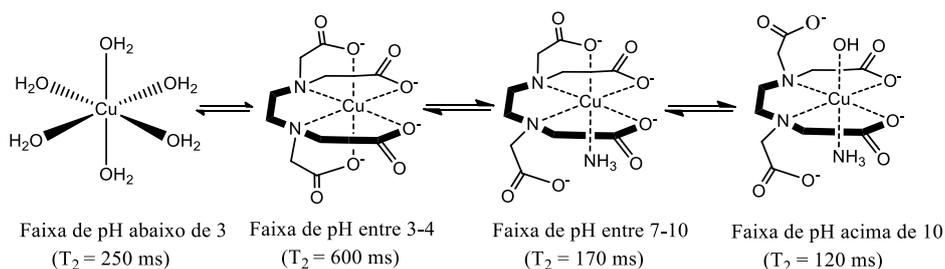
Figura 2.6 - a) Variação dos valores para absorbância máxima (■), T_1 (★) e T_2 (○) medidos com a sequência de pulsos CP-CWFP para uma solução aquosa de Cu(II)-EDTA, na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 mol.L^{-1}), em função do pH. A concentração inicial de Cu^{2+} foi de $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. b) Variação dos valores de T_1 (★) e T_2 (○) para as soluções da figura 2.6(a), contudo obtida empregando as sequências de pulsos IR e CPMG, respectivamente. As linhas sólidas correspondem a um ajuste polinomial de 6° ordem dos dados experimentais, somente para guiar a análise dos dados experimentais obtidos.



Fonte: Kock, F.V.C.; Colnago, L.A. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ions complexes in solution: An alternative to spectrophotometry. **Microchemical Journal**, V. 122, p. 144-148, 2015. Imagem reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier, copyright: 4190380966183.

A partir do pH 7 até o pH 10 os valores de T_1 e T_2 diminuem de forma drástica para 0,63 s e 0,17 s, respectivamente, similar ao decaimento observado a partir dos dados de absorvância. Esta redução tanto nos valores de T_1 quanto nos valores de T_2 , pode ser associada a consolidação das estruturas amínicas complexas em solução, resultando em um pronunciado aumento da relaxação. Em meio fortemente alcalino, entre o pH 10 ($T_1 = 0,65$ s e $T_2 = 0,20$ s) e pH 12 ($T_1 = 0,59$ s e $T_2 = 0,12$ s), foi observado uma progressiva redução nos valores para os tempos de relaxação. Estes resultados indicam que as espécies em solução sofreram hidrólise alcalina (conforme previamente discutido), reduzindo tanto os valores observados para T_1 quanto para T_2 , conforme ilustrado na figura 2.7. Por fim, estes resultados permitem sugerir uma melhor eficiência da RMN-BR em distinguir os ligantes na esfera de coordenação do Cu^{2+} em comparação a espectroscopia eletrônica, que neste caso, não foi capaz de distinguir claramente a troca de ligantes em solução (KOCK; COLNAGO, 2015).

Figura 2.7 – Possíveis estruturas assumidas em solução e em função do pH, para as espécies complexas envolvidas no estudo relaxométrico para uma mistura de ligantes.



Fonte: Autoria própria.

4 Considerações finais

A partir dos resultados alcançados ao longo deste capítulo, podemos concluir que os tempos de relaxação T_1 e T_2 obtidos simultaneamente por intermédio da aplicação das sequências rápidas de pulsos CWFPP e CP-CWFPP consistem em uma abordagem válida para o estudo de complexos contendo íons paramagnéticos em solução em alternativa a espectrofotometria no UV-Vis, como por exemplo no estudo de complexos incolores, como a espécie Mn(II)-EDTA . Finalmente, a relaxometria também pode ser aplicada para monitorar a troca de ligantes em solução para sistemas envolvendo outros agentes complexantes comumente empregados em química analítica e inorgânica, como por exemplo, aminoácidos (glicina, prolina, alanina) e halogêneos (fluoretos e cloretos), quando estes estiverem na presença de íons paramagnéticos.

Capítulo 03

Análise relaxométrica para compostos de coordenação macromoleculares

Capítulo baseado em:

KOCK, F. V. C.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. A. Time-domain NMR relaxometry as an alternative method for analysis of chitosan -paramagnetic ion interactions in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 228-232, 2017.

KOCK, F. V. C.; COLNAGO, L. A. Rapid method for monitoring chitosan coagulation using low-field NMR relaxometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 1-4, 2016.

1 Introdução

A quitosana (Chi) é um polissacárido constituído por unidades N-acetilglicosamina e glicosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4). Este biomaterial é comumente obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina (BARAN; MENTES, 2015; BARAN; MENTES; ARSLAN, 2015; ZOU et al., 2016). A quitosana tem sido amplamente empregada em aplicações médicas e ambientais, bem como em indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; PHILIPPOVA et al., 2012; WAN NGAH; TEONG; HANAFIAH, 2011; ZOU et al., 2016). Para a maioria destas aplicações, a formação de complexos macromoleculares com íons metálicos é explorada, tendo em vista o caráter polifuncional deste biopolímero e a sua capacidade de formar quelatos estáveis em solução com diversos cátions.

Embora as interações entre quitosanas e íons metálicos em solução já tenham sido amplamente estudadas, os mecanismos precisos que governam este processo, bem como a estrutura resultante para o complexo gerado em solução, ainda não estão claros (PORTNYAGIN et al., 2015; VOLD et al., 2003). Os mecanismos mais aceites para esta interação envolvem adsorção (WAN NGAH; TEONG; HANAFIAH, 2011), coagulação/floculação (RENAULT et al., 2009), além da evidente formação de quelatos (PESTOV; BRATSKAYA, 2016; VARMA; DESHPANDE; KENNEDY, 2004). Neste sentido, estudos experimentais e teóricos (LU; CAO; SHEN, 2008) indicaram que o arranjo macromolecular resultante para este complexo, envolve a presença de um ou mais grupamentos amino diretamente coordenados ao centro paramagnético, perfazendo dois modelos teóricos denominados, modelo pedante e em ponte, respectivamente (PESTOV; BRATSKAYA, 2016; PORTNYAGIN et al., 2015). As propriedades destes arranjos macromoleculares, bem como a estabilidade destes compostos de coordenação em solução foram investigadas utilizando vários métodos analíticos (GUIBAL; VINCENT; NAVARRO, 2014), incluindo espectrofotometria UV-Vis (BRUNEL; EL GUEDDARI; MOERSCHBACHER, 2013), espectrometria de absorção atômica (AZAROVA et al., 2015), potencial zeta (BORSAGLI, 2015), titulação potenciométrica (HERNANDÉZ et al., 2008) e espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (WEBSTER; HALLING & GRANT, 2007).

Portanto, o objetivo deste capítulo foi o estudo relaxométrico, com medições simultâneas de T_1 e T_2 , com sequências de pulsos suportadas no conceito SSFP, de soluções aquosas de quitosanas em função do pH e de compostos de coordenação de quitosanas com íons paramagnéticos (Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{2+}). Os resultados demonstraram que os valores de T_1 e T_2 obtidos simultaneamente através do emprego da sequência CP-CWFP com alternância de fase (CP-CWFP_{x-x}) pode ser usado como um método rápido para a estimativa do pKa dos grupamentos amino presentes na cadeia do polissacarídeo quitosana, além de proverem uma estimativa acerca dos arranjos conformacionais para os quelatos resultantes da interação deste polímero com íons paramagnéticos.

2 Materiais e métodos

2.1 Reagentes

A quitosana empregada neste estudo foi adquirida da SIGMA-ALDRICH. A massa molecular viscosimétrica média para este polissacarídeo foi determinada, solubilizando o polímero em um tampão acetato (pH = 4,5), constituído por ácido acético 0,3 mol.L⁻¹ e acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹. Um viscosímetro, modelo AVS-360 acoplado com uma bureta automática (modelo AVS-20), ambos da Schott-Gerate, foram empregados nestes ensaios para a determinação da viscosidade. Um capilar de vidro ($\phi = 0.53$ mm), contendo 15 mL da solução do biopolímero foi imerso em um banho mantido a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.01 \text{ }^\circ\text{C}$ e volumes previamente programados do solvente foram sequencialmente adicionados ao sistema para fornecer a diluição desejada. A viscosidade intrínseca (η) foi determinada a partir da extrapolação do gráfico η_{sp}/C versus C em uma diluição infinita, onde η_{sp} corresponde a viscosidade específica e C à concentração do polissacarídeo em solução. O valor ($1,75 \times 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) para a massa molecular foi estimada a partir do valor obtido para a viscosidade intrínseca ($[\eta] = 716 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), empregando a equação de Mark-Houwink-Sakurada e usando os seguintes parâmetros ($K = 0,074$ e $\alpha = 0,76$). Estes parâmetros possuem dependência com a natureza do polímero, solvente e temperatura, em consonância com (BIROLI; DELEZUK; CAMPANA-FILHO, 2016; KAASAI, 2007).

O grau de desacetilação (DD) para este polissacarídeo foi estimado por RMN-¹H em consonância com (KAASAI, 2007; KAASAI, 2010). Para estes experimentos, uma massa apropriada de quitosanas foi solubilizada em uma solução HCl/D₂O em uma

proporção de 1% (v/v), perfazendo uma concentração de 10 mg/mL. Este sistema foi submetido a uma agitação magnética constante à temperatura ambiente durante 24 h até resultar em uma solução completamente límpida. O DD (75,50%) foi determinado considerando a razão entre as intensidades dos sinais relativos aos hidrogênios provenientes do grupamento metil presente na acetamida ($\approx 2,0$ ppm) e aos hidrogênios H₂-H₆ (4,1-3,4 ppm) (KAASAI, 2010). Estes espectros foram adquiridos a 80 °C, empregando para esta finalidade um espectrômetro BRUKER AVANCE II (600 MHz para o ¹H) e usando TMSP (TriMetilSililPropionato de sódio 2,2,3,3-d₄) como referência externa.

Os experimentos visando unicamente o estudo da interação da quitosana com o solvente, foram realizados empregando soluções de quitosanas na concentração inicial de $2,2 \times 10^{-2}$ g.L⁻¹, $2,2 \times 10^{-1}$ g.L⁻¹ e 2,2 g.L⁻¹. Estas soluções foram preparadas solubilizando uma massa apropriada de quitosanas sob agitação constante e a temperatura ambiente por 24 h em ácido acético 0,6 mol.L⁻¹ (pH $\approx 2,34$).

Por sua vez, para os experimentos visando a interação entre quitosanas e íons paramagnéticos, preparou-se uma solução de quitosanas (1,5 g.L⁻¹), solubilizando sob agitação constante durante 48 h, uma quantidade apropriada deste polissacarídeo em ácido acético 0,60 mol.L⁻¹ (pH 2,34) em temperatura ambiente. Posteriormente, soluções contendo os íons paramagnéticos CuSO₄·5H₂O (SIGMA-ALDRICH, 98%), MnSO₄·5H₂O (Synth, 98%) e FeCl₃·6H₂O (Mallinckrodt Chemical, 97%), foram preparadas nas concentrações iniciais de 0,82 g.L⁻¹, 0,79 g.L⁻¹ e 0,89 g.L⁻¹, respectivamente, solubilizando o sal na solução previamente preparada de quitosanas. Por fim, para realizar as medidas na ausência do precipitado, as amostras foram centrifugadas a 10,000 rpm durante 3 min, utilizando para esta finalidade uma centrífuga para eppendorfs, modelo MiniSpin[®] plus.

2.2 Métodos

2.2.1 Medidas de pH

Os valores de pH para cada amostra foram medidos empregando um pHmetro modelo PG1800 (GEHAKA), devidamente calibrado antes de cada experimento, usando para esta finalidade soluções pH 4 (biftalato de potássio), 7 (fosfato de potássio/fosfato de sódio) e 10 (bicarbonato de potássio/carbonato de sódio). Para estes ensaios, um

volume de 5,00 mL da amostra a ser analisada, foi transferido para um tubo Falcon de capacidade de 15 mL. Posteriormente, o pH foi ajustado para o valor desejado com soluções de NaOH e HCl 1,0 mol.L⁻¹, e o volume foi completado para 10 mL com água Milli-Q. Então, o pH foi novamente checado e o sistema foi finalmente submetido às análises relaxométricas.

2.2.2 Titulação turbidimétrica

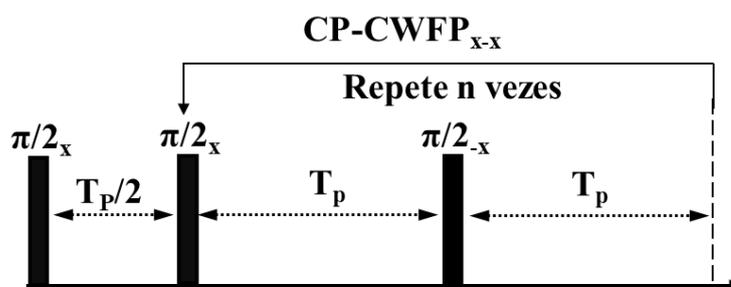
Ensaio turbidimétrico foram realizados empregando um espectrofotômetro UV-Vis, modelo LAMBDA 25, Perkin Elmer. As medidas foram realizadas em triplicatas e utilizando o modo de comprimento de onda fixo (420 nm) a temperatura ambiente.

2.2.3 Ensaio relaxométricos

Os tempos de relaxação (T_1 e T_2) foram medidos em um espectrômetro de RMN baixa resolução, Minispec, modelo BRUKER mq-20 (Alemanha) equipado com um ímã permanente de 0,47 T (20 MHz para ¹H) e uma sonda com diâmetro de 32 mm. Todos os experimentos foram realizados com a temperatura controlada em $28,0 \pm 0,1$ °C.

Para os ensaios relaxométricos, foi empregada uma sequência de pulsos de aquisição rápida no estado estacionário com alternância de fases, denominada CP-CWFP_{x-x}. Esta sequência é muito similar às sequências de pulsos no estado estacionário utilizadas no capítulo anterior. Contudo, neste caso existe um pulso $\pi/2$ espaçado por um tempo entre pulsos (t_p) igual a $t_p/2$, antes de um trem de pulsos de 90° com alternância de fases, conforme esquematizado na figura 3.1.

Figura 3.1 - Esquema para a sequência de pulsos com alternância de fases CP-CWFP_{x-x} empregada nesta tese, onde t_p corresponde ao tempo entre pulsos.



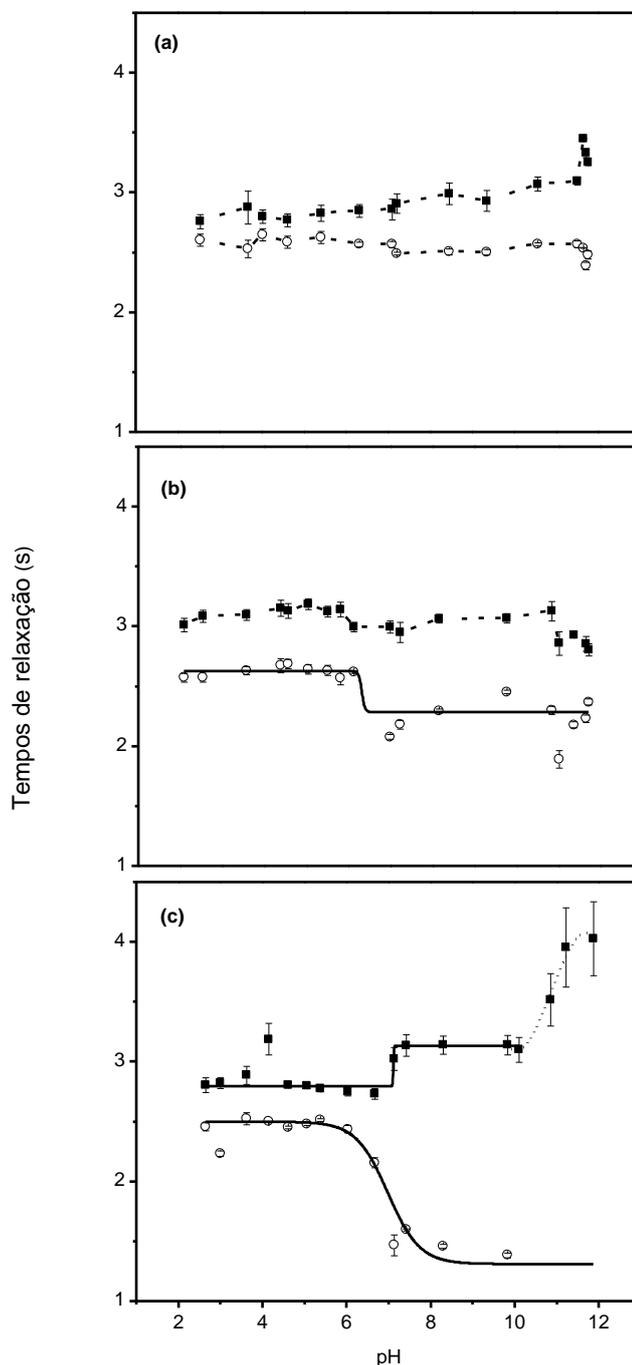
Fonte: Autoria própria.

Os valores foram obtidos aplicando a sequência acima esquematizada e usando os seguintes parâmetros: um trem de pulsos de 90° no valor de $2,34 \mu\text{s}$, um intervalo de tempo entre pulsos (t_p) de $300 \mu\text{s}$, tempo de reciclagem de 5 s , 4 scans e $45,000 \text{ ecos}$. Para cada medida, foram utilizados $500 \mu\text{L}$ de solução. Os valores de T_1 e T_2 foram obtidos aplicando as equações 1.3 e 1.4 (descritas no capítulo anterior). Todos os ajustes a serem apresentados foram realizados empregando o software Origin[®], versão 9.0. Além do mais, todos os dados experimentalmente obtidos correspondem à média de três medidas, sendo que a incerteza das medidas relaxométricas foi estimada em $\pm 10 \text{ ms}$, e foram estimadas considerando o desvio-padrão entre as medidas individuais.

3 Resultados e discussão

As figuras 3.2(a)-(c) apresentam os valores obtidos para T_1 (■) e T_2 (O) em função do pH para três soluções de quitosanas nas seguintes concentrações iniciais: $2,2 \times 10^{-2}$, $2,2 \times 10^{-1}$ e $2,2 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Na solução que apresenta a menor concentração de quitosanas (figura 1a), T_1 e T_2 permanecem quase constantes a $2,8$ e $2,6 \text{ s}$, respectivamente, na faixa de pH compreendida entre 2 e 12 . Por outro lado, para a solução contendo uma concentração intermediária (figura 3.2b), os valores de T_1 alcançados nesta mesma faixa de pH também foram constantes ($2,8 \text{ s}$). Contudo, verificou-se que os valores de T_2 , nesta situação, eram dependentes do pH. Neste caso, T_2 permaneceu quase constante a $2,6 \text{ s}$ (de forma semelhante à figura 1a) na faixa de pH compreendida entre 2 e 6 . Acima de $\text{pH} > 7$, os valores de T_2 decaíram para aproximadamente $2,2 \text{ s}$ e permaneceram constantes até $\text{pH} 12$. A linha contínua nesta figura corresponde ao ajuste sigmoide para os dados de T_2 , e possui a função apenas de guiar a análise dos dados obtidos experimentalmente. Para o sistema mais concentrado (figura 3.2c), ambos os tempos de relaxação mostraram uma forte dependência com o pH da solução. Na faixa de pH compreendida entre 2 e 6 , os valores obtidos para T_1 e T_2 foram praticamente constantes a $2,8 \text{ s}$ e $2,5 \text{ s}$, respectivamente. Posteriormente, os valores de T_1 aumentaram para aproximadamente $3,0 \text{ s}$ na faixa de pH compreendida entre 6 e 7 , enquanto os valores de T_2 diminuíram para $1,2 \text{ s}$ nesta mesma faixa de pH. Acima desta faixa, os valores de T_2 foram praticamente constantes ($1,2 \text{ s}$) entre $\text{pH} 8$ e 12 . Contudo, os valores de T_1 permaneceram constantes ($3,0 \text{ s}$) somente até $\text{pH} 10$ e depois apresentaram um acentuado aumento entre $\text{pH} 10$ e 12 , atingindo um máximo de $4,0 \text{ s}$.

Figura 3.2 - Valores para T_1 (■) e T_2 (○) obtidos através da sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x} para uma solução de quitosanas nas concentrações de (a) 2.2×10^{-2} , (b) 2.2×10^{-1} , e (c) 2.2 g.L^{-1} . As linhas sólidas correspondem a um ajuste sigmoide para os dados experimentais obtidos, somente para guiar a análise dos resultados.



Fonte: KOCK, F.V.C.; COLNAGO, L.A. Rapid method for monitoring chitosan coagulation using low-field NMR relaxometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 1-4, 2016. Imagem reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier, copyright: 4190381124991.

Estes resultados mostram que o tempo de relaxação para o solvente é fortemente influenciado tanto pela concentração de quitosana quanto pelo pH. Os tempos de relaxação (T_1 e T_2) de soluções diamagnéticas, como as abordadas neste caso, são

dependentes do tempo de correlação (τ_c), que por sua vez, consiste no tempo que uma molécula precisa para rotacionar 1 rad em torno do seu próprio eixo. Normalmente, os valores de T_2 decaem com o tempo de correlação, enquanto que T_1 assume um valor mínimo (dentro de uma faixa de frequências de ressonância) e posteriormente aumenta para baixos valores de (τ_c).

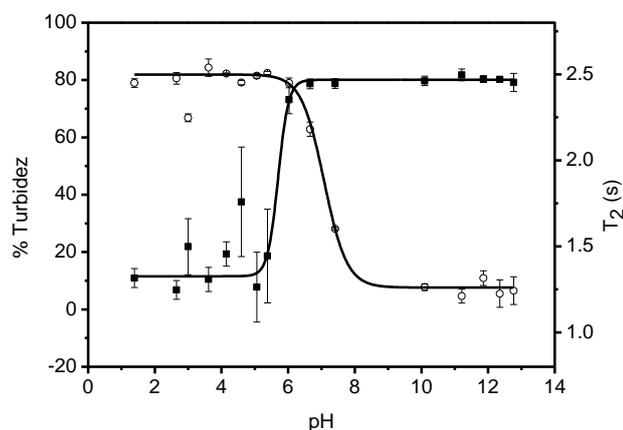
Deste modo, a figura 3.2 demonstra que os valores de T_1 e T_2 em meios ácidos foram próximos aos observados para a água pura (2,7 s) e independentes da concentração de quitosanas. Estes resultados indicam que as moléculas de quitosanas não restringiram a mobilidade das moléculas de água na faixa de pH < 6. Em meios mais alcalinos (pH > 7), por outro lado, a concentração de quitosanas desempenhou um papel chave sobre os tempos de relaxação do solvente. À menor concentração de quitosanas e em pH elevado, os tempos de relaxação para o solvente (mobilidade das moléculas de água) não foram afetados pela presença do polissacarídeo. Na concentração intermediária (figura 3.2b), os valores de T_1 também foram independentes do pH, embora os valores de T_2 tenham mostrado uma transição acentuada entre pH 6 e 7. Dado estes resultados, é possível inferir que T_2 foi mais sensível do que T_1 para o monitoramento da coagulação deste polissacarídeo. Além do mais, o fitting sigmoide dos dados de T_2 (linha continua na figura 3.2) apresenta um ponto de viragem em pH 7,2, o que pode ser associado ao pK_a do grupamento amino presente nas cadeias da quitosana, em consonância com a literatura (LIM et al., 2015).

Nos estudos envolvendo o sistema mais concentrado, o aumento de T_1 e a redução de T_2 para pH > 7 mostram que este polissacarídeo interage fortemente com as moléculas de água de forma a reduzir a sua mobilidade. Neste contexto, propomos que, na ausência de repulsões eletrostáticas, as moléculas de quitosanas possam adotar um arranjo supramolecular regular (colóide) capaz de capturar moléculas de água dentro de regiões confinadas (estrutura porosa), tendo em vista que se a água estivesse em poros grandes ou em uma estrutura não homogênea, os tempos de relaxação deveriam ter sido multiexponenciais para refletir os diferentes ambientes de água. Esta nossa hipótese é consistente com a literatura (SOGIAS; KHUTORANSKIY; WILLIAMS, 2010). De acordo com estes autores, a conformação da cadeia da quitosana é fortemente dependente do pH do meio. Em meio ácido, a cadeia para este biopolímero é linear devido as repulsões eletrostáticas causadas pelo grupamento amino presente no anel

glicopiranosídico da quitosana. Em meio alcalino, a situação se inverte. Neste caso a desprotonação dos grupos aminos possui efeito decisivo no envelhecimento da cadeia da quitosana, além da reticulação da cadeia devido a formação de interações intermoleculares. Portanto neste caso, a mobilidade das moléculas de água e consequentemente a sua acessibilidade à cadeia do biopolímero para a realização de trocas químicas é menor e consequentemente os tempos de relaxação é maior, conforme previamente discutido.

Além disto, as medidas para os tempos de relaxação também podem ser empregadas como uma alternativa ao método clássico baseado em turbidimetria, para monitorar a coagulação destes polissacarídeos em solução. A figura 3.3 apresenta uma comparação entre uma titulação turbidimétrica e relaxométrica (baseada em valores de T_2) para uma solução contendo quitosanas na concentração inicial de $2,2 \text{ g.L}^{-1}$. As linhas continuas, correspondem ao fitting sigmoide dos dados experimentais e são empregadas para a determinação dos pontos de viragem. A partir deste resultado, é possível observar que a titulação turbidimétrica e relaxométrica apresentam pontos de inflexão semelhantes, pH 6 e 7, respectivamente. Estes valores, estão próximos ao pK_a correspondente ao grupamento amino presente nas cadeias da quitosana, conforme descrito na literatura (LIM et al., 2015).

Figura 3.3 - Comparação entre a titulação turbidimétrica (■) – medida a 420 nm – e a titulação relaxométrica T_2 (O) para uma solução de quitosanas na concentração de $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ em função do pH. As linhas sólidas correspondem ao fitting sigmoide para os dados experimentais obtidos.



Fonte: KOCK, F.V.C.; COLNAGO, L.A. Rapid method for monitoring chitosan coagulation using low-field NMR relaxometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 1-4, 2016. Imagem reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier, copyright: 4190381124991.

As interações entre quitosanas (Chi) e os íons paramagnéticos Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} também foram estudadas em função do pH. Estes íons paramagnéticos foram escolhidos porque precipitam na forma de seus respectivos hidróxidos em valores de pH 3,2, 7,0 e 9,3, respectivamente (COBRA et al., 2015). Portanto suas respectivas interações com quitosanas podem ser estudadas em uma ampla faixa de pH.

As figuras 3.4a, 3.6a e 3.8a apresentam os perfis relaxométricos obtidos a partir de T_1 (■) e T_2 (O) decorrentes da interação entre o polissacarídeo quitosana e os íons paramagnéticos Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} , respectivamente, em função do pH. Por sua vez, as figuras 3.4b, 3.6b e 3.8b apresentam os perfis relaxométricos para as mesmas amostras, contudo centrifugadas e analisadas somente o sobrenadante. As linhas pontilhadas correspondem ao fitting sigmoide para os dados obtidos experimentalmente para o respectivo aquo complexo em acordo com (COBRA et al., 2015).

Estas figuras mostram a forte influência do pH sobre os perfis relaxométricos para as soluções contendo quitosanas na presença de íons paramagnéticos. Esses perfis relaxométricos foram notavelmente diferentes daqueles observados para o mesmo tipo de quitosanas e concentração, porém na ausência de íons paramagnéticos (figura 3.2). Por outro lado, os perfis relaxométricos apresentaram tendências semelhantes às observadas usando o mesmo íon paramagnético em solução aquosa (linhas pontilhadas), porém na ausência de quaisquer ligante. Em solução aquosa, ambos os tempos de relaxação aumentam em função do pH, apresentando transições em pH 3, 7 e 9 para os íons Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} , respectivamente (COBRA et al., 2015).

As principais diferenças foram obtidas para as soluções na presença dos íons Fe^{3+} (figura 3.4a). Os perfis relaxométricos para estas soluções apresentaram dois pontos de inflexão, em pH 2,9 e 6,2. À valores de pH inferiores e superiores ao primeiro ponto de inflexão, os tempos de relaxação foram de 0,05 e 1,00 s, respectivamente. No entanto, T_1 permaneceu constante em 1,0 s até pH 4 enquanto que T_2 permaneceu constante até pH 6. T_1 aumentou novamente na faixa de pH compreendida entre 4 e 7 e posteriormente atingiu um patamar em 2,8 s. O T_2 também aumentou entre pH 6 e 8 e posteriormente atingiu um patamar em 1,5 s.

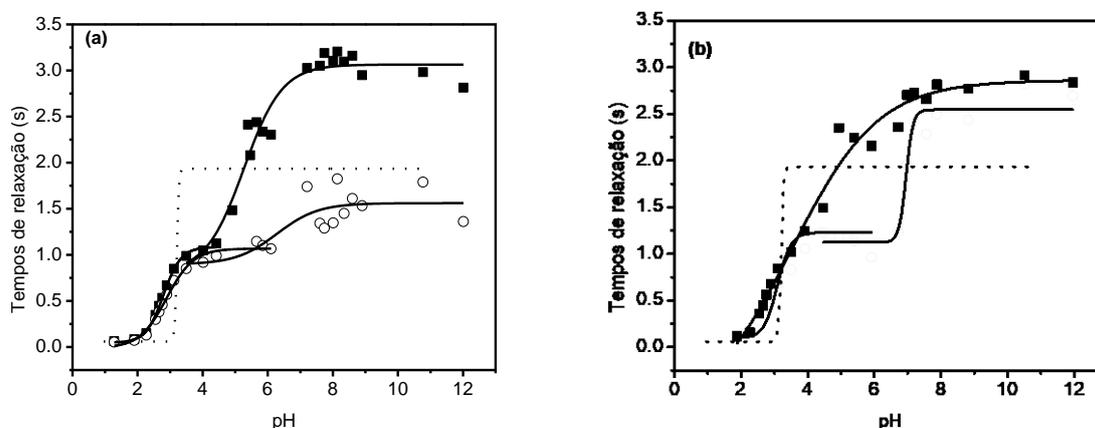
Quando as soluções contendo a espécie Chi-Fe^{3+} (figura 3.4a) foram centrifugadas, o perfil relaxométrico obtido a partir de T_1 , apresentou um único ponto de

viragem a pH 3,5. Os valores de T_1 aumentaram progressivamente de 0,11 s (pH 2) para 2,8 s (pH 8 a 12). Por outro lado, o perfil relaxométrico obtido a partir de T_2 (O) apresentou dois pontos de inflexão a 2,9 e 6,9 (figura 3.4b), sendo, portanto, semelhante ao da amostra antes da centrifugação (figura 3.4a). Contudo, o primeiro patamar em 1,2 s entre os valores de pH compreendidos entre 4 e 6,5 foi melhor definido a partir do perfil relaxométrico alcançado por T_2 . Os valores de pH neste patamar foram maiores (1,3 e 7,5) do que aqueles observados para a espécie $[\text{Chi-Fe}]^{3+}$. Além do mais, os valores de T_2 obtidos acima de pH 7,5 foram 2,5 s, o que é um indicativo de que a solução está completamente livre da presença de íons paramagnéticos.

As amostras dentro desta faixa de pH apresentaram as mesmas alterações de cor e precipitação. Em valores de pH inferiores, a solução apresentava uma coloração amarela pálida, sendo que a intensidade da cor aumentou em função do pH até aproximadamente pH 5. Na faixa compreendida entre pH 4,9 e 7, ocorreu precipitação, contudo o sobrenadante permaneceu com uma coloração inalterada. Acima deste valor de pH, o sobrenadante tornou-se incolor.

O primeiro ponto de viragem em aproximadamente pH 3 observado a partir do perfil relaxométrico obtido por T_1 (figura 3.4a) e os pontos de viragem observados a partir de T_2 (figuras 3.4a e b) foram notavelmente próximos ao observado para as soluções na ausência de quitosanas (linha pontilhada). Isto indica que tal viragem (em pH 3,2) está associada a formação de hidróxido de ferro insolúveis. No entanto, não foram observadas nenhuma precipitação nesta faixa de pH. Portanto, a partir destes perfis relaxométricos, da alteração na coloração da solução e na ausência de precipitado, é possível inferir que alguma interação ocorreu entre o polissacarídeo quitosana e os íons Fe^{3+} . Além do mais, estas interações ocorrem a partir dos grupamentos hidroxilas presentes nas cadeias de quitosanas, uma vez que os grupamentos aminos estão protonados neste valor de pH. Além do mais, o aumento observado nos tempos de relaxação até pH 4,9 pode estar associado a redução da acessibilidade das moléculas de água aos íons Fe^{3+} - o qual estão parcialmente protegidos pela quitosana – tal como proposto por (SIPOS et al., 2003).

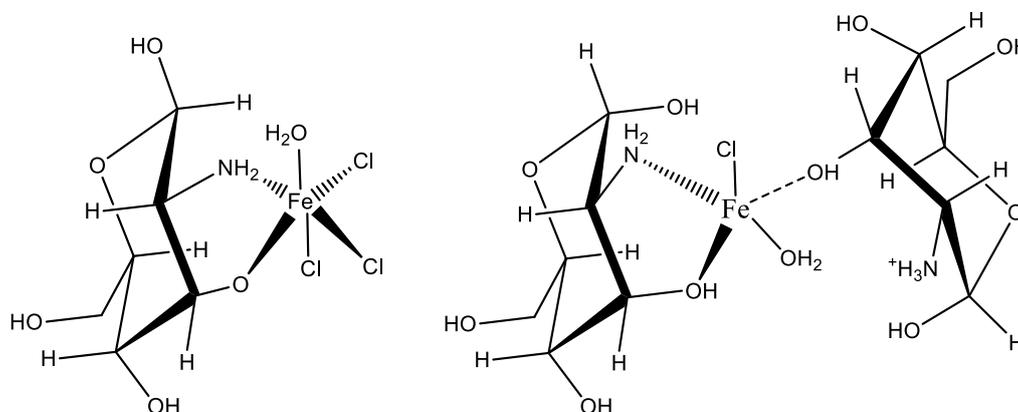
Figura 3.4 - Perfis relaxométricos obtidos a partir de T_1 (■) e T_2 (○) para os íons paramagnéticos na presença do polissacarídeo quitosana. a) Chi- Fe^{3+} e o respectivo sobrenadante (b). As linhas sólidas e pontilhadas correspondem ao fitting sigmoide dos dados experimentais obtidos.



Fonte: KOCK, F.V.C.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 228-232, 2017. Imagem reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier, copyright: 4190380856007.

Os segundos pontos de inflexão observados a partir dos perfis de T_1 e T_2 na figura 3.4a e a partir de T_2 na figura 3.4b são semelhantes aos da solução contendo apenas quitosanas (pH = 7) (KOCK et al., 2016). Esses resultados sugerem que esse ponto de viragem ocorreu devido a coagulação/floculação da quitosana em solução. Esta hipótese foi confirmada através da precipitação deste biopolímero que ocorreu na faixa de pH compreendida entre 4,9 e 7. Além do mais, os baixos valores de T_2 ($\cong 1,50$ s) observados na figura 3.4a podem ser atribuídos à presença de espécies Fe^{3+} livres na solução, mesmo após a complexação com o polissacarídeo, o que é consistente com a cor amarela observada experimentalmente no sobrenadante nesta faixa de pH. Além disso, a remoção de espécies Fe^{3+} por intermédio da coagulação da quitosana a partir do pH 7 é responsável pela eliminação da coloração amarela do sobrenadante e pelo aumento dos tempos de relaxação para valores próximos ao do solvente puro ($T_1 \cong T_2 \cong 3,0$ s) (figura 3.4b). Portanto, é possível inferir que a desprotonação dos grupos Chi- NH_3 ocorreu nessa região. Estes grupos são capazes de complexar os íons paramagnéticos bem como melhorar a eficiência da complexação, o que justifica o aumento observado nos tempos de relaxação. Estes resultados estão em consonância com os modelos propostos por (HERNANDÉZ et al., 2008), que sugeriram a participação de grupos amino desprotonados na complexação dos íons Fe^{3+} dentro desta faixa de pH, com moléculas de água adicionais ou íons cloreto completando a esfera de coordenação, conforme esquematizado na figura 3.5.

Figura 3.5 – Possíveis estruturas para o complexo formado entre quitosana e as espécies paramagnéticas Fe^{3+} , em solução, em consonância com (HERNANDÉZ et al., 2008). Nesta representação foi demonstrada apenas a complexação do ponto de vista da unidade monomérica glicosamina, para efeitos de simplificação.



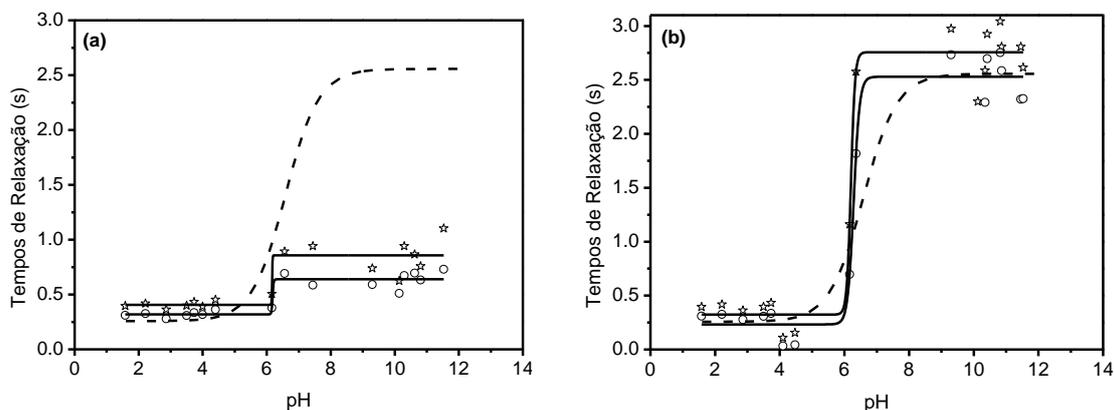
Fonte: Autoria própria.

Por outro lado, os perfis relaxométricos para a solução de quitosanas na presença de íons Cu^{2+} (figura 3.6a) apresentam dois patamares com uma transição em pH 6,2. Este resultado foi 0,88 unidades abaixo do ponto de inflexão observado para uma solução aquosa de CuSO_4 (linha pontilhada). Os tempos de relaxação foram próximos a 0,46 s (T_1) e 0,30 s (T_2) até pH 6. Acima do ponto de inflexão, T_1 e T_2 atingiram um patamar com valores em 1,00 e 0,50 s, respectivamente. Por outro lado, os tempos de relaxação para o sobrenadante foram bem maiores ($T_1 = 2,96$ e $T_2 = 2,60$ s), para esta mesma situação (acima do ponto de viragem) conforme observado na figura 3.6b. Estes valores são semelhantes aos tempos de relaxação obtidos para a água pura (linhas pontilhadas).

Quando se compara os efeitos da adição de Fe^{3+} (figura 3.4a) e Cu^{2+} (figura 3.6a) em soluções contendo o polissacarídeo quitosanas, observa-se que, após o ponto de viragem, a amostra de cobre apresentou tempos de relaxação mais curtos do que aqueles observados para as soluções contendo somente o aquocomplexo, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (linhas pontilhadas). Portanto, as espécies Cu^{2+} ainda afeta os tempos de relaxação da água, mesmo em valores de pH superiores a 7. Este resultado sugere que um complexo $[\text{Chi-Cu}]^{2+}$ foi formado e que existe moléculas de água diretamente coordenadas ao centro paramagnético. Esta hipótese está em consonância com (MODRZEJEWSKA, 2013; PESTOV; BRATSKAYA, 2016), que demonstraram que as interações entre os grupos Chi-NH_2 e Cu^{2+} ocorrem em dois arranjos - conhecidos como modelos pedante e ponte -

contendo moléculas de água diretamente ligadas ao cobre (figura 3.7), o que justifica os baixos tempos de relaxamento obtidos experimentalmente e apresentados na figura 3.6a.

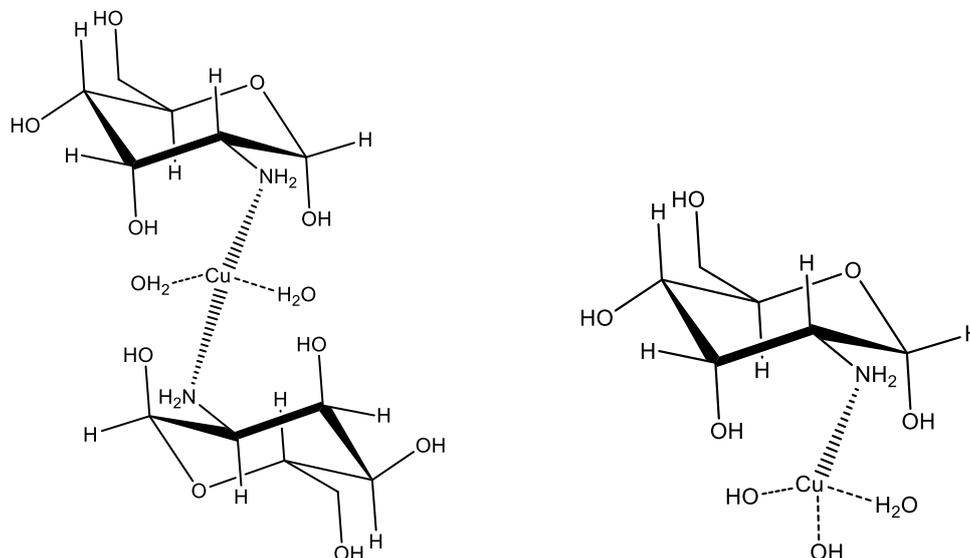
Figura 3.6 - Perfis relaxométricos obtidos a partir de T_1 (\star) e T_2 (O) para os íons paramagnéticos Cu^{2+} na presença do polissacarídeo quitosana (a) Chi-Cu^{2+} e o respectivo sobrenadante (b). As linhas sólidas e pontilhadas correspondem ao ajuste sigmoide para os dados experimentais obtidos.



Fonte: KOCK, F.V.C.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 228-232, 2017. Imagem reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier, copyright: 4190380856007.

Para o sobrenadante (figura 3.6b), a maior diferença ocorreu acima do ponto de viragem, indicando que os tempos de relaxação alcançaram os valores relativos aos do solvente puro, o que permite ser inferido que este complexo foi completamente removido da solução em meio alcalino. Este resultado encontra-se em consonância com as observações experimentais, tendo em vista que se notou uma grande quantidade de precipitado azul gelatinoso (que pode ser atribuído a remoção do complexo da solução) assim como uma concomitante presença de um sobrenadante incolor. Resultados semelhantes foram relatados por (COBRA et al., 2015). De acordo com estes autores, estas espécies paramagnéticas precipitaram como hidróxidos em altos valores de pH, alcançando tempos de relaxação próximos aos dos solventes puros. A partir desta informação, pode-se inferir que, para um sistema contendo os mesmos íons, mas na presença de quitosanas, a alta alcalinidade do sistema favorece a remoção destas espécies do seio da solução, aumentando os valores de T_1 e T_2 .

Figura 3.7 - Possíveis estruturas químicas assumidas para o complexo Chi-Cu²⁺ em solução, em consonância com (MODRZEJEWSKA, 2013; PESTOV; BRATSKAYA, 2016), assumindo a conformação ponte (esquerda) e pedante (direita). Nesta representação foi demonstrada apenas a complexação do ponto de vista da unidade monomérica glicosamina, para efeitos de simplificação.

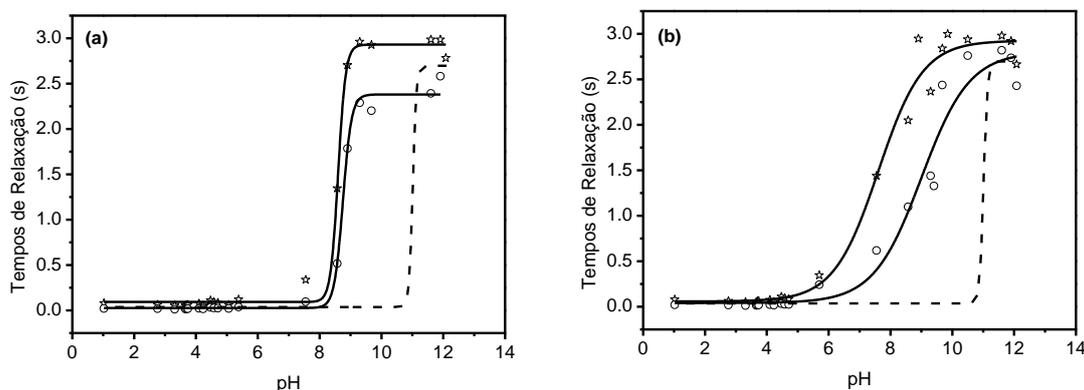


Fonte: Autoria própria.

Os perfis relaxométricos obtidos para a espécie Chi-Mn²⁺ (figura 3.8a) e o respectivo sobrenadante (figura 3.9b) apresentaram baixos tempos de relaxação (0,06 s para T₁ e 0,02 s para T₂) antes dos respectivos pontos de inflexão. Estes valores de T₁ e T₂ foram semelhantes aos observados em uma solução aquosa contendo apenas os íons Mn²⁺ (COBRA et al., 2015). Estes baixos valores são atribuídos à alta relaxividade dos íons Mn²⁺ quando comparados aos íons Cu²⁺ e Fe³⁺ (COBRA et al., 2015). O perfil relaxométrico na presença de quitosanas apresentou um ponto de inflexão em pH 8,90. Este valor foi quase 0,4 unidades de pH inferior ao ponto de inflexão correspondente ao perfil relaxométrico obtido para uma solução contendo apenas os íons Mn²⁺. Acima do ponto de inflexão, os valores de T₁ foram maiores que os valores para T₂. Além do mais, estes valores foram menores comparados aos valores obtidos para o sistema na ausência do polissacarídeo (linha pontilhada). Os valores de T₁ para o sobrenadante (figura 3.8b) mostram um ponto de viragem inferior (pH = 7,6) ao obtido a partir de T₂ (pH = 9,0). Outra diferença entre os perfis relaxométricos obtidos para as espécies [Chi-Mn]²⁺ e o respectivo sobrenadante refere-se ao pH ao qual T₁ começa a aumentar. No sobrenadante, esta grandeza começou a aumentar em valores de pH inferiores a 6 (figura 3.8b), enquanto que na presença de quitosanas (figura 3.8a) isto ocorreu somente em pH = 7.

Dados este resultado é possível confirmar que as espécies Chi-Mn^{2+} tiveram um efeito menor sobre os tempos de relaxação para o solvente quando comparado com os valores medidos numa solução aquosa dos mesmos íons. A maior parte das diferenças observadas pode ser explicada pela coagulação da quitosana em pH superior a 6. Este processo remove os íons Mn^{2+} por floculação, o que justifica a similaridade entre os perfis relaxométricos obtidos. Estes resultados indicam que o complexo $[\text{Chi-Mn}]^{2+}$ apresenta uma baixa constante de estabilidade e que estas espécies são principalmente removidas pela ação do pH. Esta hipótese está em consonância com os resultados relatados por outros autores (WU et al., 2008; BHATIA; RAVI, 2000) e pode ser corroborada experimentalmente através do surgimento de um precipitado gelatinoso e marrom escuro em meio alcalino correspondente a floculação da espécie $\text{Mn}(\text{OH})_2$ em conjunto com o polissacarídeo em solução.

Figura 3.8 - Perfis relaxométricos obtidos a partir de T_1 (\star) e T_2 (O) para os íons paramagnéticos na presença do polissacarídeo quitosana. a) Chi-Mn^{2+} e o respectivo sobrenadante (b). As linhas sólidas e pontilhadas correspondem ao fitting sigmoide dos dados experimentais obtidos.



Fonte: KOCK, F.V.C.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 98, p. 228-232, 2017. Imagem reproduzida e traduzida com permissão da Elsevier, copyright: 4190380856007.

Finalmente, os elevados tempos de relaxação ($\cong 2,70$ s) observados em todos os casos para os sobrenadantes (figs. 3.4b, 3.6b e 3.8b) demonstraram experimentalmente a alta eficiência da quitosana na remoção destes íons da solução. Esta observação concorda com os dados previamente relatados na literatura, contudo empregando outras técnicas analíticas (HERNANDÉZ et al., 2008; MODRZEJEWSKA, 2013; WU et al., 2008; BHATIA et al., 2000).

4 Considerações finais

A partir dos resultados alcançados neste capítulo é possível inferir que a relaxometria através da aplicação de sequências rápidas de pulsos e de aquisição simultânea para os tempos de relaxação T_1 e T_2 , como a CP-CWFP_{x-x}, constitui em um atraente método analítico para o estudo da coagulação de polissacarídeos, como por exemplo, quitosanas, conforme abordado nesta pesquisa, em detrimento aos métodos convencionais, mais laboriosos, como a titulação turbidimétrica e viscosimetria. Além do mais, os resultados apontam que a relaxometria torna-se em uma eficiente abordagem para o estudo de quelatos macromoleculares em solução, formados por biopolímeros, permitindo inferir acerca da estabilidade destes complexos em meio aquoso. Por fim, é possível projetar que a RMN-BR possa ser aplicada em pesquisas envolvendo outros polissacarídeos, como por exemplo, quitina e xantanas, além de seus complexos com outros íons paramagnéticos, demonstrando deste modo, a grande aplicabilidade desta técnica para o estudo por exemplo da descontaminação de metais pesados em soluções aquosas por intermédio da aplicação de agentes complexantes.

Capítulo 04

Análise relaxométrica e por RMN em alta resolução de compostos de coordenação entre sorbitol e íons cúpricos

Capítulo baseado em:

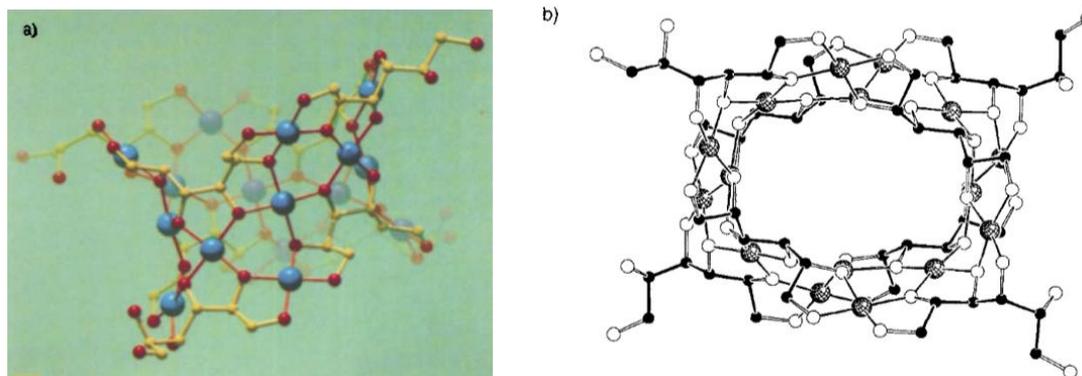
KOCK, F. V. C.; HIGUEIRA-PADILLA, A. R.; SANTOS, M.S.; COLNAGO, L. A. D-sorbitol-Cu²⁺ macromolecular structure in solution characterized by magnetic resonance spectroscopies (Em preparo).

1 Introdução

O carboidrato sorbitol (Sorb), um estereoisômero do poliálcool hexitol ($C_6H_{14}O_6$), pode ser encontrado naturalmente em frutas como por exemplo, maçãs e ameixas ou pode ser sinteticamente obtido por intermédio da redução da glicose (DEJONG; HARTEL, 2016). Este poliálcool é extensivamente aplicado em diversos ramos de pesquisa, dentre eles, eletroquímica (BARBOSA et al., 2005), medicina (GERLACH et al., 2010), alimentos (COELHO; de JESUS, 2016) e cosméticos (MILLER; HENNING; GRUNBEIN, 2001). Em muitos destes empregos, é explorada a sua capacidade para formar complexos com diversos íons metálicos, como por exemplo, Cu^{2+} e Fe^{3+} . Estes quelatos são majoritariamente empregados em solução, principalmente em banhos eletrolíticos na busca de eletrodepósitos com menor granulometria e mais aderentes ao eletrodo (BARBOSA et al., 2005; de ALMEIDA et al., 2015; FAN et al., 2013) e na formação de polioxometalatos (KLUFERS; SCHUHMACHER, 1995).

A caracterização do complexo de sorbitol com íons cúpricos, em fase sólida, realizada por difração de raios-X (figura 4.1), revelou a presença de uma estrutura macromolecular similar às ciclodextrinas (KLUFERS; SCHUHMACHER, 1995). Por outro lado, em meio aquoso, as informações sobre a estrutura deste complexo são escassas, apesar da maioria de suas aplicações situarem-se neste ambiente. Imamura et al. (1978) propuseram uma conformação baseada em dados coletados a partir da espectrofotometria no UV-Vis e titulação potenciométrica. Estes autores propuseram três conformações distintas em função da alcalinidade. Na faixa de pH compreendida entre 7 e 9,5 foi proposta a presença de algumas moléculas de sorbitol incorporadas ao precipitado gelatinoso formado pelo hidróxido de cobre. Aumentando a basicidade da solução, na faixa de pH compreendida entre 9,5 e 13, estes autores propuseram um aumento considerável do número de moléculas de sorbitol complexadas ao precipitado, tornando-o mais solúvel. Finalmente, em meios fortemente alcalinos, acima de pH 13, foi proposto que o sorbitol exerce uma forte interação com os íons cúpricos, tornando o complexo final completamente solúvel.

Figura 4.1 - Estrutura do complexo $[\text{Cu-sorb}]^{2+}$ proposta por (KLUFERS; SCHUHMACHER, 1995) a partir de difratometria de raios-X. (a) Visão lateral do complexo, onde os átomos de cobre, oxigênio e carbono estão representados em azul, vermelho e amarelo, respectivamente. (b) Visão superior do complexo, onde as esferas hachuradas, brancas e pretas correspondem aos átomos de cobre, carbono e oxigênio, respectivamente.



Fonte: KLUFERS, P.; SCHUHMACHER, J. A hexadecanuclear polyolatometalate of copper(II) ions and multideprotonated D-sorbitol. *Angewandte Chemie International*, v. 34, p. 2119-2121, 1995.

Portanto, o objetivo deste capítulo foi estudar o complexo $[\text{Sorb-Cu}]^{2+}$, em solução, usando relaxometria de RMN em baixa resolução, relaxometria de RMN em alta resolução, técnicas de RMN bidimensional (HMQC e DOSY) em alta resolução, espectrofotometria no UV-Vis e ressonância paramagnética eletrônica (EPR, do inglês, *Electronic Paramagnetic Resonance*). Com esses estudos foi possível propor uma conformação para o complexo $[\text{Sorb-Cu}]^{2+}$, em solução, similar à que se obteve por cristalografia de raios X de monocristal.

2 Materiais e métodos

2.1 Materiais

Para estes estudos foram empregados os reagentes $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e sorbitol adquiridos da SIGMA-ALDRICH. O complexo $[\text{Sorb-Cu}]^{2+}$ em solução foi preparado empregando diferentes soluções contendo distintas razões metal: ligante 3:1, 2:1, 1:1 e 1:2. Para atingir este objetivo, a concentração para o íon metálico foi mantida constante ($8,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e por sua vez a concentração do ligante foi alterada para o valor desejado. Estas soluções foram preparadas solubilizando quantidades previamente calculadas dos respectivos reagentes (metal e ligante) em um volume adequado de água Milli-Q.

2.2 Métodos

2.2.1 Medidas de pH

Os valores de pH para cada amostra foram medidos empregando um pHmetro modelo PG1800 (GEHAKA), devidamente calibrado antes de cada experimento, usando para esta finalidade soluções pH 4 (biftalato de potássio), 7 (fosfato de potássio/fosfato de sódio) e 10 (bicarbonato de potássio/carbonato de sódio). Para estes ensaios, um volume de 3,00 mL da solução mãe contendo o complexo $[\text{Sorb-Cu}]^{2+}$, foi transferido para um tubo Falcon. Posteriormente, o pH foi ajustado para o valor desejado com soluções de NaOH e HCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, e o volume foi completado para 5,00 mL com água Milli-Q. Deste modo a razão entre as concentrações do metal e do ligante permaneceu constante para todos os valores de pH estudados. Finalmente, após o ajuste do volume, o pH foi novamente checado e o sistema foi finalmente reservado para às análises relaxométricas.

2.2.2 Experimentos espectrofotométricos

As análises por UV-Vis foram realizadas usando um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo LAMBDA 25. As medidas foram realizadas empregando cubetas de plástico com 1 cm de caminho óptico. Os espectros foram obtidos entre 1000 a 500 nm, e para esta finalidade foi empregada uma velocidade de varredura de 480 nm/min.

2.2.3 Ensaios relaxométricos

Os experimentos de RMN em baixa resolução foram realizados empregando um espectrômetro de 0,47 T (19,90 MHz para o ^1H), modelo minispec mq20, BRUKER a $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Os valores para os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) foram simultaneamente obtidos por intermédio da aplicação da sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x} usando pulsos $\pi/2$ com duração de 2,34 μs , tempo de reciclagem de 9,0 s, 4 scans e 28000 ecos. Para o processamento do sinal e obtenção dos valores de T_1 e T_2 foram empregados ajustes monoexponenciais para as curvas obtidas, usando para esta finalidade o software Origin[®], versão 9.0.

2.2.4 Experimento de RMN em alta resolução

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos em um espectrômetro BRUKER Avance de 14,1 T (600,00 MHz para o ^1H), empregando uma sonda de detecção direta

(BBO) de 5 mm em temperatura fixa a 298,1 K e 500 μL da solução no pH desejado. Um capilar externo contendo 100 μL de uma solução constituída por TMS e D_2O foi empregado como referência da escala de deslocamento químico e para *lock* da frequência do deutério. A aquisição dos espectros de ^1H foi realizada empregando a sequência de pulsos da BRUKER, denominada “noesygppr”, 32 promediações, com um tempo de aquisição de 2,73 s, janela espectral de 12,019 ppm e reciclagem de 10 s. Finalmente, os espectros foram processados empregando o software TopSpin[®], versão 3.7 adquirido da BRUKER.

Para os experimentos DOSY (do inglês, *Diffusion-ordered Spectroscopy*) e HMQC (do inglês, *Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*) empregou-se uma amostra contendo uma proporção molar de 1:1 de sorbitol e íons Cu^{2+} solubilizados em D_2O . Esses experimentos foram realizados em um equipamento BRUKER, modelo AVANCE III, de 9,4 T (400,13 MHz para o ^1H) empregando uma sonda de detecção inversa (BBI), equipada com uma bobina de gradiente-z, produzindo um gradiente nominal máximo de 50,0 $\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$.

O experimento de difusão foi adquirido a 298,1 K empregando a sequência de pulsos da própria BRUKER, denominada “ledbpgppr2”, com os seguintes parâmetros: dezesseis amplitudes de gradiente nominais variando-as quadraticamente de 2,5 a 47,5 $\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$; tempo de difusão (d20) = 20 ms; tempo para recuperação do gradiente (d16) = 0,2 ms e largura do gradiente de difusão (p30) = 2,0 ms. Os valores dos coeficientes de difusão e o mapa de correlação foram obtidos no software da BRUKER *Dynamics Center*[®].

Por sua vez, para a realização do experimento HMQC, a sequência empregada foi a “hmqcphpr”, também da própria BRUKER. Os parâmetros utilizados foram: 160 promediações com 16384 pontos no canal F2 (^1H) e 256, no canal F1 (^{13}C); uma janela espectral de 33,9077 ppm, na dimensão F2, e 500 ppm na dimensão F1; uma constante de acoplamento média de 145 Hz (CNST2) e um tempo de reciclagem (d1) de 1,0 s. O mapa de correlações foi obtido usando o software TopSpin[®], da BRUKER, empregando a função de apodização “QSINE” e um lb (*line broadening*) de 1,0 Hz, em F2, e 0,3 em F1.

Finalmente para os experimentos relaxométricos foram empregadas as sequências de pulsos “t1ir” e “cpmg” da própria BRUKER, para a aquisição dos valores de T_1 e T_2 ,

respectivamente. Para estes experimentos foram utilizados 128 scans, com 524288 pontos no canal F2 (^1H) e 32 no canal F1 (IR ou CPMG); uma janela espectral de 407,4743 ppm, na dimensão F2, e 9,9967 ppm na dimensão F1 e um tempo de reciclagem (d1) de 3,0 s. Ambos os valores para os tempos de relaxação foram obtidos no software da BRUKER *Dynamics Center*[®].

2.2.5 Análise por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Os experimentos de EPR foram realizados empregando um espectrômetro BRUKER, modelo EMX-300. As amostras foram analisadas em tubos capilares (0,5 mm de diâmetro interno) à temperatura ambiente e sob condições de nitrogênio líquido. Neste último caso foi usado um dispositivo dedicado para a realização destes experimentos. As configurações instrumentais foram: frequência de microondas 9,50 GHz; frequência de modulação de 100 kHz, campo central em 3472 G, amplitude de modulação 2,024 G, potência de microondas 20 mW e 64 scans. Para o processamento do sinal foi empregado o software Origin[®], versão 9.0.

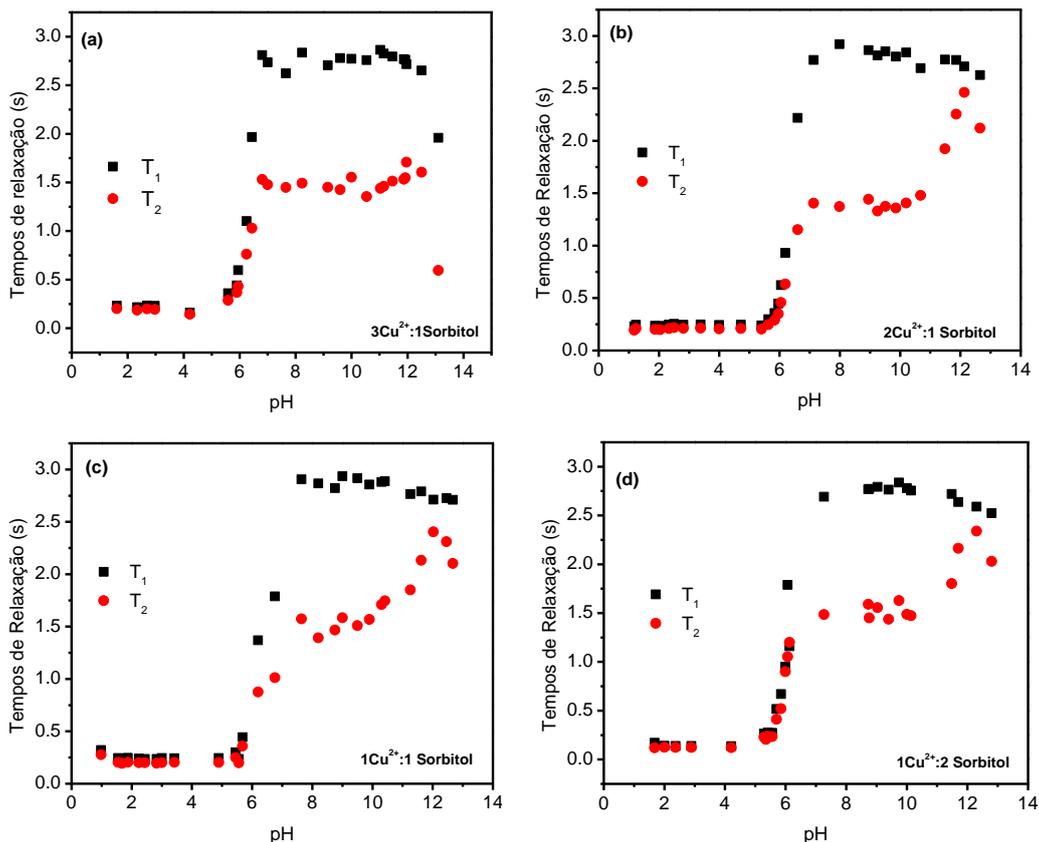
3 Resultados e discussão

Inicialmente, estudou-se a variação dos tempos de relaxação por RMN-BR com o intuito de se conhecer a influência da variação da razão molar metal:ligante sobre os valores de T_1 e T_2 associados às moléculas do solvente. As figuras 4.2 (a-d) apresentam o perfil relaxométrico em função do pH para T_1 (■) e T_2 (■) obtidos simultaneamente por intermédio da aplicação da sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x}, para os sistemas nas proporções 3:1, 2:1, 1:1 e 1:2, respectivamente.

A partir destas figuras foi possível observar que para todas as proporções estudadas ambos os tempos de relaxação assumem valores bem próximos de 0,07 s na faixa de pH entre 1 e 5. Após esta região, os valores aumentaram em média para 2,0 s (T_1) e 1,5 s (T_2) na faixa de pH entre 6 e 7, região na qual foi observado um primeiro ponto de viragem. Acima destes valores de pH, foi observado que os valores de T_1 permaneceram praticamente constantes ($\approx 2,50$ s) até pH 13. Por outro lado, os valores de T_2 permaneceram constantes até aproximadamente pH 10,3 ($\approx 1,50$ s). Após este pH os valores de T_2 aumentaram até atingir um valor máximo próximo à pH 12 ($\approx 2,20$ s). Posteriormente, os valores de T_2 diminuíram até atingirem, em média, o valor de $\approx 1,50$ s em pH 13. Interessantemente, uma exceção foi notada no perfil relaxométrico

obtido para o complexo formado na proporção 3:1 (a). Neste caso, não foi observado um valor máximo para T_2 próximo ao pH 12. O que se observou nesta solução foi a formação de um precipitado nesta faixa de pH.

Figura 4.2 – Valores de T_1 (■) e T_2 (●) em função do pH, determinados simultaneamente com a sequência de pulsos CP-CWFP_{x-x}. (a) Valores de T_1 e T_2 para as soluções aquosas contendo íons cúpricos e sorbitol na proporção de 3:1 (a), 2:1 (b), 1:1 (c) e 1:2 (d), respectivamente.



Os baixos valores de T_1 e T_2 observados na faixa de $\text{pH} \leq 5$ estão associados a presença majoritária de íons cúpricos em solução e ao efeito paramagnético destes íons na relaxação dos hidrogênios da água. Estes resultados são consistentes com a observação de uma solução azulada nesta faixa de pH, similar à de uma solução de sulfato de cobre puro. Para confirmar esta hipótese, realizou-se uma análise espectrofotométrica da solução nesta faixa pH e foi observado um comprimento de onda máximo em 800 nm, associada a espécie $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (BARBOSA et al., 2005). Além do mais, com o aumento do pH foi observado a presença de um precipitado gelatinoso de coloração azul, especialmente próximo ao pH 5, que pode ser associada à presença de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ insolúvel.

Na faixa de pH compreendida entre 6 e 7, foi observado um aumento em ambos os tempos de relaxação, o que permite inferir que houve uma alteração dos ligantes

diretamente coordenados aos íons cúpricos. Acrescentado a este fato, foi observado uma alteração nos comprimentos de onda de 800 nm para 600 nm. Esta alteração está associada à interação do ligante sorbitol aos íons cúpricos e, portanto, uma nova espécie complexa em solução começa a ser formada (BARBOSA et al., 2005).

Deste modo, torna-se possível o monitoramento da formação desta nova espécie complexa por relaxometria, uma vez que o aquocomplexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ deixa gradualmente de existir em solução, pois as moléculas de água são progressivamente substituídas pelas moléculas de sorbitol. Essa complexação reduz o efeito paramagnético do Cu^{2+} sobre a relaxação dos hidrogênios da água e os tempos de relaxação aumentam de aproximadamente 0,3 s para 2,5 s (T_1) e de 0,3 s para 1,5 s (T_2), como também observado no capítulo 02 quando se estudou complexos de Cu^{2+} e EDTA.

Ao se aumentar a alcalinidade do sistema foi observado que a coloração da solução gradualmente muda de azul claro para uma tonalidade mais escura. Esta alteração foi monitorada por espectrofotometria, na qual foi notado um deslocamento no comprimento de onda de 600 nm para 650 nm. A partir do pH 11 notou-se que a solução passou a ter uma coloração azul muito intensa, além da completa ausência de precipitado. Nas medições de relaxometria foi observado que os valores de T_2 se aproximaram aos valores de T_1 , nesta faixa de pH.

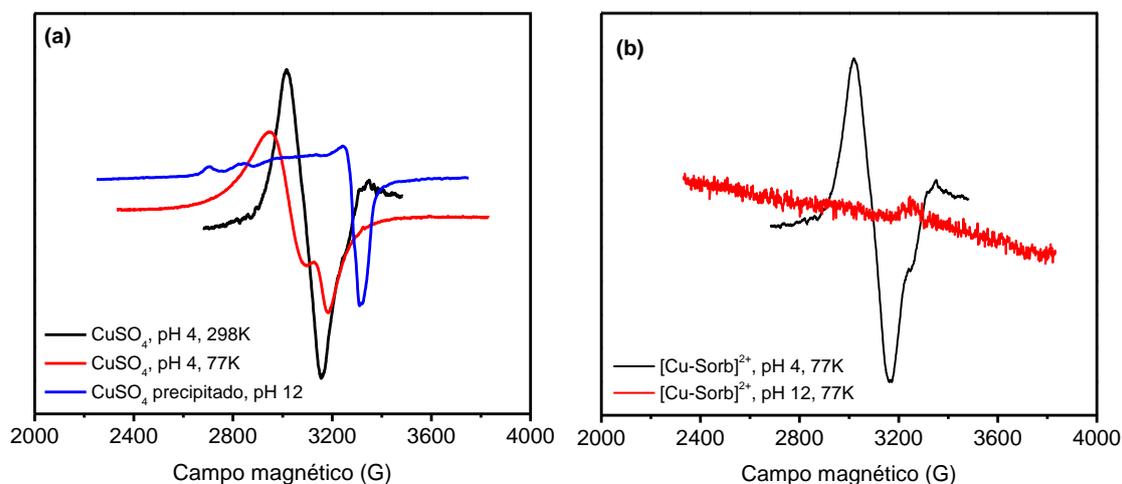
Estes resultados sugerem que apesar da espécie $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ encontrar-se formada em solução, ela altera sua estrutura ao longo da faixa de pH, conforme pode ser sugerido a partir das observações espectrofotométricas e relaxométricas. Além do mais, próximo ao pH 11 pode-se concluir que esta nova conformação do complexo não exerce mais uma influência paramagnética significativa sobre os prótons do solvente. Esta observação sugere que apesar de ser encontrada em solução, o complexo de sorbitol “blinda” os íons cúpricos em relação ao acesso das moléculas de água. Uma exceção a esta observação ocorreu para o sistema descrito na figura 4.2(a), na qual não foi observado o surgimento de um pico máximo de relaxação T_2 , nem tampouco a aproximação dos valores de T_1 e T_2 . Portanto nesta situação, a alta razão molar entre o metal e o ligante permite que exista uma alta concentração de íons Cu^{2+} livres em solução, tornando o efeito paramagnético causado por estas espécies, o fator de maior proeminência dentro do sistema.

Por fim, para $\text{pH} > 12$ foi observado a progressiva redução para os valores de T_2 . Estas observações podem ser associadas à hidrólise alcalina do complexo. Deste modo,

nestes valores de pH o complexo em solução pode estar sendo hidrolisado, deixando o íon paramagnético mais acessível às moléculas do solvente. Com isso a água passa a ter novamente acesso aos íons cúpricos, diminuindo os valores de T_2 .

Para confirmar a reação de complexação em meio aquoso também foram realizados estudos com a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Nas figuras 4.3 (a-b) estão os resultados obtidos por EPR para os sistemas estudados. Na figura 4.3 (a) estão os espectros de EPR da solução de sulfato de cobre sem o ligante, em pH 4, obtido a 298K (linha preta) e 77K (linha vermelha) e o espectro de EPR do mesmo sal, em pH 12 (linha azul) obtido a 298K. Na figura 4.3 (b) estão os espectros de EPR (77 K) do complexo em pH 4 (linha preta) e em pH 12 (linha vermelha).

Figura 4.3 - Espectros de EPR obtidos para o sistema contendo íons cúpricos. Em (a) estão os espectros de EPR para o sulfato de cobre (298 K) em solução e em pH 4 (linha preta) e a 77K (linha vermelha) no mesmo pH. Em azul está o espectro de EPR do precipitado de CuSO_4 em pH 12 a 298 K. Em (b) estão os espectros EPR para os íons na presença de sorbitol, a 77 K, em pH 4 (linha preta) e pH 12 (linha vermelha).



Na figura 4.3 (a) é possível notar que a solubilização do sulfato de cobre a pH 4 (298 K) forneceu uma única e larga linha no espectro de EPR (linha preta), centralizada em 3200 G, e que pode estar associada à presença do aquocomplexo, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, conforme descrito por (RABOVSKY et al., 2010). A presença do aquocomplexo foi confirmada a 77 K, onde pode-se observar o surgimento de uma linha mais bem definida com dois sinais (linha vermelha). Esses espectros são bem diferentes do espectro do precipitado de hidróxido de cobre (linha azul). Neste caso, foi notado o surgimento de uma linha de alta intensidade, centralizada em 3400 G e com sinais de menor intensidade em 2705,6 G, 2844, 2 G, 2890, 4 G e 3245, 4 G. Este deslocamento indica que estes íons

estão presentes em um arranjo diferente do anterior. Isto é justificável tendo em vista que nesta situação ($\text{pH} \approx 12$), não temos mais a presença do aquocomplexo em solução, mas sim da espécie sólida $\text{Cu}(\text{OH})_2$.

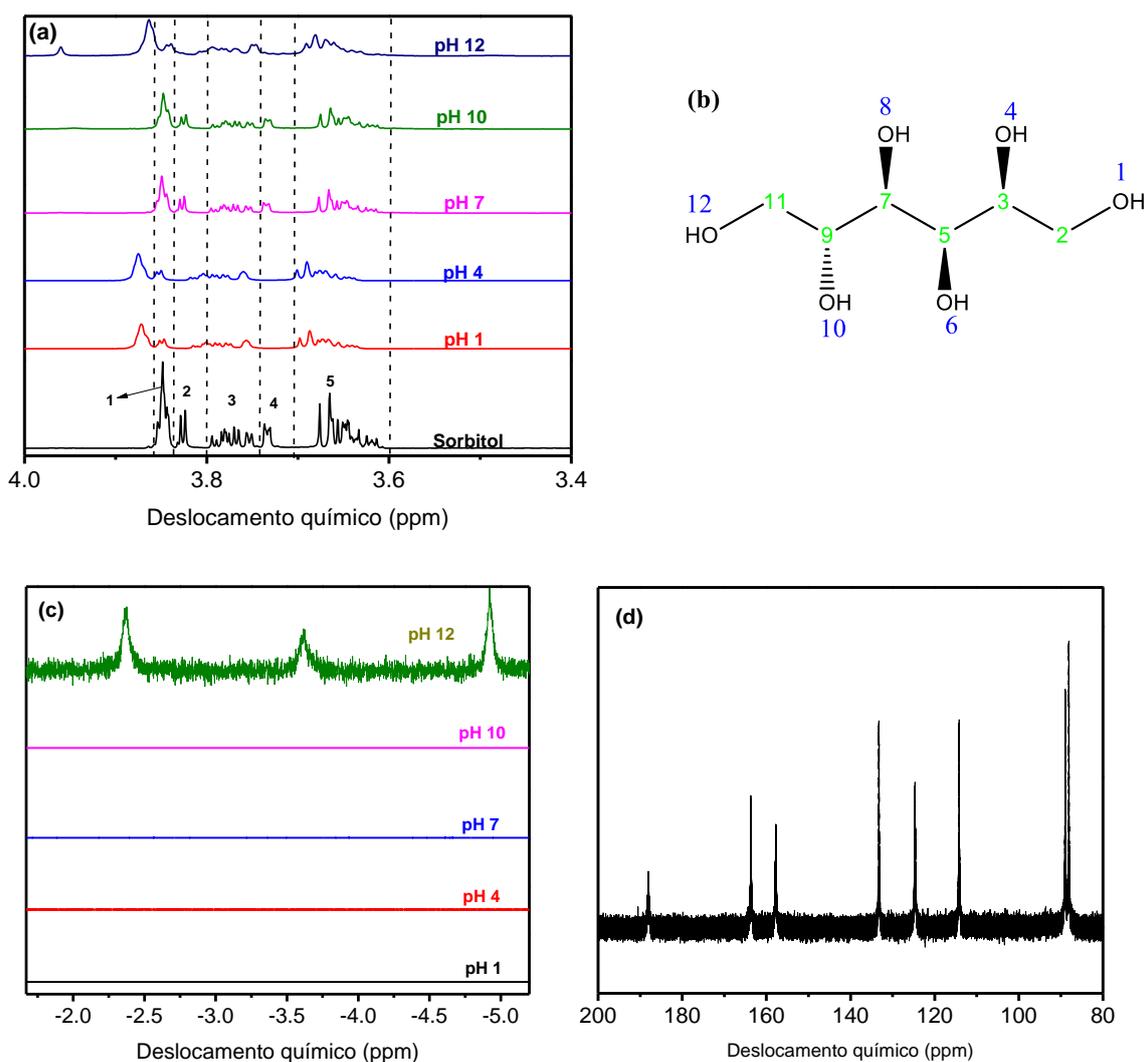
Os espectros de EPR (figura 4.3b) de sulfato de cobre na presença do sorbitol em $\text{pH} \approx 4$ (linha preta) é muito similar ao espectro obtido para o aquocomplexo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (figura 4.3a), indicando que o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ não se forma em meio ácido. Por outro lado, em $\text{pH} \approx 12$ e a 77 K não foi observado nenhum sinal para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$, apenas a presença de um sinal muito fraco (linha vermelha, figura 4.3 (b)), correspondente a cavidade. A ausência dos sinais de Cu^{2+} pode ser explicada por um arranjo estrutural que possibilita uma alta interação dipolar $\text{Cu}^{2+}\text{-Cu}^{2+}$. Com esta interação dipolar forte ocorre um alargamento muito grande do sinal que dificulta a sua detecção (PANICH et al., 2016). Este resultado indica que em solução, o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ pode também assumir uma estrutura polimérica, com múltiplos íons Cu^{2+} a uma distância aproximada de 12 Å, conforme observado em fase sólida, com a difração de raios-X (KLUFERS; SCHUHMACHER, 1994; KLUFERS; SCHUHMACHER, 1995).

Assim, fez-se também estudos com RMN em alta resolução dessas soluções, em função do pH, para se obter maiores informações da estrutura do complexo. Os espectros foram obtidos em uma solução 90% H_2O e 10% D_2O . Na figura 4.4(a) estão os espectros de RMN de ^1H para as soluções contendo apenas o sorbitol (linha preta) e para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ nos pH 1 (vermelho), 4 (azul), 7 (rosa), 10 (verde) e 12 (azul marinho). Na figura 4.4(b) está a estrutura do sorbitol com destaques em azul para os núcleos de hidrogênio da hidroxila e em verde para os demais núcleos de hidrogênio. Na figura 4.4(c) estão os espectros para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ com uma expansão na região negativa de deslocamento químico, entre -3 a -5,5 ppm. Finalmente, na figura 4.4(d) está o espectro para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ em pH 12 expandido na região entre 80 e 200 ppm.

Na figura 4.4(a) estão os espectros de ^1H -RMN para os hidrogênios ligados aos carbonos discriminados (em verde) 2, 3, 5, 7, 9, e 11 presentes na estrutura do ligante sorbitol, representado na figura 4.4 (b)). O primeiro multipletto (1) entre 3,84 – 3,86 ppm corresponde a interação de dois núcleos de hidrogênio, simbolizados pelos números 9 e 3 (figura 4.4 (b)). O segundo multipletto (2) entre 3,82 – 3,83 ppm corresponde a um dubleto ($J = 2,93$ Hz) associado ao hidrogênio designado pelo número em verde 2. O terceiro multipletto (3) entre 3,74 – 3,80 ppm está associado aos hidrogênios designados

pelo número 5. Por sua vez, o multipletto (4) localizado entre 3,71 – 3,74 ppm corresponde a um dubleto associado hidrogênios assinalados em verde pelo número 11. O último multipletto (5) entre 3,60 – 3,68 ppm está associado a interação entre os hidrogênios assinalados pelos números em verde 7, 11 e 2. Finalmente, os sinais correspondentes aos hidrogênios associados às hidroxilas não aparecem na expansão realizada na figura 4.4 (a), pois são facilmente trocáveis pelos prótons da água. Estas atribuições para o espectro do sorbitol foi realizada suportada no banco de dados do site HMDB (do inglês, *Human Metabolome Database*).

Figura 4.4 - (a) Espectros de ^1H -RMN obtidos a 600 MHz e a 25 °C para o sorbitol (linha preta) solubilizado em uma solução 90% H_2O e 10% D_2O e na presença de íons Cu^{2+} , em função do pH 1 (vermelho), pH 4 (azul), pH 7 (rosa), pH 10 (verde) e pH 12 (azul marinho). Para a aquisição destes espectros foram empregando um capilar contendo uma solução de TMS P como referência. (b) Estrutura do sorbitol. (c) Expansão do espectro na região entre -2.0 e -5.0 ppm e em (d) Espectro de ^1H -RMN entre 80 e 200 ppm, do complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ na proporção 1:1 em pH 12.



Além do mais, na figura 4.4(a) é possível observar que os espectros de sorbitol na presença de íons cúpricos e em todos os valores de pH são bem mais largos do que no sorbitol puro (linha preta). Nesta mesma figura pode-se observar que no espectro da amostra em pH 12 ocorre um maior alargamento dos sinais. Na amostra em pH 12 também são observados três sinais em -2,37 ppm, -3,61 ppm e -4,96 ppm (figura 4.4(c)) e vários sinais acima de 80 ppm (88,20 ppm, 89,07 ppm, 114,28 ppm, 124,76 ppm, 133,38 ppm, 157,91 ppm, 163,77 ppm e 188,24 ppm), conforme observado na figura 4.4(d) e que não estão presentes nas outras faixas de pH. Os valores de deslocamentos químicos em valores negativos e acima de 80 ppm são devido ao deslocamento paramagnético, conforme similarmente observado para outros complexos contendo íons cúpricos (SATCHER JUNIOR; BALCH, 1995).

O alargamento dos sinais observado para a amostra de $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ em todos os valores de pHs está associado a relaxação paramagnética causada pela interação dos núcleos de hidrogênio com os íons Cu^{2+} . Para demonstrar esta hipótese fez-se a determinação de T_1 e T_2 da amostra em pH 12 onde se obteve $T_1 = 18,80$ ms e $T_2 = 9,63$ ms para o sinal em -2,37 ppm; $T_1 = 13,60$ ms e $T_2 = 6,49$ ms para o sinal em -3,61 ppm e $T_1 = 25,00$ ms e $T_2 = 11,70$ ms para o sinal em -4,96 ppm. Estes valores são sensivelmente menores em relação aos valores médios encontrados para o ligante na ausência de íons paramagnéticos ($T_1 = 161,00$ ms e $T_2 = 116,00$ ms). Para os cálculos relativos ao ligante foram levados em consideração os sinais entre 3,61 ppm e 3,96 ppm. Demonstrando desta forma, o forte campo magnético local oriundo do elétron desemparelhado pertencente aos íons cúpricos sobre a relaxação dos núcleos de hidrogênio.

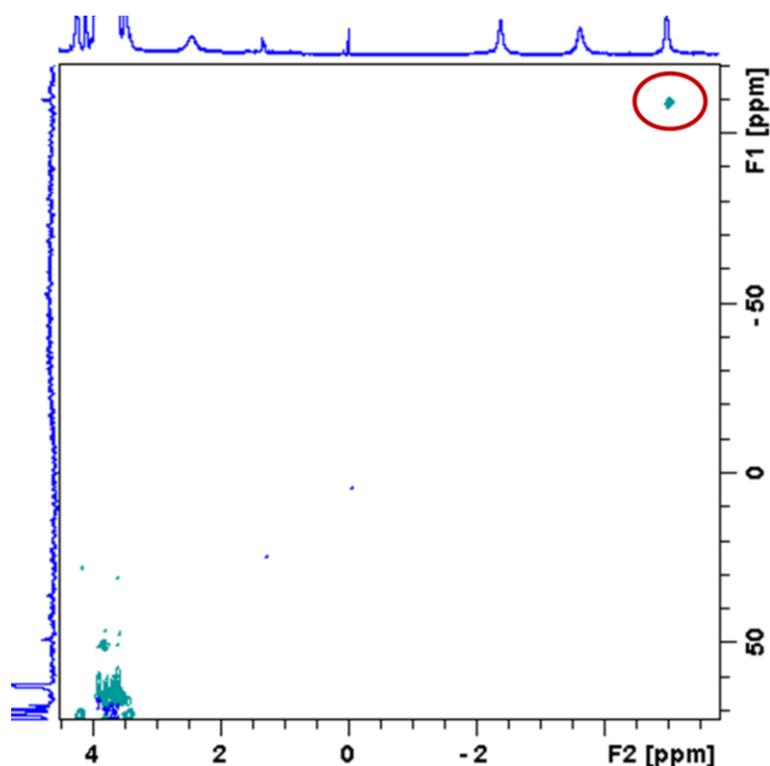
Também se realizou experimentos em solução 100% D_2O para ver se alguns dos hidrogênios fora da região “normal” de deslocamento químico, de 0 a 10 ppm, correspondiam à hidrogênios trocáveis ou não. Os três sinais negativos não tiveram diferenças nos valores de área absoluta com a solubilização em D_2O puro, indicando que esses hidrogênios estão ligados aos carbonos. De igual modo, os sinais de ^1H acima de 80 ppm (figura 4.4(d)), também foram observados na presença de D_2O , indicando que esses sinais podem ser atribuídos aos núcleos de hidrogênios não trocáveis pertencentes a estrutura do complexo, e possivelmente vizinhos aos íons cúpricos.

Para confirmar que os sinais em valores negativos eram dos hidrogênios ligados

ao carbono, fez-se experimentos bidimensionais de correlação ^1H - ^{13}C . Na figura 4.5 está um espectro HMQC (do inglês, *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) para a amostra em pH 12. A escolha do experimento de HMQC em relação ao HSQC (do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) baseou-se no fato da sequência HMQC ter um menor tempo de excitação/evolução, permitindo que sinais com curtos valores de T_2 possam ser detectados.

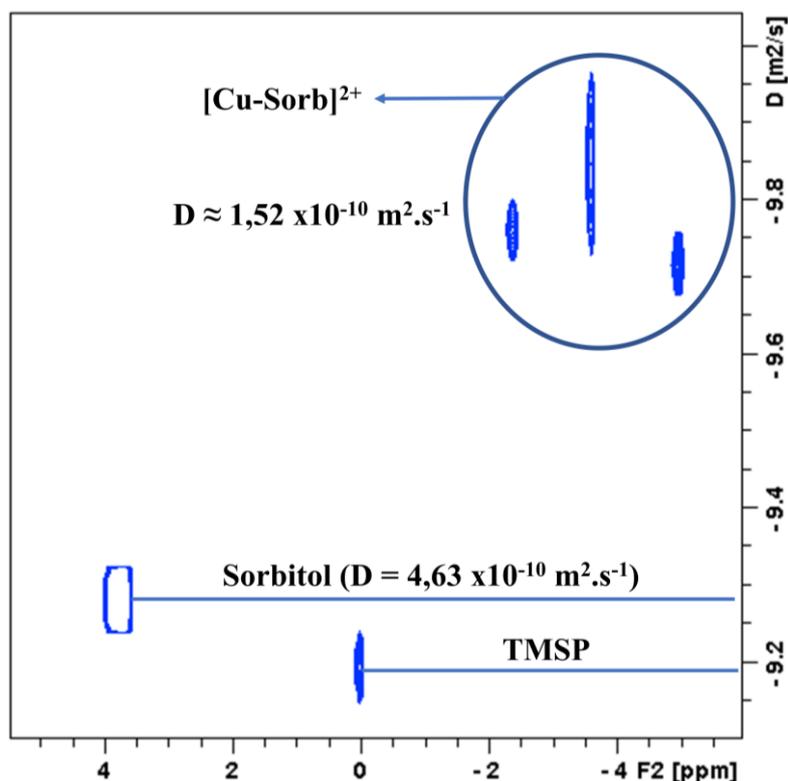
Como pode-se ver na figura 4.5 há uma correlação entre o sinal em - 4,94 ppm com o carbono em -110 ppm, marcado com um círculo vermelho. Também é possível ser notado, que os outros sinais na região negativa do espectro de ^1H não possuíram correlação com nenhum núcleo de carbono. A falta dessas correlações pode estar associada a alguns fatores, tais como: à perda de sinal devido à relaxação transversal; à não excitação dos núcleos de ^{13}C aos quais os mesmos estão ligados, uma vez que a largura e potência do pulso utilizados podem não ter sido suficientes para excitar uma janela espectral tão grande, de 500 ppm, quando tradicionalmente utiliza-se 200 ppm; ou a possibilidade desses núcleos de ^{13}C possuírem deslocamentos químicos fora da janela espectral empregada.

Figura 4.5 - Espectro HMQC para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ em pH 12 e a 298K, demonstrando experimentalmente a correlação obtida para o ^1H em -4,94 ppm com o núcleo de ^{13}C em -110 ppm (círculo vermelho).



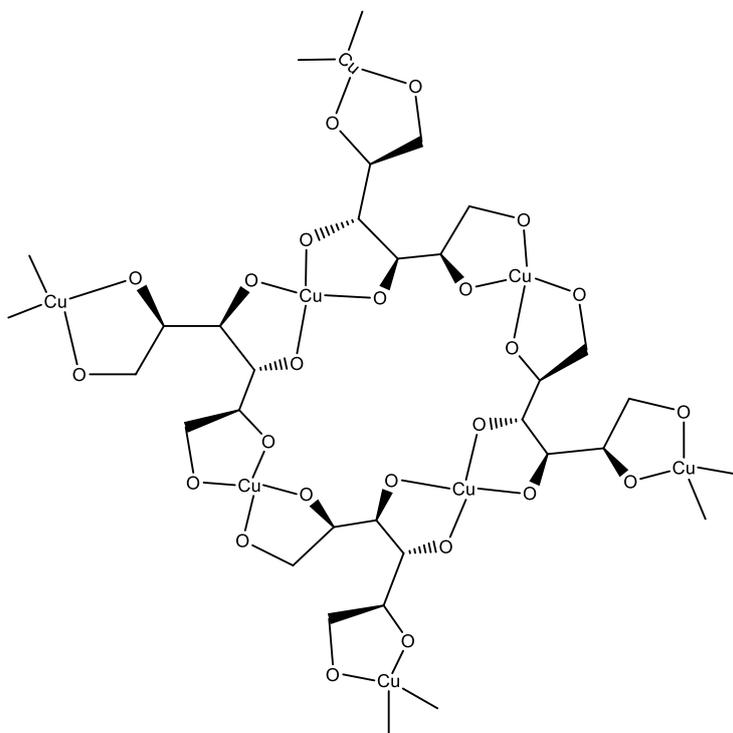
Também foram realizados experimentos de medição da difusão molecular para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ em pH 12 usando-se a sequência DOSY (do inglês, *Diffusion Ordered Spectroscopy*) (figura 4.6), com o intuito de ser confirmar a natureza macromolecular deste quelato. Nesta figura é possível observar que as linhas na região negativa do espectro apresentam coeficientes de difusão da ordem de $1,5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, menor do que o coeficiente de difusão do sorbitol ($D = 4,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, medido a partir do sinal em 3,98 ppm. No DOSY também é possível identificar outro sinal em 4,12 ppm com o mesmo coeficiente de difusão do complexo. O valor de D dos sinais em valores negativos de deslocamento químico são da ordem do D atribuído a macromoléculas (DERRIC; McCORD; LARIVE, 2002). Estes resultados indicam que pode também existir em solução uma estrutura um pouco menor que o complexo macromolecular, talvez uma estrutura intermediária. O sinal em 0 ppm corresponde ao TMSP, usado como referência nos experimentos. Deste modo, é possível inferir que o complexo $[\text{Cu-sorb}]^{2+}$ formado em pH 12 apresenta um arranjo macromolecular, possivelmente dendrimerico próximo ao discutido por Imamura et al. (1975) e confirmado até o momento apenas no estado sólido (KLUFERS; SCHUHMACHER, 1995).

Figura 4.6- Espectro DOSY para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ em pH 12 e a 298K.



Finalmente, é possível sugerir, a partir dos dados experimentais, combinando RMN-AR e relaxometria, arranjos conformacionais em função da faixa de pH para o complexo formado entre sorbitol e íons cúpricos (figura 4.7). Deste modo, propõe-se que um complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ seja preliminarmente formado em pH próximo a neutralidade. Neste ponto, ocorreria a existência de moléculas de sorbitol incorporadas ao precipitado gelatinoso formado por hidróxido de cobre, aumentando parcialmente a solubilidade deste precipitado em solução. Aumentando a alcalinidade do sistema (na faixa de pH compreendida entre 7 e 10), propõe-se a existência de uma quantidade maior de moléculas de sorbitol em interação com o precipitado de hidróxido de cobre, perfazendo uma estrutura polimérica. Esta interação proporcionaria o surgimento de um sistema mais solúvel em comparação ao anteriormente descrito, contudo ainda existe em solução um pouco de precipitado gelatinoso de coloração azul escuro. Finalmente, próximo ao pH 12 existe a completa solubilização do precipitado, e a formação de um complexo macromolecular de $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ em solução, que pode ser similar à estrutura proposta na literatura e confirmada por raios-X em estado sólido (monocristal).

Figura 4.7 - Estrutura proposta por intermédio da combinação dos resultados obtidos por relaxometria e RMN-AR para o complexo $[\text{Cu-Sorb}]^{2+}$ em pH 12.



Fonte: Autoria própria.

4 Considerações finais

Dado os resultados alcançados com RMN e EPR pode-se concluir que em pH 12 há a completa formação do complexo macromolecular formado entre o ligante sorbitol e íons cúpricos. Deste modo, demonstrou-se o potencial da espectroscopia de RMN/EPR para o estudo de complexos envolvendo carboidratos e íons paramagnéticos, tornando possível a aplicação desta abordagem ao estudo complexométrico envolvendo outros polissacarídeos com íons cúpricos ou mesmo outras espécies paramagnéticas.

Capítulo 05

Desenvolvimento de sondas paramagnéticas para tomografia por RMN: Uma abordagem relaxométrica in vitro

Capítulo baseado em:

KOCK, F. V. C.; STEFANIA, R.; GIANOLIO, E.; AIME, S. Synthesis and relaxometric characterization of novel contrast agents for MRI applications (Em preparo)

SILVA, S. R.; DUARTE, E. C.; RAMOS, G. S.; KOCK, F. V. C.; ANDRADE, F. D.; FRÉZARD, F.; COLNAGO, L. A.; DEMICHELI, C. Gadolinium(III) Complexes with N-Alkyl-N-methylglucamine Surfactants Incorporated into Liposomes as Potential MRI Contrast Agents. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

1 Introdução

O estudo da interação entre ligantes orgânicos e íons paramagnéticos é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos agentes de contrastes para tomografia por ressonância magnética nuclear (MRI, do inglês *Magnetic Resonance Imaging*). Estes agentes de contrastes são frequentemente complexos contendo íons paramagnéticos que possuem elevados valores de relaxividade longitudinal paramagnética (r_{1p}). Vários íons paramagnéticos como Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Cr^{2+} podem ser utilizados como possíveis agentes de contrastes para MRI, contudo o íon Gd^{3+} é mais comumente empregado devido aos seus sete elétrons desemparelhados e consequente elevado momento magnético eletrônico (BONNET et al., 2010). No entanto, a administração destes íons livres (na forma de seu respectivo aquocomplexo) é prejudicial para a saúde humana, devido à sua rápida hidrólise a pH fisiológico, levando a uma deposição no fígado e nos ossos, além de provocar a substituição de íons endógenos importantes ao organismo, como Ca^{2+} e Zn^{2+} (CARAVAN et al., 1999). Portanto, a sua complexação com ligantes, fornecendo complexos altamente estáveis torna-se um passo fundamental na busca de novos agentes de contraste.

Atualmente, os agentes de contrastes comerciais mais utilizados possuem apenas uma molécula de água coordenada ao íon paramagnético, dentre estes, é possível destacar o DOTAREM[®], nome comercial para o complexo Gd-DOTA (DOTA, corresponde à abreviação para o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), Prohance[®], nome comercial para o complexo Gd-(HP-DO3A) (HP-DO3A, corresponde à abreviação para o ácido 10-(2-hidroxipropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético) e o MAGNEVIST[®], nome comercial para o complexo Gd-DTPA (DTPA, corresponde à abreviação para o ácido dietilenotriaminopentacético) (AIME et al., 1998).

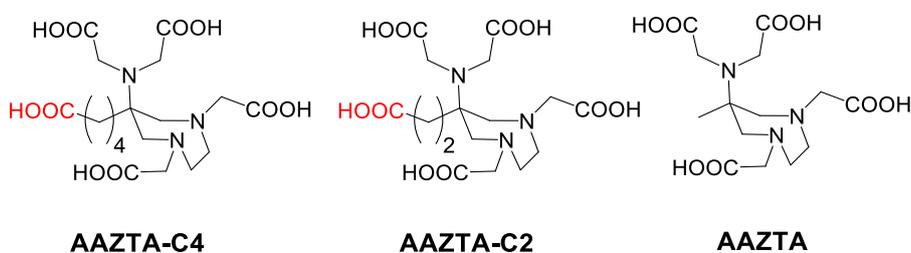
Apesar de ser bem conhecido que o aumento no número de moléculas de água coordenadas ao centro paramagnético possa diminuir a estabilidade do quelato, complexos com ligantes hepta- e hexa-dentado têm mostrado alta estabilidade com duas ou três moléculas de águas diretamente coordenadas ao íon paramagnético, respectivamente (DATTA et al., 2009; AIME et al., 2004). Neste contexto, o ligante AAZTA (ácido 6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepina-tetraacético), representado na figura 5.1, bem como seus derivados têm sido extensivamente pesquisados. Por exemplo, os complexos de AAZTA foram utilizados para formar macroagregados por intermédio

de interações com lipídeos, possibilitando a obtenção de elevados valores de $r_{1\rho}$ (GIANOLIO et al., 2007). Outros exemplos consistem na funcionalização destes complexos com substratos hidrofóbicos adequados para induzir uma interação com albumina humana, HSA (do inglês, *Human Serum Albumin*) (GIANOLIO et al., 2014) e modificação do centro de coordenação, através da inserção de ácidos fosfínico (ERMELINDO et al., 2013) e fosfônico (GUANCI et al., 2015) para obtenção de derivados mais interessantes para aplicações em MRI. Por fim, vários derivados foram concebidos com o intuito de se incorporar grupos funcionais capazes de serem facilmente conjugados com peptídeos, conforme descrito por (MAMEDOV et al., 2012; MINAZZI et al., 2014).

Portanto, as pesquisas neste segmento estão direcionadas para o desenvolvimento de potenciais agentes de contraste paramagnéticos que possam ser empregados no diagnóstico preciso, rápido e evidentemente o mais precoce possível, para várias doenças como por exemplo, câncer, por MRI. Assim, a busca de novos agentes de contrastes mais específicos é de grande relevância para diagnósticos clínicos e estudos biomédicos.

Deste modo, o objetivo deste capítulo foi o estudo termodinâmico e relaxométrico de novos derivados do complexo $[Gd-AAZTA]^-$ funcionalizados lateralmente com ácidos carboxílicos de cadeia curta (C_2 e C_4), que posteriormente possibilitará bioconjugações com peptídeos, reduzindo a mobilidade interna do núcleo paramagnético, e consequentemente do quelato, permitindo a obtenção de sistemas de alta relaxividade para aplicações em tomografia por ressonância magnética (MRI).

Figura 5.1 - Estruturas químicas para os ligantes desenvolvidos e aplicados neste capítulo.



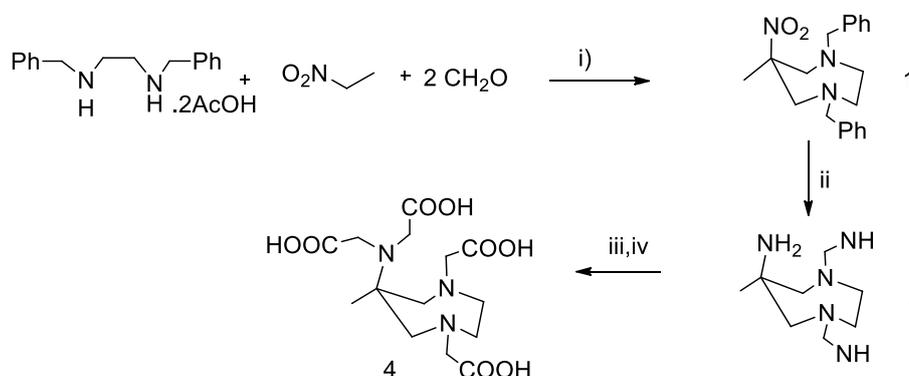
Fonte: Autoria própria.

2 Materiais e métodos

2.1 Síntese dos ligantes

A síntese dos ligantes AAZTA, AAZTAC₂COOH e AAZTAC₄COOH empregados neste capítulo, encontra-se bem descrita por (AIME et al., 2004; MANZONI et al., 2012). O passo-chave para todas estas sínteses consiste na formação do anel de sete membros (figura 5.2), através de um protocolo regido pela reação de nitro-Mannich. Deste modo, para a síntese do AAZTA, por exemplo, aquece-se uma mistura de nitroetano, formaldeído e N,N'-dibenziletilenodiamina-diacetato em acetato de etila. Este sistema conduz à formação do composto 1. A redução do grupo nitro e a concomitante reação de desbenzilação, foi realizada através da hidrogenação catalítica do composto previamente obtido, conduzindo ao composto 2, uma triamina fortemente básica. Uma exaustiva alquilação dos átomos de nitrogênio com bromoacetato de terc-butila na presença de carbonato de potássio e ácido trifluoracético, foi empregada para remover os ésteres terciários, e fornecer o ligante AAZTA, conforme observado na figura 5.2. A síntese dos ligantes foi realizada em colaboração com o laboratório de síntese orgânica sediado no MBC (do inglês, Molecular Biotechnology Center) em Turim, Itália.

Figura 5.2 - Esquema para a síntese do ligante AAZTA.



Fonte: AIME, S. et al. [Gd-AAZTA]: A New Structural Entry for an Improved Generation of MRI Contrast Agents. *Inorganic Chemistry*, 43, 7588-7590, 2004.

2.2 Preparo dos complexos de Gd³⁺

Uma solução de GdCl₃ (1,16 mM) em água deionizada foi preparada a partir da solução estoque de GdCl₃ (51,8 mM). Os ligantes sólidos (AAZTA e seus derivados), previamente sintetizados foram solubilizados em água para obter a concentração exata desejada para complexar o metal. As amostras dos complexos foram preparadas pela

mistura de uma quantidade adequada da solução contendo os íons Gd^{3+} e o ligante desejado, na proporção molar de 1:1. Foi tolerado um excesso, de no máximo 2-5% de ligante. A ausência de íons Gd^{3+} livres em solução foi confirmada usando o indicador xylenol, conforme descrito por (BARGE et al., 2006). O pH final da solução foi ajustado para 7 e confirmado com um eletrodo calibrado com soluções tampão Metrohm, pH 4 e 7. A concentração de íons Gd^{3+} nos complexos foi determinada por relaxometria, após o complexo ter sido completamente desmineralizado com uma solução concentrada de HCl (37%, v/v) por 24 h a 120 °C.

2.3 Análise relaxométrica

A taxa de relaxação longitudinal observável (R_{1obs}) foi medida usando o espectrômetro Stelar Spinmaster (Mede, Pavia, Italy) operando a 0,47 T e empregando a sequência de pulsos inversão-recuperação (IR), com pulsos de 90° de 3,5 μ s, 2 scans e 16 incrementos de tempo entre os dois pulsos da sequência. A reprodutibilidade foi estimada em $\pm 0,5\%$, a partir do desvio padrão entre três experimentos independentes.

Os perfis em função do campo magnético foram realizados empregando valores de R_{1obs} adquiridos em função do campo magnético na faixa compreendida entre 0,01 e 20 MHz (o que corresponde a faixa de 0,00024 T e 0,47 T) empregando, para esta finalidade um espectrômetro Stelar automático de campo variável, FFC (do inglês, *Fast Field Cycling*). Por outro lado, para os pontos obtidos na faixa compreendida entre 20 MHz (0,47 T) a 70 MHz (1,7 T), foram realizados empregando experimentos independentes, aplicando a sequência de pulsos IR, contudo, usando um espectrômetro modelo Stelar Spinmaster operando a campos magnéticos variáveis, porém não-automático. Para ambos os experimentos, a temperatura foi controlada, empregando um controlador de temperatura Stelar VTC-91 equipado com um fluxo de ar. A incerteza na medição da temperatura usando este sistema é de $\pm 0,1^\circ C$.

2.4 Aquisição do espectro de 1H -RMN para o complexo EuAAZTAC₂COOH

Para este experimento, os dados foram obtidos empregando um espectrômetro modelo BRUKER Avance 600 MHz (14.09 T), equipado com uma sonda BBI de 5 mm e usando 100 μ L de D₂O para o lock interno e 500 μ L da solução contendo o complexo. Os parâmetros experimentais foram: Janela espectral de 1000 Hz, pulso de 90° (7 μ s), tempo de aquisição de 10 ms e 1000 scans.

2.5 Relaxometria por ^{17}O -RMN

Para estes experimentos, os dados foram adquiridos em função da temperatura (275K – 346K) empregando um espectrômetro modelo BRUKER Avance 600 MHz (14,09 T) equipado com uma sonda BBI de 5 mm e usando um capilar contendo uma solução de D_2O como lock externo. Os parâmetros experimentais foram: Janela espectral de 1000 Hz, pulso de 90° (7 μs), tempo de aquisição de 10 ms e 1000 scans. Soluções contendo 2,6% do isótopo ^{17}O foram empregadas (Yeda, Israel). A taxa de relaxação transversal observada (R_2) foi calculada a partir da largura do sinal a meia altura ($\Delta\nu_{1/2}$): $R_{2obs} = \pi \cdot (\Delta\nu_{1/2})$.

2.6 Experimentos de transmetalção com íons endógenos

Os experimentos de transmetalção foram realizados usando uma abordagem cinética. A taxa de relaxação observável (R_{1obs}) foi medida em função do tempo por 3 dias, empregando uma solução tampão fosfato (pH 7) contendo íons Gd^{3+} na concentração de 0,50 mM e os sais ZnCl_2 e CaCl_2 na concentração de 10 mM, separados em dois eppendorfs distintos (volume total de 1,00 mL cada). Após preparado o sistema, R_{1obs} foi imediatamente medido usando a sequência de pulsos IR, e os valores obtidos foram designados como R_1 ($t = 0$ min). Conseqüentemente, estes sistemas foram sempre mantidos sob agitação e a temperatura foi mantida a 37°C . Os eppendorfs foram bem fechados para evitar quaisquer perdas por evaporação da solução. Uma alíquota representativa com volume aproximado de 80 μL para cada um dos sistemas foi coletado em intervalos de 60 min para os estudos relaxométricos. Concluída as medições, o volume foi retornado ao respectivo eppendorf, garantindo uma mínima variação na concentração dos cátions durante os experimentos. Os valores obtidos a partir da primeira execução, foram designados como R_1 (t).

2.7 Determinação das constantes de estabilidade para os complexos

As constantes de estabilidade para as espécies abordadas nesta pesquisa foram realizadas em colaboração com o departamento de química analítica e inorgânica sediado na universidade de Debrecen, Hungria. Para estes experimentos, a razão metal ligante usada foi 1:1, sempre em constante agitação. Para as medidas de pH e as titulações potenciométricas foram empregados um pHmetro modelo CRISON micro pH 2002, uma auto bureta modelo CRISON micro BU2030 e um eletrodo modelo Metrohm-6.0233.100. As titulações foram realizadas na faixa de pH compreendida entre pH 1,7 a pH 11,7. A

estimativa da concentração de $[H^+]$ foi realizada empregando o método proposto por (IRVING et al., 1967). Finalmente, as constantes de estabilidade foram estimadas empregando o software PSEQUAD[®] conforme descrito por (ZEKANY et al., 1985). Os resultados para estes experimentos serão apresentados na seção de material suplementar.

2.8 Análise dos dados

Todos os fittings realizados nesta pesquisa foram feitos empregando o software OringingPro versão 8.5.1.

3 Resultados e discussão

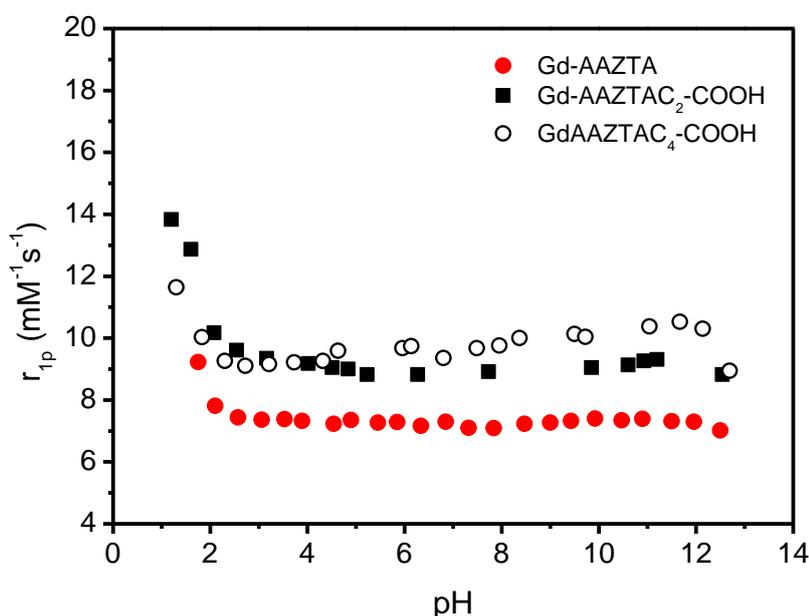
A figura 5.3 apresenta os perfis relaxométricos obtidos a 21MHz e a 25°C, em função da relaxividade paramagnética (r_{1p}) e do pH para uma solução aquosa contendo os quelatos $[Gd-AAZTAC_2COOH]^-$ (■) e $[Gd-AAZTAC_4COOH]^-$ (O). Para estes experimentos, a concentração molar para os íons gadolínio, $[Gd^{3+}]$ foi 0,24 mM para o derivado C₂ e 0,70 mM para o derivado C₄. Em pH neutro, os valores obtidos para r_{1p} foram $8,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $9,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para os derivados C₂ e C₄, respectivamente.

A partir desta figura é possível notar que ambos os complexos apresentam perfis relaxométricos semelhantes em função do pH. Os valores correspondentes a r_{1p} decrescem significativamente até pH 2 e depois permanecem quase constantes até pH 10-11. Posteriormente, os valores para r_{1p} diminuem em meios extremamente alcalinos para ambos os quelatos. Além do mais, é possível notar que os valores correspondentes a r_{1p} obtidos para ambos os derivados foram superiores em toda a faixa de pH aos valores obtidos para o quelato precursor, ou seja, sem modificação $[Gd-AAZTA]^-$ (●).

Os altos valores obtidos para a relaxividade em meio fortemente ácido podem estar relacionados à hidrólise ácida sofrida por estes quelatos em solução aquosa, nesta faixa de pH. Nestas condições estas espécies estão altamente protonadas com a consequente liberação do íon paramagnético Gd^{3+} que é caracterizado por possuir maiores valores para r_{1p} ($12,98 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a 21MHz e 25 °C) em comparação aos quelatos com o ligante AAZTA. No intervalo entre pH 2 a 10-11 estas espécies apresentam uma estabilidade em solução, por uma longa faixa de pH, sendo esta uma característica relevante para aplicações biológicas, uma vez que os futuros ensaios serão realizados à pH fisiológico (pH \approx 7). Além do mais, os valores para r_{1p} são menores, pois nesta faixa de pH, os complexos estão completamente formados em solução. A partir do pH 11-12 estas espécies começam a sofrer hidrólise alcalina em decorrência da elevada

concentração de hidroxilas no sistema. Consequentemente, os complexos se dissociam e os íons Gd^{3+} livres precipitam como $Gd(OH)_3$, decrescendo substancialmente os valores para r_{1p} .

Figura 5.3 - Perfis relaxométricos em função do pH para novos derivados do complexo $[Gd-AAZTA]^-$ (●), para $[Gd-AAZTAC_2COOH]^-$ (■) e para $[Gd-AAZTAC_4COOH]^-$ (○). Todos os perfis relaxométricos foram realizados obtendo-se os valores correspondentes a taxa de relaxação longitudinal observável (R_{1obs}) a 21MHz, 25 °C e na faixa de pH 1-14, empregando uma concentração em $[Gd^{3+}]$ de 0,24 mM para o derivado C₂ e 0,70 mM para o derivado C₄. Os resultados foram normalizados para a concentração de 1 mM para facilitar a comparação entre eles.



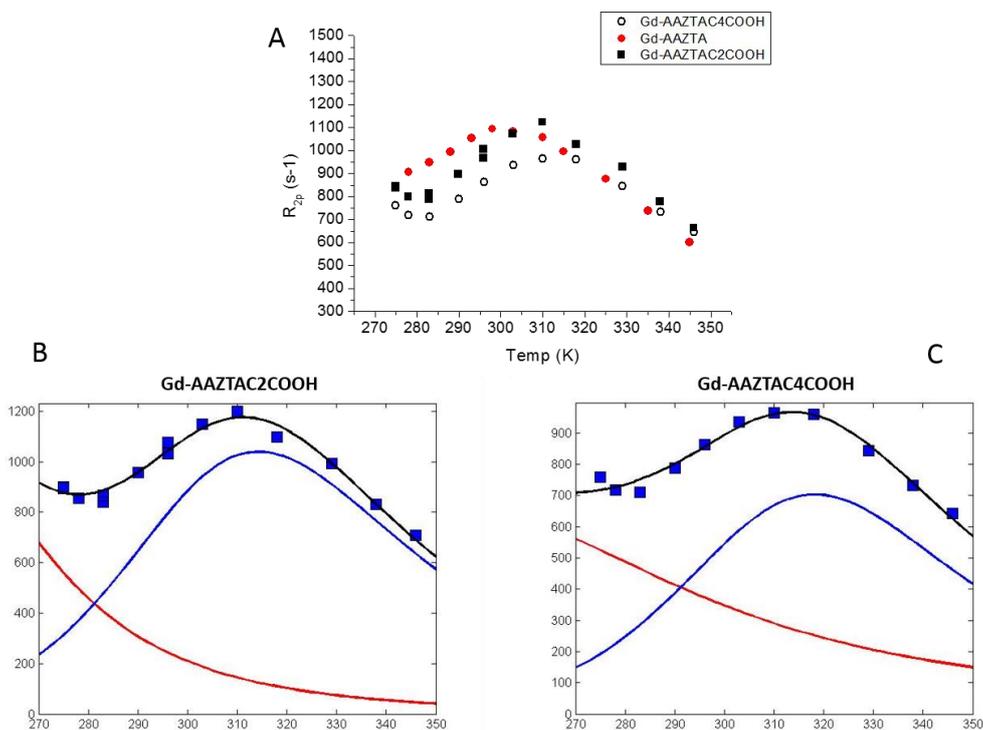
A figura 5.4 apresenta os perfis obtidos a partir da técnica de ^{17}O -RMN- R_{2p} em função da temperatura (275 K a 346 K). A partir destes perfis é possível estimar a taxa de troca das moléculas de água entre a primeira esfera de coordenação e o seio da solução (τ_M) para os derivados $[Gd-AAZTAC_2COOH]^-$ (■) e $[Gd-AAZTAC_4COOH]^-$ (○). Para estes experimentos a concentração de $[Gd^{3+}]$ foi de 10,7 mM e 9,6 mM para os derivados C₂ e C₄, respectivamente. Estes perfis foram comparados com o quelato precursor, $[Gd-AAZTA]^-$ (●). Além do mais, foi realizada uma normalização para a concentração de 20 mM em todos os sistemas, com o único intuito de facilitar a comparação entre os mesmos.

A partir desta figura é possível observar que os três sistemas investigados apresentam valores de relaxividade transversal paramagnética ($R_{2p} = R_{1(complexo)} - R_{1(controle)}$) semelhantes. Estes resultados sugerem que os dois novos derivados são

caracterizados pela presença de duas moléculas de água na esfera interna de coordenação, assim como o obtido para o quelato precursor. No entanto, enquanto o complexo não-modificado apresenta um perfil senoidal clássico para estes experimentos, no caso dos derivados $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ e $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ uma tendência descontínua foi observada. Nestes casos, a relaxividade de fato decai na faixa de temperatura muito baixa (273-283 K) e então começa a aumentar, alcançando um máximo em 310 K e decai novamente em temperaturas mais altas.

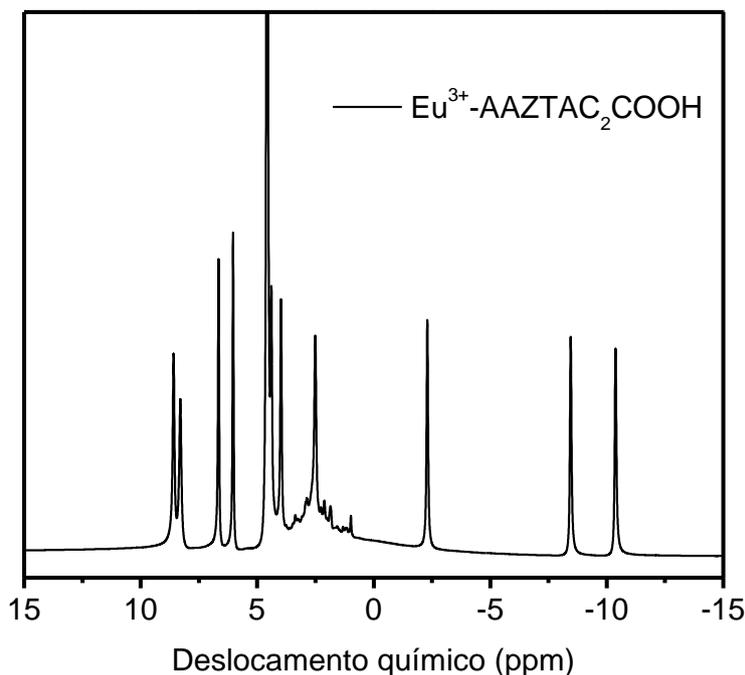
O perfil obtido para estes complexos leva a inferir que estes quelatos apresentam uma mistura de espécies em um rápido regime em relação a taxa de troca entre as moléculas de água, o que pode estar associado, a princípio, à presença de duas espécies diferentes em solução. Os dados foram ajustados usando as equações de Swift-Connick modificadas, em consonância com (KARIMI et al., 2016) para considerar a presença de duas espécies caracterizadas por dois conjuntos relaxométricos diferentes (figura 5.4 (b) e (c) e tabela 5.1). Esta hipótese foi parcialmente confirmada para ambos os complexos. Para o derivado $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ foi possível detectar um equilíbrio entre duas espécies com tempos de trocas distintos, 11,2 ns (49,2%) e 317 ns (50,8%). Valores muito semelhantes foram obtidos no caso do derivado $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$, no qual foi encontrado um valor de 38,6 ns (42,3%) para as espécies com troca mais rápida e de 325 ns (57,7%) para o caso da espécie que apresenta um regime mais lento.

Figura 5.4 - (a) Comparação entre os perfis relaxométricos obtidos por ^{17}O -RMN para a taxa de relaxação transversal (R_{2p}) em função da temperatura para os derivados $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ (■), $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ (○) e $[\text{Gd-AAZTA}]^-$ (●) não modificado, obtido a 14.09 T e em pH neutro (b e c). O fitting dos dados experimentais obtidos para $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ e $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ foi realizado empregando as equações modificadas de Swift-Connick, levando em consideração a presença de duas espécies diferentes, em consonância com (KARIMI et al., 2016).



Tendo em vista a necessidade de se confirmar a hipótese levantada acerca da presença ou não de dois isômeros em equilíbrio para os derivados do complexo $[\text{Gd-AAZTA}]^-$, realizou-se uma análise por ^1H -RMN para a espécie $[\text{Eu-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ a 600 MHz (figura 5.5). Este núcleo foi escolhido, pois o cátion Eu^{3+} possui propriedades químicas muito similares ao dos íons Gd^{3+} , contudo não apresenta um paramagnetismo tão acentuado, simplificando consideravelmente a análise do espectro obtido.

Figura 5.5 - Espectro obtido a 600 MHz e a 25°C para o complexo Eu^{3+} -AAZTAC₂COOH.



Os espectros de ^1H -RMN para o derivado Eu^{3+} -AAZTAC₂COOH mostraram dez linhas de ressonância correspondentes aos dez grupos metilênicos presentes no complexo metálico. Este resultado (confirmado em uma grande faixa de temperaturas), não suporta a presença de dois estereoisômeros, conforme previamente havíamos levantado como hipótese. Portanto, é possível inferir que o perfil descontínuo observado a partir dos experimentos de ^{17}O -RMN- R_{2p} para esta espécie pode estar associado a uma espécie única na qual se distinguem diferentes regimes de trocas químicas entre as moléculas de água pertencentes à esfera interna e externa.

Obteve-se maiores informações acerca dos fatores que influenciam r_{1p} para estes novos derivados, realizando perfis relaxométricos em função do campo magnético. Na figura 5.6 estão apresentados estes perfis em função do campo magnético obtidos a 25°C (■) e 37°C (O) para os derivados C₂ (a) e C₄ (b). Estes dados experimentais foram ajustados usando as equações propostas na teoria relaxométrica de Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM), em consonância com (AIME et al., 1998).

Para estes ajustes, os valores de τ_M para os dois derivados foram mantidos fixos a um valor médio entre a taxa de troca lenta e rápida determinada a partir dos experimentos de ^{17}O -RMN- R_{2p} . As curvas foram bem ajustadas usando os valores dos parâmetros apresentados na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Principais parâmetros relaxométricos obtidos a partir dos ajustes realizados nos gráficos provenientes dos experimentos em função do campo magnético e ¹⁷O-RMN.

	r_{1p} (0.47T, 298K)	τ_R (ps) ^[a]		τ_M (ns) ^[b]	q ^[c]	q_{ss} ^[d]
Gd-AAZTA	7,1	74		90	2	0
Gd-AAZTAC ₂ COOH	8,8	25°C	94	11,2 (49,2%) 317 (50,8%)	2	0,5
		37°C	52			
Gd-AAZTAC ₄ COOH	9,4	25°C	112	38,6 (42,3%) 325 (57,7%)	2	2,4
		37°C	75			

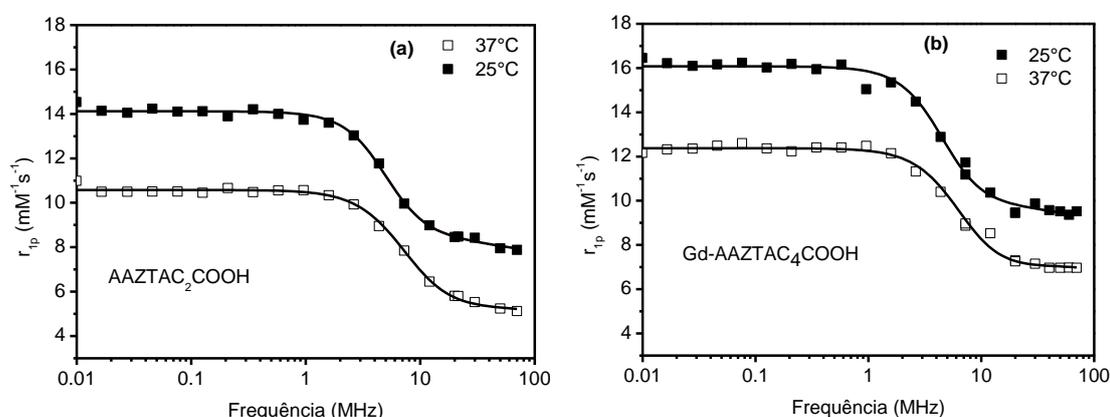
[a] tempo de correlação rotacional, [b] tempo de troca entre as moléculas de águas, [c] número de moléculas de água na esfera interna [d] número de moléculas de água na segunda esfera.

Na figura 5.6 (a) é possível observar que os valores de r_{1p} para o derivado C₂ permanece quase constante em 14 mM⁻¹.s⁻¹ e 11 mM⁻¹.s⁻¹ a 25°C e 37°C, respectivamente, até aproximadamente 1 MHz. Acima desta frequência, os valores de relaxividade diminuem progressivamente até 10 mM⁻¹.s⁻¹ e 6 mM⁻¹.s⁻¹ a 80 MHz e 25°C e 37°C, respectivamente. Nesse sentido, a relaxividade para o derivado C₄, mostrou valores maiores, permanecendo constante em 16 mM⁻¹.s⁻¹ e 12 mM⁻¹.s⁻¹ a 25°C e 37°C até 1 MHz e similarmente ao derivado anterior, mostrou acima desta frequência uma diminuição até 10 mM⁻¹.s⁻¹ e 8 mM⁻¹.s⁻¹ a 80MHz e 25°C e 37°C, respectivamente (Figura 5.6 (b)).

A maior relaxividade observada para o derivado C₄ em relação ao derivado C₂ não pode estar relacionada com os seus pesos moleculares ligeiramente diferentes, uma vez que apenas grupamento (CH₂)₂ diferencia-os e conforme pode também ser confirmado a partir dos valores obtidos para os tempos de correlação rotacional (τ_R) que são muito próximos (94 ps versus 112 ps a 25 °C). Deste modo foi necessário ajustar os perfis relaxométricos aplicando modelos matemáticos que fossem capazes de incluir além das contribuições clássicas da esfera interna e externa, a contribuição de moléculas de água proveniente da segunda esfera de coordenação. Comparando os resultados para estes ajustes é evidente que existe uma grande diferença na contribuição relativa a segunda esfera para os dois derivados (0,5 para o derivado [Gd-AAZTAC₂COOH]⁻ e 2,4 para o

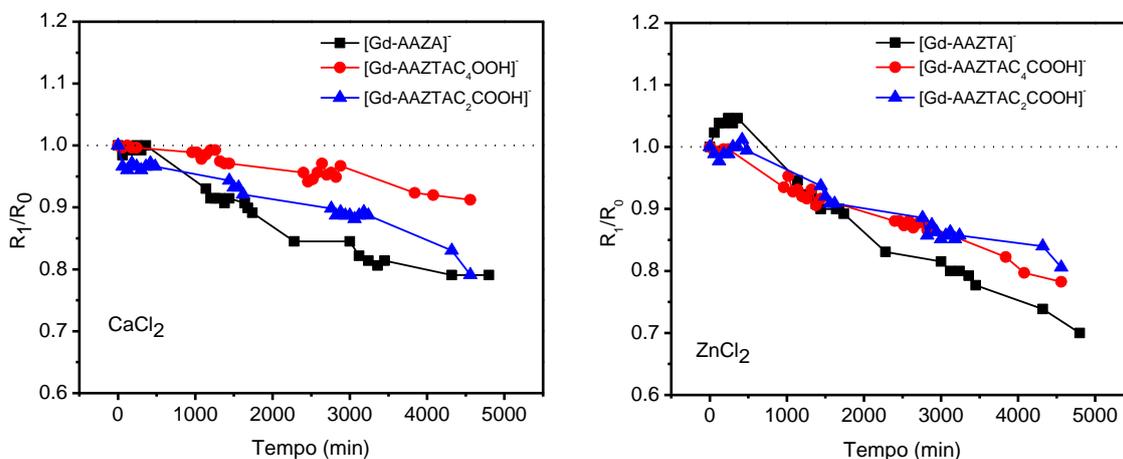
derivado [Gd-AAZTAC₄COOH]⁻), os diferenciando substancialmente em relação ao complexo precursor, que não apresenta moléculas de água na segunda esfera de coordenação (tabela 5.1). A contribuição para r_{1p} devido a presença de moléculas de água na segunda esfera de coordenação está bem descrita na literatura. Por exemplo Lebduskva et al., (2007) descreveram que a influência dessas moléculas em complexos de gadolínio proporciona um incremento em média 12% superior sobre os valores de r_{1p} em comparação ao complexo que não apresenta moléculas de água em sua segunda esfera de coordenação.

Figura 5.6 - Perfis relaxométricos obtidos em função do campo magnético na faixa de 0,01 MHz até 80 MHz para uma solução 1mM de [Gd-AAZTAC₂COOH]⁻ (a) e [Gd-AAZTAC₄COOH]⁻ (b) a pH ≈ 7 e 25°C (■) e 37°C (○).



Uma desvantagem para os complexos de Gd^{3+} está relacionada à substituição parcial ou completa deste metal por cátions endógenos (por exemplo, Ca^{2+} e Zn^{2+}), liberando íons gadolínio, que são potencialmente tóxicos ao corpo humano (DEBROYE et al., 2014). Na figura 5.7 são apresentados os resultados sobre os estudos de transmetalção envolvendo os íons endógenos Ca^{2+} e Zn^{2+} com os complexos [Gd-AAZTA]⁻ (■), [Gd-AAZTAC₂COOH]⁻ (●) e [Gd-AAZTAC₄COOH]⁻ (▲).

Figura 5.7 - Avaliação da taxa de relaxação longitudinal relativa (R_1/R_0) para o complexo $[\text{Gd-AAZTA}]^-$ (■), $[\text{Gd-AAZTAC}_2\text{COOH}]^-$ (●) e $[\text{Gd-AAZTAC}_4\text{COOH}]^-$ (▲) na presença de um excesso de CaCl_2 (esquerda) e ZnCl_2 (direita). Os experimentos foram realizados em tampão fosfato, pH 7, 37°C e 21 MHz, durante 3 dias.



Ao longo deste experimento foi observado que o complexo $[\text{Gd-AAZTA}]^-$ comporta-se de forma semelhante ao complexo Gd-DTPA (LAURENT et al., 2001), na qual também foi observado um ligeiro aumento para a taxa de relaxação longitudinal, mesmo em presença de baixas quantidades de ZnCl_2 (direita). No caso do complexo Gd-DTPA este aumento inicial foi explicado em termos da melhor acessibilidade dos íons Gd^{3+} à água durante o processo de descomplexação. Por sua vez, uma explicação semelhante pode ser feita para a espécie $[\text{Gd-AAZTA}]^-$. Neste caso, o processo de transmetalção pode ser explicado, através da formação de um complexo binuclear na presença de íons Zn^{2+} . Espera-se que este último complexo exiba uma maior relaxividade seja como resultado de um peso molecular mais elevado, seja como a ocorrência de um aumento da segunda esfera de coordenação.

Além do mais, como as concentrações para os íons endógenos são bem maiores que as concentrações para os íons Gd^{3+} , os íons Ca^{2+} e Zn^{2+} competem com este íon e uma transmetalção "verdadeira", pode ser monitorada a partir da diminuição dos valores de $R_{1\text{obs}}$ devido à formação de GdPO_4 insolúvel, uma vez que a titulação é realizada em tampão fosfato, em decorrência da formação dos complexos $[\text{Zn-AAZTA}]^{2-}$ ($\beta = 16,02$) e $[\text{Ca-AAZTA}]^{2-}$ ($\beta = 11,75$), em solução.

Interessantemente, quando a mesma titulação é realizada na presença dos novos derivados, o aumento na relaxação inicial observado anteriormente já não é obtido. Esse resultado sugere que possivelmente a transmetalção desses derivados ocorra através de

um mecanismo diferente. Portanto, é possível inferir que a presença de uma cadeia lateral externa ao anel se torne no primeiro local para a interação com os íons endógenos. Além disso, a interação preferencial do íon metálico na cadeia lateral resulta numa redução global do processo de transmetalção, conforme observado experimentalmente através da diminuição menos acentuada para os valores de R_{1obs} (figura 5.7).

Foram também determinadas as constantes de estabilidades para todas as espécies complexas formadas em solução, tanto para o derivado C_4 , $[Ca-AAZTAC_4COOH]^{2-}$ ($\beta = 12,05$) e $[Zn-AAZTAC_4COOH]^{2-}$ ($\beta = 17,05$), quanto para o derivado C_2 , $[Ca-AAZTAC_2COOH]^{2-}$ ($\beta = 11,91$) e $[Zn-AAZTAC_2COOH]^{2-}$ ($\beta = 16,93$). A partir destes resultados é possível concluir que estas espécies são menos estáveis em comparação ao complexo antes de sofrer a transmetalção ($\beta = 20,06$ e $\beta = 20,33$, para os derivados C_2 e C_4 , respectivamente). Portanto, estes novos derivados aparecem menos suscetíveis à transmetalção, ou seja, mais inertes, quando comparados ao complexo precursor, $[Gd-AAZTA]^-$ ($\beta = 18,93$). Deste modo é possível inferir a partir de todas estas propriedades apresentadas e discutidas neste capítulo, que estes novos derivados se configuram como complexos promissores para atuarem como agentes de contraste em aplicações empregando a tomografia por ressonância magnética.

4 Considerações finais

Dados os resultados alcançados neste capítulo conclui-se que a presença de uma cadeia lateral, proporciona a estes novos derivados $[Gd-AAZTAC_2COOH]^-$ e $[Gd-AAZTAC_4COOH]^-$, propriedades relaxométricas superiores ao complexo precursor, $[Gd-AAZTA]^-$, tais como maiores valores para r_{1p} (mesmo em elevados campos magnéticos), presença de moléculas de água em um regime de troca mais rápida com o solvente e um maior número de moléculas de água (0,5 e 2,4 para o primeiro e segundo derivado, respectivamente) na segunda esfera de coordenação (q_{ss}) em comparação ao complexo precursor, que não apresenta nenhuma molécula de água nesta esfera. Além do mais, estes complexos apresentaram uma taxa de transmetalção menor frente à relevantes íons endógenos (Ca^{2+} e Zn^{2+}), permitindo projetá-los como importantes sondas paramagnéticas para o diagnóstico precoce de tumores por MRI.

Capítulo 06

Desenvolvimento de sondas paramagnéticas para MRI: Uma abordagem relaxométrica in vivo

Capítulo baseado em:

TRIEPEI, M.; CAPUANA, F.; KOCK, F.V.C.; GIANOLIO, E.; PAGOTO, A.; STEFANIA, R.; DIGILIO, G.; AIME, S. Synthesis of high relaxivity gadolinium AAZTA tetramers as building blocks for bioconjugation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, p. 1428-1437, 2018.

1 Introdução

A geração de imagens por ressonância magnética nuclear, conhecida como MRI, tem experimentado um crescente sucesso, especialmente para um diagnóstico clínico rápido e preciso para uma ampla faixa de enfermidades (DEBROYE et al., 2014; MANUS et al., 2012; PAGOTO et al., 2016). Contudo, um importante desafio para esta técnica consiste na necessidade, em alguns casos, de aumentar a diferenciação entre tecidos saudáveis e tumorais, por exemplo, devido a presença de uma metástase proveniente da reprodução de células malignas (AIME et al., 2006; DEBROYE et al., 2014).

Para superar este desafio, o desenvolvimento de novos agentes de contrastes, mais específicos, minimamente inertes e que sejam facilmente eliminados pelo organismo, torna-se imprescindível. Estas espécies são comumente quelatos contendo íons paramagnéticos, frequentemente Gd^{3+} , associados à ligantes orgânicos, que atuam na redução tanto de T_1 quanto de T_2 , permitindo o assinalamento inequívoco da região afetada por um tumor. Este processo é governado pela interação entre o complexo contendo o íon paramagnético e proteínas presentes em processos trombóticos, como por exemplo a fibrina, conforme descrito por (CONSTANTINI et al., 1992; STARMANS et al., 2013; FALANGA et al., 2013; CHAABANE et al., 2015).

Deste modo, o desenvolvimento de sondas paramagnéticas sensíveis à esta proteína, aparece como uma abordagem promissora para o diagnóstico precoce de doenças que envolvam a formação de trombos, como arteriosclerose e diversos tipos de câncer (mama, pulmão, próstata e cérebro) (STARMANS et al., 2013). Recentemente, um macrocomplexo de $[Gd-DTPA]^{-2}$, foi conjugado com sucesso ao peptídeo (Ac-WQPCPWESWTFCWDPGGGK_ε(PEG-Linker)₂GGGK₂), apto a se ligar com a fibrina. Neste caso, os resultados demonstraram que este agente de contraste macromolecular apresenta uma alta relaxividade paramagnética ($r_{1p} = 42,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), além de ter uma elevada afinidade à células tumorais, conforme descrito por (CHAABANE et al., 2015).

Portanto, os principais objetivos deste capítulo consistirão na avaliação *in vitro* e *in vivo* do macrocomplexo FibPep- $[GdAAZTAC_4COOH]_4$, que contém uma sequência de aminoácidos proveniente de um anticorpo específico para a proteína fibrina, possibilitando a sua atuação como agente de contraste para o diagnóstico precoce de câncer de próstata (linhagem celular PC-3) em camundongos por tomografia de ressonância magnética.

2 Materiais e métodos

2.1 Obtenção do complexo macromolecular FibPep-dL-(Gd-AAZTAC₄COOH)₄

A síntese do peptídeo FibPep foi realizada de acordo com STARMANS et al., (2013). Para a conjugação com o tetrâmero de lisina (dL)-(Gd-AAZTA)₄ foi usada a metodologia proposta por (CHAABANE et al., 2015). Por sua vez, a complexação com os íons Gd³⁺, e a consequente formação da estrutura final do complexo foi realizada por titulação relaxométrica em pH fixo (pH \approx 6,5), monitorando a taxa de relaxação longitudinal observável (R_{1obs}) a 20 MHz e a 25°C em função da concentração de íons Gd³⁺. O excesso de Gd³⁺ em solução foi precipitado pela adição de NaOH até pH \approx 8. Posteriormente, o sistema foi centrifugado e filtrado e o complexo em solução foi coletado. A concentração residual de Gd³⁺ foi estimada, segundo o método espectrofotométrico proposto por (BARGE et al., 2006), aplicando uma solução do corante orange xylenol.

2.2 Análise relaxométrica

Os valores para R_{1obs} obtidos para o macrocomplexo foram adquiridos usando o espectrômetro Stellar Spinmaster (Mede, Pavia, Italy) operando a 0,47 T e empregando a sequência de pulsos inversão-recuperação (IR), com pulsos de 90° de 3,5 μ s, 2 scans e 16 incrementos de tempo entre os dois pulsos da sequência. A reprodutibilidade foi estimada em $\pm 0,5\%$, a partir do desvio padrão entre três experimentos independentes.

Os perfis em função do campo magnético foram realizados empregando valores de R_{1obs} adquiridos na faixa compreendida entre 0,01 e 20 MHz (o que corresponde a faixa de 0,00024 T e 0,47 T) empregando, para esta finalidade um espectrômetro Stellar automático de campo variável, FFC (do inglês, *Fast Field Cycling*). Por outro lado, para os pontos em altos valores de campo magnético, de 20 MHz (0,47 T) a 70 MHz (1,7 T), foram realizados experimentos independentes, empregando a sequência de pulsos IR, contudo, usado um espectrômetro modelo Stellar Spinmaster operando a campos magnéticos variáveis, porém não-automático. Para ambos os experimentos, a temperatura foi controlada, usando um controlador de temperatura Stellar VTC-91 equipado com um fluxo de ar, que controla a temperatura em $\pm 0,1^{\circ}$ C.

A determinação da relaxividade paramagnética (r_{1p}) para este complexo foi realizada empregando uma desmineralização do quelato com HCl concentrado (37% v/v)

por 24h a 120°C. Estas medições foram realizadas em triplicatas, e o valor utilizado neste capítulo corresponde à média destes experimentos.

2.3 Estudos *in vitro* da interação entre o macrocomplexo e fibrina

Uma placa para cultura de tecidos com 96 poços foi usada para formação de coágulos contendo fibrina. Em cada poço foi adicionado 90 µL de plasma sanguíneo fresco e 5 µL de CaCl₂ (agente ativador de plaquetas) 400 µM e 5 µL de trombina (agente coagulante). Após esta etapa, o sistema foi agitado e incubado a 37°C por 90 minutos. Posteriormente, 50 µL da solução contendo o complexo peptídeo-dL-(Gd-AAZTAC₄COOH)₄, em diferentes concentrações (3 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM, 50 µM e 100 µM) e solubilizado em PBS (do inglês, *Phosphate Buffer Solution*) foi adicionado aos poços. O sistema foi incubado novamente a 37°C por mais 60 minutos. Cada experimento foi feito em triplicata. Após a incubação os coágulos foram lavados individualmente com solução tampão fosfato, próximo ao pH 7, e removidos da placa para análises posteriores. Então, os coágulos foram digeridos em HNO₃(conc.) (1 mL) e desmineralizados a 160°C. Finalmente, as concentrações de Gd³⁺ presente nos coágulos foram determinadas por ICP-MS, empregando para esta finalidade um espectrômetro modelo (Thermo Scientific ELEMENT 2 ICP-MS Finnigan, Rodano, Milano, Italy).

2.4 Cultura das células

As células de câncer de próstata, linha tumoral PC-3, foram cultivadas em meio de cultura DMEM F-12 (Euroclone, Itália). Esta linhagem tumoral foi escolhida por apresentar após prévios ensaios biológicos, alta concentração de fibrina. As células foram cultivadas em um meio contendo 10% (v/v) de FBS (do inglês, fetal calf serum) (Lonza, Bélgica), 1% de penicilina (Lonza, Bélgica) e uma solução 2 mM de glutamina (Lonza, Bélgica). O meio de cultura foi mantido a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Finalmente, as células foram resuspendidas em tampão fosfato para posterior aplicação *in vivo* nos camundongos. Este procedimento foi realizado em conjunto com o setor de biotecnologia sediado no MBC (do inglês, *Molecular Biotechnology Center*) em Turim, Itália.

2.5 Procedimento cirúrgico para implantação do tumor

Foram usados neste estudo camundongos nus machos de 6-8 semanas, pesando de 28 a 34g. Foi administrado aos camundongos 1 hora antes do início do procedimento

de implantação das células tumorais, o anestésico (Rymadil, 5 mg/kg), conforme protocolos internacionais. Após esta etapa foi administrado o anestésico local, Lidocaína. O procedimento de inoculação foi iniciado com a desinfecção do abdômen do animal com Betadine[®], seguido por uma incisão de 12-15 mm ao longo da linha central e 3-4 cm acima do canal urinário. A próstata dos camundongos foi exposta e o tecido adiposo momentaneamente removido. 30 µL de uma suspensão contendo $1,5 \times 10^6$ células de câncer de próstata foram injetadas com uma microseringa. Após este procedimento, os músculos e a pele do animal foram esterilizados com Betadine[®]. Então, os animais foram colocados em repouso para se recuperarem e o anestésico Rymadil foi novamente administrado ao menos uma vez, após 24h de inoculação. Os camundongos foram deixados 25 dias para o desenvolvimento do tumor. Este procedimento também foi realizado em conjunto com o setor de biotecnologia sediado no MBC (do inglês, *Molecular Biotechnology Center*) em Turim, Itália.

2.6 Geração e processamento de imagens por MRI

Os estudos por MRI foram realizados empregando um scanner BRUKER Biospec 7T (BRUKER, Madison, EUA). Os camundongos foram previamente anestesiados com uma injeção intramuscular de uma mistura de tiletamina e zolazepam na dosagem de 20 mg/kg e xilazina na dosagem de 5 mg/kg. A injeção do agente de contraste foi feita por uma veia na cauda do animal. Finalmente, o camundongo foi posicionado no scanner a 37°C.

Após a aplicação do agente de contraste na dose de 0,02 mmolGd/kg, as imagens foram adquiridas sequencialmente por 60 minutos. Posteriormente, as imagens foram adquiridas após 3h e finalmente 24h do início da administração do agente de contraste. A sequência empregada na aquisição das imagens foi a MSME (do inglês, *T₁-weighted Multi-Slice Multi-Echo*). A análise destas imagens foi realizada empregando o software Bruker ParaVision 4.0. As regiões de interesse foram manualmente selecionadas. O aumento percentual do contraste ($\%T_{1(t)}^{enh}$) (do inglês, *%T₁ contrast enhancement*) em função do tempo foi estimado em consonância com a equação 1:

$$\%T_{1(t)}^{enh} = \frac{S_{(t)}^{Post} - S_{(t)}^{PRE}}{S_{PRE}} \times 100 \quad (1)$$

Nesta equação, S^{PRE} e $S_{(t)}^{Post}$ representam a intensidade do sinal, antes e após a administração do agente de contraste, respectivamente.

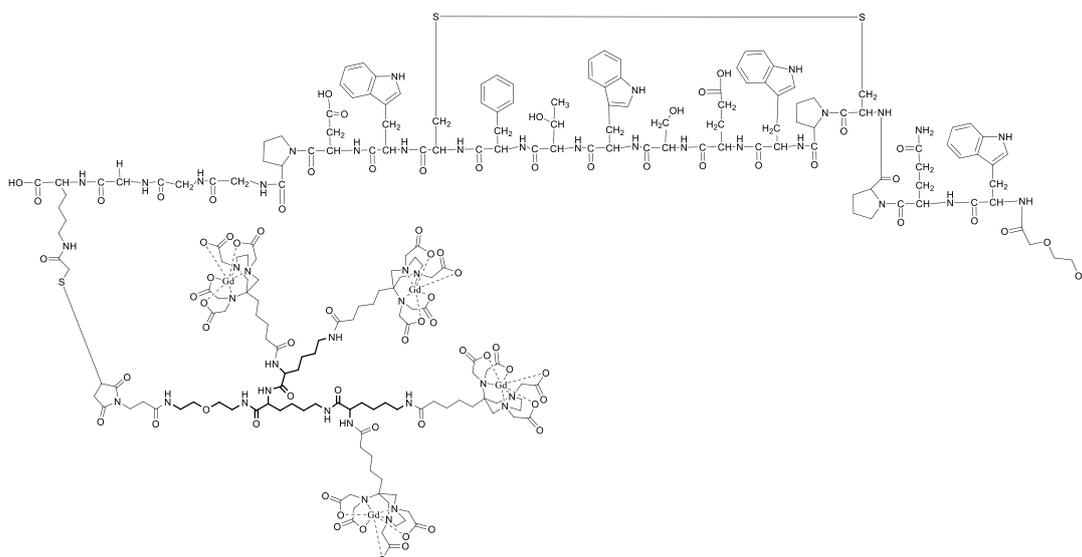
2.7 Análise Post-Mortem

Os camundongos empregados nos estudos por MRI foram sacrificados 24 h após a injeção do agente de contraste para os estudos *post-mortem*. Estes estudos visaram a determinação da concentração residual de gadolínio no fígado, baço, rins, músculos, bexiga e tumor. Estas amostras foram dissolvidas ao longo de 1 mês em ácido nítrico ultrapuro, empregando para esta finalidade, o volume de 3 mL para o fígado e 1 mL para os demais órgãos. A concentração residual de gadolínio foi determinada por ICP-MS (Thermo Scientific ELEMENT 2 ICP-MS Finnigan, Rodano, Milano, Italy).

3 Resultados e Discussão

A figura 6.1 apresenta a estrutura química para o macrocomplexo peptídeo-dL-(Gd-AAZTA)₄ empregado nos estudos *in vitro* e *in vivo* acerca da afinidade de interação com a fibrina. Este complexo apresenta uma massa molar de 5425,63 g.mol⁻¹ e uma fórmula molecular empírica C₂₁₅H₂₈₈Gd₄N₄₆O₇₄S₃.

Figura 6.1 - Estrutura química para o peptídeo Fib-Pep conjugado com o tetrâmero dL-(Gd-AAZTAC₄COOH)₄, perfazendo o agente de contraste macromolecular.

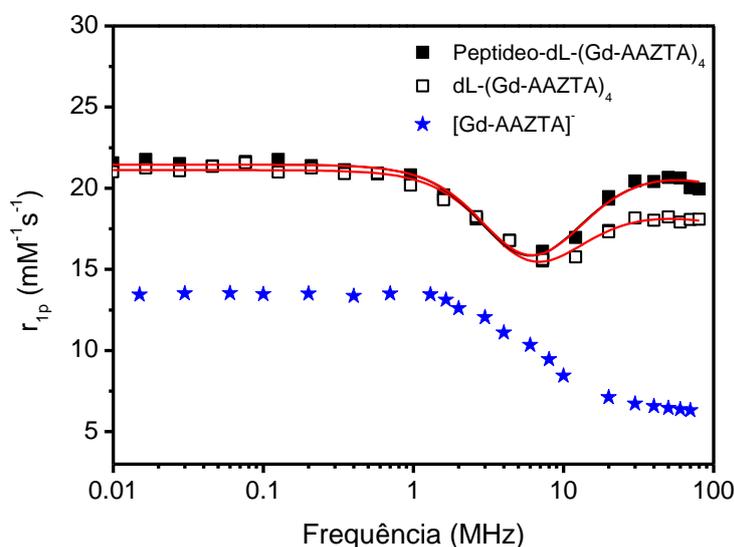


Fonte: Autoria própria.

A figura 6.2 apresenta os perfis relaxométricos obtidos a 25°C em função do campo magnético para os complexos peptídeo-dL-(GdAAZTAC₄COOH)₄ (□) e para o

tetrâmero dL-(GdAAZTA)₄ (O). Estes perfis foram obtidos variando o campo magnético entre 0,01 MHz a 80 MHz. Uma simples exploração qualitativa já nos permite realizar algumas considerações acerca do tamanho molecular destas espécies. De acordo com a literatura, complexos com baixo peso molecular apresentam um perfil com ausências de picos relaxométricos, especialmente em altos valores de campos magnéticos (20-80 MHz). Por outro lado, os complexos que possuem altos valores de massa molecular apresentam, comumente um pico relaxométrico na região acima de 20 MHz. Esta observação pode ser explicada tendo em vista que nesta faixa de campo magnético, o sistema relaxométrico é governado pelo tempo de correlação rotacional (τ_R), conforme descrito por (AIME et al., 2006). Portanto, complexos mais “pesados” apresentam um menor τ_R , e deste modo um maior valor para r_{1p} será obtido. Conclusões similares foram realizadas por (AIME et al., 1998), pesquisando compostos macromoleculares formados entre Gd³⁺ e albumina humana, HSA (do inglês, *Human Serum Albumin*). Estes autores demonstraram que os sistemas macromoleculares apresentam um pico de relaxividade centrado em aproximadamente 20-30 MHz como consequência dos altos valores de τ_R . Estes autores atribuíram estes resultados, ao fato de que τ_R e o campo magnético conservam uma relação linear, que está estritamente relacionada ao peso molecular e consequente tamanho dos complexos. Enquanto que, em baixo valores de campo magnético, a relaxividade é governada pelo parâmetro correspondente ao tempo de relaxação do spin eletrônico τ_{S0} (Aime et al., 1998).

Figura 6.2 - Comparação entre os perfis relaxométricos obtidos em função do campo magnético para o tetrâmero dL-(GdAAZTA)₄ (O) e o complexo macromolecular, denominado peptídeo-dL-(GdAAZTAC₄COOH)₄ (■). Estes perfis foram obtidos a 25°C com o campo magnético variando entre 0,01 MHz e 80 MHz.



Portanto, a partir da observação destes perfis é possível inferir que este novo complexo apresenta uma relaxividade superior ao tetrâmero em todos os valores de campo magnético estudados. Além do mais esta figura revela que a relaxividade deste novo derivado é significativamente maior em comparação à espécie [Gd-AAZTA]⁻ (7,1 mM⁻¹.s⁻¹) não modificada (AIME et al., 2004). Os perfis realizados em função do campo magnético foram ajustados utilizando a teoria de Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) e considerando duas moléculas de água na esfera interna de coordenação (q = 2) e fixando os valores de tempo de troca química (τ_M) em 100 ps, em acordo com os dados previamente reportados para a espécie [Gd-AAZTA]⁻ (Aime et al., 2004). A tabela 6.1, sumariza os principais resultados relaxométricos obtidos para os derivados abordados neste capítulo, a partir da análise em função do campo magnético.

Tabela 6.1 - Principais parâmetros relaxométricos obtidos em função do campo magnético para os derivados abordados neste capítulo.

	r_{1p} (0.47T, 298K)	τ_R (ps) ^[a]	τ_M (ns) ^[b]	q ^[c]	q_{SS} ^[d]
Gd-AAZTAC ₄ COOH-tetramero-peptideo	19,2	297	1x10 ⁻⁷	2	3
Gd-AAZTA tetramero	17,3	251	1x10 ⁻⁷	2	3

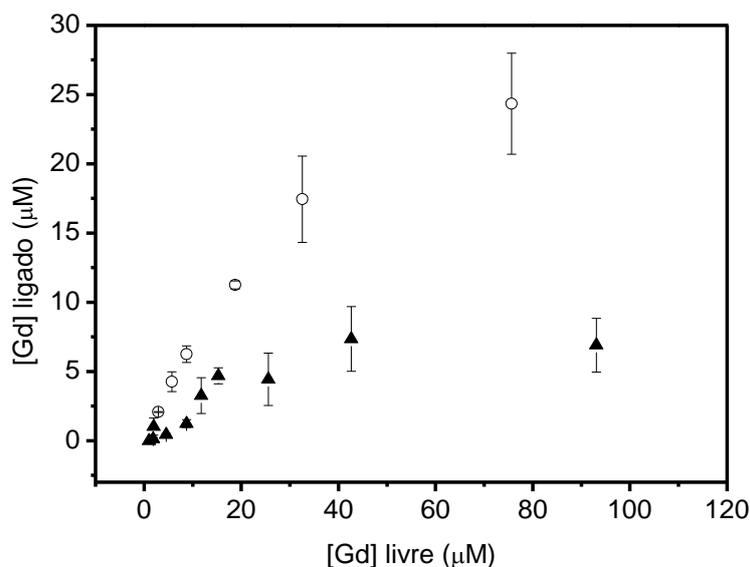
[a] tempo de correlação rotacional, [b] tempo de troca entre as moléculas de águas, [c] número de moléculas de água na esfera interna [d] número de moléculas de água na segunda esfera.

O valor de relaxividade (19,2 mM⁻¹s⁻¹) encontrado para o derivado macromolecular resulta em uma relaxividade final de 79,12 mM⁻¹.s⁻¹ por molécula, o que torna este derivado particularmente interessante para aplicações empregando técnicas de imagens por ressonância. Este significativo aumento na relaxividade pode ser atribuído a um aumento do tempo de correlação rotacional, τ_R , devido ao significativo aumento da massa molecular do complexo, em consonância com (AIME et al., 1998).

A figura 6.3 apresenta os resultados provenientes das análises de ICP-MS referentes aos ensaios *in vitro* acerca da interação com fibrina para o derivado macromolecular peptídeo-dL-(GdAAZTAC₄COOH)₄ (O) e o controle, que neste caso, foi feito empregando somente o tetrâmero dL-(GdAAZTA)₄ (▲). A partir desta figura é

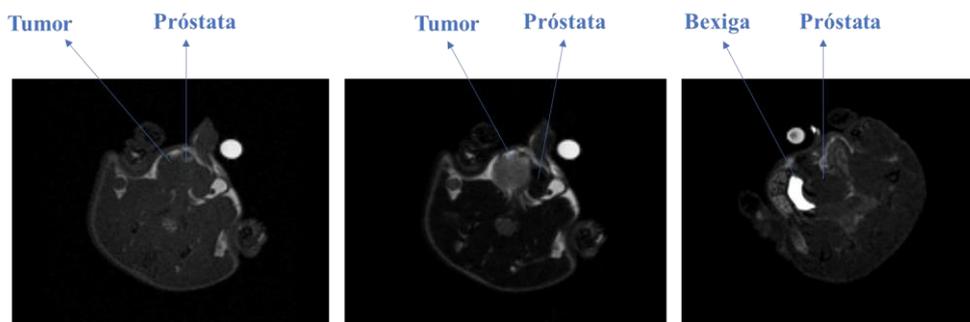
possível notar que a interação entre o agente de contraste proposto neste capítulo e a fibrina é favorável, sendo superior à obtida para o tetrâmero (controle) sob as mesmas condições de análises. Tendo em vista estes resultados, foi possível a projeção dos experimentos *in vivo* empregando este complexo.

Figura 6.3 - Estudo *in vitro* referente a interação entre o complexo peptídeo-dL-(Gd-AAZTAC₄COOH)₄ com a fibrina.



Para determinar se o complexo proposto também apresentava a mesma interação com a proteína fibrina *in vivo* foram usados camundongos, com câncer de próstata induzido com as células da linhagem PC-3. A figura 6.4 apresenta algumas imagens dos camundongos em três condições: antes (esquerda), após 6,0 min (centro) e 20 min (direita) da ministração de uma solução contendo o complexo peptídeo-dL-(Gd-AAZTAC₄COOH)₄, na concentração de 0,02 mmol Gd/kg do camundongo.

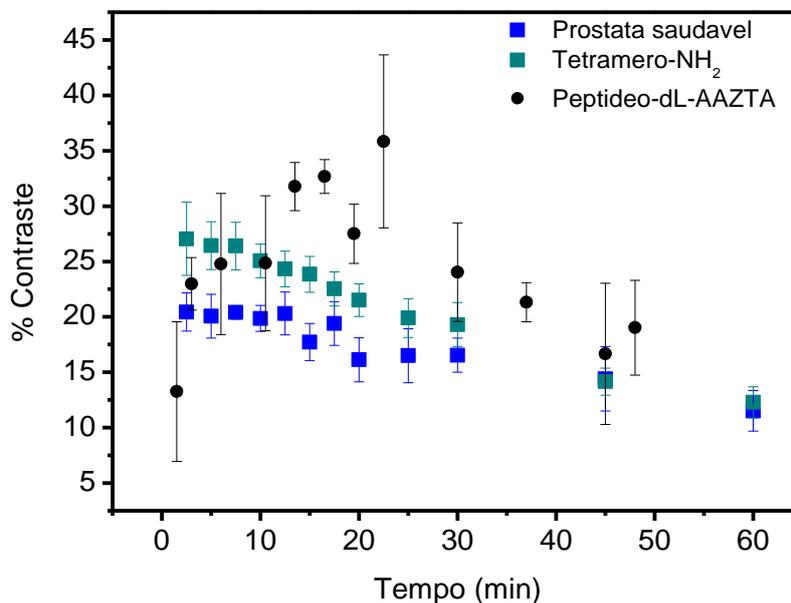
Figura 6.4 - Imagens MRI de camundongos com câncer de próstata: antes (esquerda) e após 6,0 min (centro) e 20 min (direita) da administração do agente de contraste peptídeo-dL-(Gd-AAZTAC₄COOH)₄ na dose de 0,02 mmol Gd/kg do animal.



A partir desta figura é possível observar que antes (esquerda) de ministrar o agente de contraste ao animal, a região delimitada pelo tumor relativo ao câncer de próstata é indistinguível dos tecidos saudáveis que o circundam. Após 6,0 min (centro) existe um significativo aumento do contraste, tornando o tumor claramente visível nas imagens de MRI. Isto ocorre devido a interação entre o agente de contraste e as moléculas de fibrina, as quais agem como marcador em consonância com o discutido por (CHAABANE et al., 2015). Segundo estes autores, este aumento no contraste está relacionado ao tamanho macromolecular do complexo, o qual fornece um longo tempo de permanência dentro do sistema venoso do animal, permitindo um tempo suficiente de interação com as moléculas de fibrina. Finalmente, na imagem coletada após 20 min (direita) é possível notar um intenso contraste na região da bexiga, evidenciando a excreção renal deste agente de contraste pelo animal.

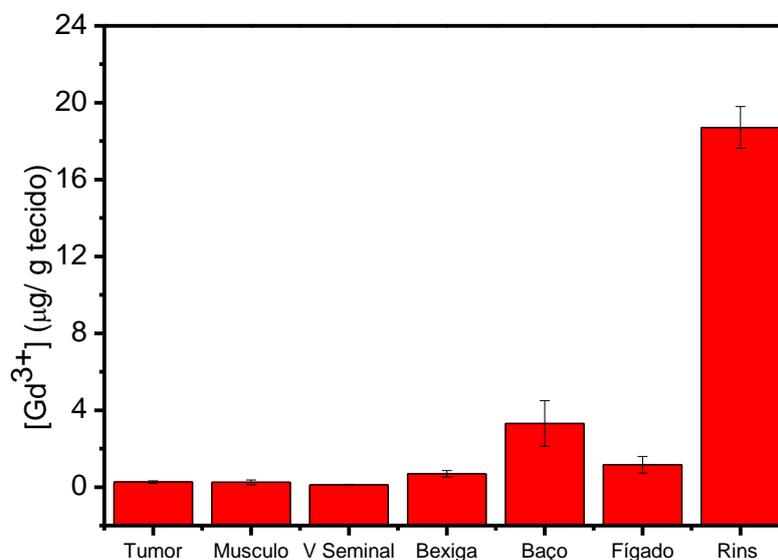
A figura 6.5 apresenta os resultados provenientes da análise quantitativa obtida por PRE (do inglês, *Paramagnetic Relaxation Enhancement*) até 60 minutos para o complexo peptídeo-dL-(GdAAZTAC₄COOH)₄ (preto) comparado com o controle, que neste caso, foi realizado a partir da próstata saudável (azul) e o tetrâmero dL-(GdAAZTA)₄ (verde). As análises quantitativas das imagens revelaram um forte aumento no contraste nos primeiros 15 min, após a ministração do complexo. Em consonância ao discutido por (CHAABANE et al., 2015), os dados obtidos experimentalmente demonstram que a interação entre a fibrina localizada na matriz extracelular e o agente de contraste é viável para o monitoramento da metástase de uma linha tumoral, conforme previamente sinalizado pelos ensaios *in vitro*. Além do mais, conforme esperado, este complexo proporciona um maior contraste em relação aos controles, próstata saudável (azul) e o tetrâmero dL-(GdAAZTA)₄ (verde), que evidentemente apresentam uma concentração muito baixa de fibrina para uma eficiente interação.

Figura 6.5 - Análise quantitativa realizadas a partir das imagens de MRI para o agente de contraste Peptídeo-dL-(Gd-AAZTAC₄COOH)₄ (preto), próstata saudável (azul) e o tetrâmero dL-(GdAAZTA)₄ (verde).



Finalmente, a figura 6.6 apresenta os resultados para o estudo *post-mortem* realizado a partir dos órgãos dos animais empregado nas análises *in vivo*. Estes resultados evidenciam que a concentração de gadolínio foi mais predominante nos rins dos animais, após 24 h da injeção do agente de contraste. Este dado permite assegurar que o agente de contraste foi majoritariamente excretado na urina dos animais em consonância com os resultados de MRI previamente apresentados e discutidos.

Figura 6.6 - Análise da concentração residual *post-mortem* de gadolínio nos camundongos.



4 Considerações Finais

Dados os resultados alcançados neste capítulo é possível inferir que o macrocomplexo, peptídeo-dL-(Gd-AAZTAC₄COOH)₄ possui um valor de relaxividade paramagnética ($r_{1p} = 79,12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) expressivamente maior comparado ao complexo não modificado, [Gd-AAZTAC₄COOH] ($9,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). A obtenção desta elevada relaxividade foi possível, tendo em vista o design de um complexo com alta massa molecular e conseqüente tempo de correlação rotacional (τ_R), significativamente superior. Os resultados *in vitro* acerca da interação deste novo derivado com a fibrina, presente em metástases para os mais diversos tipos de câncer, demonstrou que o complexo macromolecular apresenta uma interação eficiente com esta proteína, permitindo classifica-lo como um promissor agente de contraste para o diagnóstico precoce de câncer. Finalmente, os ensaios *in vivo* confirmaram esta afinidade, nos quais foram obtidos uma rápida visualização do tumor referente ao câncer de próstata (linhagem tumoral PC-3), além de uma eficiente excreção renal do agente de contraste pelo organismo do animal, conforme confirmado pelos ensaios *post-mortem*.

Conclusões

Dados os resultados apresentados neste trabalho de doutorado, é possível concluir que a relaxometria de RMN-BR possui papel fundamental nos estudos de complexos contendo íons paramagnéticos em solução. As aplicações proporcionadas por esta espectroscopia permitem o seu emprego no monitoramento de reações de complexação, através dos estudos de trocas de ligantes. Estes estudos proporcionam grande vantagem, pois aliam respostas rápidas, através do emprego de sequências de pulsos no estado estacionário com a possibilidade de aplicações a soluções incolores, fator limitante, por exemplo, para a espectrofotometria no UV-Vis. Análises conformacionais para o polissacarídeo quitosana e para os seus complexos com os íons Cu^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} em função do pH, foram abordadas e os resultados demonstraram que este biopolímero interage fortemente com as moléculas do solvente (água), especialmente em meios alcalinos, às aprisionando entre suas cadeias poliméricas. Além do mais, foi também possível inferir acerca da conformação e estrutura dos complexos gerados a partir da interação deste polímero com íons paramagnéticos. Neste sentido, também foram estudados os complexos formados envolvendo o poliálcool sorbitol com íons cúpricos. Neste caso, os resultados mostraram uma alta complementariedade entre a relaxometria e a RMN-AR, permitindo inferir tanto acerca da troca de ligantes, quanto do surgimento de espécies macromoleculares em meio alcalino. Complexos que possuem relevância biológica, também foram abordados. Neste caso, a caracterização relaxométrica em solução para derivados do complexo $[\text{Gd-AAZTA}]$, permitiu extrair diversos parâmetros coordenativos importantes, como por exemplo, o tempo de troca química entre as moléculas de água coordenadas ao centro paramagnético e a solução (τ_M), o tempo de correlação rotacional do complexo (τ_R), o número de moléculas de água diretamente coordenadas ao íon metálico (q), além da presença ou não de moléculas de água na segunda esfera de coordenação (q_{ss}). Por fim, um novo complexo macromolecular contendo um fragmento peptídico de um anticorpo para a detecção de fibrina foi avaliado para o diagnóstico de câncer de próstata em camundongos. Os resultados por MRI indicaram que este novo complexo possui uma ação de contraste que possibilita a clara visualização do tumor e uma rápida excreção renal (conforme confirmado por ensaios *post-mortem*) possibilitando um diagnóstico precoce para este tipo de câncer, aumentando as expectativas em relação as chances de cura e a qualidade de vida para futuros pacientes.

Perspectivas

Apesar dos consolidados avanços alcançados ao longo desta pesquisa de doutorado, se faz necessário para uma maior compreensão acerca dos compostos de coordenação contendo íons paramagnéticos em solução, estudos complementares e outros mais aprofundados. Neste sentido esperamos continuar os ensaios de interação da fibrina com macrocomplexos, usando para esta finalidade outros modelos tumorais que apresentem elevada concentração para esta proteína. Deste modo, esperamos elucidar de forma mais consistente a ação do agente de contraste FibPep-(GdAAZTAC₄COOH)₄, e possivelmente expandirmos a sua aplicabilidade para outros tipos de tumores altamente letais, como o câncer de pulmão, pâncreas e estômago. Evidentemente, à título de comparação, considera-se interessante a realização dos estudos *in vivo* para a sonda paramagnética FibPep-(GdAAZTAC₂COOH)₄, uma vez que este complexo possui propriedades relaxométricas *in vitro*, similares à do derivado escolhido para a realização dos ensaios de tomografia por RMN apresentados neste trabalho de doutorado. Em relação aos estudos relativos a análise relaxométrica e por RMN em alta resolução para o quelato formado entre sorbitol e íons cúpricos, estudos mais aprofundados se faz necessários. Neste sentido, um estudo por ¹⁷O-RMN em função da temperatura poderia ser executado, especialmente em pH 12, para a determinação da taxa de troca entre as moléculas de água diretamente coordenadas aos íons Cu²⁺ e a solução. Além do mais, será interessante realizar um perfil relaxométrico em função do campo magnético, para conhecermos a relaxividade paramagnética (r_{1p}) para estas espécies. Uma vez que deste modo será possível evidenciar a presença do macrocomplexo especialmente em frequência próxima a 30 MHz. Em relação ao monitoramento de reações de complexação por intermédio da troca de ligantes em solução, estudos complementares seriam interessantes. Neste caso a aplicação dos métodos aqui proposto, para o estudo da interação entre aminoácidos como prolina e glicina com íons paramagnéticos poderá apresentar implicações interessantes para a compreensão de reações biológicas. Finalmente, para os estudos envolvendo macromoléculas será interessante realizar pesquisas acerca da interação entre compostos biológicos, tais como DNA e HSA com complexos metálicos, para desvendarmos os mecanismos de interação entre estes. Estes estudos poderão ser realizados empregando métodos modernos de RMN, tais como STD (do inglês, *Saturation Transfer Difference Spectroscopy*) e podem possuir alta relevância para a compreensão da atuação de quimioterápicos, auxiliando na projeção de fármacos biologicamente mais ativos.

Referências Bibliográficas

AIME, S.; BOTTA, M.; FASANO, M.; TERRENO, E. Lanthanide(III) chelates for NMR biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 27, p.19-29, 1998.

AIME, S.; CALABI, L.; CAVALLOTTI, C.; GIANOLIO, E.; GIOVENZANNA, G.B.; LOSI, P.; MAIOCCHI, A.; SISTI, M. [Gd-AAZTA]⁻: A new structural entry for an improved generation of MRI contrast agents. **Inorganic Chemistry**, v. 43, p. 7588-7590, 2004.

AIME, S.; CRICH, S.G.; GIANOLIO, E.; GIOVENZANA, G.B.; TEI, L.; TERRENO, E. High sensitivity lanthanide(III) based probe for MR-medical imaging. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 250, p. 1562-1579, 2006.

ALMEIDA, M.R.H.; BARBANO, E.P.; CARVALHO, M.F.; TULIO, P.C.; CARLOS, I.A. Copper–zinc electrodeposition in alkaline-sorbitol medium: Electrochemical studies and structural, morphological and chemical composition characterization. **Applied Surface Science**, v. 333, p.13-22, 2015.

ANDRADE, F.D.; MARCHI NETTO, A.; COLNAGO, L.A. Qualitative analysis by online nuclear magnetic resonance using Carr–Purcell–Meiboom–Gill sequence with low refocusing flip angles. **Talanta**, v. 84, p. 84-88, 2011.

ANDRADE, F.D.; MARCHI NETTO, A.; COLNAGO, L.L. Use of Carr-Purcell pulse sequence with low refocusing flip angle to measure T₁ and T₂ in a single experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 214, p. 184-188, 2012.

AZAROVA, Y.A.; PESTOV, A.V.; USTINOV, A.Y.; BRATSKAYA, S.Y. Application of chitosan and its N-heterocyclic derivatives for preconcentration of noble metal ions and their determination using atomic absorption spectrometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 680-686, 2015.

AZEREDO, R.B.V.; COLNAGO, L.L.; ENGELSBERG, M. Quantitative analysis using steady-state free precession nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 2401-2405, 2000.

BARAN, T.; MENTES, A.; ARSLAN, H. Synthesis and characterization of water soluble O-carboxymethyl chitosan Schiff bases and Cu(II) complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 94-103, 2015.

- BARAN, T.; MENTES, A. Cu(II) and Pd(II) complexes of water soluble O-carboxymethyl chitosan Schiff bases: Synthesis, characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 542-554, 2015.
- BARANYAI, Z.; UGGERI, F.; MAIOCCHI, A.; GIOVENZANA, G. B.; CAVALLOTTI, C.; TAKÁCS, A.; TÓTH, I.; BÁNYAI, I.; BÉNYEI, A.; BRUCHER, E.; AIME, S. Equilibrium, kinetic and structural studies of AAZTA complexes with Ga^{3+} , In^{3+} and Cu^{2+} . **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2013, p. 147-162, 2013.
- BARANYAI, Z.; UGGERI, F.; GIOVENZANA, G. B.; BÉNYEI, A.; BRUCHER, E.; AIME, S. Equilibrium and kinetic properties of the lanthanoids(III) and various divalent metal complexes of the heptadentate ligand AAZTA. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, p. 1696-1705, 2009.
- BARBANO, E.P.; OLIVEIRA, G.M.; CARVALHO, M.F.; CARLOS, I.A. Copper-tin electrodeposition from an acid solution containing EDTA added. **Surface & Coatings Technology**, v. 240, p. 14-22, 2014.
- BARBOSA, L.L.; ALMEIDA, M.R.H.; CARLOS, R.M.; YONASHIRO, M.; OLIVEIRA, G.M.; CARLOS, I.A. Study and development of na alkaline bath for copper deposition containing sorbitol as complexing agent and morphological characterization of the copper film. **Surface & Coating Technology**, v. 192, p. 145-153, 2005.
- BARBOSA, L.L.; KOCK, F.V.C.; SILVA, R.C.; FREITAS, J.C.C.; LACERDA JUNIOR, V.; CASTRO, E.V.R. Application of low-field NMR for the determination of physical properties of petroleum fractions. **Energy & Fuels**, v. 27, p. 673-679, 2013.
- BARBOSA, L.L.; KOCK, F.V.C; CASTRO, E.V.R; LACERDA JUNIOR, V. Relaxometric study concerning the action of a complexant agent on petroleum. **Global Journal of Energy Technology Research Updates**, v.1, p.96-103, 2014.
- 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**, v. 1, p. 184-188, 2006.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M.Q. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 83-89, 2010.

BHAT, T.R.; KRISHNAMURTHY, M. Spectrophotometric studies on protonated, amino and hydroxo complexes of copper (II), nickel (II) and cobalt (II) versenates. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 25, p. 1147-1154, 1963.

BHATIA, S.C.; RAVI, N. A magnetic study of a Fe-chitosan complex and its relevance to other biomolecules. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 413-417, 2000.

BIROLI, W.G.; DELEZUK, J.A.M.; CAMPANA-FILHO, S.P. Ultrasound-assisted conversion of alpha-chitin into chitosan. **Applied Acoustics**, v. 103, p. 239-242, 2016.

BLOCH, F.; HANSEN, W.W.; PACKARD, M. The nuclear induction experiment. **Physical Review**, v. 70, p. 474-485, 1946.

BLOEMBERGEN, N.; PURCELL, E.M.; POUND, R.V. Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. **Physical Review**, v. 7, p. 679-712, 1948.

BLOEMBERGEN, N. Spin Relaxation processes in a two-proton system. **Physical Review**, v. 104, p. 1542, 1956.

BONNET, C.S.; FRIES, P.H.; CROUZY, S.; DELANGE, P. Outer-sphere investigation of MRI relaxation contrast agents. Example of a cyclodecapeptide gadolinium complex with second-sphere water. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 8770-8781, 2010.

BORSAGLI, F.G.L.M.; MANSUR, A.A.P.; CHAGAS, P.; OLIVEIRA, L.C.A.; MANSUR, H.S. O-carboxymethyl functionalization of chitosan: Complexation and adsorption of Cd (II) and Cr (VI) as heavy metal pollutant ions. **Reactive & Functional Polymers**, v. 97, p. 37-47, 2015.

BRUNEL, F.; EL GUEDDARI, N.E.; MOERSCHBACHER, B.M. Complexation of copper(II) with chitosan nanogels: Toward control of microbial growth. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1348-1356, 2013.

- CARAVAN, P.; ELLISON, J.J.; MCMURRY, T.J.; LAUFFER, R.B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2293-2352, 1999.
- CHAABANE, L.; TEI, L.; MIRAGOLI, L.; LATTUADA, L.; VON WRONSKI, M.; UGEERI, F.; LORUSSO, V.; AIME, S. *In vivo* MR Imaging of fibrin in a neuroblastoma tumor model by means of a targeting Gd-containing peptide. **Molecular Imaging and Biology**, v. 17, p. 819-828, 2015.
- COBRA, P.F.; GOMES, B.F.; MITRE, C.I.N.; BARBOSA, L.L.; MARCONCINI, L.V.; COLNAGO, L.A. Measuring the solubility product constant of paramagnetic cations using time-domain nuclear magnetic resonance relaxometry. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 14-17, 2015.
- COELHO, A.G.; JESUS, D.P. A simple method for determination of erythritol, maltitol, xylitol, and sorbitol in sugar-free chocolates by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 37, p. 2986-2991, 2016.
- COLNAGO, L.A.; ENGELSBERG, M.; SOUZA, A.A.; BARBOSA, L.L. High-throughput, non-destructive determination of oil content in intact seeds by continuous wave-free precession NMR. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 1271-1274, 2007.
- COLNAGO, L.A.; ANDRADE, F.D.; SOUZA, A.A.; AZEREDO, R.B.V.; LIMA, A.A.; CERIONI, L.M.; OSÁN, T.M.; PUSIOL, D.J. Why is inline NMR rarely used as industrial sensor? Challenges and opportunities. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, p. 191-203, 2014.
- CONGER, R.L.; SELWOOD, P.W. Proton relaxation in paramagnetic solutions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 20, p. 383-387, 1952.
- CONWAY, T.F.; EARLE, F.R. Nuclear magnetic resonance for determining oil content of seeds. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 40, p. 265-268, 1963.
- CONSTANTINI, V.; ZACHARSKI, L.R. The role of fibrin in tumor metastasis, **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 11, p. 283-290, 1992.

COUTINHO, C.F.B.; COUTINHO, L.F.M.; MAZO, L.H. Estudo do comportamento eletroquímico de substâncias complexantes utilizando eletrodos de cobre. **Química Nova**, v. 32, p. 228-233, 2009.

DATTA, A.; RAYMOND, K.N. Gd-hydroxypyridinone (HOPO)-based high-relaxivity Magnetic Resonance Imaging (MRI) contrast agents. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, p. 938-947, 2009.

DEBROYE, E.; PARAC-VOGT, T.N. Towards polymeric lanthanide complexes as dual contrast agents for magnetic resonance and optical imaging. **Chemical Society Reviews**, v. 43, p. 8178-8192, 2014.

DEJONG, A.E.; HARTEL, R.W. Determination of sorbitol crystal content and crystallization rate using TD-NMR. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 117-123, 2016.

DERRICK, T.S.; MCCORD, E.F.; LARIVE, C.K. Analysis of protein/ligand interactions with NMR diffusion measurements: the importance of eliminating the protein background. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 155, p. 217-225, 2002.

ERMELINDO, A.; GAMBINO, G.; TEI, L. Synthesis of a mixed carboxylate-phosphinate AAZTA-like ligand and relaxometric characterization of its Gd (III) complex. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 6378-6380, 2013.

FALANGA, A.; MARCHETTI, M.; VIGNOLI, A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, p. 223-233, 2013.

FAN, K.; SONG, J.; LI, J.; GUAN, X.; TAO, N.; TONG, C.; SHEN, H.; NIU, L. Copper(ii)-responsive gel-sol phase transition in supramolecular gel systems of salen-appended sorbitol. **Journal Materials Chemical C**, v. 1, p. 7479-7482, 2013.

FUSARO, L.; LUHMER, M. ¹⁷O-NMR study of diamagnetic and paramagnetic lanthanide (III)-DOTA complexes in aqueous solution. **Inorganic Chemistry**, v. 53, p. 8717-8722, 2014.

GERLACH, J.C.; BRAYFIELD, C.; PUHL, G.; BORNEMAN, R.; MULLER, C.; SCHMELZER, E.; ZEILINGER, K. Lidocaine/monoethylglycinexylidide test, galactose elimination test, and sorbitol elimination test for metabolic assessment of liver cell bioreactors. **Artificial Organs**, v. 34, p. 462-472, 2010.

GIANOLIO, E.; GIOVENZANA, G.B.; LONGO, D.; LONGO, I.; MENEGOTTO, I.; AIME, S. Relaxometric and modelling studies of the binding of a lipophilic Gd-AAZTA complex to fatted and defatted human serum albumin. **Chemistry – A European Journal**, v. 13, p. 5785-5797, 2007.

GIANOLIO, E.; CABELLA, C.; COLOMBO SERRA, S.; VALBUSA, G.; ARENA, F.; MAIOCCHI, A.; MIRAGOLI, L.; TEDOLDI, F.; UGGERI, F.; VISIGALLI, M.; BARDINI, P.; AIME, S. B25716/1: a novel albumin-binding Gd-AAZTA MRI contrast agent with improved properties in tumor imaging. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 19, p. 715-726, 2014.

GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C. **Ressonância magnética nuclear**: fundamentos, métodos e aplicações. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. 1012p.

GOMES, B.F.; NUNES, L.M.S.; LOBO, C.M.S.; CABEÇA, L.F.; COLNAGO, L.A. In situ study of the magneto-electrolysis phenomenon during copper electrodeposition using time domain NMR relaxometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 9391-9393, 2014.

GUANCI, C.; PINALLI, R.; AIME, S.; GIANOLIO, E.; LATTUADA, L.; GIOVENZANA, G.B. Synthesis of phosphonic analogues of AAZTA and relaxometric evaluation of the corresponding Gd(III) complexes as potential MRI contrast agent. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 1994-1997, 2015.

GUIBAL, E.; VINCENT, T.; NAVARRO, R. Metal ion biosorption on chitosan for the synthesis of advanced materials. **Journal of Materials Science**, v. 49, p. 5505-5518, 2014.

GYURCSIK, B.; NAGY, L. Carbohydrates as ligands: coordination equilibria and structure of the metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 203, p. 81-149, 2000.

HERNANDÉZ, R.B.; FRANCO, A.P.; YOLA, O.R.; LÓPEZ-DELGADO, A.; FELCMAN, J.; RECIO, M.A.L.; MERCÊ, A.L.R. Coordination study of chitosan and Fe^{3+} . **Journal of Molecular Structure**, v. 87, p. 89-99, 2008.

IMAMURA, T.; HATANAKA, C.; DOUDOU, T. Formation of a copper-sorbitol complex in copper sulfate-sorbitol systems. **Journal of Faculty of Fisheries and Animal Husbandry**, v. 17, p. 107-116, 1978.

IRVING, H.M.; MILLES, M.G.; PETTIT, L.D. A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 38, p. 475-488, 1967.

ISLAM, M.K.; KIM, S.; KIM, H.K.; PARK, S.; LEE, G.H.; KANG, H.J.; JUNG, J.C.; PARK, J.S.; KIM, T.J; CHANG, Y. Manganese Complex of Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)–Benzothiazole Aniline (BTA) Conjugate as a Potential Liver-Targeting MRI Contrast Agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 2993-3001, 2017.

KARIMI, S.; TEI, L.; BOTTA, M.; HELM, L. Evaluation of water exchange kinetics on $[\text{Ln}(\text{AAZTAPh-NO}_2)(\text{H}_2\text{O})_q]_x$ complexes using proton nuclear magnetic resonance. **Inorganic Chemistry**, v. 55, p. 6300-6307, 2016.

KASAAI, M.R. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 477-488, 2007.

KASAAI, M.R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 801-810, 2010.

KLUFERS, P.; SCHUHMACHER, J. Sixteenfold deprotonated γ -cyclodextrin tori as anions in a hexadecanuclear lead(II) alkoxide. **Angewandte Chemie International**, v. 33, p. 1863-1865, 1994.

KLUFERS, P.; SCHUHMACHER, J. A hexadecanuclear polyolatometalate of copper(II) ions and multideprotonated D-Sorbitol. **Angewandte Chemie International**, v. 34, p. 2119-2121, 1995.

- KOCK, F.V.C.; COLNAGO, L.A. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ions complexes in solution: An alternative to spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v. 122, p. 144-148, 2015.
- KOCK, F.V.C.; COLNAGO, L.A. Rapid method for monitoring chitosan coagulation using low-field NMR relaxometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 1-4, 2016.
- KOCK, F.V.C.; MONARETTO, T.; COLNAGO, L. Time-domain NMR relaxometry as an alternative method for analysis of chitosan-paramagnetic ion interactions in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 228-232, 2017.
- KOYLU, M.Z.; ASUBAY, S.; YILMAZ, A. Determination of proton relaxivities of Mn(II), Cu(II) and Cr(III) added to solutions of serum proteins. **Molecules**, v. 14, p. 1537-1545, 2009.
- KOOS, M.R.M.; DANIELI, E.; CASANOVA, F.; BLUMICH, B.; LUY, B. Differentiation of enantiomers by 2D NMR Spectroscopy at 1T using residual dipolar couplings. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 54, p. 527-530, 2016.
- LAUFFER, R.B. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: Theory and design. **Chemical Reviews**, v. 87, p. 901-927, 1987.
- LAURENT, S.; ELST, L.V.; COPOIX, F.; MULLER, R.N. Stability of MRI paramagnetic contrast media. **Investigative Radiology**, v. 36, p. 115-122, 2001.
- LEBDUSKOVA, P.; HERMANN, P.; HELM, L.; TÓTH, E.; KOTEK, J.; BINNEMANS, K.; RUDOVSKY, J.; LUKES, I.; MERBACH, A.E. Gadolinium(III) complexes of mono- and diethyl esters of monophosphonic acid analogue of DOTA as potential MRI contrast agents: solution structures and relaxometric studies. **Dalton Transactions**, v. 4, p. 493-501, 2007.
- LIM, C.; LEE, D.W.; ISRAELACHVILI, J.N.; JHO, Y.S.; HWANG, D.S. Contact time- and pH-dependent adhesion and cohesion of low molecular weight chitosan coated surfaces. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 887-894, 2015.

LU, R.Q.; CAO, Z.G.; SHEN, G.P. Comparative study on interaction between copper (II) and chitin/chitosan by density functional calculation. **Journal of Molecular Structure: TEOCHEM**, v. 860, p. 80-85, 2008.

MAMEDOV, I.; ENGELMANN, J.; ESCHENKO, O.; BEYERLEIN, M.; LOGOTHETIS, N.K. Dual-functional probes towards in vivo studies of brain connectivity and plasticity. **Chemical Communications**, v. 48, p. 2755-2757, 2012.

MANUS, L.M.; STRAUCH, R.C.; HUNG, A.H.; ECKERMANN, A.L.; Meade, T.J. Analytical methods for characterizing magnetic resonance probes. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 6278-6287, 2012.

MANZONI, L.; BELVISI, L.; AROSIO, D.; BARTOLOMEO, M.P.; BIANCHI, A.; BRIOSCHI, C.; BUONSANTI, F.; CABELLA, F.; CASAGRANDE, C.; CIVERA, M.; de MATTEO, M.; FUGAZZA, L.; LATTUADA, L.; MAISANO, F.; MIRAGOLI, L.; NEIRA, C.; PILKINGTON-MIKSA, M.; SCOLASTICO, C. Synthesis of Gd and ⁶⁸Ga complexes in conjugation with a conformationally optimized RGD sequence as potential MRI and PET tumor-imaging probes. **ChemMedChem**, v. 7, p. 1084-1093, 2012.

MILLER, D.J.; HENNING, T.; GRUNBEIN, W. Phase inversion of W/O emulsions by adding hydrophilic surfactant — a technique for making cosmetics products. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 183-185, p. 681-688, 2001.

MINAZZI, P.; LATTUADA, L.; MENEGOTTO, I.G.; GIOVENZANA, G.B. An enzymatic approach to bifunctional chelating agents. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 12, p. 6915-6921, 2014.

MODRZEJEWSKA, Z. Sorption mechanism of copper in chitosan hydrogel. **Reactive & Functional Polymers**, v. 73, p. 719-729, 2013.

MONARETTO, T.; ANDRADE, F.D.; MORAES, T.B.; SOUZA, A.A.; de AZEVEDO, E.R.; COLNAGO, L.A. On resonance phase alternated CWFP sequences for rapid and simultaneous measurement of relaxation times. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 259, p. 174-178, 2015.

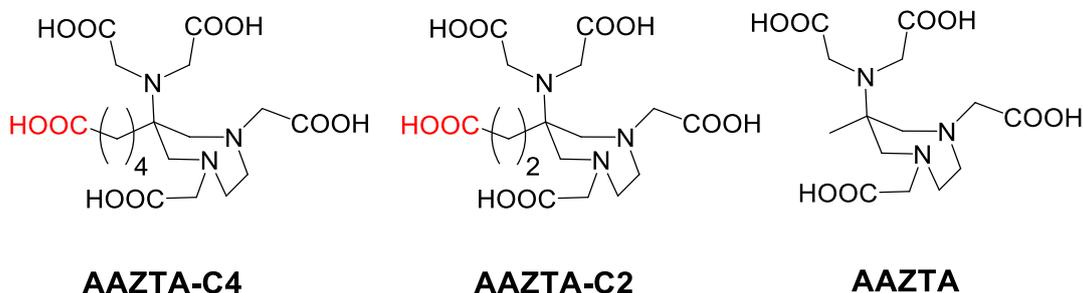
- MORGAN, L.O.; NOLLE, A.W. Proton spin relaxation in aqueous solutions of paramagnetic ions. II. Cr^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} e Gd^{3+} . **The Journal of Chemical Physics**, v. 31, p. 365-368, 1959.
- NUNES, L.M.S.; COBRA, P.F.; CABEÇA, L.F.; BARBOSA, L.L.; COLNAGO, L.A. In situ quantification of Cu(II) during an electrodeposition reaction using time-domain NMR relaxometry. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 6351-6354, 2012.
- OAKES, J.; SMITH, E.G. Structure of Mn-EDTA^{2-} Complex in Aqueous Solution by Relaxation Nuclear Magnetic Resonance. **Faraday Transactions**, v. 77, p. 299-308, 1981.
- OLIVEIRA, G.M.; BARBOSA, L.L.; BROGGI, R.L.; CARLOS, I.A. Voltammetric study of the influence of EDTA on the silver electrodeposition and morphological and structural characterization of silver films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 578, p. 151-158, 2005.
- PAGOTO, A.; STEFANIA, R.; GARELLO, F.; ARENA, F.; DIGILIO, G.; AIME, S.; TERRENO, E. Paramagnetic phospholipid-based micelles targeting VCAM-1 receptors for MRI visualization of inflammation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, p. 1921-1990, 2016.
- PANICH, A.M.; SHAMES, A.I.; TSINDLEKHT, M.I.; OSIPOV, V.Y.; PATEL, M.; SAVARAM, K.; HE, H. Structure and magnetic properties of pristine and Fe-doped micro and nanographenes. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, p. 3042-3053, 2016.
- PEREIRA, F.M.V.; REBELLATO, A.P.; PALLONE, J.A.L.; COLNAGO, L.A. Through-package fat determination in commercial samples of mayonnaise and salad dressing using time-domain nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. **Food Control**, v. 48, p. 62-66, 2015.
- PESTOV, A.; BRATSKAYA, S. Chitosan and Its derivatives as highly efficient polymer ligands. **Molecules**, v. 21, p. 330-365, 2016.

- PHILIPPOVA, O.E.; KORCHAGINA, E.V.; VOLKOV, E.V.; SMIRNOV, V.A.; KHOKHLOV, A.R.; RINAUDO, M. Aggregation of some water-soluble derivatives of chitin in aqueous solutions: Role of the degree of acetylation and effect of hydrogen bond breaker. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 687-694, 2012.
- PORTNYAGIN, A.S.; BRATSKAYA, S.; PESTOV, A.V.; VOIT, A.V. Binding Ni(II) ions to chitosan and its N-heterocyclic derivatives: density functional theory investigation. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1069, p. 4-10, 2015.
- RABOVSKY, A.B.; KOMAROV, A.M.; IVIE, J.S. BUETTNER, G.R. Minimization of free radical damage by metal catalysis of multivitamin/multimineral supplements. **Nutrition Journal**, v. 9, p. 61-67, 2010.
- RENAULT, F.; SANCEY, B.; BADOT, P.M.; CRINI, G. Chitosan for coagulation/flocculation processes—an eco-friendly approach. **European Polymer Journal**, v.45, p. 1337-1348, 2009.
- ROLLA, G.A.; PLATAS-IGLESIAS, C.; BOTTA, M.; TEI, L.; HELM, L. ¹H and ¹⁷O NMR relaxometric and computational study on macrocyclic Mn(II) complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 52, p. 3268–3279, 2013.
- SATCHER JUNIOR, J.H.; BALCH, A.L. Magnetic coupling and ¹H NMR spectroscopy of binuclear copper(II) complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 34, p. 3371-3373, 1995.
- SILVA, R.C.; CARNEIRO, G.F.; BARBOSA, L.L.; LACERDA JUNIOR, V.; FREITAS, J.C.C.; CASTRO, E.V.R. Studies on crude oil-water biphasic mixtures by low-field NMR. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 50, p. 85-88, 2012.
- SCHLUTER, A.; WEISS, A. Nuclear magnetic resonance relaxation titration. **Analytical Chemistry**, v. 266, p. 177-186, 1973.
- SKOOG, D.A.; WESTE, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Editora Thomson, 2006. 1026p.

- SIPOS, P.; BERKESI, O.; TOMBÁ CZ, E.; PIERRE, T.G.; WEBB, J. Formation of spherical iron (III) oxyhydroxide nanoparticles sterically stabilized by chitosan in aqueous solutions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 95, p. 55-63, 2003.
- SOGIAS, I.A.; KHUTORYANSKIY, V.V.; Williams, A.C. Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 211, p. 426-433, 2010.
- SONG, Y.Q. A 2D NMR method to characterize granular structure of dairy products. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 55, p. 324-334, 2009.
- STARMANS, L.W.E.; VAN DUIJNHOFEN, S.M.J.; ROSSIN, R.; AIME, S.; DAEMEN, M.J.A.P.; NICOLAY, K.; GRULL, H. SPECT imaging of fibrin using fibrin-binding peptides. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 8, p. 229-237, 2013.^[a]
- STARMANS, L.W.E.; VAN DUIJNHOFEN, S.M.J.; ROSSIN, R.; BERBEN, M.; AIME, S.; DAEMEN, M.J.A.P.; NICOLAY, K.; GRULL, H. Evaluation of In-111-labeled EPep and FibPep as tracers for fibrin SPECT imaging. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, p. 229-237, 2013.^[b]
- WAN NGAH, W.S.; TEONG, L.C.; HANAFIAH, M.A.K.M. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1446-1456, 2011.
- WEBSTER, A.; HALLING, M.D.; GRANT, D.M. Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1189-1201, 2007.
- WU, Z.B.; NI, W.N.; GUAN, B.H. Application of chitosan as flocculant for coprecipitation of Mn(II) and suspended solids from dual-alkali FGD regenerating process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 757-764, 2008.
- VARMA, A.J.; DESHPANDE, S.V.; KENNEDY, J.F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 77-93, 2004.

- VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R.B.V.; ALEM, N.E.R.; COLNAGO, L.A. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, p. 34-39, 2005.
- VOLD, I.M.N.; KARUM, K.M.; GUIBAL, E.; SMIDSROD, O. Binding of ions to chitosan-selective studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 471-477, 2003.
- ZALESSKIY, S.S.; DANIELI, E.; BLUMICH, B.; ANANIKOV, V.P. Minutuarization of NMR systems: Desktop spectrometers, microcoil spectroscopy, and “NMR on a chip” for chemistry, biochemistry, and industry. **Chemical Reviews**, v. 11, p. 5641-5694, 2014.
- ZEKANY, L.; NAGYPAL, I. PSQUAD. In: LEGGETT, D. J. (Ed.). **Computational method for the determination of formation constants**. Boston: Springer, 1985. p. 291-353.
- ZIENTEK, N.; LAURIAN, C.; MEYER, K.; KRAUME, M.; GUTHAUSEN, G.; MAIWALD, M. Simultaneous ^{19}F - ^1H medium resolution NMR spectroscopy for online reaction monitoring. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 249, p. 53-62, 2014.
- ZIMMERMAM, J.R. Proton relaxation phenomena in complex ion formation. **The Journal of Chemical Physics**, v. 21, p. 1605-1605, 1953.
- ZIMMERMAM, J.R. Proton relaxation in Mn^{2+} aqueous solutions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 22, p. 950-950, 1954.
- ZOU, P.; YANG, X.; WANG, J.; LI, Y.; YU, H.; ZHANG, Y.; Liu, G. Advances in characterization and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1174-1181, 2016.

Material Suplementar

1 Estudos de equilíbrio para o complexo AAZTA-C₄ (0.15 M NaCl, 25°C)

1.1 Determinação das constantes de protonação (0,15 M NaCl, 25°C):

$$K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H^+]} \quad (1)$$

Tabela 1. Constantes de protonação para os ligantes AAZTA-C₄, AAZTA-C₂ e AAZTA (25°C)

	AAZTA-C ₄	AAZTA-C ₂	AAZTA ^[a]	
I	0.15 M NaCl	0.15 M NaCl	0.15 M NaCl ^[a]	0.1 M KCl ^[b]
logK₁^H	10.48 (1)	10.22 (1)	10.06	11.23
logK₂^H	6.90 (1)	6.53 (1)	6.50	6.52
logK₃^H	4.68 (1)	4.33 (2)	3.77	3.78
logK₄^H	3.73 (1)	3.62 (1)	2.33	2.24
logK₅^H	2.60 (1)	2.91 (1)	1.51	1.56
logK₆^H	1.80 (2)	2.03 (2)	–	–
logK₇^H	1.09 (3)	1.23 (3)	–	–
ΣlogK_i^H	31.27	30.86	24.16	25.33

^[a] BARANYAI, Z.; UGGERI, F.; MAIOCCHI, A.; GIOVENZANA, G. B.; CAVALLOTTI, C.; TAKÁCS, A.; TÓTH, I.; BÁNYAI, I.; BÉNYEI, A.; BRUCHER, E.; AIME, S. Equilibrium, kinetic and structural studies of AAZTA complexes with Ga³⁺, In³⁺ and Cu²⁺. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2013, 147 – 162.

^[b] BARANYAI, Z., UGGERI, F., GIOVENZANA, G. B., BÉNYEI, A., BRUCHER, E., AIME, S. Equilibrium and kinetic properties of the lanthanoids(III) and various divalent metal complexes of the heptadentate ligand AAZTA. **Chemistry - A European Journal**, 2009, 15, 1696-1705.

1.2 Constantes de estabilidade e protônica (0,15 M NaCl, 25°C)

Tabela 2. Constantes de estabilidade e protônica dos complexos formados pelos ligantes AAZTA-C₄, AAZTA-C₂ e AAZTA com os íons Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ e Ln³⁺ (25°C)

I	AAZTA-C4	AAZTA-C2	AAZTA	
	0.15 M NaCl	0.15 M NaCl	0.15 M NaCl	0.1 M KCl ^[a]
CaL	12.05 (2)	11.91 (1)	11.75 (1)	12.76
CaHL	4.77 (2)	4.36 (1)	3.41 (3)	3.34
CaH ₂ L	3.27 (2)	3.58 (3)	–	–
ZnL	17.05 (3)	16.93 (3)	16.02 (1)	18.01
ZnHL	4.74 (3)	4.48 (3)	3.95 (1)	3.87
ZnH ₂ L	3.76 (2)	3.61 (3)	2.53 (1)	2.36
ZnH ₃ L	2.76 (2)	2.74 (3)	–	–
ZnLH ₁	11.39 (4)	11.44 (5)	11.36 (2)	11.25
CuL	18.94 (5)		20.71 (2)	22.27
CuHL	4.79 (2)	4.54 (3)	3.92 (1)	4.00
CuH ₂ L	3.91 (2)	3.86 (2)	2.68 (1)	2.72
CuH ₃ L	2.88 (2)	2.94 (2)	0.92 (3)	–
CuH ₄ L	1.31 (2)		–	–
CuLH ₁	11.02 (3)	11.23 (2)	10.79 (2)	10.81
LaL	17.24 (2)	16.98 (3)	16.48 (1)	17.53
LaHL	4.68 (1)	4.36 (1)	1.90(5)	1.97
LaH ₂ L	2.37 (2)	2.59 (2)	–	–
GdL	20.33 (2)	20.06 (5)	18.93 (1)	20.24
GdHL	4.74 (1)	4.45 (2)	2.18 (1)	1.89
GdH ₂ L	2.07 (1)	2.11 (3)	–	–
LuL	22.06 (3)	21.65 (4)	21.22 (4)	21.85
LuHL	4.65 (2)	4.47 (4)		

^[a] BARANYAI, Z., UGGERI, F., GIOVENZANA, G. B., BÉNYEI, A., BRUCHER, E., AIME, S. Equilibrium and kinetic properties of the lanthanoids(III) and various divalent metal complexes of the heptadentate ligand AAZTA. *Chemistry - A European Journal*, 2009, 15, 1696-1705.

2 Autorização do comitê de ética para a realização dos ensaios *in vivo*.*Ministero della Salute*Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari
Ufficio VI (ex DGSA – Benessere Animale)Università degli Studi di Torino
pec: coordinamento.ricerca@pec.unito.it
Dipartimento di Biotecnologie Molecolari
e Scienze per la Salute
pec: biotecnologie@pec.unito.itc.a Dr.ssa Fiorella ALTRUDA
e-mail: fiorella.altruda@unito.it

e, per conoscenza

ASL Torino 1
Servizio Veterinario
c.a. Dr.ssa Laura GEMELLO
e-mail: laura.gemello@asl1.to.it

OGGETTO: D.lgs. 26/2014 in materia di protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.
Trasmissione autorizzazioni ai sensi dell'art. 31.
Autorizzazione n° 1012/2015-PR (Risposta a DGSF 27309-A del 23/12/2014)

Si trasmette l'autorizzazione n° 1012/2015-PR rilasciata in data 23/09/2015, ai sensi dell'art. 31 del D.lgs. 26/2014.

IL DIRETTORE DELL'UFFICIO VI
Dr. Vincenzo Ugo SANTUCCI

Referenti: G. Botta e-mail: g.botta@sanita.it;
UNI TORINO Aime 09MMXV



Ministero della Salute

DIREZIONE GENERALE DELLA SANITÀ ANIMALE E DEI FARMACI VETERINARI
UFFICIO VI ex DGSA

Autorizzazione n. *1012*/2015-PR

IL DIRETTORE GENERALE

Vista la domanda di autorizzazione del progetto di ricerca **“Studio di modelli sperimentali animali mediante tecniche di imaging e valutazione dell’efficacia di trattamenti con agenti teranostici utilizzati nello sviluppo di protocolli di medicina personalizzata per trattamenti di patologie tumorali anche basati sull’irraggiamento”**, ex articolo 31 del decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, acquisita con prot. DGSAF 27309 del 23/12/2014, inoltrata dall’**Università degli Studi di Torino, sede legale in Torino, Via Verdi, 8**, per il tramite dell’Organismo preposto al benessere degli animali di cui all’articolo 25 del menzionato d.lgs. n. 26/2014, e finalizzata all’esecuzione del progetto di ricerca come descritto nella documentazione allegata alla domanda;

Visto l’articolo 31, comma 1, del d.lgs. n. 26/2014, nel quale il Ministero della salute è individuato quale autorità competente al rilascio dell’autorizzazione all’esecuzione di progetti di ricerca che prevedono l’utilizzo di animali a fini scientifici secondo le finalità di cui all’articolo 5, comma 1, in continuità con la precedente normativa di cui al decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116;

Visti gli articoli 12, 13, 14, 15, 16 e 17 del succitato d.lgs. n. 26/2014, che stabiliscono le modalità di utilizzazione degli animali nelle procedure condotte a fini scientifici;

Visti gli articoli 31, 32, 34 e 35, nonché gli Allegati IV, VI, VII e IX del d.lgs. n. 26/2014, che fissano i requisiti generali per il rilascio di autorizzazione per progetti di ricerca;

Vista la nota n. 20210 del 08/07/2015, con cui l’Istituto Superiore di Sanità ha comunicato l’esito positivo della valutazione tecnico-scientifica sul progetto di ricerca;

Considerato che ricorrono i requisiti stabiliti dal d.lgs. n. 26/2014 per il progetto da autorizzare;

Preso atto che il responsabile del progetto di ricerca, ai sensi dell’articolo 3, comma 1, lettera g) del d.lgs. n. 26/2014, è il **Prof. Silvio AIME**;

Considerato che lo **stabilimento utilizzatore del Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute, dell’Università degli Studi di Torino, sito in Torino, Via Nizza, 52, è regolarmente autorizzato con decreto n. 182/2010-A del 03/11/2010, ai sensi del D.lgs. 116/92**;

Visto l’articolo 4, comma 2 e l’articolo 16 del decreto legislativo 30 marzo 2001, n. 165 e successive modifiche, recanti le funzioni dei dirigenti di uffici dirigenziali;

Responsabile del procedimento: Dr. Vincenzo Ugo SANTUCCI
Referenti: Botta: g.botta@sanita.it



1. L'Università degli Studi di Torino con sede legale in Torino, Via Verdi, 8, all'esecuzione del progetto di ricerca ex articolo 31 del decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26, in conformità a quanto indicato nella richiesta di autorizzazione citata in premessa ed, in particolare, con riferimento a:

“Studio di modelli sperimentali animali mediante tecniche di imaging e valutazione dell'efficacia di trattamenti con agenti teranostici utilizzati nello sviluppo di protocolli di medicina personalizzata per trattamenti di patologie tumorali anche basati sull'irraggiamento”

2. Il Prof. Silvio AIME quale responsabile del progetto di ricerca, ai sensi dell'articolo 3, comma 1, lettera g) del d.lgs. n. 26/2014.

3. L'Università degli Studi di Torino con sede legale in Torino, Via Verdi, 8, all'esecuzione del progetto di ricerca di cui al punto 1 nello stabilimento utilizzatore del Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute, dell'Università degli Studi di Torino, sito in Torino, Via Nizza, 52, regolarmente autorizzato con decreto n. 182/2010-A del 03/11/2010, ai sensi del D.lgs. 116/92.

Alla conclusione del progetto di ricerca, il responsabile di cui all'articolo 3, comma 1, lettera g) del d.lgs. n. 26/2014 dovrà inviare alla scrivente Amministrazione la documentazione necessaria ai fini della valutazione retrospettiva come previsto dall'articolo 32 del citato decreto.

La presente autorizzazione ha una durata di sessanta mesi e può essere revocata secondo quanto previsto dall'articolo 31, comma 15 del d.lgs. n. 26/2014.

23 SET. 2015

IL DIRETTORE GENERALE
(Dott. Silvio BORBELLO)

Responsabile del procedimento: Dr. Vincenzo Ugo SANTUCCI
Referenti: Bottalini, bottalini@sanita.it