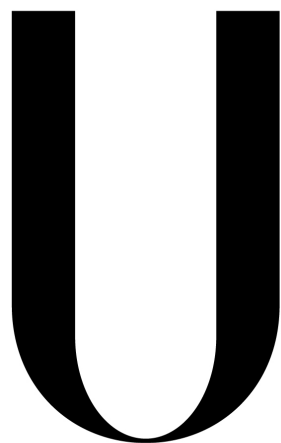


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Desenvolvimento de complexos de Eu e Tb com
aplicação imagiológica e terapêutica no cancro**

Mário Nuno Romão Felício

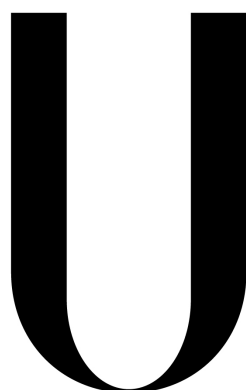
Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Desenvolvimento de complexos de Eu e Tb com
aplicação imagiológica e terapêutica no cancro**

Mário Nuno Romão Felício

Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica

Orientadores:

Doutor Pedro Vaz

Doutora Mariela Nolasco

2013

*“ The curiosity leads the search for knowledge,
and the knowledge brings more curiosity.”*

Resumo

Os lantanídeos (*Ln*) têm sido muito estudados devido às suas propriedades fluorescentes únicas, tais como um grande desvio de Stokes e tempos de decaimentos longos. A síntese de complexos de Európio (*Eu*) e Térbio (*Tb*) tem um grande número de aplicações possíveis na área da medicina. Com a descoberta recente de compostos orgânicos (8-hidroxiquinolina) que actuam especificamente em células cancerígenas, através do recrutamento de cobre, reduzindo a proliferação e provocando a apoptose, a síntese de complexos de *Ln* que actuam em células cancerígenas tem ganho interesse.

O objectivo do presente trabalho foi sintetizar complexos de *Eu/Tb* (8 com e 8 sem cobre) que possam recrutar cobre (*Cu*) especificamente em células cancerígenas, tendo uma acção terapêutica e funcionando como biosondas. Os complexos, para além do *Ln*, possuem uma molécula que promove o *efeito antena* (2,2'-bipiridina), e têm uma ligando adicional que recruta *Cu* nas células tumorais (testados quatro ligandos diferentes). Os complexos foram caracterizados através da espectroscopia vibracional, confirmando a estrutura dos mesmos. Espectroscopia de UV/Vis e de fluorescência foram também realizadas, para estudar as propriedades fotoluminescentes dos complexos. Os mesmos demonstraram que possuem excelentes propriedades fluorescentes, especialmente **C2** para os complexos de *Eu* e **C9** para os de *Tb*, podendo assim funcionar como biosondas. O recrutamento de *Cu* por parte dos complexos foi confirmado por espectroscopia de UV/Vis, o que deixou em aberto a possibilidade do recrutamento de *Cu* poder acontecer de forma específica para células cancerígenas.

Os efeitos na viabilidade celular por parte dos complexos foram estudados em células *HeLa* e *A549*, utilizando um método colorimétrico (MTT). Os complexos sem *Cu* não interferiram na viabilidade celular, contrariamente aos complexos bimetálicos, que reduziram significativamente a viabilidade. Os estudos de fluorescência em meio celular permitiram confirmar os resultados obtidos em solução. Concluindo, os complexos de *Eu/Tb* sintetizados podem funcionar como biosondas e como moléculas anticancerígenas.

Palavras-Chave: Európio, Térbio, Complexos de lantanídeos, Inibidores do proteassoma, Cancro;

Abstract

Lanthanides (*Ln*) have been studied extensively because of their unique fluorescent properties, such as a long Stokes shift, exceptionally decay times and long excitable wavelength. The complexation of these metals, especially europium (*Eu*) and terbium (*Tb*), has a large number of applications in medicine. With a discovery of an organic compound (8-hydroxyquinoline) that target cancer cells specifically, by recruiting copper, reducing their proliferation and leading to apoptosis, the synthesis of the lanthanides complexes that target cancer cells has been gaining a major interest.

The objective of the current work was synthesize *Eu/Tb* complexes (8 with and 8 without copper) that can recruit copper specifically from cancer cells, having a therapeutic action and working like imaging probe. The complexes, besides the metal, have a 2,2'-bipyridine molecule that promotes the *antenna* effect for the *Ln*, and have one additional ligand that targets and recruits copper in tumours cells (four different ligands were tested). The complexes were characterized with vibrational spectroscopy, confirming the structure of them. Fluorescent and UV/Vis spectroscopy were also done, to study the photoluminescent properties of the complexes. The complexes have shown that have great fluorescent properties, especially **C2** for *Eu* complexes, and **C9** for *Tb* complexes, proving that can function as bioprobe. The recruiting of *Cu* by the complexes was confirmed by UV/Vis spectroscopy, which leaves open the possible function of recruiting *Cu* specifically in cancer cells.

Proliferation and cytotoxic effects of the complexes were studied in *HeLa* and *A549* cells, using a colorimetric method (MTT). Complexes without copper don't interfere with the viability of the cells, contrary to the complexes with copper, which reduce the viability. Fluorescent studies were also done in cellular medium, confirming the results obtained in solution. Concluding, the complexes of *Eu/Tb* synthesize can function as bioprobes and as anticancer molecules.

Keywords: Europium, Terbium, Lanthanide complexes, Proteasome inhibitors, Cancer.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Doutor Pedro Vaz e à Doutora Mariela Nolasco por terem aceitado supervisionar o meu trabalho de tese de mestrado, e porque sem ajuda destes professores o trabalho desenvolvido não teria sido possível. Ainda um duplo agradecimento à Doutora Mariela Nolasco pela ajuda na obtenção e tratamento de dados da espectroscopia de Raman e de Fluorescência. Depois, um agradecimento também especial à Doutora Carla Nunes por todo o apoio prestado a todos os níveis, à Mestre Cristina Fernandes por tudo o que me ensinou, e aos restantes membros do laboratório.

De seguida, gostaria de agradecer à Professora Margarida Meireles, à Doutora Carla Afonso e à Mestre Ana Bagulho por todo o apoio prestado em termos de material necessário para os estudos celulares, e pelo constante interesse no trabalho desenvolvido, ao Grupo de Inorgânica Teórica pela cedência de material e de espaço de trabalho.

Depois, queria agradecer aos amigos de sempre, João Muralha, Diogo Januário, Miguel Ferragolo, Cláudia Polónia, Rita Madeira, Sofia Alves e Filipa Matilde, porque são eles que me fazem esquecer as semanas menos boas e até as semanas boas, apoiando-me sempre de uma forma exagerada. Queria ainda agradecer aos “novos” amigos, mas não menos importantes, porque também sem eles os tempos de descanso e de tertúlias não teriam sido iguais, sendo que alguns merecem atenções especiais, tais como Joana Ricardo (“Madrinha”), Jomi Fernandes (“Padrinho”), João Nunes, Luís César, Samuel Casaca, Andreia Pousinha, Carlos Vieira e João Albuquerque.

O agradecimento maior é para a Inês Marques, porque me tem apoiado constante e incondicionalmente, e sem este apoio, tudo teria sido mais difícil, acreditando sempre cegamente em mim.

Finalmente, queria agradecer à minha família e principalmente aos meus pais, José e Manuela, porque foram eles que me tornaram o homem que sou e que me ajudaram a ser alguém que procura saber sempre mais e mais, e sem eles, os obstáculos não teriam sido ultrapassados. Obrigado por tudo!

Índice

RESUMO.....	I
ABSTRACT	III
AGRADECIMENTOS.....	V
ÍNDICE.....	VII
GLOSSÁRIO.....	IX
1. INTRODUÇÃO TEÓRICA.....	1
1.1 LANTANÍDEOS.....	3
1.2 COMPLEXOS DE LANTANÍDEOS	6
1.2.1 Biosondas.....	7
1.3 CANCRO E ANGIOGÊNESE.....	8
1.4 INIBIDORES DO PROTEASSOMA.....	12
1.5 OBJECTIVO DO TRABALHO	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1 MATERIAIS E INSTRUMENTAÇÃO	17
2.2 SÍNTESE DOS COMPLEXOS DE <i>EU</i>	18
2.2.1 Complexos do Tipo I (C1-C4).....	18
2.2.2 Complexos do Tipo II (C5-C8).....	19
2.3 SÍNTESE DOS COMPLEXOS DE <i>TB</i>	20
2.3.1 Complexos do Tipo I (C9-C12).....	20
2.3.2 Complexos do Tipo II (C13-C16).....	21
2.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	22
2.4.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	22
2.4.2 Espectroscopia de Raman	22
2.4.3 Espectroscopia de UV/Vis.....	22
2.4.4 Espectroscopia de Fluorescência	23
2.5 CULTURA CELULAR E ENSAIOS CITOTÓXICOS <i>IN VITRO</i>	23
2.5.1 Criopreservação e ressuspensão de células criopreservadas	24
2.5.2 Cultura e quantificação celular.....	24
2.5.3 Actividade citotóxica <i>in vitro</i> utilizando ensaio colorimétrico.....	25
2.5.4 Espectroscopia de Fluorescência em meio celular	26
3. RESULTADOS	27
3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS (C1-C16)	29
3.1.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.....	31
3.1.2 Espectroscopia de Raman	33
3.1.3 Espectroscopia de UV/Vis.....	37
3.1.4 Espectroscopia de Fluorescência	42
3.2 ENSAIOS CELULARES <i>IN VITRO</i>	47
3.2.1 Citotoxicidade em células HeLa.....	48
3.2.2 Citotoxicidade em células A549.....	50
3.2.3 Determinação dos valores de IC_{50}	51
3.2.4 Fluorescência em meio celular.....	52

4. CONCLUSÃO	55
4.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	59
5. BIBLIOGRAFIA	61
6. ANEXOS	69
6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS (C1-C16)	71
6.1.1 Espectroscopia de UV/Vis.....	71
6.1.2 Espectroscopia de Fluorescência	72
6.2 ENSAIOS CELULARES <i>IN VITRO</i>	73
6.2.1 Citotoxicidade em células HeLa.....	73
6.2.2 Citotoxicidade em células A549.....	74
6.2.3 Fluorescência em meio celular.....	75

Glossário

α/β FGF – Factor de crescimento de fibroblastos

λ – Comprimento de onda

λ_{exc} – Comprimento de onda de excitação

μ L - Microlitro

μ M – Micromolar

η – Rendimento

$^{\circ}$ C – Graus Celsius

bpy – Bipyridina

C1 – Complexo de Eu + 2,2'-*bpy* + L1

C2 – Complexo de Eu + 2,2'-*bpy* + L2

C3 – Complexo de Eu + 2,2'-*bpy* + L1 + Cu

C4 – Complexo de Eu + 2,2'-*bpy* + L2 + Cu

C5 – Complexo de Eu + 2,2'-*bpy* + L3

C6 – Complexo de Eu + 2,2'-*bpy* + L4

C7 – Complexo de Eu + 2,2'-*bpy* + L3 + Cu

C8 – Complexo de Eu + 2,2'-*bpy* + L4 + Cu

C9 – Complexo de Tb + 2,2'-*bpy* + L1

C10 – Complexo de Tb + 2,2'-*bpy* + L2

C11 – Complexo de Tb + 2,2'-*bpy* + L1 + Cu

C12 – Complexo de Tb + 2,2'-*bpy* + L2 + Cu

C13 – Complexo de Tb + 2,2'-*bpy* + L3

C14 – Complexo de Tb + 2,2'-*bpy* + L4

C15 – Complexo de Tb + 2,2'-*bpy* + L3 + Cu

C16 – Complexo de Tb + 2,2'-*bpy* + L4 + Cu

CaO – Óxido de Cálcio

cm – Centímetro (1×10^{-2} metro)

CO₂ – Dióxido de Carbono

CuCl₂.2H₂O – Cloreto de cobre hidratado

Da – Dalton

dm – Decímetro (1×10^{-1} metro)

DMSO – Dimetilsulfóxido§

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EtOH – Etanol

EuCl₃.6H₂O – Cloreto de Európio hexahidratado

FBS – Soro bovino fetal

FF, F, m, f – Muito forte, forte, médio, fraco

FTIR _ Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

g – Grama

g – Velocidade de centrifugação

GCSF – Factor coestimulador de granulócitos

GMCSF – Factor coestimulador de granulócitos e macrófagos

He – Hélio
IC – Conversão interna
IC₅₀ – Concentração inibitória de 50% do crescimento
ISC – Conversão intersistemas
IV – Infravermelho
KBr – Brometo de Potássio
kV – Quilovolt (1×10^3 volte)
L - Litro
L1 – Ácido isonicotínico
L2 – Ácido naftaleno 1,5-dicarboxílico
L3 – *trans*-1,2-di-(4-piridil)-etileno
L4 – 4,4-*bpy*
Ln – Lantanídeos
M – Molar ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)
miRNA – MicroRNA
mg - Miligrama
mL – Mililitro
mm – Milímetro (1×10^{-3} metro)
mM – Milimolar
mRNA – RNA mensageiro
MTT - Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaOH – Hidróxido de sódio
nm – Nanómetro (1×10^{-9} metro)
Pa – Pascal
PBS – Tampão salino de fosfatos
PDECGF – Factor de crescimento derivado de plaquetas endoteliais
pH – Potencial de Hidrogénio
phen – Fenantrolina
Q^{Ln} – Rendimento quântico intrínseco do lantanídeo
RNA – Ácido ribonucleico
T_{amb} – Temperatura ambiente
TbCl₃·6H₂O – Cloreto de térbio hexahidratado
TGFβ – Factor de crescimento de transformação beta
UV – Ultravioleta
UV/Vis – Ultravioleta/Visível
VEGF – Facto de crescimento vascular endotelial
Z – Número atómico

1. Introdução Teórica

1.1 Lantanídeos

A palavra lantanídeo, com ligações às palavras luminescência e luz, deriva da palavra grega “*lanthanein*”, que significa “*permanecer escondido*”. Inicialmente, os elementos químicos deste grupo eram conhecidos como elementos raros (“*rare earth elements*”), isto porque os minerais de onde eram isolados eram e são extremamente raros na Terra, sendo depois introduzido o termo lantanídeo por volta de 1925, muito provavelmente por Victor Goldschmidt^{1,2}.

Os lantanídeos (*Ln*) são a maior família de elementos químicos, que inicia no Lantânio (*La*, *Z* = 57) e termina no Lutécio (*Lu*, *Z* = 71), com características únicas e muito semelhantes entre eles em termos de propriedades químicas, como por exemplo, o estado de oxidação, que é geralmente III (catiões trivalentes). Esta família pertence ao sexto período da tabela periódica, **Figura 1**, embora sejam reconhecidos como um grupo à parte devido à sua configuração electrónica em forma de átomo [Xe] 6s² 4f^{*n*}, que passa a [Xe] 4f^{*n*} quando na forma de iões de carga 3+, o que explica em parte a grande semelhança nas propriedades químicas destes elementos e que possibilita a estes serem também conhecidos como elementos do bloco f, sendo excepção o Lu, que é um elemento do bloco d³.

The figure shows a standard periodic table with the following highlights:

- Lanthanide series (orange box):** La (57), Ce (58), Pr (59), Nd (60), Pm (61), Sm (62), Eu (63), Gd (64), Tb (65), Dy (66), Ho (67), Er (68), Tm (69), Yb (70).
- Actinide series (orange box):** Ac (89), Th (90), Pa (91), U (92), Np (93), Pu (94), Am (95), Cm (96), Bk (97), Cf (98), Es (99), Fm (100), Md (101), No (102).
- Europium (Eu, red box):** Atomic number 63.
- Terbium (Tb, green box):** Atomic number 65.

Figura 1. Tabela periódica dos elementos, com destaque para os Lantanídeos (caixa de cor laranja), e para os elementos Európio (*Eu*) e Tébrio (*Tb*), (caixas de cor vermelha e verde, respectivamente).

A orbital 4f é preenchida e estabilizada à medida que o número atómico aumenta, isto devido a uma contracção que tem origem no aumento do número de prótons presentes no núcleo do átomo, o que explica a diminuição do raio iónico com o aumento do número atómico.

As características espectroscópicas destes elementos, essenciais na descoberta de alguns membros desta família, provêm do facto da orbital 4f estar protegida pelas

orbitais preenchidas $5p^6$ e $6s^2$, o que permite transições electrónicas 4f-4f proibidas por simetria pelas leis da quântica, tendo coeficientes de absorção molar muito baixas e emissão na região do visível e do infravermelho próximo ⁴, sendo um grupo muito particular em termos de luminescência.

A luminescência consiste num processo de emissão de luz a partir de estados excitados de energia, podendo ser dividida consoante a natureza dos mesmos: fluorescência se a emissão se fizer a partir de estados singlete, fosforescência se a emissão se fizer a partir de estados tripleto, **Figura 2**.

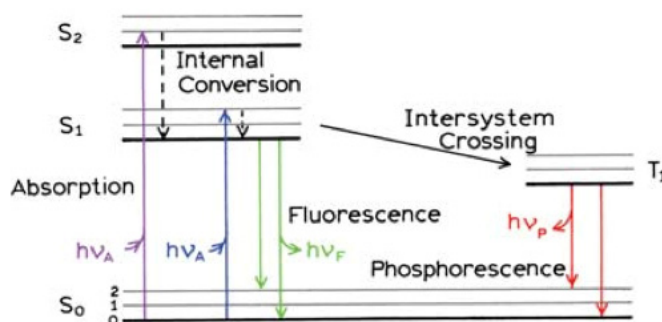


Figura 2. Diagrama de Jablonski em que estão representados as transferências entre níveis de energia possíveis para moléculas luminescentes, adaptado de ⁵.

Como está representado na Figura 2, a fluorescência ocorre quando os electrões depois de excitados, retornam ao nível fundamental de energia de singlete. A transição para o estado fundamental (representada a verde) é rápida isto porque o número de spin do electrão excitado é oposto ao do que se mantém no estado fundamental, podendo haver emparelhamento entre electrões. Quanto à fosforescência, é um processo que ocorre quando a emissão de fotões se faz a partir de estado excitado de tripleto. É um processo mais lento, isto porque as transições para o estado fundamental são proibidas já que tanto o electrão no estado fundamental como o electrão no estado excitado têm a mesma orientação de spin. É devido a este fenómeno que a fosforescência é observável numa escala de tempo maior após absorção de energia ⁵. A eficiência deste processo é avaliada pela diferença de energia entre a que é absorvida e a que é emitida na forma de fotão. Quanto menor for esta diferença, mais eficiente é o fenómeno, havendo no entanto vários processos que poderão levar à perda da energia absorvida:

1. Conversão interna (IC) – consiste na relaxação vibracional e na passagem do segundo estado excitado para o primeiro ($S_2 \rightarrow S_1$). Cada nível energético possui diferentes níveis vibracionais, com diferentes energias associada. Como a relaxação vibracional é geralmente muito rápida, perde-se energia e ocorre a transição para o nível vibracional menos energético de S_1 , isto porque a emissão ocorre normalmente a partir deste nível de energia, independentemente de se encontrar no segundo estado excitado (S_2).

2. Cruzamento intersistemas (ISC) – consiste na mudança da orientação de spin do electrão, do estado de singleto para tripleto, havendo ao longo desta transição perda de energia de forma não radiativa.

Daqui se conclui que o ISC é essencial para que ocorra fosforescência, daí que este processo seja menos energético comparativamente à fluorescência, que só engloba perdas energéticas no mesmo sistema, traduzidas por IC. Existem outros processos mais complexos que poderão contribuir para a perda de fluorescência, como a extinção de fluorescência (“*quenching*”), a transferência de energia por ressonância (RET) ou as interações com o solvente, que não estão representados na **Figura 2**.

A particularidade dos *Ln* em termos de luminescência vem do facto de conseguirem emitir luz a partir de um único átomo, mais precisamente devido às transições entre as orbitais f, que estão protegidas pelas restantes orbitais preenchidas, o que permite o longo tempo de decaimento de luminescência e os baixos coeficientes de absorção. Esta característica provoca também uma ausência de emissão polarizada, e logo nunca poderão ser feitos estudos de anisotropia em lantanídeos^{6,7}, e possibilita ainda que não haja extinção de fluorescência por parte de oxigénio (O₂) nem desvios devido à polaridade do solvente, o que constitui uma grande vantagem em relação a outro tipo de fluoróforos^{8,9}.

A escolha do *Ln* a utilizar para processos luminescentes prende-se com aquele que é mais eficiente na emissão, isto é, traduz-se naquele que consegue ter um estado excitado mais facilmente ocupado e que consegue minimizar as perdas de energia. Estes pré-requisitos são mais facilmente obtidos quando a diferença entre o último nível vibracional do estado fundamental e o estado excitado é maior, ou seja, maior valor de rendimento quântico intrínseco (Q^{Ln})⁴, **Figura 3**.

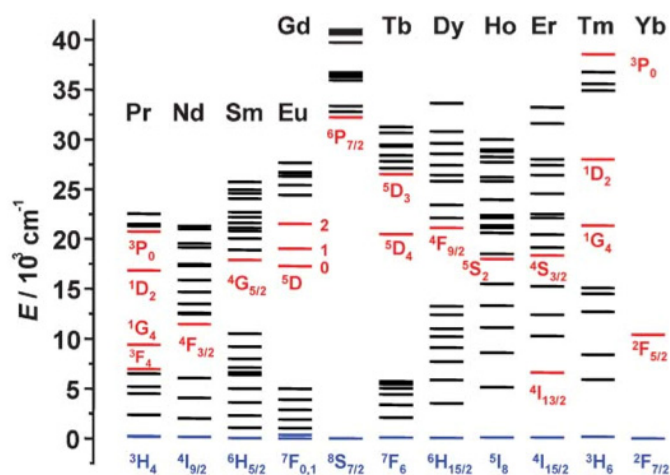


Figura 3. Diagrama de energia dos lantanídeos em solução aquosa, estando representado a azul o estado fundamental e a vermelho os níveis mais facilmente ocupados, adaptado de⁴.

Observando a figura anterior, os metais que apresentam um maior valor de Q^{Ln} são o Európio (*Eu*), o Térbio (*Tb*) e o Gadolínio (*Gd*), sendo que o *Gd* emite no UV,

daí que seja preferido quando o objectivo é desenvolver marcadores fluorescentes. Neste trabalho focar-nos-emos em *Eu* e *Tb*, **Figura 1**.

1.2 Complexos de Lantanídeos

Elementos como o *Eu* e *Tb* têm sido altamente estudados ao longo dos últimos anos pelas razões apresentadas anteriormente. Embora este grupo de elementos seja conhecido pelas propriedades espectroscópicas e pelas suas vantagens comparativamente a outro tipo de fluoróforos, são também as mesmas que permitem perceber que com a excitação directa do elemento não é obtido o rendimento máximo que estes elementos podem ter em termos de luminescência, já que existem vários estudos que demonstram que o rendimento dos materiais com lantanídeos não é tão alto como o esperado teoricamente¹⁰. O motivo para esta falha em termos de rendimento prende-se com as transições energéticas f-f de carácter proibitivo, que como já foi dito anteriormente, permitem a emissão de luz excepcionalmente num único elemento^{11,12}. O facto destas, transições serem proibidas, faz com que após a absorção de luz na forma de energia, a emissão seja retardada, levando a tempos de decaimento longos^{6,7}, mas provoca também uma perda de energia, daí que o rendimento dos *Ln* em materiais não seja o esperado.

Para ultrapassar esta extinção de fluorescência que não era esperada, desenvolveu-se um método que é conhecido por “efeito de antena”¹³⁻¹⁵. Este efeito consiste na transferência de energia entre um ligando orgânico e o *Ln*, que irá potenciar as propriedades luminescentes do mesmo, daí que seja como que uma antena que capta a luz¹⁶. Como os lantanídeos são ricos em química de coordenação¹⁷, o método utilizado consiste em complexar *Ln* com moléculas orgânicas que sejam eficientes na absorção de luz e na transferência de energia para os níveis do *Ln*, sendo por isso mais eficiente a presença de “antenas” com níveis de energia próximos dos do íon¹⁸. Em termos de transferência de energia, o processo quântico está representado na **Figura 4**.

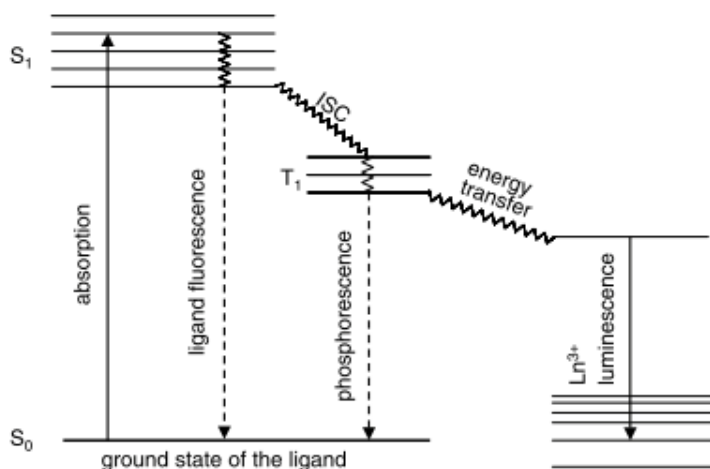


Figura 4. Mecanismo do “efeito de antena”, em que se observa a absorção de luz por parte do ligando e as respectivas transições de energia até emissão de luz por parte do *Ln* ($S_1 \rightarrow T_1 \rightarrow {}^5D_0 \rightarrow {}^7F_j$), adaptado de¹⁸.

Observando a figura acima, consegue-se observar as transferências energéticas necessárias para a excitação e posterior emissão do *Ln*. Após excitação do ligando para níveis S_1 , existe transferência de energias entre sistemas (ISC), e posterior transferência para o nível de emissão do *Ln* (no caso do *Eu* 5D_0 e no caso *Tb* é 5D_4), emitindo finalmente luz com a passagem para o estado fundamental (7F_j)¹⁹. Outra vantagem da presença de moléculas orgânicas num complexo de *Ln* é o facto de reduzir a simetria do complexo, o que aumenta as propriedades fotofísicas do complexo^{20,21}. Conclui-se assim que a escolha do ligando é essencial²² para a obtenção de um complexo de *Ln* que seja estável, e ao mesmo tempo, eficiente na absorção, na transferência e emissão de energia²³.

Nos últimos anos têm sido sintetizados vários complexos de Eu e Tb que têm uma grande pureza de cor (emissão monocromática), elevada eficiência fotoluminescente, estabilidade e Q^{Ln} ^{16,24-27}, e que são termicamente estáveis²⁸. Para além destas vantagens, os complexos apresentam um grande desvio de Stokes (diferença entre o comprimento de onda de excitação e emissão característicos), na ordem dos 200 nm, e um espectro de emissão característico diferente comparativamente a outros complexos¹⁷.

As diferenças dos complexos sintetizados consistem no estado de oxidação do *Ln* (os lantanídeos também podem formar complexos no estado II^{29,30}) e no tipo de “antenas” utilizadas, sendo que as mais estudadas foram os ligandos neutros 2,2'-bipiridina (*bpy*) e 1,10-fenantrolina (*phen*)¹⁰. Com estes estudos concluiu-se que se o ião metálico estiver saturado em termos de coordenação, existem menos efeitos de extinção de fluorescência, principalmente por parte de H₂O (os grupos O-H provocam uma desactivação do estado excitado do ião³¹). No entanto, observa-se que a estabilidade mecânica de alguns complexos é baixa para estudos fotofísicos³². Devido a esta baixa estabilidade mecânica, vários autores têm testado a incorporação de complexos de *Ln* em diferentes tipos de materiais, como nanopartículas³³, líquidos iónicos³⁴ ou materiais porosos como o MCM-41 ou o SBA-15^{35,36}, isto para aumentar a estabilidade mecânica e térmica dos mesmos, bem como a resistência de coordenação com moléculas de H₂O.

Ainda assim, as excelentes características dos complexos de *Ln*, principalmente de *Eu* e *Tb*, têm levado diversos autores a testar diversas aplicações para os mesmos, tais como, sensores em imunofluorescência³⁷, aparelhos ópticos electrónicos³⁸, biossensores, amplificadores de fibras³² e ainda marcadores de imagiologia^{33,11}. Mais recentemente, foram sintetizados complexos de *Ln* que para além de um ligando que funciona como *antena*, possui um outro que terá uma função quelante, sendo que poderá ser aplicado a vários fins, consoante a molécula para qual o ligando tem afinidade³¹.

1.2.1 Biosondas

Outra aplicação, que vai de encontro às já enumeradas, é a criação de biosondas fluorescentes, com aplicação na imagiologia molecular. A imagiologia molecular consiste numa técnica de análise de amostras vivas em tempo real com grande resolução espacial³⁹, que permite o mapeamento da envolvimento dos tecidos.

Para a criação de uma biosonda eficiente, existem diversos aspectos a tomar em conta, nomeadamente a especificidade para os tecidos alvo, a biocompatibilidade (esta é essencial), a elevada fluorescência intrínseca (permite a redução da concentração administrada) e a não interferência desta na biologia dos tecidos. Vários têm sido os caminhos para o desenvolvimento de biosondas, entre eles as reacções orgânicas (fluoróforos utilizados são orgânicos, bem como a sua derivatização⁴⁰), ou as reacções baseadas em metais, como os *Ln*.

Os complexos metálicos de *Ln* têm tido grande sucesso neste campo devido às suas propriedades já citadas anteriormente, como o grande desvio de Stokes, o longo tempo de decaimento (permitem o uso de espectro e microscopia “time-resolved”⁴¹), a insensibilidade ao O₂ e a emissão em bandas bem definidas e características de cada ião⁴². Todas estas propriedades permitem que os complexos de *Ln* sejam considerados as biosondas fluorescentes “perfeitas” para a utilização em diversas técnicas de análise, daí que cada vez mais se estude a forma de introduzir a especificidade ao tecido alvo nestes complexos, sendo esta a única falha no desenho destas biosondas.

1.3 Cancro e Angiogénese

Nas últimas décadas, o cancro e a oncogénese têm sido alvo de estudos intensivos, no sentido de se encontrar novas formas terapêuticas de combate a esta doença. O cancro consiste num conjunto de mais de 100 doenças, que provoca um aumento da proliferação celular e o aparecimento de tumores sólidos em diversos órgãos. Este aumento da proliferação celular é provocado por desregulações na homeostasia do crescimento celular, com origem em factores ambientais ou genéticos. Neste caso, a origem “ambiental” refere-se a tudo o que não é intrínseco à célula, como por exemplo, o contacto com químicos como o tabaco⁴³, a exposição a radiação, infecções crónicas contínuas em tecidos epiteliais⁴⁴, entre outros. Quanto aos factores genéticos, estes passam pela activação de oncogenes (genes que promovem o crescimento celular e o aparecimento de tumores), pela inibição dos genes supressores tumorais e pela alteração da acção dos miRNA (pequenos segmentos de RNA, que têm a capacidade de actuar em diversos alvos, regulando-os sempre de uma forma negativa), sendo que para o surgimento de cancro basta uma única alteração genética⁴⁵.

O desenvolvimento do cancro é caracterizado por diversas fases de crescimento. A primeira fase de crescimento tumoral consiste na proliferação, através de sinalização celular, que é essencial para o crescimento inicial do tumor, já que é esta sinalização que provoca a proliferação contínua das células. A forma como surgem estes sinais de proliferação em células normais ainda não está determinada, devido às dificuldades experimentais de controlo de sinais entre células e os tecidos circundantes. Contrastando, os sinais proliferativos têm sido altamente estudados em células tumorais^{46,47}, tendo já sido encontrados e estudados vários mecanismos. Entre eles, conta-se a produção de factores de crescimento específicos para os receptores de membrana (sinalização autócrina)⁴⁸, a estimulação de células normais para

suplementação das células cancerígenas⁴⁹, o aumento do número de receptores para os variados factores de crescimento e a alteração aos mecanismos de retroacção que controlam a homeostasia celular, **Figura 5**.

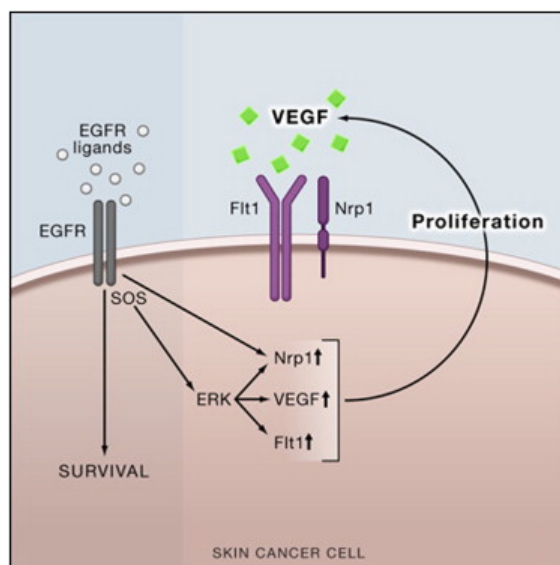


Figura 5. Sinalização autócrina de uma célula cancerígena através do VEGF, que promove a sua proliferação, adaptado de⁵⁰.

A segunda fase de crescimento consiste na sustentabilidade das células tumorais em termos de nutrientes e de O₂. Para tal, as células tumorais estimulam a produção de vasos sanguíneos, num processo denominado de angiogénese⁵¹. Este processo que é essencial durante o desenvolvimento embrionário, e que ocorre na vida de um adulto durante os processos de renovação celular e ciclo menstrual, é determinante no desenvolvimento tumoral, estando constantemente activo neste tipo de células⁵². A angiogénese é marcada por nascimento capilar, crescimento de vasos excessivos e bastante largos, microhemorragias e desenvolvimento de células endoteliais anormal. Em células não cancerígenas, a angiogénese envolve um alto nível de equilíbrio entre inibidores e activadores, que se encontram também disponíveis em células cancerígenas, sendo que nas últimas existe uma maior estimulação dos activadores⁵³, tais como, VEGF, PDECGF, α/β FGF, TGF β , GCSF e GMCSF⁵⁴. Outro componente essencial na regulação da angiogénese é a matriz extracelular, isto porque permite a ligação dos factores de crescimento e a sua libertação nas células tumorais e não tumorais, e permite também a interacção entre as células tumorais e as células endoteliais que irão compor os futuros vasos sanguíneos⁵¹, **Figura 6**. É devido a esta dependência da angiogénese que muitos estudos têm sido feitos no sentido de inibir este processo especificamente em células tumorais, tendo sido já testado compostos metálicos (que irão ser abordados nas próximas secções deste capítulo)⁵³, inibidores específicos de factores de crescimento⁵¹, entre outros, sendo que até hoje os resultados mais promissores apontam para a utilização de fármacos combinados.

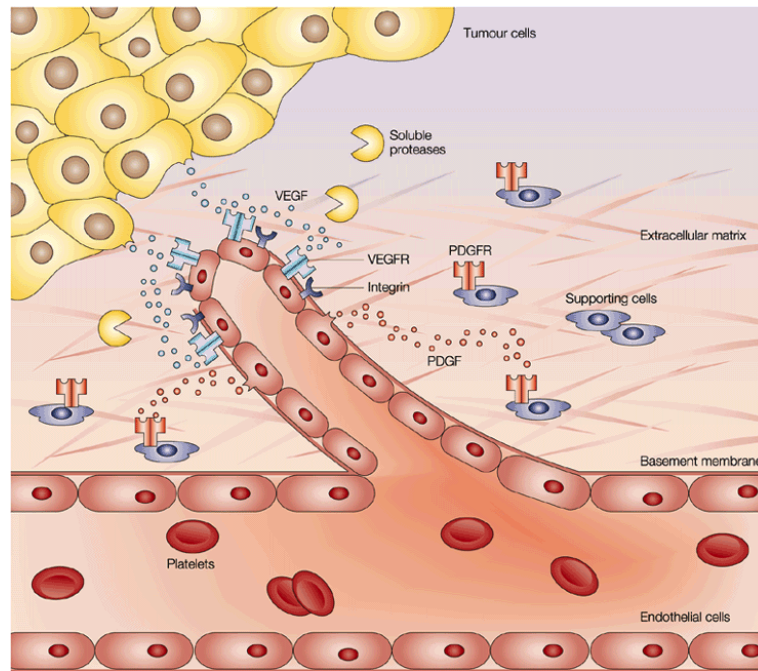


Figura 6. Angiogênese em células tumorais, em que se observa a acção dos factores de crescimento como o VEGF, e a acção determinante da matriz extracelular para permitir a envolvimento das células endoteliais às células tumorais, adaptado de ⁵⁵.

Na última fase de desenvolvimento dos tumores, estes invadem e metastisam novos tecidos, provocando então o cancro. Esta fase ocorre, geralmente, da seguinte forma⁵⁶:

1. Invasão local;
2. Extravasão para o sangue e para os vasos linfáticos;
3. Extravasão do lúmen dos vasos para o tecido parênquima dos tecidos distantes;
4. Formação de pequenas moléculas de células cancerígenas - micrometastases;
5. Crescimento das micrometastases.

Poderão ocorrer outras formas de invasão, que originarão diferentes tipos de tumores. No caso dos “tumores benignos”, que não apresentam esta fase, estes não são considerados cancerosos porque não conseguem metastisar novos tecidos, daí a sua diferente denominação.

Com base no que foi dito anteriormente, a elevada proliferação celular permite o surgimento das células tumorais, e mais tarde de tumores sólidos, que hoje em dia já são vistos como um órgão de elevada complexidade, com vários tipos de células que participam em interações entre elas, tendo um microambiente também ele complexo e essencial. Entre os diferentes tipos de células, estão presentes células estaminais tumorais (com capacidade para originar novos tumores), células tumorais, células endoteliais (essenciais para a vascularização), “*pericytes*” (suporte através de sinais parácrinos, factores de crescimento e apoio às células endoteliais), células imunitárias inflamatórias (promoção tumoral), e fibroblastos (promoção do fenótipo tumoral),

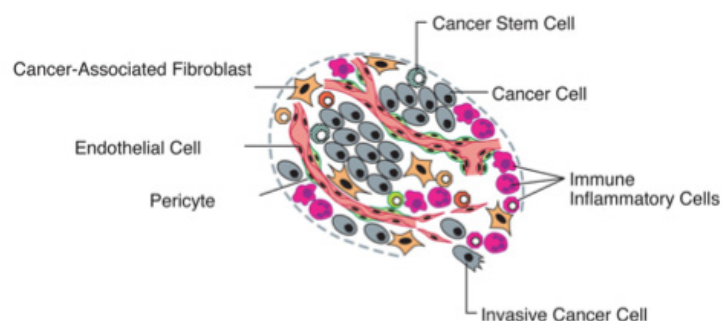


Figura 7. Microambiente de um tumor sólido, onde estão evidenciados os diversos tipos de células presentes num tumor, necessárias ao desenvolvimento deste, adaptado de ⁴⁸.

Após o que foi dito, a proliferação celular é um passo substancial para o início do desenvolvimento tumoral, mas os sinais excessivos de proliferação existentes ao longo de todo o desenvolvimento faz com que também sejam activos mecanismos de defesa celulares de controlo de proliferação, sendo necessário à célula tumoral adaptar-se a esses mecanismos, sendo estes:

1. Autofagia – consiste na quebra dos organelos celulares, que irão posteriormente ser reciclados para sínteses celulares e metabolismo energético. Este mecanismo é muito activo em situações de stress celular, como é o caso do cancro. Tal como a apoptose, são necessárias várias moléculas activadoras e inibidoras⁵⁷, e é na desregulação destas moléculas que as células tumorais actuam para conseguirem sobreviver e proliferar;
2. Necrose – consiste na morte celular por controlo genético, onde ocorre a ruptura dos organelos celulares para o ambiente circundante, o que permite o recrutamento de células inflamatórias do sistema imunitário⁵⁸, que têm como função eliminar todo o conteúdo necrótico, que não é incorporado em vesículas tal como acontece na apoptose. Uma das formas das células tumorais se defenderem é tornarem as células inflamatórias pro-tumorais;
3. Apoptose – consiste na morte celular programada essencial no desenvolvimento e na homeostasia celular. É controlada por diversas vias metabólicas de sinalização celular, mais precisamente por moléculas reguladoras como o Bcl-2, que activa e inactiva este processo consoante certos processos celulares (reparo do DNA, inibição da proteassoma, entre outros). Este processo inicia-se com a fragmentação nuclear, a incorporação dos fragmentos resultantes em corpos apópticos e finalmente a degradação destes⁵⁹. As células tumorais apresentam várias estratégias para inibirem a apoptose, principalmente através de controlo genético. É com base nesta “facilidade” de evasão das células tumorais que a apoptose é vista como o alvo mais promissor de combate à proliferação cancerígena⁶⁰.

A apoptose revela-se então um mecanismo celular de defesa que é altamente alterado pelas células tumorais, sendo mesmo constantemente inibida para que a

proliferação celular aumente. Diversos estudos têm sido feitos no sentido do “levantamento” desta inibição, e será este o mote da próxima secção.

1.4 Inibidores do Proteassoma

O proteassoma (26S) é uma estrutura multimérica catalítica de elevada massa molecular (perto de 20 000 Da), com três subunidades, duas 19S e uma 20S, em que esta última é o centro proteolítico⁶¹. A subunidade 20S é constituída por várias sub-subunidades β , sendo que a $\beta 1$ tem actividade de caspase, a $\beta 2$ actividade de tripsina e a $\beta 5$ actividade de quimiotripsina⁶². Esta estrutura está envolvida na degradação de proteínas marcadas com cauda poliubiquitinada, sendo fundamental para a manutenção da homeostasia celular, isto porque estas proteínas podem ter funções de controlo do ciclo celular, da proliferação celular e da apoptose (I κ B α , ciclinas, entre outras)⁶³. Muitas destas proteínas estão desreguladas em células tumorais (as proteínas com actividade anti-tumoral são inibidas e degradadas, e as proteínas com actividade pro-tumoral são estimuladas), o que faz com que o proteassoma tenha um maior nível de expressão⁶⁴, degradando um maior número de proteínas antitumorais.

Assim sendo, o proteassoma pode funcionar como um motor de proliferação ou de apoptose⁶⁵, tendo uma função determinante na proliferação das células tumorais⁶⁶. Vários estudos têm comprovado esta importância, com a utilização de vários tipos de inibidores do proteassoma que actuam em células tumorais mas não nas células não malignas, provocando a morte celular⁶⁷, isto porque o último tipo de células possui inibidores que actuam protegendo-as da activação precoce da apoptose⁶⁵. A inibição do proteassoma e da angiogénese são então possíveis estratégias de combate ao cancro⁶⁸. De entre os tipos de inibidores mais estudados encontram-se os complexos metálicos, em que o metal poderá ser cádmio⁶², gálio⁶⁹ ou cobre^{61,68}, sendo que este último é o mais estudado e o mais promissor no combate ao cancro.

O cobre (*Cu*) é um metal essencial para todos os organismos, com uma concentração ideal no organismo, que permite a sua função biológica, não sendo tóxico. Quando a concentração de cobre está acima da ideal, tem actividade tóxica, levando à perda de actividade de vários metaloenzimas, alterando propriedades de algumas proteínas⁷⁰ e provocando danos nas cadeias de DNA (possui uma grande afinidade para estas moléculas), através do aparecimento de espécies reactivas de O₂⁷¹. Estas desregulações podem originar doenças como a de Wilson ou o síndrome de Menkes, concluindo-se assim que o controlo da concentração de cobre é muito importante⁷². Para que exista este tipo de controlo, o cobre é internalizado celularmente por vias altamente desenvolvidas para esse efeito, mantendo assim a homeostasia celular de cobre, **Figura 8**.

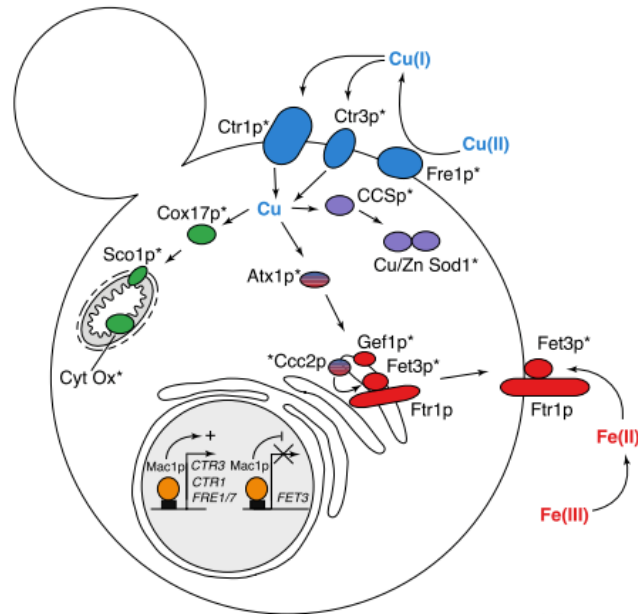


Figura 8. Modelo de homeostasia celular de incorporação de cobre em *Saccharomyces cerevisiae*, onde estão representadas as vias responsáveis por esta incorporação e onde está representada a ligação entre a incorporação de cobre e de ferro, adaptado de ⁷².

Quanto às funções biológicas, o *Cu* é um cofactor importante na angiogénese, já que induz o mRNA dos factores de crescimento (como o VEGF), promovendo o crescimento e proliferação celular⁷³, e é essencial nas reacções de oxidação e redução com moléculas de O_2 , como no complexo IV na cadeia respiratória⁷⁴. Tendo em conta as funções biológicas, é fácil concluir que a concentração de cobre está mais elevada em células tumorais, promovendo o seu crescimento e proliferação ao nível da angiogénese, sendo que já existem estudos que comprovam este aumento de concentração na ordem dos 50%⁷⁰. Para além desta função tumoral, *Cu* é também utilizado pelo proteassoma, (a relação com este complexo multienzimático ainda não está esclarecida⁷⁵), contribuindo também este factor para o aumento da concentração em células tumorais, (neste tipo de células, o proteassoma encontra-se muito expresso, tal como foi dito anteriormente).

Os complexos metálicos de cobre já estudados têm inibido a angiogénese em células tumorais e a subunidade $\beta 5$ com actividade de quimiotripsina do proteassoma^{61,68}, provocando a acumulação de proteínas poliubiquitinadas e mais tarde a morte celular, devido à desregulação proteica. Com base nestes estudos, foram também estudados diversos quelantes de *Cu*, como a 8-Hidroxiquinolina⁷⁵, o clioquinol⁷⁶ ou o ditiocarbamato de pirrolidina⁷³, que recrutavam o metal especificamente junto das células tumorais devido à maior concentração deste, e que provocavam a morte celular específica^{73,75,61}, sendo estes resultados bastante promissores no combate ao cancro.

1.5 Objectivo do trabalho

Tomando em consideração o que já foi apresentado, novas terapias de combate ao cancro têm sido essenciais no sentido de elucidar possíveis caminhos para identificação e tratamento de células tumorais cada vez mais eficazes. No presente trabalho foi proposta uma possível contribuição para este campo da ciência.

O objectivo do trabalho desenvolvido foi a síntese de complexos metálicos contendo *Eu* e *Tb* que possam funcionar como agentes quelantes específicos de *Cu* em células tumorais, tendo assim um dupla acção terapêutica, já que recrutam cobre e podem funcionar como biosondas fluorescentes com a presença de lantanídeos eficientes na emissão de luz, monitorizando a presença deste ião junto das células. O trabalho desenvolveu-se então com este objectivo, primeiro sintetizando complexos com os diferentes ligandos escolhidos capazes de recrutarem cobre junto das células tumorais, e depois sintetizando novos complexos com os ligandos e com cobre coordenado a estes. Estes complexos já com cobre são necessários porque nos ensaios *in vitro*, as linhas celulares tumorais já se encontram desenvolvidas, não necessitando de recrutar *Cu* para o seu desenvolvimento, permitindo assim estudar os efeitos que estes terão intracelularmente na inibição da proliferação e possível apoptose celular. Todos os complexos foram caracterizados com diversas técnicas analíticas, e depois testados em linhas celulares tumorais como *HeLa* (cancro cervical) e *A549* (cancro do pulmão), observando-se e concluindo-se acerca das propriedades destes.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais e Instrumentação

Os reagentes químicos disponíveis comercialmente foram todos adquiridos nos fornecedores habituais, sem necessidade de purificação extra. Os solventes foram secos sob atmosfera de azoto utilizando os procedimentos habituais, sendo que o Etanol (EtOH) foi destilado sob CaO. Todos os complexos foram sintetizados em atmosfera de azoto, utilizando técnicas de linha de vácuo/azoto e de *schlenk*.

Para a síntese dos diferentes complexos de *Eu* e *Tb*⁷⁷, foram escolhidos quatro ligandos diferentes que têm como função o recrutamento de *Cu*, sendo eles o ácido isonicotínico (L1), o ácido naftaleno 1,5-dicarboxílico (L2), o *trans*-1,2-di-(4-piridil)-etileno (L3) e a 4,4'-*bpy* (L4), **Figura 9**; foi também escolhida uma molécula orgânica que promove o efeito antena necessário à excitação do metal, tal como explicado anteriormente, a 2,2'-*bpy*²⁴, **Figura 10**.

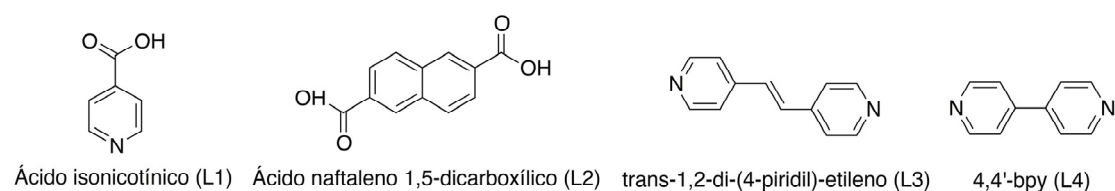


Figura 9. Estruturas moleculares dos diferentes ligandos utilizados na síntese dos complexos de *Eu* e *Tb*.

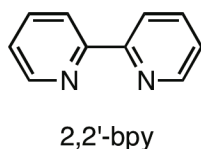


Figura 10. Estrutura molecular da molécula orgânica escolhida para promover o efeito antena no lantanídeo utilizado.

É com base nos ligandos utilizados que se fez a classificação de complexos do tipo I e complexos do tipo II. Complexos do tipo I são aqueles que possuem os ligandos que se coordenam como bidentados, neste caso, L1 e L2. Complexos do tipo II são compostos pelos ligandos que se coordenam como monodentados com o Ln utilizado, L3 e L4. Todos os complexos foram novamente sintetizados mas com a incorporação de *Cu* coordenado ao ligando utilizado⁶¹, tal como foi explicitado no objectivo do trabalho, secção 1.5.

A caracterização dos complexos sintetizados com recurso às espectroscopias de Raman e de Fluorescência foi realizada no Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO), Universidade de Aveiro, sendo que as restantes técnicas utilizadas foram realizadas no Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Todos os equipamentos utilizados estão descritos nas respectivas secções.

2.2 Síntese dos Complexos de Eu

2.2.1 Complexos do Tipo I (C1-C4)

2.2.1.1 Complexos 1 e 2 (C1, C2)

Dissolveu-se em EtOH (10 mL), 1.0×10^{-3} mol de L1/L2 (123.14 mg, 216.19 mg, respectivamente), e adicionou-se 500 μ L de NaOH 2M (1.0×10^{-3} mol), deixando a reagir à T_{amb} durante 30 minutos. Adicionou-se gota a gota uma solução de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (366.41 mg, 1.0×10^{-3} mol) em EtOH (10 mL), e deixou-se a reagir durante 30 minutos a 50 °C. Após este tempo, adicionou-se gota a gota uma solução de 2,2'-bpy (156.19 mg, 1.0×10^{-3} mol) em EtOH (10 mL), e deixou-se a reagir durante a noite a 50 °C. Por fim, a solução final foi seca a vácuo e o produto final foi obtido em pó.

Complexo 1 (C1) – Complexo de Eu + 2,2'-bpy + L1

Produto final em pó de cor branca.

Rendimento (η): 100 % (529.1 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3400 (FF), 3221 (F), 2015 (f), 1615 (f), 1395 (m), 1077 (f), 607 (f)

Complexo 2 (C2) – Complexo de Eu + 2,2'-bpy + L2

Produto final em pó de cor branca, com tons de rosa suave.

Rendimento (η): 100 % (629.3 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3415 (FF), 1625 (F), 1398 (m), 1258 (f), 1084 (f), 792 (m)

2.2.1.2 Complexos 3 e 4 (C3, C4)

Dissolveu-se 1.0×10^{-4} mol de C1/C2 (53.8 mg, 63.1 mg, respectivamente) em EtOH (10 mL), e adicionou-se à reacção uma solução de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17 mg, 1.0×10^{-4} mol) em EtOH (10 mL), gota a gota, deixando-se a reagir durante a noite a 50 °C. A solução final foi seca a vácuo e o produto final foi obtido em pó.

Complexo 3 (C3) – Complexo de Eu + 2,2'-bpy + L1 + Cu

Produto final em pó de cor azul esverdeado.

Rendimento (η): 65.44 % (45.2 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3539 (F), 3434 (FF), 3400 (FF), 3220 (F), 2023 (f), 1616 (F), 1400 (F), 1091 (m), 608 (F)

Complexo 4 (C4) – Complexo de Eu + 2,2'-bpy + L2 + Cu

Produto final em pó de cor azul esverdeado.

Rendimento (η): 70.52 % (54.0 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3511 (F), 3434 (FF), 3407 (FF), 3220 (F), 2001 (f), 1617 (F), 1400 (F), 1300 (m), 1087 (m), 790 (m), 603 (f)

2.2.2 Complexos do Tipo II (C5-C8)

2.2.1.1 Complexos 5 e 6 (C5, C6)

Dissolveu-se 156.19 mg de 2,2'-bpy (1.0×10^{-3} mol) em EtOH (10 mL), e adicionou-se à solução gota a gota uma solução de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (366.41 mg, 1.0×10^{-3} mol) em EtOH (10 mL), deixando-se a reagir a 50 °C durante 2 h. Adicionou-se depois à reacção uma solução do L3 (182.23 mg, 1.0×10^{-3} mol) em EtOH (10 mL), isto gota a gota, e deixou-se reagir durante a noite a 50 °C. Por fim, a solução obtida foi seca a vácuo e o produto final foi obtido em pó.

Complexo 5 (C5) – Complexo de Eu + 2,2'-bpy + L3

Produto final em pó de cor branca.

Rendimento (η): 100 % (623.0 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3400 (FF), 3180 (FF), 2015 (f); 1608 (F), 1400 (F), 1013 (m), 831 (m), 762 (F), 609 (F)

Complexo 6 (C6) – Complexo de Eu + 2,2'-bpy + L4

Produto final em pó de cor branca.

Rendimento (η): 83.00 % (504.6 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3644 (FF), 3212 (FF), 2015 (f), 1595 (F), 1437 (F), 1011 (m), 811 (F), 762 (m)

2.2.1.2 Complexos 7 e 8 (C7, C8)

Dissolveu-se 1.0×10^{-4} mol de C5/C6 (63.4 mg, 60.8 mg, respectivamente) em EtOH (10 mL), e adicionou-se à reacção uma solução de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17 mg, 1.0×10^{-4} mol) em EtOH (10 mL), gota a gota, deixando-se a reagir durante a noite a 50 °C. A solução final foi seca a vácuo e o produto final foi obtido em pó.

Complexo 7 (C7) – Complexo de Eu + 2,2'-bpy + L3 + Cu

Produto final em pó de cor azul esverdeada.

Rendimento (η): 75.68 % (59.5 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3519 (F), 3435 (FF), 3406 (FF), 3121 (FF), 1616 (m), 1400 (FF), 1100 (f)

Complexo 8 (C8) – Complexo de Eu + 2,2'-bpy + L4 + Cu

Produto final em pó de cor azul esverdeado.

Rendimento (η): 45 % (34.2 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3410 (FF), 3220 (m), 2009 (f), 1617 (m), 1400 (m), 1092 (f)

2.3 Síntese dos Complexos de Tb

2.3.1 Complexos do Tipo I (C9-C12)

2.2.1.1 Complexos 9 e 10 (C9, C10)

Dissolveu-se em EtOH (10 mL), 1.0×10^{-3} mol de L1/L2 (123.14 mg, 216.19 mg, respectivamente), e adicionou-se 500 μ L de NaOH 2M (1.0×10^{-3} mol), deixando a reagir à T_{amb} durante 30 minutos. Adicionou-se gota a gota uma solução de $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ (374.38 mg, 1.0×10^{-3} mol) em EtOH (10 mL), e deixou-se a reagir durante 30 minutos a 50 °C. Após este tempo, adicionou-se gota a gota uma solução de 2,2'-bpy (156.19 mg, 1.0×10^{-3} mol) em EtOH (10 mL), e deixou-se a reagir durante a noite a 50 °C. Por fim, a solução final foi seca a vácuo e o produto final foi obtido em pó.

Complexo 9 (C9) – Complexo de Tb + 2,2'-bpy + L1

Produto final em pó de cor branca.

Rendimento (η): 100 % (541.2 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3400 (FF), 3207 (F), 2000 (f), 1614 (m), 1545 (m), 1400 (F), 1165 (f), 1010 (f), 762 (m), 610 (m)

Complexo 10 (C10) – Complexo de Tb + 2,2'-bpy + L2

Produto final em pó de cor branco rosado.

Rendimento (η): 100 % (637.4 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3373 (F), 3142 (F), 1549 (F), 1402 (FF), 1193 (m), 917 (f), 756 (m), 616 (f)

2.2.1.2 Complexos 11 e 12 (C11, C12)

Dissolveu-se 1.0×10^{-4} mol de C9/C10 (54.5 mg, 63.8 mg, respectivamente) em EtOH (10 mL), e adicionou-se à reacção uma solução de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (17 mg, 1.0×10^{-4} mol) em EtOH (10 mL), gota a gota, deixando-se a reagir durante a noite a 50 °C. A solução final foi seca a vácuo e o produto final foi obtido em pó.

Complexo 11 (C11) – Complexo de Tb + 2,2'-bpy + L1 + Cu

Produto final em pó de cor verde com tons de azul marinho.

Rendimento (η): 69.00 % (48.1 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3523 (m), 3443 (F), 3407 (FF), 3216.68 (F), 1592 (F), 1543 (F), 1413 (FF), 1316 (f), 1157 (f), 1010 (f), 774 (F), 680 (m)

Complexo 12 (C12) – Complexo de Tb + 2,2'-bpy + L2 + Cu

Produto final em pó de cor verde com tons de azul marinho.

Rendimento (η): 87.87 % (67.9 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3522 (m), 3432 (F), 3400 (F), 3124 (F), 1557 (F), 1545 (F), 1400 (FF), 1157 (m), 1025 (m), 908 (f), 775 (F), 620 (f)

2.3.2 Complexos do Tipo II (C13-C16)

2.2.1.1 Complexos 13 e 14 (C13, C14)

Dissolveu-se 156.19 mg de 2,2'-bpy (1.0×10^{-3} mol) em EtOH (10 mL), e adicionou-se à solução gota a gota uma solução de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (373.38 mg, 1.0×10^{-3} mol) em EtOH (10 mL), deixando-se a reagir a 50 °C durante 2 h. Adicionou-se depois à reacção uma solução do L3 (182.23 mg, 1.0×10^{-3} mol) em EtOH (10 mL), isto gota a gota, e deixou-se reagir durante a noite a 50 °C. Por fim, a solução obtida foi seca a vácuo e o produto final foi obtido em pó.

Complexo 13 (C13) – Complexo de Tb + 2,2'-bpy + L3

Produto final em pó de cor branca.

Rendimento (η): 97.45 % (624.4 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3367 (F), 3124 (FF), 1937 (f), 1600 (F), 1400 (FF), 1011 (m), 830 (m), 761 (F), 586 (m)

Complexo 14 (C14) – Complexo de Tb + 2,2'-bpy + L4

Produto final em pó de cor branca.

Rendimento (η): 96.65 % (594.1 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3374 (m), 3118 (FF), 1592 (f), 1400 (FF), 1095 (m), 778 (f), 609 (f)

2.2.1.2 Complexos 15 e 16 (C15, C16)

Dissolveu-se 1.0×10^{-4} mol de C13/C14 (64.1 mg, 61.5 mg, respectivamente) em EtOH (10 mL), e adicionou-se à reacção uma solução de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17 mg, 1.0×10^{-4} mol) em EtOH (10 mL), gota a gota, deixando-se a reagir durante a noite a 50 °C. A solução final foi seca a vácuo e o produto final foi obtido em pó.

Complexo 15 (C15) – Complexo de Tb + 2,2'-bpy + L3 + Cu

Produto final em pó de cor verde com tons de azul marinho.

Rendimento (η): 64.17 % (50.9 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3523 (m), 3446 (F), 3406 (FF), 3124 (FF), 1611 (FF), 1400 (FF), 1028 (m), 832 (m), 770 (m), 586 (f)

Complexo 16 (C16) – Complexo de Tb + 2,2'-bpy + L4 + Cu

Produto final em pó de cor verde com tons de azul marinho.

Rendimento (η): 67.65 % (51.9 mg)

Bandas de IV (cm^{-1}): 3523 (m), 3435 (F), 3408 (FF), 3214 (m), 1616 (m), 1400 (m), 1010 (f), 781 (f), 769 (f), 610 (f)

2.4 Técnicas de Caracterização dos Complexos

Do vasto leque de técnicas espectroscópicas ao serviço da comunidade científica, algumas delas podem ser bastante elucidativas para o estudo das diversas ligações químicas. A técnica que mais contribui para o estudo destas interações é a espectroscopia vibracional (Raman e IV), enquanto que a espectroscopia de absorção no UV/Vis e de fluorescência contribuem mais para a caracterização das propriedades espectroscópicas. Seguidamente, são feitas algumas considerações sobre todas estas técnicas, não sendo descritos os respectivos fundamentos, os quais estão fora do âmbito desta dissertação, podendo ser consultados em obras da especialidade⁷⁸⁻⁸¹.

2.4.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier consiste na excitação por parte de uma fonte de radiação média-infravermelha dos níveis vibracionais fundamentais das moléculas em análise e na aquisição do espectro aquando do relaxamento energético, tendo como objectivo estudar a estrutura das mesmas⁸².

Os espectros de FTIR foram obtidos para todos os complexos sintetizados num espectrómetro *Nicolet 6700 da Thermo Scientific*, com uma resolução de 2 cm^{-1} , entre 400 e 4000 cm^{-1} . As amostras foram preparadas em pastilha de KBr, numa proporção de 3% de amostra e KBr, segundo os métodos analíticos tradicionais.

2.4.2 Espectroscopia de Raman

O efeito de Raman consiste na excitação da molécula em estudo por parte de um fóton, do estado fundamental para um estado energético imaginário. A aquisição do espectro é feita através da análise da energia dos fótons difundidos por colisão inelástica após a excitação da molécula. Esta técnica tem também como objectivo interpretar os níveis vibracionais das moléculas, dando informação acerca da estrutura das mesmas, sendo complementar ao FTIR⁸³.

Os espectros de Raman foram obtidos na região de 150 a 4000 cm^{-1} , com 2 cm^{-1} de resolução, à T_{amb} , num espectrómetro *Bruker RFS-100*, equipado com um laser díodo de Nd:YAG com emissão a 1064 nm e um detector *InGaAs*.

2.4.3 Espectroscopia de UV/Vis

A espectroscopia de Ultravioleta/Visível (UV/Vis) tem como princípio a absorção de energia por parte de uma molécula, o que permitirá transições electrónicas entre os diferentes níveis energéticos das orbitais. Esta absorção é analisada em termos de frequência, ou mais correntemente, em termos de comprimento de onda. O espectro de absorção permite-nos concluir onde é que essa absorção ocorre com maior intensidade.

Os ensaios de espectroscopia de UV/Vis foram todos realizados num espectrofotómetro *Shimadzu UV2450* com lâmpadas de excitação de Deutério e

Tungstênio, à T_{amb} , entre 200 e 700 nm, numa célula de quartzo de 1 cm e utilizando como solvente e como referência H_2O desionizada.

2.4.3.1 Ensaio em solução

Os ensaios de UV/Vis realizados em solução foram obtidos no sentido de elucidar a que comprimento de onda era máxima a absorção de luz por parte do complexo analisado, bem como dos ligandos escolhidos, com uma concentração de 1.3×10^{-5} M.

2.4.3.2 Titulação de Cu

Os ensaios de titulação de Cu foram realizados nas mesmas condições acima descrita, excepto em termos de concentração. Os complexos (100 μ M) foram analisados em soluções de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ com concentrações crescentes sucessivas, sendo estas 1, 5, 10, 25 e 50 μ M.

2.4.4 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de Fluorescência permite analisar a capacidade de uma molécula emitir luz após excitação da mesma com um determinado comprimento de onda, e determinar a que comprimento de onda a emissão é mais forte⁵.

Os ensaios de espectroscopia de Fluorescência em solução foram realizados num leitor de microplacas de Fluorescência *Spectra MAX Gemini EM, Molecular Devices*, a 37 °C e utilizando como solvente e como branco H_2O desionizada. Os complexos tinham uma concentração final de 2.0×10^{-20} M, e os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) utilizados foram 265, 271, 295, e 312 nm. Os espectros de fluorescência em solução de metanol foram realizados num *Fluorolog-3 Model FL3-2T* com dupla excitação, à temperatura ambiente. A fonte de excitação foi uma lâmpada de Xénon a 450 W, e os λ_{exc} utilizados foram 282 e 300 nm.

2.5 Cultura celular e Ensaio citotóxicos *in vitro*

Nos estudos de citotoxicidade dos complexos sintetizados, foram utilizadas duas linhas celulares, *HeLa* (adenocarcinoma cervical) e *A549* (adenocarcinoma alveolar). Células *HeLa* foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, sem L-glutamina), as células *A549* foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, com 4.5 g.L⁻¹ de Glucose e sem L-glutamina). Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (FBS), 1% de penicilina e estreptomicina (200 U.mL⁻¹) e 1% de L-glutamina (2 mM). O FBS contém nutrientes, factores de crescimento adicionais e inibidores de tripsina que promovem o crescimento celular. Ambos os meios possuem também um indicador de pH, vermelho de fenol, que altera a sua cor consoante a acidez ou basicidade do meio, para amarelo ou vermelho, respectivamente. Quando a cor do meio é amarela, o que revela um meio ácido, a maior parte dos nutrientes já foi

consumida pelas células, e a oxigenação não é suficiente, o que indica que é necessária uma mudança de meio de cultura.

As culturas celulares foram mantidas numa incubadora de cultura celular a 37 °C, numa atmosfera humidificada de 95% de atmosfera normal/5% de CO₂ (*Shellab CO₂ Series Sheldon Mfg. Inc.*). Os ensaios celulares foram realizados numa câmara de fluxo laminar (*ESCO Class II Biohazard Safety Cabinet*) em condições de esterilidade, tal como todos os materiais utilizados na cultura celular.

2.5.1 Criopreservação e ressuspensão de células criopreservadas

As células foram retiradas do meio de cultura e centrifugadas a 900 g durante 10 minutos, com ressuspensão do *pellet* numa solução de 90% FBS / 10% DMSO, e colocadas em frascos criogénicos (2.0×10^6 cél.mL⁻¹). O DMSO é um agente crioprotectivo utilizado para baixar o ponto de fusão das alíquotas e prevenir a formação de cristais de gelo no interior das células criopreservadas, o que poderia levar à inviabilidade celular. Após este procedimento, os frascos criogénicos foram mantidos num recipiente de criopreservação (*Mr. Frosty*), preenchido com isopropanol, que permite às células criopreservadas arrefecerem 1 °C /minuto, desde a T_{amb} até -80 °C. Finalmente, os frascos foram armazenados num reservatório de azoto líquido.

Quando as células criopreservadas foram necessárias, estas podem ser “ressuscitadas”. Para isso, após retirar o frasco criogénico do reservatório de azoto líquido, estas foram aquecidas a 37 °C durante 1 a 2 minutos. A suspensão celular foi então transferida para um frasco de cultura que contém meio suplementado pré-aquecido e incubado a 37 °C, 95% atmosfera normal/ 5% CO₂.

2.5.2 Cultura e quantificação celular

As células encontram-se em crescimento em frascos de cultura com o meio correspondente. Quando o crescimento celular é confluyente (ocupação de 80% a 90% do frasco), é necessário adicionar tripsina, um enzima proteolítico que permite desprender as células, umas das outras e do frasco, através da quebra de ligações peptídicas (tripsinização). A ocupação do fundo do frasco por parte das células nunca ultrapassou o limite de confluência (80-90%), isto porque quando tal acontece as células deixam de se dividir, param de crescer (senescência) e acabam por morrer. Para este procedimento, o meio de cultura foi removido do frasco de cultura, as células foram lavadas com tampão salino de fosfatos (PBS 1x, pH 7.4), a tripsina foi adicionada e o frasco incubado a 37 °C durante 5 minutos. Após a tripsinização, PBS foi adicionado novamente à suspensão celular, retirando-se por fim fracções que eram colocadas em novos frascos de cultura com meio de cultura suplementado.

Para que os resultados sejam reprodutíveis, e para que se tenha um crescimento celular óptimo, é importante que se tenha uma densidade celular apropriada. O método mais comum de quantificação de células envolve o uso do hemocítmetro, uma lâmina engrossada que possui uma grelha de 9 quadrados que têm no seu interior mais 16 quadrados visíveis ao microscópio óptico. Cada quadrado

maior tem de dimensões 1 mm x 1 mm, com uma profundidade de 0.1 mm, o que perfaz um volume de 0.1 mm³ (10⁻⁴ cm³ ou mL). Para calcular o número total de células em solução por mL, é necessário contar o número de células em cada quadrado maior e multiplicar o valor obtido pelo factor de conversão do volume atrás referido (10⁴).

2.5.3 Actividade citotóxica in vitro utilizando ensaio colorimétrico

Para determinação da viabilidade celular após exposição aos complexos sintetizados, foi utilizado um ensaio colorimétrico: MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). MTT é uma molécula de cor amarela que pode ser reduzida por um redutase mitocondrial em cristais roxos, somente em células viáveis⁸⁴. Após quantificação celular, 5×10⁵ células foram crescidas em microplacas de 96 poços e incubadas durante 48 h a 37 °C numa atmosfera humidificada de 5% CO₂/95% ar atmosférico. Após este período, o meio foi retirado, as células foram tratadas com 8 concentrações diferentes dos complexos (10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µM) dissolvidos anteriormente em meio de cultura suplementado, e incubadas durante 48 h nas mesmas condições anteriores. Os poços controlo continham apenas meio suplementado, **Figura 11**.

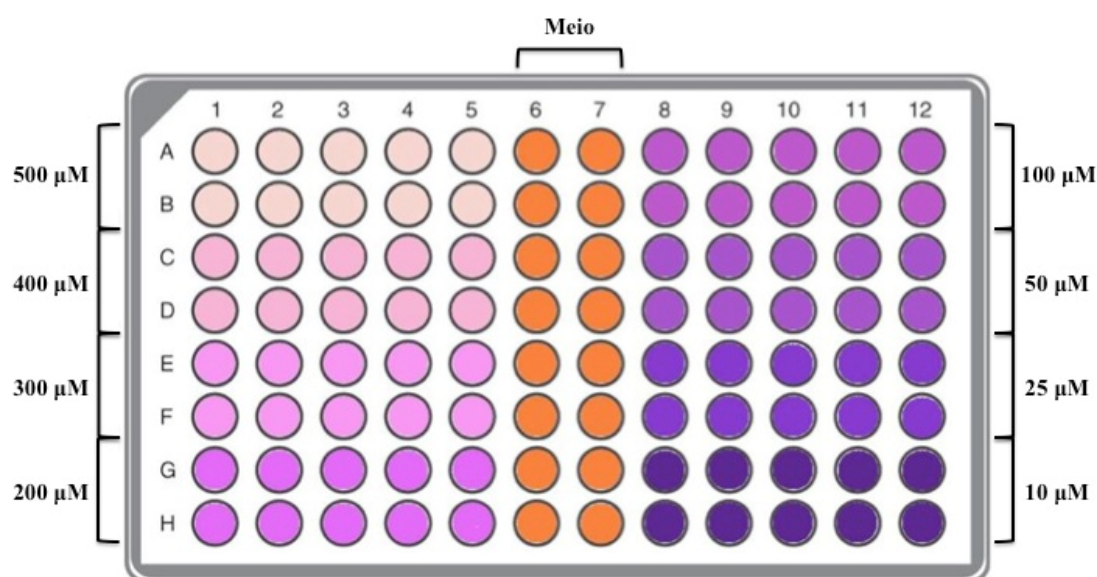


Figura 11. Esquema representativo da distribuição de concentrações (10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µM) e brancos numa microplaca de 96 de poços para estudos de citotoxicidade celular. O gradiente de cores está de acordo com o esperado após introdução de MTT, exceptuando os poços controlo, adaptado de ⁸⁵.

Após as 48 h de incubação, o meio foi removido, foram adicionados 100 µL de uma solução de MTT (0.5 mg.mL⁻¹ dissolvido em meio suplementado) a cada poço da microplaca, sendo depois esta incubada durante 2 h a 37 °C numa atmosfera humidificada de 5% CO₂/95% ar atmosférico. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de DMSO para dissolver os cristais roxos, que não são solúveis em meio aquoso.

A absorvência foi depois medida a 570 nm usando um leitor de microplacas de 96 poços (*Tecan Sunrise Absorbance Reader*). Existe uma correlação directa entre absorvência e viabilidade celular. Assumindo que os poços somente com meio suplementado correspondem a 100% de viabilidade celular (células metabolicamente activas), a viabilidade celular para cada concentração de composto é calculada com base na razão entre a absorvência para cada concentração e absorvência dos poços controlo. Cada experiência possui 10 replicados para cada concentração de composto utilizada. Os valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50% do crescimento) foram determinados com recurso a ajustes de regressões não lineares, através do software *Prism™ GraphPad*.

2.5.4 Espectroscopia de Fluorescência em meio celular

Para os estudos de espectroscopia de fluorescência em meio celular, as células foram tratadas e incubadas em microplacas de 96 poços tal como foi descrito anteriormente, tendo-se utilizado apenas uma das linhas celulares (HeLa). Aplicaram-se os compostos com uma concentração final de 50 µM e incubaram-se as microplacas durante 2 horas a 37 °C numa atmosfera humidificada de 5% CO₂/95% ar atmosférico. Após o tempo de incubação, os compostos foram retirados e as células foram lavadas com PBS (1x, pH 7.4). Os ensaios de espectroscopia de Fluorescência foram realizados num leitor de microplacas de Fluorescência *Spectra MAX Gemini EM, Molecular Devices*, a 37 °C, com uma concentração de 50 µM e utilizando como branco os poços apenas com meio suplementado, e tendo-se excitado aos comprimentos de onda de 265, 271, 295 e 312 nm.

3. Resultados

3.1 Síntese e caracterização dos Complexos (C1-C16)

A síntese dos diferentes complexos de *Eu* e *Tb* com o objectivo final descrito na secção 1.5, foi realizado por um processo de síntese já descrito⁷⁷, em que se utilizou quatro ligandos diferentes (L1 a L4) e uma molécula orgânica como *antena* (2,2'-*bpy*). Consoante o tipo de coordenação do ligando ao metal, bidentado para L1 e L2 e monodentado para L3 e L4 (complexos do tipo I e do tipo II, respectivamente), utilizaram-se dois processos de síntese diferentes, **Figuras 12 e 13**.

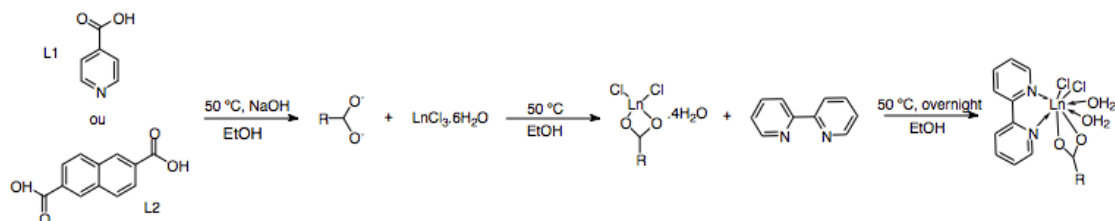


Figura 12. Processo de síntese dos complexos do tipo I, em que os ligandos se coordenam de forma bidentada (L1 e L2), pertencendo a este grupo de complexos **C1**, **C2** em que o *Ln* utilizado é *Eu*, e **C9** e **C10** em que o *Ln* utilizado é *Tb*.

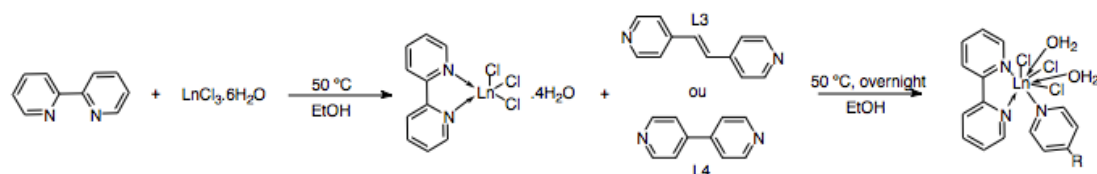
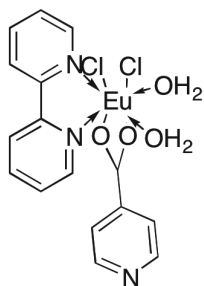


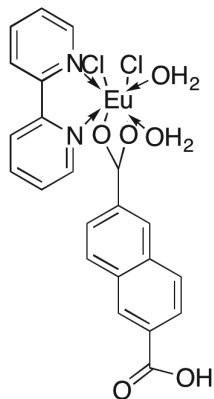
Figura 13. Processo de síntese dos complexos do tipo II, em que os ligandos se coordenam de forma monodentada (L3 e L4), pertencendo a este grupo de complexos **C5**, **C6** em que o *Ln* utilizado é *Eu*, e **C13** e **C14** em que o *Ln* utilizado é *Tb*.

Após a síntese dos complexos com os respectivos ligandos, foram ainda sintetizados os complexos em que o ligando se encontrava coordenado também a *Cu*, para além do *Ln* utilizado. Este método de síntese apenas difere dos representados nas figuras acima no último passo, em que se adiciona $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de forma a coordenar *Cu* ao ligando utilizado (**C3**, **C4**, **C7**, **C8**, **C11**, **C12**, **C15** e **C16**). A estrutura dos complexos sintetizados encontra-se representada na **Figura 14** para aqueles em que o metal é *Eu*, e na **Figura 15** para os que têm como metal *Tb*. Para confirmar a síntese dos complexos descritos e representados nas seguintes figuras, procedeu-se à sua caracterização por diversas técnicas de análise. Os resultados obtidos estão descritos e analisados nas seguintes secções.

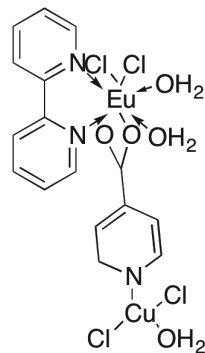
Complexos do tipo I



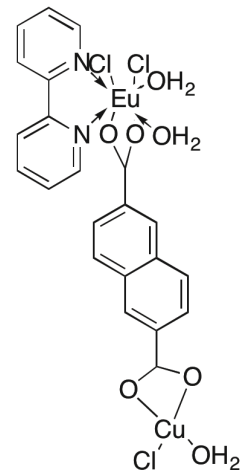
C1



C2

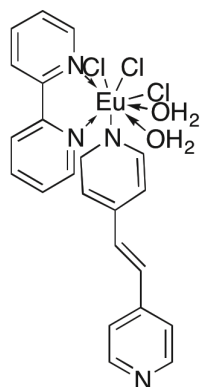


C3

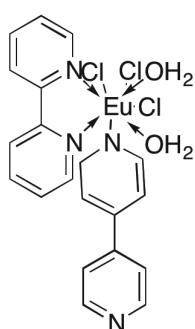


C4

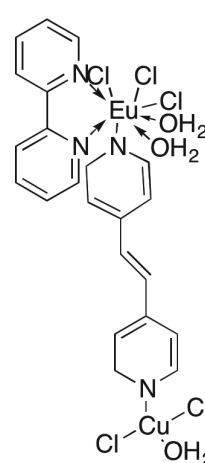
Complexos do tipo II



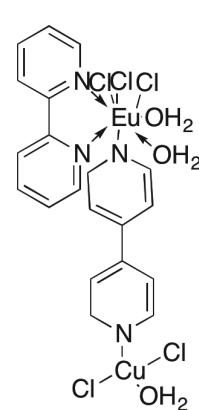
C5



C6



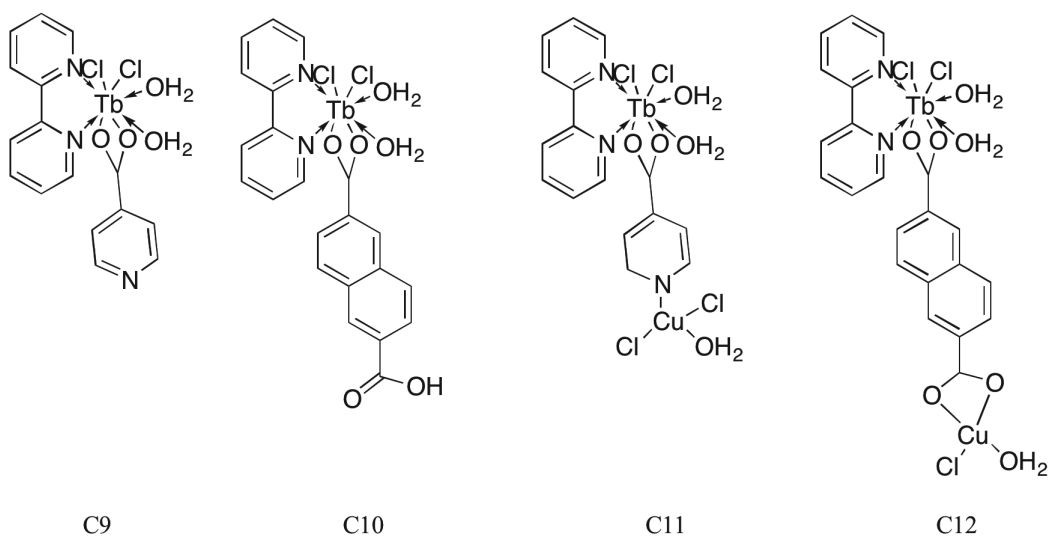
C7



C8

Figura 14. Representação da estrutura molecular dos vários tipos de complexos em que o *Ln* utilizado foi *Eu*, estando diferenciados os complexos do tipo I e II, (ligando bidentado e monodentado, respectivamente).

Complexos do tipo I



Complexos do tipo II

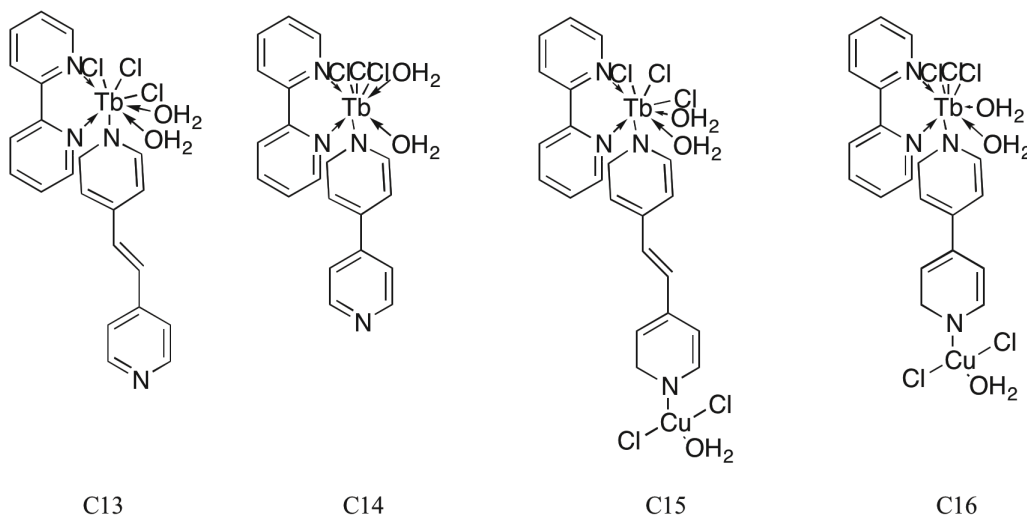


Figura 15. Representação da estrutura molecular dos vários tipos de complexos em que o Ln utilizado foi Tb, estando diferenciados os complexos do tipo I e II, (ligando bidentado e monodentado, respectivamente).

3.1.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de FTIR foram obtidos para os diferentes complexos (C1-C16) para caracterização da estrutura molecular dos mesmos, consoante as bandas vibracionais características dos grupos químicos presentes nos complexos. Tendo em atenção a estrutura molecular presente nas figuras acima, existem vários modos de vibração que irão estar representados nos espectros de todos os complexos, como C=N e C_{Carom.} ($\nu_{C=N}$ e $\nu_{C_{Carom.}}$, respectivamente), e alguns modos de vibração que estarão presentes consoante o ligando que se encontra coordenado ao metal, como C=O e O-H ($\nu_{C=O}$ e ν_{O-H} , respectivamente). Os espectros obtidos para os diferentes complexos estão representados nas **Figuras 16 e 17**.

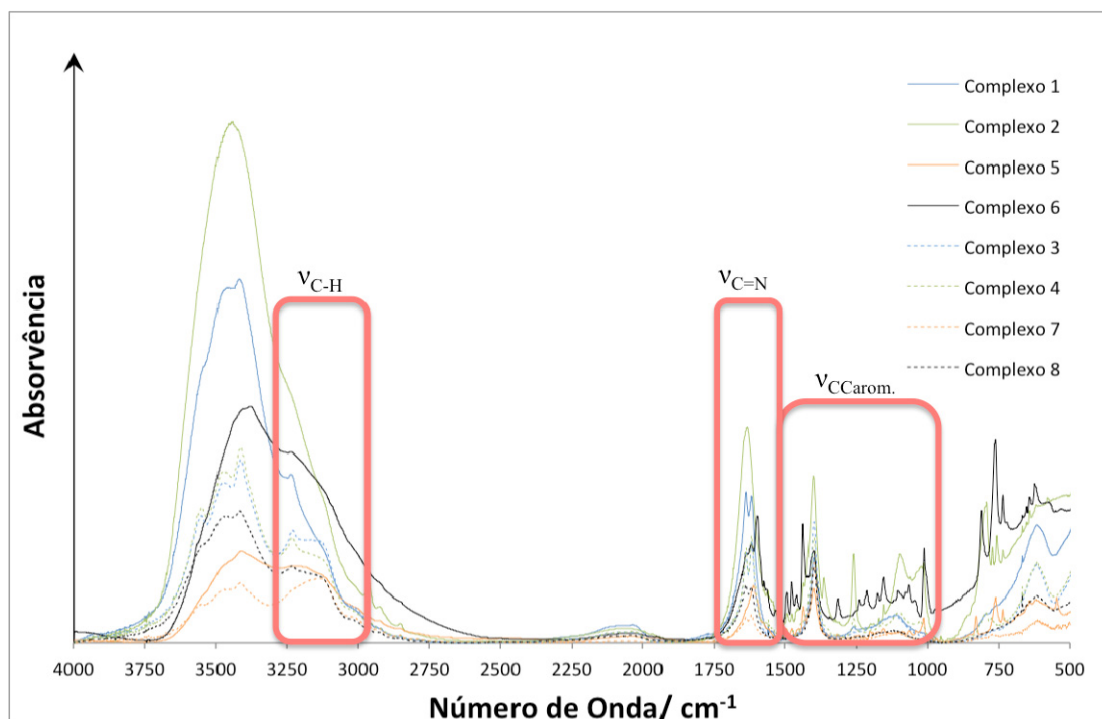


Figura 16. Espectros de FTIR dos diferentes complexos de *Eu*, sendo que os complexos com os mesmos ligandos já coordenados a *Cu* encontram-se também representados a tracejado.

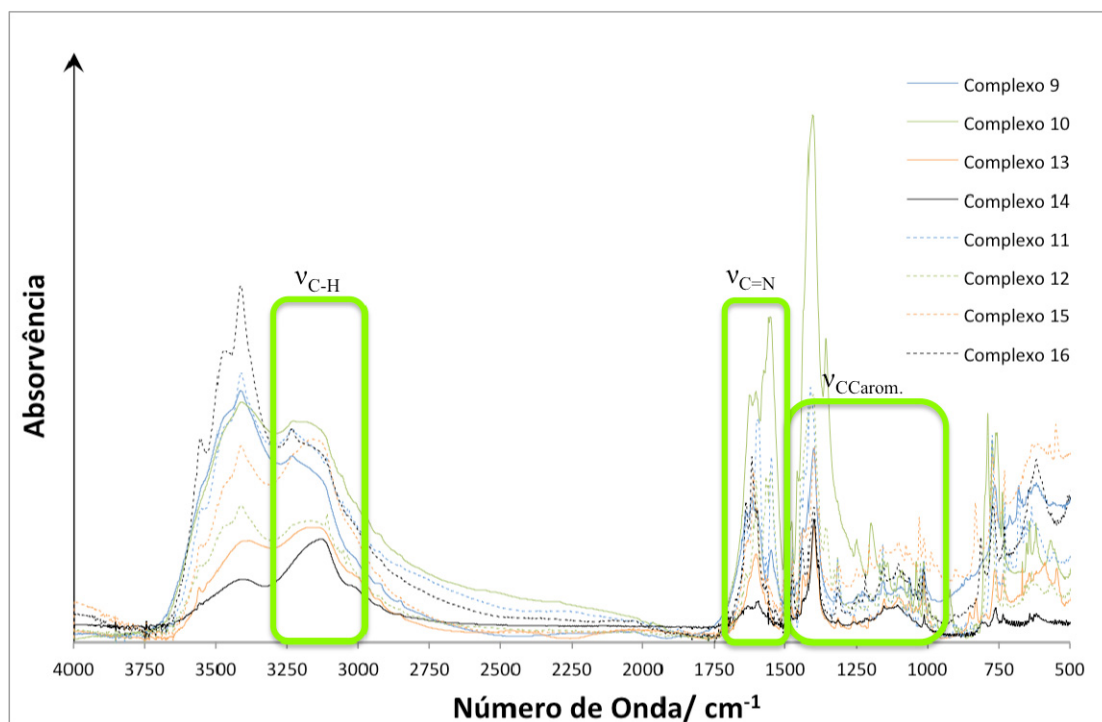


Figura 17. Espectros de FTIR dos diferentes complexos de *Tb*, sendo que os complexos com os mesmos ligandos já coordenados a *Cu* encontram-se também representados a tracejado.

Nas figuras acima encontram-se destacados os modos de vibração que são comuns a todos os complexos representados na mesma. Ao observar estes gráficos, quer nos complexos com *Eu* como com *Tb*, por volta dos 3100 cm^{-1} identifica-se o modo de vibração das ligações C-H dos aromáticos ($v_{\text{C-H}}$), presente nos diferentes

ligandos e na *antena* (2,2'-*bpy*). O mesmo se aplica para a banda que se encontra a cerca dos 1600 cm⁻¹, confirmando a presença do modo de vibração da ligação C=N ($\nu_{C=N}$), que tem origem em alguns ligandos (L1, L3 e L4) e na 2,2'-*bpy*. Em alguns complexos, como C1-C4 e C9-C12, esta banda está convoluída com o modo de vibração dos carboxilatos ($\nu_{C=O}$), tal como será explicitado mais à frente. Por último, as bandas correspondentes ao modo de vibração da ligação CC em aromáticos ($\nu_{CCarom.}$) têm origem tanto nos ligandos como na *antena*, e encontram-se entre 1600 e 1000 cm⁻¹.

Relativamente aos modos de vibração específicos dos diferentes tipos de complexos (tipo I e tipo II), nos complexos do tipo I encontram-se presentes os modos de vibração das ligações C=O ($\nu_{C=O}$), entre os 1800 e 1600 cm⁻¹, da ligação C-O (ν_{C-O}), entre os 1320 e 1000 cm⁻¹, e da ligação O-H (ν_{O-H}), entre os 3600 e 3000 cm⁻¹. Estes modos de vibração estão presentes devido aos grupos carboxilo dos ligandos (L1 e L2). Ainda nos complexos com L1, observa-se vários modos de vibração fracos das ligações C-H (δ_{C-H}), entre os 1350 e 1250 cm⁻¹, devendo-se aos anéis aromáticos do ligando. Quanto aos complexos do tipo II, apenas se encontram os modos de vibração das ligações C=C ($\nu_{C=C}$), entre 1900 e 1500 cm⁻¹, e C-H (δ_{C-H}). O primeiro só está presente nos complexos coordenados com o L3, e tem origem na ponte alquilo que liga ambas as iminas aromáticas. O último modo de vibração tem origem nos anéis aromáticos presentes em ambos os ligandos (L3 e L4).

3.1.2 Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman e de Infravermelho são técnicas em que os princípios fundamentais são diferentes, mas ambas são espectroscopias vibracionais, sendo que o método de análise dos espectros obtidos para as diferentes amostras (neste caso, complexos metálicos), é elaborada da mesma forma. Assim sendo, também se analisa nesta técnica a presença de modos de vibração específicos das ligações químicas que estão presentes nos diferentes complexos sintetizados. Em termos de espectros obtidos, estes são mais bem definidos e têm uma maior resolução, mostrando melhor determinados tipos de ligações químicas, comparativamente à espectroscopia de IV, em certas amostras. Nas figuras que se seguem, estão representados os espectros obtidos para os complexos de *Eu* e de *Tb* do tipo I (**Figuras 18 e 19**), e para os complexos de *Eu* e *Tb* do tipo II (**Figuras 20 e 21**). De notar que para os complexos em que o ligando se encontra coordenado com *Cu* (**C3, C4, C7, C8, C11, C12, C15 e C16**), os espectros de Raman obtidos não foram semelhantes aos dos complexos monometálicos. O espectro de Raman é obtido através da leitura da energia libertada pela molécula em análise aquando do regresso ao estado fundamental de um nível energético imaginário, isto após excitação da molécula. Uma possível razão para que o espectro não seja semelhante é exactamente pela libertação dessa mesma energia, isto é, os espectros dos complexos com *Cu*, quando excitados, no lugar de difundir a radiação do nível energético imaginário, emitem, tendo assim um padrão muito semelhante a um espectro de fluorescência dos mesmos, que foram obtidos e serão tratados na secção 3.1.4. De notar que embora

sejam pouco perceptíveis, as bandas características dos mesmos espectros estão presentes, exceptuando para o **C11**, em que o complexo tem um espectro do tipo de banda única. Embora se consigam identificar algumas bandas características, os resultados aqui tratados referem-se somente aos complexos sem *Cu*.

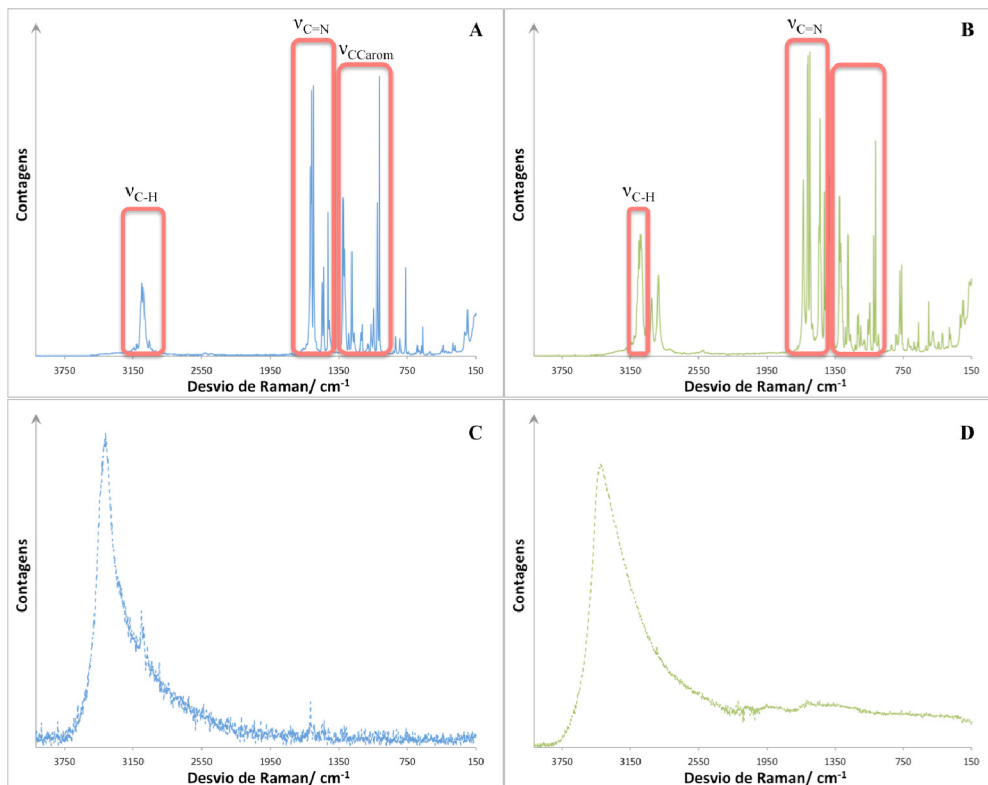


Figura 18. Espectros de Raman obtidos para os complexos de *Eu* do tipo I (L1 e L2 bidentados), onde A – C1, B – C2, C – C3 e D – C4. Em A e B estão denotadas as bandas características dos modos de vibração presentes em todos os complexos.

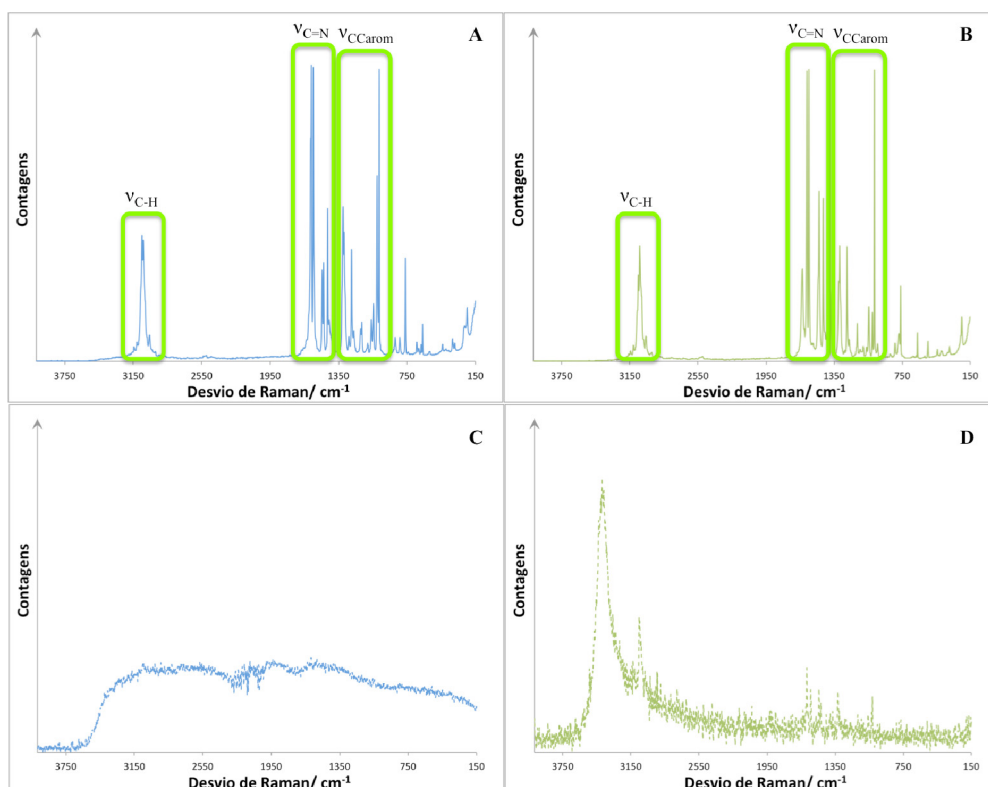


Figura 19. Espectros de Raman obtidos para os complexos de *Tb* do tipo I (L1 e L2 bidentados), onde A – C9, B – C10, C – C11 e D – C12. Em A e B estão denotadas as bandas características dos modos de vibração presentes em todos os complexos.

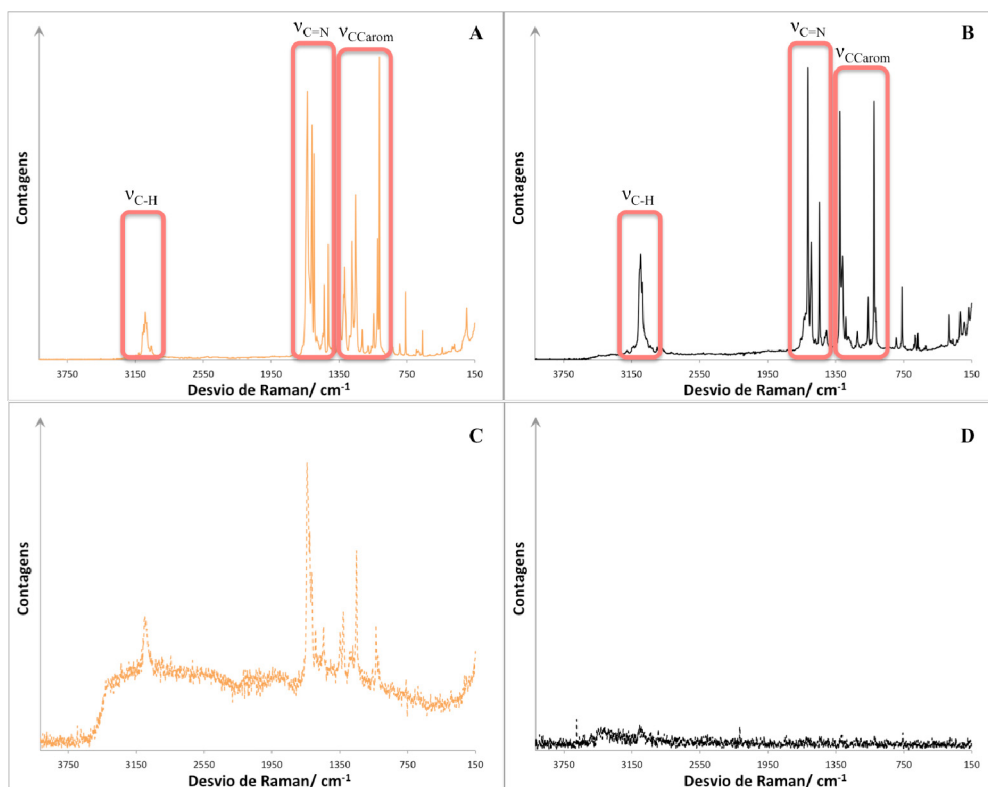


Figura 20. Espectros de Raman obtidos para os complexos de *Eu* do tipo II (L3 e L4 monodentados), onde A – C5, B – C6, C – C7 e D – C8. Em A e B estão denotadas as bandas características dos modos de vibração presentes em todos os complexos.

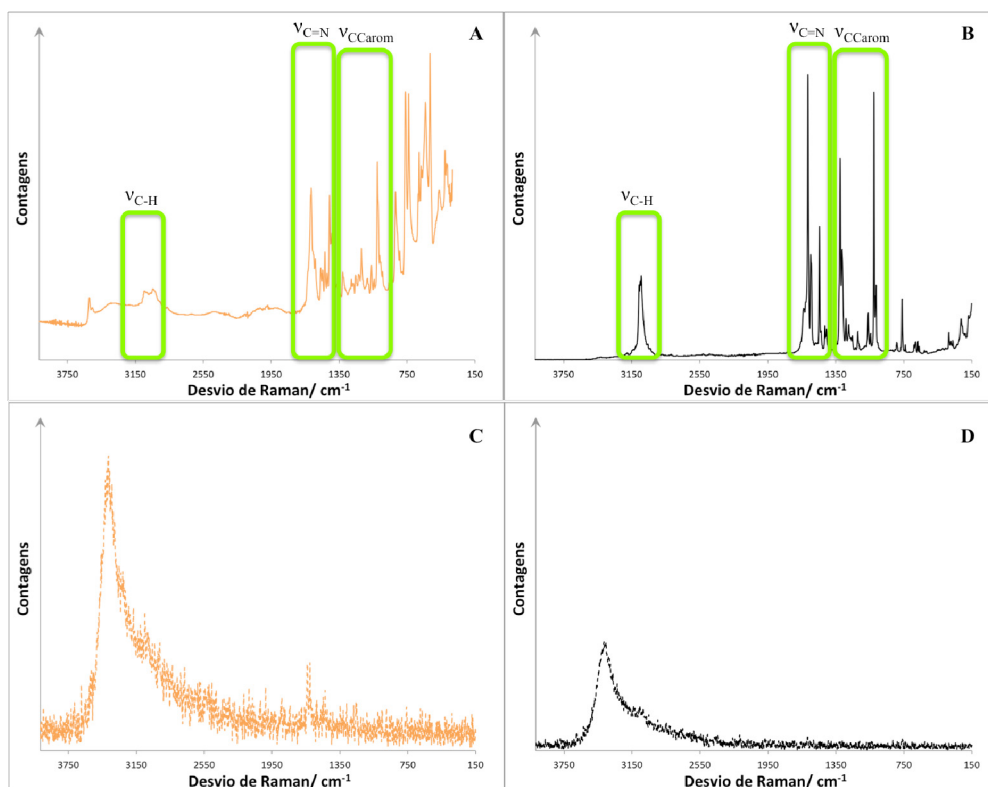


Figura 21. Espectros de Raman obtidos para os complexos de *Tb* do tipo II (L3 e L4 monodentados), onde A – C13, B – C14, C – C15 e D – C16. Em A e B estão denotadas as bandas características dos modos de vibração presentes em todos os complexos.

Em todas as figuras dos complexos em que o ligando ainda não se encontra coordenado ao Cu, estão denotadas as bandas que são comuns a todos eles, tal como os espectros de FTIR mostravam. Entre esses modos de vibração característicos estão C-H em aromáticos (ν_{C-H} cerca dos 3100 cm^{-1}), CC em aromáticos (ν_{CCarom} entre 1600 e 1000 cm^{-1}) e C=N em iminas aromáticas ($\nu_{C=N}$ cerca dos 1600 cm^{-1}). Todos estes modos de vibração confirmam as estruturas propostas anteriormente.

Para os complexos do tipo I quer de *Eu* quer de *Tb* (Figuras 18 e 19), existem modos de vibração específicos que foram identificados nos espectros de Raman, tal como nos espectros de FTIR. Entre eles, os das ligações O-H (ν_{O-H} entre 3600 e 3000 cm^{-1}), C=O ($\nu_{C=O}$ entre 1800 e 1600 cm^{-1}) e C-O (ν_{C-O} entre 1320 e 1000 cm^{-1}), todos com origem nos grupos carboxilo dos ligandos. Para L1, observou-se tal como anteriormente em FTIR uma banda na zona dos 1350 a 1250 cm^{-1} característica da ligação C-H (δ_{C-H}). Estes resultados vêm assim confirmar e corroborar os resultados obtidos anteriormente e a estrutura proposta para os complexos do tipo I. Para os complexos do tipo II (Figuras 20 e 21), também os modos de vibração já identificados na espectroscopia de FTIR foram confirmados. O modo de vibração da ligação C-H (δ_{C-H} entre 1350 e 1250 cm^{-1}) foi identificado em todos os espectros dos complexos coordenados aos ligandos L3 e L4, sendo que o modo de vibração da ligação C=C ($\nu_{C=C}$ entre 1900 e 1500 cm^{-1}) foi apenas identificado para o L3, tal como era esperado.

3.1.3 Espectroscopia de UV/Vis

Após uma caracterização em termos de estrutura e composição química dos complexos sintetizados, através da espectroscopia de FTIR/Raman, os compostos foram caracterizados em termos de espectroscopia de UV/Vis. A necessidade da caracterização dos complexos por esta técnica deve-se às conhecidas capacidades de emissão dos metais utilizados como o *Eu* e *Tb*, dando informação acerca de alterações existentes na primeira esfera de coordenação em torno do *Ln* do complexo e informação acerca da transferência de energia. Inicialmente, após a síntese dos complexos, estes foram expostos a uma lâmpada de UV com um comprimento de onda de 365 nm numa câmara escura, para confirmação da emissão de luz por estes, (**Figura 22**). De notar que a este comprimento de onda os complexos em que o ligando está coordenado a *Cu* não emitiam qualquer luz visível, daí que na figura estejam somente representados os complexos em que o ligando se encontra livre numa das extremidades (**C1, C2, C5, C6** para *Eu* e **C9, C10, C13, C14** para *Tb*).

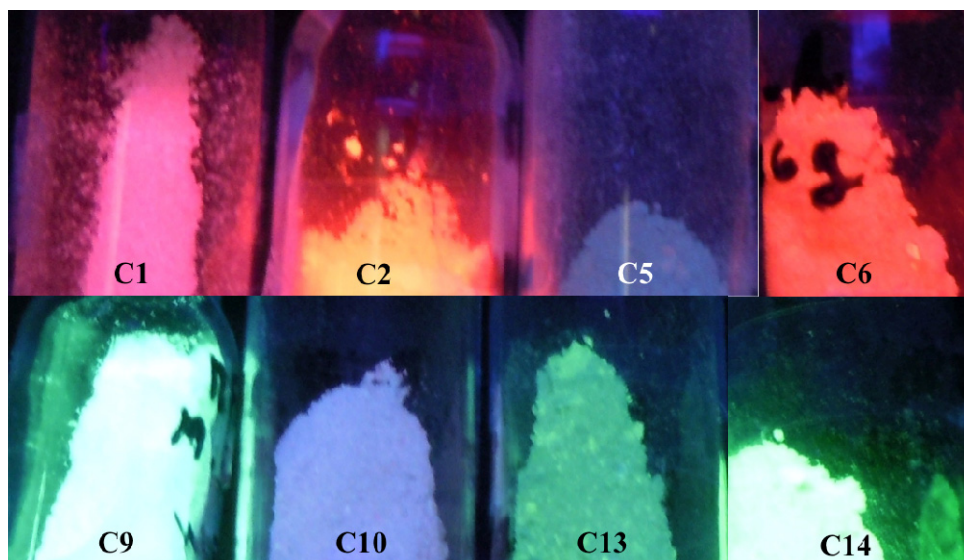


Figura 22. Complexos de *Eu* (linha de cima, C1, C2, C5 e C6) e de *Tb* (linha de baixo, C9, C10, C13 e C14) representados sob excitação de uma lâmpada de UV com 365 nm.

Tal como está representado na figura anterior, os complexos quando expostos a uma lâmpada de UV têm uma grande capacidade de emitirem luz, sendo que os complexos de *Eu* emitem sempre na gama do vermelho, exceptuando **C5** que emite uma cor rosa muito fraca, e os complexos de *Tb* na gama do verde, exceptuando **C10**, que tem também uma cor rosa muito fraca quando excitado. Desta figura também se conclui que o **C2** e o **C9** são os que emitem mais luz visível. A razão para este maior poder de excitação por parte destes complexos prende-se com a afinidade do metal para com o ligando utilizado. Tal como já está descrito na literatura¹³, *Eu* tem mais afinidade com o ácido naftaleno 1,5-dicarboxílico (L1) e *Tb* tem mais afinidade com o ácido isonicotínico (L2).

Após a confirmação da emissão de luz por parte dos complexos, e antes da caracterização dos complexos por espectroscopia de UV/Vis, foram adquiridos os espectros dos ligandos (1.3×10^{-5} M) utilizados na coordenação com o *Ln*, **Figura 23**.

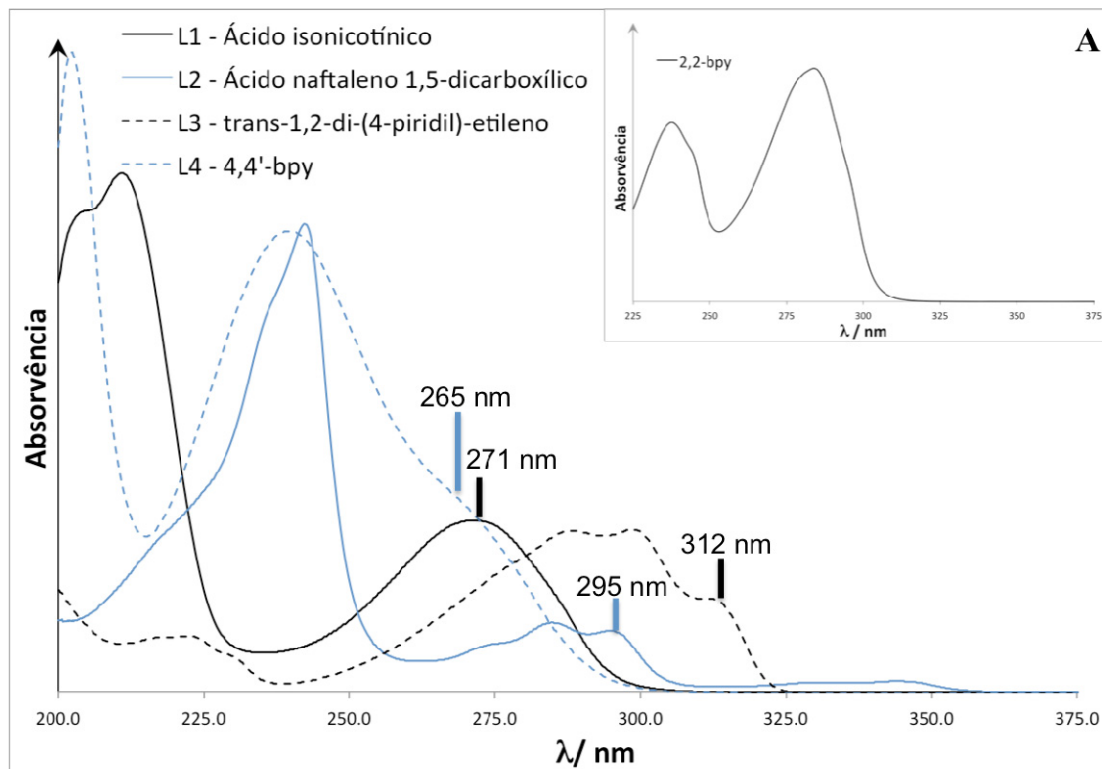


Figura 23. Espectro de UV/Vis dos ligandos (L1, L2, L3 e L4) em solução de H₂O desionizada, com uma concentração de 1.3×10^{-5} M. Os comprimentos de onda assinalados correspondem à banda menos energética do ligando. Em A, espectro de UV/Vis da *antena* utilizada (1.3×10^{-5} M, H₂O desionizada).

Observando a figura anterior, observa-se que os diferentes ligandos têm comportamentos diferentes em solução em relação à sua capacidade de absorver luz. Na mesma figura estão marcados os comprimentos de onda em que os ligandos absorvem menos energia (maior comprimento de onda), estando os resultados resumidos no **Quadro 1**. Estes comprimentos de onda foram escolhidos para posteriormente serem utilizados na aquisição dos dados de espectroscopia de Fluorescência (secção 3.1.5).

Quadro 1. Resumo dos comprimentos de onda em que estão presentes bandas energéticas referentes aos diferentes ligandos utilizados na coordenação aos diferentes complexos de *Eu* e *Tb*.

Bandas Energéticas/ nm			
L1	L2	L3	L4
211	242	288	202
271	274	299	240
-	285	312	265
-	295	-	-

Relativamente à molécula orgânica que funciona como *antena* (2,2'-*bpy*), o espectro desta foi obtido em solução de H₂O desionizada, em que os máximos de absorção ocorrem aos comprimentos de onda de 235 nm e 280 nm, (**Figura 23 – A**).

Após à análise dos resultados referentes aos ligandos e à *antena*, foram adquiridos os espectros de absorção dos complexos sintetizados, em condições semelhantes (1.3×10^{-5} M, H₂O desionizada como solvente), **Figuras 24 e 25**.

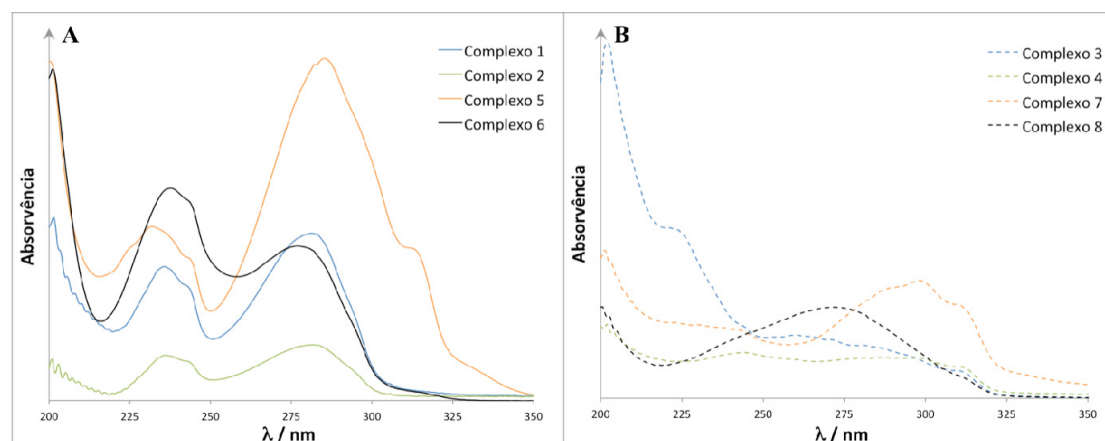


Figura 24. Espectros de UV/Vis dos complexos sintetizados de *Eu* (1.3×10^{-5} M, H₂O desionizada). **A** – Complexos de *Eu* sem *Cu* coordenado, **B** – Complexos de *Eu* com *Cu* coordenado.

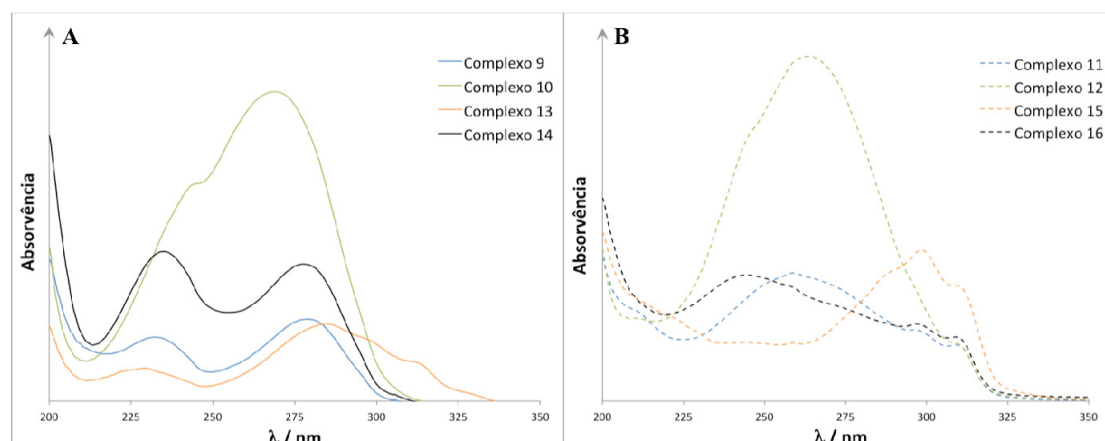


Figura 25. Espectros de UV/Vis dos complexos sintetizados de *Tb* (1.3×10^{-5} M, H₂O desionizada). **A** – Complexos de *Tb* sem *Cu* coordenado, **B** – Complexos de *Tb* com *Cu* coordenado.

Relativamente aos espectros obtidos dos complexos de *Eu*, para os que não têm o ligando coordenado a *Cu* (Figura 24 - A), o espectro de absorção é semelhante ao da 2,2'-*bpy*, com duas bandas de absorção bem definidas, embora para todos os complexos a primeira banda esteja desdobrada em dois picos com comprimento de onda próximos e para o complexo **C5** a última banda esteja também desdobrada em dois picos de comprimentos de onda diferentes. As bandas de absorção observadas encontram-se aos comprimentos de onda de 235 nm e 280 nm, o que implica um espectro semelhante ao da *antena*. Relativamente aos complexos em que ligando já está coordenado ao *Cu* (Figura 24 - B), estes apresentam um padrão de bandas semelhante aos dos ligandos dos complexos precursores (Figura 23), exceptuando **C8**,

que apresenta somente uma única banda larga com pico máximo aos 270 nm, estando os resultados obtidos resumidos no **Quadro 2**.

Quadro 2. Resumo das bandas de absorção dos complexos de *Eu* em que o ligando se encontra coordenado com *Cu*, estando também representadas as bandas de absorção dos respectivos ligandos.

Bandas Energéticas/ nm							
L1	C3	L2	C4	L3	C7	L4	C8
211	225	242	243	288	285	202	270
271	260	274	-	299	299	240	-
-	-	285	298	312	310	265	-
-	-	295	312	-	-	-	-

Comparando os resultados obtidos para os ligandos e para os complexos, para o complexo **C3**, a banda menos energética (260 nm) deslocou-se para comprimentos de onda menores (mais energéticos) em relação ao ligando, contrariamente à primeira banda (225 nm), que se deslocou para um comprimento de onda maior (menos energético). Para os complexos **C4** e **C7**, as bandas de absorção observadas são semelhantes às bandas dos ligandos. Observando e comparando finalmente os resultados obtidos para os complexos de *Eu* com e sem o ligando coordenado ao *Cu*, consegue-se concluir que a adição de *Cu* provoca alteração nos níveis de energia do singuleto dos complexos binucleares, em relação aos complexos precursores monometálicos.

Em relação aos espectros de absorção obtidos para os complexos de *Tb*, os espectros dos complexo sem *Cu* (Figura 24 - A) são semelhantes aos obtidos para os complexos de *Eu* sem *Cu* (com picos máximos de absorvência aos 235 e 280 nm), exceptuando para o complexo **C10** que apresenta uma banda larga única desdobrada em dois picos de intensidade aos 242 e 270 nm. Este complexo apresenta um desvio para comprimentos de onda menores na banda mais intensa (270 nm), implicando uma transição de energia mais energética. Quanto aos complexos de *Tb* com *Cu*, estes não apresentem um padrão de bandas tão semelhante com os ligandos como os complexos de *Eu* com *Cu*, exceptuando o **C15** que tem um resultado muito semelhante ao **L3**, **Quadro 3**. De notar que **C12** tem uma banda tal como o mesmo complexo sem *Cu* (**C10**), em que o comprimento de onda ao qual a absorção é máxima é 260 nm, o que implica também um desvio em 10 nm para zonas mais energéticas.

Quadro 3. Resumo das bandas de absorção dos complexos de *Tb* em que o ligando se encontra coordenado com *Cu*, estando também representadas as bandas de absorção dos respectivos ligandos.

Bandas Energéticas/ nm							
L1	C11	L2	C12	L3	C15	L4	C16
211	-	242	244	288	286	202	-
271	257	274	260	299	299	240	242
-	296	285	-	312	312	265	296
-	312	295	-	-	-	-	310

Como os complexos **C11** e **C16** não apresentam um padrão de bandas que seja comparável com o dos ligandos, isto implica que após a adição de cobre, tal como para os complexos discutidos acima, existe uma alteração dos níveis de energia relativamente aos complexos precursores sem *Cu* (**C9** e **C14**).

3.1.3.1 Titulação de Cobre

De forma a confirmar a alteração do comportamento dos complexos em termos de absorção de energia aquando da coordenação de *Cu*, foram realizadas titulações do metal para os diferentes complexos monometálicos (**C1**, **C2**, **C5**, **C6** para *Eu* e **C9**, **C10**, **C13**, **C14** para *Tb*). Os resultados obtidos estão representados nas **Figuras 26** e **27**. Os espectros de UV/Vis das diversas concentrações de *Cu* estão representados na **Figura S1 da secção 6.1.1**, com um pico aos 265 nm.

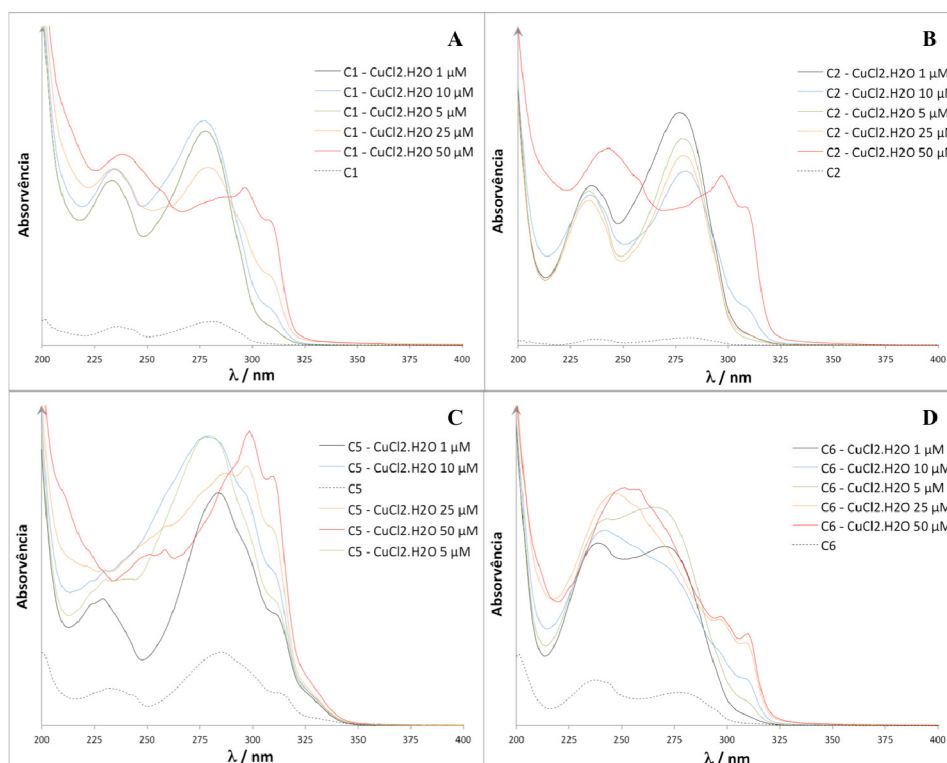


Figura 26. Representação dos espectros de absorção da titulação de *Cu* realizada aos complexos de *Eu* sem *Cu* coordenado (100 μM), A – **C1**, B – **C2**, C – **C5** e D – **C6**.

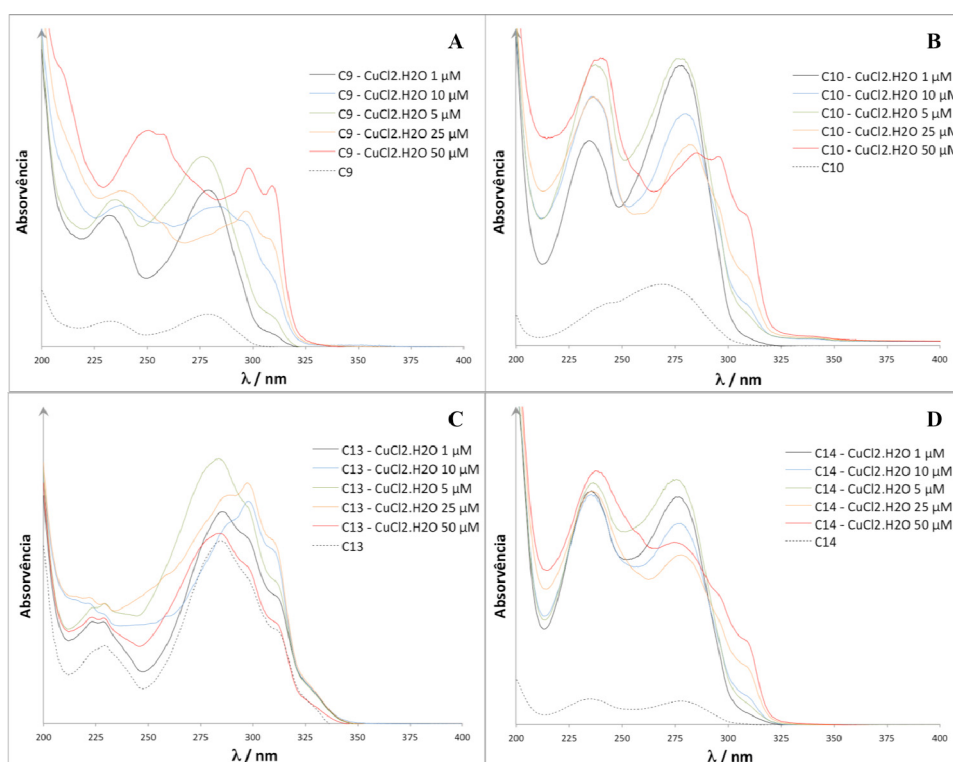


Figura 27. Representação dos espectros de absorção da titulação de *Cu* realizada aos complexos de *Tb* sem *Cu* coordenado (100 μM), A – C9, B – C10, C – C13 e D – C14.

Observando os resultados obtidos para os diferentes complexos, todos eles com o aumento da concentração de *Cu* em solução alteram o padrão de bandas, que inicialmente é semelhante ao da *antena* (1 μM), e que termina por ser muito semelhante ao do ligando utilizado (50 μM). Estes resultados vêm confirmar o que já tinha sido concluído anteriormente, que com a coordenação de *Cu* ao ligando, os níveis de energia do complexo são alterados.

Outro objectivo deste estudo foi comprovar que os complexos conseguem coordenar *Cu* quando este não se encontra a baixas concentrações, garantindo assim que conseguem ter a função biológica já explicitada no organismo, onde a concentração de *Cu* é baixa. Tendo em atenção os resultados obtidos, os complexos apresentam um padrão de bandas característico da coordenação de *Cu* ao seu ligando entre os 25 e os 50 μM , o que implica uma grande eficiência no recrutamento deste metal, tal como é necessário para que possam funcionar como inibidores de células cancerígenas. A título de exemplo foi observado a existência de pontos “*pseudo*” isobésticos para o complexo C10 (Figura S2 da secção 6.1.1), que demonstra a existência de espécies em equilíbrio, tendo os resultados obtidos sido normalizados e corrigidos para a polaridade do solvente.

3.1.4 Espectroscopia de Fluorescência

A caracterização por espectroscopia de fluorescência dos complexos sintetizados teve como objectivo obter os perfis de fluorescência dos mesmos. Inicialmente para os estudos de fluorescência, os comprimentos de onda de excitação

(λ_{exc}) utilizados foram os da banda menos energética dos ligandos (L1 – 271 nm, L2 – 295 nm, L3 – 312 nm, L4 – 265 nm, Figura 23), de forma a confirmar a presença e influência dos ligandos nas características espectroscópicas dos complexos, **Figuras 28 e 29**.

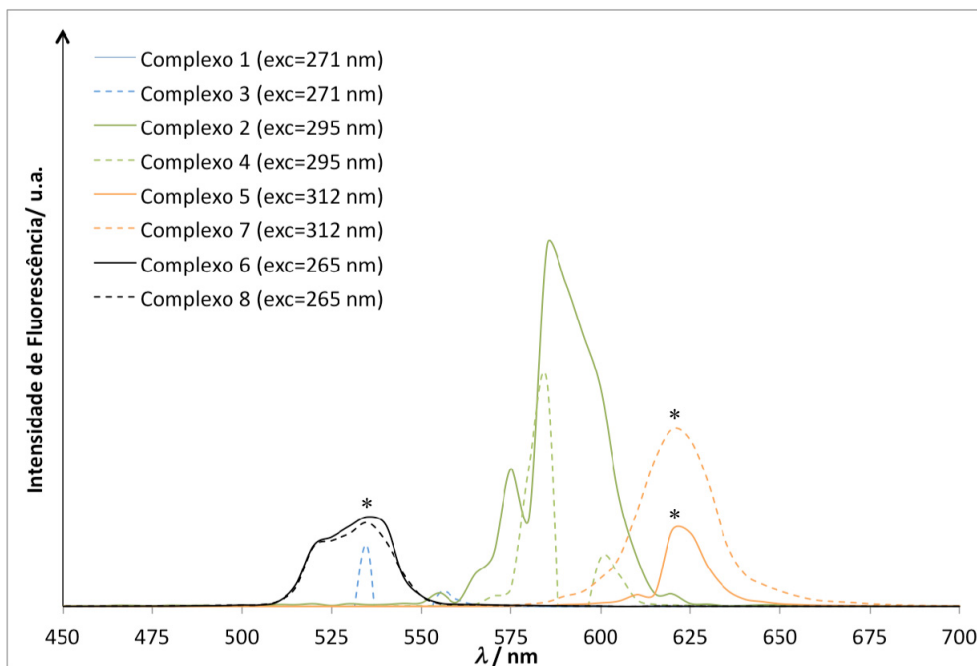


Figura 28. Espectro de fluorescência dos complexos de *Eu* (2.0×10^{-20} M), em que o λ_{exc} utilizado para cada complexo corresponde ao comprimento de onda da banda menos energética do ligando. A banda (*) corresponde a um sinal originado pela difusão de 2ª ordem do aparelho.

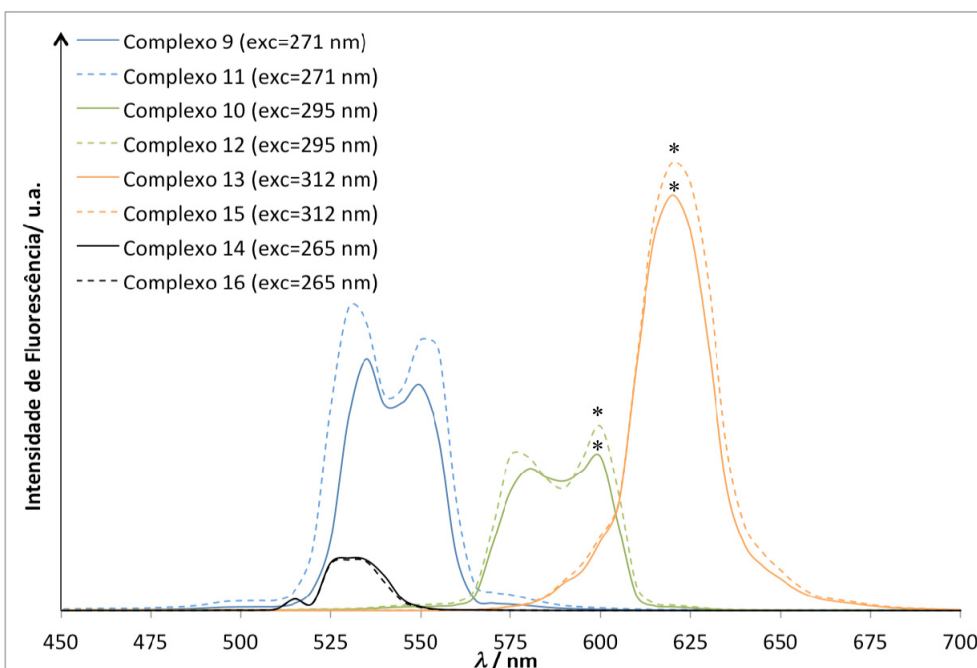


Figura 29. Espectro de fluorescência dos complexos de *Tb* (2.0×10^{-20} M), em que o λ_{exc} utilizado para cada complexo corresponde ao comprimento de onda da banda menos energética do ligando. A banda (*) corresponde a um sinal originado pela difusão de 2ª ordem do aparelho.

Observando os resultados dos complexos sintetizados quando excitados aos comprimentos de onda específicos dos ligandos, observa-se em quase todos os complexos (excepto **C2/C4**) que aqueles que são bimetalícos têm uma maior intensidade de fluorescência associada aos ligandos, o que corrobora as conclusões obtidas para a espectroscopia de UV/Vis, isto é, os complexos quando coordenados ao *Cu* têm os seus níveis de energia alterados, com implicações no respectivo espectro de absorção. As bandas que possuem um (*) são originadas pelo aparelho, no dobro do comprimento de onda utilizado para excitação do complexo.

Para caracterizar em termos da capacidade de emissão de luz, os complexos obtidos, foram adquiridos os espectros de fluorescência dos complexos de *Eu* e de *Tb* em solução de H₂O desionizada, com um λ_{exc} a 282 nm para os monometalícos e 300 nm para os bimetalícos, o que corresponde ao comprimento de onda em que os complexos absorvem com mais intensidade na zona menos energética (maiores comprimentos de onda), tal como está representado nas Figuras 24 e 25, **Figuras 30 e 31**.

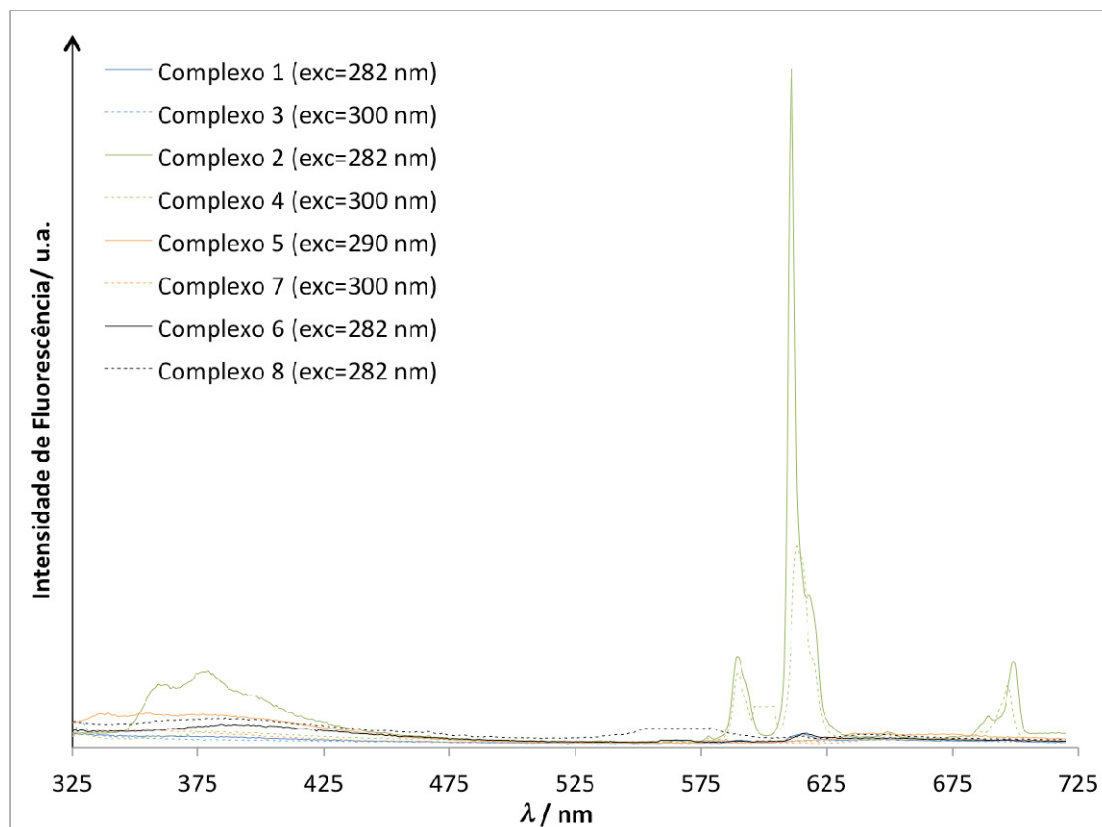


Figura 30. Espectro de fluorescência dos complexos de *Eu* (2.0×10^{-20} M), em que os λ_{exc} escolhidos foram 282 nm para os complexos sem *Cu* e 300 nm para os complexos com *Cu*, (exceptuando **C5** e **C8**).

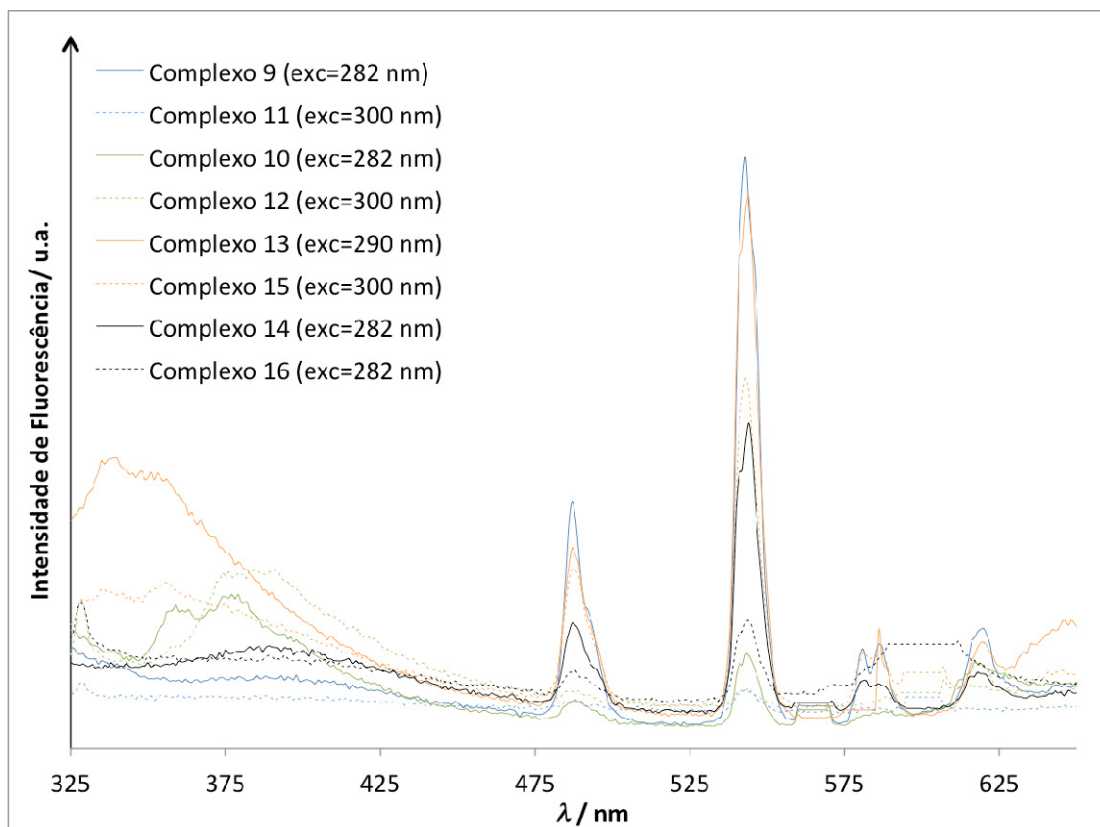


Figura 31. Espectro de fluorescência dos complexos de *Tb* (2.0×10^{-20} M), em que os λ_{exc} escolhidos foram 282 nm para os complexos sem *Cu* e 300 nm para os complexos com *Cu*, (exceptuando **C13** e **C16**).

Tendo em atenção os resultados obtidos nas figuras anteriores, consegue-se concluir que para cada *Ln*, existe um complexo monometálico que tem uma maior intensidade de fluorescência do que os restantes. Ainda assim, a fraca luminescência associada ao *Ln* presente em H₂O desionizada, não permitiu a caracterização completa dos complexos em termos de transições entre as orbitais f. Como tal, foram então adquiridos os espectros dos complexos com maior intensidade para ambos os lantanídeos (**C2/C4** para *Eu* e **C9/C11** para *Tb*), **Figuras S3 e S4 da secção 6.1.2**, com λ_{exc} de 300 nm para o complexo de *Eu* e de 282 nm para o de *Tb*, isto para que o sinal de 2^a ordem do aparelho não se sobrepusesse ao *Ln*, com o objectivo de obter maior pormenor na caracterização dos complexos, observando-se assim as bandas de emissão das transições entre as orbitais f⁸⁶⁻⁸⁸, isto quando a transferência de energia para o *Ln* ocorre de forma eficiente. Estes espectros foram obtidos em solução de metanol de forma a evitar a extinção de fluorescência na primeira esfera de coordenação do complexo, devido às interacções entre o solvente e o complexo. De notar também que os complexos com maior intensidade de fluorescência nestes estudos correspondem aos mesmos que foram identificados inicialmente à lâmpada de UV, **C2** e **C9**. Os espectros obtidos foram normalizados, e estão representados na **Figura 32** para **C2/C4** e na **Figura 33** para **C9/11**.

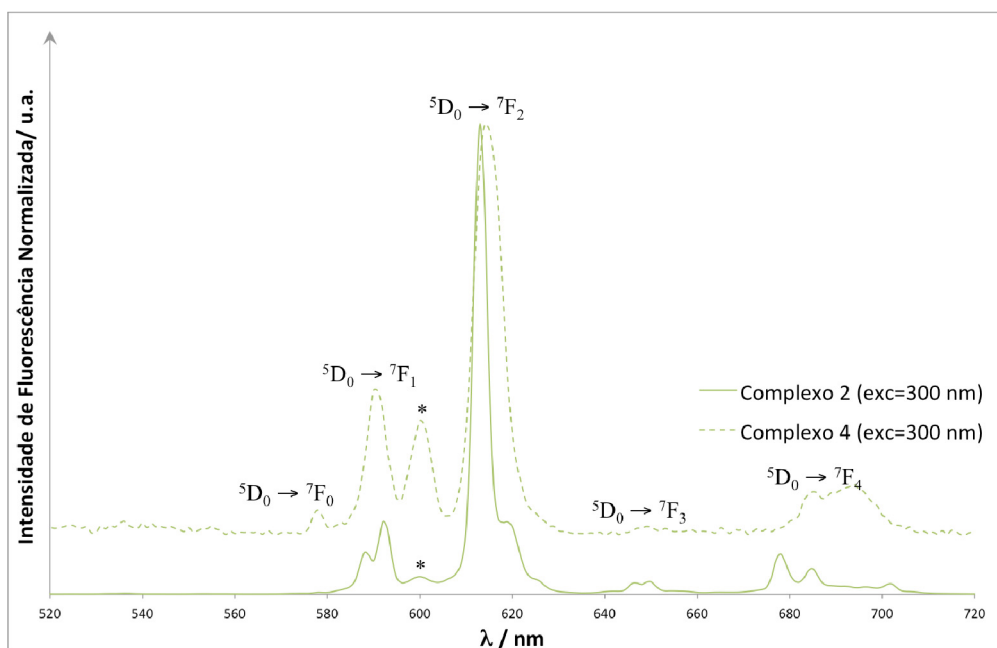


Figura 32. Espectro de fluorescência normalizado do complexo **C2** (sem *Cu*) e **C4** (com *Cu*), com λ_{exc} a 300 nm, em que estão denotadas as transições das orbitais observadas em ambos os espectros.

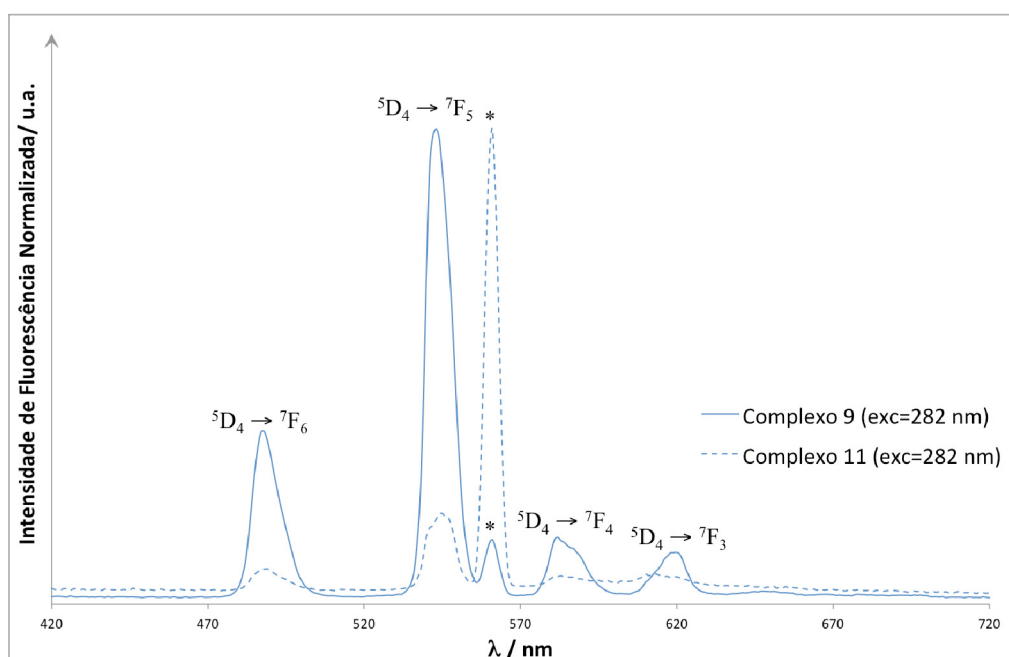


Figura 33. Espectro de fluorescência normalizado do complexo **C9** (sem *Cu*) e **C11** (com *Cu*), com λ_{exc} a 282 nm, em que estão denotadas as transições das orbitais observadas em ambos os espectros.

O sinal originado pela difusão de 2ª ordem do aparelho origina bandas específicas no dobro de comprimento de onda de excitação, que estão representadas pelo (*). Observando os mesmos, no gráfico dos complexos de *Eu* (**C2/C4**), a banda de maior intensidade ocorre aos 612 nm (corresponde à transição entre orbitais $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$), e nos gráficos dos complexos de *Tb* (**C9/C11**), a banda de maior intensidade ocorre aos 545 nm (corresponde à transição entre orbitais $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$). Estes

comprimentos de onda de emissão são específicos para estes metais, estando descritos na literatura^{24,11}.

Especificamente no gráfico dos complexos de *Eu*, antes da normalização da intensidade de fluorescência (Figura S2 da secção 6.1.2), observa-se que a banda aos 612 nm tem maior intensidade para o complexo sem *Cu* (**C2**), comparativamente ao complexo com *Cu* (**C4**), estando assim em concordância com os resultados UV/Vis. Observando depois o espectro normalizado (Figura 32) a presença das bandas referentes às transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_{1,2,4}$ permitem concluir acerca da sensibilidade do complexo em relação ao ambiente local, observando as mudanças na esfera de coordenação do complexo após a ligação de *Cu*. Estas bandas, após a coordenação de *Cu*, tornam-se mais largas e são constituídas por dois picos do espectro anterior na mesma zona de comprimento de onda, evidenciando as diferenças na simetria no complexo após a coordenação de *Cu*, e a menor eficiência na emissão de luz por parte do mesmo.

Quanto aos espectros obtidos para os complexos de *Tb* antes da normalização (Figura S3 da secção 6.1.2), as conclusões são semelhantes às anteriores relativamente à banda de intensidade de fluorescência característica do *Ln*, ou seja, maior intensidade no complexo sem *Cu* (**C9**), o que corrobora a menor eficiência na emissão de luz após introdução do novo metal. Relativamente ao espectro normalizado (Figura 33), ambos os complexos evidenciaram as bandas características das transições $^5D_4 \rightarrow ^7F_{6,3}$, mas a intensidade de fluorescência é muito mais fraca comparativamente à do complexo de *Eu* **C2**, não sendo possível observar alterações nas bandas e assim concluir acerca do ambiente da esfera de coordenação. Concluindo, nos complexos monometálicos, a transferência de energia é mais eficiente, permitindo assim uma maior capacidade de emissão de luz. Após a coordenação de *Cu*, que provoca alterações na distribuição dos níveis energéticos, a transferência de energia torna-se menos eficiente. Daqui resulta que os complexos monometálicos apresentam uma maior intensidade de fluorescência, quando a excitação ocorre sobre o lantanídeo.

3.2 Ensaios celulares *in vitro*

O objectivo do presente trabalho era a síntese de complexos de *Eu* e *Tb* com aplicação biológica, sendo que esta aplicação se divide na componente de biosondas e na componente anticancerígena. A primeira aplicação prende-se com o facto dos complexos sintetizados possuírem um núcleo metálico de lantanídeos (*Eu* e *Tb*), com grandes propriedades fotoluminescentes descritas na literatura⁴⁰⁻⁴². Quanto à segunda aplicação, esta deve-se ao facto dos complexos sintetizados poderem possuir a capacidade de recrutar *Cu* junto das células cancerígenas de forma específica, já existindo trabalhos na literatura que utilizam complexos para o tratamento do cancro *in vitro*^{61,74,75}.

Sabendo o objectivo do trabalho, os complexos sintetizados foram caracterizados com as técnicas adequadas à confirmação da sua estrutura e das suas propriedades, confirmando-se as características luminescentes dos mesmos,

principalmente naqueles em que o ligando não estava coordenado a *Cu*. Após esta confirmação, os estudos experimentais evoluíram no sentido de testar as possíveis aplicações biológicas que os complexos poderão ter (biosondas e anticancerígenos). Para tal, foi inicialmente avaliada a viabilidade celular dos complexos em duas linhas celulares, células *HeLa* (adenocarcinoma cervical) e células *A549* (adenocarcinoma alveolar). Este tipo de linhas celulares foram escolhidas por terem um grande impacto na população mundial, no caso das *A549*, e por serem as que permitem tirar conclusões iniciais mais eficientes, sendo utilizadas em quase todo o tipo de estudos celulares, no caso das *HeLa*. O esperado é observar que os complexos monometálicos não interferem na viabilidade celular de qualquer uma das linhas, enquanto que os complexos bimetálicos, devido à acção de *Cu*, inibem o crescimento e interferem na viabilidade das células. Foi posteriormente calculado o IC_{50} para os complexos em que se aplicava, recorrendo ao software *Prism™ GraphPad*, e finalmente foi estudado a emissão de fluorescência por parte dos complexos em meio celular.

De notar que para os estudos celulares, tendo em conta os resultados obtidos na caracterização dos diferentes complexos, irão apenas ser aqui retratados os resultados obtidos para os complexos do tipo I (engloba **C2/C4** e **C9/C11**), isto porque foram estes que obtiveram os melhores resultados na espectroscopia de fluorescência em solução. A H_2O desionizada foi o solvente escolhido para estes estudos porque é aquele que retrata de melhor forma o organismo, simulando as condições a que os complexos serão submetidos, bem como a temperatura de $37\text{ }^{\circ}C$.

3.2.1 Citotoxicidade em células *HeLa*

Os resultados obtidos nos estudos de viabilidade celular em células *HeLa* estão resumidos para os complexos do tipo I na **Figuras 34 e 35**. Os resultados obtidos para os complexos do tipo II estão representados na **Figuras S5 e S6, na secção 6.2.1**, sendo que as conclusões tiradas dos mesmos não serão aqui discutidas.

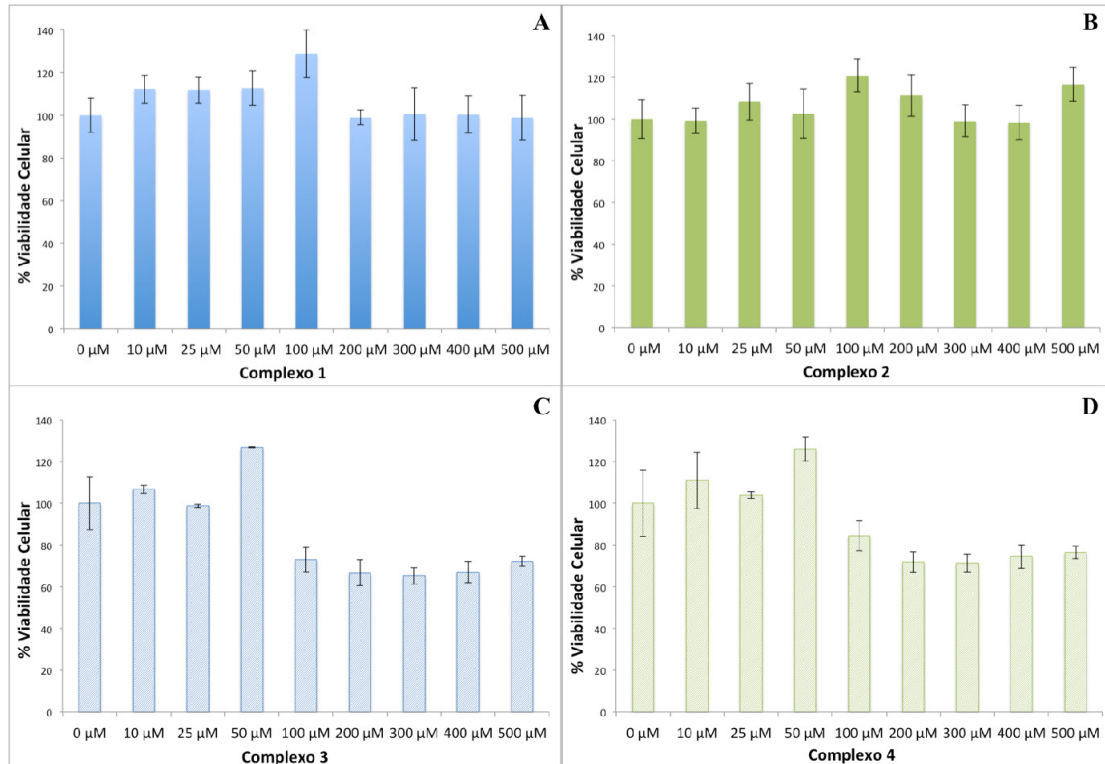


Figura 34. Estudos de viabilidade celular obtidos para os complexos do tipo I de *Eu* (A – C1, B – C2, C – C3 e D – C4) em células *HeLa*. O controlo utilizado foi meio de crescimento suplementado.

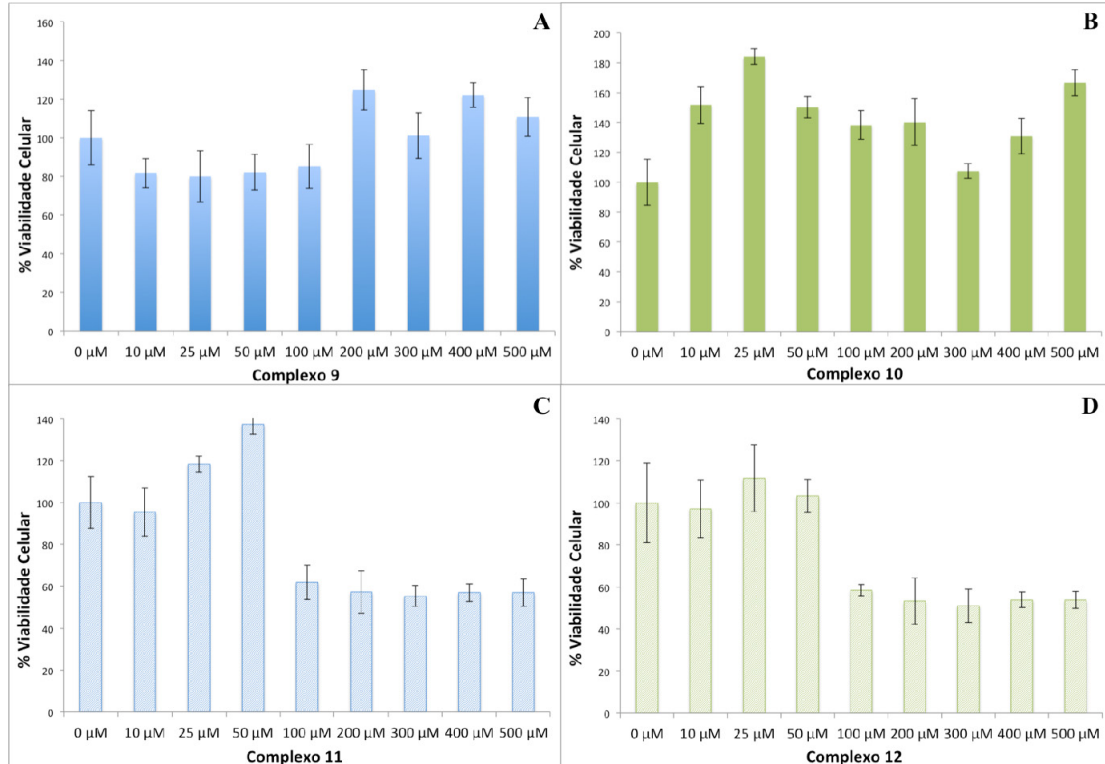


Figura 35. Estudos de viabilidade celular obtidos para os complexos do tipo I de *Tb* (A – C9, B – C10, C – C11 e D – C12) em células *HeLa*. O controlo utilizado foi meio de crescimento suplementado.

Observando os resultados obtidos para os complexos sem *Cu* (C1 e C2 para *Eu* e C9 e C10 para *Tb*), é possível concluir que este tipo de complexos não interfere com a viabilidade celular, isto porque o crescimento celular mantém-se nos 100% ou até numa percentagem mais alta, possivelmente devido à utilização das moléculas orgânicas dos complexos no seu metabolismo (Figura 34 – A,B e 35 – A,B), já que as moléculas presentes nos complexos são azotadas.

Quantos aos espectros obtidos para os complexos bimetálicos (C3 e C4 para *Eu* e C9 e C10 para *Tb*), todos eles têm uma grande depressão por volta dos 50 μM para valores de 60% de viabilidade celular, o que contrasta com os resultados discutidos acima (Figura 34 – C,D e 35 – C,D). Estes resultados são explicados pela presença de *Cu*, que irá actuar junto das células no sentido de inibir o crescimento, possivelmente devido à sua acção na acumulação de proteínas poliubiquitinadas (inibindo o proteassoma), que provoca mais tarde a apoptose celular. Assim, para estes últimos complexos foi calculado o valor de IC_{50} , não sendo calculado para os primeiros porque a viabilidade mantém-se sempre próxima dos 100%, (secção 3.2.3).

3.2.2 Citotoxicidade em células *A549*

Os resultados obtidos nos estudos de viabilidade celular em células *A549* estão resumidos para os complexos do tipo I na **Figuras 36 e 37**. Os resultados obtidos para os complexos do tipo II estão representados na **Figuras S7 e S8**, na **secção 6.2.2**, sendo que as conclusões tiradas dos mesmos não serão aqui discutidas.

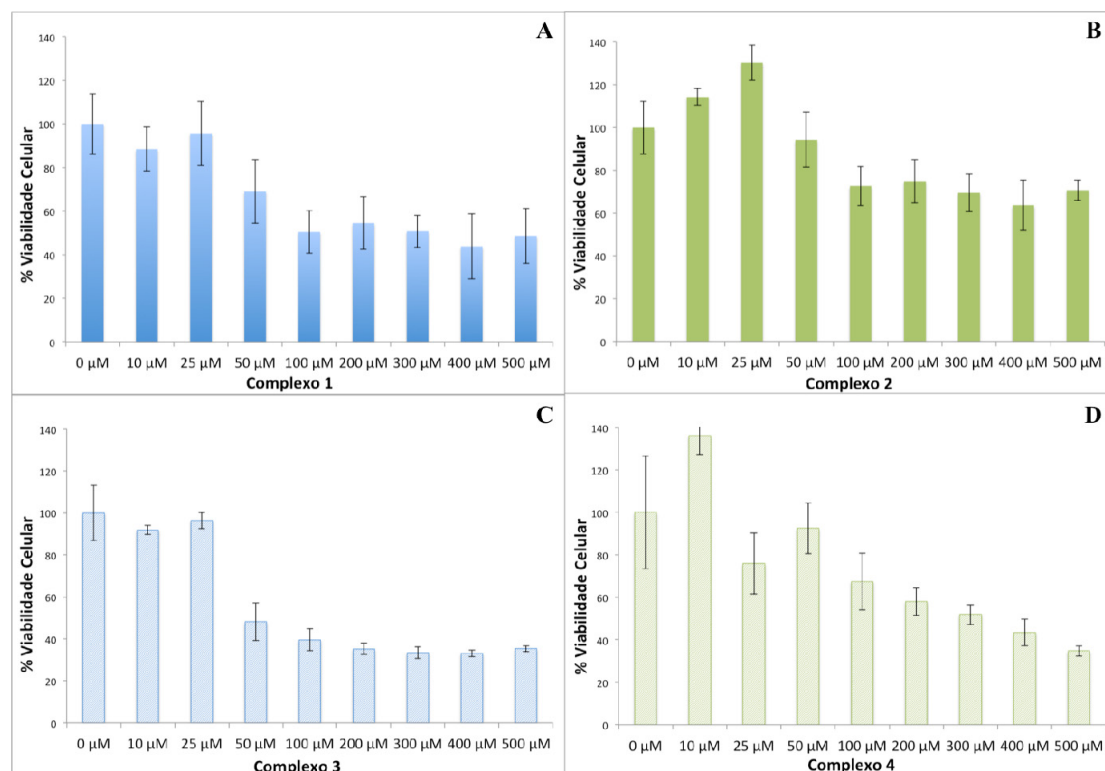


Figura 36. Estudos de viabilidade celular obtidos para os complexos do tipo I de *Eu* (A – C1, B – C2, C – C3 e D – C4) em células *A549*. O controlo utilizado foi meio de crescimento suplementado.

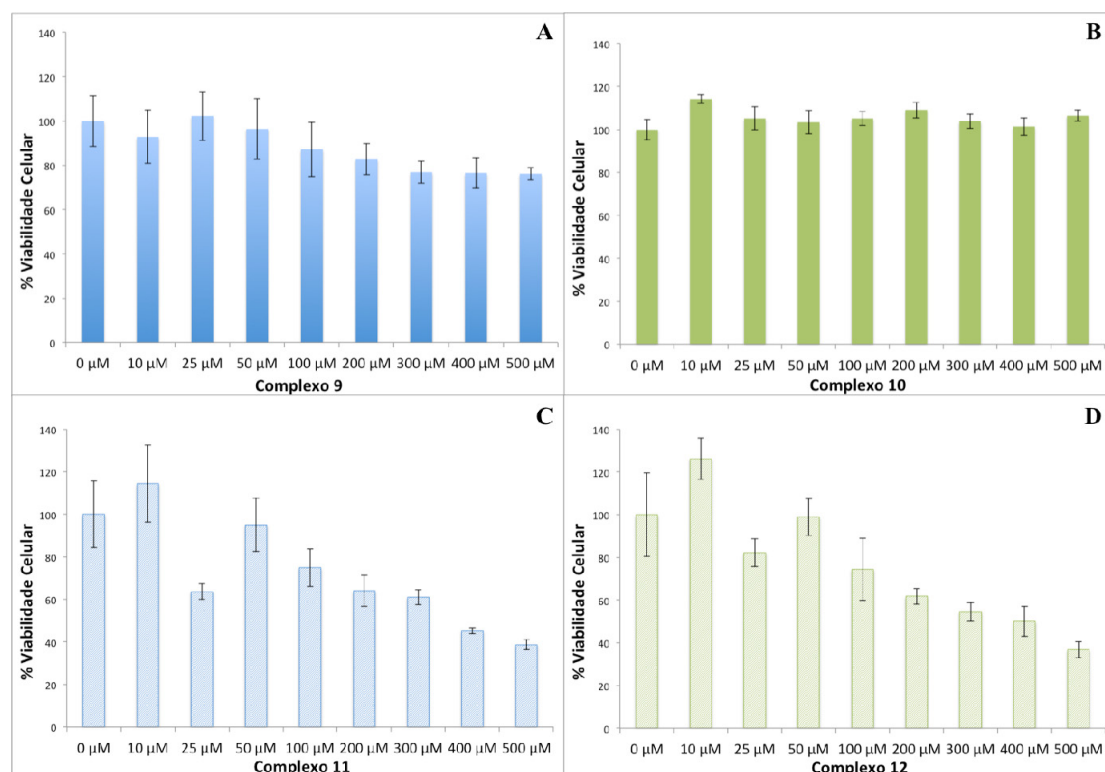


Figura 37. Estudos de viabilidade celular obtidos para os complexos do tipo I de *Tb* (A – C9, B – C10, C – C11 e D – C12) em células *HeLa*. O controlo utilizado foi meio de crescimento suplementado.

Tomando em atenção os resultados obtidos para os complexos monometálicos de *Eu*, (C1 e C2), observa-se que à medida que aumenta a concentração dos complexos existe também uma menor viabilidade celular, até próximo dos 50% e 70%, respectivamente (Figura 36 – A,B). Este resultado contrasta com o que foi obtido para os complexos de *Tb*, (Figura 37 – A,B), já que para estes a viabilidade mantem-se sempre próximo dos 80% e dos 100% para o C9 e C10, respectivamente, o que novamente demonstra que este tipo de complexos não interfere com a viabilidade celular. Quanto aos complexos bimetálicos (C3 e C4 para *Eu* e C11 e C12 para *Tb*), observa-se que estes interferem na viabilidade celular, tal como o que foi discutido na linha celular anterior, (Figura 36 – C,D e Figura 37 – C,D). Comparando os complexos monometálicos com os bimetálicos, embora os primeiros tal como já foi dito, também interfiram na viabilidade celular, interferem numa menor percentagem celular, observando-se que os complexos com *Cu* actuam de forma mais forte na viabilidade celular. Assim sendo, estes resultados corroboram a necessidade de cálculo do valor de IC_{50} para os complexos bimetálicos.

3.2.3 Determinação dos valores de IC_{50}

Após a observação da influência dos diferentes complexos na viabilidade celular de duas linhas celulares, o valor de IC_{50} foi calculado para aqueles que são bimetálicos. Este valor corresponde à concentração necessária de complexo para que a viabilidade celular seja inibida em 50%, isto em termos de número de células. É o

valor de IC_{50} que nos permite concluir acerca da eficiência de actuação de um determinado composto, avaliando se é necessária uma grande ou pequena concentração para obter o efeito desejado, e assim sendo, quanto menor for o valor, maior é eficiência de actuação do complexo. Os valores de IC_{50} obtidos para os complexos em estudo estão resumidos no **Quadro 4**. Estes valores foram calculados recorrendo a um software próprio para o efeito, *Prism™ GraphPad*.

Quadro 4. Valores de IC_{50} para os diferentes complexos bimetálicos sintetizados nas duas linhas celulares testadas, células *HeLa* e células *A549*.

Complexo/ μM	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>	
<i>Eu</i>	3	80.96	49.39
	4	88.09	58.34
	7	95.10	50.53
	8	98.20	79.66
<i>Tb</i>	11	81.47	187.80
	12	77.24	92.40
	15	87.90	-
	16	93.67	86.83

Observando os valores obtidos para os complexos de *Eu*, aquele que tem um menor valor de IC_{50} em células *HeLa* é **C3**, tal como em células *A549*. Ainda dentro dos complexos de *Eu*, o complexo **C4** que em termos de caracterização possui as melhores características, tem o segundo melhor valor de IC_{50} para células *HeLa*, mas apenas o terceiro em células *A549*. Relativamente aos complexos de *Tb*, **C12** é aquele que tem um menor IC_{50} em células *HeLa*, e nas células *A549* é o **C16**. Novamente, o complexo que em termos de caracterização obteve melhores resultados, **C11**, embora em células *HeLa* tenha o segundo melhor valor de IC_{50} , em células *A549* possui o pior valor de IC_{50} obtido, sabendo que para o **C15** este não foi calculado porque o software não reconheceu um comportamento inibitório nos valores de viabilidade celular.

Concluindo, tendo em atenção os valores calculados, os complexos têm um comportamento diferente consoante a linha celular estudada, indicando que em termos de actuação, os complexos embora possam inibir o crescimento de células tumorais, são mais ou menos específicos consoante o tipo de cancro. Para células *HeLa*, os complexos com melhores resultados foram os de *Tb*, nomeadamente **C12**, para a linha celular *A549*, os complexos de *Eu* (**C3**) são os mais específicos e eficientes, com valores de IC_{50} bastante baixos. Futuramente, são necessários estudos em mais linhas celulares cancerígenas, de modo a observar as diferenças existentes entre as mesmas.

3.2.4 Fluorescência em meio celular

Depois de se obter os resultados referentes à viabilidade celular, foram feitos estudos de fluorescência em meio celular dos complexos analisados. Estes estudos

focaram-se nos comprimentos de onda dos ligandos (L1 – 271 nm, L2 – 295 nm, L3 – 312 nm e L4 – 265 nm), e tiveram como objectivo observar se existia alterações nos espectros de fluorescência após a inclusão dos complexos em células. O esperado será observar uma baixa intensidade de fluorescência para os complexos sem *Cu*, contrariamente aos complexos bimetálicos, que terão uma maior intensidade de fluorescência, isto devido a diferentes distribuições dos níveis energéticos. Os resultados referentes aos complexos do tipo I de *Eu* e de *Tb* encontram-se representados na **Figuras 38 e 39**. Os resultados referentes aos complexos do tipo II encontram-se na **Figuras S9 e S10 da secção 6.2.3**, não sendo discutidos nesta secção.

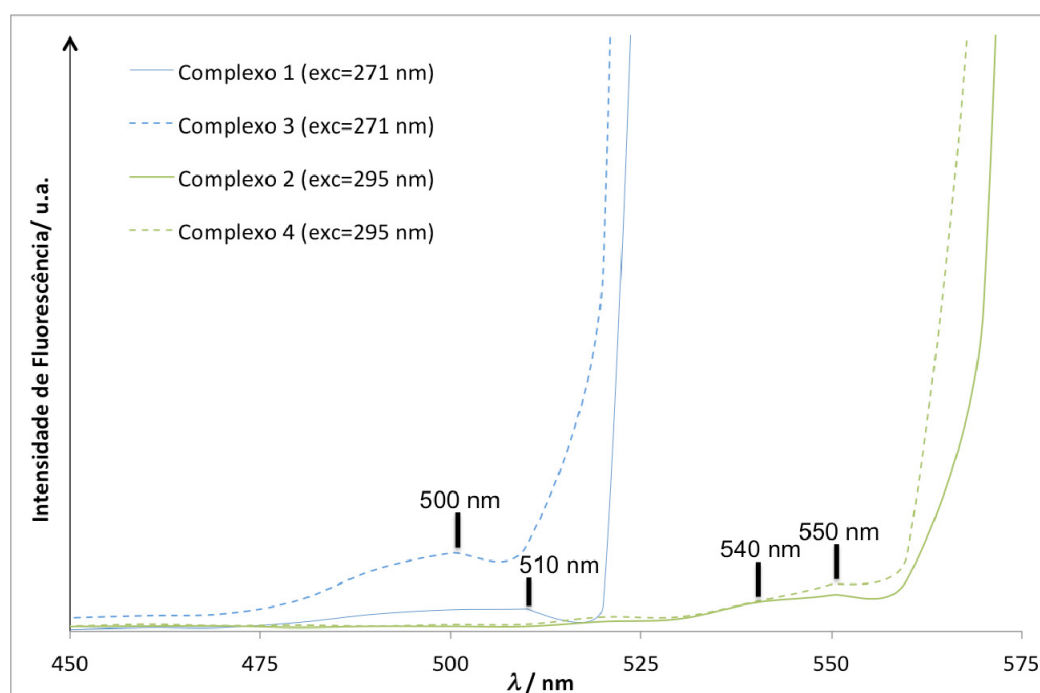


Figura 38. Espectro de fluorescência dos complexos do tipo I de *Eu* ($50 \mu\text{M}$), em que o comprimento de onda de excitação utilizado foi o correspondente do ligando. Estão denotados os comprimentos de onda em que ocorrem as bandas características de cada complexo.

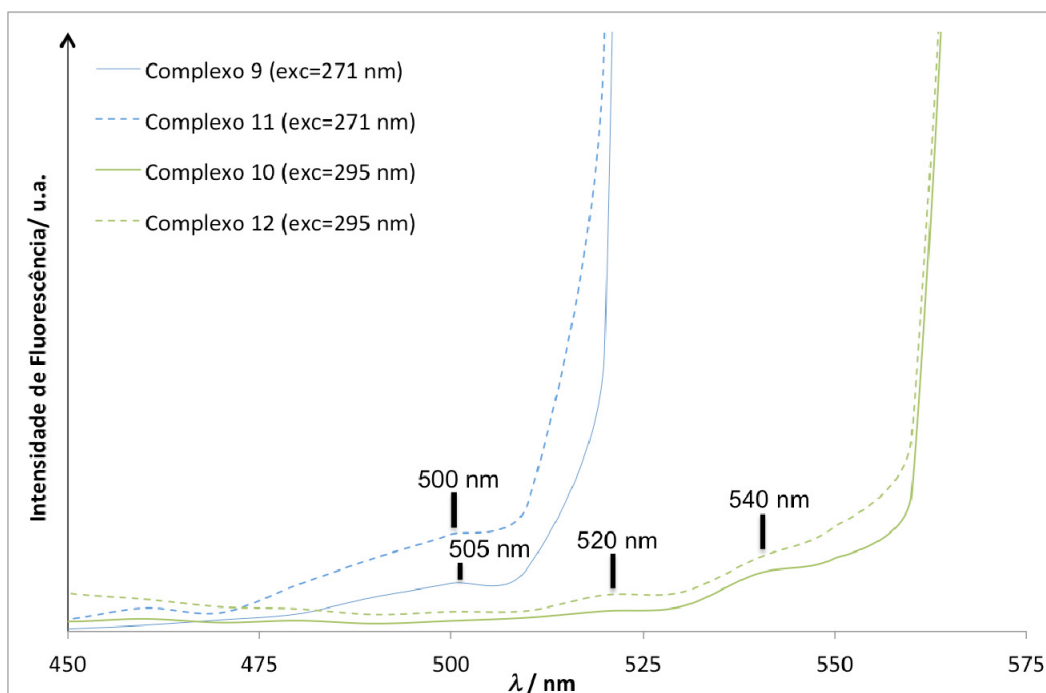


Figura 39. Espectro de fluorescência dos complexos do tipo I de *Tb* ($50 \mu\text{M}$), em que o comprimento de onda de excitação utilizado foi o correspondente do ligando. Estão denotados os comprimentos de onda em que ocorrem as bandas características de cada complexo.

Observando a Figura 38, referente aos resultados dos complexos do tipo I de *Eu*, confirma-se a maior intensidade de fluorescência para os complexos bimetálicos. A razão desta maior intensidade de fluorescência prende-se com o facto do comprimento de onda de excitação utilizado (271 e 295 nm) provocar uma transferência de energia mais eficiente nos complexos bimetálicos, devido à reorganização dos níveis energéticos. Comparando os diferentes complexos, o espectro do complexo **C1** tem uma intensidade muito baixa, acabando por ter um pico próximo dos 510 nm, isto comparativamente ao complexo **C3**, que tem um pico próximo dos 500 nm, ou seja, em zonas mais energéticas, e com maior intensidade. Quanto aos complexos **C2/C4**, as diferenças observadas são apenas na intensidade de fluorescência, sendo maior para o complexo bimetálico (**C4**), tendo ambos picos aos 540 e 550 nm.

Quanto aos complexos do tipo I de *Tb* (Figura 39), os espectros obtidos estão em concordância com os resultados discutidos acima, ou seja, para os complexos bimetálicos observa-se uma maior intensidade de fluorescência, devido aos efeitos discutidos no parágrafo anterior. Para os complexos **C9/C11**, os picos máximos ocorreram aos 500 e 505 nm, respectivamente, sendo por isso muito semelhantes. Em relação aos complexos **C10/C12**, os picos máximos ocorreram aos 520 e 540 nm.

4. Conclusão

O presente trabalho teve como objectivo desenvolver complexos metálicos que poderiam ter uma acção terapêutica de duas vertentes, a primeira sendo um agente de imagiologia (biosonda) devido ao metal presente (*Eu* ou *Tb*) e uma segunda em que seria uma molécula preventiva do cancro, através de uma actuação específica em células cancerígenas. A utilização de complexos metálicos com uma acção terapêutica anticancerígena ou como biosondas já tinha sido proposta por diversos autores^{42,61,69}, tendo sido obtidos resultados bastante promissores.

Tendo estes resultados em mente, foi idealizada a construção de complexos de *Eu* e de *Tb* que conseguissem ter ambas as funções. No que diz respeito ao porquê da utilização de lantanídeos para as propriedades luminescentes, este tipo de complexos foram aqueles que têm obtido melhores resultados ao longo dos últimos anos^{10,16,42}, com elevados rendimentos quânticos de fluorescência, grandes desvios de Stokes e decaimentos lentos. Os complexos foram sintetizados segundo a bibliografia existente⁷⁷, sendo escolhida a 2,2'-*bpy* como molécula orgânica que funcionaria como *antena* para o aumento da eficiência da transferência de energia para o *Ln* utilizado, e sendo escolhidos quatro ligandos diferentes, que em primeira instância funcionariam para saturar a esfera de coordenação do metal, e numa outra circunstância serviriam para recrutar cobre junto das células. É o recrutamento de *Cu* junto das células cancerígenas que permite a acção terapêutica junto das mesmas, já que inibe a sua proliferação e provoca a morte celular^{75,89}. Este metal é essencial para a angiogénese (através do recrutamento de factores de crescimento), processo que permite o crescimento das células tumorais e posteriormente a sua proliferação em larga escala^{53,54}. Para além desta função, foi também identificado uma outra função para com o proteassoma (que se encontra mais activo em células tumorais), que se prende com a inibição deste complexo multienzimático, principalmente da subunidade 20S, o que leva à apoptose celular^{63,73}, através da acumulação de proteínas poliubiquitinadas.

Foram então sintetizados complexos metálicos com os diferentes ligandos escolhidos (L1-L4), quer para *Eu* quer para *Tb*, e foram caracterizados com técnicas de espectroscopia vibracional, no sentido de confirmar a estrutura por estes sugerida nas Figuras 14 e 15. Os complexos correspondentes em que o ligando se encontra coordenado a *Cu* permitem estudar o efeito dos complexos quando já coordenados, simulando assim a sua possível acção terapêutica. A espectroscopia de FTIR e de Raman são técnicas essenciais para a identificação dos modos de vibração específicos das ligações existentes nas diferentes moléculas sintetizadas^{78,80}. Através da identificação de modos de vibração de C-H e CC dos aromáticos, C=N, C=O, C-O e O-H conseguiu-se concluir que os complexos tinham a estrutura proposta anteriormente. Um fenómeno observado especificadamente na espectroscopia de Raman foi a emissão de fotões por parte dos complexos que possuíam *Cu* (Figuras 18-21), ou seja, no lugar de difundir os fotões tal como era suposto na técnica, estes emitiam, simulando um estado de fluorescência imaginário, o que indicou claramente que estes complexos tinham propriedades luminescentes.

Em seguida, já depois de confirmada a estrutura dos complexos, foram estudadas as propriedades espectroscópicas de UV/Vis e de Fluorescência dos

mesmos. Antes destes estudos, os complexos sem *Cu* foram expostos a uma lâmpada de UV de 365 nm que confirmou a emissão de luz por parte dos complexos, tendo-se observado que **C2** e **C9** eram os que emitiam mais luz visível, e foram também obtidos os espectros de UV/Vis dos ligandos e da *antena*, necessários para os seguintes estudos. Os estudos de absorvência indicaram que para os complexos sem *Cu*, estes tinham um espectro semelhante ao da *antena*, o que indica que a transferência de energia ocorre preferencialmente para o metal, enquanto que o espectro dos complexos com *Cu* tinham sempre um padrão semelhante aos ligandos presentes, indicando que ocorre reorganização dos níveis energéticos após a coordenação de *Cu* (Figuras 24 e 25). Para além destes resultados, foi realizada uma titulação de *Cu* com recurso à espectroscopia de UV/Vis (Figuras 26 e 27), que confirmou o descrito acima. Ou seja, à medida que a concentração de *Cu* aumenta, o complexo bimetálico vai sendo formado (aumenta a concentração na solução) e como tal, detectam-se os respectivos níveis energéticos deste novo complexo. Os resultados de UV/Vis permitiram assim concluir que os complexos têm dois comportamentos espectroscópicos diferentes, um com e outro sem *Cu*, o que permitirá assim identificar os complexos no organismo por técnicas de imagiologia antes e depois de actuarem nas células alvo, e confirmaram que os complexos conseguem recrutar cobre, mesmo quando em concentrações muito inferiores.

Quanto à espectroscopia de fluorescência, foram tomados dois caminhos diferentes neste tipo de estudos, diferenciando os dois estudos nos comprimentos de onda de excitação utilizados. Inicialmente foram utilizados os comprimentos de onda em que os ligandos absorviam com menor energia associada (Quadro 1), isto com o objectivo de confirmar que os complexos em que os ligandos estavam coordenados a *Cu* sofriam alterações na organização dos níveis energéticos, levando assim a propriedades diferentes. Nas Figuras 28 e 29, observou-se que a intensidade para os complexos bimetálicos era maior, comparativamente aos complexos monometálicos, tal como era esperado. Numa outra análise, os comprimentos de onda utilizados para a excitação dos complexos foram os de maior absorção por parte dos complexos (282 e 300 nm), de forma a estudar a fluorescência relativa do *Ln* utilizado. Destes resultados, conclui-se que os complexos com maior intensidade de fluorescência foram **C2** e **C9**, tendo sido feitos estudos mais pormenorizados para estes complexos e para os respectivos complexos com *Cu*, **C4** e **C11** (Figuras 32 e 33). Novamente, os resultados confirmavam o que já tinha sido observado, isto é, os complexos sem *Cu* neste caso tinham uma maior intensidade de fluorescência, contrariamente aos complexos com *Cu* que tinham uma intensidade muito menor. Conclui-se assim que existe a possibilidade de utilizar os complexos sintetizados como biosondas, existindo uma forma de os distinguir antes e após actuação nas células cancerígenas, já que os complexos quando coordenados a *Cu* alteram os seus níveis energéticos, modificando assim as suas propriedades de absorção e emissão dos complexos.

A confirmação da possível utilização dos complexos como biosondas permitiu avançar com o estudo dos complexos, agora em meio celular, de forma a ser avaliado o comportamento dos mesmos. Foram escolhidas duas linhas celulares, células *HeLa*

e *A549*, e foi observada a influência dos complexos na viabilidade celular (Figuras 34, 35, S4 e S5 para células *HeLa* e Figuras 36, 37, S6 e S7 para células *A549*). Observando os resultados obtidos, os complexos monometálicos não influenciaram a viabilidade celular, mas os complexos com *Cu* diminuíram a viabilidade, tendo sido posteriormente calculado o valor de IC_{50} para os últimos (Quadro 4). Destes valores calculados, observou-se que os complexos actuavam de forma diferente consoante o tipo de linha celular e o tipo de *Ln* presente no complexo, mas ainda assim os complexos de *Tb* obtiveram melhores resultados nas células *HeLa*, enquanto que os complexos de *Eu* resultaram de uma melhor forma nas células *A549*. Conclui-se assim que os complexos conseguem actuar junto das células cancerígenas, quando coordenados a *Cu*, de forma a inibirem o crescimento e proliferação das mesmas, possivelmente porque inibem a subunidade 20S do proteassoma, levando à acumulação de proteínas poliubiquitinadas e posteriormente à apoptose. Para confirmar esta acção por parte dos complexos, são necessários mais estudos que irão ser discutidos na secção 4.1.

Finalmente, foram estudadas as propriedades de fluorescência dos complexos em meio celular, para assim concluir se estas eram ou não alteradas (Figuras 38, 39, S8 e S9), utilizando como comprimentos de onda de excitação os que são específicos dos ligandos (Quadro 1). Os resultados obtidos corroboraram os que foram discutidos para os complexos em solução, isto é, quando excitados nestes comprimentos de onda, os complexos bimetálicos têm uma maior intensidade de fluorescência em relação aos monometálicos, indicando que existe uma alteração dos níveis energéticos dos complexos.

Assim sendo, conclui-se que os complexos de *Eu* e *Tb* podem ter duas funções terapêuticas, uma como biosondas e uma outra como moléculas utilizadas no tratamento do cancro. Como biosondas porque possuem propriedades fluorescentes óptimas, através da utilização de *Ln*, confirmadas por diversos autores. Como moléculas anticancerígenas, estes complexos recrutam *Cu* junto das células tumorais, devido à elevada concentração deste ião neste tipo de células, inibindo a angiogénese. Quando já coordenados ao metal, possivelmente os complexos actuam ao nível da subunidade 20S do proteassoma, que se encontra mais activo em células tumorais, promovendo a acumulação de proteínas poliubiquitinadas, e provocando apoptose.

4.1 Perspectivas Futuras

O trabalho desenvolvido permitiu demonstrar que os complexos sintetizados poderão ter duas funções terapêuticas, uma como biosondas e outra como agentes antitumorais. Embora algumas destas propriedades já tinham sido observadas nos estudos realizados, são necessárias experiências adicionais que permitirão confirmar estas mesmas propriedades.

Para confirmar que os complexos sintetizados sem *Cu* não afectam a proliferação celular em células normais, serão testadas linhas celulares de fibroblastos. Mais, serão testadas linhas celulares de células cancerígenas diferentes

das já testadas, como *MCF-7* (cancro da mama) e *LNCap* (adenocarcinoma da próstata), com o objectivo de compreender as diferenças no modo de actuação dos complexos em diferentes tipos de células.

Outras experiências adicionais possíveis consistem no estudo do recrutamento por parte dos complexos de outros metais, como zinco (*Zn*), cobalto (*Co*), entre outros. Esta experiência permitirá entender a força do recrutamento por parte dos complexos, inferindo-se assim de outras possíveis acções terapêuticas. Ainda dentro deste tema, a aplicação dos complexos em linhas celulares que sejam alimentadas por meios suplementados de cobre, permitirá avaliar até que ponto os mesmos conseguem recrutar *Cu* junto das células, e não somente em solução *in vitro*.

Relativamente à possível acção terapêutica, para assegurar que os complexos de *Cu* actuam ao nível do proteassoma, inibindo a subunidade 20S, poderão ser feitos estudos de identificação de proteínas poliubiquitinadas e de marcadores de apoptose (*western blot*). Se os complexos actuarem tal como foi descrito, observar-se-á uma acumulação de proteínas poliubiquitinadas quando são aplicados os complexos de *Cu*, e identificar-se-á marcadores específicos de apoptose como a Poli ADP ribose polimerase (PARP).

Finalmente, um outro estudo que poderá ser elaborado será com organismos *in vivo*. Devido ao facto dos complexos serem muito fluorescentes, o organismo proposto seria *Danio rerio* (peixe zebra) que permitirá monitorizar a forma de actuação dos complexos e também o tipo de células em que actuarão, devido à sua transparência. Uma parte interessante deste estudo seria administrar os complexos na forma de suplemente alimentar.

5. Bibliografia

1. S. Cotton, *Lanthanide and Actinide chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, U.K., Sixth Edit., 2006.
2. N. N. Greenwood and A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, Reed Educational and Professional Publishing Ltd, Leeds, U.K., Second Edi., 1997.
3. H. B. Kagan, M. Sasaki, and J. Collin, *Pure & Applied Chemistry*, 1988, **60**, 1725–30.
4. J.-C. G. Bünzli and C. Piguet, *Chemical Society Reviews*, 2005, **34**, 1048–77.
5. J. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer Science+Business Media, LLC, Baltimore, Maryland, USA, Third Edit., 2006.
6. F. Richardson, *Chemical Reviews*, 1982, **82**, 541–52.
7. N. Sabbatini and M. Guardigli, *Coordination Chemistry Reviews*, 1993, **123**, 201–23.
8. G. R. Choppin and D. R. Peterman, *Coordination Chemistry Reviews*, 1998, **174**, 283–99.
9. G. F. de Sa, O. L. Malta, C. M. Donegá, A. M. Simas, R. L. Longo, P. A. Santa-Cruz, and E. F. de Silva, *Coordination Chemistry Reviews*, 2000, **196**, 165–95.
10. H. Xu, K. Yin, and W. Huang, *Chemistry European Journal*, 2007, **13**, 10281–93.
11. H. Xu, K. Yin, and W. Huang, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2010, **114**, 1674–83.
12. V. Divya, R. O. Freire, and M. L. P. Reddy, *Dalton Transactions*, 2011, **40**, 3257–68.
13. P. P. Lima, M. M. Nolasco, F. A. A. Paz, R. A. S. Ferreira, R. L. Longo, O. L. Malta, and L. D. Carlos, *Chemistry of Materials*, 2013, **25**, 586–98.
14. S. M. Bruno, R. A. Sá Ferreira, L. D. Carlos, M. Pillinger, P. Ribeiro-Claro, and I. S. Gonçalves, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, **113**, 453–62.
15. H. Wang, Y. Ma, H. Tian, N. Tang, W. Liu, Q. Wang, and Y. Tang, *Dalton Transactions*, 2010, **39**, 7485–92.

16. L. Huang, B. Q. Ma, C.-H. Huang, T. C. W. Mak, G.-Q. Yao, and G.-X. Xu, *Journal of Coordination Chemistry*, 2001, **54**, 95–103.
17. A. Thibon and V. C. Pierre, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, **394**, 107–20.
18. T. Steinkamp and U. Karst, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, **380**, 24–30.
19. H. Xu and W. Huang, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2011, **217**, 213–18.
20. K. Mori, K. Watanabe, K. Fuku, and H. Yamashita, *Chemistry European Journal*, 2012, **18**, 415–18.
21. K. Nakamura, Y. Hasegawa, H. Kawai, N. Yasuda, N. Kanehisa, Y. Kai, T. Nagamura, S. Yanagida, and Y. Wada, *The Journal of Physical Chemistry A*, 2007, **111**, 3029–37.
22. H. Xu, K. Yin, and W. Huang, *Chemphyschem: a European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, 2008, **9**, 1752–60.
23. A. K. Hagan and T. Zuchner, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, **400**, 2847–64.
24. H. Xu, R. Zhu, P. Zhao, L.-H. Xie, and W. Huang, *Polymer*, 2011, **52**, 804–13.
25. Y. Li, B. Yan, and H. Yang, *Journal of Physical Chemistry C*, 2008, **112**, 3959–68.
26. Y. Li and B. Yan, *Journal of Fluorescence*, 2009, **19**, 191–201.
27. X. Guo, L. Fu, H. Zhang, L. D. Carlos, C. Peng, J. Guo, J. Yu, R. Deng, and L. Sun, *New Journal of Chemistry*, 2005, **29**, 1351–58.
28. J. Gałęzowska, R. Janicki, H. Kozłowski, A. Mondry, P. Młynarz, and Ł. Szyrwił, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2010, **2010**, 1696–1702.
29. I. L. Fedushkin, O. V. Maslova, A. N. Lukoyanov, and G. K. Fukin, *Comptes Rendus Chimie*, 2010, **13**, 584–92.
30. I. L. Fedushkin, O. V. Maslova, M. Hummert, and H. Schumann, *Inorganic Chemistry*, 2010, **49**, 2901–10.

31. D. Maffeo and J. A. G. Williams, *Inorganica Chimica Acta*, 2003, **355**, 127–36.
32. S. Gago, J. A. Fernandes, J. P. Rainho, R. A. Sá Ferreira, M. Pillinger, A. A. Valente, T. M. Santos, L. D. Carlos, P. J. A. Ribeiro-Claro, and I. S. Gonçalves, *Chemistry of Materials*, 2005, **17**, 5077–84.
33. H. Härmä, C. Graf, and P. Hänninen, *Journal of Nanoparticle Research*, 2008, **10**, 1221–24.
34. S. M. Bruno, R. A. S. Ferreira, F. A. Almeida Paz, L. D. Carlos, M. Pillinger, P. Ribeiro-Claro, and I. S. Gonçalves, *Inorganic Chemistry*, 2009, **48**, 4882–95.
35. C. Peng, H. Zhang, J. Yu, Q. Meng, L. Fu, H. Li, L. Sun, and X. Guo, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, **109**, 15278–87.
36. S. M. Bruno, A. C. Coelho, R. a. S. Ferreira, L. D. Carlos, M. Pillinger, A. a. Valente, P. Ribeiro-Claro, and I. S. Gonçalves, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2008, **24**, 3786–95.
37. P. Bag, U. Flörke, and K. Nag, *Dalton Transactions*, 2006, 3236–48.
38. H. Xu, K. Yin, and W. Huang, *Synthetic Metals*, 2010, **160**, 2197–2202.
39. J. Chan, S. C. Dodani, and C. J. Chang, *Nature Chemistry*, 2012, **4**, 973–84.
40. G. Lukinavicius, K. Umezawa, N. Olivier, A. Honigmann, G. Yang, T. Plass, V. Mueller, L. Reymond, I. R. Corrêa, Z.-G. Luo, C. Schultz, E. A. Lemke, P. Heppenstall, C. Eggeling, S. Manley, and K. Johnsson, *Nature Chemistry*, 2013, **5**, 132–39.
41. S. Pandya, J. Yu, and D. Parker, *Dalton Transactions*, 2006, 2757–66.
42. C. P. Montgomery, B. S. Murray, E. J. New, R. Pal, and D. Parker, *Accounts of Chemical Research*, 2009, **42**, 925–37.
43. H. K. Biesalski, B. B. De Mesquita, A. Chesson, F. Chytil, R. Grimble, R. J. J. Hermus, J. Kohrle, R. Lotan, K. Norpoth, U. Pastorino, and D. Thurnham, *Cancer Journal Clinics*, 1998, **48**, 316–322.
44. S. F. Moss and M. J. Blaser, *Nature Clinical Practice: Oncology*, 2005, **2**, 90–7.
45. C. M. Croce, *The New England Journal of Medicine*, 2008, **358**, 502–11.

46. R. Perona, *Clinical & Translational Oncology*, 2006, **8**, 77–82.
47. E. Witsch, M. Sela, and Y. Yarden, *Physiology*, 2010, **25**, 85–101.
48. D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell*, 2011, **144**, 646–74.
49. N. A. Bhowmick, E. G. Neilson, and H. L. Moses, *Nature*, 2004, **432**, 332–37.
50. B. M. Lichtenberger, P. K. Tan, H. Niederleithner, N. Ferrara, P. Petzelbauer, and M. Sibilis, *Cell*, 2010, **140**, 268–79.
51. M. M. Eatock, A. Schätzlein, and S. B. Kaye, *Cancer Treatment Reviews*, 2000, **26**, 191–204.
52. D. Hanahan and J. Folkman, *Cell*, 1996, **86**, 353–64.
53. G. J. Brewer, *Experimental Biology and Medicine*, 2001, **226**, 665–73.
54. J. P. Dutcher, *Current Oncology Reports*, 2001, **3**, 353–58.
55. M. Cristofanilli, C. Charnsangavej, and G. N. Hortobagyi, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, **1**, 415–26.
56. J. E. Talmadge and I. J. Fidler, *Cancer Research*, 2010, **70**, 5649–69.
57. R. Mathew, V. Karantza-Wadsworth, and E. White, *Nature Reviews Cancer*, 2007, **7**, 961–67.
58. L. Galluzzi and G. Kroemer, *Cell*, 2008, **135**, 1161–63.
59. S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson, and G. G. Poirier, *Cancer Research*, 1993, **53**, 3976–85.
60. J. M. Adams and S. Cory, *Oncogene*, 2007, **26**, 1324–37.
61. S. S. Hindo, M. Frezza, D. Tomco, M. J. Heeg, L. Hryhorczuk, B. R. McGarvey, Q. P. Dou, and C. N. Verani, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, **44**, 4353–61.
62. Z. Zhang, C. Bi, D. Buac, Y. Fan, X. Zhang, J. Zuo, and P. Zhang, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2013, **123**, 1–10.
63. J. Adams, V. J. Palombella, E. A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D. D. Lazarus, J. Maas, C. S. Pien, S. Prakash, and P. J. Elliott, *Cancer Research*, 1999, **59**, 2615–22.

64. S. Schmitt and Q. Dou, *Journal Pharmacovigilance*, 2013, 1–3.
65. H. C. A. Drexler, *Cell Biology*, 1997, **94**, 855–60.
66. K. Shinohara, M. Tomioka, H. Nakano, S. Toné, H. Ito, and S. Kawashima, *Biochemical Journal*, 1996, **317**, 385–88.
67. S. Adsule, V. Barve, D. Chen, F. Ahmed, Q. P. Dou, S. Padhye, and F. H. Sarkar, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, **49**, 7242–46.
68. J. Zuo, C. Bi, Y. Fan, D. Buac, C. Nardon, K. G. Daniel, and Q. P. Dou, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2013, **118**, 83–93.
69. D. Chen, M. Frezza, R. Shakya, Q. C. Cui, V. Milacic, C. N. Verani, and Q. P. Dou, *Cancer Research*, 2007, **67**, 9258–65.
70. E. J. Margalioth, J. G. Schenker, and M. Chevion, *Cancer*, 1983, **52**, 868–72.
71. K. G. Daniel, D. Chen, B. Yan, and Q. P. Dou, *Frontiers in Bioscience*, 2007, **12**, 135–44.
72. S. Labbé and D. J. Thiele, *Trends in Microbiology*, 1999, **7**, 500–05.
73. D. Chen, F. Peng, Q. C. Cui, K. G. Daniel, S. Orlu, J. Liu, and Q. P. Dou, *Frontiers in Bioscience*, 2005, **10**, 2932–39.
74. T. Theophanides and J. Anastassopoulou, *Oncology Hematology*, 2002, **42**, 57–64.
75. K. G. Daniel, P. Gupta, R. H. Harbach, W. C. Guida, and Q. P. Dou, *Biochemical Pharmacology*, 2004, **67**, 1139–51.
76. S. Zhai, L. Yang, Q. C. Cui, Y. Sun, Q. P. Dou, and B. Yan, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2010, **15**, 259–69.
77. H. Xu, R. Zhu, P. Zhao, and W. Huang, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011, **115**, 15627–38.
78. J. M. Chalmers and P. R. Griffiths, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, U.K., 2002.
79. J. J. C. Teixeira-Dias, *Espectroscopia Molecular: fundamentos, métodos e aplicações*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1986.

80. D. A. Long, *Raman Spectroscopy*, McGraw-Hill International Book Company, New York, 1977.
81. E. A. V. Ebsworth, D. W. H. Rankin, and S. Cradock, *Structural Methods in Inorganic Chemistry*, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Second Edi., 1991.
82. J. M. Hollas, *Modern Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, U.K., Fourth Edi., 2004.
83. M. Reichenbacher and J. Popp, *Challenges in Molecular Structure Determination*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012.
84. T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods*, 1983, **65**, 55–63.
85. I. J. Marques, *Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa*, 2013.
86. M. M. Nolasco, A. M. Amado, and P. J. A. Ribeiro-Claro, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2009, **40**, 687–95.
87. P. J. A. Ribeiro-Claro, A. M. Amorim da Costa, M. L. Vueba, M. E. Pina, and A. M. Amado, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006, **37**, 472–79.
88. L. R. Nassimbeni, *CrystEngComm*, 2003, **5**, 200–03.
89. K. G. Daniel, D. Chen, S. Orlu, Q. C. Cui, F. R. Miller, and Q. P. Dou, *Breast Cancer Research : BCR*, 2005, **7**, 897–908.

6. Anexos

6.1 Síntese e caracterização dos Complexos (C1-C16)

6.1.1 Espectroscopia de UV/Vis

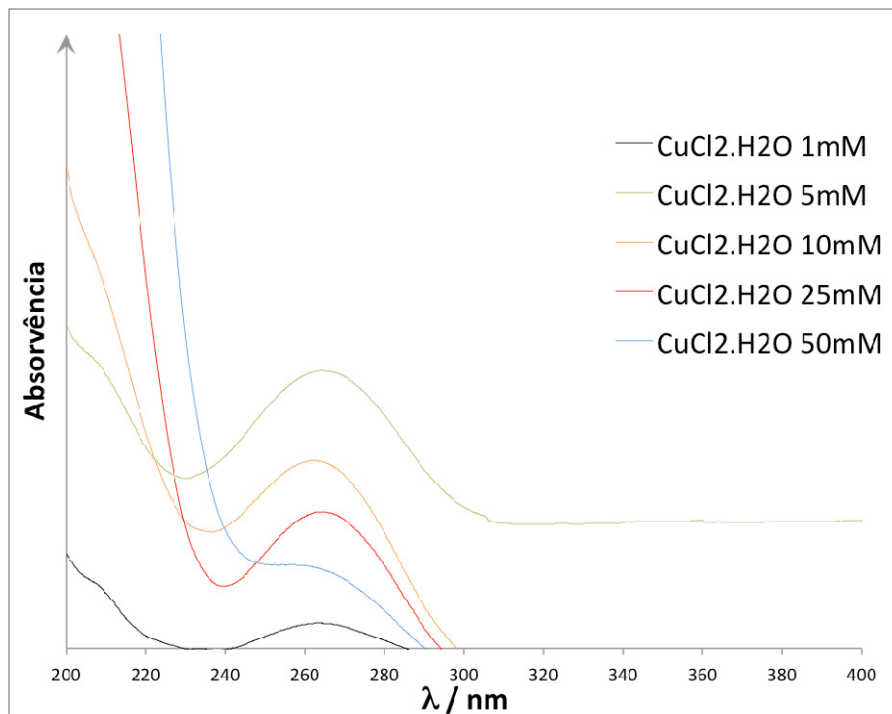


Figura S1. Espectro de UV/Vis das diferentes concentrações utilizadas de CuCl₂.H₂O na titulação do metal nos diferentes complexos, com máximo de absorvência aos 265 nm.

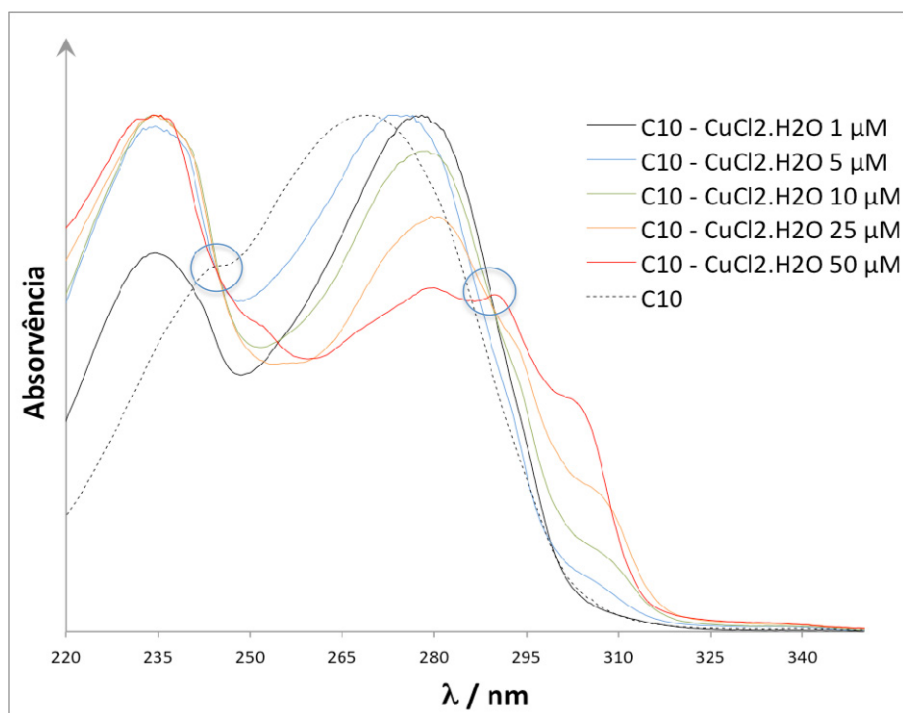


Figura S2. Espectro normalizado de absorção para a titulação de Cu no complexo C10 corrigidos para a polaridade de solvente, com indicação dos dois pontos isobásticos.

6.1.2 Espectroscopia de Fluorescência

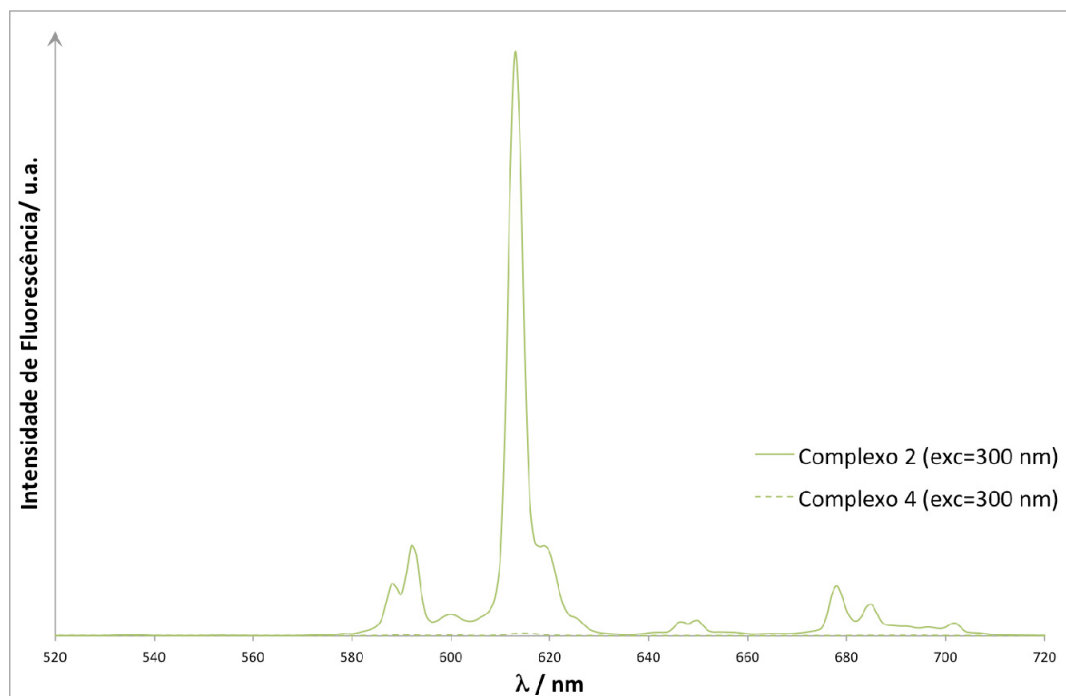


Figura S3. Espectro de emissão dos complexos de *Eu* C2 (sem *Cu*) e C4 (com *Cu*), com excitação aos 300 nm.

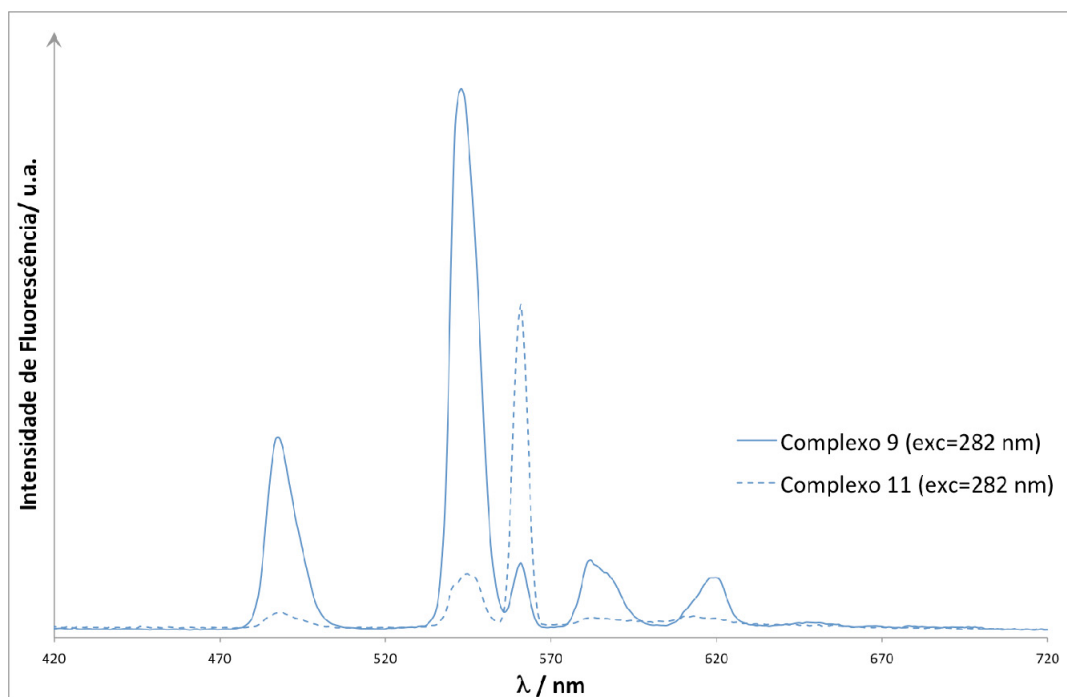


Figura S4. Espectro de emissão dos complexos de *Tb* C9 (sem *Cu*) e C11 (com *Cu*), com excitação aos 282 nm.

6.2 Ensaio celulares *in vitro*

6.2.1 Citotoxicidade em células *HeLa*

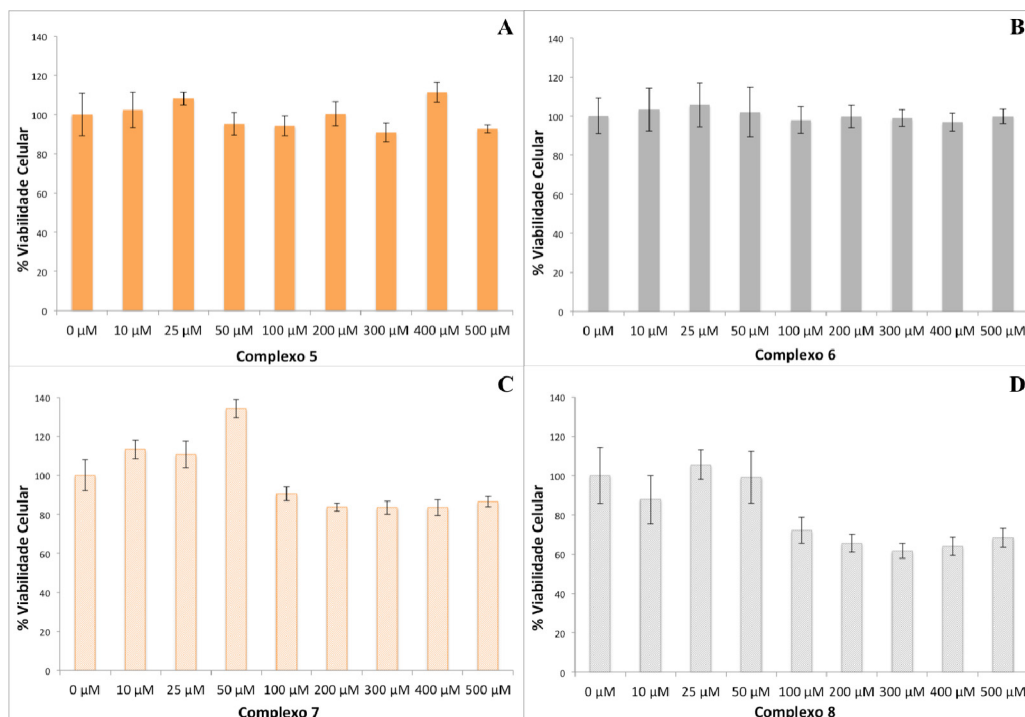


Figura S5. Estudos de viabilidade celular obtidos para os complexos do tipo II de *Eu* (A – C5, B – C6, C – C7 e D – C8) em células *HeLa*. O controlo utilizado foi meio de crescimento suplementado.

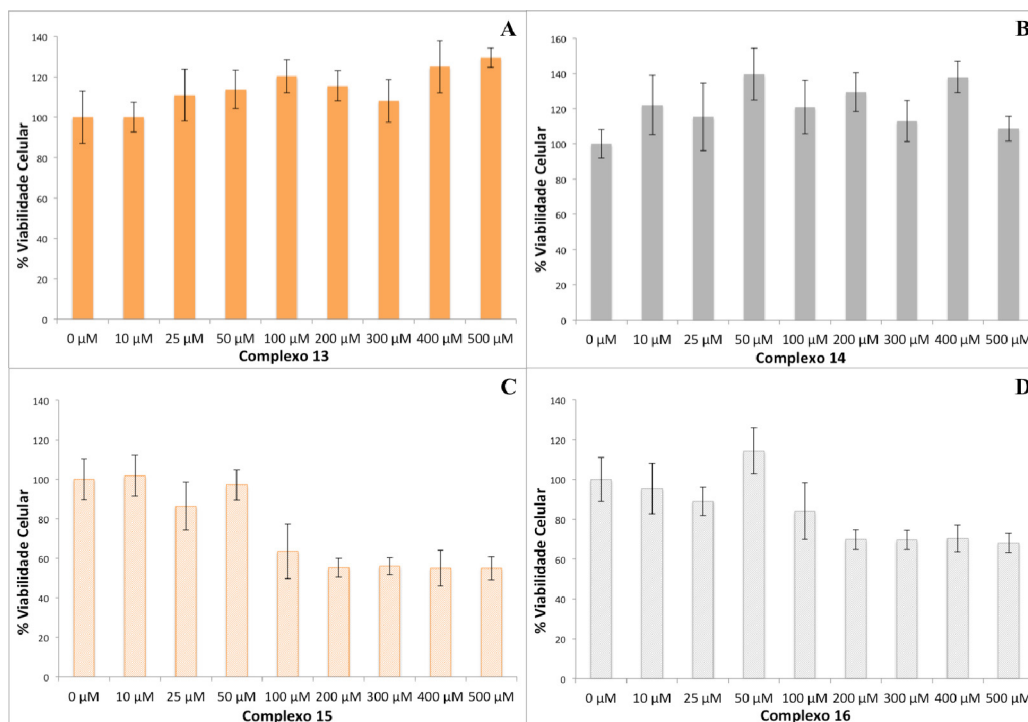


Figura S6. Estudos de viabilidade celular obtidos para os complexos do tipo II de *Tb* (A – C13, B – C14, C – C15 e D – C16) em células *HeLa*. O controlo utilizado foi meio de crescimento suplementado.

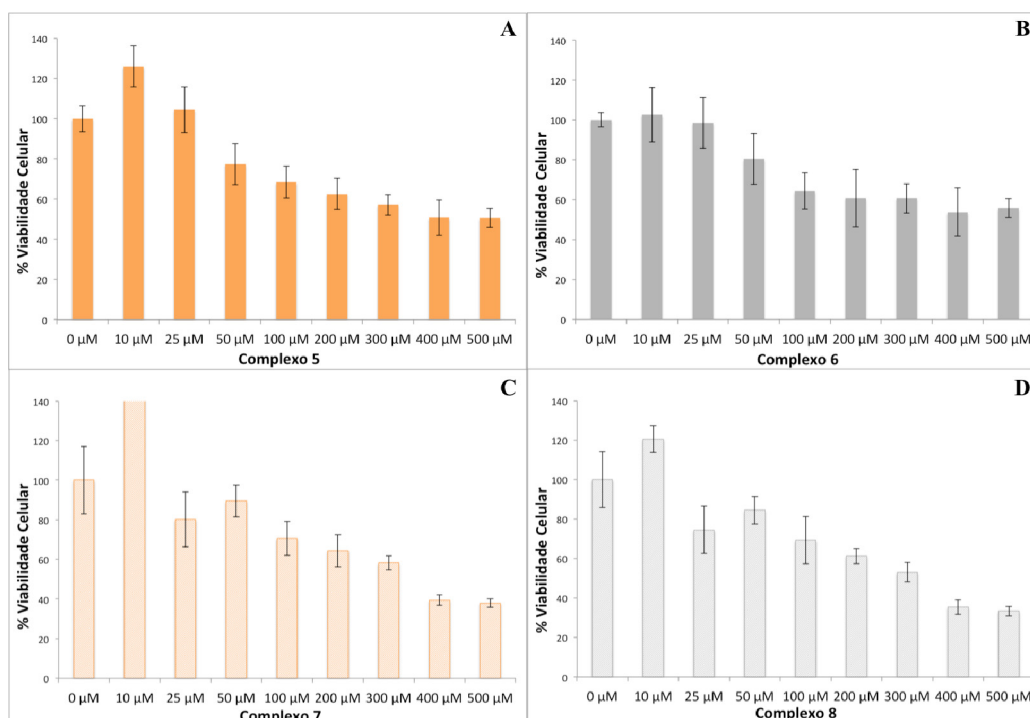
6.2.2 Citotoxicidade em células *A549*

Figura S7. Estudos de viabilidade celular obtidos para os complexos do tipo II de *Eu* (A – C5, B – C6, C – C7 e D – C8) em células *A549*. O controlo utilizado foi meio de crescimento suplementado.

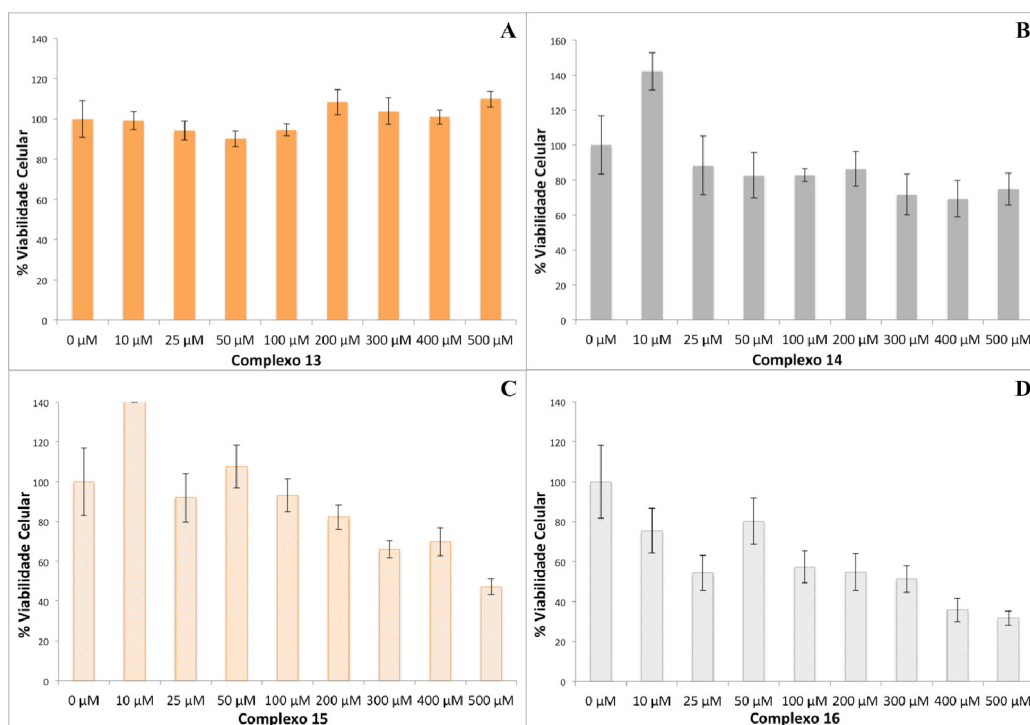


Figura S8. Estudos de viabilidade celular obtidos para os complexos do tipo II de *Tb* (A – C13, B – C14, C – C15 e D – C16) em células *A549*. O controlo utilizado foi meio de crescimento suplementado.

6.2.3 Fluorescência em meio celular

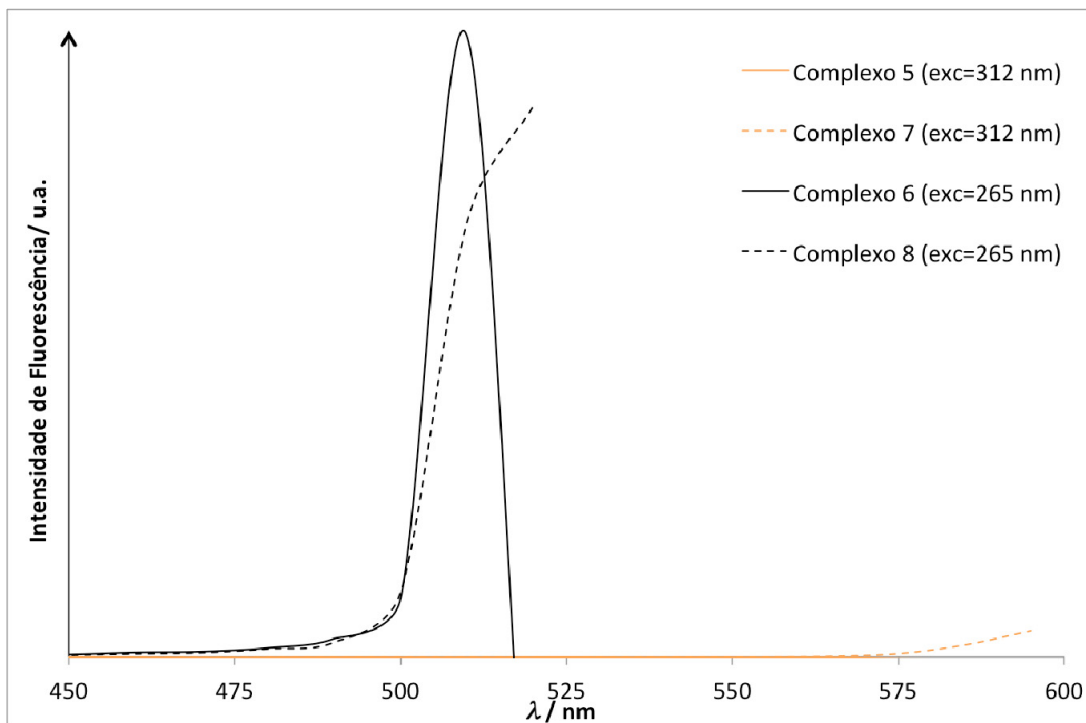


Figura S9. Espectro de fluorescência dos complexos do tipo II de *Eu*, em que o comprimento de onda de excitação utilizado foi o correspondente do ligando.

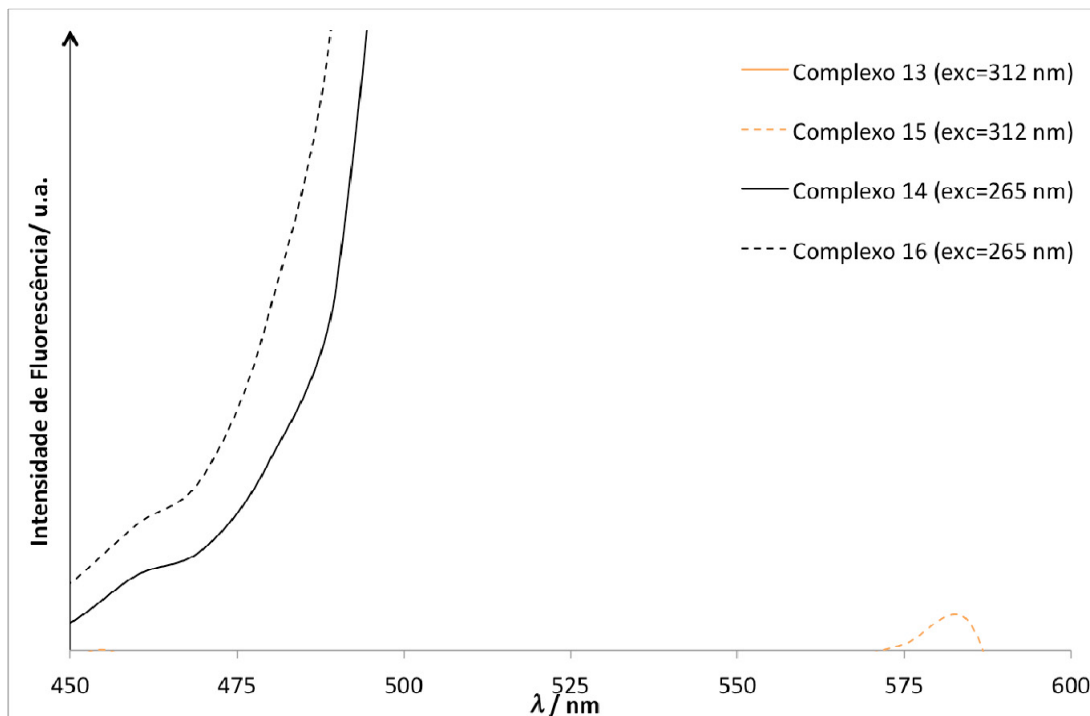


Figura S10. Espectro de fluorescência dos complexos do tipo II de *Tb*, em que o comprimento de onda de excitação utilizado foi o correspondente do ligando.

