

Paula Cristina Afonso Baía

**Complexos metálicos de glicoconjugados
para aplicações biomédicas**

Universidade do Minho

Escola de Ciências

Braga 2004

Paula Cristina Afonso Baía

Complexos metálicos de glicoconjugados para aplicações biomédicas

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Química (Especialização
em Ensino)

**Universidade do Minho
Departamento de Química
Braga 2004**

Agradecimentos

Importa salientar que tudo quanto decorreu ao longo da realização deste trabalho se deveu à colaboração e à amizade indispensáveis de todos os que, de forma directa ou indirecta, me apoiaram durante este percurso.

Nunca será demais destacá-los e agradecer a todos.

Ao Professor Doutor José Alberto Martins e ao Professor Doutor João Paulo André, orientadores desta dissertação.

À Susana Torres, pela sua preciosa ajuda em laboratório, pelas excelentes sugestões de escrita e pela sua boa disposição e companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Química, técnicos e administrativos, pelo apoio prestado, tanto no laboratório como a nível burocrático.

Aos elementos do Conselho Executivo da Escola EB 2,3/S de Lanheses e da Escola EB 2,3 de Viana do Castelo pelas facilidades concedidas, a nível de horário escolar, permitindo assim a concretização deste projecto.

Aos colegas de escola e aos alunos, pela compreensão, simpatia e carinho que demonstraram ao longo de todo o ano, mesmo se por vezes não lhes dei a devida atenção, quero agradecer e dizer que nunca os esquecerei.

À minha querida amiga Marlene Martins, pelo seu inestimável apoio e por me ter feito acreditar que era capaz de chegar ao fim.

À minha amiga Dulce pela sua preciosa colaboração.

Ao Castilho e ao Filipe pela assistência informática.

Aos meus amigos, Janine, Rui e Paulo, pelo seu inestimável apoio e incentivo.

A todos os meus amigos, que por serem tantos é impossível especificar todos, agradeço a paciência e o encorajamento que me deram nos momentos mais difíceis.

À minha querida irmã, pelo seu contínuo apoio e incentivo e por acreditar em mim.

Aos meus queridos pais, pelo permanente incentivo, apoio, carinho e compreensão que mais uma vez souberam transmitir e demonstrar e por tantas outras razões que seria impossível enumerar aqui...

A todos o meu muito obrigado!

RESUMO

Nos últimos anos tem-se registado um aumento no número de novos casos de cancro de fígado. A imagiologia do fígado é uma ferramenta essencial para o diagnóstico e prognóstico clínico. Existem no mercado vários agentes de contraste para imagiologia por ressonância magnética (IRM) do fígado, no entanto poucos são os que mostram especificidade para hepatócitos.

Uma vez que a galactose é reconhecida e internalizada pelo receptor de asialoglicoproteína (lectina expressa em hepatócitos) este trabalho consistiu na síntese de glicoconjugados do ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) com diferentes açúcares (glucose, galactose e lactose), com diferentes valências (1,2,4 e 8) e no estudo dos complexos com iões lantanídeos (Ln(III)). Os glicoconjugados sintetizados foram caracterizados por métodos espectroscópicos (RMN, espectrometria de massa).

Os estudos de caracterização físico-química dos complexos de Ln(III), nomeadamente La(III), Sm(III) e Eu(III), com os ligandos DTPA(Gal)₂, DTPA(Lac)₂, e DTPA(Gal)₄ em D₂O, a pH 7,5, a várias temperaturas foram efectuados por RMN de ¹H. A relaxividade do complexo Gd-DTPA(Lac)₂ foi determinada recorrendo à técnica de dispersão de relaxação magnética nuclear (DRMN). Determinaram-se os parâmetros que regulam a relaxividade.

ABSTRACT

In the last few years there has been an increase in the cases of liver cancer. Liver imagiology is of paramount importance for the clinical diagnosis and prognosis. There are some contrast agents available in the market for Magnetic Resonance imagiology (MRI). However only few show specificity for hepatocytes.

Since we known that galactose is recognized and internalized by the asialoglicoprotein receptor (hepatocyte expressed lectin), this work consisted of a synthesis of a new class of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) bisamide-linked glycoconjugates of different sugars (glucose, lactose and galactose), with different valences (1, 2, 4 and 8) and in the study of their Ln(III) complexes. The glycoconjugates were characterized both by spectroscopic methods (NMR, Mass Spectrometry).

The physico-chemical characterization of the Ln(III) complexes (La(III), Sm(III) e Eu(III)) of DTPA(Gal)₂, DTPA(Lac)₂ and DTPA(Gal)₄ in D₂O, in aqueous solution at pH 7,5 and at different temperatures, was also performed based on ¹H NRM techniques.

The protonic relaxivity of Gd(III)-DTPA(Lac)₂ was determined, using the nuclear magnetic relation dispersion (NMRD) technique. The parameters that rule the relaxivity were determined.

Lista de abreviaturas

AC – Agentes de Contraste
Ac – Acetato
ASGP – Asialoglicoproteína
ap – aparente
BMA – Bismetilamida
BOPTA – Ácido-4-carboxi-5,8,11-tricarboximetil-1-fenil-2-oxa-5,8,11-triazotridecano-13-óico
Brine – Solução saturada de cloreto de sódio
DCC – 1,3-Diciclohexilcarbodiamida
DCM – Diclorometano
DCU – Diciclohexilureia
dd – Duplo duplete
ddd – duplo duplo duplete
DIPEA – Diisopropiletilamina
DMF – N, N-Dimetilformamida
DOTA – Ácido 1,4,7,10 – tetraazaciclododecano-1,4,7,10 – tetraacético
DPDP – N-N'-1,2-etanodiibis [N-[3-hidroxi-2-metil-5-(fosfonoxilmetil)-4-piridinil] metilglicano]
DTPA – Ácido dietilenotriaminapentaacético
DRMN – Dispersão de relaxação magnética nuclear
DRH – Domínio de reconhecimento de hidratos de carbono
EDTA – Ácido etilenodiaminatetraacético
EOB – Etoxibenzil
EtOH – Etanol
FAB – Fast atom bombardment
Gal – Galactose
GalNAc – N-acetilgalactosamina
GlcNAc – N-Acetilglucosamida
Glc – Glucose
HBT – Hidroxibenzotriazol
HPDO3A – Ácido 1,4,7,10 tetraazaciclododecano-1-(2-hidroxiopropil)-4,7,10 triacético

HRMS – High Resolution Mass Spectrometry
ICP – Inductively Coupled Plasma
IQ – Ionização química
IRM – Imagiologia de Ressonância Magnética
J – Constante de acoplamento
l – Largo
Lac – Lactose
Ln – Lantanídeos
m – Multipleteo
MeCN – Acetonitrilo
MeOH – Metanol
NOTA – Ácido 1, 4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético
q – quarteto
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RES – Sistema retículo endotelial
s – Singleto
TAC – Tomografia Axial Computorizada
^{ter}Bu – Grupo butilo terciário
TFA – Ácido trifluoracético
t – tripleto
ZFS – Separação para campo nulo (zero field splitting)

Índice

Capítulo I

Introdução

1. Introdução	1
2. Ligando DTPA	2
2.1 – Ligação aos iões Ln(III)	3
3. Iões lantanídeos trivalentes	3
3.1- Química de coordenação	4
3.2- Propriedades electrónicas e luminescência	5
3.3- Momento magnético	8
3.4- Reagentes de desvio e de relaxação	9
3.5- Desvios químicos induzidos pelos iões Ln(III)	11
3.5.1- Desvios de contacto	11
3.5.2- Desvios de pseudo-contacto	13
3.6- Relaxação paramagnética	18
3.6.1- Equações de <i>Solomon-Bloembergen</i>	20
3.6.2- Relaxação da água	23
4. Imagiologia de Ressonância Magnética (IRM)	25
4.1 – Agentes de contraste	26
4.2 – Imagiologia do fígado	28
5. Lectinas	32
5.1- Estrutura molecular das lectinas	34
5.1.1- Lectinas simples	35
5.1.2- Lectinas mosaíco	35
5.1.3- Conjuntos macromoleculares	35
5.2- Estrutura das lectinas animais	36

5.3 – Função das lectinas	37
5.3.1- Lectinas microbianas	38
5.3.2- Lectinas vegetais	38
5.3.3- Lectinas animais	38
5.5.4- Outras lectinas	40
5.4- Receptor de asialoglicoproteína	
5.4.1 – Características gerais	41
5.4.2 – Características estruturais	41
5.4.3 – Função do receptor ASGP	42
6. Multivalência e efeito de “cluster”	42

Capítulo II

Resultados e discussão

1. Design sintético	45
2. Síntese dos compostos	46
3. Estudos de RMN dos Ln(III)-glicoconjugados	63
4. Estudos de relaxividade protónica (DNMR) de Gd(III)-DTPA(Lac)₂	68

Capítulo III

Parte Experimental

1. Procedimentos gerais e equipamentos	71
2. Síntese	72
Síntese de monossacarídeos peracetilados	72
Síntese dos ácidos (tio)glicosilpropiónicos peracetilados	73

Síntese da bistrifluoracetamida	75
Síntese da bisamina	75
Síntese do tioglicosídeo divalente peracetilado	76
Síntese do tiogalactosídeo tetravalente peracetilado	77
Síntese da 1,6-hexanodiamina-monoBoc	77
Síntese dos tioglicosídeos monovalentes amino-derivatizados	78
Síntese do tioglicosídeo divalente amino-derivatizado	79
Síntese do tioglicosídeo tetravalente amino-derivatizado	81
Síntese de DTPA's mono e bisamida	82
3 - Preparação dos Ln(III)-glicoconjugados para estudos de RMN e de DRMN	86
Conclusão	87
Apêndice	89
Bibliografia	92

Capítulo I

Introdução

1. Introdução

A imagiologia de ressonância magnética (IRM) é uma técnica de diagnóstico importante utilizada em medicina que se baseia no processamento dos sinais de RMN dos prótons da água do corpo. Esta técnica não expõe o paciente a radiação ionizante uma vez que se baseia na interação de campos magnéticos e de radiofrequências com os prótons da água dos tecidos. A intensidade das imagens obtidas em IRM depende de vários parâmetros característicos do estado de organização dos tecidos biológicos, tais como a densidade dos núcleos atômicos em estudo (prótons da água), os tempos de relaxação nuclear (T_1 e T_2) e a corrente sanguínea. A IRM permite também obter informações sobre fenómenos químicos e dinâmicos que ocorrem nos tecidos (Geraldes, 1987).

Em termos gerais a densidade prótonica nos vários tecidos é muito baixa, conseqüentemente as imagens obtidas destes tecidos apresentam um baixo contraste. Utilizando agentes de contraste paramagnéticos é possível melhorar a visualização dos diferentes tecidos e das possíveis lesões. Entre os muitos requisitos da IRM encontra-se a elevada eficiência, relaxividade e bioespecificidade dos agentes de contraste.

Os íons paramagnéticos Mn(II), Fe(III) e Gd(III) são agentes de relaxação eficientes, no entanto na forma livre são tóxicos. Por esta razão eles são ligados a agentes quelantes de forma a reduzir a sua toxicidade e, ao mesmo tempo, melhorar a sua especificidade para determinados tecidos ou órgãos (André, 1999).

Os quelatos de gadolínio são considerados os melhores agentes de contraste para IRM, devido ao elevado paramagnetismo ($4f^7$) do íon Gd(III) e também à lenta relaxação do seu spin electrónico. A eficiência dos agentes de contraste baseia-se na sua habilidade para reduzirem selectivamente o tempo de relaxação dos prótons da água nos tecidos biológicos sendo expresso pela sua relaxividade, r_1 . A relaxividade é definida como sendo o aumento da relaxação longitudinal dos prótons da água para uma concentração 1 mM do composto paramagnético (Caravan, 1999; Tóth, 2002).

Os agentes de contraste para IRM do fígado, disponíveis comercialmente, fornecem uma excelente resolução de contraste, porém apresentam uma baixa

especificidade (Santos, 2003). Os agentes de contraste para IRM específicos para hepatócitos são: $[Gd(BOPTA)(H_2O)]^{2-}$, $[Gd(EOB-DTPA)(H_2O)]^{2-}$, $[Mn(DPDP)(H_2O)]$, óxidos de ferro superparamagnéticos, sistemas paramagnéticos de lipossomas e micelas (Cavagna, 1991; Schmitt-Willich, 1999; Rocklage, 1989; Papisov, 1993; Kabalka, 1991; André, 1999).

No âmbito deste trabalho foram sintetizados e estudados glicoconjugados multivalentes de complexos metálicos com potencial aplicação em imagiologia médica (IRM e cintigrafia) e radioterapia. Os compostos sintetizados consistem num agente quelante bifuncional capaz de formar quelatos estáveis (cinética e termodinamicamente) com iões Ln(III) e um açúcar ligado ao agente quelante por um espaçador. O resíduo de açúcar é capaz de interagir com elevada afinidade e selectividade com lectinas (receptores) (Dam, 2002).

Os glicoconjugados de galactose e lactose de complexos de iões Ln(III) foram compostos idealizados para interagirem especificamente com o receptor biológico ASGP do fígado.

Neste trabalho foi ainda realizada a caracterização físico-química de alguns complexos de Ln(III) em solução aquosa por RMN de 1H e DRMN de 1H . A relaxividade protónica dos quelatos de Gd(III) descreve a eficiência do acoplamento dipolar entre os protões da água e o ião metálico paramagnético.

2 - Ligando DTPA

Entre os ligandos com aplicação em Medicina Nuclear o DTPA (figura 1), continua a ser um dos mais utilizados não só porque forma complexos muito estáveis (cinética e termodinamicamente) com muitos catiões metálicos, mas também porque constitui um ligando bifuncional para ligação a compostos de elevado peso molecular tais como anticorpos e péptidos (Pratas, 2001). Este ligando é usualmente utilizado em quelatoterapia na remoção de certos materiais radioactivos em indivíduos contaminados por iões metálicos radioactivos.

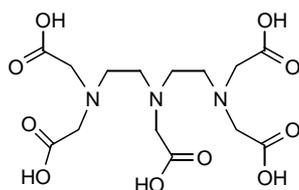


Figura 1 – Estrutura química do agente complexante de cadeia aberta DTPA.

2.1 – Ligação aos íons Ln(III)

Os complexos dos íons Ln(III) com o ligando DTPA são nona-coordenados. A ligação dá-se através dos três átomos de azoto amínicos e dos cinco átomos de oxigénio dos carboxilatos pendentes, sendo a nona posição de coordenação do ião metálico ocupada por uma molécula de água. No caso da ligação dos íons Ln(III) aos derivados bisamídicos do DTPA, dois grupos carboxilato são substituídos por dois grupos carbonilo, sendo o restante esquema de coordenação idêntico ao do DTPA, tal como é evidenciado pela estrutura de raios-X de cristais do complexo Gd(DTPA-EA₂) (EA₂=bis(etilamida)). As duas formas exibidas pelos complexos nona-coordenados dos íons lantanídeos correspondem à espécie de geometria de coordenação trigonal prismática distorcida “tricapped” e à espécie de geometria de coordenação quadrangular anti-prismática distorcida “monocapped”. Estas duas geometrias estão intimamente relacionadas entre si e em muitos casos uma determinada estrutura pode ser convenientemente descrita por ambas as geometrias (Geraldes, 1993).

3. Íons lantanídeos trivalentes

Nos últimos cinquenta anos os lantanídeos passaram a desempenhar um papel importante e diversificado na tecnologia moderna (metalurgia, lasers, electrónica, catálises, indústria óptica...). Ao contrário do seu nome colectivo, terras raras, eles não são raros, podendo a sua abundância ser similar à de elementos que não são considerados raridades. Por exemplo a abundância do gadolínio é de 6,4 g/tonelada em rochas vulcânicas, usualmente na forma de monasites e de bastenasites.

Não existem evidências de que desempenham um papel essencial nos mamíferos. Experiências com ratos demonstraram que estes elementos apresentam uma toxicidade média (Bulman, 1988).

Os lantanídeos apresentam grande semelhança de comportamento químico ao longo da série.

As suas propriedades magnéticas e espectroscópicas contribuem para a sua extensa utilização em investigação química.

3.1 – Química de coordenação

Ao longo do período as orbitais $4f$ dos lantanídeos são progressivamente preenchidas, desde o La ($4f^0$) até ao Lu ($4f^{14}$). As três primeiras energias de ionização são comparativamente baixas.

O estado trivalente é o mais estável em solução aquosa, (genericamente Ln(III)), sendo no entanto conhecidas algumas excepções como por exemplo o Ce(IV) e o Eu(II). A trivalência dos lantanídeos e a sua consequente configuração electrónica confere a estes elementos propriedades muito similares ao longo da série.

Devido ao facto das orbitais f serem orbitais internas, os seus electrões não se encontram disponíveis para formar ligações covalentes. Isto é muito diferente do que ocorre com as orbitais d dos elementos de transição que são orbitais de valência e em que, por isso, facilmente se estabelecem ligações químicas em que há partilha de electrões (isto reflecte-se no valor da energia do campo do ligando que no caso dos metais de transição é da ordem dos 20000 cm^{-1} e para o caso dos complexos de Ln(III) é apenas da ordem das centenas). Outro factor importante dos iões lantanídeos e que também os distingue dos iões metálicos de transição é a tendência que apresentam para formar complexos isomórficos com um ligando. Em certos aspectos a química de coordenação dos iões Ln(III) é semelhante à química de coordenação de iões de Ca(II), Sr(II) e Ba(II) (Moeller, 1972). As semelhanças entre os seus raios iónicos e o raio iónico do Ca(II) torna-os sondas adequadas que substituem isomorficamente o cálcio em alguns sistemas biológicos (William, 1970).

Os iões lantanídeos são ácidos duros, consequentemente interagem preferencialmente com bases duras. A sua preferência por átomos dadores é a seguinte: O > N > S e F > Cl. Os complexos de ligandos cujo átomo dador é apenas N ou S

hidrolisam-se rapidamente e não são estáveis em solução aquosa.

Os lantanídeos, ao contrário dos elementos de transição do bloco *d*, devido às suas ligações iônicas fortes, não apresentam restrições elevadas quanto à estereoquímica dos compostos em que participam. Os números de coordenação associados aos lantanídeos variam desde 3 a 12, tanto no estado sólido como em solução, sendo o 8 e 9 os números mais comuns (Choppin, 1984). Os aqua iões Ln(III) apresentam um número de coordenação que varia ao longo da série de 9 para 8, como resultado da contracção dos lantanídeos (Kowall, 1995). Os elementos centrais da série exibem um equilíbrio de coordenação entre os complexos octaaqua e o nonaaqua.

3.2 - Propriedades electrónicas e luminescência

Com as excepções do La(III) ($4f^0$) e do Lu(III) ($4f^{14}$), todos os iões da série dos lantanídeos possuem orbitais $4f$ incompletas. Os termos electrónicos das várias configurações $4f^n$ dão origem, na maioria dos casos, a estados excitados de baixa energia, absorvendo na zona do visível. Os termos individuais são desdobrados em vários níveis J devido ao acoplamento spin-orbital, sendo por sua vez os níveis J desdobrados pelo campo do ligando num máximo de $2J+1$ componentes. Alguns dos estados excitados de muitos iões Ln(III) relaxam por emissão de luminescência. Com efeito, os iões lantanídeos distinguem-se da maioria dos catiões metálicos pela particularidade de luminescerem em solução mesmo à temperatura ambiente. As transições entre os vários estados das configurações $4f^n$ são formalmente proibidas pela regra de selecção de Laporte, o que significa que a probabilidade dessas transições ocorrerem é pequena, pelo que os coeficientes de extinção molar característicos dos iões Ln(III) são bastantes baixos, em solução aquosa geralmente $\varepsilon \leq 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nieboer, 1975; Horrocks, 1981). Como consequência, tanto as absorções como as emissões são fracas e os tempos de vida dos estados excitados são longos (por vezes da ordem dos ms).

Os fenómenos de desexcitação não radiativa são relativamente pouco eficazes nos complexos de iões Ln(III) e como consequência luminescem à temperatura ambiente, quando são excitados com luz visível e/ou ultra-violeta. Grande parte dos estudos de luminescência dos iões lantanídeos em solução foram efectuados em solventes orgânicos, com quelatos de β -dicetonatos e tiveram como pioneiro Weissman

em 1942 (Weissman, 1942). Nos anos 60, com o advento do laser, um novo impulso foi dado no conhecimento da química dos íons lantanídeos. Estas fontes de radiação, quer as de modo contínuo quer as de modo pulsado, permitem um elevado grau de discriminação espectral, gerando feixes de radiação com larguras de banda bastantes estreitas (tipicamente <0.02 nm).

A figura 2 mostra os níveis energéticos dos cinco elementos centrais da série dos lantanídeos: Sm(III), Eu(III), Gd(III), Tb(III), e Dy(III).

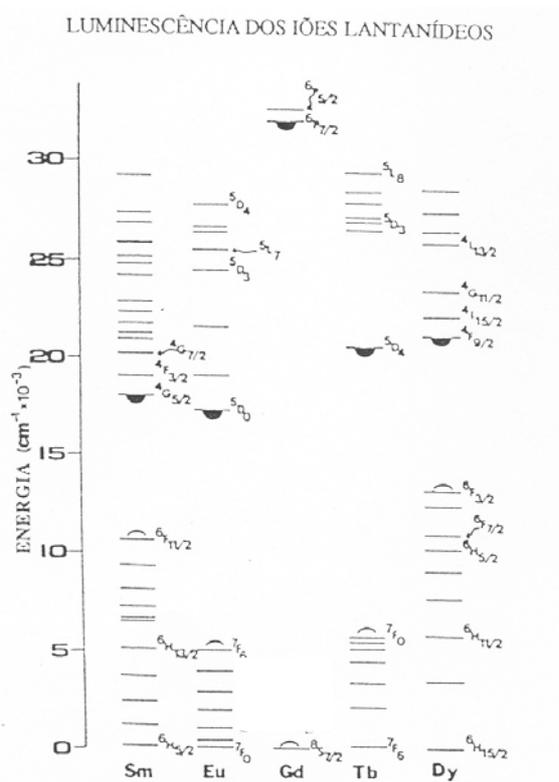


Figura 2 - Diagrama dos níveis de energia para os membros centrais dos íons Ln(III).

representa o nível luminescente de energia mais baixa e o nível de energia mais alta do estado fundamental (Horrocks, 1981).

Normalmente a luminescência dos restantes elementos da série raramente é observada, excepto no estado sólido, e são de menor importância como sondas luminescentes de moléculas biológicas, devido principalmente às pequenas diferenças de energia entre os possíveis níveis emissores e receptores de radiação, relativamente pouco separados, o que favorece mecanismos de desexcitação não radiativa (Horrocks, 1981).

Na maioria dos estudos dos iões Ln(III) como sondas luminescentes tem-se utilizado o Eu(III) e Tb(III), que possuem diferenças energética entre o nível emissor de menor energia e o nível de maior energia do estado fundamental, respectivamente de 12500 e 14800 cm^{-1} (valores razoavelmente elevados) e para além disso, a emissão é consideravelmente intensa e situa-se na zona do visível. O Eu(III) emite de acordo com transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ ($J=0-4$, por vezes 0-6), sendo a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ hipersensível e o Tb(III) emite de acordo com as transições $^5D_4 \rightarrow ^7F_J$ ($J=0-6$). Os tempos de vida dos seus estados emissores dependem do ambiente químico do ião, nomeadamente do solvente utilizado (Haas, 1971; Haas, 1974). Um outro factor que afecta os tempos de vida dos estados excitados é a temperatura, o que pode ser interpretado em termos de um despovoamento dos estados excitados por processos radiativos (Stein, 1975).

A intensidade da luminescência dos iões Ln(III) pode ser substancialmente aumentada por efeito da complexação com ligandos que possuam na sua estrutura molecular um sistema de ligações químicas que possa absorver energia suficiente para a excitar a um estado singleto, passando seguidamente a um estado tripleto (*conversão intersistemas*), transferindo energia para um estado energético adequado do ião Ln(III) (Horrocks, 1981; Moeller, 1972). Trata-se de um fenómeno de sensibilização da luminescência do ião Ln(III) e constitui uma forma alternativa à excitação directa do ião metálico com uma fonte de radiação. Cite-se, por exemplo, o caso do ião Tb(III) ligado a proteínas como a transferrina, a concavalina e a tripsina de porco e de bovino, em que se verificou um aumento na intensidade de emissão por um factor de 10^4 a 10^5 relativamente à emissão do Tb(III) livre em solução (Nieboer, 1975).

A luminescência dos iões lantanídeos pode ser estudada utilizando duas técnicas espectroscópicas distintas, embora relacionadas entre si:

- espectroscopia de emissão, que requer excitação da amostra num dado comprimento de onda, enquanto o monocromador de emissão faz um varrimento dos vários comprimentos de onda espectrais.

- espectroscopia de excitação, que requer um comprimento de onda de emissão fixo, enquanto o monocromador de excitação faz o varrimento (ou então utilizando um laser como fonte de emissão). Esta técnica permite fornecer informação sobre as transições a partir do estado fundamental até ao estado emissor e níveis superiores. Um espectro de excitação está intimamente relacionado com o espectro de absorção, desde que adicionados os efeitos das transições não radiativas.

3.3 - Momento magnético

Uma propriedade bastante importante dos iões Ln(III) é o seu paramagnetismo, associado aos seus electrões desemparelhados (com as excepções do La(III) e do Lu(III), ambos diamagnéticos). A maioria dos iões lantanídeos só possuem um estado $^{2S+1}L_J$ povoado à temperatura ambiente, ($kT \approx 200 \text{ cm}^{-1}$), no entanto o Eu(III) e o Sm(III) têm os seus estados excitados mais baixos consideravelmente povoados. Para a maioria dos iões Ln(III), os valores dos seus momentos magnéticos são dados pela expressão (1). Contudo, esta expressão só é válida para o estado fundamental, pelo que, quando se calculam as susceptibilidades e os momentos magnéticos do Eu(III) e do Sm(III), têm de ser tidos em conta o povoamento térmico dos estados excitados e o efeito Zeeman de segunda ordem (dá origem a paramagnetismo que não depende da temperatura, e que pode ser entendido como uma mistura do estado fundamental com estados excitados, a qual pode ser induzida por um campo magnético externo) (Geraldes, 1987; Reuben, 1973).

$$\mu_{ef} = g_J [J(J+1)]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

$$g_J = \frac{\{S(S+1) - L(L+1) + 3J(J+1)\}}{2J(J+1)} \quad (2)$$

g_J é o factor de Landé; J constitui o número quântico de momento angular total; L e S são respectivamente os números quânticos de momento angular orbital e de momento angular de spin.

O estado fundamental do ião Ln(III) é definido por um termo espectroscópico, de acordo com as regras de Hund:

- i) S é tão elevado quanto possível.
- ii) L é tão elevado quanto possível, de forma consistente com i).

iii) J é tão elevado quanto possível para uma camada electrónica mais que semipreenchida ($J=L+S$) e tão baixo quanto possível para uma camada menos que semipreenchida ($J=L-S$) (Cotton, 1975).

3.4 - Reagentes de desvio e de relaxação

Em estudos de RMN os efeitos paramagnéticos induzidos nas frequências de ressonância dos núcleos das moléculas que se ligam aos iões lantanídeos, dependem tanto da natureza dos próprios núcleos como do ião paramagnético em si, e podem traduzir-se, quer em desvios químicos dos sinais em relação à sua posição na ausência de espécies paramagnéticas, quer em alargamento dos sinais por diminuição dos tempos de relaxação T_1 (tempo de relaxação *longitudinal* ou de spin-rede) e T_2 (tempo de relaxação *transversal* ou de spin-spin). Tanto os fenómenos de desvio químico como os de relaxação nuclear, induzidos por iões paramagnéticos, resultam de dois tipos fundamentais de interacção entre os spins electrónicos do ião metálico e os spins nucleares da molécula em estudo (Geraldès, 1987):

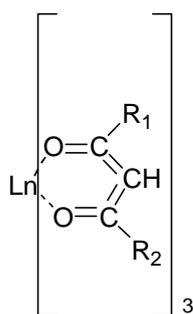
i) interacção de contacto de Fermi (escalar); esta interacção ocorrerá se existir uma probabilidade finita de encontrar alguma densidade de spin electrónico desemparelhado nas orbitais s do átomo do núcleo em estudo, quer por um mecanismo de deslocalização directa quer por um mecanismo de polarização de spin através das ligações.

ii) interacção de pseudo-contacto (dipolar); advém de uma interacção dipolo-dipolo, através do espaço, entre os momentos magnéticos angulares electrónico e nuclear. É o tipo de interacção que predomina na maioria dos casos com reagentes de desvio dos iões Ln(III).

De entre os vários iões lantanídeos paramagnéticos, os iões Pr(III) ($4f^2$), Eu(III) ($4f^6$) e Yb(III) ($4f^{13}$), com tempos de relaxação de spin electrónico curtos ($\tau_s < 1$ ps) induzem desvios nas frequências de RMN das moléculas às quais se ligam os iões Ln(III), sem que se verifique um alargamento significativo dos sinais. Por outro lado, os iões Gd(III) e Eu(II) (ambos $4f^7$), com elevados tempos de relaxação de spin electrónico ($\tau_s > 100$ ps), aumentam as velocidades de relaxação magnética nuclear, sem induzirem desvios consideráveis. Os iões Dy(III) ($4f^9$) e Ho(III) ($4f^{10}$), com tempos de relaxação de spin electrónico de valor intermédio, provocam simultaneamente desvios e aumentam a relaxação nuclear. Os iões lantanídeos, quando complexados, continuam a exhibir as suas propriedades de desvio e/ou relaxação e muitos deles são bastante estáveis

numa larga gama de valores de pH, o que em condições de pH>6.5 se torna extremamente vantajoso, uma vez que a complexação evita a precipitação dos hidróxidos dos lantanídeos (Glasel, 1973).

Existem reagentes de desvio e de relaxação para soluções aquosas, caso de Ln(EDTA)⁻, Ln(NOTA) e Ln(DOTA)⁻, assim como para soluções não aquosas, normalmente derivados de tris-β-dicetonatos, de que (Ln(ACAC)₃, Ln(DPM)₃ e Ln(FOD)₃) são alguns exemplos (figura 3) (Catarro, 1987; Spirlet, 1984).



DPM: R₁ = R₂ = t-butilo

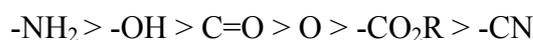
FOD: R₁ = t-butilo e R₂ = CF₃CF₂CF₂ -

TFN: R₁ = R₂ = CF₃CF₂CF₂ -

FHD: R₁ = R₂ = CF₃CF₂ -

Figura 3 – Reagentes de desvio dos iões Ln(III) com ligandos do tipo tris-β-dicetonato (Inagaki, 1981).

A formação de um aduto pela associação de um reagente de desvio a uma molécula de um dado substrato constitui uma reacção de um ácido de Lewis (reagente de desvio) com uma base de Lewis (substrato), pelo que os reagentes de desvio deverão ser suficientemente acídicos (no caso de FHD e TFN os grupos possuem elevada capacidade para retirar electrões). A basicidade de Lewis das moléculas do substrato também é importante em experiências de desvio químico. Sanders e Williams usaram Eu(DPM)₃ como reagente de desvio e compararam os desvios dos sinais de prótons de substratos com vários grupos funcionais. Concluíram que os desvios são induzidos de acordo com a seguinte ordem (Inagaki, 1981):



Ao ser adicionado um reagente de desvio a uma solução da molécula do

substrato, cuja estrutura se pretende conhecer, observam-se desvios selectivos no seu espectro de RMN, que reflectem a sua estrutura espacial. A troca entre o substrato livre e complexado normalmente é rápida à escala temporal de RMN, observando-se um espectro médio. Deste modo, os desvios induzidos dependem da concentração do complexo metálico de um modo que reflecte a sua constante de ligação ao substrato (Geraldes, 1987).

Os efeitos exercidos pelos agentes de relaxação, diminuindo os tempos de relaxação dos vários núcleos de uma molécula também são selectivos, reflectindo a sua relação geométrica relativamente ao centro paramagnético.

3.5 - Desvios químicos induzidos pelos iões Ln(III)

O desvio químico induzido na frequência de ressonância de um dado núcleo da molécula do substrato, pela ligação do reagente de desvio, possui várias contribuições:

$$\Delta_{\text{total}} = \Delta_{\text{d}} + \Delta_{\text{c}} + \Delta_{\text{pc}} \quad (3)$$

Δ_{d} representa o desvio diamagnético; advém do efeito de complexação, em que as nuvens electrónicas da molécula do substrato são polarizadas pela carga positiva do ião Ln(III), podendo mesmo ser induzidas alterações estruturais na molécula do substrato. Estas alterações afectam os estados electrónicos da molécula do substrato e induzem desvios nas frequências de RMN dos seus núcleos. Estes desvios precisam de ser corrigidos e subtraídos do desvio total, pelo que se usam os iões diamagnéticos La(III) e Lu(III).

3.5.1 - Desvios de contacto

Δ_{c} indica o desvio de contacto, já referido anteriormente. A interacção hiperfina de contacto entre um núcleo do substrato e a densidade de spin electrónico desemparelhado do ião lantanídeo crê-se ocorrer por um mecanismo de polarização de spin, em lugar de uma deslocalização directa dos electrões desemparelhados do centro paramagnético para o substrato (Niebor, 1975). Isto é consistente com o facto das

orbitas $4f$ dos iões Ln(III) estarem bastante inacessíveis para poderem participar numa sobreposição directa com as orbitas moleculares do substrato. Para os lantanídeos, a relação fundamental que descreve o desvio de contacto é (Inagaki, 1981):

$$\Delta_c = \left(\frac{A}{h} \right) \langle S_z \rangle / \left(\frac{g_n B_0}{2\pi} \right) \quad (4)$$

$\frac{A}{h}$ é a constante de acoplamento hiperfino electrão-núcleo (em Hz); $\langle S_z \rangle$ representa a polarização média de spin electrónico; g_n é a razão magnetogírica do núcleo; B_0 o campo magnético aplicado. Para os iões lantanídeos, o valor de $\langle S_z \rangle$ do estado fundamental é dado por:

$$\langle S_z \rangle_J = \frac{-\beta J(J+1)g_J(g_J-1)B_0}{3kT} \quad (5)$$

β é o magnetão de Bohr; J e g_J foram já definidos anteriormente; k é a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta.

Assim, o desvio de contacto devido ao estado fundamental J é dado pela expressão:

$$\Delta_c = \frac{-2\pi \left(\frac{A}{h} \right) \beta J(J+1)g_J(g_J-1)}{3kTg_N} \quad (6)$$

Uma vez que os iões Eu(III) e Sm(III) possuem estados electrónicos excitados apreciavelmente povoados à temperatura ambiente, deverão então ser tidas em conta as contribuições desses estados quando se calculam os valores de $\langle S_z \rangle$. Em particular para o ião Eu(III), o numero quântico do estado electrónico fundamental é $J = 0$, pelo que $\langle S_z \rangle_J = 0$ e $\Delta_c = 0$, de acordo com as expressão (5) e (6), logo os desvios de contacto deverão ter origem exclusivamente nos estados excitados. Golding e Halton calcularam os valores de $\langle S_z \rangle$ para a série dos lantanídeos (tabela 1) e concluíram que esses valores (incluindo as contribuições do estado fundamental e dos estados excitados) não

diferiam muito dos valores relativos de $\langle S_Z \rangle_J$ [$=J(J+1)g_J(g_J - 1)$], obtidos por Lewis *et al.*, excepto para o Eu(III) e Sm(III), havendo uma boa correlação linear com os desvios de contacto observados nas ressonâncias de $H_2^{17}O$ coordenada com os iões Ln(III) (Reuben, 1973; Lewis, 1962; Geraldès, 1987).

Tabela 1 – Comparação dos desvios de contacto teóricos e experimentais (em ppm) (Geraldès, 1987).

Ião	Desvio de contacto ^a		
	Teórico		Exp.
	$\langle S_Z \rangle_J^{(b)}$	$\langle S_Z \rangle^{(c)}$	$\Delta_c^{(d)}$
Ce	1,07	0,98	
Pr	3,20	2,97	-3,8
Nd	4,91	4,49	-4,8
Pm	4,80	4,01	
Sm	7,79	-0,06	
Eu	0	-10,68	
Gd	-31,50	-31,50	[31,5]
Tb	-31,50	-31,82	33,5
Dy	-28,30	-28,55	26,0
Ho	-22,50	-22,63	21,9
Er	-15,30	-15,37	14,5
Tm	-8,16	-8,21	7,6
Yb	-2,57	-2,59	2,0

^a Normalizados a 31,50 para o Gd; ^b Valores relativos $\langle S_Z \rangle_J = J(J+1) g_J(g_J - 1)$; ^c Valores de Golding e Halton;

^d Desvios de contacto de ^{17}O na $H_2^{17}O$, de Reuben e Fiat

3.5.2 - Desvios de pseudo-contacto

Δ_{pc} , na expressão (3), corresponde ao desvio de pseudo-contacto e é um tipo de desvio que resulta de uma interacção directa entre o spin electrónico do ião lantanídeo e os núcleos de átomos como o ^{14}N e o ^{17}O , que possuem associado a cada um deles um par de electrões que permitem uma ligação directa ao ião paramagnético (Glasel, 1973).

Para núcleos como o ^{13}C e o ^{19}F , assim como para prótons próximos do ião

lantanídeo, tanto o mecanismo de contacto como o de pseudo-contacto são importantes. Para protões afastados do centro paramagnético, o mecanismo de pseudo-contacto, por si só, explica de forma adequada os desvios observados experimentalmente (Golding, 1973).

Bleaney fez o tratamento teórico dos desvios de pseudo-contacto, explicando a variação da intensidade e do sentido do desvio para todos os iões lantanídeos (Bleaney, 1972).

Os desvios de pseudo-contacto induzidos pelos iões Ln(III) são obtidos a partir do valor médio do campo magnético local, tomado sobre todas as orientações do complexo em relação ao campo magnético externo, e que tem origem no momento magnético do ião lantanídeo. Por sua vez, o momento magnético deriva da susceptibilidade magnética do ião Ln(III).

Consideremos um sistema de coordenadas cartesianas (figura 4) com origem no ião lantanídeo, e os eixos dos xx, yy e zz paralelos aos três eixos principais do tensor susceptibilidade magnética ($\tilde{\chi}$).

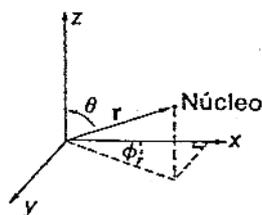


Figura 4 – Sistema de eixos coordenados coincidentes com os eixos principais do tensor $\tilde{\chi}$ e com origem no ião Ln(III) (Dwek, 1971).

Assim, para um núcleo magnético no local de coordenadas (r, θ, ϕ) , o desvio de pseudo-contacto induzido pelo ião Ln(III) é dado pela expressão:

$$\Delta_{pc} = \frac{1}{2r^3 F(\theta, \phi)} \quad (7)$$

r é a distância do núcleo ao centro paramagnético; F é o factor angular, definido do seguinte modo:

$$F(\theta, \phi) = (\chi_{zz} - \bar{\chi})^3 (\cos^2 \theta - 1) + (\chi_{xx} - \chi_{yy}) \sin^2 \theta \cos 2\phi \quad (8)$$

θ e ϕ são coordenadas polares da posição do núcleo no sistema de eixos que diagonaliza o tensor susceptibilidade magnética, $\tilde{\chi}$; χ_{xx} , χ_{yy} e χ_{zz} são as componentes principais do tensor susceptibilidade da espécie paramagnética e $\bar{\chi}$ é o seu valor médio definido de acordo com:

$$\bar{\chi} = \frac{1}{3}(\chi_{xx} + \chi_{yy} + \chi_{zz}) \quad (9)$$

Da equação 8 verifica-se que um sistema com susceptibilidade magnética isotrópica, isto é, $\chi_{zz} = \chi_{xx} = \chi_{yy} = \bar{\chi}$, origina um desvio de pseudo-contacto nulo. Conclui-se então que os desvios de pseudo-contacto advêm da anisotropia do tensor susceptibilidade magnética do complexo do ião lantanídeo. Se esse tensor possuir simetria axial, ($\chi_{xx} = \chi_{yy}$), o desvio de pseudo-contacto será dado por:

$$\Delta_{pc} = \frac{(\chi_{zz} - \bar{\chi})(3 \cos^2 \theta - 1)}{2r^3} \quad (10)$$

No caso dos iões lantanídeos, em que os electrões $4f$ estão bastante escudados dos efeitos dos ligando, pode considerar-se que, numa primeira aproximação, os iões Ln(III) são iões livres e o seu tensor susceptibilidade magnética é isotrópico. Esse tensor isotrópico não originaria desvios pseudo-contacto (Glasel, 1973).

A anisotropia de $\tilde{\chi}$ dos electrões $4f$ resulta do potencial electrostático das moléculas dos ligandos, isto é, os níveis electrónicos dos iões Ln(III), devido às interacções com o campo do ligando, não se encontram degenerados para campo nulo (Bleaney, 1972).

O estado fundamental de número quântico J sofre um desdobramento por acção do campo electrostático do ligando, de que resultam $2J+1$ níveis. As separações desses níveis resultantes não são, no entanto, superiores aos valores de kT . De acordo com a teoria de Bleaney, o desvio de pseudo-contacto induzido por um ião Ln(III) na

frequência de ressonância de um dado núcleo do ligando, pode ser descrito por:

$$\Delta_{pc} = - \left[\frac{g_J^2 \beta^2 J(J+1)(2J-1)(2J+3)}{60(kT)^2} \right] r^{-3} F'(\theta, \phi) \quad (11)$$

$$\text{em que } F'(\theta, \phi) = D_z(3 \cos^2 \theta - 1) + (D_x - D_y) \sin^2 \theta \cos 2\phi \quad (12)$$

D_x , D_y e D_z são parâmetros do campo electrostático do ligando ($D_x + D_y + D_z = 0$). No caso de simetria axial, $D_x = D_y$ e o segundo termo de F' anula-se. A expressão (11) mostra que o desvio de pseudo-contacto depende de T^{-2} (temperatura absoluta) e não de T^{-1} tal como o desvio de contacto. Os parâmetros D_y definem-se do seguinte modo:

$$\begin{aligned} D_x &= \langle r^2 \rangle \langle J \parallel \alpha \parallel J \rangle (A_2^2 - A_2^0) \\ D_y &= \langle r^2 \rangle \langle J \parallel \alpha \parallel J \rangle (-A_2^2 - A_2^0) \\ D_z &= \langle r^2 \rangle \langle J \parallel \alpha \parallel J \rangle (2A_2^0) \end{aligned} \quad (13)$$

$\langle r^2 \rangle$ é o valor médio de r^2 para os electrões $4f$; $\langle J \parallel \alpha \parallel J \rangle$ é um coeficiente característico do ião Ln(III), determinado pelos números quânticos L , S e J que definem o respectivo estado fundamental: A_2^0 e A_2^2 são dois coeficientes do campo electrostático (Glasel, 1973). Golding e Pyykk incluíram outros termos do campo do ligando de ordem superior (A_4^0 , A_6^0 e A_6^6) mas os valores dos desvios de pseudo-contacto não mostraram diferir em mais de 20% dos valores teóricos respectivos determinados por Bleaney (Golding, 1973).

Os coeficientes $\langle J \parallel \alpha \parallel J \rangle$ mudam de sinal em função do ião Ln(III), o que explica que alguns iões lantanídeos induzam desvios para altas frequências e outros induzam para baixas frequências. Os coeficientes do campo electrostático do ligando podem também exibir sinais diferentes, de ligando para ligando, o que explica que o mesmo ião Ln(III) com ligandos diferentes possa induzir desvios com sentidos opostos

(Bünzli, 1989).

Os desvios de pseudo-contacto dados pela expressão (11) devem-se à contribuição do estado electrónico fundamental, de número quântico J , para o tensor susceptibilidade magnética. Contudo, para iões com 5 ou 6 electrões $4f$, os estados electrónicos estão consideravelmente povoados à temperatura ambiente, pelo que também tem de ser considerada a contribuição desses estados excitados para a susceptibilidade magnética. Para o ião Eu(III) ($4f^6$), o valor de J para o estado fundamental é zero, ($\Delta_{pc} = 0$ quando $J=0$, de acordo com a expressão (11)), pelo que os desvios de pseudo-contacto devem ter origem principalmente na contribuição dos estados excitados para a anisotropia do tensor da susceptibilidade magnética. No tratamento teórico que fez, dos desvios químicos induzidos pelos iões Ln(III), Bleaney incluiu a contribuição desses estados excitados para o Eu(III) e outros iões. Os desvios de pseudo-contacto teóricos (valores normalizados a -100 para o Dy), estão indicados na tabela seguinte (tabela 2).

Tabela 2 – Comparação dos desvios de pseudo-contacto teóricos e experimentais (em ppm) (Gerald, 1987).

Ião	Desvio de pseudo-contacto ^e		
	Teórico ^f est. Fund.	C/est. excitado	exp. ^g
Ce	-6,6	-6,3	
Pr	-11,4	-11,0	-8,2
Nd	-4,5	-4,2	-3,0
Pm	+2,4	+2,0	
Sm	+0,5	-0,7	-0,2
Eu	0	+4,0	+5,1
Gd	0	0	
Tb	-87	-86	-50
Dy	-100	-100	-100
Ho	-39	-39	-42
Er	+33	+33	+16
Tm	+53	+53	+10
Yb	+22	+22	+12

^e Valores normalizados a -100 para o D_y ; ^f Obtidos por Bleaney; ^g Valores experimentais para os complexos dos iões Ln(III) com o mononucleotídeo monofosfato de citidina.

Com as exceções do Sm(III) e do Eu(III), as contribuições dos estados electrónicos excitados são responsáveis por apenas uma percentagem bastante pequena do desvio químico e os valores medidos experimentalmente mostram em geral uma boa concordância com os valores teóricos.

Os desvios de pseudo-contacto, que revelam uma dependência geométrica da posição do núcleo em estudo (a maior parte das vezes protões) em relação ao centro paramagnético, nomeadamente do inverso da terceira potência da distância, têm constituído um instrumento útil na determinação de conformações moleculares e de equilíbrios conformacionais de sistemas dinâmicos. Como os desvios de contacto não contêm esta informação geométrica, torna-se necessária uma separação da contribuição de pseudo-contacto da de contacto, para o que existam diversos métodos (Dobson, 1973; Reilley, 1976).

3.6 – Relaxação paramagnética

As possibilidades de obtenção de informação estrutural em sistemas bioquímicos, a partir de dados de relaxação nuclear, induzida por espécies paramagnéticas, foi pela primeira vez explorada em 1962 por Eisinger *et al.* Estes autores constataram que por ligação de vários iões de metais de transição à molécula de DNA a velocidade de relaxação dos protões do solvente, a água, aumenta consideravelmente. Este fenómeno designa-se por aumento da relaxação protónica (Dwek, 1975).

Nos anos que se seguiram, grande parte das investigações efectuadas incidiram sobre as velocidades de relaxação da água em sistemas enzimáticos na presença de iões paramagnéticos como o Mn(II) e o Gd(III), o que conduziu ao conhecimento de vários parâmetros de ligação e ao esclarecimento de vários mecanismos enzimáticos. Nos casos em que esses mecanismos dependem das características conformacionais dos ligandos, torna-se necessário estudar os efeitos das provas paramagnéticas sobre os núcleos, relacionando esses efeitos com as distâncias aos centros paramagnéticos.

Quando as provas paramagnéticas, além de induzirem relaxação também provocam desvios de pseudo-contacto, os dados de desvio complementam a informação estrutural obtida a partir dos dados de relaxação.

Os iões paramagnéticos (Mn(II), Cr(III), Fe(III), Gd(III)), em virtude dos seus electrões desemparelhados, possuem momentos magnéticos electrónicos elevados – o momento magnético do electrão é cerca de mil vezes mais intenso que o da maioria dos núcleos. Um núcleo que se situe nas vizinhanças dum ião paramagnético sentirá um intenso campo magnético local que flutua devido à relaxação do spin electrónico e aos movimentos moleculares aleatórios de difusão translacional das moléculas de solvente e das espécies paramagnéticas. Este campo magnético flutuante geralmente permite aumentar as velocidades de relaxação dos núcleos, mesmo quando as espécies paramagnéticas estão presentes na solução em baixas concentrações. A grandeza desse aumento pode em princípio ser analisada e interpretada no sentido de fornecer informação sobre as distâncias dos núcleos ao ião paramagnético, e sobre a dinâmica molecular em solução (Bertini, 1980).

Numa solução de um soluto paramagnético, a relaxação nuclear é inteiramente dominada por uma interacção entre o spin electrónico desemparelhado da espécie paramagnética, **S**, e o spin do núcleo, **I**. Os intensos campos magnéticos locais produzidos pelos electrões podem sofrer um acoplamento com os núcleos por um mecanismo de interacção dipolar ou, por vezes, por um mecanismo de interacção escalar hiperfina, transmitido através das ligações químicas.

No caso específico dos iões lantanídeos, iões como o Gd(III) e o Eu(II) (ambos $4f^7$), em que o tensor da susceptibilidade magnética é nulo ($(L=0$ e $S = \frac{7}{2})$) e $\langle J \| \alpha \| J \rangle = 0$, pelo que os valores de D_z são nulos), não induzem desvios de pseudo-contacto nas frequências de ressonância dos núcleos das moléculas que se encontram nas suas proximidades, mas como possuem tempos de relaxação electrónica elevados (τ_s), podem aumentar consideravelmente as velocidades de relaxação desses núcleos.

Em sistemas biológicos, o interesse geralmente recai sobre os iões paramagnéticos coordenados com ligandos polidentados. Por exemplo, em estudos *in vivo* de imagiologia de ressonância magnética (IRM), há vantagem em utilizar o ião metálico paramagnético na forma de quelato, como agente de relaxação da água dos

tecidos e órgãos, porque os iões livres possuem toxicidades elevadas (Lauffer, 1987)

A aplicação da relaxação paramagnética a domínios da biologia e da medicina tem impulsionado o desenvolvimento de um elevado número de provas de relaxação, baseadas principalmente no gadolínio [Gd(III)(P₂O₇)], (Gd(III)EDTA), (Gd(III)(ACAC)₃) (Williams, 1982).

3.6.1 - Equações de Solomon – Bloembergen

As velocidades de relaxação (longitudinal, $\frac{1}{T_{1M}}$ e transversal, $\frac{1}{T_{2M}}$ dos núcleos próximos de um centro paramagnético são dadas por: (Dwek, 1971)

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{2}{15} \left(\frac{\gamma_I^2 \mu_{ef}^2 \beta^2}{r^6} \right) \left[\frac{3\tau_c}{(1 + \omega_I^2 \tau_c^2)} + \frac{7\tau_c}{(1 + \omega_s^2 \tau_c^2)} \right] + \frac{2}{3} [s(s+1)] \left(2\pi \frac{A}{h} \right)^2 \left[\frac{\tau_e}{(1 + \omega_s^2 \tau_e^2)} \right] \quad (14)$$

$$\frac{1}{T_{2M}} = \frac{1}{15} \left(\frac{\gamma_I^2 \mu_{ef}^2 \beta^2}{r^6} \right) \left[\frac{4\tau_c + 3\tau_c}{(1 + \omega_I^2 \tau_c^2)} + \frac{13\tau_c}{(1 + \omega_s^2 \tau_c^2)} \right] + \frac{1}{3} [s(s+1)] \left(2\pi \frac{A}{h} \right)^2 \left[\frac{\tau_e + \tau_e}{(1 + \omega_s^2 \tau_e^2)} \right] \quad (15)$$

As expressões anteriores são conhecidas por *equações de Solomon-Bloembergen* (Solomon, 1955; Bloembergen, 1957) e só são válidas para um regime de troca rápida entre o ligando livre e coordenado e para ambientes químicos do ião metálico de baixa simetria. Estas duas condições parece, no entanto, serem obedecidas pela maioria dos complexos de Gd(III) (Dwek, 1971; Inagaki, 1981; Lauffer, 1987; Bloembergen, 1961; Leyden, 1977).

Embora as equações de Solomon-Bloembergen incluam um termo que diz respeito à interacção de contacto electrão-núcleo, esta contribuição deverá ser mínima para os iões Ln(III), dada a interioridade dos seus electrões 4f relativamente aos electrões 5s e 5p, pelo que normalmente se despreza. Estudos da variação dos tempos de relaxação T_1 e T_2 com a temperatura, confirmam este facto para o caso do Gd(III) e do Eu(II) (Dwek, 1971).

Nas expressões anteriores ω_s e ω_I são respectivamente as frequências de

precessão electrónica e nuclear de Larmor ($\omega_s \gg \omega_I$), γ_I é a razão magnetogírica nuclear, μ_{ef} é o momento magnético efectivo, r é a distância entre o centro paramagnético e o núcleo em questão, τ_c é o tempo de correlação da interacção dipolar e τ_e o tempo de correlação da interacção escalar. Os outros símbolos foram já definidos anteriormente.

Os primeiros termos de ambas as equações advêm da interacção dipolar entre o spin electrónico e o spin nuclear, caracterizados pelo tempo de correlação τ_c , que modula esta interacção. Os segundos termos advêm da modulação da interacção escalar, caracterizada pelo tempo de correlação τ_e .

τ_c e τ_e caracterizam a velocidade para a qual são interrompidas as duas formas de interacção magnética; o mecanismo mais rápido é sempre o dominante para um movimento isotrópico, escrevendo-se:

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_s} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_R} \quad (16)$$

$$\frac{1}{\tau_e} = \frac{1}{\tau_s} + \frac{1}{\tau_M} \quad (17)$$

τ_M é o tempo de vida do núcleo em estudo, sob a influência do centro paramagnético, e que é determinado pela velocidade de troca química entre a molécula (do solvente ou do ligando) livre e coordenada e é dependente da temperatura. τ_R é o tempo de correlação rotacional do ião paramagnético (solvatado ou sob a forma de quelato) e também depende da temperatura. τ_s é o tempo de relaxação do spin electrónico; trata-se de uma função complexa determinada pela modulação da *separação para campo nulo* ("zero field splitting", abreviadamente ZFS) dos níveis de spin electrónico, causada por distorções na simetria do complexo devido a colisões entre as moléculas do solvente e do soluto, ou possivelmente devido a outros movimentos moleculares (Bünzli, 1989; Dwek, 1975).

O seu valor, dependente da frequência e da temperatura, é dado por:

$$\frac{1}{\tau_s} = B \left[\frac{\tau_v}{(1 + \omega_s^2 \tau_v^2)} + \frac{4\tau_v}{(1 + 4\omega_s^2 \tau_v^2)} \right] \quad (18)$$

τ_v é outro tempo de correlação, relacionado com a velocidade de modulação do ZFS, pelo impacto das moléculas do solvente sobre o complexo paramagnético ($\tau_v < \tau_s$); B é uma constante que inclui os valores do spin electrónico e dos parâmetros do ZFS.

Para iões paramagnéticos ligados a macromoléculas, a eficácia da distorção da simetria do complexo pela colisão de moléculas do solvente pode ser reduzida se o local de ligação do metal for tal que a aproximação de moléculas do solvente esteja restringida. Nestes casos a distorção da simetria do complexo pode dever-se ao acoplamento das vibrações ião-ligando com outras vibrações mais lentas ou com movimentos de cadeias polipeptídicas da macromolécula. Esses processos podem, contudo, envolver mais que um tempo de correlação simples, constituindo uma dificuldade adicional para a obtenção do valor de τ_s .

O grau de validade das equações de Solomon-Bloembergen depende de várias aproximações:

- i) Existe um único tempo de relaxação de spin electrónico.
- ii) Não se verifica separação dos níveis electrónicos para campo nulo, i. e., o ZFS é nulo, ou pelo menos $ZFS \ll \omega_s$.
- iii) Não se verifica separação da linha de ressonância de spin electrónico por interacção com o spin nuclear da própria espécie nuclear, ou pelo menos é $\ll \omega_s$.
- iv) Os movimentos moleculares de orientação em solução são isotrópicos.
- v) O factor g electrónico é isotrópico.
- vi) Os tempos de correlação para os vários movimentos em solução são funções exponenciais.

As velocidades de relaxação $\frac{1}{T_{1M}}$ e $\frac{1}{T_{2M}}$ bem como τ_c podem ser determinados a partir de estudos da variação das velocidades de relaxação com a frequência, ou a partir de dados de *aumento da relaxividade protónica* (Koenig, 1975). Desta forma, a distância r, do ião paramagnético ao núcleo em estudo, pode ser conhecida, o que constitui o fundamento da utilização dos agentes de relaxação como

sondas estruturais. Em estudos de distâncias, os erros obtidos na determinação de τ_c (devidos a τ_s) não são graves na medida em que r depende aproximadamente da raiz sexta de τ_c .

$$\text{Como } \frac{1}{T_{iM}} = \frac{1}{T_{iobs}} - \frac{1}{T_i} = \frac{f(\tau_c)}{r^6}, \quad (i=1,2), \text{ em que } \frac{1}{T_i} \text{ são as velocidades de}$$

relaxação de um dado núcleo na ausência de íon paramagnético, pode conhecer-se de imediato o valor da distância r se $f(\tau_c)$ for conhecido. Contudo, se o valor de τ_c for desconhecido, podem obter-se as razões de $\frac{1}{T_1}$ ou $\frac{1}{T_2}$ para quaisquer dois núcleos distintos de um ligando, determinando-se assim as distâncias relativas desses núcleos ao centro paramagnético. O estudo dos vários núcleos de uma molécula ligada ao íon paramagnético permite "fazer o mapa" dessa molécula. Esse "mapa" pode ser usado, conjuntamente com os dados de desvio, para a obtenção das estruturas moleculares dinâmicas dos ligandos em solução (Williams, 1982).

3.6.2 - Relaxação da água

Os efeitos paramagnéticos de relaxação são transmitidos aos núcleos vizinhos não só através dos movimentos moleculares aleatórios das espécies em solução mas também através das interações químicas específicas que são responsáveis pela aproximação das moléculas de solvente ao íon metálico (no caso da água essa aproximação é de 5Å). As relaxações associadas a cada tipo de interação química diferem entre si, dependendo da distância e da escala de tempo da interação e pode ocorrer por dois mecanismos distintos: o de *esfera interna* e o de *esfera externa*.

As contribuições de esfera interna advêm da relaxação quando a molécula de água se encontra ligada ao íon paramagnético na sua esfera primária de coordenação através do átomo de oxigénio (caso A da figura 5) e as de esfera externa incluem prótons das moléculas de água ligadas ao íon paramagnético na segunda esfera de coordenação por pontes de hidrogénio (caso B), bem como os efeitos da difusão translacional (caso C).

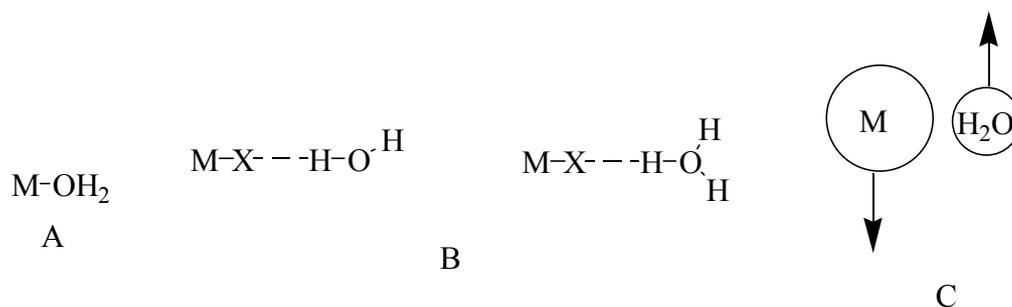


Figura 5 – Interações responsáveis pela aproximação das moléculas de água ao ião Ln (III) (Lauffer, 1987).

Nem sempre é possível uma distinção clara entre os dois mecanismos mas esta baseia-se sobretudo no tempo que os prótons residem sob a influência do centro paramagnético e na sua distância a esse centro (se o tempo que a molécula de água permanece ligada ao ião metálico for longo em comparação com o tempo necessário para que as duas espécies se afastem por difusão, também se pode considerar que o mecanismo que prevalece é o de esfera interna).

Somente uma pequena percentagem dos núcleos está ligada ou sob a influência do centro paramagnético, pelo que também têm de ser tidos em conta os efeitos paramagnéticos sobre os núcleos mais afastados do catião metálico. Embora esses efeitos sejam nulos pelo mecanismo de contacto, não são desprezáveis pelo mecanismo dipolar (Koenig, 1975).

A contribuição da esfera externa para a relaxividade da água pode ser por vezes bastante significativa, particularmente em quelatos de Gd(III), em que chega a ser da ordem dos 10%, relativamente ao valor total uma vez que por ligação do ião metálico a ligandos polidentados, o número de moléculas de água da primeira esfera de coordenação diminui, tornando-se o mecanismo de camada interna menos decisivo (Koenig, 1975; Bünzli, 1989; Lauffer, 1987).

Define-se um tempo de correlação difusional relativo, τ_D :

$$\tau_D = \frac{r^2}{[3(D_H + D_{Gd})]} \quad (19)$$

em que r é a distância de maior aproximação entre o spin electrónico do ião

metálico e do spin nuclear protónico da água e D_H e D_{Gd} são os coeficientes de difusão da água e do Gd. Trata-se de uma descrição quantitativa algo limitada, que se aplica ao caso limite em que não existem quaisquer interacções entre a água e o complexo metálico (caso C anterior).

4. Imagiologia de Ressonância Magnética (IRM)

O uso da ressonância magnética nuclear para obter imagens de diferentes estruturas, em particular na visualização do interior do corpo humano, deve-se aos cientistas Paul Lauterbar e Peter Mansfield considerados pioneiros no uso desta técnica, tendo sido galardoados com o prémio Nobel da Medicina em 2003 (Gerald, 2003).

A IRM é uma técnica cada vez mais comum em medicina clínica de diagnóstico e em investigação biomédica. Esta técnica não requer a exposição do paciente a radiação ionizante, uma vez que é baseada na interacção de campos magnéticos e radiofrequências com núcleos atómicos, nomeadamente os prótons da água nos tecidos.

A IRM utiliza ondas de rádio, campos magnéticos e sistemas de computadores mas exclui radiações ionizantes, como os raios X e é capaz de produzir imagens muito detalhadas e com enorme resolução dos tecidos macios e órgãos, de qualidade comparável ou superior à Tomografia Axial Computorizada (TAC), sem os efeitos secundários potencialmente adversos resultantes do uso de raio X (Gerald, 2003). A imagem gerada do corpo é uma imagem altamente detalhada, não invasiva e tridimensional (Lowe, 2002).

Além de utilizar radiações inofensivas (ondas de rádio), o contraste das imagens médicas resultantes da técnica IRM, contém uma informação muito mais rica e dependente de múltiplos parâmetros. Representa não só a densidade de prótons dos tecidos, que contém uma informação anatómica muito rica, comparável à do TAC, mas reflecte também certos processos dinâmicos da água dos tecidos, tais como a sua mobilidade, difusão e fluxo, que contém informações sobre o estado fisiológico dos tecidos, fornecendo meios para uma discriminação mais sensível entre tecidos saudáveis e patológicos (Gerald, 2003).

O facto de ser uma técnica não invasiva e com elevada eficácia, torna-a num importante instrumento de diagnóstico em medicina. No entanto, o contraste gerado por esta técnica é por vezes insuficiente, sendo necessário utilizar agentes de contraste (AC)

(Jacques, 2002). Estes compostos, muitos deles complexos metálicos, são injectados no corpo para aumentar o contraste entre o tecido normal e o tecido danificado, mostrar o fluxo sanguíneo ou funções biológicas, e permitem um melhor diagnóstico (Lowe, 2002).

A IRM é uma modalidade de diagnóstico baseada no contraste obtido pelos AC paramagnéticos. Os quelatos de Gd(III) demonstraram ser bons AC paramagnéticos para IRM, devido quer ao elevado paramagnetismo do ião Gd(III) ($4f^7$) quer devido à lenta relaxação do seu spin electrónico. A eficácia da utilização dos AC para IRM baseia-se na sua capacidade de selectivamente encurtarem o tempo de relaxação dos prótons da água dos tecidos lesionados sendo expressa pela sua relaxividade, r_1 . A relaxividade é definida como o aumento da relaxação longitudinal dos prótons da água para uma concentração de 1mM do composto paramagnético (Caravan, 1999; Tóth, 2002).

4.1 – Agentes de contraste

O uso de complexos metálicos como agentes de diagnóstico é uma área relativamente nova da investigação médica a qual se tem desenvolvido durante os últimos 40 anos. Tem-se vindo a desenvolver o uso de complexos de metais paramagnéticos para aumentar o contraste em IRM (Reichert, 1999).

Actualmente, aproximadamente 30% dos exames de imagiologia de ressonância magnética (IRM) incluem o uso de agentes de contraste. À medida que novos agentes de contraste vão surgindo esta percentagem tende a aumentar.

Os agentes de contraste de IRM que são usados correntemente são agentes extracelulares não específicos. A sua capacidade para aumentar o contraste em imagens de IRM deve-se essencialmente à sua distribuição na corrente sanguínea e ao seu tamanho reduzido. Além disso a relativa baixa sensibilidade da técnica de ressonância magnética requer a injeção de uma grande quantidade de agentes de contraste. Por isso, no desenvolvimento de novos agentes de contraste pretende-se aumentar a sua eficiência, quer no que se refere à sua relaxividade quer à sua especificidade (Jacques, 2002)

Apesar da descoberta de outros agentes de contraste de IRM, a saber, agentes baseados em partículas de óxidos ferro e quelatos de manganésio(II), o gadolínio(III)

continua a dominar (Caravan, 1999).

Dois outros lantanídeos, o disprósio(III) e o holmio(III), possuem maiores momentos magnéticos que o gadolínio(III), mas a assimetria dos seus estados electrónicos leva a uma rápida relaxação dos spins electrónicos, induzindo uma velocidade de relaxação muito lenta dos prótons da água. Por último pode referir-se como vantagem o facto dos quelatos de gadolínio(III), quando associados a algumas biomoléculas, permanecerem intactos no interior do corpo, devido à sua enorme estabilidade cinética e termodinâmica (Caravan, 1999).

O primeiro agente de contraste aprovado para uso clínico foi o Gd-DTPA, conhecido como Magnevist. De seguida foram aprovados outros agentes de contraste de Gd(III) com propriedades similares ao Gd-DTPA, nomeadamente: Gd-DOTA (DOTA = ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10 - tetraacético, Dotarem); Gd-DTPA-BMA (BMA = bismetilamida, Omniscan) e o Gd-HPDO3A (HPDO3A = ácido 1,4,7,10 tetraazaciclododecano -1- (2-hidroxipropil) - 4,7,10 triacético, Prohance) (Aime, 2002).

Estes complexos paramagnéticos de gadolínio(III), usados clinicamente como agentes de contraste para IRM, (Magnevist, Dotarem, Prohance e Omniscan) (figura 6) possuem aproximadamente a mesma relaxividade em médios e altos campos magnéticos. São não específicos, distribuindo-se nos espaços extravasculares e são rapidamente eliminados pelos rins (Laurent, 2004).

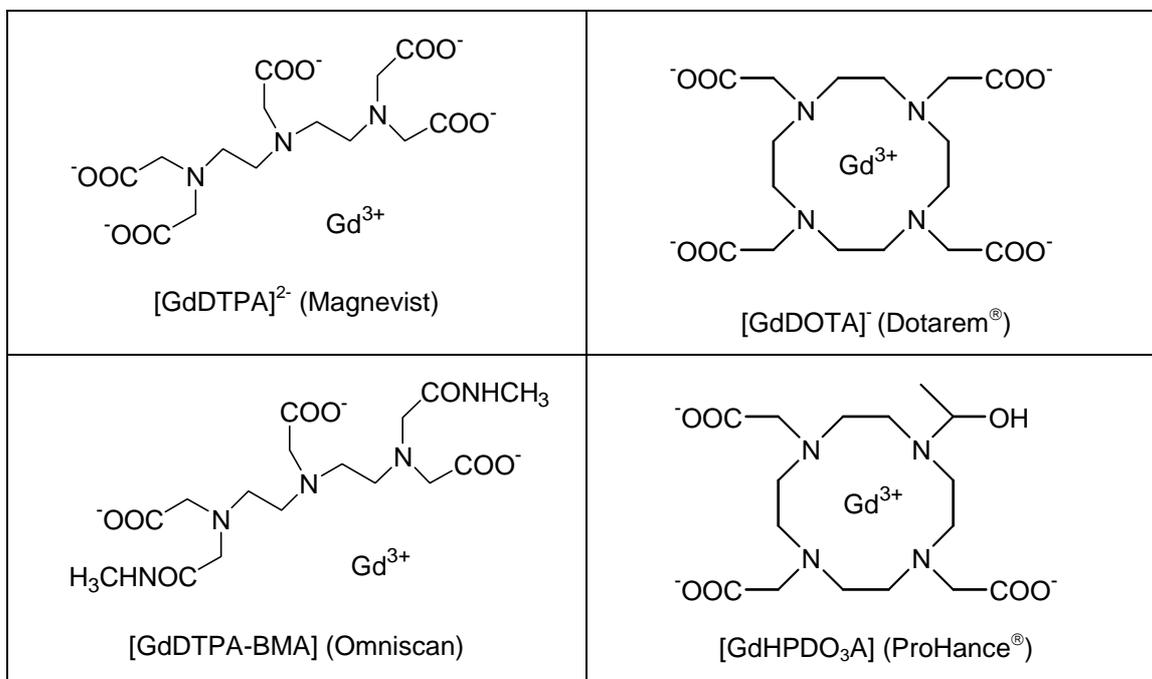


Figura 6 - Estrutura de quelatos de Gd(III) utilizados clinicamente como agentes de contraste em IRM

(Aime, 2002).

Ligandos tais como o DTPA formam complexos suficientemente estáveis, de modo que, enquanto permanecem no interior do corpo, não se detecta uma dissociação entre o ligando e o metal (Caravan, 1999).

Devido ao seu tamanho, os lantanídeos tendem a originar números de coordenação elevados em meio aquoso. Todos os quelatos de Gd(III) utilizados em IRM, são complexos com número de coordenação nove nos quais o ligando ocupa oito posições de ligação ao metal e a nona posição de coordenação é ocupada por uma molécula de água (Caravan, 1999).

4.2 – Imagiologia do fígado

Apesar de ser um órgão vital, o fígado só recentemente recebeu atenção do ponto de vista do diagnóstico por radiologia (Mintorovitch, 2000). A detecção não invasiva e a diferenciação de focos de lesão no fígado de pacientes com suspeita de tumores primários benignos ou malignos ou com metástases constituem um grande desafio de diagnóstico para qualquer radiologista. Um grande número de lesões benignas e malignas, com várias aparências, podem ser detectadas por IRM (Helmberger, 2001).

Com a inovação nas técnicas de imagiologia e o desenvolvimento de diferentes tipos de agentes de contraste, o diagnóstico de doenças do fígado, em particular a detecção dos focos de lesão, melhorou consideravelmente. A selecção de um método de imagem apropriado para o diagnóstico deve ser feita de acordo com o historial de cada paciente.

No desenvolvimento de novos AC específicos para o fígado, os principais objectivos são o melhoramento da detecção de lesões, classificação (benigno ou maligno) e caracterização (metástase ou hemangioma) ou seja pretende-se detectar o maior número de lesões o mais cedo possível e aumentar a sensibilidade da técnica de IRM na detecção lesões de pequenas dimensões. Isto poderá permitir aplicar uma terapia específica e em fases iniciais (Mintorovitch, 2000).

Um agente de contraste utilizado em IRM para o fígado deve idealmente ser específico e eventualmente difundir-se pelos espaços extracelulares e rapidamente

passar para a área intersticial da lesão assim como do parênquima normal.

Actualmente, existem três estratégias principais para o desenvolvimento de agentes de contraste específicos para o fígado: agentes direccionados especificamente para hepatócitos, células de Kupffer (macrófagos residentes no fígado) e RES (sistema retículo-endotelial) hepático (Mintorovitch, 2000; Helmberger, 2001).

Os agentes de contraste usados em IRM para avaliação de lesões hepáticas são classificados de acordo com a sua biodistribuição e efeitos de contraste nas seguintes categorias: agentes extracelulares, agentes do sistema retículo-endotelial (RES), agentes hepatobiliares e agentes do tipo “*blood pool*” (Harisinghani, 2001).

Os complexos extracelulares de gadolínio, que são tipicamente hidrofílicos com baixo peso molecular, possibilitam o diagnóstico de lesões focais no fígado, no entanto o aumento de contraste pelo uso destes complexos não é realmente específico para o fígado, pois pode causar um aumento de contraste noutras partes do corpo (Weinmann, 2003). Em condições *in vivo* o gadolínio livre é tóxico formando partículas coloidais que são fagocitadas pelo RES. O facto dos compostos de gadolínio possuírem tamanho pequeno permite a sua rápida passagem da zona intravascular para a zona intersticial, seguindo-se uma rápida eliminação pelos rins (Helmberger, 2000; Harisinghani, 2001). A ausência de toxicidade dos quelatos de gadolínio reside na sua estabilidade *in vivo*, a qual está relacionada com a sua elevada estabilidade termodinâmica e com a sua lenta cinética de dissociação. O seu baixo potencial osmótico e a sua baixa viscosidade também favorecem a sua utilização clínica (Helmberger, 2001).

Os agentes hepatobiliares representam um grupo heterogéneo de compostos paramagnéticos solúveis que se acumulam selectivamente nos hepatócitos aumentando assim, o contraste entre o parênquima normal do fígado e outros tecidos (Yoshikawa, 2003; Harisinghani, 2001).

Os agentes do tipo “*blood pool*” possuem um comportamento similar aos agentes de contraste de IRM já utilizados. Trata-se de agentes extracelulares que demonstram uma distribuição preferencial no corpo, devido às suas dimensões. De modo a fornecerem uma melhor imagem dos vasos sanguíneos, estes compostos precisam de permanecer, durante um período razoável, na circulação sem ocorrer a sua redistribuição pelos espaços intersticiais. Por isso, espécies com elevado peso molecular são mais desejáveis, uma vez que estes compostos não podem ser eliminados por filtração glomerular e não passam para as zonas intersticiais (Jacques, 2002).

Devido à sua forte ligação com a albumina, alguns complexos de gadolínio permanecem no interior da corrente sanguínea por um tempo prolongado podendo actuar como AC do tipo “*blood pool*” (Helmberger, 2001). Partículas ultra pequenas superparamagnéticas de óxido de ferro podem constituir agentes de contraste do tipo “*blood pool*” (Harisinghani, 2001).

Como os glicoconjugados de complexos metálicos, são agente de contraste de IRM direccionados para os hepatócitos, convém fazer uma breve análise dos agentes similares actualmente disponíveis para uso clínico.

Existem três agentes de contraste de IRM direccionados para hepatócitos: Multihance (Gd-BOPTA), Telescan (Mn-DPDP) e o Eovist (Gd-EOB-DTPA) (figura 7) (Helmberger, 2001).

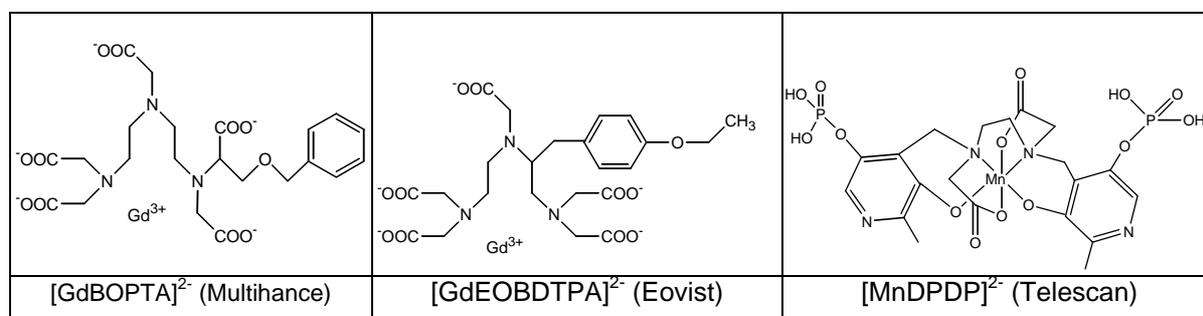


Figura 7 – Estrutura química do Multihance, Eovist e Telescan (Aime, 2002; Santos, 2003).

O Mn-DPDP foi o primeiro complexo de manganésio a ser utilizado como agente de contraste para o fígado em testes clínicos (Weinmann, 2003). O Mn-DPDP (Telescan), é um quelato de manganésio(II) que é internalizado pelos hepatócitos. Contudo o Mn-DPDP não é específico para hepatócitos, é absorvido pelos tecidos ricos em mitocôndrias que possuem um metabolismo aeróbico activo (Harisinghani, 2001).

O Mn-DPDP é administrado por via intravenosa dissociando-se *in vivo* em manganésio livre e DPDP. O fígado absorve o manganésio livre que actua como agente paramagnético intracelular diminuindo os tempos de relaxação, T_1 . O ligando DPDP é expelido pelos rins, na urina. O DPDP não contribui para as propriedades de imagiologia do ião metálico mas reduz a sua toxicidade (Harisinghani, 2001).

A administração deste agente deve ser lenta, o que implica uma redução da informação obtida, nomeadamente no que concerne à classificação e caracterização de

lesões. Ainda não foi provado que o Mn-DPDP permita a diferenciação entre tumores hepatocelulares benignos e malignos (Helmberger, 2001).

O Gd-BOPTA (Multihance), é um complexo de gadolínio(III), somente licenciado no Continente Europeu.

Após administração intravenosa, o Gd-BOPTA é distribuído pelo plasma e subsequentemente, pelo sistema extracelular tal como acontece com os agentes de contraste extracelulares. Gd-BOPTA é eliminado por filtração glomerular e após entrar nos hepatócitos por excreção biliar. Nos humanos, o Gd-BOPTA é eliminado essencialmente pelos rins sendo apenas 3% a 5% eliminado nos fluidos biliares.

Semelhantemente a outros agentes de contraste específicos para o fígado o Gd-BOPTA apresenta propriedades de perfusão e selectividade hepatócita (Helmberger, 2001).

O Gd-EOB-DTPA (Eovist), também é um complexo de gadolínio(III). A cadeia EOB, etoxibenzílica, confere lipofilicidade ao complexo.

Após injeção intravenosa o Gd-EOB-DTPA passa rapidamente da zona intravascular para o sistema extracelular. De seguida, o composto é absorvido pelos hepatócitos e, por último, eliminado por filtração glomerular (Helmberger, 2001). O Gd-EOB-DTPA é completamente eliminado do corpo através da urina e fezes (Weinmann, 2003).

Este composto ainda se encontra na fase de testes clínicos (Helmberger, 2001).

Partículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIO), ainda em estudos pré-clínicos, mostraram ser internalizadas pelos hepatócitos. Também se encontram em investigação nanopartículas SPIOs (USPIOs) revestidas com arabinogalactano e asialofetuína, para fazer a vectorização do fígado, através do receptor ASGP (Weinmann, 2003).

Por tudo o que foi referido, pode dizer-se que os agentes de contraste específicos para hepatócitos ajudam na detecção de lesões no fígado, pelo aumento do contraste entre o fígado e os tumores não-hepatocelulares (Harisinghani, 2001).

Dada a escassez de agentes de contraste específicos para hepatócitos (IRM do fígado), surge a necessidade de aprofundar a investigação no desenvolvimento de novos agentes de contraste.

5. Lectinas

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas não enzimáticas, que se ligam preferencialmente a estruturas específicas de hidratos de carbono e que desempenham um papel importante no reconhecimento celular. São diferentes das imunoglobinas, pois não são produtos de resposta imunitária (Lis, 1998; Nangia – Mater, 2002; Loris, 2002).

Os hidratos de carbono possuem um enorme potencial de codificação biológica. Estas moléculas (glicoproteínas e glicolípidos) encontram-se nas superfícies exteriores de todas as células e funcionam como meios de identificação celular para o meio exterior desempenhando um papel importante no reconhecimento celular (Nangia – Makker, 2002). Todas as lectinas possuem um domínio de reconhecimento de hidratos de carbono, sendo este que determina a sua especificidade (Calbiochem).

A classificação das lectinas depende da sua origem, ou seja, vegetal, animal, microbiana, etc. As lectinas animais são classificadas com base na homologia da sua sequência aminoacídica e na relação evolutiva entre lectinas. As lectinas das plantas são agrupadas de acordo com a família da planta. As lectinas encontradas em microorganismos tendem a ser classificadas com base na sua função, por exemplo, em adesinas ou toxinas (Varki, 1999; Calbochem). As lectinas podem encontrar-se na forma solúvel e/ou associadas a células exibindo várias funções. As lectinas animais encontram-se envolvidas numa variedade de processos celulares, incluindo transporte enzimático, *tissue homing* e função imunológica. As lectinas microbianas estão principalmente envolvidas na ligação à célula hospedeira, colonização de tecidos e invasão. A função biológica das lectinas das plantas ainda não está completamente entendida, no entanto, sabe-se que estão envolvidas em muitos processos intrínsecos, como deposição de proteínas armazenadas, defesa contra agentes patogénicos e predadores animais, estabelecimento de simbioses, transporte de hidratos de carbono, estimulação mitogénica das células embrionárias, aumento das paredes das células, entre outras. Estas lectinas encontram-se em muitas zonas das plantas desde sementes, folhas, caule e casca, sendo relativamente fácil a sua extracção. (Calbiochem)

A tabela 3 apresentada os desenvolvimentos mais importantes no estudo das lectinas entre 1860 e 1998 (Gabijs, 2001)

Tabela 3 – Alguns desenvolvimentos importantes na história das lectinas (Gabius, 2001).

1860	Descrição da coagulação do sangue como indicador da actividade das lectinas no veneno das cobras (S. W. Mitchell).
1888	Detecção da aglutinação das células por fracções proteicas de sementes de plantas tóxicas e de óleo de feijão (H. Stillmark).
1891	Aplicação das plantas tóxicas aglutinadas como modelos de antígenos (P. Ehrlich).
1898	Introdução do termo hemaglutinas, referente a proteínas vegetais que aglutinam os glóbulos vermelhos das células (M. Elfstrand).
1902	Detecção de glutinas bacterianas (R. Kraus) e confirmação da presença de lectinas no veneno das cobras (S. Flexner, H. Noguchi).
1906	Descrição de uma actividade para aglutinação de eritrócitos bovinos activada por revestimento com complemento (H. J. Bordet, F. P. Gay).
1907	Detecção de aglutinas não tóxicas em plantas (K. Landsteiner, H. Raubischek).
1913	Uso de células para purificação das lectinas (R. Kobert).
1919	Cristalização das lectinas Con A (J. B. Summer).
1936	Descoberta de hidratos de carbono que se ligam a lectina Con A (J. B. Summer, S. F. Howell).
1941	Detecção de aglutinas virais (G. K. Hirst).
1947/48	Detecção de um grupo específico de lectinas que identificam o grupo sanguíneo (W. C. Boyd, K. O. Renkonen).
1952	Hidratos de carbono naturais determinantes do grupo sanguíneo detectados por lectinas mediadoras de aglutinação (W. M. Watkins, W. T. J. Morgan).
1954	Introdução do termo lectinas quando se faz referência às ligações hidratos de carbono-proteínas (W. C. Boyd).
1960	Detecção do potencial mitogénico das lectinas em relação a linfócitos (P. C. Nowell).
1965	Introdução da cromatografia de afinidade para isolar lectinas (I. L. Goldstein, B. B. L. Agrawal).
1972	Detecção da sequência e da estrutura tridimensional das lectinas (G. M. Edelman, K. O. Hardman, C. F. Ainsworth).
1974	Isolamento da lectina do fígado nos mamíferos (G. Ashwell).
1978	Primeira encontro internacional sobre lectinas (T. C. Borg-Hansen).
1979	Detecção de ligandos endógenos de lectinas vegetais (H. Rüdiger).
1983	Detecção de acção intersticial das lectinas vegetais (L. L. Murdock).
1984	Isolamento das lectinas de tumores (H. J. Gabius, R. Lotan, A. Raz).
1985	Imobilização de glicoproteínas como adsorventes universais com afinidade para lectinas (H. Rüdiger).
1987	Introdução de neoglicoconjugados em diagnósticos de tumores (H. J. Gabius e colaboradores).
1989	Detecção da acção fungicida das lectinas vegetais (W. J. Peumans).

1995	Análise da estrutura do complexo ligando-lectina em solução por espectroscopia de RMN (J. Jiménez-Barbero e colaboradores).
1996/98	Deteção de selecção de confórmers diferentes por lectinas (H. J. Gabius e colegas, L. Poppe e colaboradores).

As lectinas são geralmente obtidas na sua forma pura, a maior parte por cromatografia de afinidade do ligando imobilizado, podendo também ser obtidas, mais recentemente, por recombinação com técnicas de ADN (Lis, 1998).

As lectinas representam um grupo heterogéneo de proteínas oligoméricas que variam muito em tamanho, estrutura, organização molecular bem como na constituição dos seus locais de ligação. Por isso são agrupadas em famílias com sequências e efeitos estruturais semelhantes (Lis, 1998)

5.1 - Estrutura molecular das lectinas

O estudo da estrutura das lectinas teve início em 1970, com o estudo da estrutura da concanavalin A, Con A (Loris, 2002). Esta lectina foi isolada a partir do legume *canavalin ensiformis* (Banerjee, 1996). No entanto, só em 1989 se conseguiu obter o primeiro complexo de hidrato de carbono Con A ligado à metil α -D-manopiranosida. A primeira estrutura de uma lectina animal, a galectina, só foi obtida em 1993 (Loris, 2002).

Tendo por base a sua especificidade, as lectinas podem ser classificadas em diferentes famílias, de acordo com o monossacárideo para o qual exibem maior afinidade. A afinidade das lectinas é usualmente fraca para com os monossacárideos, com constantes de associação muito baixas, na ordem dos milimolar, no entanto, apresentam geralmente elevada selectividade (Lis, 1998).

As lectinas exibem, muitas vezes, especificidade para se ligarem a oligossacárideos, havendo algumas que interagem apenas com estes. A afinidade das lectinas para com os oligossacárideos pode ser influenciada pela forma dos oligossacárideos, compostos que são moléculas flexíveis com considerável liberdade de rotação em torno das bandas glicosídicas que ligam os monossacárideos individuais. Devido à sua flexibilidade, os oligossacárideos com estrutura química diferente podem

ter efeitos topográficos substanciais em comum, obtendo-se como resultado desta similaridade, ligações à mesma lectina (Lis, 1998).

A determinação de sequência de aminoácidos de algumas centenas de lectinas, bem como da sua estrutura tridimensional permitiu substituir a tradicional divisão das lectinas de acordo com a sua origem, por uma classificação baseada na sua estrutura comum (Lis, 1998). De acordo com esta classificação existem três classes: simples; mosaico; conjuntos macromoleculares.

Dentro de cada classe existem famílias de lectinas que possuem sequências e propriedades estruturais similares.

5.1.1 - Lectinas simples

Encontram-se nesta classe quase todas as lectinas das plantas, as galectinas (S – lectinas) e as lectinas animais pertencentes à família específica da galactose.

Possuem um número pequeno de subunidades não necessariamente idênticas, de peso molecular geralmente abaixo dos 40 kDa, podendo conter um domínio adicional além do local de ligação a hidratos de carbono (Lis, 1998).

5.1.2 - Lectinas mosaico

As lectinas mosaico são proteínas com diversos domínios (módulos de acção), mas apenas um deles é o local de ligação de hidratos de carbono. Encontram-se nesta classe as lectinas animais C, P, e I assim como hemaglutinas virais.

Muitas destas lectinas são monovalentes, mas como se encontram envolvidas em membranas, actuam de forma multivalente (Lis, 1998).

5.1.3 - Conjuntos macromoleculares

É comum encontrar lectinas deste tipo em bactérias sob a forma de fibras. São filamentos de organelos heteropoliméricos que se encontram na superfície das bactérias, consistindo num arranjo em hélice de subunidades de diferentes tipos associados segundo uma ordem bem definida (Lis, 1998).

O tamanho do filamento fibroso (*Shaft*) é formado por polímeros da subunidade

maior. Apenas uma das subunidades, geralmente o menor componente da fibra, processa a ligação com os hidratos de carbono e é responsável pela especificidade da fibra para os açúcares (manose ou galactose) (Lis, 1998).

Existem no entanto, muitas lectinas que não pertencem a nenhuma família estrutural conhecida, são chamadas as lectinas órfãs (Kilpatrick, 2002).

5.2 -Estrutura das lectinas animais

Algumas proteínas, que hoje consideramos como lectinas animais, foram descobertas antes das lectinas das plantas, no entanto, muitas não eram reconhecidas como proteínas de ligação a hidratos de carbono. Até cerca de 1998, as lectinas animais eram agrupadas em apenas duas famílias, consoante a sua estrutura, as lectinas do tipo-C, que requerem Ca(II) para a sua actividade, e do tipo S, dependentes de grupos sulfidrilos com afinidade para β -galactosídeos (presentemente conhecidas como galectinas) (Kilpatrick, 2002).

Actualmente a classificação das lectinas animais, como já foi referido, tem por base a homologia da sequência aminoacídica e a relação evolutiva entre lectinas (tabela 4). Estes grupos incluem a maioria das lectinas animais conhecidas, no entanto, existem outros que não apresentam estas características nem homologias óbvias, nem relações evolutivas com outras lectinas (Varki, 1999).

Tabela 4 – Classes e famílias de lectinas animais (adaptado de Varki, 1999).

Tipo-C (inclui selectinas, colectinas, etc)	}	Homologia de sequências conhecidas
Tipo-S (galectinas)		
Tipo-P (M6PRs)		
Tipo-I (inclui siglecs-lectinas com afinidade para ácidos siálicos)		
Calcireticulin, calnexin, calmegin		
Proteínas com afinidade para ácido hialurónico		
Lectina do ovo da rã		
Pentraxinas	}	Homologia de sequências conhecidas
Proteínas com afinidade para glicosaminoglicanos		
Proteínas de ligação ao glicosaminoglicano		
ERGIC-53 e VIP-36		
Receptor S4GGnM		
Proteínas com afinidade para		
Proteínas com afinidade para Sulfoglucoronosil		
Lectinas do sangue de insectos		
Inerleuccinas I e II		

5.3 - Função das lectinas

A principal função das lectinas parece ser o reconhecimento celular.

Inicialmente, por volta de 1960 quando se efectuaram os primeiros estudos sobre as lectinas, estas eram consideradas meios importantes na investigação estrutural e funcional de complexos de hidratos de carbono, especialmente glicoproteínas e na identificação de alterações que ocorrem na superfície celular durante os processos patológicos e fisiológicos. Presentemente, as lectinas tornaram-se alvo de atenção devido ao seu potencial de reconhecimento celular em diversos processos biológicos nomeadamente, na eliminação de glicoproteínas do sistema circulatório, no controlo intracelular do transporte de glicoproteínas, na adesão de agentes infecciosos a células hospedeiras, no recrutamento de leucócitos para locais de inflamação assim como nas interacções celulares no sistema imunitário em caso de metástases e tumores malignos (Lis, 1998).

5.3.1 - Lectinas microbianas

As lectinas virais e microbianas são reguladoras da adesão de organismos às células hospedeiras, um pré-requisito para que a infecção ocorra. Isto foi demonstrado em 1940 para a hemaglutina do vírus da gripe, uma lectina específica para o ácido N-acetilneuramínico, ácido siálico (Lis, 1998).

5.3.2 – Lectinas vegetais

De entre as várias teorias propostas sobre as funções das lectinas das plantas apenas duas são consideradas actualmente mais plausíveis (Lis, 1998).

A primeira assume que a função destas lectinas reside no estabelecimento de simbiose entre as bactérias fixadoras de nitrogénio (risobiomas) e plantas leguminosas, um processo de importância crucial no ciclo do nitrogénio da vida Terrestre. Contudo, a aplicação desta teoria é restrita uma vez que só se aplica a uma família de plantas (leguminosas).

A outra teoria é mais geral e pressupõe que as lectinas das plantas são agentes de defesa contra diferentes predadores invertebrados e animais de maior porte, assim como contra fungos fitopatogénicos. A toxicidade de várias lectinas das plantas para animais e o seu crescente efeito inibidor nos fungos são a base para se presumir que a sua função é a defesa das plantas contra fungos fitopatogénicos e animais (Lis, 1998).

5.3.3 - Lectinas animais

A ligação a hidratos de carbono é efectuada através de um domínio específico, o domínio de reconhecimento de hidratos de carbono (DRH) (figura 8) (Varki, 1999).

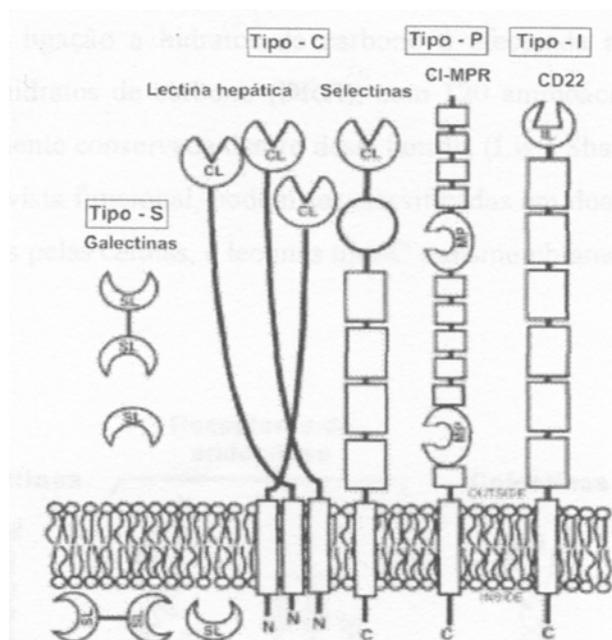


Figura 8 – Representação esquemática (estrutura do domínio extra celular e topologia) dos principais grupos de lectina animais, tendo em conta a estrutura proteica. (CL) DRH lectina tipo-C; (SL) DRH lectina tipo-S; (MP) DRH lectina tipo-P; (IL) DRH lectina tipo-I (Varki, 1999).

Apesar das lectinas animais serem descritas como proteínas que ligam a hidratos de carbono de modo específico, existem referências a lectinas animais que têm como actividade adicional, a ligação a outras estruturas que não hidratos de carbono, via interações proteína-proteína, proteína-lípido ou proteína-ácido nucleico. Isto sucede quando o domínio de reconhecimento do hidrato de carbono se encontra combinado com um domínio adicional, feito estrutural que Barondes associa ao facto das lectinas animais, em geral, serem moléculas bifuncionais (Kilpatrick, 2002). Como exemplo, temos as galectinas, que apresentam afinidade para resíduos de galactose e sequências de aminoácidos. Com base na arquitectura estrutural dos domínios de ligação, estas lectinas podem ser classificadas em três tipos: *proto*, *chimera* e *tandem-repeat* (figura 9) (Hirabayashi, 1997).

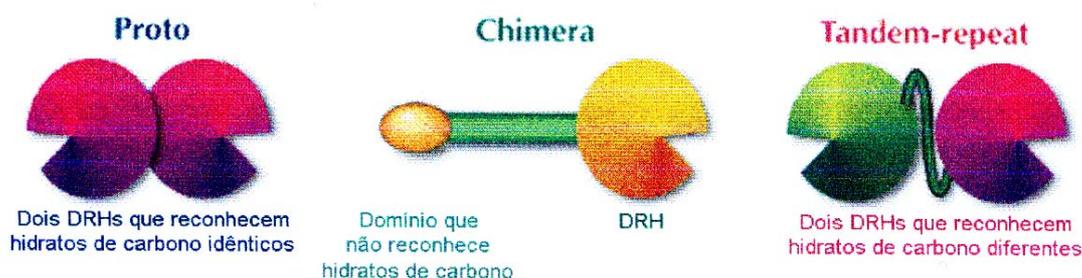


Figura 9 – Arquitectura dos domínios de ligação nos três tipos de galectinas (Hirabayashi, 1997).

Do ponto de vista funcional as lectinas tipo-C podem ser classificadas em duas classes: lectinas tipo-C solúveis secretadas pelas células, e lectinas tipo-C transmembranares (figura 10) (Varki, 1999).

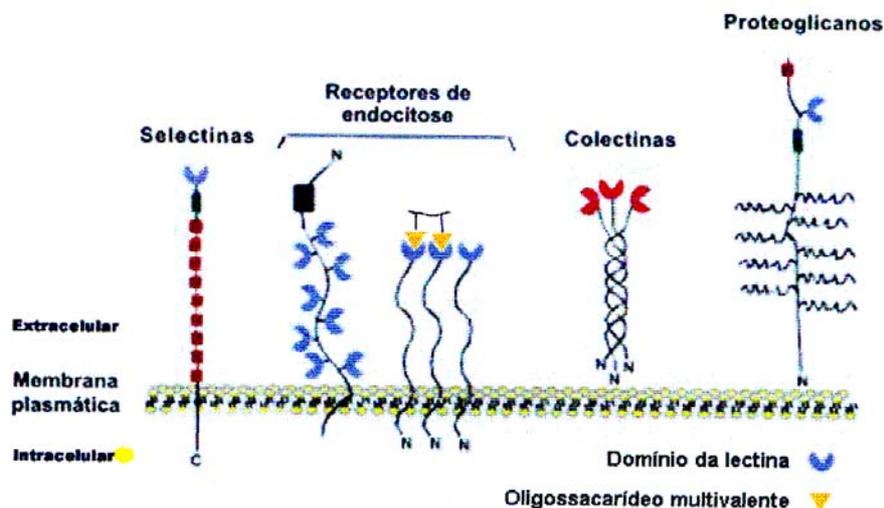


Figura 10 – Organização do DRH, em diferentes membros da família das lectinas tipo-C (Varki, 1999).

As lectinas do tipo-C encontram-se envolvidas em variadas funções do sistema imunitário, como a inflamação e imunidade em casos de tumor e células infectadas com vírus (Varki, 1999). Em particular as lectinas tipo-C transmembranares têm como funções representativas, o reconhecimento entre células, adesão célula-célula e internalização de moléculas em células. Um exemplo típico deste grupo é o receptor hepático asialoglicoproteína (ASGP), lectina específica para a galactose/N-acetilgalactosamina, presente em macrófagos. A capacidade de oligomerização (dímero, trímero ou hexâmero, dependendo da molécula), das lectinas transmembranares, permite que a ligação a hidratos de carbono seja feita através de interações multivalentes (Imai, 1998).

5.3.4 - Outras lectinas

Existem outras lectinas, descobertas mais recentemente, que são lectinas intracelulares nomeadamente, Calnexin, Calreticulin, MR60/ERGIC-53 e VIP-36, que desempenham um papel na biosíntese de glicoproteínas assim como no seu processo de saída do meio intracelular, transporte e entrega na superfície das células (Lis, 1998).

5.4 - Receptor de asialoglicoproteína (ASGP)

5.4.1 – Características gerais

O receptor ASGP foi a primeira lectina a ser descrita em mamíferos, tendo sido descoberta em meados dos anos 60 por Ashwell e Morell e seus colaboradores (Weigel, 2002). Esta lectina, também chamada lectina hepática, é normalmente descrita como sendo responsável pela endocitose e remoção da circulação de glicoproteínas desialiladas, em que após a remoção do resíduo terminal de ácido siálico ficam expostos resíduos terminais de galactose (Gal) ou N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Wu, 2002). No entanto, trabalhos recentes mostraram que este receptor é também capaz de reconhecer glicoproteínas com terminais de ácido siálico (Park, 2003).

Uma vez que esta ligação é dependente dos íons Ca(II) , este receptor é incluído na classe das lectinas do tipo-C. É predominantemente expresso na membrana sinusoidal de hepatócitos de mamíferos (Varki, 1999; Wu, 2002). Em qualquer momento os receptores estão presentes na superfície e no interior dos hepatócitos, com 50-90% do número total de receptores localizados intracelularmente, em compartimentos vesiculares, no retículo endoplasmático e complexo de Golgi (McAbee, 1990; Bader, 1995; Weigel, 2002).

5.4.2 – Características estruturais

O receptor ASGP é constituído por subunidades maiores e menores, que são codificadas por genes diferentes. Em humanos, o receptor ASGP é constituído por duas subunidades, H1 (subunidade maior) e H2 (subunidade menor), com 46 e 50 kDa e expressos numa razão molar de 3:1, respectivamente (Weigel, 2002).

Embora o receptor de ASGP se ligue a glicoproteínas com resíduos terminais não-redutores de Gal ou GalNAc, tem o dobro da afinidade para GalNAc (Stockert, 1995). Cada subunidade polipeptídica do receptor liga-se a um resíduo terminal de Gal ou GalNAc e a afinidade dos ligandos para o receptor ASGP parece ser governada pela valência dos resíduos de açúcar e pelo espaçamento apropriado entre eles (Rensen, 2001). Para racionalizar as diferenças de afinidade, principalmente em relação à valência e espaçamentos dos açúcares, foi proposto um modelo que descreve a distribuição dos locais de ligação dos receptores da superfície com uma geometria

triangular (figura 11) (Stockert, 1995).

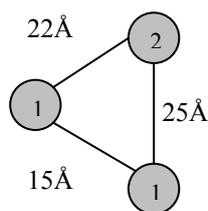


Figura 11 – Relação geométrica entre os locais de ligação do receptor ASGP (adaptado de Stockert, 1995)

Apesar de ser consensual que o receptor biológico ASGP é um complexo oligomérico composto por dois tipos de subunidades, a composição das subunidades e o tamanho do receptor em hepatócitos vivos, permanece incerta (Bider, 1996).

5.4.3 – Função do receptor ASGP

O receptor biológico ASGP foi identificado e tem sido caracterizado com base na sua capacidade para ligar glicoproteínas exógenas com terminais Gal/GalNAc; no entanto ainda não foram definitivamente identificados ligandos endógenos para este receptor hepático (Park, 2003)

Estudos mais recentes apontam para uma função do receptor de ASGP no catabolismo da lipoproteína (Herzenjak, 2003). O envolvimento do receptor ASGP na remoção de células apoptóticas também já foi demonstrado (Dini, 1992; Dalton, 2003).

6. Multivalência e efeito de “cluster”

Muitos processos biológicos ocorrem por ligações monovalentes entre moléculas, e são muitas vezes efectivos. Mas regra geral as interacções multivalentes são mais fortes que a soma das interacções monovalentes correspondentes e por isso mais vantajosas (Mammen, 1998).

As interacções multivalentes são caracterizadas pela ligação simultânea de múltiplos ligandos ou de ligandos multivalentes a uma molécula com vários locais de ligação (Mammen, 1998).

Assim, a multivalência é a ligação em simultâneo entre dois ou mais locais de

ligação de uma molécula biológica ou organismo (proteínas ou vírus), a múltiplos receptores de outra (as superfícies celulares) (Borman, 2000). As interações desta natureza têm mostrado ser altamente específicas e versáteis. Por exemplo, a ligação pode ser modulada com a alteração de resíduos de açúcar individuais ou alterando o seu espaçamento.

A multivalência pode ser vista como um meio que a Natureza encontrou de, mesmo utilizando ligandos fracos, estabelecer ligações fortes. Por isso cada vez mais os investigadores demonstram interesse em explorar o potencial da multivalência na concepção de novos fármacos, nomeadamente no desenvolvimento de ligandos de hidratos de carbono (Borman, 2000).

Da multivalência resulta um aumento da afinidade geralmente conhecido como efeito de “cluster”. No efeito de “cluster” obtém-se um aumento da afinidade maior do que o factor de multiplicação de valência (Borman, 2000).

Existem diversos mecanismos que contribuem para o aumento da afinidade funcional. Entender estes mecanismos é importante para otimizar a performance dos ligandos e perceber como funcionam os sistemas naturais (Bertozzi, 2001). Mecanismos relevantes incluem o efeito quelato (ocupação dos locais de ligação adjacentes) e o efeito “cluster” (figura 12) (Kiessling, 2000).

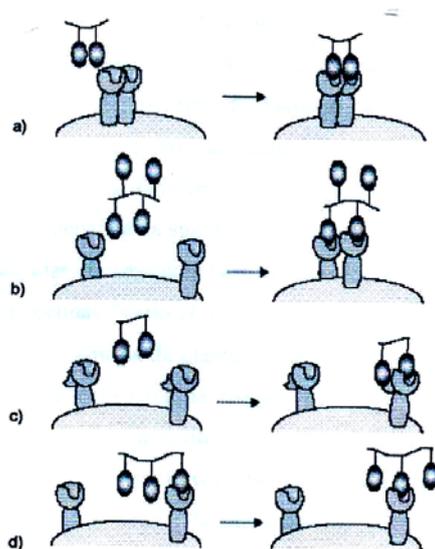


Figura 12 – Mecanismos de interação entre ligandos multivalentes e receptores da superfície celular. Ligandos multivalentes podem: **a)** interagir com receptores oligoméricos, por ocupação de múltiplas locais de ligação (efeito quelato), **b)** causar um efeito de Cluster nos receptores da superfície celular, **c)** ocupar locais de ligação primários e secundários num receptor, **d)** apresentam uma concentração local mais elevada de epitótipos de ligação, o que pode levar a um aumento da afinidade aparente (Kiessling, 2000).

A ocorrência da multivalência na natureza, quer por inibição da ligação de agentes patogénicos a células quer pelo bloqueamento dos locais de ligação nas células das toxinas, são processos que envolvem ligandos multivalentes de hidratos de carbono, sendo merecedores de investigação (Roy, 1996)

Diversos fenómenos biológicos são exemplos de interacções multivalentes: adesão da bactéria *E. coli* à superfície das células epiteliais da uretra e bexiga, adesão de vírus à superfície das células como acontece com o vírus da gripe, respostas anti-inflamatórias, o recrutamento dos neutrófilos pelas células endoteliais próximas da inflamação e em reacções imunes, a ligação dos anticorpos aos respectivos antiécticos presentes nas superfícies de bactérias, vírus e outros organismos (Mammen, 1998).

Os hidratos de carbono desempenham, entre outras funções, um papel importante na adesão celular, onde as interacções hidrato de carbono-receptor são geralmente específicas e multivalentes. Esta especificidade e multivalência sugerem a potencial utilidade de derivados de hidratos de carbono, geralmente poliméricos e multiantenários, como transportadores em libertação controlada de fármacos e como bloqueadores ou inibidores de associações hidratos de carbono-receptor indesejado (Fujimoto, 2000).

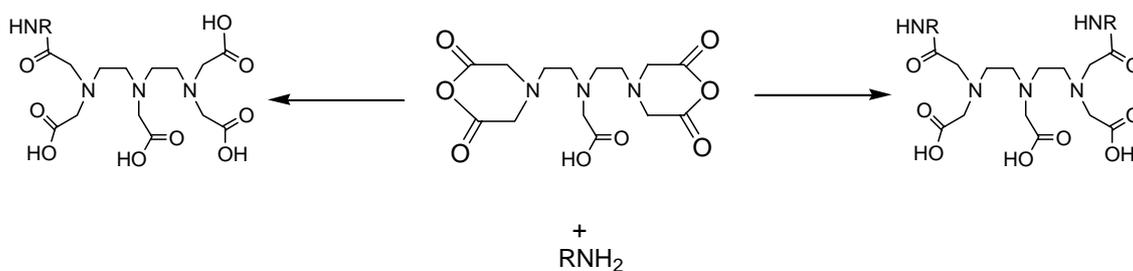
galactose e lactose. O receptor de ASGP, receptor biológico do fígado, reconhece especificamente resíduos não redutores de galactose (lactose) com configuração anomérica β em biomoléculas ou em conjugados sintéticos (Weigel, 2002). Os conjugados de glucose não são reconhecidos pelo receptor ASGP, pelo que constituem um controle negativo no estudo da interacção glicoconjugado-receptor ASGP.

O espaçador utilizado foi a 1,6-hexanodiamina, que para além de introduzir a função amina necessária para o acoplamento com o agente quelante, DTPA-bisanidrido, funciona como espaçador entre o complexo metálico e o fragmento de reconhecimento biológico.

O agente quelante seleccionado foi o DTPA, não só porque forma complexos cinética e termodinamicamente estáveis, mas também porque é um ligando disponível comercialmente na forma de bisanidrido, facilmente conjugável com biomoléculas.

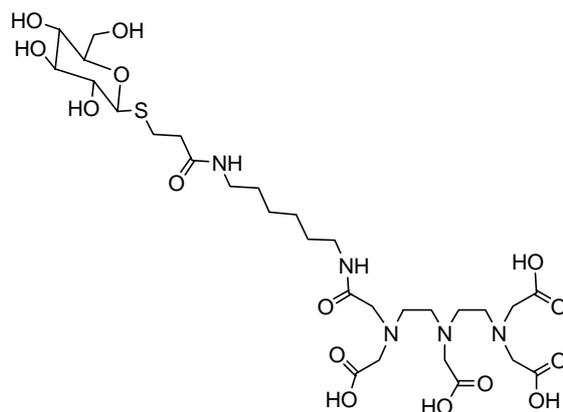
2. Síntese dos compostos

A síntese de DTPA's mono e bisamida está descrita na literatura para uma grande variedade de conjugados. A reacção de DTPA bisanidrido com blocos sintéticos com grupos terminais amina permite sintetizar DTPA's (mono e bisamidas) com rendimentos aceitáveis (esquema 1).



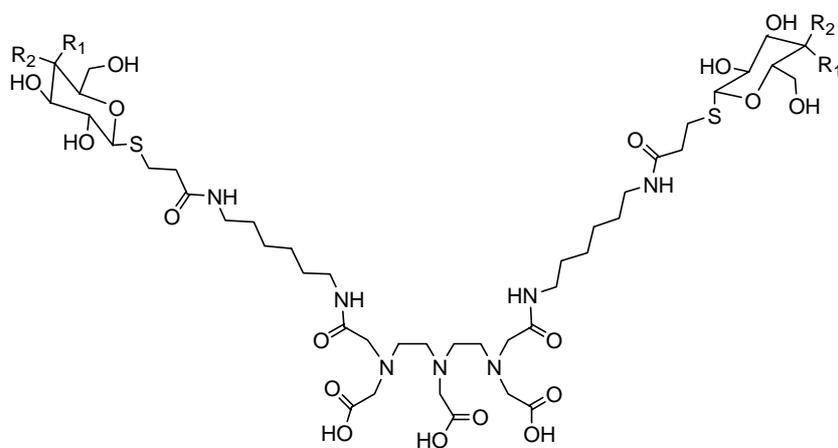
Esquema 1 - Síntese dos DTPA- mono e bisamidas.

Esta estratégia sintética foi adaptada para a síntese de (tio)glicoconjugados de DTPA de várias valências (1, 2, 4 e 8) e com diferentes açúcares: galactose (Gal), glucose (Glc) e lactose (Lac) (Figura 14, 15, 16 e 17) (Baía, aceite para publicação; Zanini, 1996).



4 - DTPA(mono-Glc)

Figura 14 – Estrutura do glicoconjugado DTPA-monoamida.

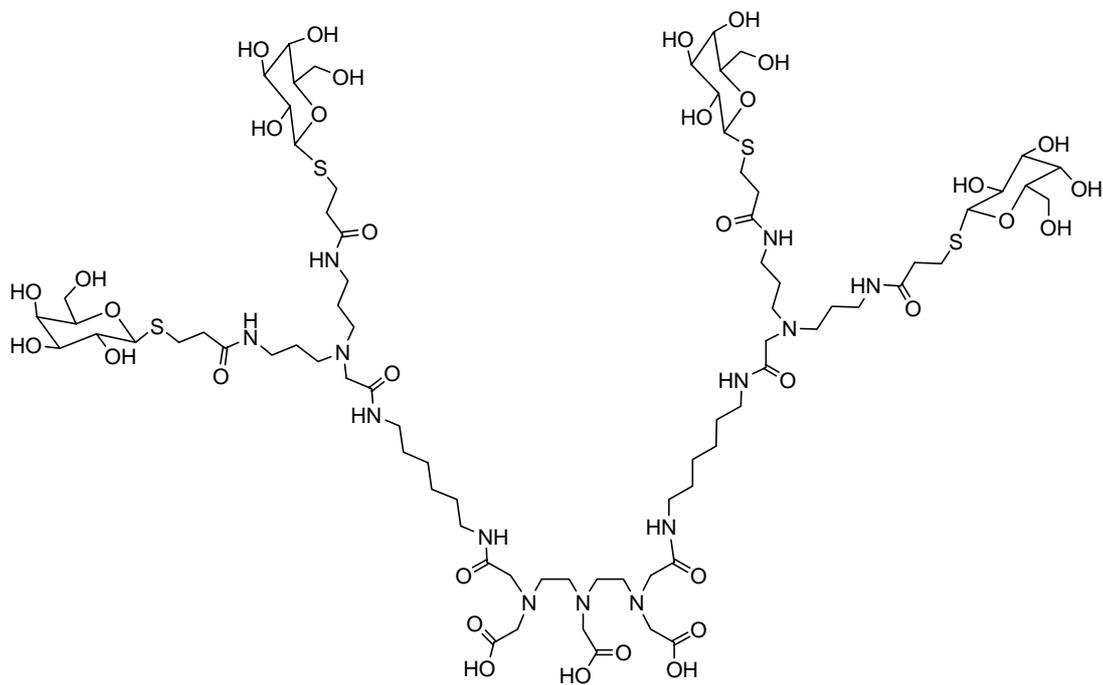


5 - $R_1 = H$ e $R_2 = OH$ - **DTPA(Glc)₂**

6 - $R_1 = OH$ e $R_2 = H$ - **DTPA(Gal)₂**

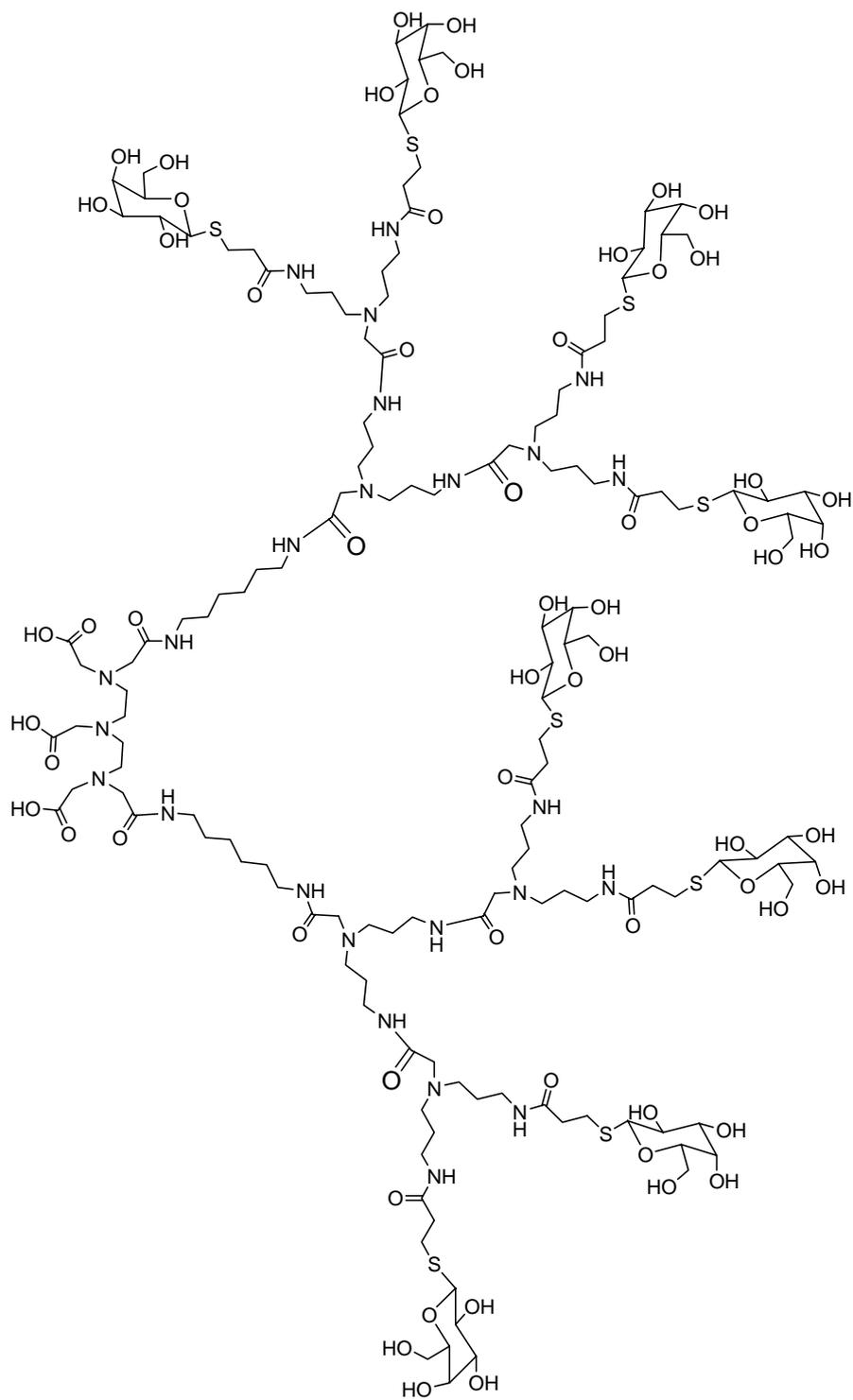
7 - $R_1 = H$ e $R_2 = \beta$ -D-galactopyranosil - **DTPA(Lac)₂**

Figura 15 – Estrutura dos glicoconjugados divalentes de DTPA.



8 - DTPA(Gal)₄

Figura 16 – Estrutura do glicoconjugado tetravalente de DTPA.



9 - DTPA(Gal)₈

Figura 17 – Estrutura do glicoconjugado octavalente de DTPA.

Os blocos amina usados na síntese dos (tio)glicoconjugados de DTPA (**4**, **5**, **6**, **7**, **8** e **9**) foram: um bloco monovalente (**10**), um glicodendrímico divalente (**11**) e um glicodendrímico tetravalente (**12**) (Figura 18).

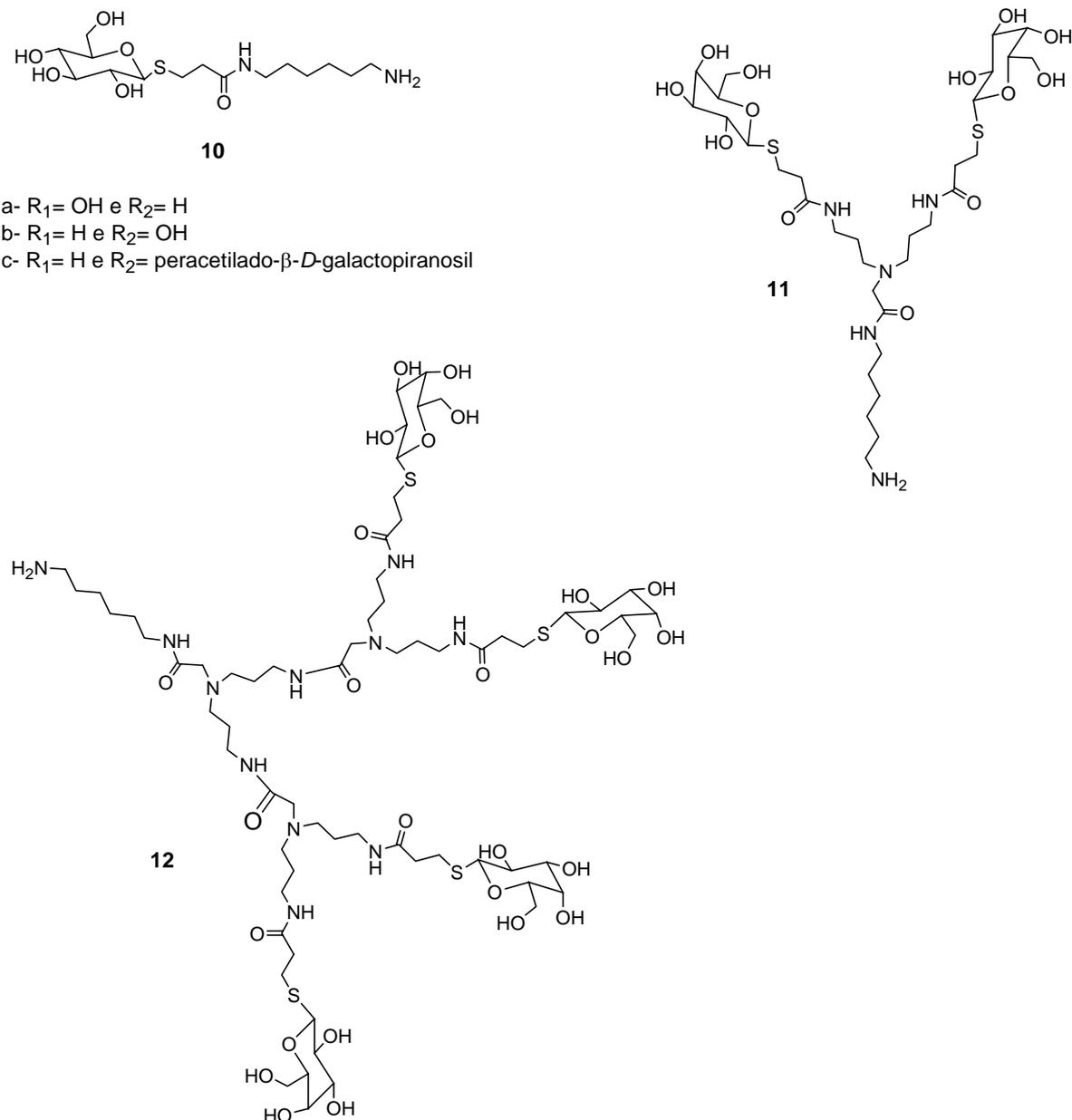
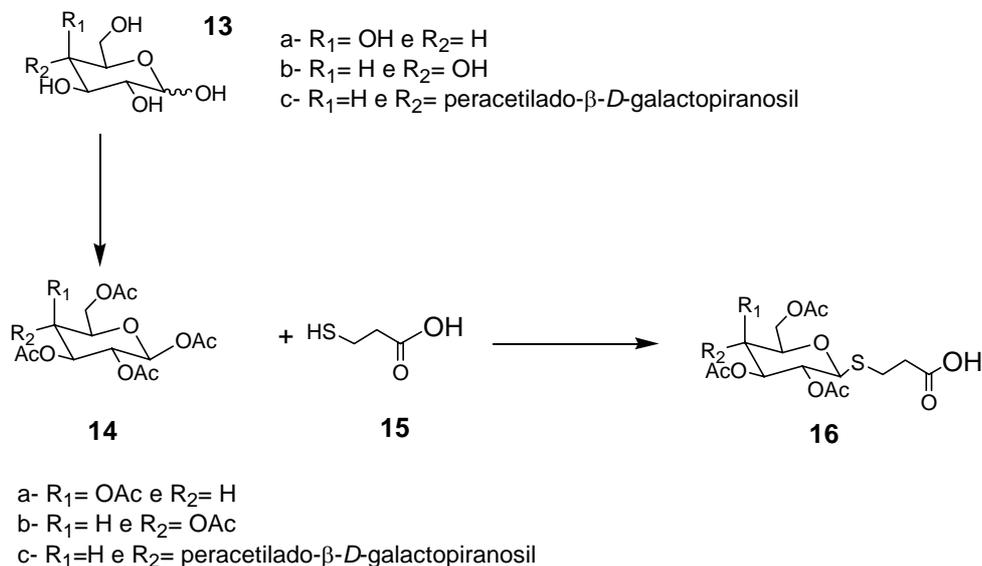


Figura 18 - Estrutura dos blocos amina usados na síntese de DTPA monoamida (**4**) e bisamida (**5**, **6**, **7**, **8**, e **9**).

Os (tio)glicosídeos foram seleccionados como fragmentos de açúcar (determinantes de especificidade) devido à facilidade da sua obtenção, em altos rendimentos, a partir de reagentes disponíveis comercialmente (Elofsson, 1991).

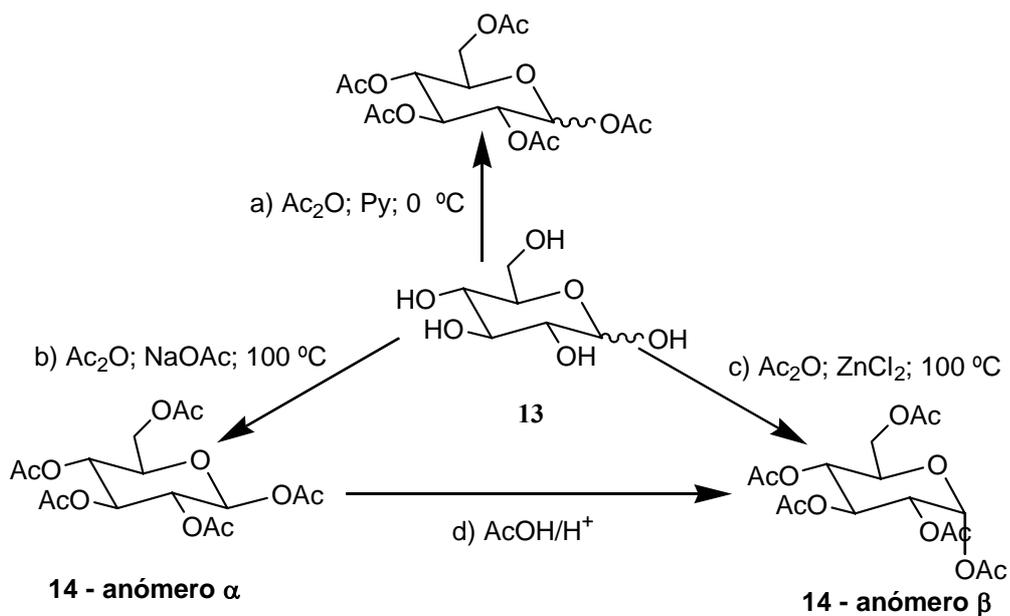
Adicionalmente o uso de tióis ω funcionalizados com ácidos carboxílicos (ácido tiopropiónico por exemplo) permite a introdução da função ácido carboxílico conveniente para acoplamento com aminas (Esquema 2).



Esquema 2 – Síntese de ácidos glicosiltiopropiónicos peracetilados.

a) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NaOAc}$; b) DCM ; $\text{BF}_3\text{OEt}_2/\text{DCM}$

Na reacção de acetilação o acetato de sódio funciona como catalisador, levando à formação preferencial de monossacarídeos peracetilados (**14**) com configuração anomérica β (figuras 19, 20 e esquema 3).



Esquema 3 - Síntese de monossacarídeos peracetilados.

Em condições de catálise ácida (esquema 3, condições c) e d)) forma-se preferencialmente o anómero α , mais estável devido ao efeito anomérico (produto termodinâmico). Em condições de catálise alcalina (esquema 3, condição b) a velocidade de mutarrotação é mais alta do que a velocidade da reacção de acetilação. Adicionalmente, o grupo OH hemiacetálico (posição 1) na conformação equatorial é mais reactivo (nucleófilico) do que o grupo OH-1 hemiacetálico na conformação axial. Do efeito combinado resulta a formação do produto cinético, β acetato.

Os β acetatos são requeridos para a reacção de síntese dos ácidos (tio)glicosilpropionicos (**16**). De facto esta reacção não ocorre com os α -acetatos.

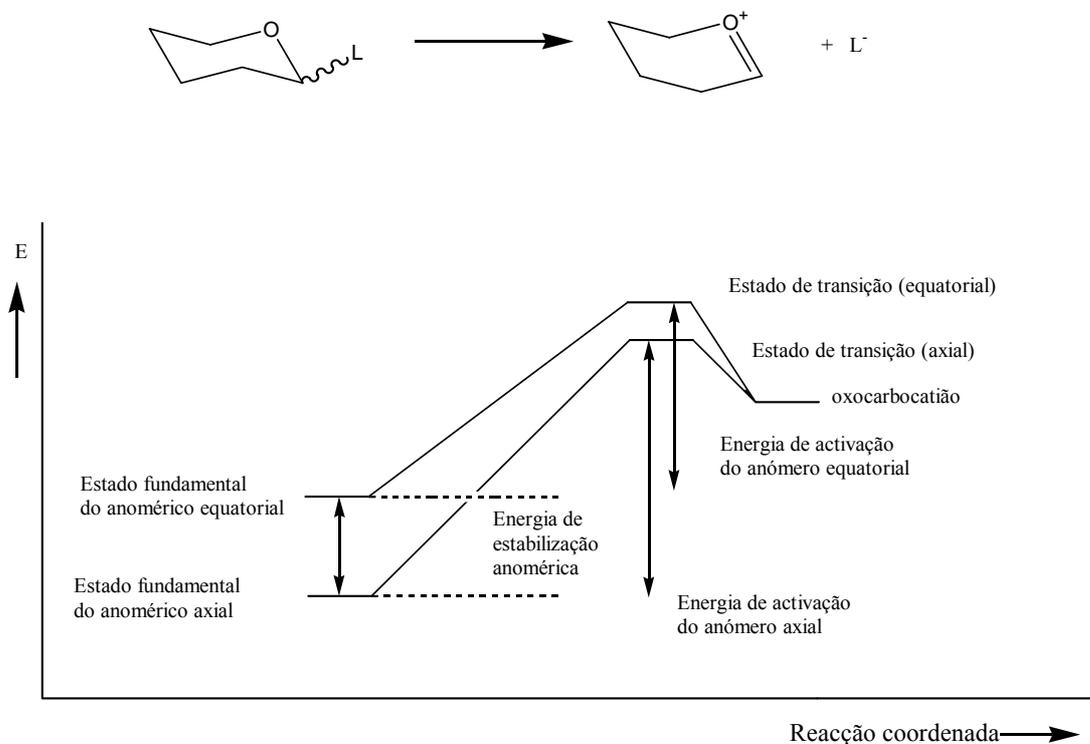


Figura 19 - Perfil de energia para a formação do intermediário oxocarbeniônio na reacção de hidrólise em glicosídeos axial e equatorial. L é o grupo abandonante (Boons, 2000).

As reacções de hidrólise de α e β glicosídeos procedem pela formação de um intermediário oxocarbeniônio comum, conseqüentemente os estados de transição que levam á formação deste intermediário são similares. Como o anómero α é mais estável que o anómero β devido ao efeito endoanomérico apresenta por isso uma maior energia de activação e conseqüentemente menor reactividade. Assim a diferença de reactividade

dos anómeros α e β pode ser explicada com base nos seus estados fundamentais de energia.

A magnitude do efeito anomérico está directamente relacionada com a electronegatividade de substituintes X na posição anomérica (figura 20) (Boons, 2000).

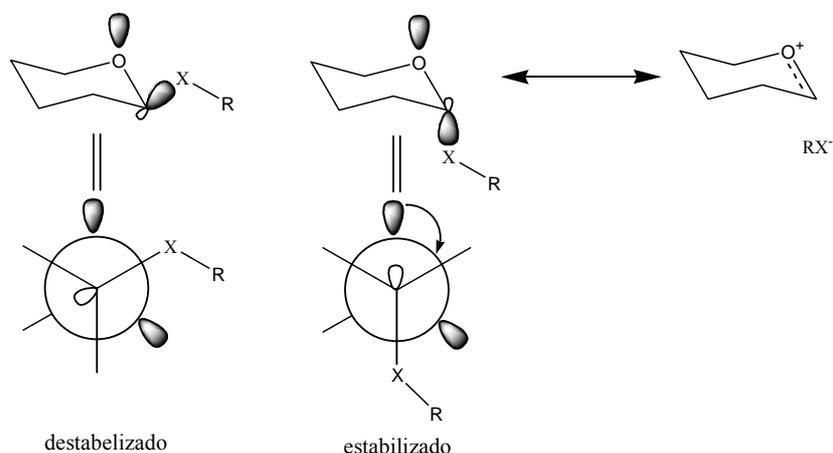
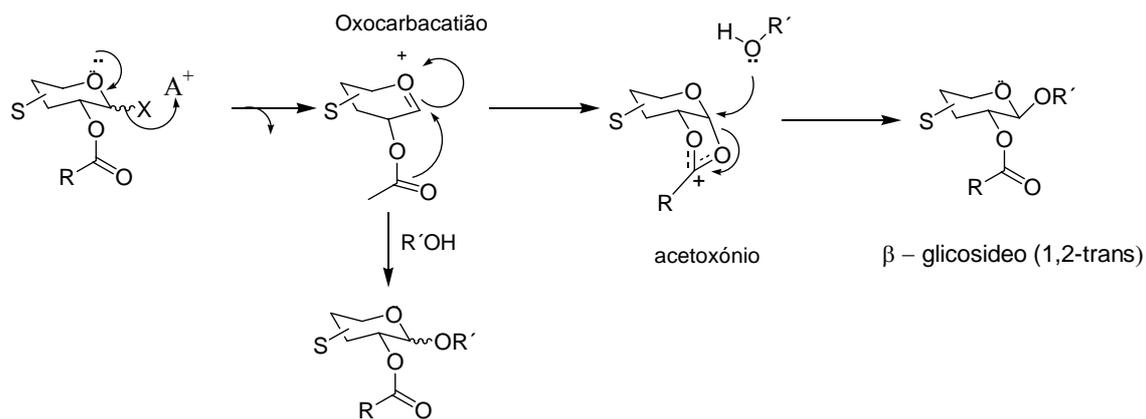


Figura 20 - Efeito anomérico: efeito estabilizador resultante da interação do par de electrões (não ligante) do oxigénio endocíclico com a orbital antiligante C-X, em compostos substituídos na posição anomérica axial (Boons, 2000).

A conformação axial (anómero α) é estabilizada pela transferência parcial de densidade electrónica do oxigénio endocíclico para a orbital antiligante C-X periplanar. Esta interacção (efeito estereoelectrónico), não está presente no anómero β , porque a orbital antiligante C-X tem uma orientação espacial desfavorável (figura 20). Este efeito permite racionalizar o efeito da electronegatividade de substituintes X na velocidade de reacções de hidrólise de glicosídeos.

O receptor biológico ASGP reconhece glicoproteínas desialiladas, i.e, em que os resíduos terminais do ácido siálico foram clivados expondo resíduos de N-acetilgalactosamina ou galactose na forma β . É portanto fundamental que os blocos de açúcar (galactose, glucose e lactose) se encontrem na configuração anomérica β .

O grupo acetilo na posição 2 determina a configuração anomérica dos (tio)glicosídeos através de participação na formação do intermediário oxocarbocatião.



Esquema 4 – Síntese de β-glicosídeos (1,2-trans-glicosídeos) por efeito de participação do grupo vizinho (Boons, 1997).

O intermediário oxocarbacatião tem geometria planar pelo que o ataque pelo nucleófilo pode ocorrer com igual probabilidade na “face” α ou β , levando à formação de uma mistura de glicosídeos com configuração α e β . Participação do grupo acetato na posição 2 leva à formação do intermediário acetooxónio em que a “face” α está bloqueada, formando-se exclusivamente o anómero β .

Os monossacarídeos constituintes dos oligossacarídeos de glicoconjugados (glicolípidos e glicoproteínas) naturais estão ligados por ligações *O*-glicosídicas na forma α ou β . Estas ligações glicosídicas são cliváveis por α ou β glicosidases, as quais têm um papel importante na síntese e processamento de oligossacarídeos e glicoconjugados naturais (Varki, 1999).

É especialmente relevante para estudos *in vivo* e *in vitro* o facto dos (tio)glicosídeos (*S*-análogos) serem resistentes à hidrólise por glicosidases. São portanto, mais estáveis do ponto de vista metabólico. Foi demonstrado também que os (tio)glicosídeos adoptam em solução uma conformação similar à dos respectivos análogos de oxigénio possuindo uma actividade biológica equivalente (Elofsson, 1991; Elofsson, 1993; Kiefel, 1999).

A arquitectura dendrímica de blocos **11** e **12** foi seleccionada pela possibilidade que oferece de variar rapidamente a valência dos glicoconjugados.

Os dendrímeros (também conhecidos como moléculas em cascata) foram introduzidos durante a última década como materiais poliméricos bem definidos (monodispersos) e funcionalizados (grupos funcionais terminais ácido carboxílico, amina, éster, etc) com tamanhos e formas e propriedades parecidas com as das

moléculas biológicas (proteínas). A apresentação multivalente de ligandos biológicos torna estas moléculas plataformas preveligiadas para o estudo de interacções multivalentes (Boas, 2003). Estes materiais são sintetizados de uma forma iterativa através de uma estratégia convergente ou divergente a partir de um número reduzido de blocos sintéticos (figura 21 e esquema 5).

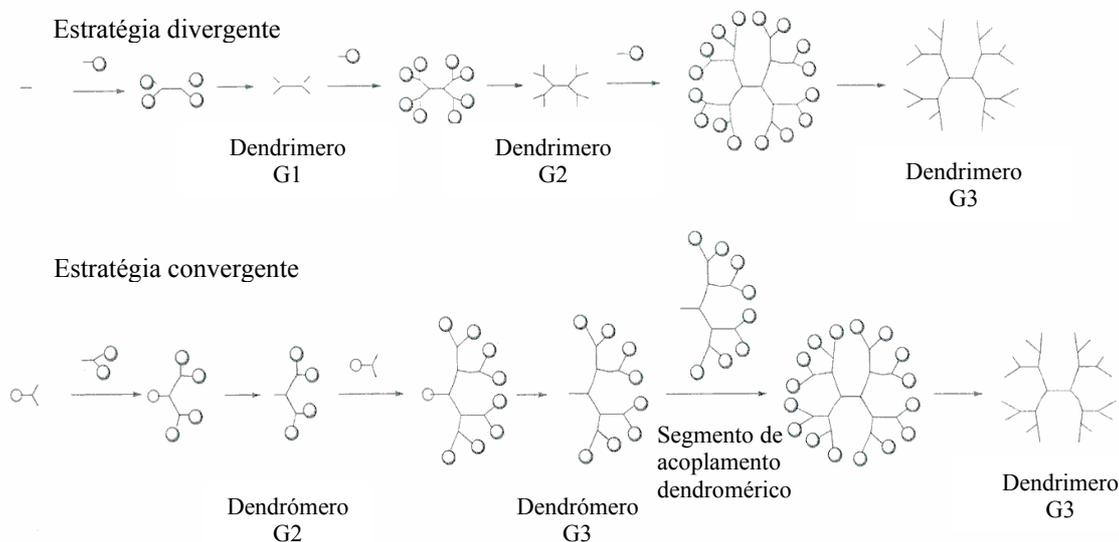
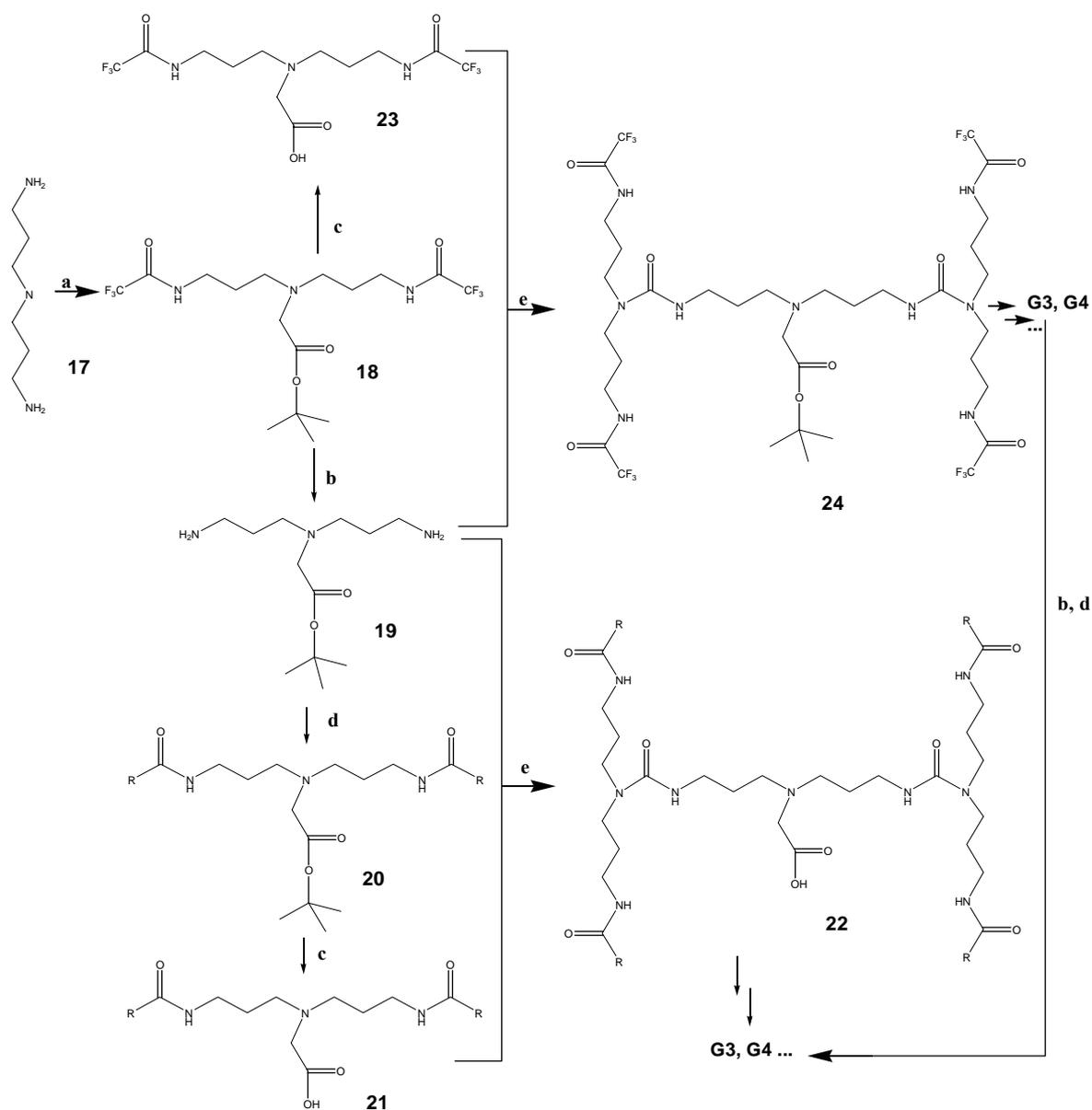


Figura 21 – Reacção de síntese dos dendrímeros. (Adaptado de Boas, 2003)

Na estratégia divergente, o dendrímero é sintetizado geração a geração partindo do centro (coração do dendrímero) para a periferia. Em cada geração o número de locais de reacção equivalentes aumenta (duplica, triplica, ...) o que requer reacções muito eficientes (com rendimentos quantitativos) para evitar reacções incompletas, as quais introduziriam defeitos na estrutura do dendrímero. Estes defeitos seriam propagados e ampliados para gerações superiores. A estratégia convergente, desenvolvida por Hawker e Frechét, (Hawker, 1990) tem início na superfície do dendrímero terminando no seu centro, onde os segmentos dendroméricos são acoplados. Nesta estratégia em cada passo reactivo o número de locais equivalentes de reacção é sempre o mesmo (2, 3, ...), muito menor do que no caso da estratégia divergente, o que permite uma síntese mais eficiente. Por outro lado a estratégia convergente permite a síntese de dendrímeros assimétricos pelo acoplamento de segmentos dendroméricos diferentes (Boas, 2003; Jayaraman, 1997).

Para a síntese dos glicodendrímeros adaptamos uma estratégia sintética originalmente descrita por Roy *et al.*



Esquema 5 – Síntese de dendrímeros. Estratégia A ↓; Estratégia B ↑.

a) i. $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})\text{OEt}$, DCM; ii. DIPEA, MeCN/ $\text{BrCH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}^{\text{t}}\text{Bu}$; **b)** $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$; Dowex 1X2-100- OH^- **c)** TFA/DCM; **d)** $\text{RC}(\text{O})\text{X}$ – derivado de um ácido carboxílico, $\text{X} = \text{OH}$, $\text{X} = \text{Cl}$, $\text{X} = \text{OC}(\text{O})\text{R}$; **e)** DCC/HBT.

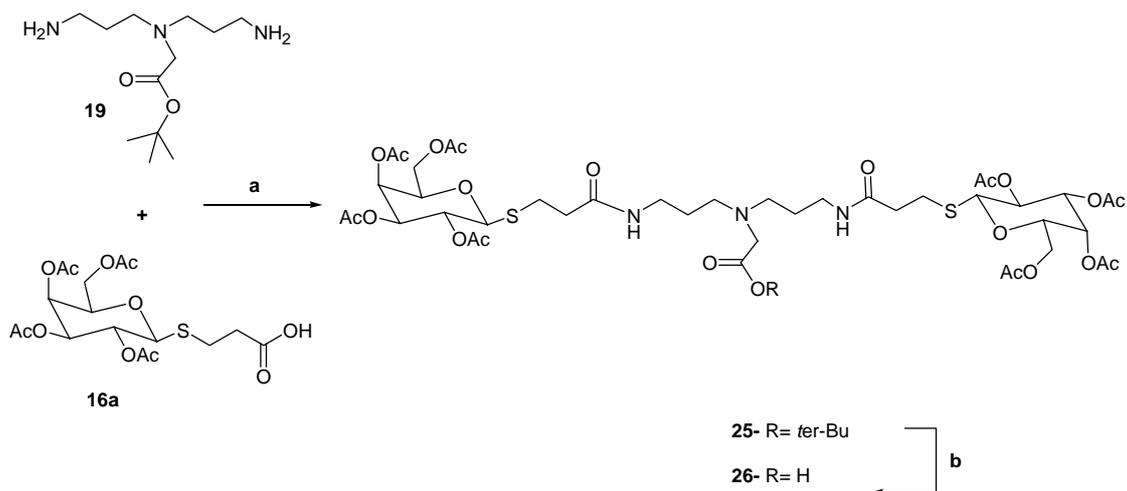
No esquema 5 estão representadas duas estratégias convergentes estudadas por nós para a síntese de glicodendrímeros.

Ambas as estratégias adoptadas envolveram a protecção selectiva dos grupos amina terminais da triamina (**17**) na forma de trifluoroacetamida. A quimiosselectividade desta reacção resulta provavelmente do maior impedimento estereoquímico da amina secundária, embora esta seja mais básica (nucleófila) que as aminas primárias. A

Alquilação da amina secundária com bromoacetato de ter-Butilo gera um dendrómero do tipo AB₂. Neste bloco o grupo ácido carboxílico está protegido na forma éster ter-butílico. Os dois grupos protectores (ter-butílico e trifluoroacetato de etilo) são ortogonais. Na literatura a desprotecção químióselectiva de trifluoroacetamidas está descrita com vários reagentes (NaOH, NH₃, NaBH₄) (Greene, 1981). No nosso caso a desprotecção químióselectiva dos grupos funcionais amina foi conseguida com uma resina de troca iónica na forma OH⁻ (Dowex1X2-OH⁻) (Lee, 1979). A principal vantagem deste método de desprotecção consiste em não se introduzir na mistura reaccional catiões metálicos e na facilidade da remoção da resina por filtração. A desprotecção químióselectiva do éster ter-butílico foi conseguida quantitativamente com ácido trifluoroacético em diclorometano. Para a construção dos dendrímeros pode-se seguir duas estratégias. O dendrómero **19** pode ser directamente derivatizado com ácidos carboxílicos ou derivados de ácidos carboxílicos (ou outros grupos funcionais) introduzindo nesta fase os grupos de vectorização (reconhecimento biológico) desejados. De seguida, é necessário desproteger o grupo protector na função ácido carboxílico sem afectar os grupos introduzidos na etapa anterior. O acoplamento deste novo bloco **21** com o dendrómero **19** gera o dendrómero tetravalente G₂ (**22**), já com os grupos terminais de “vectorização” colocados. Este processo iterativo poderia ser continuado para obter gerações superiores de dendrímeros, G₃, G₄ (estratégia **A**).

A estratégia alternativa consiste na construção do dendrómero com os grupos amina terminais protegidos, seguido de desprotecção e derivatização numa etapa com os grupos de vectorização desejados (estratégia **B**). Esta estratégia pode ser desvantajosa para gerações altas do dendrómero devido ao impedimento estérico (compressão) dos grupos funcionais terminais (Tomalia, 1995).

O facto do grupo de vectorização, ácido (tio)glicosilpropiónico peracetilado, resistir à desprotecção do grupo funcional ácido carboxílico e às condições de acoplamento (DCC, HBT) e purificação, tornou possível a construção do dendrómero pela estratégia **A** (esquema 5 e 6).

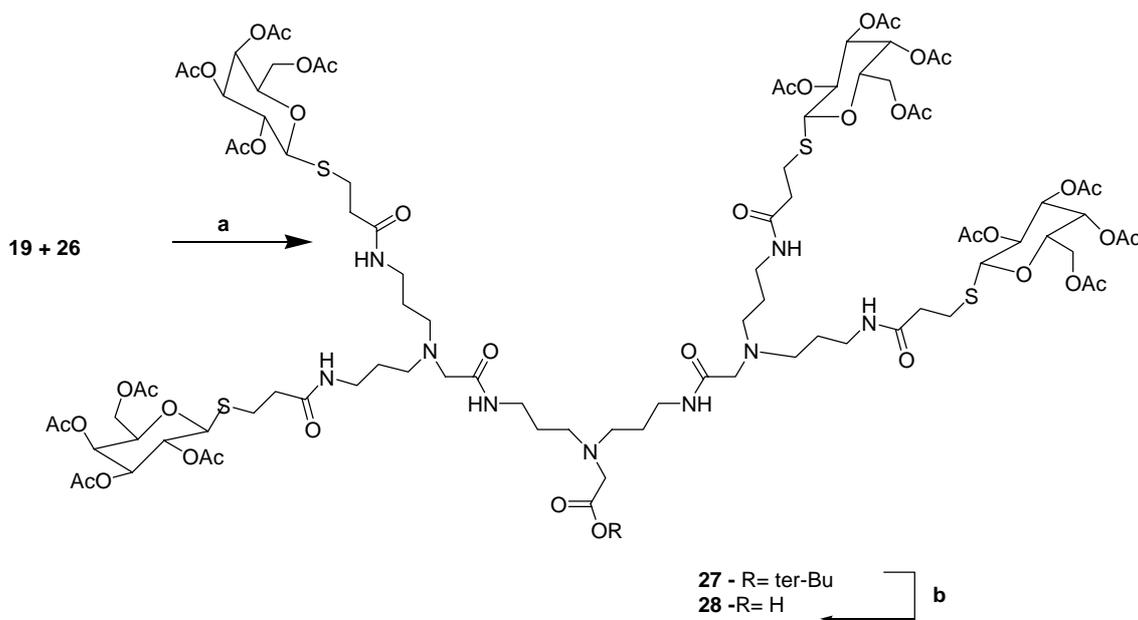


Esquema 6 - Síntese do glicodendrômero de primeira geração (G1).

a) DCC / HBT, DCM; b) TFA / DCM (1:3)

Com o dendrómero (**19**) e com o ácido (tio)galactosilpropiónico (**16a**) disponíveis, levou-se a cabo a síntese da geração 1 (G1) do glicodendrômero (Esquema 5). As condições de acoplamento DCC e HBT revelaram-se convenientes permitindo obter o bloco (**25**) em rendimento elevado. A desprotecção da função ácido carboxílico decorreu quantitativamente sem desprotecção dos grupos protectores do açúcar.

Com o bloco bisamina (**19**) e com o glicodendrômero divalente desprotegido na função ácido carboxílico (**26**) disponíveis obtivemos a geração 2-G2 (**27**) do glicodendrômero (Esquema 7).

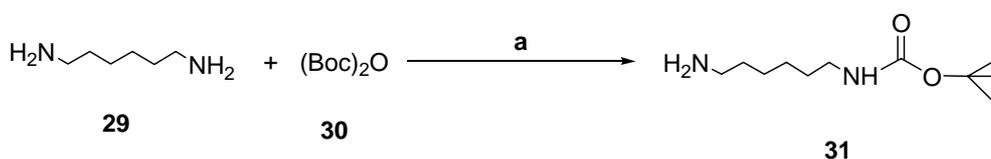


Esquema 7 - Síntese do glicodendrômero tetra-valente.

a) i. DIPEA/DCM ii. HBT, DCC; b) TFA /DCM(1:3)

A pré-titulação com DIEPA do sal de TFA do bloco (**26**) resultante da reacção de desprotecção, revelou-se necessária para o sucesso da reacção de acoplamento com DCC/HBT.

Para obter os blocos amina **10**, **11** e **12**, requeridos para reacção com o DTPA-bisanidrido, foi necessário acoplar aos blocos **16**, **26** e **28** uma diamina. O uso de uma diamina (desprotegida) levaria à formação de uma mistura de produtos (monoderivado, bisderivado e amina reagente) dificultando a purificação do derivado. Por outro lado, uma diamina monoprotégida gera um único produto. Com as condições de desprotecção do éster ter-butilico já testadas, decidimos usar uma diamina monoprotégida (**31**) na forma Boc-carbamato (esquema 8).

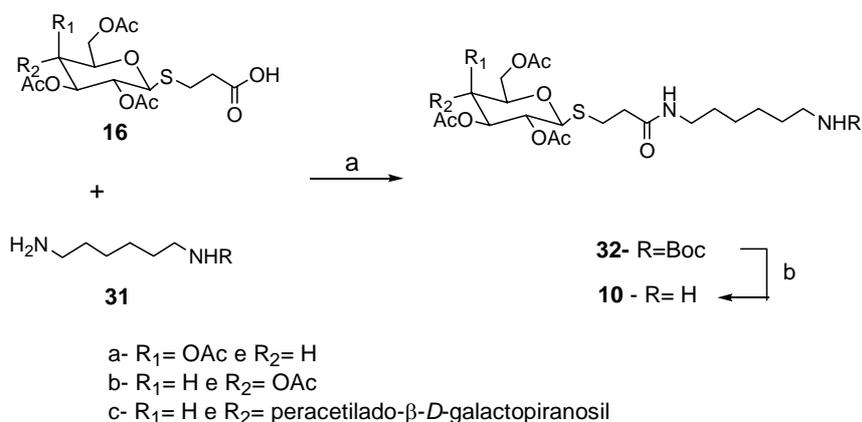


Esquema 8 – Síntese de 1,6-hexanodiamina-monoBoc.

a) DCC/HBT, DCM.

O monoderivado 1,6-hexanodiamina-monoBoc (**31**) foi obtido usando um grande excesso de 1,6-hexanodiamina (**29**), (10:1) relativamente ao reagente $(\text{Boc})_2\text{O}$ (**30**).

Os blocos açúcar monovalentes (**10**) foram sintetizados directamente a partir dos ácidos (tio)glicosilpropiónicos (**16**) e 1,6-hexanodiamina monoprotégida na forma Boc-carbamato (**31**) (Esquema 9).



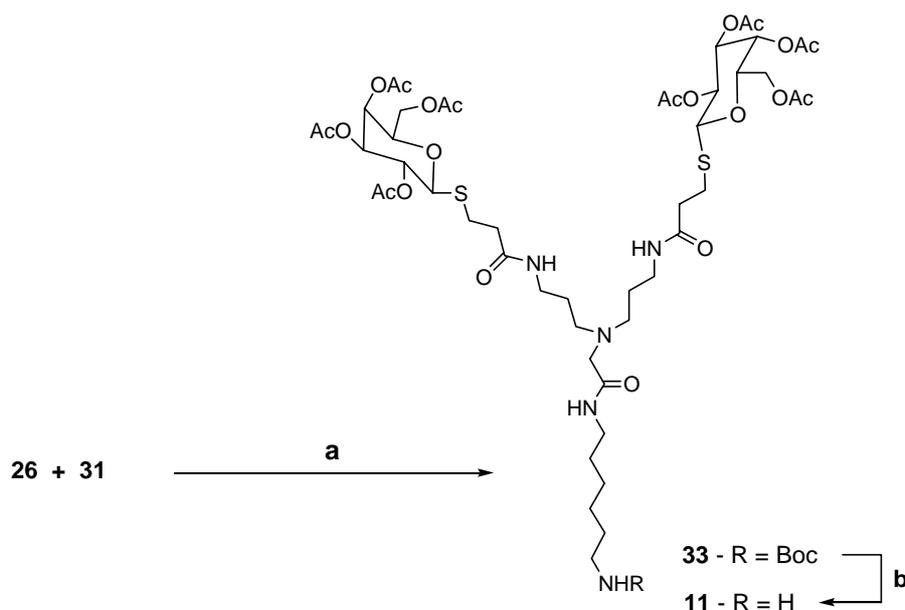
Esquema 9 - Síntese do glicodendrímtero monovalente (bloco I).

a) DCC/HBT, DCM, b) TFA/DCM (1/3).

As condições de acoplamento DCC/HBT forneceram a amida protegida (**32**) com bom rendimento. A desprotecção do grupo protector Boc terminal, em TFA/DCM, ocorreu sem desprotecção do fragmento de açúcar. O sal de TFA resultante (**10**) foi usado sem purificação posterior na reacção de acoplamento com o DTPA bisanidrido.

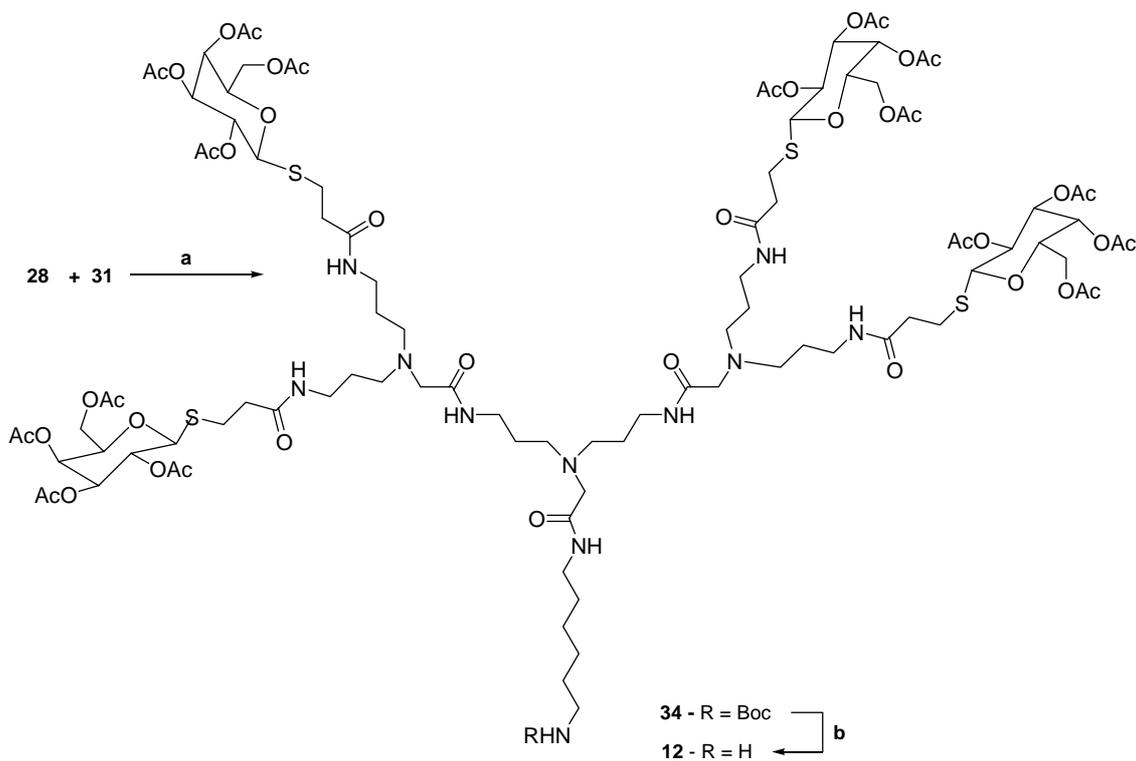
Para além de introduzir a função amina necessária para o subsequente acoplamento com o fragmento DTPA-bisanidrido, o fragmento 1,6-hexanodiamina (**29**) funciona também como espaçador entre o complexo metálico e o fragmento de reconhecimento biológico. O espaçador garante que não há impedimento estereoquímico no processo de interacção ligando-receptor. O tamanho do espaçador pode ter uma importância crítica quando o local de ligação no receptor biológico é profundo, como acontece com a maioria das enzimas. Por outro lado o local de reconhecimento de açúcares na maioria das lectinas (DRH) é superficial, não requerendo um espaçador muito longo (Varki, 1999). Um espaçador demasiado longo pode ter um efeito contraproducente no reconhecimento biológico (efeito entrópico) (Mammen, 1998). Adicionalmente um espaçador flexível pode resultar numa relaxividade menor do que a esperada com base apenas no peso molecular do conjugado (André, aceite para publicação).

De modo similar ao descrito no esquema 6 o acoplamento da 1,6 hexanodiamina-monoBoc (**31**) com os blocos **26** e **28** requer pré-titulação destes com DIEPA (esquema 10 e 11).



Esquema 10 - Síntese do glicodendrímero divalente.

a) i. DIPEA /DCM ii. DCC/HBT, DCM; b) TFA/DCM (1/3)

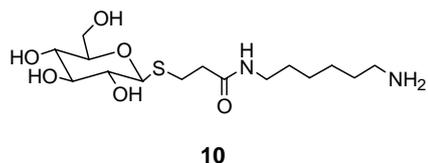
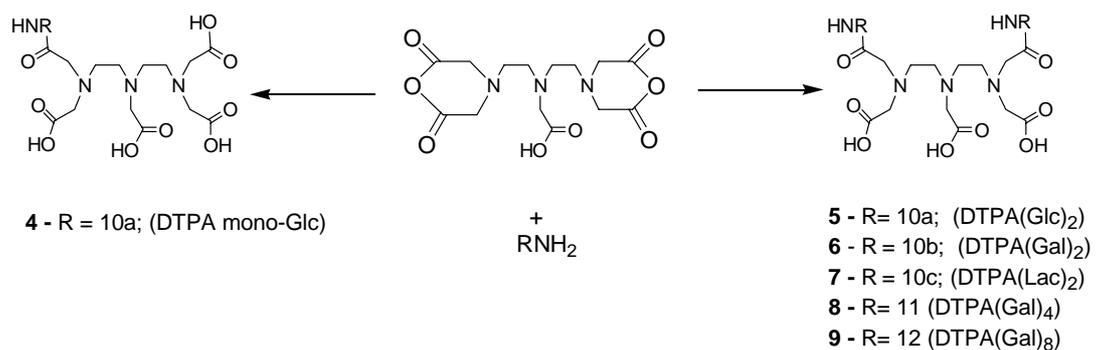


Esquema 11 - Síntese do glicodendrímtero tetravalente.

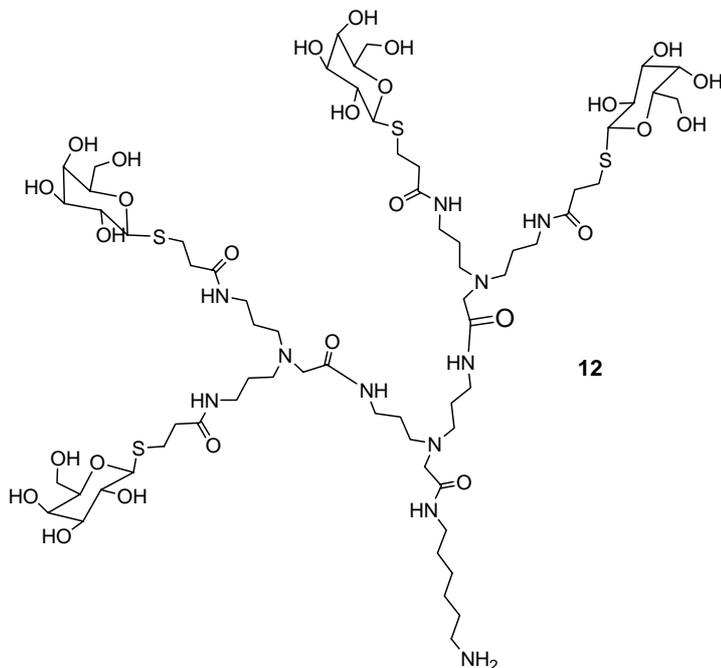
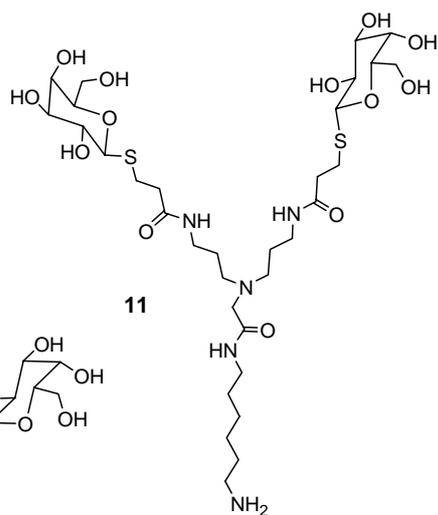
a) i. DIPEA /DCM ii. DCC/HBT, DCM; **b)** TFA/DCM (1/3)

A desprotecção do grupo amina terminal nos glicodendrímteros **32**, **33** e **34** decorreu quantitativamente, originando os blocos amino funcionalizados **10**, **11** e **12** prontos para acoplamento com o fragmento DTPA-bisanidrido.

Ajustando as condições de reacção com o bloco DTPA-bisanidrido foi possível sintetizar quer derivados bisamida quer derivados monoamida (esquema 12).



- a- R₁= OH e R₂= H
 b- R₁= H e R₂= OH
 c- R₁= H e R₂= peracetilado-β-D-galactopiranosil



Esquema 12 – Síntese de DTPA's mono e bisamida

a) i. DIPEA/DCM **ii.** DMF / Py; **b) i.** KOMe / EtOH **ii.** Amberlist 15, eluição com NH₃ **iii.** Purificação por RPC₈ sílica, eluição com H₂O/KOH (100% H₂O -> 100% EtOH).

Para garantir a formação dos derivados bisamida (**6**, **7**, **8** e **9**) foi necessário utilizar um excesso de bloco amina (2.1-2.2 eq) relativamente ao reagente DTPA bisanidrido.

As bisamidas intermédias protegidas nos açúcares não foram isoladas. Estes materiais foram directamente submetidos a desprotecção com hidróxido de potássio em

etanol. Ajustando o pH da solução de desprotecção com uma resina de troca iónica na forma H^+ (Ambelist 15) resulta na ligação do material desprotegido à resina. A subsequente lavagem com água e eluição com uma solução aquosa de amoníaco leva à recuperação do material desprotegido. Este material revelou-se de pureza suficiente (>95%) para as experiências futuras. A síntese do glicoconjugado octavalente (9) foi tentada sem sucesso. Embora o espectro de 1H RMN sugira a existência do material desejado, não conseguimos confirmar este resultado por espectrometria de massa.

Para a síntese de DTPA-monoamidas (4) utilizou-se um excesso de DTPA-bisanidrido (2.0 eq.) em relação ao componente amina. Das tentativas de acoplamento resultou uma mistura complexa de difícil purificação por cromatografia de troca iónica. A análise por espectrometria de massa revelou a existência na mistura de ambos os produtos mono (4) e bisamida (5). As misturas resultantes da cromatografia de troca iónica foram submetidas a cromatografia de fase reversa (RPC₈ sílica) não permitindo obter fracções puras dos materiais mono e bisamida.

3. Estudos de RMN dos Ln(III)-glicoconjugados

Obtiveram-se os espectros de RMN de protão dos complexos 1:1 dos ligandos DTPA(Gal)₂, DTPA(Lac)₂ e DTPA(Gal)₄ com La(III), Sm(III) e Eu(III) em D₂O, pH 7, a várias temperaturas (7, 25, 40, 60 e 80 °C).

Os espectros de RMN de protão dos glicoconjugados diamagnéticos de La(III) (Figura 22A) revelam-se idênticos aos dos glicoconjugados livres para o mesmo valor de pH, excepto para os protões do esqueleto de DTPA, os quais, em resultado de maior proximidade ao centro de coordenação, originam sinais mais complexos (2,92, 2,78, 2,68 e 2,45 ppm para os protões do esqueleto NCH₂CH₂N e uma série de multipletos do tipo AB parcialmente sobrepostos na região 3,2-3,5 ppm para os protões CH₂ dos grupos pendentos acetato e amida) muito semelhantes aos sinais do complexo [La(DTPA)]²⁻ e de outros complexos La(DTPA)-bisamidas referidos na literatura (Choppin, 1979; Peters, 2001).

Os complexos de Sm(III) e de Eu(III) apresentam sinais que praticamente não são influenciados (quer em termos de desvio químico quer de alargamento) pela presença dos centros paramagnéticos, nomeadamente os sinais dos protões dos resíduos de açúcar e os dos braços ligantes mais afastados do DTPA, devido à dependência da

contribuição dipolar de r^{-3} e de r^{-6} , respectivamente para o desvio químico e para a relaxação induzidos pelos íons paramagnéticos Ln(III). No entanto, os prótons da cadeia lateral mais próxima do fragmento de DTPA-amida (ex. CH₂(f) e CH₂(g) na Figura 22) sofrem um forte desvio químico bem como alargamento, em particular os sinais dos grupos metilénicos do fragmento de DTPA, também de forma análoga ao que se encontra descrito na literatura para os complexos paramagnéticos de DTPA e de outros ligandos do tipo DTPA-bisamida (Peters, 2001; Kimpe, 2003).

Por comparação com os espectros de RMN de próton de outros complexos derivados do DTPA (Aime, 1990; Jenkins, 1988) podemos concluir que os sinais mais desviados para baixa frequência (região de +0,1 ppm a -1,4 ppm) do Sm(III)-DTPA(Gal)₂ e os sinais mais desviados para alta frequências (região de +35 ppm a +15 ppm) do Eu(III)-DTPA(Gal)₂, correspondem a dois prótons CH₂ do esqueleto de etilenodiamina do DTPA. Estes prótons exibem os maiores desvios dipolares induzidos, devido ao valor elevado e positivo do seu factor geométrico axial $G = (3 \cos^2\theta - 1)/r^3$ (Jenkins, 1988), em que θ é o ângulo definido pelo vector Ln(III)-próton e o eixo principal de simetria da susceptibilidade magnética do complexo (Peters, 2001).

Nos espectros de RMN de próton de complexos de íons Ln(III) com ligandos do tipo DTPA-bisamida com centros não quirais nas cadeias laterais o número de sinais é elevado; os três átomos de N coordenados são quirais e são possíveis quatro pares diastereoisoméricos de enantiómeros, originando um máximo de oito sinais RMN para cada grupo de prótons magneticamente equivalentes (Figura 23) (Peters, 2001; Geraldès, 1993)

Existem dois processos de isomerização para os complexos Ln(DTPA) em solução: i) a racemização dos átomos de N terminais, a qual envolve descoordenação-inversão-coordenação dos átomos de azoto e dos grupos acetato adjacentes e que é um processo com uma barreira de energia elevada mas que no caso das ligações Ln(III)-carbonilo, relativamente mais fracas que as ligações Ln(III)-carboxilato, constitui um processo importante de racemização; ii) a racemização do azoto central, via interconversão entre as duas conformações possíveis das pontes etilénicas (figura 24) a qual é um processo de baixa energia, e que torna magneticamente idênticas as duas metades do complexo relativamente ao grupo glicinato central do DTPA (reduzindo para metade o número de sinais de CH₂ observados) (Peters, 2001; Geraldès, 1993). No caso dos compostos estudados neste trabalho é este o processo dinâmico que se verifica,

o qual é em regime de troca rápida a 60 °C para os complexos de samário e de troca lenta a 7 °C para os complexos de európio, devido aos maiores desvios dipolares induzidos pelo íon Eu(III). Os complexos de Sm(III) a temperatura elevada mostram um mínimo de sete sinais, resultantes de dois prótons etilénicos, desviados para baixa frequência (figura 22B) e que indicam que a maioria (senão todos) dos quatro isómeros possíveis estão presentes em solução, com diferentes populações relativas. Esta conclusão é confirmada pela constatação de que os mesmos dois prótons etilénicos originam um mínimo de dez (de um total de dezasseis) sinais desviados para alta frequência no caso dos complexos de európio a temperatura elevada (Figura 22C).

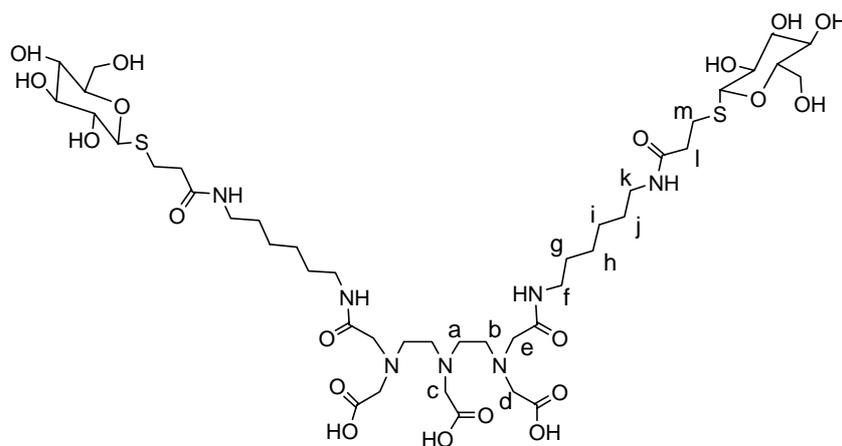


Figure 22 – Estrutura do composto DTPA(Gal)₂
(Os prótons para análise espectral encontram-se assinalados)

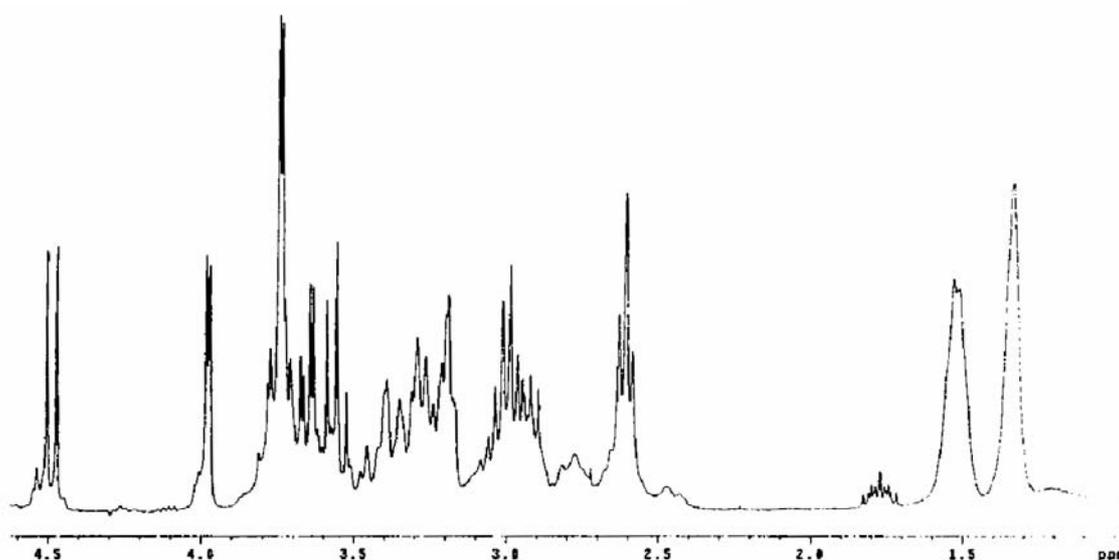


Figura 22 A – Espectro de ¹H RMN do glicoconjugado La(III)-DTPA(Gal)₂, em D₂O, T=25 °C, pH 7.0.

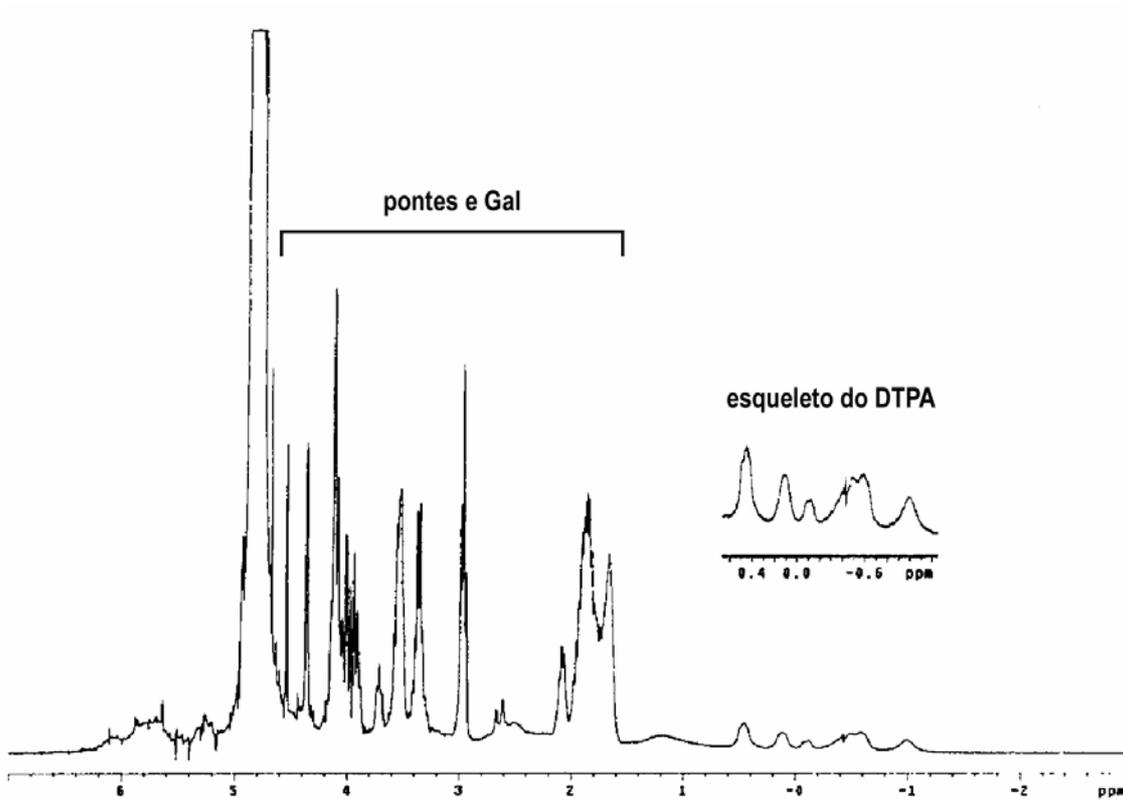


Figura 22 B – Espectro de ^1H RMN do glicoconjugado $\text{Sm(III)-DTPA(Gal)}_2$ em D_2O , $T=60\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7.0$.

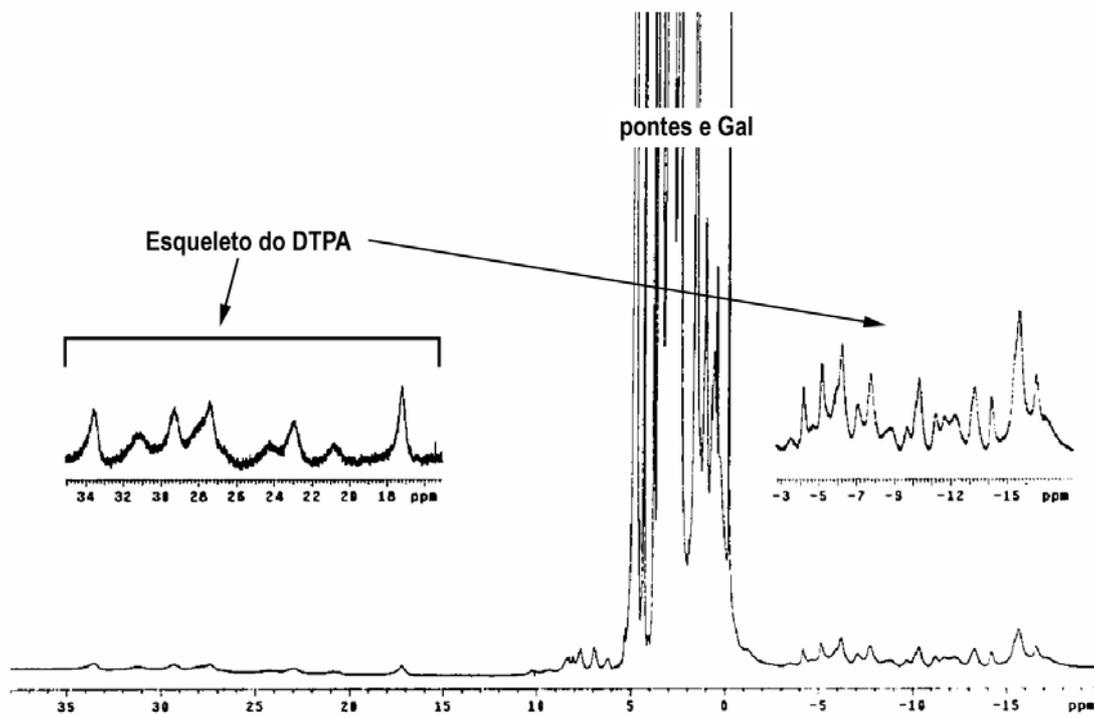


Figura 22 C – Espectro de ^1H RMN do glicoconjugado $\text{Eu(III)-DTPA(Gal)}_2$ em D_2O , $T=7\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7.0$.

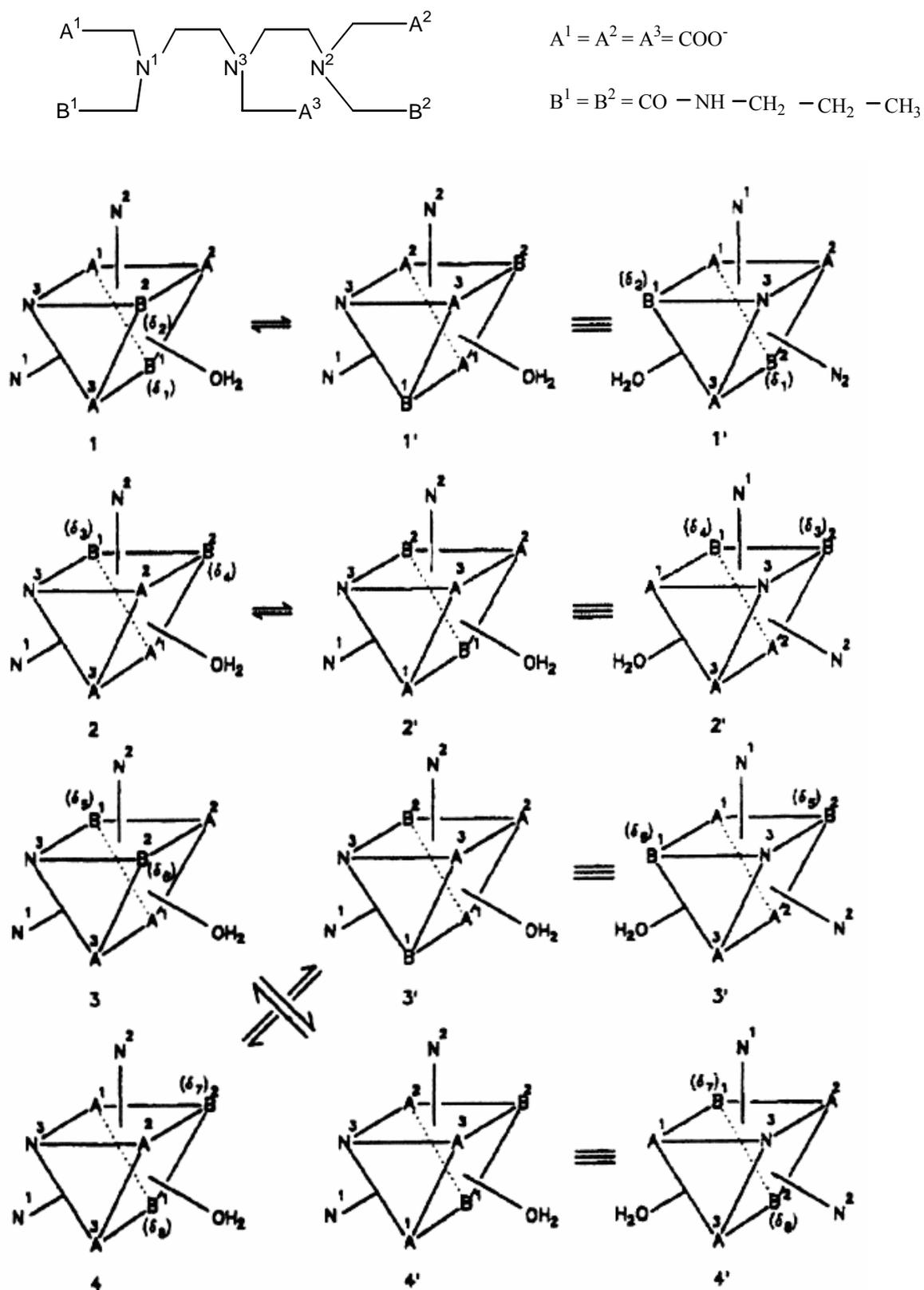


Figura 23 - Poliedros de coordenação dos oito enantiómeros dos complexos $\text{Ln}(\text{DTPA-bisamida})$, considerando que a geometria é trigonal prismática distorcida “tricapped”. Os processos de interconversão estão indicados (Geraldes, 1993).

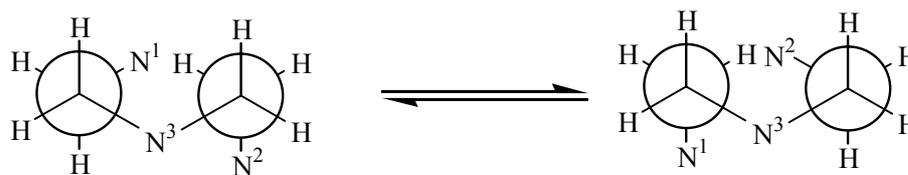


Figura 24 – Interconversão conformacional do esqueleto da dietilenotriamina nos complexos Ln(DTPA-bisamida) (Geraldes, 1993).

4. Estudos de relaxividade protónica (NMRD) de Gd(III)-DTPA(Lac)₂

A relaxividade protónica longitudinal do complexo Gd(III)-DTPA(Lac)₂ foi medida em solução aquosa a 25 e a 60 °C, no intervalo de frequências de Larmor de 0,2 a 20 MHz. Os perfis de DRMN (Figura 26), foram obtidos pelo ajuste dos pontos experimentais à teoria de Solomon-Bloembergen-Morgan, a qual relaciona as velocidades de relaxação com os parâmetros microscópicos dos complexos de Gd(III) (ver equações no apêndice). Na análise dos perfis de DRMN fixaram-se os valores da velocidade de troca de água e da sua entalpia de activação, de acordo com valores anteriormente determinados para complexos do tipo DTPA-bisamida ($k_{ex}^{298} = 0.40 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta H^\ddagger = 40.0 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Tóth, 2001). Os coeficientes de difusão e a sua energia de activação foram também fixados de acordo com os valores comumente aceites ($D_{GdH}^{298} = 24 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ e $E_{DGdH} = 20 \text{ kJ mol}^{-1}$), uma vez que, para complexos de baixo peso molecular, estes dois parâmetros são relativamente independentes da natureza dos complexos (Tóth, 2001; Powell, 1996). Assim, na análise das relaxividades protónicas, fez-se o ajuste do tempo de correlação rotacional, τ_R , da sua energia de activação, E_R , e dos parâmetros que descrevem a relaxação do spin electrónico, i.e, a flutuação quadrática média do tensor ZFS, Δ^2 , e o tempo de correlação para a modulação de ZFS, τ_V . Os parâmetros obtidos para o complexo em estudo encontram-se na Tabela 5 e são comparados com valores obtidos para as mesmas grandezas físicas para complexos de Gd(III) relacionados.

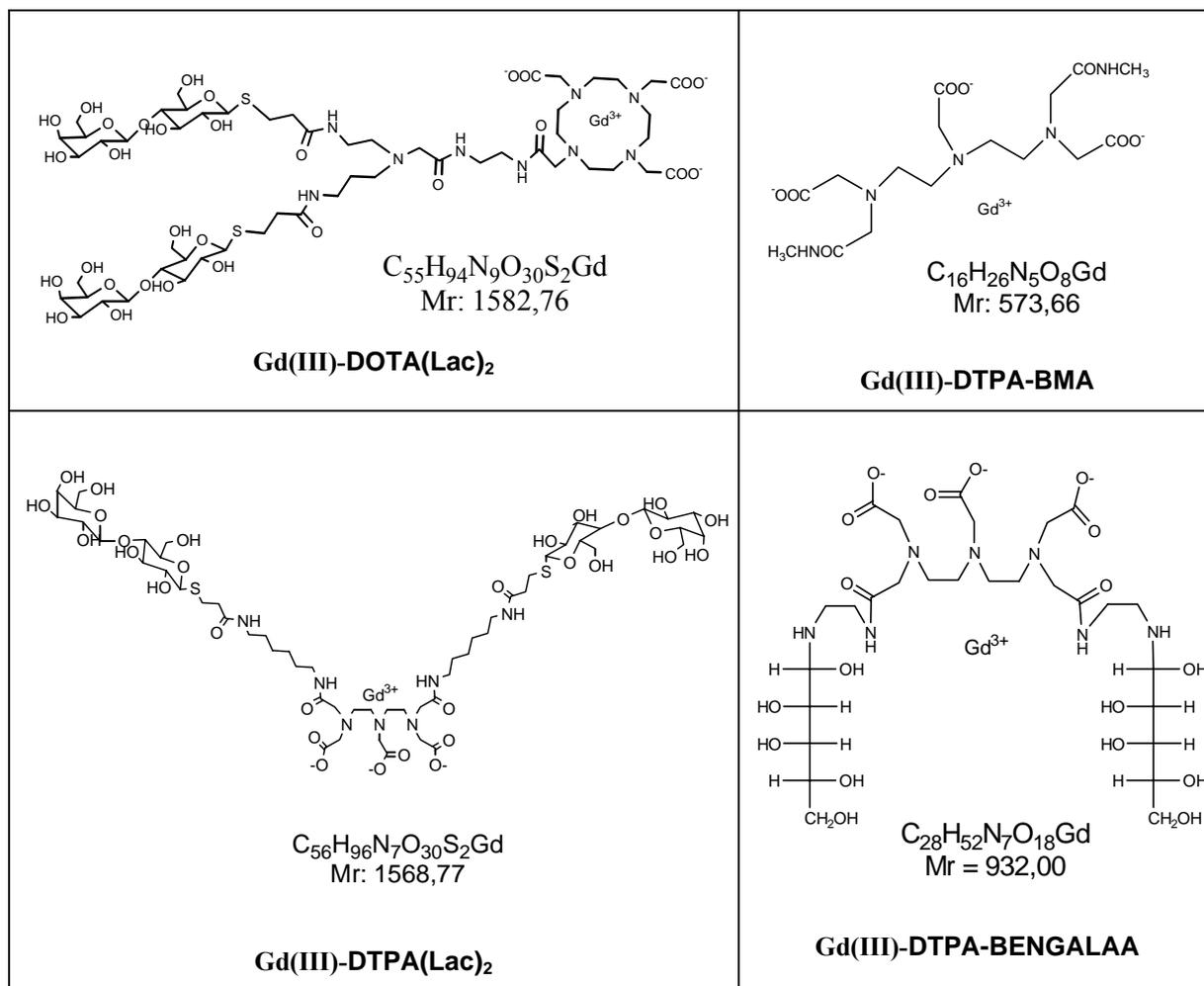


Figura 25 – Estrutura dos compostos Gd(III)-DTPA(Lac)₂, Gd(III)-DOTA(Lac)₂, Gd(III)-DTPA-BENGALAA e Gd(III)-DTPA-BMA.

Tabela 5 - Parâmetros obtidos da análise de DRMN do Gd(III)-DTPA(Lac)₂ em comparação com outros complexos de Gd(III).

	DTPA ^b	DTPA-BMA ^b (bisamida)	DTPA-BENGALAA ^c (bisamida)	DTPA(Lac) ₂ (bisamida)	DOTA(Lac) ₂ ^d (monoamida)
$K_{ex}^{298} / 10^6 s^{-1}$	3,3	0,45	0,22	0,40 ^a	1,2 ^a
$\Delta H / KJ mol^{-1}$	51,6	47,6	42,5	40,0 ^a	30,0 ^a
τ_R^{298} / ps	58	66	265	332	306
$E_{RH} / KJ mol^{-1}$	17,3	21,9	19,7	36,3	29,9
τ_v^{298} / ps	25	25	16	10	33
$E_v / KJ mol^{-1}$	1,6	3,9	5,5	1 ^a	1 ^a
$\Delta^2 / 10^{20} s^{-2}$	0,46	0,41	0,53	0,63	0,12

^a parâmetros fixos; ^b Powell, 1996; ^c Lammers, 1997; ^d André, 2004.

A relaxividade de Gd(III)-DTPA(Lac)₂ (peso molecular = 1569) a 25 °C e a 20 MHz é de 5,72 mM⁻¹s⁻¹, o que corresponde a um aumento de 13% relativamente à relaxividade de Gd(III)-DTPA-BMA, o qual é um complexo de baixo peso molecular (p.m. = 574) do tipo DTPA-bisamida e actualmente utilizado clinicamente como agente de contraste. Esta diferença de relaxividade é consistente com um aumento, por um factor de cinco, no tempo de correlação rotacional relativamente ao complexo de menor peso molecular, uma vez que τ_R é o factor dominante nos perfis de DRMN a campos altos.

A variação dos perfis de DRMN com a temperatura é indicadora da forma como a relaxividade protónica de complexos de baixo peso molecular é limitada por rotação rápida: as relaxividades aumentam com a diminuição da temperatura por abrandamento das rotações moleculares em solução.

Os parâmetros obtidos para a relaxação de spin electrónico do complexo de Gd(III) encontram-se dentro dos valores usualmente obtidos para complexos similares.

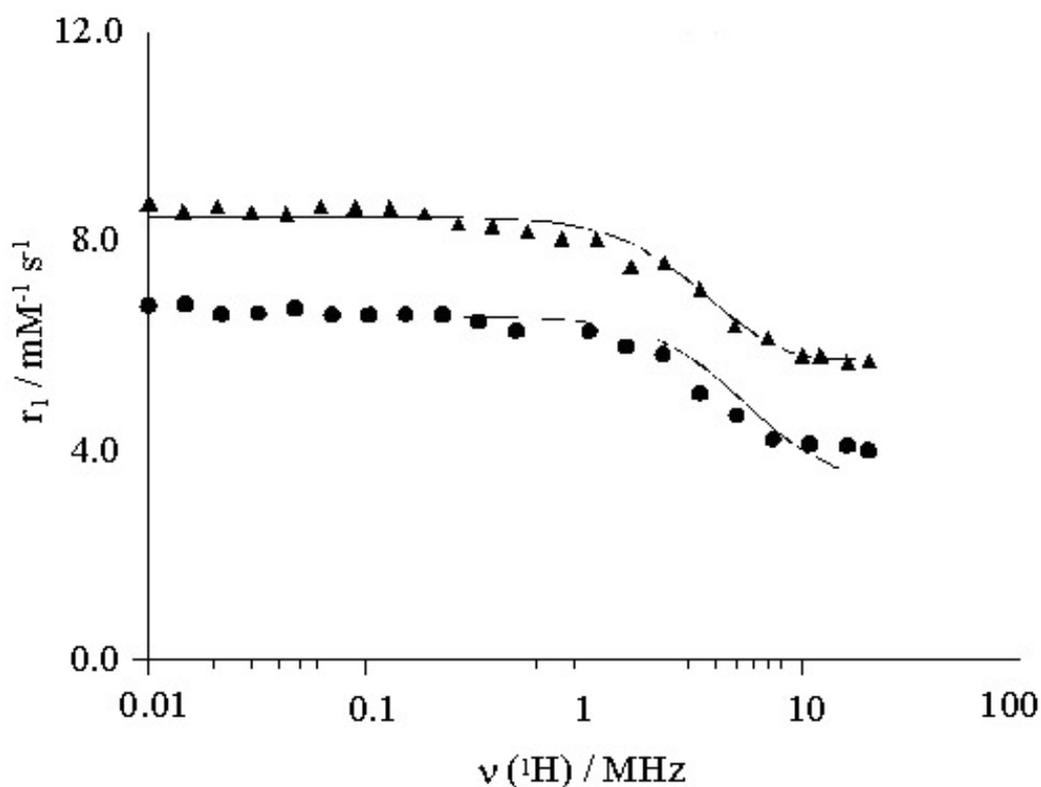


Figura 26 - Perfis de DRMN em função da temperatura para Gd(III)-DTPA(Lac)₂. T = 25 °C (triângulos); e 60 °C (círculos). As linhas representam o ajuste pelo método dos mínimos quadrados dos pontos experimentais às equações descritas no texto (os valores experimentais encontram-se na tabela 6 em apêndice).

Capítulo III

Parte experimental

1. Procedimentos gerais e equipamento

Os produtos químicos foram adquiridos à Sigma Chemical Company e utilizados sem qualquer purificação adicional. Foram usados solventes de maior grau de pureza disponível (p.a.), os quais foram purificados pelos métodos usuais. As reacções foram monitorizadas por TLC Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) em suporte de alumínio. Os processos de revelação utilizados foram a observação sob luz UV (254 nm), a adsorção de vapor de iodo e por aquecimento com 10% de ácido sulfúrico em água/etanol (90:10). A cromatografia de flash foi feita em Kieselgel 60 (Merck, 230-400). As fracções relevantes resultantes da cromatografia de flash foram concentradas a pressão reduzida, T < 40 °C. Os espectros de massa FAB (modo positivo) foram obtidos num espectómetro de massa VG Autospec com 3-nitrobenzol (NBA) como matriz. Para os compostos com massa molecular superior a 2000, os espectros de massa foram obtidos pela técnica de ionização electrospray. Os espectros de RMN de ¹H (1D e 2D) e de ¹³C foram obtidos num espectómetro Varian Unity Plus 300 RMN, operando a 299.938 MHz e 75.428 MHz para ¹H e ¹³C respectivamente. Os desvios químicos (δ) são dados em ppm relativamente ao solvente CDCl₃ (¹H, δ 7.27; ¹³C δ 77.36) como referência interna. Para espectros de ¹H e de ¹³C em D₂O os desvios químicos (δ) são dados em ppm, em relação a TSP como referência interna (¹H, δ 0.0) e *ter*-butanol como referência externa (¹³C, δ 30.29). O pD das soluções de D₂O foi ajustado com DCl ou com NaOD livre de CO₂ e convertido em valores de pH usando a correcção isotópica pH = pD - 0.4. Os valores de pD foram medidos com um medidor de pH HANNA com um eléctrodo combinado HI1310 (HANNA instruments, Itália).

Os perfis de dispersão da relaxação magnética nuclear 1/T₁ (DRMN) dos prótons da água a 25 e 60 °C foram obtidos num relaxómetro cíclico de RMN (Spinmaster FFC, stelar) abrangendo campos magnéticos desde 5 x 10⁻⁴ a 0.47 T (correspondendo a uma frequência protónica de Larmor de 0.022-20 MHz).

2. Síntese

Síntese de monossacarídeos peracetilados:

1,2,3,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosose (galactose peracetilada) (14a):

Adicionou-se galactose (**13a**) (5g, 0.028 mmol), acetato de sódio anidro (4 g, 69.6 mmol) e anidrido acético (27 g, 0.26 mmol). A mistura reaccional foi colocada em agitação e aquecida em banho de óleo até se obter uma solução, colocada posteriormente em refluxo durante 2 horas. A mistura reaccional foi arrefecida por adição de gelo (250 cm³) e colocada em agitação durante uma hora. O precipitado obtido por filtração foi lavado com água fria, seco sob pressão reduzida e recristalizado em etanol originando um sólido branco (6.2 g, η = 56%). ¹H, δ (300 MHz, CDCl₃) 2.00, 2.05, 2.13, 2.17 (5x3H, s, 5OAc), 4.06 (1H, ddd, *J* = 11.0, 7.2 e 0.9 Hz, H-5), 4.16 (2H, m, H-6a e H-6b), 5.08 (1H, dd, *J* = 10.5 e 3.3 Hz, H-3), 5.34 (1H, dd, *J* = 10.5 e 8.4 Hz, H-2), 5.43 (1H, dd, *J* = 3.3 e 0.9 Hz, H-4), 5.70 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-1).

1,2,3,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosose (glucose peracetilada) (14b):

Adicionou-se glucose (**13b**) (5 g, 0.028 mmol), acetato de sódio anidro (4 g, 69.6 mmol) e anidrido acético (27 g, 0.26 mmol). A mistura reaccional foi colocada em agitação e aquecida em banho de óleo até se obter uma solução, colocada posteriormente em refluxo durante 2 horas. A mistura reaccional foi arrefecida por adição de gelo (250 cm³) e colocada em agitação durante uma hora. O precipitado obtido por filtração foi lavado com água fria, seco sob pressão reduzida e recristalizado em etanol originando um sólido branco (6.2 g, η = 56%). ¹H, δ (300 MHz, CDCl₃) 2.02, 2.04, 2.10, 2.13 (5x3H, s, 5OAc), 3.85 (1H, ddd, *J* = 9.9, 4.5 e 2.1 Hz, H-5), 4.11 (1H, dd, *J* = 12.6 e 2.1 Hz, H-6a), 4.30 (1H, dd, *J* = 12.6 e 4.5 Hz, H-6b), 5.14 (1H, tap, *J* = 9.9 Hz, H-4), 5.15 (1H, tap, *J* = 8.4 Hz, H-2), 5.26 (1H, tap, *J* = 9.3 Hz, H-3), 5.72 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-1).

1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil)-β-D-

glucopiranosose (lactose peracetilada) (14c): Adicionou-se *D*-lactose (**13c**) (7.2 g, 20.0 mmol), acetato de sódio anidro (4,6 g, 80.0 mmol) e anidrido acético (32.0 g, 180.0 mmol). A mistura reaccional foi colocada em agitação e aquecida em banho de óleo até se obter uma solução, colocada posteriormente em refluxo durante 2 horas. A mistura

reaccional foi arrefecida por adição de gelo (300 cm³) e colocada em agitação durante uma hora. O precipitado obtido por filtração foi lavado com água fria, seco sob pressão reduzida e recristalizado em etanol originando um sólido branco (7.7 g, η = 57%). ¹H, δ (300 MHz, CDCl₃) 1.92, 1.99, 2.00, 2.01, 2.03, 2.06, 2.08, 2.11, (3x8H, s, 8Ac), 3.75 (1H, m, H-5), 3.80 (1H, m, H-4), 3.85 (1H, m, H-5'), 4.10 (3H, m, H-6'a, H-6'b, H-6'c), 4.43 (1H, m, H-6b), 4.45 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-1'), 4.93 (1H, dd, J = 10.3 e 3.4 Hz, H-3'), 5.02 (1H, dd, J = 9.4 e 8.4 Hz, H-2), 5.07 (1H, dd, J = 10.3 e 7.9 Hz, H-2'), 5.22 (1H, tap, J = 9.4 Hz, H-3), 5.33 (1H, dd, J = 3.4 e 0.9 Hz, H-4'), 5.65 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-1); ¹³C (75.6 MHz, CDCl₃) 20.52 (Me), 20.62 (2xMe), 20.65 (3xMe), 20.77 (Me), 20.84 (Me), 60.86 (C-6'), 61.75 (C-6), 66.61 (C-4'), 69.01 (C-2'), 70.51 (C-2), 70.75 (C-5'), 70.97 (C-3'), 72.63 (C-3), 73.50 (C-5), 75.67 (C-4), 91.54 (C-1), 100.95 (C-1'), 168.71 (C=O), 169.88 (C=O), 169.41 (C=O), 169.49 (C=O), 170.00 (C=O), e 170.18 (C=O).

Síntese dos ácidos (tio)glicosilpropiónicos peracetilados:

Ácido (tio)galactosilpropiónico (16a): A uma solução de 1,2,3,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopirranose (**14a**) (9.2882 g, 23.8 mmol) e ácido 3-mercaptopropiónico (**15**) (2.48 cm³, 28.6 mmol) adicionou-se eterato de trifluoreto de boro (10.1248 g, 71.3 mmol) gota-a-gota durante 15 minutos em DCM seco (50 cm³) à temperatura ambiente sob uma atmosfera de azoto. Após uma hora, a mistura reaccional foi diluída com DCM (50 cm³) e lavada com HCl (1M, 3x200 cm³). Posteriormente a fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada a pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia de flash seca (éter de petróleo-acetato de etilo, 48:2→50:0) originando o composto final sob a forma de uma espuma branca (10.10 g, η = 82%). ¹H, δ (300 MHz, CDCl₃) 1.98, 2.05, 2.06, 2.15 (4x3H, s, 4Ac), 2.76 (2H, t, J = 7.2 Hz, SCH₂CH₂), 2.81-2.93 (2H, m, SCH₂), 3.92 (1H, t, J = 6.6 Hz, H-6a), 4.05-4.21 (2H, m, H-5 e H-6b), 4.54 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-1), 5.04 (1H, dd, J = 9.9 e 3.3 Hz, H-3), 5.22 (1H, t, J = 9.9 Hz, H-2), 5.43 (1H, dd, J = 3.3 e 0.9 Hz, H-4).

Ácido (tio)glucosilpropiónico (16b): A uma solução de 1,2,3,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopirranose (**14b**) (11.06 g, 28.3 mmol) e ácido 3-mercaptopropiónico (**15**) (7.40 cm³, 85.0 mmol) adicionou-se eterato de trifluoreto de boro (6.02 g, 42.5 mmol) gota-a-gota

durante 15 minutos em DCM seco (30 cm³) à temperatura ambiente sob uma atmosfera de azoto. Após uma hora, a mistura reaccional foi diluída com DCM (200 cm³) e lavada com HCl (1M, 3x200 cm³). Posteriormente a fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada a pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia de flash seca (DCM-MeOH, 20:1→5:1) originando o composto final sob a forma de uma espuma branca (10.10 g, η = 82%). ¹H, δ (300 MHz, CDCl₃) 2.01, 2.03, 2.05, 2.09 (4x3H, s, 4 OAc) 2.74 (2H, m, SCH₂CH₂), 2.93 (2H, m, SCH₂), 3.71 (1H, ddd, J = 9.6, 7.8 e 2.8 Hz, H-5), 4.14 (1H, dd, J = 12.2 e 2.4 Hz, H-6a), 4.24 (1H, dd, J = 12.2 e 4.9 Hz, H-6b), 4.55 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-1), 4.98 e 5.12 (2H, m, H-2 e H-3), 5.23 (1H, tap, J = 9.6 Hz, H-4); ¹³C, δ (75.6 MHz, CDCl₃) 20.44 (2xMe), 20.56 (2xMe), 35.13 (SCH₂), 24.98 (SCH₂CH₂), 62.07 (C-6), 68.23, 69.54, 73.60, 75.72, 83.84 (C-1), 169.34 (C=O), 170.70 (C=O), 1711.42 (C=O), 176.48 (COOH); m/z (IQ) 454 (M+NH₄⁺, 19%), 382(8), 350 (5), 331 (4), 232 (7), 213 (12), 77 (100); HRMS (IQ) Calc. para C₁₇H₂₈NO₁₁S (M+NH₄⁺) 454.1382. encontrada 454.1383.

Ácido (tio)lactosilpropiónico (16c): A uma solução de 1,2,3,6-tetra-O-acetil-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil)- β -D-glucopiranosose (**14c**) (20.36 g, 30.0 mmol) e ácido 3-mercaptopropiónico (**15**) (6.37 g, 60.0 mmol) adicionou-se eterato de trifluoreto de boro (6.38 g, 45.0 mmol) gota-a-gota durante 10 minutos em DCM seco (50 cm³) à temperatura ambiente sob uma atmosfera de azoto. Após uma hora, a mistura reaccional foi diluída com DCM (500 cm³) e lavada com HCl (1M, 3x100 cm³). Posteriormente a fase orgânica foi seca com MgSO₄, concentrada a pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia de flash seca (DCM-MeOH, 20:1→5:1) originando o composto final sob a forma de uma espuma branca (16.2 g, η = 74%). ¹H, δ (300 MHz, CDCl₃) 1.97, 2.04, 2.05, 2.07, 2.12, 2.15 (21H, 6s, 7Ac), 2.70 (2H, m, CH₂COOH), 2.83 (1H, m, SCH_aH_b), 2.93 (1H, m, SCH_aH_b), 3.61 (1H, m, H-5), 3.75 (1H, tap, J = 9.4 Hz, H-4), 3.86 (1H, tap, J = 7.0 Hz, H-5'), 4.08 (3H, m, H-6a, H-6b, H-6'b), 4.43 (1H, m, H-6b), 4.46 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-1'), 4.49 (1H, d, J = 10.3 Hz, H-1), 4.90 (1H, tap, J = 10.3 Hz, H-2), 4.94 (1H, dd, J = 10.3 e 3.4 Hz, H-3'), 5.08 (1H, dd, J = 110.3 e 7.9 Hz, H-2'), 5.19 (1H, tap, J = 9.4 Hz, H-3), 5.32 (1H, dd, J = 3.4 e 1.0 Hz, H-4') ¹³C, δ (75.6 MHz, CDCl₃) 20.52 (Me), 20.66 (Mex3), 20.72 (e), 20.80 (Mex2), 25.33 (SCH₂), 35.25 (CH₂COOH), 60.84 (C-6'), 62.20 (C-6), 66.64 (C-4'),

69.12 (C-2'), 70.12 (C-2), 70.71 (C-3'), 73.65 (C-3), 76.20 (C-4), 76.74 (C-5), 83.89 (C-1), 1168.98 (C=O), 169.57 (C=O), 169.95 (C=O), 170.04 (C=O), 170.26 (C=O), 1170.34 (C=O), 170.46 (C=O) 176.23 (COOH);); m/z (FAB⁺, NBA) 763.4 (M+K⁺, 7%), 747.4 (M + Na⁺, 17), 619.3(6), 559.3(6), 331(100); HRMS (FAB⁺, NBA) Calc. para C₂₉H₄₀O₁₉NaS (M+Na⁺) 747.178374 encontrado 747.17822.

Síntese da bistrifluoracetamida (18)

A uma solução em gelo de 3,3-iminobis(propilamina) (17) (0.94 g, 7.1 mmol) em diclorometano (20 cm³) foi adicionada gota a gota, durante uma hora, uma solução de etiltrifluoracetato (2.24 g, 15.6 mmol) em diclorometano (20 cm³). Após ter atingido a temperatura a mistura reaccional foi colocada em agitação durante 16 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida obtendo-se um óleo incolor. A análise por TLC (CH₂Cl₂/MeOH; 4:1) revelou uma mancha maior e uma mancha menor (sinal positivo com ninidrina). Este material foi utilizado na reacção seguinte sem ser purificado. O óleo foi redissolvido em MeCN (50 cm³), tendo-lhe sido adicionada DIPEA (0.92 g, 7.1 mmol). De seguida adicionou-se gota-a-gota bromoacetato de terbutilo (1.38 g, 7.1 mmol) durante 5 minutos e a mistura reaccional foi colocada em agitação durante 6 horas, à temperatura ambiente, com formação de um precipitado branco. A mistura reaccional foi filtrada para se remover o precipitado branco e o solvente foi removido a pressão reduzida originando um óleo vermelho brilhante. Este material foi purificado por cromatografia de flash seca (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/NH₄OH; 100% CH₂Cl₂ -> 10% MeOH) originando como composto final um óleo incolor (2.50 g; η = 81%, nos dois passos). ¹H, δ (300 MHz, CDCl₃) 1.40 (9H, s, ^{ter}Bu), 1.67 (4H, qt, J = 6.3 Hz, NCH₂CH₂), 2.50 (4H, t, J = 6.3 Hz, NCH₂), 3.12 (2H, s, NCH₂C(O)), 5.39 (4H, qap, J = 6.3 Hz, NCH₂CH₂), 8.40 (2H, t(l), NHC(O)CF₃); ¹³C, δ (75.6MHz, CDCl₃) 25.43 (NCH₂CH₂), 27.75 (CH₃), 38.07 (NCH₂CH₂CH₂), 51.83 (NCH₂), 55.76 (CH₂C(O)); 81.98 (OC(CH₃)₃), 115.89 (q, J = 287 Hz, CF₃), 157.34 (q, J = 37.0 Hz, NHC(O)CF₃), 171.18 (C(O) ^{ter}Bu).

Síntese da bisamina (19)

A uma solução do composto 18 (3.10 g; 7.1 mmol) em MeOH/H₂O (50/20 cm³) adicionou-se resina Dowex-X2-100-OH⁻ (30 cm³; resina seca). A mistura reaccional foi agitada durante 72 horas à temperatura ambiente. A resina foi filtrada, lavada com água

e metanol e o filtrado foi concentrado a pressão reduzida originando um óleo amarelo. Este material foi purificado por cromatografia de flash seca ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$; 100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 40:60:10:10$) obtendo-se como composto final um óleo espesso e incolor (1.21 g; $\eta = 69\%$). ^1H , δ (300 MHz, CDCl_3) 1.36 (9H, s, $^{\text{ter}}\text{Bu}$), 1.51 (4H, qt, $J = 6.9$ Hz, NCH_2CH_2), 2.50 (4H, t, $J = 6.9$ Hz, NCH_2), 2.65 (4H, t, $J = 6.9$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.09 (2H, s, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$); ^{13}C , δ (5.6MHz, CDCl_3) 27.93 (CH_3), 30.64 (NCH_2CH_2), 40.15 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 51.77 (NCH_2), 55.85 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$); 80.60 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 170.71 ($\text{C}(\text{O})$).

Síntese do tioglicosídeo divalente peracetilado (25)

A uma solução de bisamina **19** (0.95 g, 3.87 mmol) em diclorometano (100 cm^3), colocada num banho de gelo, foi sequencialmente adicionado ácido (tio)galactosilpropiónico peracetilado (**16a**) (3.55 g, 8.13 mmol), HBT (1.23 g, 9.76 mmol) e DCC (1.67 g, 9.76 mmol) em solução de diclorometano (10 cm^3), gota-a-gota. Após 15 minutos, a mistura reaccional foi removida do banho de gelo e deixada a agitar até atingir a temperatura ambiente. A mistura reaccional foi colocada em agitação, à temperatura ambiente, durante a noite. O precipitado DCU foi removido por filtração e lavado com diclorometano. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida dando origem a um xarope. Este material foi redissolvido em acetato de etilo (200 cm^3) e sequencialmente lavado com NaHCO_3 (sol. Sat.; $3 \times 100 \text{ cm}^3$) e solução saturada de cloreto de sódio (100 cm^3). A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida originando uma espuma branca. A purificação por cromatografia de flash seca ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 50\% \text{ MeOH}$) permitiu obter o composto final como uma espuma branca (4.02 g, $\eta = 96\%$). ^1H , δ (300 MHz, CDCl_3) 1.47 (9H, s, $^{\text{ter}}\text{Bu}$), 1.64 (4H, m, NCH_2CH_2), 1.99, 2.06, 2.16 (12H, OAc), 2.51 (8H, m, sinais sobrepostos de NCH_2 e SCH_2CH_2), 2.91-2.06 (4H, m, SCH_2), 3.14 (2H, s, $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$), 3.55 (4H, qap, $J = 5.4$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.95 (2H, tap, $J = 6.3$ Hz, H – 6a), 4.14 (4H, m, H-6b + H-5), 4.57 (2H, d, $J = 9.9$ Hz, H-1), 5.05 (2H, dd, $J = 9.9$ Hz, e 3.3 Hz, H-3), 5.21 (2H, tap, $J = 9.9$ Hz, H-2), 5.44 (2H, d, $J = 3.3$ Hz, H-4), 7.02 (2H, m(l), $\text{C}(\text{O})\text{NH}$); m/z (FAB⁺, NBA) 1082 (M^+ , 100); HRMS (FAB⁺, NBA) Calc. para $\text{C}_{46}\text{H}_{72}\text{N}_3\text{O}_{22}\text{S}_2$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ 1082.4049. Encontrada 1082.4038.

Síntese do tiogalactosídeo tetravalente peracetilado (27)

A solução contendo o composto tiogalactosídico divalente (25) (2.83 g, 1.25 mmol) foi colocada em agitação durante a noite, com CH₂Cl₂/TFA (3/1, 20 cm³). O solvente foi removido sob pressão reduzida, obtendo-se uma espuma amarela brilhante, a qual foi redissolvida em DCM (20 cm³) e o solvente removido sob pressão reduzida. Este procedimento repetiu-se algumas vezes e o material foi posteriormente seco sob vácuo originando uma espuma espessa e brilhante (26). A análise do espectro de RMN de ¹H, revelou o desaparecimento do sinal δ 1.47 referente ao grupo ter-butilo. Este material não sofreu mais nenhuma purificação nem caracterização. Todo o material obtido (assumiu-se um rendimento de 100% na reacção de desproteção) foi dissolvido em DCM (10 cm³) e colocado em banho de gelo. Adicionou-se a bisamina desprotegida (19) (0.220g, 1.49 mmol), HBT (0.220 g, 1.49 mmol) e gota-a-gota uma solução de DCC (0.300 g, 1,49 mmol) em DCM (10 cm³). A mistura resultante foi colocada sob agitação, em banho de gelo, durante 15 minutos. Após a mistura reaccional atingir a temperatura ambiente, permaneceu a agitar por mais 24 horas. O precipitado de DCU formado foi removido por filtração e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O óleo resultante foi redissolvido em acetato de etilo (200 cm³), lavado com NaHCO₃ (sol. sat.: 3 x 50 cm³) e solução saturada de cloreto de sódio (50 cm³). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia de flash seca (CH₂Cl₂/EtOH; 100% CH₂Cl₂ -> 20%EtOH) o que permitiu obter-se o composto final como uma espuma branca (1.12 g, η = 83%). ¹H, δ (300 MHz, CDCl₃) sinais seleccionados: 1.46 (9H, s, ^{ter}Bu), 1.64 (8H, m, NCH₂CH₂), 1.98, 2.05, 2.06, 2.16 (48H, s, OAc), 2.55 (20H, m), 2.86-3.10 (16H, m), 3.32 (14H, m), 3.98 (4H, tap, J = 6.6 Hz, H-6), 4.14 (8H, m, H-6b + H-5), 4.59 (4H, d, J = 9.9 Hz, H-1), 5.06 (4H, dd, J = 10.0 e 3.4 Hz, H-3), 5.20 (4H, tap, J = 9.9 Hz, H-2), 5.44 (4H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 7.02 (4H, m(l), C(O)NH);

Síntese da 1,6-hexanodiamina-monoBoc (31)

Adicionou-se gota a gota durante 3 horas uma solução de diterbutilodicarbonato (30) (1.32 g, 6.04 mmol) em dioxano (20 mL) a uma solução de 1,6-hexanodiamina (29) (5.62 g, 48.4 mmol) em dioxano (30 mL). A mistura reaccional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi removido sob pressão reduzida originando um óleo amarelo. A este óleo adicionou-se água (50 mL)

originando o aparecimento de um precipitado branco. O precipitado foi filtrado e a solução aquosa foi extraída com diclorometano (100 mL). A fase orgânica foi lavada com água (100 mL) seca com sulfato de magnésio e concentrada sob pressão reduzida originando um óleo amarelo (1.10 g, η = 84%), o qual cristalizou. A análise por TLC (diclorometano-etanol 5:1) com revelação por ninidrina revelou apenas uma mancha. ^1H , δ (300 MHz, CDCl_3) 1.31 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$); 1.34 (13H, m, sinais sobrepostos de $^{\text{ter}}\text{Bu}$, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ e NHCH_2CH_2), 1.49 (2H, s(l), NH_2 ; desaparece com troca com D_2O), 2.68 (2H, t, J = 6.9 Hz, NH_2CH_2), 3.09 (2H, qap, J = 6.6 Hz, $\text{CH}_2\text{NHC(O)}$), 4.58 (1H, s(l), NHC(O)).

Síntese dos tioglicosídeos monovalentes amino-derivatizados

Procedimento típico ilustrado para a obtenção de 32a: Colocou-se em gelo, uma solução de ácido propiônico peracetilado (tiogalactosil) (**16a**) (0.375 g, 0.859 mmol), 1,6- hexadiamino-monoBoc (**31**) (0.169 g, 0.789 mmol) e HBT (0.140 g, 0.940 mmol) em DCM (10 cm^3). A esta solução foi adicionada, gota-a-gota, uma solução de DCC (0.194 g, 9.40 mmol) em DCM (5 cm^3). Após 15 minutos a mistura reaccional foi removida do banho de gelo, permitindo-se que atingisse a temperatura ambiente. De seguida, colocou-se a mistura em agitação durante a noite à temperatura ambiente. O precipitado de DCU formado foi removido por filtração e lavado com diclorometano. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida originando um xarope espesso. A este material foi adicionado acetato de etilo (100 cm^3) e sequencialmente lavado com KHSO_4 (sol. aq. 1M; 3 \times 50 cm^3), NaHCO_3 (sol. aq. 1M; 3 \times 50 cm^3) e solução saturada de NaCl (50 cm^3). A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida originando uma espuma branca. Purificação por cromatografia de flash seca ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 100% CH_2Cl_2 \rightarrow 50% MeOH) permitiu obter o composto final como uma espuma branca (0.480 g, η = 97%). ^1H , δ (300 MHz, CDCl_3) 1.34 (4H, m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$), 1.43 (9H, s, $^{\text{ter}}\text{Bu}$), 1.50 (4H, m, $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_2$), 1.99, 2.05, 2.06 e 2.16 (4x3H, s, 4OAc), 2.50 (2H, m, SCH_2CH_2), 2.88-3.06 (2H, m, SCH_2), 3.09 (2H, m, $\text{CH}_2\text{NHC(O)}\text{O}^{\text{ter}}\text{Bu}$), 3.24 (2H, m, C(O)NHCH_2), 3.48 (1H, m(l)) 3.95 (1H, dt, J = 7.2, 5.7 e 0.9 Hz, H-5), 4.11 (1H, dd, J = 11.2 e 5.7 Hz, H-6a), 4.19 (1H, dd, J = 11.2 e 7.2 Hz, H-6b), 4.54 (1H, d, J = 9.9 Hz, H-1), 5.04 (1H, dd, J = 10.2 e 3.3 Hz, H-3), 5.23 (1H, tap, J = 9.9 Hz, H-2), 5.43 (1H, dd, J = 3.3 e 0.9 Hz, H-4), 5.98 (1H, t(l), NH);

m/z (ESI) 673 ($M + K^+$, 3%), 657 ($M + Na^+$, 31%), 635 ($M + H^+$, 100%) 579 (42%) 535 (44%); *HRMS* (ESI) Calc. para $C_{28}H_{47}N_2O_{12}S$ 635.2849. Encontrada 635.2856.

31b: Partindo do ácido propiônico peracetilado (tioglucosil) (**16b**) (1.854 g, 4.25 mmol) e de 1,6-hexadiamina-monoBoc (**31**) (0.920 g, 4.25 mmol), obteve-se o composto **32b** sob a forma de uma espuma branca (2.54 g, $\eta = 94\%$). 1H , δ (300 MHz, $CDCl_3$) 1.32 (4H, m, $NHCH_2CH_2(CH_2)_2$), 1.43 (9H, s, ^{ter}Bu), 1.50 (4H, m, $NHCH_2(CH_2)_2$), 2.00, 2.03, 2.04 e 2.09 (12H, s, 4xOAc), 2.49 (2H, m, SCH_2CH_2), 2.82-3.16 (4H, m, sinais sobrepostos de SCH_2 e $CH_2NHC(O)O^{ter}Bu$), 3.23 (2H, m, $C(O)NHCH_2$), 3.72 (1H, ddd, $J = 9.9, 4.8$ e 2.7 Hz, H-5), 4.11-4.28 (2H, sinais sobrepostos de H-6a e H-6b) 4.55 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-1), 5.02 (1H, tap, $J = 10.2$ Hz, H-2), 5.06 (1H, tap, $J = 9.6$ Hz, H-3), 5.22 (1H, tap, $J = 9.3$ Hz, H-4), 6.09 (1H, t(l), NH); m/z (ESI) 657 ($M + Na^+$, 22%), 635 ($M + H^+$, 100%) 579 (39%) 535 (40%); *HRMS* (ESI) Calc. para $C_{28}H_{47}N_2O_{12}S$ ($M+H$) $^+$ 635.2849. Encontrada 635.2850.

31c: Partindo do ácido propiônico peracetilado (tiolactosil) (**16c**) (1.70 g, 2.35 mmol) e de 1,6-hexadiamina-monoBoc (**31**) (0.507 g, 2.35 mmol), obteve-se o composto **32c** sob a forma de uma espuma branca (2.54 g, $\eta = 94\%$). 1H , δ (300 MHz, $CDCl_3$) 1.33 (4H, m, $NHCH_2CH_2(CH_2)_2$), 1.42 (9H, s, ^{ter}Bu), 1.70 (4H, m, $NHCH_2(CH_2)_2$), 1.97, 2.04, 2.05, 2.07, 2.13 e 2.16 (7x3H, s, 7OAc), 2.46 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, SCH_2CH_2), 2.81 (1H, m, SCH_aH_b), 3.03 (1H, m, SCH_aH_b), 3.08 (2H, $CH_2NHC(O)O^{ter}Bu$), 3.21 (2H, m, $NHCH_2$), 3.45 (1H, m), 3.59 (1H, m, H-5), 3.78 (1H, tap, $J = 9.6$ Hz, H-4), 3.89 (1H, tap, $J = 7.0$ Hz, H-5'), 4.03-4.16 (3H, m), 4.28 (1H, m), 4.52 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 4.65 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-1), 4.90 (1H, tap, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.96 (1H, dd, $J = 10.2$ e 3.3 Hz, H-3'), 5.09 (1H, dd, $J = 10.5$ e 7.8 Hz, H-2'), 5.19 (1H, tap, $J = 9.3$ Hz, H-3), 5.34 (1H, d, $J = 22.4$ Hz, H-4'), 6.30 (2H, t(l), $NHC(O)$); m/z (FAB^+ , NBA) 923 ($M+H$) $^+$, 3); *HRMS* (FAB^+ , NBA) Calc. para $C_{40}H_{63}N_2O_{20}S$ ($M+H$) $^+$ 923.3695. Encontrada 923.3683.

Síntese do tioglicosídeo divalente amino-derivatizado (**33**)

Colocou-se uma solução de tiogalactosídeo divalente (**25**) (0.968 g, 0.895 mmol) em agitação durante a noite com CH_2Cl_2/TFA (3/1, 10 cm^3). O solvente foi removido sob pressão reduzida originando uma espuma amarela brilhante, que foi posteriormente

redissolvida em DCM (10 cm³) e o solvente removido sob pressão reduzida. Repetiu-se este procedimento algumas vezes e o material obtido foi seco sob vácuo originando o ácido carboxílico desprotegido (**26**) sob a forma de uma espuma amarela. A análise do espectro ¹H RMN revelou o desaparecimento do sinal com desvio químico 1.4 ppm referente ao grupo ter-butilo. Não foi feita mais nenhuma purificação nem caracterização deste material. Todo o material obtido (assumiu-se que o rendimento da reacção de desprotecção foi de 100%) foi dissolvido em DCM (10 cm³) a frio (banho de gelo) e titulado (papel de pH) até atingir o pH 9-10 com DIPEA. A esta solução foi adicionada uma solução 1,6-hexadiamino monoBoc (**31**) (0.230 g, 1.07 mmol) em DCM (5 cm³) e HBT (0.140 g, 0.940 mmol). Adicionou-se de seguida, gota-a-gota, uma solução de DCC (0.230 g, 1.10 mmol) em DCM (5 cm³). Após 15 minutos a mistura reaccional foi removida do banho de gelo permitindo-se que atingisse a temperatura ambiente. A mistura foi colocada sob agitação durante a noite à temperatura ambiente. O precipitado DCU foi removido por filtração e lavado com DCM. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida originando um xarope espesso. A este material adicionou-se acetato de etilo (150 cm³), sendo sequencialmente lavado com NaHCO₃ (sol. sat.; 3 x 100 cm³) e solução saturada de NaCl (100 cm³). A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida formando-se uma espuma amarela brilhante. A purificação por cromatografia de flash seca (CH₂Cl₂/MeOH; 100% CH₂Cl₂ -> 50%MeOH) permitiu obter o composto final sob a forma de uma espuma branca (1.01 g, η = 92%). ¹H, δ (300 MHz, CDCl₃) 1.32 (4H, m, C(O)NHCH₂CH₂(CH₂)₂), 1.43 (9H, s, ^{ter}Bu), 1.51 (4H, m, C(O)NHCH₂(CH₂)₂), 1.72 (4H, m, NCH₂CH₂) 1.99, 2.05, 2.06 e 2.16 (24H, s, 8xOAc), 2.52 (8H, m, sinais sobrepostos de SCH₂CH₂ e NCH₂), 2.88-3.14 (8H, m, sinais sobrepostos de SCH₂, NCH₂C(O) (singlete a 3.02) e CH₂NHC(O)O^{ter}Bu), 3.29 (6H, m, NCH₂CH₂CH₂) e NCH₂C(O)NHCH₂), 3.40-3.56 (1H, m), 3.96 (2H, dt, J = 6.4 e 0.9 Hz, H-5), 4.09 (2H, dd, J = 11.4 e 6.3 Hz, H-6a), 4.20 (2H, dd, J = 11.2 e 6.4 Hz, H-6b), 4.56 (2H, d, J = 10.2, H-1), 4.74 (1H, t(l), NH), 5.05 (2H, dd, J = 10.0 e 3.3 Hz, H-3), 5.25 (2H, tap, J = 9.9 Hz, H-2), 5.44 (2H, dd, J = 3.3 e 0.9 Hz, H-4), 6.74 (2H, t(l), NH), 7.10 (2H, t(l)); m/z (FAB⁺, NBA) 1223 (M-H)⁺, 100); HRMS (FAB⁺, NBA) Calc. para C₅₃H₈₆N₅O₂₃S₂ (M+H)⁺ 1224.5155. Encontrada 1224.5119.

Síntese do tioglicosido tetravalente amino-derivatizado (34)

Colocou-se uma solução de (tio)galactosídeo tetravalente (**27**) (1.599 g, 0.707mmol) em agitação durante a noite com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (3/1, 10 cm^3). O solvente foi removido sob pressão reduzida originando uma espuma amarela brilhante, que foi posteriormente redissolvida em DCM (10 cm^3) e o solvente removido sob pressão reduzida. Repetiu-se este procedimento algumas vezes e o material obtido foi seco sob vácuo originando o ácido carboxílico desprotegido (**28**) sob a forma de uma espuma amarela. A análise do espectro ^1H RMN revelou o desaparecimento do sinal com desvio químico 1.4 ppm referente ao grupo ter-butilo. Não foi feita mais nenhuma purificação nem caracterização deste material. Todo o material obtido (assumiu-se que o rendimento da reacção de desprotecção foi de 100%) foi dissolvido em DCM (10 cm^3) a frio (banho de gelo) e titulado (papel de pH) até atingir o pH 9-10 com DIPEA. A esta solução foi adicionada uma solução 1,6-hexadiamino monoBoc (**31**) (0.184 g, 0.849 mmol) em DCM (5 cm^3) e HBT (0.134 g, 0.990 mmol). Adicionou-se de seguida, gota-a-gota, uma solução de DCC (0.204 g, 0.990 mmol) em DCM (5 cm^3). Após 15 minutos a mistura reaccional foi removida do banho de gelo permitindo-se que atingisse a temperatura ambiente. A mistura foi colocada sob agitação durante a noite à temperatura ambiente. O precipitado DCU foi removido por filtração e lavado com DCM. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida originando um xarope espesso. A este material adicionou-se acetato de etilo (200 cm^3), sendo sequencialmente lavado com NaHCO_3 (sol. sat.; 3 x 100 cm^3) e solução saturada de NaCl (100 cm^3). A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida formando-se uma espuma amarela brilhante. A purificação por cromatografia de flash seca ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow$ 50%MeOH) permitiu obter o composto final sob a forma de uma espuma branca (1.300 g, $\eta = 76,5 \%$). ^1H , δ (300 MHz, CDCl_3) 1.32 (4H, m, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$), 1.43 (9H, s, ^{ter}Bu), 1.67 (16H, m, NCH_2CH_2 e $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_2$), 1.99, 2.05, 2.06 e 2.16 (4x12H, s, *OAc*), 1.72 (4H, m, NCH_2CH_2) 2.51 (20H, m, sinais sobrepostos de SCH_2CH_2 (4x2H) e NCH_2 (6x2H)), 2.84-3.14 (16H, m, sinais sobrepostos de SCH_2 (4x2H) $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$ (3x2H) (singleto a 3.02) e $\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{O}^{ter}\text{Bu}$ (2H)), 3.14-3.20 (14H, m, $\text{C}(\text{O})\text{NCH}_2$) e $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 3.98 (4H, tap, $J = 6.9$ Hz, H-5), 4.09 (4H, dd, $J = 11.2$ e 6.3 Hz, H-6a), 4.20 (4H, dd, $J = 11.2$ e 6.9 Hz, H-6b), 4.58 (4H, d, $J = 10.2$, H-1), 5.06 (4H, dd, $J = 9.9$ e 3.3 Hz, H-3), 5.17 (4H, tap, $J = 9.9$ Hz, H-2), 5.44 (4H, d, $J = 3.3$, H-4), 6.86 (4H, t(l), $\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 7.50 (4H, t(l),

C(O)NH); HRMS (ESI) Calc .para $C_{103}H_{165}N_{11}O_{45}S_4 (M+2H)^{2+}$ 1201.9916. Encontrada 1201.9961.

Síntese de DTPA's mono e bisamida

DTPA(Gal)₂ (6): Uma solução de tiogalactosido monovalente amino protegido (**32a**) (0.618 g, 0.973 mmol) foi colocada em agitação durante a noite com CH₂Cl₂/TFA (3/1, 10 cm³). O solvente foi removido sob pressão reduzida para dar uma espuma amarela brilhante, que foi posteriormente redissolvida em DCM (10 cm³) e o solvente removido sob pressão reduzida. Este procedimento foi repetido algumas vezes e o material foi seco sob vácuo originando uma espuma amarela brilhante e espessa (**10a**). A análise do espectro ¹H RMN revelou o desaparecimento do sinal com desvio químico 1.47 ppm referente ao grupo ter-butilo. Não foi feita mais nenhuma purificação nem caracterização deste material. Todo o material obtido (assumiu-se que o rendimento da reacção de desprotecção foi de 100%) foi dissolvido em DCM (10 cm³) a frio (banho de gelo) e titulado (papel de pH) até atingir o pH 9-10 com DIPEA. Esta solução foi adicionada a uma solução contendo DTPA-bisanidrido (0.158 g, 0.442 mmol) em DMF (40 cm³) e piridina (1 cm³). A mistura reaccional foi colocada sob agitação, à temperatura ambiente, durante a noite. Concentrou-se a mistura sob pressão reduzida obtendo-se um óleo incolor. Este material não sofreu mais nenhuma purificação nem caracterização. O resíduo foi redissolvido numa mistura de etanol (10 cm³) e KOH (sol. aq. 1M, 10 cm³) e colocado em agitação à temperatura ambiente durante a noite. O pH da mistura reaccional foi ajustado para 1 com Amberlist 15. A resina foi transferida para uma coluna, minuciosamente lavada com água e eluída com sol. aq. NH₃ 0.5 M. As fracções relevantes foram recolhidas e concentradas a pressão reduzida (T <40 °C) originando o glicoconjugado totalmente desprotegido sob a forma de um sólido branco (0.342 g, η = 71%, dos dois passos). Quando necessárias mais purificações foram feitas em cromatografia de coluna com sílica C₈ em fase reversa eluída com um gradiente (100% H₂O -> 100% EtOH). ¹H, δ(300 MHz, D₂O, pH 7.0): 4.48 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-1), 3.54 (2H, tap, H-2), 3.64 (2H, tap, H-3), 3.70 (2H, dd, J = 9.4 e 3.3 Hz, H-4), 3.96 (2H, tap, J = 3.3 Hz, H-5), 3.73 (4H, m, H-6a e H-6b), 1.32 (8H, m, C(O)NHCH₂CH₂(CH₂)₂), 1.51 (8H, m, C(O)NHCH₂(CH₂)₂), 3.20 (8H, m, C(O)NHCH₂), 2.60 (4H, m, SCH₂CH₂), 2.95-3.01 (4H, m, SCH₂), 3.24 (4H, s, DTPA amida NCH₂C(O)), 3.76 (2H, s, DTPA acetato central NCH₂CO₂⁻), 3.40 (4H, s, DTPA acetato terminal NCH₂CO₂⁻), 3.34, 3.08 (8H, dois

m, DTPA esqueleto NCH_2); ^{13}C , δ (75.6 MHz, D_2O): 86.18 (C-1), 69.67 (C-2), 74.05 (C-3), 79.07 (C-4), 68.94 (C-5), 61.30 (C-6), 25.90, 25.83 ($\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$), 28.29, 28.42 ($\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_2$), 39.23, 39.54 ($\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 26.49 (SCH_2), 36.57 (SCH_2CH_2), 58.86 (DTPA amida $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$), 54.58 (DTPA acetato central $\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$), 58.95 (DTPA acetato terminal $\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$), 50.59, 52.79 (DTPA esqueleto NCH_2), 170.77, 173.02, 174.28, 178.40 (DTPA acetato $\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$ e amida $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$, outro $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$); m/z (FAB^+ , NBA) 1091 ($\text{M}+\text{H}^+$, 23); HRMS (FAB^+ , NBA) Calc. para $\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{N}_7\text{O}_{20}\text{S}_2$ ($\text{M}+\text{H}^+$)⁺ 1090.4899. Encontrada 1090.4859.

DTPA(Lac)₂ (7): Tiolactosido monovalente totalmente protegido (**32c**) (0.997 g, 1.08 mmol) foi desprotegido seguindo-se o mesmo procedimento descrito para o composto (**6**). Reacção com DTPA-bisanidrido (0.183 g, 0.512 mmol), seguida de desprotecção e purificação originou o glicoconjugado **7** sob a forma de um sólido branco (0.345 g, $\eta = 48\%$, nos dois passos). ^1H , δ (300 MHz, D_2O , pH 7.0): 4.46 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1), 3.54 (2H, dd, $J = 10.2$ e 7.8 Hz, H-2), 3.63 (2H, tap, H-3), 3.66 (2H, dd, H-4), 3.99 (2H, d, $J = 3.3$ Hz, H-5), 3.70 (4H, m, H-6a e H-6b), 4.58 (2H, d, $J = 10.2$ Hz, H-1'), 3.36 (2H, tap, H-2'), 3.64 (2H, tap, H-3'), 3.68 (2H, dd, H-4'), 3.94 (2H, tap, H-5'), 3.72 (4H, m, H-6a' e H-6b') (unidade de Gal: -H-1-H-6b; unidade de Glc: -H-1'-H-6b'), 1.32 (8H, m, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$), 1.52 (8H, m, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_2$), 3.20 (8H, m, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 2.61 (4H, m, SCH_2CH_2), 2.98-3.01 (4H, m, SCH_2), 3.23 (4H, s, DTPA amida $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$), 3.76 (2H, s, DTPA acetato central $\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$), 3.38 (4H, s, DTPA acetato terminal $\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$), 3.37, 3.08 (8H, dois m, DTPA esqueleto NCH_2); ^{13}C , δ (75.6 MHz, D_2O): 103.08 (C-1), 71.15 (C-2), 78.42 (C-3), 72.71 (C-4), 60.49 (C-5), 75.55 (C-6), 85.59 (C-1'), 72.11 (C-2'), 78.82 (C-3'), 75.92 (C-4'), 68.76 (C-5'), 61.22 (C-6') (unidade de Gal: C-1-C-6; unidade de Glc: C-1'-C-6'), 25.86, 25.94 ($\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$), 28.33, 28.47 ($\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_2$), 39.26, 39.58 ($\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 26.45 (SCH_2), 36.61 (SCH_2CH_2), 58.86 (DTPA amida $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$), 54.33 (DTPA acetato central $\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$), 59.03, 59.11 (DTPA acetato terminal $\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$), 50.53, 52.88 (DTPA esqueleto NCH_2), 170.60, 173.41, 174.24, 178.82 (DTPA acetato $\text{NCH}_2\text{CO}_2^-$ e amida $\text{NCH}_2\text{C}(\text{O})$, outro $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$); m/z (ESI) 1415 ($\text{M}+\text{H}^+$, 14%); HRMS (ESI) Calc. para $\text{C}_{56}\text{H}_{100}\text{N}_7\text{O}_{30}\text{S}_2$ ($\text{M}+\text{H}^+$)⁺ 1414.5956, Encontrada 1414.5971.

Tentativa de síntese de DTPA-monoGlc (4): Uma solução de tioglucosídeo monovalente amino protegido (**32b**) (2.41 g, 3.80 mmol) foi colocada em agitação durante a noite com CH₂Cl₂/TFA (3/1, 10 cm³). O solvente foi removido sob pressão reduzida para dar uma espuma amarela brilhante, que foi posteriormente redissolvida em DCM (10 cm³) e o solvente removido sob pressão reduzida. Este procedimento foi repetido algumas vezes e o material foi seco sob vácuo originando uma espuma amarela brilhante e espessa (**10b**). A análise do espectro ¹H RMN revelou o desaparecimento do sinal com desvio químico 1.47 ppm referente ao grupo ter-butilo. Não foi feita mais nenhuma purificação nem caracterização deste material. Todo o material obtido (assumiu-se que o rendimento da reação de desproteção foi de 100%) foi dissolvido em DCM (10 cm³) a frio (banho de gelo) e titulado (papel de pH) até atingir o pH 9-10 com DIPEA. Esta solução foi adicionada a uma solução contendo DTPA-bisanidrido (2.720 g, 7.600 mmol) em DMF (70 cm³) e piridina (5 cm³). A mistura reacional foi colocada sob agitação, à temperatura ambiente, durante a noite. Concentrou-se a mistura sob pressão reduzida obtendo-se um óleo incolor. Este material não sofreu mais nenhuma purificação nem caracterização. O resíduo foi redissolvido numa mistura de etanol (50 cm³) e KOH (sol. aq. 1M, 20 cm³) e colocado em agitação à temperatura ambiente durante a noite. O pH da mistura reacional foi ajustado para 1 com Amberlist 15. A resina foi transferida para uma coluna, minuciosamente lavada com água e eluída com sol. aq. NH₃ 0.5 M. As frações relevantes foram recolhidas e concentradas a pressão reduzida (T <40 °C), originando uma espuma amarela (1.39 g). Análise por TLC (sílica de fase normal; H₂O/EtOH/AcOH – 8:2:2 gotas) revelou uma mistura complexa de produtos com fragmentos de açúcares. Análise por espectrometria de massa (ESI), permitiu identificar nesta mistura os produtos DTPA-monoGlc e DTPA-(Glc)₂; *m/z* (ESI) 1090.5 (M+H⁺, 10%), 742.3 (M+H⁺, 6%); *HRMS* (ESI) Calc. para C₄₄H₈₀N₇O₂₀S₂- DTPA-(Glc)₂ (M+H)⁺ 1090.4894. Encontrada 1090.4910. *HRMS* (ESI) Calc. para C₂₉H₅₂N₅O₁₅S- DTPA-monoGlc (M+H)⁺ 742.3175. Encontrada 742.3211.

Foi tentada a purificação desta mistura por cromatografia de coluna com sílica de fase reversa (RP8) por eluição com um gradiente (100% H₂O -> 100% EtOH). Análise das frações obtidas por TLC (sílica de fase normal; H₂O/EtOH/AcOH – 8:2:2 gotas) demonstrou baixa resolução (misturas de compostos). Não foi tentada qualquer purificação posterior da mistura obtida.

DTPA(Gal)₄ (8): O tiogalactosido amino divalente totalmente protegido (**33**) (0.464 g, 0.379 mmol) foi desprotegido seguindo-se o mesmo procedimento descrito para o composto (**6**). A reacção com DTPA-bis anidrido (0.064 g, 0.179 mmol), seguida de desprotecção e purificação originou o glicoconjugado **8** sob a forma de um sólido branco (0.240 g, η = 69% nos dois passos). ¹H, δ (300 MHz, D₂O, pH 7.0): 4.46 (4H, d, J = 9.0 Hz, H-1), 3.52 (4H, tap, H-2), 3.64 (4H, tap, H-3), 3.68 (4H, m, H-4), 3.95 (4H, dap, J = 3.3 Hz, H-5), 3.71 (8H, m, H-6a + H-6b), 1.28 (8H, m, C(O)NHCH₂CH₂(CH₂)₂), 1.49 (8H, m, C(O)NHCH₂(CH₂)₂), 3.18 (8H, m, C(O)NHCH₂), 3.48 (4H, m, NCH₂C(O)), 2.75 (8H, m, NCH₂), 1.83 (8H, m, NCH₂CH₂), 3.20 (8H, m, NCH₂CH₂CH₂), 2.59 (8H, m, SCH₂CH₂), 2.97 (8H, m, SCH₂), 3.20 (4H, s, DTPA amida NCH₂C(O)), 3.71 (2H, s, DTPA acetato central NCH₂CO₂⁻), 3.33 (4H, s, DTPA acetato terminal NCH₂CO₂⁻), 3.34, 3.18 (8H, dois m, DTPA esqueleto NCH₂); ¹³C, δ (75.6 MHz, D₂O): 86.29 (C-1), 69.66 (C-2), 74.09 (C-3), 79.08 (C-4), 68.95 (C-5), 61.41 (C-6), 25.33 (C(O)NHCH₂CH₂(CH₂)₂), 28.53 (C(O)NHCH₂(CH₂)₂), 39.32, 39.18 (C(O)NHCH₂), 56.57 (NCH₂C(O)), 52.51 (NCH₂), 25.38 (NCH₂CH₂), 37.11 (NCH₂CH₂CH₂), 26.70 (SCH₂), 36.52 (SCH₂CH₂), 59.20 (DTPA amida NCH₂C(O)), 54.50 (DTPA acetato central NCH₂CO₂⁻), 59.11 (DTPA acetato terminal NCH₂CO₂⁻), 50.51, 52.89 (DTPA esqueleto NCH₂), 170.51, 173.40, 174.48, 178.85 (DTPA acetato NCH₂CO₂⁻ e amida NCH₂C(O)NH, outro CH₂C(O)NH); m/z (FAB⁺, NBA) 1932 (M⁺, 20), 1055 (100); HRMS (FAB⁺, NBA) Calc. para C₇₈H₁₄₂N₁₃O₃₄S₄ (M+H)⁺ 1932.8665. Encontrada 1932.8576.

Tentativa de síntese de DTPA(Gal)₈ (9): O tioglicosido tetravalente amino-derivativado (**34**) (0.418 g, 0.174 mmol) foi desprotegido seguindo o mesmo procedimento descrito para o composto (**6**). A reacção com DTPA-bis anidrido (0.030 g, 0.0827 mmol), seguida de desprotecção originou um sólido branco (0.167 g). A análise do espectro RMN de ¹H sugere que obtivemos o composto desejado, contudo não conseguimos obter um espectro de massa concordante com a estrutura do composto. ¹H, δ (300 MHz, D₂O, pH 7.0) sinais seleccionados: 4.44 (8H, d, J = 9.6 Hz, H-1), 3.54 (8H, tap, J = 9.6 Hz, H-2), 3.61 (8H, dd, J = 9.3 e 3.3 Hz, H-3), 3.93 (8H, dap, J = 3.3 Hz, H-4), 3.68-3.78 (36H, m), 1.27 (8H, m, C(O)NHCH₂CH₂(CH₂)₂), 1.47 (8H, m, C(O)NHCH₂(CH₂)₂), 1.70 (24H, m(l)), 2.57 (16H, m, SCH₂CH₂), 2.68 (16H, m), 2.96

(16H, m, SCH₂) 3.10-3.40 (56H, m).

Não conseguimos obter um espectro de massa consistente com a estrutura deste composto.

Preparação dos Ln(III)-glicoconjugados para estudos de RMN e de DRMN

Os Ln(III)-glicoconjugados foram preparados adicionando-se um ligeiro excesso (1.1 eq.) de solução aquosa de LnCl₃ a uma solução aquosa de glicoconjugado. O pH da solução foi lentamente ajustado a 5 com KOH (aq) e a solução foi colocada em agitação, à temperatura de 70 °C, durante oito horas. O pH final foi ajustado a 7 com KOH (aq) e qualquer precipitado formado foi retirado por filtração. A solução foi concentrada e purificada por filtração em gel com Sephadex G10, eluindo em água. As frações relevantes foram recolhidas e liofilizadas obtendo-se os complexos de Ln(III).

O conjugado DTPA-(Lac)₂, foi deixado a reagir com um excesso de solução stock de Gd(ClO₄) e o excesso do ião metálico foi retrotitulado com uma solução de Na₂H₂EDTA, permitindo conhecer-se a concentração exacta do glicoconjugado.

O quelato Gd(III)-DTPA-(Lac)₂, foi preparado por adição de quantidades apropriadas de glicoconjugado à solução aquosa de perclorato de gadolínio (3-5% excesso de glicoconjugado). O pH foi ajustado a 7 com KOH. A solução de Gd(III)-glicoconjugados foi liofilizada e diluída com solução tampão de fosfato 25 mM (pH 7.4). A concentração do Gd(III) (4.63 mM) foi verificada por medições de ICP. A ausência do gadolínio livre em solução foi verificada usando o indicador laranja de xilenol (Brunisholtz, 1959).

Conclusão

Desenvolveu-se uma estratégia sintética para obter glicoconjugados de DTPA (Ácido dietilenotriaminopentaacético), com diferentes valências e diferentes açúcares. A arquitectura glicodendrímica é especialmente conveniente e versátil para variar a valência dos glicoconjugados de uma forma interactiva a partir de um número reduzido de blocos sintéticos. Demonstrou-se a síntese de um glicodendrímicos mono, di e tetravalente. O respectivo DTPA-bisamida é octavalente. Gerações superiores são possíveis, recorrendo-se ao mesmo processo de síntese.

Da análise aos espectros de ^1H RMN dos complexos La(III) Sm(III) e Eu(III) com os ligandos DTPA(Gal)₂, DTPA(Lac)₂ e DTPA(Gal)₄ em D₂O, concluiu-se:

-Os espectros dos glicoconjugados diamagnéticos de La(III) revelam-se idênticos aos dos glicoconjugados livres para o mesmo valor de pH, excepto para os protões do esqueleto de DTPA, os quais, em resultado de maior proximidade centro de coordenação, originam sinais mais complexos;

-Os complexos de Sm(III) e de Eu(III) apresentam sinais que praticamente não são influenciados (quer em termos de desvio químico quer de alargamento) pela presença dos centros paramagnéticos, nomeadamente os sinais dos protões dos resíduos de açúcar e os dos braços ligantes mais afastados do DTPA. No entanto, os protões da cadeia lateral mais próxima do fragmento de DTPA-amida sofrem um forte desvio químico bem como alargamento, em particular os sinais dos grupos metilénicos do fragmento de DTPA.

O valor encontrado para a relaxividade do Gd(III)-DTPA(Lac)₂ a 20 MHz e a 25 °C é cerca de 13% superior ao de quelatos de Gd(III)-DTPA-bisamidas de menor peso molecular, como é o caso do DTPA-BMA, de acordo com um valor de tempo de correlação rotacional, τ_R , mais longo. Será de esperar que o valor de τ_R deste quelato de Gd(III) aumente linearmente com o peso molecular, desde que a mobilidade interna das cadeias laterais não se altere significativamente, conduzindo a um aumento proporcional da relaxividade. Este resultado sugere que a relaxividade do glicoconjugado tetravalente, Gd(III)-DTPA(Gal)₄, (peso molecular = 2088), seja substancialmente superior. A relaxividade protónica dos quelatos de Gd(III) descreve a eficiência do acoplamento dipolar magnético entre os protões da água e o ião metálico paramagnético, por isso é uma medida directa da eficiência dos quelatos como agentes

de contraste para imagiologia de ressonância magnética.

Este resultado, associado ao facto dos complexos metálicos dos glicoconjugados potencialmente se ligarem ao receptor biológico ASGP, faz destes compostos potenciais agentes de imagiologia médica (IRM e cintigrafia gama) específicos para o fígado.

Apêndice

DRMN. As relaxividades protônicas determinadas (com concentração normalizada a 1 mM em Gd(III)) contêm as contribuições de esfera interna (is) e de esfera externa (os):

$$r_1 = r_{1is} + r_{1os} \quad (1)$$

O termo respeitante à contribuição da esfera interna é dado pela equação (2); em que q indica o número de moléculas de água na esfera interna.

$$r_{1is} = \frac{1}{1000} \times \frac{q}{55.55} \times \frac{1}{T_{1m}^H + \tau_m} \quad (2)$$

A velocidade de relaxação longitudinal dos prótons da esfera interna, $1/T_{1m}^H$ expressa-se por:

$$\frac{1}{T_{1m}^H} = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_o}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_S^2 \gamma_I^2}{r_{GdH}^6} S(S+1) \left[\frac{3\tau_{d1H}}{1 + \omega_I^2 \tau_{d1H}^2} + \frac{7\tau_{d2H}}{1 + \omega_S^2 \tau_{d2H}^2} \right] \quad (3)$$

onde r_{GdH} corresponde à distância efectiva entre o spin electrónico do Gd(III) e os prótons da água, ω_I é a frequência de ressonância protónica e τ_{diH} é dado pela equação (4), onde τ_R é o tempo de correlação rotacional do vector Gd(III)-H_{água}:

$$\frac{1}{\tau_{diH}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{T_{ie}} \quad i = 1, 2 \quad (4)$$

assume-se que o tempo de correlação rotacional, τ_R , tem uma dependência exponencial simples da temperatura, possuindo uma de energia de activação, E_R :

$$\tau_R = \tau_R^{298} \exp \left\{ \frac{E_R}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15} \right) \right\} \quad (5)$$

As velocidades de relaxação electrónica de spin, $1/T_{1e}$ e $1/T_{2e}$, para iões

metálicos em solução com $S > 1/2$ é predominantemente governada por um mecanismo transitório de separação para campo nulo “zero-field-splitting” (ZFS) (McLachlan, 1964; Powell, 1993). Nas equações (6-7), Δ^2 é a flutuação quadrática média do tensor de ZFS, τ_v é o tempo de correlação para a modulação de ZFS com a energia de activação E_v , e ω_s é a frequência de Larmor de spin electrónico:

$$\left(\frac{1}{T_{1e}}\right)^{\text{ZFS}} = \frac{1}{25} \Delta^2 \tau_v \{4S(S+1) - 3\} \left\{ \frac{1}{1 + \omega_s^2 \tau_v^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_s^2 \tau_v^2} \right\} \quad (6)$$

$$\left(\frac{1}{T_{2e}}\right)^{\text{ZFS}} = \Delta^2 \tau_v \left[\frac{5.26}{1 + 0.372\omega_s^2 \tau_v^2} + \frac{7.18}{1 + 1.24\omega_s \tau_v} \right] \quad (7)$$

$$\tau_v = \tau_v^{298} \exp\left\{ \frac{E_v}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15} \right) \right\} \quad (8)$$

a contribuição da esfera externa é descrita pela equação (9), em que N_A é a constante de Avogadro, e J_{os} é a função de densidade espectral.

$$r_{ios} = \frac{32N_A \pi}{405} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_s^2 \gamma_I^2}{a_{GdH} D_{GdH}} S(S+1) [3J_{os}(\omega_1, T_{1e}) + 7J_{os}(\omega_s, T_{2e})] \quad (9)$$

$$J_{os}(\omega, T_{je}) = \text{Re} \left[\frac{1 + \frac{1}{4} \left(i\omega \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{1/2}}{1 + \left(i\omega \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{1/2} + \frac{4}{9} \left(i\omega \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right) + \frac{1}{9} \left(i\omega \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{3/2}} \right] \quad (10)$$

$j = 1, 2$

Um valor de $3,6 \text{ \AA}$ foi usado para a_{GdH} . Para a dependência da temperatura, no que concerne ao coeficiente de difusão para a difusão do protão da água em relação ao complexo de Gd(III), D_{GdH} , assumiu-se uma dependência exponencial da temperatura, com uma energia de activação, E_{DGdH} :

$$D_{GdH} = D_{GdH}^{298} \exp\left\{ \frac{E_{DGdH}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15} \right) \right\} \quad (11)$$

Tabela 6 - Relaxividade protónica do Gd(III)-DTPA(Lac)₂.

Frequência (MHz)	25 °C	Frequência (MHz)	60 °C
10.001	5.811	15.998	4.1
6.9516	6.175	10.853	4.123
4.8342	6.398	7.36	4.229
3.3593	7.080	4.9912	4.672
2.335	7.601	3.384	5.109
1.6231	7.540	2.296	5.843
1.1293	8.033	1.5569	5.993
0.78425	8.037	1.0565	6.301
0.54522	8.204	0.48561	6.311
0.379	8.281	0.32959	6.476
0.26382	8.347	0.22346	6.602
0.1833	8.551	0.15136	6.626
0.12722	8.644	0.10281	6.599
0.088466	8.656	0.069612	6.607
0.061485	8.682	0.047272	6.72
0.042866	8.526	0.032022	6.635
0.029663	8.581	0.021664	6.628
0.020774	8.681	0.014771	6.799
0.01433	8.578	0.010031	6.788
0.010031	8.734	20	4.011
12	5.823		
16	5.671		
20	5.722		

Bibliografia

- Aime, S.; Cabella, C.; Colombatto, S.; Crich, S. G.; Gianolio, E.; Maggioni, F. (2002) *J. Magn. Res. Imag.* **16**, 394.
- Aime, S.; Dastrù, W.; Crich, S.G.; Gianolio, E.; Mainero, V. (2002) *Biopolymers (Peptide Science)* **66**, 419.
- André, J. P.; Tóth, É.; Fisher, H.; Seelig, A.; Mäcke, H. R.; Merbach, A. E. (1999) *Eur. J. Inorg. Chem* **5**, 2977.
- André, J. P.; Geraldés C. F. G. C.; Martins, J. A.; Merbach, A. E.; Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; Lima, J. J. P.; Tóth, É. (2004) *Chem. Eur. J.* **10**, 5804.
- Baía, P.; André, J.P.; Geraldés, C.F.G.C.; Martins, J.A; Merbach, A. E.; Tóth, É., aceite para publicação no *Eur. J. Inorg. Chem*
- Bader, A.; Reimer, P.; Knop, E.; Böker, K; Christians, U.; Weissleder, R.; Sewing, K. (1995) *Journal of Molecular Biology* **259**, 281.
- Banerjee, R.; Das, K.; Ravishankar, R.; Suguna, K; Surolia, A.; Vijayan, M. (1996) *Journal of Molecular Biology* **259**, 281.
- Bertini, I.; Drago, R. S. (editores). (1980) *NATO Adv. Study Instit. Series*, **151**.
- Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. (2001) *Carbohydrates and Glycobiology Review* **291**, 2357.
- Bleaney, B. (1972) *Journal of Magnetic Resonance* **8**, 91.
- Bider, M. D.; Wahlberg, J. M.; Kammerer, R. A.; Spiess, M. (1996) *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 31996.
- Boas, U.; Heegaard, P. M. H. (2004) *Chem. Soc. Rev.* **33**, 43.
- Bloembergen, N.; Morgan, L. O. (1961) *J. Chem. Phys.* **34**, 842.
- Borman, S. (2000) *Science and Engineering*, 48.
- Boons, G-J.; Hale, K. J. (2000) *Organic Synthesis with Carbohydrates-mono and oligosaccharides: structure, configuration and conformation*, Sheffield Academic

Press, Ltd; England.

- Bulman, R. A.; Seiler, H. G.; Sigel, H.; Siegel, A. (editors) (1988) *Handbook of Toxicity of Inorganic Compounds*, Marcel Dekker, New York.
- Brunisholtz, G.; Randin, M. (1959) *Helv. Chim. Acta*, 42, 1927.
- Bünzli, J. C.; Choppin, G. R. (editors), (1989) *Lanthanide probes in life, Chemical and Earth Sciences*, Elsevier, Amesterdão.
- Calbiochem. *Lectins*. Technical Bulletin.
- Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. (1999) *Chemical Review* **99**, 2293.
- Catarro, M. P. M. M. (1987) Tese de Mestrado, FCTUC, Universidade de Coimbra.
- Cavagna, F.; Daprà, M.; Maggioni, F.; Haën, C.; Felder, E. (1991) *Magnetic Resonance in Medicine* **22**, 329.
- Choppin, G.R.; Baisden, P. A.; Khan, S. A. (1979) *Inorganic Chemistry* **18**, 1330.
- Choppin, G. R. (1984) *Journal of the Less-Common Metals* **100**, 141.
- Cotton, S. A.; Hart, F. A. (1975) *The Mc Millan Press*, Londres.
- Dalton, S R.; Wiegert, R L.; Badwin, C. R; Kassel, K. M.; Casey, C. A. (2003) *Biochemistry Pharmacology* **15**, 535.
- Dam, T. K.; Brewer, C.F. (2002) *Chemical Review* **102**, 387.
- Dini, L.; Autuori, F.; Lentini, A.; Oliverio, S.; Piacentini, M. (1992) *Federation of European Biochemical Societies* **296**, 174.
- Dobson, C. M.; Williams, R. J. P.; Xavier, A. V. (1973) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2662.
- Dwek, R. A.; Richards, R. E.; Moralle, K. G.; Nieboer, E.; Williams, R. J. P.; Xavier, A. V. (1971) *Eur. J. Biochem.* **21**, 204.
- Dwek, R. A. (1975) *Magnetic Resonance*, Clarendon Press, Oxford.
- Elofsson, M.; Walse B.; Kihlberg J. (1991) *Tetrahedron Letters* **32**, 7613.

- Elofsson, M.; Roy, S.; Walse, B.; Kihlberg J. (1993) *Carbohydrates Res.* **246**, 89.
- Fujimoto, K.; Miyata, T.; Aoyama, Y. (2000) *Journal American Society* **122**, 3558.
- Gabius, H-J. (2001) *Biological Information Transfer*, 1.
- Geraldes, C. F. G. C.; Gil, V. M. S. (1987) *Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Geraldes, C. F. G. C.; Urbano, A. M.; Hoefnagel, M. A.; Peters, J. A. (1993) *Inorganic Chemistry.* **32**, 2426.
- Geraldes, C.F.G.C. (2003) *Sociedade Portuguesa de Química*, 47.
- Glasel, J. A. (1973) *Progr. Inorg. Chem.* **18**, 383.
- Golding, J. D.; Pyykkö, P. (1973) *Mol. Phys.* **26**, 1389.
- Greene, T.W. (1981) *Protective groups inorganic synthesis*, John Wiley & Sons.
- Haas, Y.; Stein, G. (1971) *Journal of Physical Chemistry* **75**, 3668.
- Haas, Y.; Stein, G.; Wurzburg, E. (1974) *Journal of Chemical Physics* **60**, 258.
- Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J.; (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 76638.
- Harisinghani, M.G.; Jhaveri, K.S.; Weissleder, R.; Schima, W.; Saini, S.; Hahn, P.F.; Mueller, P.R. (2001) *Clinical Radiology* **56**, 714.
- Helmberger, T.; Semelka, R. C. (2001) *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America* **9**, 745.
- Hirabayashi, J. (1997) *Galectin: Definition and History*. **In:**
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA01E.html>
- Herzenjak, A.; Frank, S.; Wo, X; Zhou, Y.; Berkel, T.; Kostner, G. M. (2003) *Biochemical Journal* **376**, 765.
- Horrocks, W. D.; Sudnick, D. R. (1981) *Acc. Chem. Res.* **14**, 384.
- Imai, Y. (1998) *C-type Lectins*. **In:**
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA04E.html>

- Inagaki, F.; Miiyazawa, T. (1981) *Prog. NMR Spectrosc.* **14**, 67.
- Jacques, V.; Desreux, J. F. (2002) *Topics in Current Chemistry* **221**, 123.
- Jayaraman, N.; Nepogodiev, S. N.; Stoddart, J. F. (1997) *Chem. Eur. J.* **8**, 1193.
- Jenkins, B. J.; Lauffer, R. B. (1988) *J. Magn. Reson.* **88**, 328.
- Jenkins, B. J.; Lauffer, R. B. (1988) *Inorganic Chemistry* **27**, 4730.
- Kabalka, G. W.; Davis, M. A.; Moss, T. H.; Buonocore, E.; Hubner, K.; Holmberg, E.; Maruyama, K.; Huang, L. (1991) *Magnetic Resonance in Medicine* **19**, 406.
- Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. (2000) *Current Opinion in Chemical Biology* **4**, 696.
- Kiefel, M. J.; Thomson, R. J.; Radovanovic, M.; Itzstein, M. V. (1999) *J. Carbohydrates Chemistry* **18**, 937.
- Kilpatrick, D. C. (2002) *Biochimica et Biophysica Acta* **1572**, 187.
- Kimpe, K.; Parac -Vogt, T. N.; Laurent, S.; Piérart, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N.; Binnemans K. (2003) *European Journal of Inorganic Chemistry*, 3021.
- Kowall T.; Foglia, F.; Merbach, A. E. (1995) *Journal of the American Chemical Society* **117**, 3790.
- Koenig, S.H.; Epstein, M. (1975) *J. Chem. Phys.* **63**, 2279.
- Lammers, H.; Maton, F.; Pubanz, D.; Laren, M. W. van; Bekkum, H. van; Merbach, A. E.; Muller, R. N.; Peters, J. A. (1997) *Inorganic Chemistry* **36**, 2527.
- Lauffer, R. B. (1987) *Chem. Rev.* **87**, 901.
- Laurent, S.; Botteman, F.; Vander Elst, L.; Muller, R.N. (2004) *European Journal of Inorganic Chemistry*, 463.
- Lee, R. T.; Lee, Y. C. (1979) *Carbohydrate Research* **77**, 149.
- Lewis, W. B.; Jackson, J. A.; Lemons, J. F.; Taube, H. (1962) *Journal of Chemical Physics* **36**, 694.
- Leyden, D. E.; Cox, R. H. (1977) *Analytical Applications of NMR*, John Willey &

Sons, New York.

- Lis. H.; Sharon, N. (1998) *Chemical Reviews* **98**, 637.
- Loris, R. (2002) *Biochimica et Biophysica Acta* **1572**, 198.
- Lowe, R. (2002) *Aust. J. Chem.* **55**, 551.
- Mammen, M.; Choi, S-K.; Whitesides, G. M. (1998) *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2754.
- McAbee, D. D.; Clarke, B L.; Oka, J. A.; Weigel, P. H. (1990) *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 629.
- McLachlan, A. D. (1964) *Proceedings of the Royal Society of London series a-Mathematical and Physical Sciences* **280**, 271.
- Mintorovitch, J.; Shamsi, K. (2000) *Oncology* **14**.
- Moeller, T. (1972) *Inorg. Chem.– series one* **7**, 275.
- Nangia-Makker, P.; Conklin, J.; Hogan, V.; Raz, A. (2002) *TRENDS in Molecular Medicine* **8**, 187.
- Nieboer, E. (1975) *Struct. Bonding* **22**, 2.
- Papisov, M. I.; Bogdanov, A.; Schaffer, B.; Nossif, N.; Shen, T.; Weissleder R.; Brady, T. J. (1993) *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **122**, 383.
- Park, E I.; Manzella, S. M.; Baenziger, J. U. 2003, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 4597.
- Peters, J. A.; -Bovens, E. Z.; Corsi, D.; Geraldes, C. F. G. C. (2001) “*Structure and dynamics of gadolinium based contrast agents*” in *the Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Wiley, Chichester, 315.
- Powell, D. H.; Merbach, A. E.; González, G.; Brücher, E.; Micskei, K.; Ottaviani, M. F.; Köhler, K.; Zelewsky, A. Von; Grinberg, Lebedev, O. Y.; Y. S. (1993) *Helvetica Chimica Acta* **76**, 2129.
- Powell, D. H.; Dhubhghaill, O. M. Ni; Pubanz, D.; Helm, L.; Lebedev, Y. S.; Schaefer, W.; Merbach, A. E. (1996) *Journal of the American Chemical society*

118, 9333.

- Prata, M. I. M. (2001) Tese de Doutoramento, FCTUC, Universidade de Coimbra.
- Reilley, C. N.; Good, B. W.; Allendoerfer, R. D. (1976) *Anal. Chem.* **48**, 1446.
- Reichert, D. E.; Lewis J. S.; Anderson, C. J. (1999) *Coordination Chemistry Reviews* **184**, 3.
- Rensen, P. C, N.; Sliedregt, L. A. J. M.; Ferns, M; Kieviet, E; Rossenberg, S. M. W.; Leeuwen, S. H.; Berkel, T. J. C.; Biessen, E. A. L. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 37577.
- Reuben, J. (1973) *J. Mag. Reson.* **11**, 103.
- Rocklage, S. M.; Cacheris, W. P.; Quay, S. C.; Hahn, F. E.; Raymond, K. N. (1989) *Inorganic Chemistry* **28**, 477.
- Roy, R. (1996) *Current Opinion in Structural Biology* **6**, 692.
- Santos, M. I. M. (2003) Relatório de Estágio da Licenciatura em Biologia Aplicada, Escola de Ciências, Universidade do Minho.
- Spirlet, M. R.; Desreaux, J. F.; Loncin, M. F. Rebizant J. (1984) *Inorganic Chemistry* **23**, 359.
- Stein, G.; Würzberg, E. (1975) *J. Chem. Phys.* **62**, 208.
- Stockert, R. J. (1995) *Physiological Reviews* **75**, 591.
- Schmitt-Willch H.; Brehm, M.; Ewers, C. L. J.; Michl G.; Fahrnow, A. -M.; Petrov, O.; Platzek, J.; Raduchel, B.; Süzle, D. (1999) *Inorganic Chemistry* **38**, 1134.
- Tomália, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallons, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. (1985) *Polim. J.* **17**, 117.
- Tóth, É.; Helm, L.; Merbach, A. E. (2001) “*Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Theory and Mechanism*” in *the Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic resonance Imaging*, Wiley, Chichester, 45.
- Tóth, É.; Helm, L.; Merbach, A. E. (2002) *Top. Current Chem.* **221**, 61.
- Varki, A.; Cummings, R; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J. (1999) *Essentials*

of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Weigel, P. H.; Yik, J. H. N. (2002) *Biochimica et Biophysica Acta* **25375**, 341.
- Weissman S. I. (1942) *J. Chem. Phys.* **10**, 214.
- Weinmann, H. J.; Ebert, W.; Misselwitz, B.; Schmitt-Willch, H. (2003) *European Journal of Radiology* **46**, 33.
- Williams, R. J. P. (1970) *Quart. Rev.* **24**, 331.
- Williams, R. J. P. (1982) *Struct. Bond.* **50**, 77.
- Wu, J.; Nantz, M. H.; Zern, M. A. (2002) *Frontiers in Bioscience* **7**, 717.
- Yoshikawa, K.; Inoue, Y.; Akahane, M.; Shimada, M.; Itoh, S.; Seno, A.; Hayashi, S. (2003) *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **18**, 204.
- Zanini, D.; Roy, R. (1996) *Journal of Organic Chemistry* **61**, 7348.