



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

**COMPLEXOS IONICAMENTE MARCADOS DE Tb³⁺ E
Eu³⁺ HIDROSSOLÚVEIS: SÍNTESE E APLICAÇÃO EM
IMAGEAMENTO CELULAR**

ALUNA: JÚLIA ROSSI DINIZ

Orientador: Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto

Coorientadora: Profa. Dra. Aline Lima de Oliveira

Brasília, Março de 2014.



Universidade de Brasília – Instituto de Química

COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Júlia Rossi Diniz**, matrícula nº **12/0081504**, intitulada **“Complexos Ionicamente Marcados de Tb³⁺ e Eu³⁺ Hidrossolúveis: Síntese e Aplicação em Imageamento Celular”**, apresentada no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 7 de março de 2014.

Prof^o Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof^o Dr. Alexandre Augusto Moreira Lapis
Membro Titular (UFFS)

Prof^o Dr. Angelo Henrique de Lira Machado
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof^o Dr. Marcelo Oliveira Rodrigues
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 7 de março de 2014.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA - PPGQ



LABORATÓRIO DE QUÍMICA MEDICINAL E TECNOLÓGICA

COMPLEXOS IONICAMENTE MARCADOS DE Tb³⁺ E Eu³⁺ HIDROSSOLÚVEIS: SÍNTESE E APLICAÇÃO EM IMAGEAMENTO CELULAR

JÚLIA ROSSI DINIZ

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Química como pré-requisito
para a obtenção do título de Mestre

Brasília, Março de 2014.

Dedicatória

Como te procurei...
Procurei-te em tantos lugares!
No universo,
naquele que chamam Uno...
Procurei-te no equilíbrio do Cosmos,
Na ilusão de Shiva e Keshava.
Procurei-te no respirar da meditação em yoga.
Procurei-te nos risos de Buda,
Na auto realização e na alegria do mundo.
Procurei-te na beleza sedutora das ciências
E na harmonia dos números de homem.
Procurei-te em mim mesma
E no engano do espírito que reencarna para evoluir.
Em busca da grande verdade,
Dela nunca estive tão longe.
Enquanto isso, me observavas...
Nunca te foi oculto um único pensamento meu,
E até da minha cabeça tinhas contado cada fio de cabelo.
Nunca uma folha jamais caiu sem que houvesse permitido
E ainda que, na minha busca, distante de ti eu andasse,
O teu tão profundo amor,
Tão maior que os céus e a terra,
Incomparavelmente maior que a sabedoria dos homens
E que as minhas iniquidades,
Encontrou-me.
E diante da verdade digo:
Jamais cogitei que dentro do meu coração ela seria tão doce.
Hoje, posso dizer...
Ganhei vida no dia em que te conheci meu doce Jesus.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas portas que se abriram e também pelas que se fecharam. Não tenho dúvidas que sem Ele este trabalho não teria acontecido.

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão. É por causa deles que eu estou aqui e, ainda que tendo tropeçado algumas vezes, posso dizer que estou firme. Ao meu pai eu quero agradecer por ser a minha âncora, aquele que não me deixa cair e me levanta sempre que há tropeços. À minha mãe por ser uma fortaleza dentro da minha casa, por segurar as barras e cuidar de mim com amor e carinho. Ao meu irmão pelos conselhos e pelo carinho. Não falo isso muitas vezes, mas eu te amo muito Caio.

Agradeço aos meus avós por serem os melhores avós do mundo. Muitos dos meus momentos mais felizes aconteceram na casa da laiá ao lado dos tios e primos.

Agradeço ao Professor Marcelo porque, sem dúvidas, ele é uma das bases mais fortes deste trabalho. Agradeço também pela paciência e dedicação e por todo auxílio que me dispôs.

Agradeço ao Prof. Severino Alves Júnior por ter cedido espaço para as análises fotofísicas. Ao Daniel por muitas vezes ter auxiliado na síntese dos complexos. Agradeço ao Pedro pela excelente bibliografia recomendada e à Haline pelas dicas no *Word*. Agradeço ao Marcos pela amizade que tem me dedicado e à Gabi pelos dias de escrita da Dissertação.

Agradeço em especial ao Vítor e a família dele. São pessoas que eu tenho um carinho que não se pode dimensionar. Desejo a eles as alegrias mais doces que possam existir. E Vítor, você vai para todo sempre estar no mais profundo do meu coração.

Agradeço à Prof. Aline (Hello-Hello como a chamam) por ter me acompanhado no Mestrado, pelos valiosos ensinamentos de RMN, por estar sempre disponível para tirar minhas dúvidas e pelo carinho e dedicação, os quais são recíprocos.

Agradeço do fundo do meu coração ao pessoal do LaQuiMeT: Thyago, Romulito, Gi, Haline, Pedro Pimenta, Alberto, Raquel, Tainara, Pedro M., Pedro G. e Marina pelos risos, descontrações e suportes, tanto profissional como pessoal. Saibam que vocês são a minha segunda família!

Finalmente, agradeço em especial ao Prof. Brenno por ser mais que um orientador, por sempre estar disposto a me ouvir, porque através dele tenho aprendido muito sobre Química e sobre vida. Estará para sempre no coração!

Agradeço também à bolsa fornecida pela Capes e ao Instituto de Química, bem como à Universidade de Brasília, a qual eu tenho um carinho especial.

Sumário

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	vii
Abstract	viii
Listas de Abreviações e Acrônimos	ix
Lista de Esquemas	xii
Lista de Tabelas	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 Líquidos iônicos, suas interações e líquidos iônicos de função específica	1
1.2 Lantanídeos	4
1.3 Imageamento Celular.....	9
2. Objetivos.....	11
3. Parte Experimental	12
3.1 Análises de ESI-MS	13
3.2 Dados Fotofísicos.....	13
2.3 FTIR-ATR.....	13
2.4 Análises de RMN	14
4. Resultados e Discussão	15
5. Conclusão & Perspectivas	40
6. Bibliografia	41
7. Apêndice.....	44
7.1 Licença.....	44
7.2 Publicação.....	45

Resumo

O presente trabalho apresenta a síntese, caracterização e estudos fotofísicos de dois complexos hidrossolúveis ionicamente marcados de európio e térbio, intitulados **EuMAI** e **TbMAI**. Ambos os complexos apresentaram um equilíbrio em solução aquosa (dissociação/associação de ligante) a qual foi observada por diferentes técnicas espectroscópicas (RMN, ESI-MS, FTIR-ATR).

Cálculos teóricos comprovaram a viabilidade do equilíbrio observado em solução aquosa.

Ambos os complexos foram submetidos a experimentos de imageamento celular, mostrando que o complexo **TbMAI** foi um excelente marcador fluorescente seletivo com intensa luminescência e afinidade exclusiva à região do retículo endoplasmático celular.

Abstract

The present work describes the synthesis, characterization and photophysical for two water soluble ionically-tagged europium and terbium complexes, namely **EuMAI** and **TbMAI**. Both complexes showed an equilibrium (ligand dissociation/association) in aqueous solution readily observed by different spectroscopic techniques (NMR, ESI-MS, FTIR-ATR).

Theoretical calculations also suggest the proposed equilibrium in aqueous solution.

Both complexes were tested as probes for bioimaging purposes. **TbMAI** is an outstanding fluorescent probe with intense luminescence showing exclusive selectivity towards the endoplasmic reticulum region.

Listas de Abreviações e Acrônimos

DAPI	Di-hidroclorato de 4,6-Diamino-2-fenilindol
DFT	Density Functional Theory (Teoria da Função de Densidade)
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por electrospray
FTIR-ATR	Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Total Atenuada
LIS	<i>Lanthanide Induced Shift</i> (Deslocamento Induzido pelo Lantanídeo)
LIs	Líquidos Iônicos
LMCT	<i>Ligand to Metal Charge Transfer</i> (Transferência de Carga do Ligante para o Metal)
MAI.Cl	Cloreto de 1-metil-3-carboximetilimidazólio
MCF-7	Célula cancerígena de mama (<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>)
MDA-MB-23	Célula cancerígena invasiva de mama
NOE	Nuclear Overhauser Effect (Efeito <i>Overhauser</i> Nuclear)
T ₁	Tempo de relaxação spin-nuclear longitudinal
TMSP	Ácido propanoico trimetilsilano
TSILs	<i>Task Specific Ionic Liquids</i> (Líquidos Iônicos de Função Específica)
W ₂	Relaxação cruzada W ₂

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas de alguns líquidos iônicos imidazólios.	1
Figura 2. Estrutura simplificada mostrando as ligações de H em um LI, no qual cada ânion interage com três cátions e cada cátion com três ânions. Os cátions também podem interagir, por exemplo, por π -stacking na direção x. (Adaptada da ref. 7).....	2
Figura 3. Exemplos de TSILs. As estruturas 1 e 2 foram usadas como ligantes para síntese de complexos ionicamente marcados que atuaram como catalisadores em reações de Suzuki e epoxidação respectivamente (ref. 2b e 2c). A estrutura 3 foi usada como catalisador em reações de Biginelli (ref. 2e). 3	
Figura 4. Função de onda radial dos elétrons $4f^3$ do Nd^{3+} (linha vermelha) comparada à função radial dos elétrons do núcleo de Xe (linha pontilhada preta) (Adaptada da ref.12).....	5
Figura 5. Um possível microestado do subnível $4f^6$. Cada um dos $N = 6$ elétrons representados por seus respectivos números quânticos m_l e m_s	6
Figura 6. Níveis de energia dos íons Eu^{3+} (à esquerda) e Ce^{3+} (à direita) em um campo octaédrico (Adaptada da ref.16).....	7
Figura 7. Diagrama de Jablonski ilustrando o efeito antena TE(s) – transferência de energia do estado singleto; TE(t) – transferência de energia do estado tripleto; CIS – cruzamento intersistema. (Adaptada da ref. 22).....	8
Figura 8. Células cancerígenas MCF-7. (A) Núcleo celular marcado com TO-PRO-3 (vermelho). (B) Sinal de fluorescência celular encubado com BT-DH (verde) distribuído exclusivamente nas mitocôndrias. (C) Imagem de contraste das células. (D) Sobreposição de todos os sinais fluorescentes e imagem de contraste das células. (Adaptada da ref. 24).....	9
Figura 9. Espectros de ^{13}C RMN (acima) e 1H RMN (abaixo) do complexo EuMAI em D_2O	15
Figura 10. Espectros de 1H RMN do complexo TbMAI em D_2O a (A) 1,5 mg/mL, (B) 3,0 mg/mL, (C) 7,5 mg/mL, (D) 15,0 mg/mL.	16
Figura 11. Diagrama de energia e diferença populacional dos estados para os spins de 1H e ^{13}C de 4N spins, cuja proximidade é suficiente para possibilitar um acoplamento dipolar. a) Equilíbrio Térmico. b) Após a saturação dos spins do 1H . c) Após a relaxação-cruzada via W_2 . (Adaptada da ref. 28).....	18
Figura 12. ESI(+)-MS/MS dos sinais relativos ao Eu^{3+} complexado a três ligantes MAI e dois ânions cloreto como contra-íons (m/z 643 e padrão isotópico).....	20
Figura 13. ESI(+)-MS/MS dos sinais relativos ao Eu^{3+} complexado a dois ligantes MAI associados a dois ânions cloreto como contra-íons (m/z 503 e padrão isotópico).....	21

Figura 14. ESI(+)-MS/MS dos sinais relativos ao Tb ³⁺ complexado a três ligantes MAI, associados a dois ânions cloreto como contra-íons, e a três moléculas de H ₂ O (<i>m/z</i> 703 – seleção monoisotópica).	21
Figura 15. ESI(+)-MS/MS dos sinais relativos ao Tb ³⁺ complexado a dois ligantes MAI, associados a dois ânions cloreto como contra-íons, e a três moléculas de H ₂ O (<i>m/z</i> 563 – seleção monoisotópica).	21
Figura 16. Diagrama dos componentes do ESI. Aqui é interessante observar que a região A, onde ocorre a formação do aerossol está submetida à pressão atmosférica. (Adaptada da ref. 31)	23
Figura 17. Possíveis isômeros de massa das espécies observadas de EuMAI e TbMAI.	24
Figura 18. Espectros de FTIR-ATR do EuMAI (a) e TbMAI (b).	26
Figura 19. Modos vibracionais de estiramento simétrico e assimétrico do ácido carboxílico do MAI.Cl, representados vetorialmente.	27
Figura 20. Espectros de emissão do EuMAI (a) e do TbMAI (b).	29
Figura 21. Geometria otimizada do complexo EuMAI e a sua dissociação em solução aquosa calculada via Sparkle/PM3. Espécie coordenada a três (a) e a dois (b) ligantes MAI.	31
Figura 22. Espectros de excitação do EuMAI (a) e do TbMAI (b).	32
Figura 23. Mecanismos de transferência de energia no processo de sensibilização. (Adaptada da ref. 45)	33
Figura 24. Curva de decaimento de tempo de vida do EuMAI (a) e do TbMAI (b) adquiridos em temperatura ambiente, através das excitações em 395 nm e 367 nm, respectivamente, durante o monitoramento das transições ⁵ D ₀ → ⁷ F ₂ do Eu ³⁺ e ⁵ D ₄ → ⁷ F ₅ do Tb ³⁺ . As linhas vermelhas sólidas correspondem ao melhor ajuste, R > 0,99.	36
Figura 25. Células MDA-MB-231. (a) Mostra o núcleo das células marcadas com DAPI (marcador comercial; azul) apenas. (b) Mostra o padrão de luminescência do EuMAI com pequenas associações à região perinuclear e uma coloração homogênea na região citoplasmática (vermelha). (c) Imagens (a) e (b) sobrepostas. (d) Imagem de contraste de fase das células MDA-MB-231 com seus aspectos morfológicos normais. <i>É importante ressaltar que a coloração vermelha foi artificialmente intensificada para facilitar a visualização da imagem, não representado, assim, a coloração real da amostra.</i>	37
Figura 26. Células MDA-MB-231. (a) Mostra o núcleo das células marcadas com DAPI (marcador comercial; azul) apenas. (b) Mostra o padrão de luminescência do TbMAI altamente associada à região perinuclear e uma pequena coloração homogênea na região citoplasmática (verde). (c) Imagens (a) e (b) sobrepostas. (d) Imagem de contraste de fase das células MDA-MB-231 com seus aspectos morfológicos normais. Não houve nenhuma alteração nas imagens das células MDA-MB-231 marcadas com o complexo TbMAI, de maneira que estas mostram seu brilho real.	39

Lista de Esquemas

Esquema 1. Síntese dos complexos de Eu^{3+} e Tb^{3+} , solúveis em água.....	12
Esquema 2. Equilíbrio das espécies dos complexos EuMAI e TbMAI formadas em solução aquosa.	20
Esquema 3. Estruturas detectadas e caracterizadas por ESI(+)-MS/MS no equilíbrio proposto. As moléculas de água foram omitidas da esfera de coordenação para maior clareza.	22

Lista de Tabelas

Tabela 1. Configurações eletrônicas dos lantanídeos em suas espécies neutras. (Adaptada da ref. 13).....	4
Tabela 2. Propriedades eletrônicas dos íons Ln^{3+} livres. (Adaptada da ref. 12).7	7
Tabela 3. Deslocamentos químicos dos átomos de carbono do complexo EuMAI.....	17
Tabela 4. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio do complexo EuMAI.....	17
Tabela 5. Valores dos estiramentos simétricos e assimétricos da ligação CO e valores de $\Delta_{\text{ASS-SIM}}$ para os complexos EuMAI e TbMAI e para o ligante MAI.Cl.	27
Tabela 6. Valores calculados para o EuMAI via Sparkle/PM3 da transferência de energia e retro-transferência de energia intramolecular.	34
Tabela 7. Valores teóricos e experimentais dos parâmetros de intensidade Ω_2 , Ω_4 e Ω_6 , tempo de vida (t), taxas de decaimento radiativo (A_{rad}) e não-radiativo (A_{nrad}), eficiência quântica (η) e rendimento quântico (q) do complexo EuMAI.	35

1. Introdução

1.1 Líquidos iônicos, suas interações e líquidos iônicos de função específica

Desde a observação feita por Paul Walden em 1914 acerca das propriedades do sal $[\text{Et}_3\text{NH}_3][\text{NO}_3]$, considerado hoje como o primeiro relato de um líquido iônico (LI), jamais se imaginou a riqueza do campo de aplicações e inovações à que esta classe particular de compostos viabilizaria.¹ Aplicações estas que abrangem catálise, eletroquímica, nanotecnologia, combustíveis entre outras.²

O termo LI atualmente está restrito a sais com cátions orgânicos que fundem a uma temperatura arbitrária de até 100 °C.¹ LIs imidazólios são uma classe especial de LIs cujo cátion é um derivado do núcleo imidazol (Figura 1).

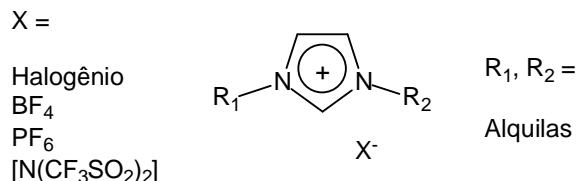


Figura 1. Estruturas de alguns Líquidos iônicos imidazólios.

As propriedades físico-químicas peculiares dos LIs imidazólios tais como pressão de vapor negligenciável, estabilidade química e térmica, viscosidade, o próprio fato de serem líquidos em uma ampla faixa de temperaturas, bem como o fato de muitos possuírem baixos pontos de fusão (algumas vezes negativos), estão intimamente ligadas à natureza de suas interações cátion-ânion. Isso significa que estas propriedades podem ser modificadas variando-se tanto o cátion como o ânion.³ Estima-se que há, aproximadamente, 10^6 combinações possíveis para a formação de LIs.⁴ Contudo, nesta dissertação focar-se-á nos LIs imidazólios apenas, sendo assim, o termo LI fica designado, de agora em diante, exclusivamente àqueles cujo cátion é um derivado do imidazol.

Elucidar as forças que governam as interações entre cátions e ânions nos LIs está longe de ser trivial e é tema de investigações que se apoiam em

diferentes técnicas espectroscópicas e teóricas como RMN, espectrometria de massas, IR, DRX, mecânica e dinâmica molecular, DFT e outras.⁵

Dupont define os LIs como estruturas supramoleculares com ligações de hidrogênio significativas, quando puros. Quando misturados a outras moléculas, são mais bem descritos como estruturas nanoorganizadas com regiões polares e não polares,^{6,7} teoria posteriormente corroborada por cálculos teóricos efetuados por Padua e colaboradores.⁸ As ligações de hidrogênio podem se dar através de diferentes ligações CH-ânion no LI, sendo estes os hidrogênios 2, 4 e 5 (Figura 2), bem como os hidrogênios das cadeias alquílicas. Mas não são apenas ligações de H as responsáveis pela organização espacial dos LIs. Outras interações não covalentes como forças de Coulomb e de van der Waals, π -stacking, C-H- π também se revelaram importantes.

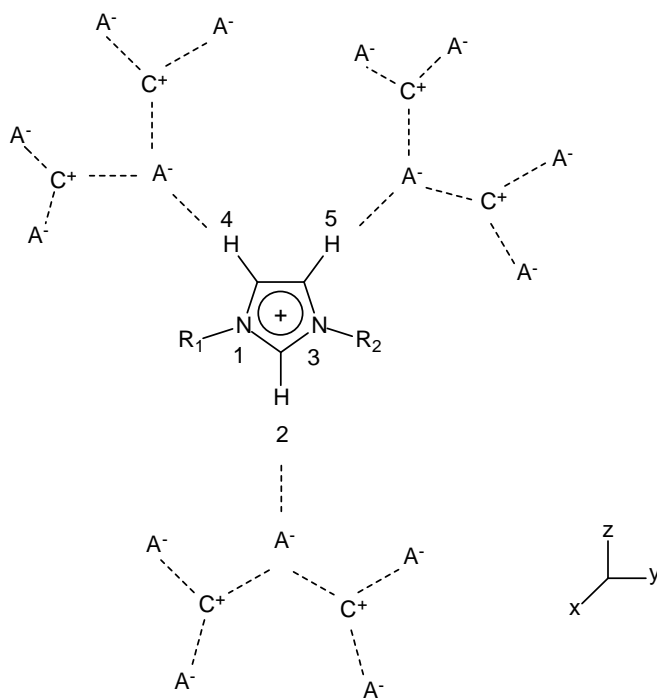


Figura 2. Estrutura simplificada mostrando as ligações de H em um LI, no qual cada ânion interage com três cátions e cada cátion com três ânions. Os cátions também podem interagir, por exemplo, por π -stacking na direção x. (Adaptada da ref. 7)

Em contrapartida, Zhao e colaboradores afirmam que apesar de presentes, as ligações de H não são as principais responsáveis por definir as

estruturas de alguns LIs, sendo as forças de Coulomb essenciais na sua organização.⁹ De fato, é preciso compreender que, apesar de englobarem uma grande quantidade de compostos, os LIs diferem em sua arquitetura e, conseqüentemente, em suas propriedades pela diferença de suas composições catiônicas e aniônicas, de forma que as forças que governam suas interações variam com estes mesmos cátions e ânions.

Quando grupos funcionais são ligados covalentemente ao cátion, ao ânion ou a ambos no LI, tem-se uma classe mais restrita denominada *task-specific ionic liquids* (TSILs), traduzida em português como líquidos iônicos de função específica. Eles são assim chamados porque ganham a possibilidade de atuar não apenas como meio reacional, mas passam a desempenhar literalmente uma tarefa específica, como por exemplo, de catalisadores.¹⁰ A Figura 3 ilustra alguns exemplos de TSILs.

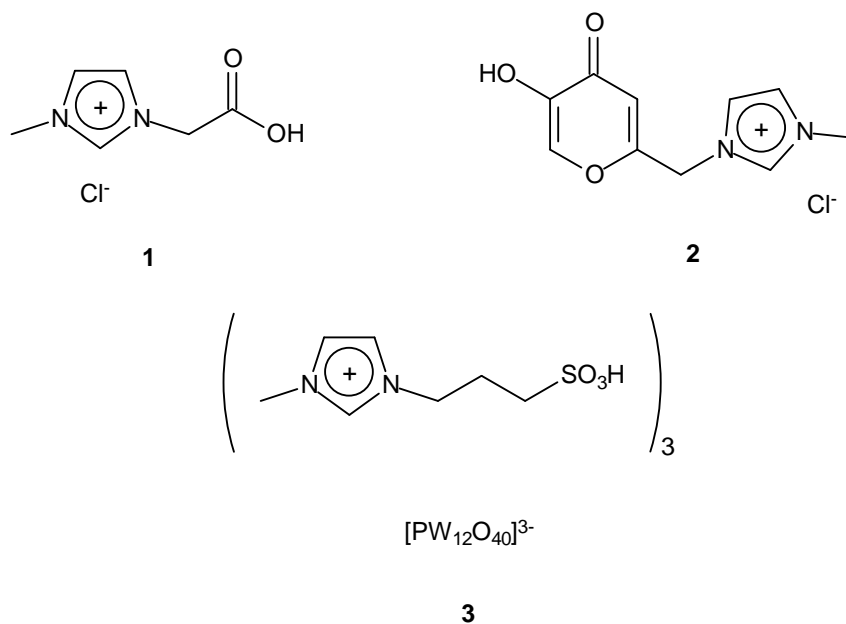


Figura 3. Exemplos de TSILs. As estruturas **1** e **2** foram usadas como ligantes para síntese de complexos ionicamente marcados que atuaram como catalisadores em reações de Suzuki e epoxidação respectivamente (ref. 2b e 2c). A estrutura **3** foi usada como catalisador em reações de Biginelli (ref. 2e).

A incorporação de TSILs, como ligantes diretamente coordenados a centros metálicos em complexos de lantanídeos para posteriores estudos fotoquímicos e aplicações destes novos materiais luminescentes é uma área

ainda pouco estudada, mas que promete grandes avanços, em especial visando aplicações como marcadores celulares fluorescentes.¹¹

1.2 Lantanídeos

Lantanídeos, definidos neste texto como Ln, formam um grupo de quinze elementos na tabela periódica que vão do lantânio ao lutécio e possuem propriedades únicas devido às suas configurações eletrônicas. A configuração eletrônica no estado fundamental de íons Ln^{3+} é $[\text{Xe}] 4f^n 5d^0 6s^2$ ou $[\text{Xe}] 4f^{n-1} 5d^1 6s^2$, ($0 \leq n \leq 14$).¹² A Tabela 1 mostra as configurações eletrônicas dos lantanídeos em suas espécies neutras.

Tabela 1. Configurações eletrônicas dos lantanídeos em suas espécies neutras. (Adaptada da ref. 13)

Lantanídeo	Número atômico	Configuração eletrônica
La	57	$[\text{Xe}] 4f^0 5d^1 6s^2$
Ce	58	$[\text{Xe}] 4f^1 5d^1 6s^2$
Pr	59	$[\text{Xe}] 4f^3 5d^0 6s^2$
Nd	60	$[\text{Xe}] 4f^4 5d^0 6s^2$
Pm	61	$[\text{Xe}] 4f^5 5d^0 6s^2$
Sm	62	$[\text{Xe}] 4f^6 5d^0 6s^2$
Eu	63	$[\text{Xe}] 4f^7 5d^0 6s^2$
Gd	64	$[\text{Xe}] 4f^7 5d^1 6s^2$
Tb	65	$[\text{Xe}] 4f^9 5d^0 6s^2$
Dy	66	$[\text{Xe}] 4f^{10} 5d^0 6s^2$
Ho	67	$[\text{Xe}] 4f^{11} 5d^0 6s^2$
Er	68	$[\text{Xe}] 4f^{12} 5d^0 6s^2$
Tm	69	$[\text{Xe}] 4f^{13} 5d^0 6s^2$
Yb	70	$[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^0 6s^2$
Lu	71	$[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^1 6s^2$

Importantes propriedades espectroscópicas são observadas nestes elementos devido ao progressivo preenchimento eletrônico do subnível $4f$ e ao efeito de blindagem destes elétrons, causado pelos subníveis eletrônicos menos energéticos isoeletrônicos ao xenônio, principalmente dos subníveis totalmente preenchidos $5s$ e $5p$ (Figura 4).¹⁴

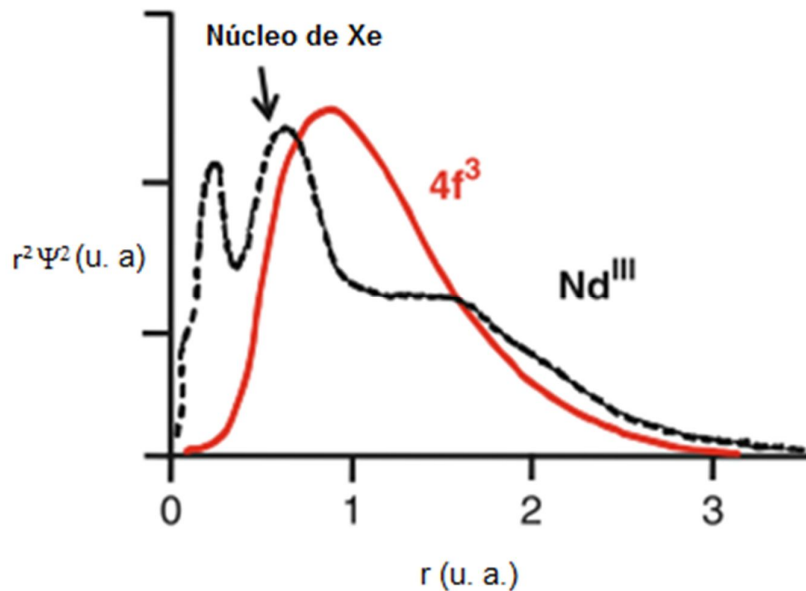


Figura 4. Função de onda radial dos elétrons $4f^3$ do Nd^{3+} (linha vermelha) comparada à função radial dos elétrons do núcleo de Xe (linha pontilhada preta) (Adaptada da ref.12)

O estudo espectroscópico dos compostos de lantanídeos busca compreender os fenômenos resultantes da interação destes materiais com a luz.¹⁵ Para compreender as transições que ocorrem nestes materiais, provenientes das excitações e emissões em diferentes comprimentos de onda, é preciso considerar que elas estão intimamente ligadas ao caráter quantizado dos movimentos do orbital e de spin caracterizados, respectivamente, pelos momentos angulares \vec{l} e \vec{s} . Como as transições são explicadas a partir de diferentes termos espectroscópicos, algumas definições são importantes.

Define-se, termodinamicamente, microestado como uma dada distribuição cujo sistema constituído por N elétrons ocupa com certa probabilidade. Como nos referimos ao subnível $4f$, cada um dos N elétrons apresentam-se associados ao número quântico $n = 4$, $l = 3$, m_l e m_s . A Figura 5 ilustra um microestado possível para o subnível $4f^6$.¹²

Exemplo: N = 6 elétrons no subnível 4f

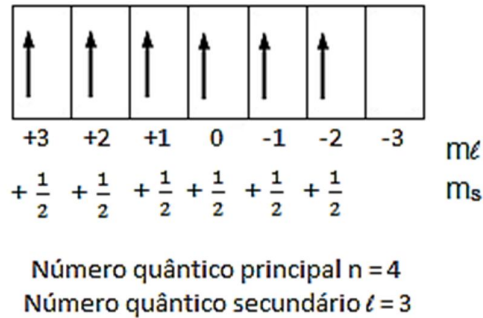


Figura 5. Um possível microestado do subnível 4f. Cada um dos N = 6 elétrons representados por seus respectivos números quânticos m_ℓ e m_s .

Sabendo-se que:

$$\vec{L} = \sum_{i=1}^N \vec{l}_i, \vec{S} = \sum_{i=1}^N \vec{s}_i, M_L = \sum_{i=1}^N (m_\ell)_i, M_S = \sum_{i=1}^N (m_s)_i$$

Cada microestado é caracterizado pelos seus respectivos números quânticos M_L e M_S . Estes microestados são subdivididos, seguindo alguns critérios matemáticos, em conjuntos representados pelo chamado termo espectroscópico (^{2S+1}L) , onde $L = S, P, D, F, \dots$, de acordo com $L = 0, 1, 2, 3, \dots$. O número de microestados que o termo se reagrupa (multiplicidade do termo) é dado por $(2S+1) \cdot (2L+1)$. O subnível 4f preenchido com N elétrons possui diversos termos espectroscópicos sendo que a soma das suas multiplicidades é igual à degenerescência do sistema.¹²

Devido ao acoplamento dos dois movimentos do elétron (movimento gerado pelo spin e movimento do orbital ao redor do núcleo), surge um novo número quântico J associado ao momento angular total dado por $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$. Sendo assim, cada termo espectroscópico (^{2S+1}L) , por sua vez, é dividido em novos termos espectroscópicos $(^{2S+1}L_J)$, cada um com multiplicidade $2J+1$. A Tabela 2 mostra algumas das propriedades eletrônicas dos íons Ln^{3+} livres.¹²

Tabela 2. Propriedades eletrônicas dos íons Ln^{3+} livres. (Adaptada da ref. 12)

f^n	Multiplicidade	Número de termos	Termo do nível fundamental
f^0 f^{14}	1	1	1S_0 1S_0
f^1 f^{13}	14	1	$^2F_{5/2}$ $^2F_{7/2}$
f^2 f^{12}	91	7	3H_4 3H_6
f^3 f^{11}	364	17	$^4I_{9/2}$ $^4I_{15/2}$
f^4 f^{10}	1001	47	5I_4 5I_8
f^5 f^9	2002	73	$^6H_{5/2}$ $^6H_{15/2}$
f^6 f^8	3003	119	7F_0 7F_6
f^7	3432	119	$^8S_{7/2}$

Existem dois tipos de íons Ln^{3+} , os íons de Kramers, cujo número de elétrons f é ímpar, e por isso J é um número fracionário, e existem também aqueles cujo número de elétrons f é par. Para estes últimos, os $2J+1$ estados possuem a mesma energia na ausência de um campo magnético.¹⁶

Em um campo cristalino, os íons Ln^{3+} têm seus estados divididos em diferentes níveis de energia em função da simetria do grupo. A Figura 6 ilustra essa divisão para um íon de Kramers, Ce^{3+} , e para um íon cujo número de elétrons é par, Eu^{3+} , em um campo cristalino octaédrico.¹⁶

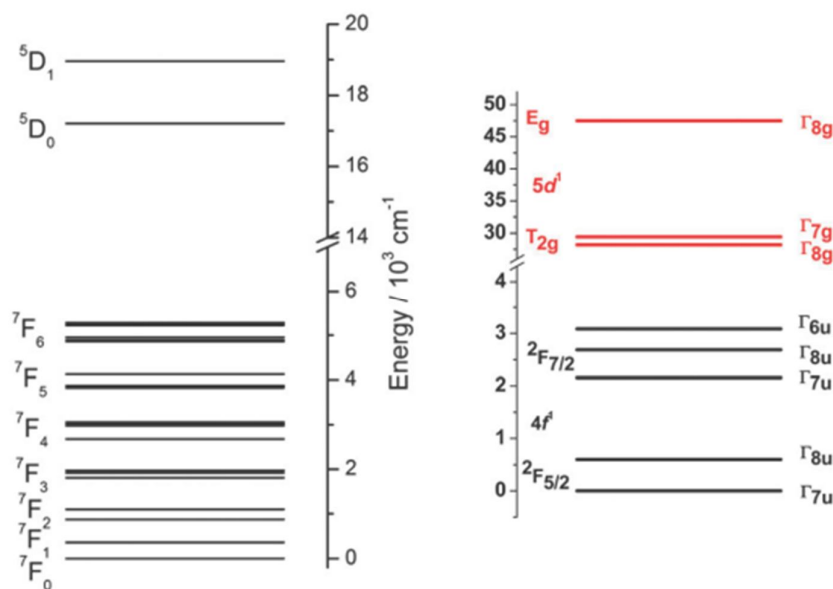


Figura 6. Níveis de energia dos íons Eu^{3+} (à esquerda) e Ce^{3+} (à direita) em um campo octaédrico (Adaptada da ref.16)

É válido ressaltar que é possível que haja uma mistura entre estes diferentes estados, de forma que um determinado estado pode apresentar

porcentagens de outros. Isso torna a representação $(^{2S+1}G_J)$, em alguns casos, insuficiente para representá-los.¹⁶

Em diversos casos a excitação destes estados não é dada de forma direta, mas, através da excitação primária da matriz que pode ou não estar coordenada ao íon Ln^{3+} . A este efeito dá-se o nome de sensitização ou efeito antena, pioneiramente descrito por Weissman.¹⁷

Crosby *et al.*^{18,19} foram os primeiros a propor que a transferência direta de energia dos estados excitados singleto do ligante complexado não ocorre e que o principal caminho de transferência de energia aos íons Ln^{3+} se dá através do estado de mais baixa energia tripleto ou através de um estado excitado próximo a este (aproximadamente 500 cm^{-1}).¹⁹ Posteriormente, inúmeros foram os trabalhos publicados relacionando a energia do estado excitado tripleto ao rendimento quântico de complexos de Ln^{3+} .²⁰ Ainda assim, Kleinerman²¹ discute de forma brilhante a possível participação do estado singleto no processo de sensitização. A Figura 7 ilustra os dois possíveis caminhos pelo qual a transferência de energia pode ocorrer.

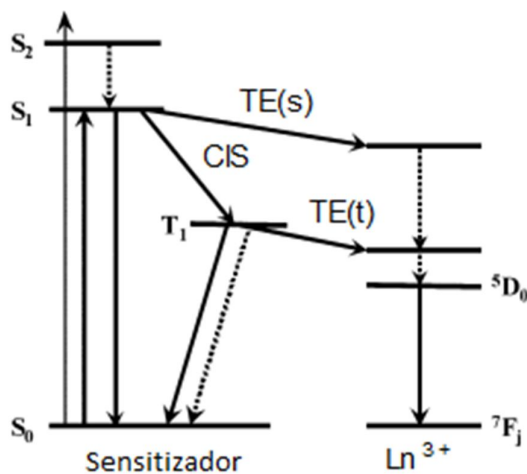


Figura 7. Diagrama de Jablonski ilustrando o efeito antena TE(s) – transferência de energia do estado singleto; TE(t) – transferência de energia do estado tripleto; CIS – cruzamento intersistema. (Adaptada da ref. 22)

1.3 Imageamento Celular

A microscopia confocal, atualmente, tem alta capacidade de Imageamento, já que aumenta a resolução óptica com o uso do chamado *pinhole*. O *pinhole* trata-se de uma abertura localizada à frente do detector (fotomultiplicadora) que evita a passagem da luz fluorescente desfocada.

A Figura 8 ilustra células cancerígenas MCF-7 marcadas com diferentes fluoróforos, ilustrando o resultado deste avanço no Imageamento da célula.

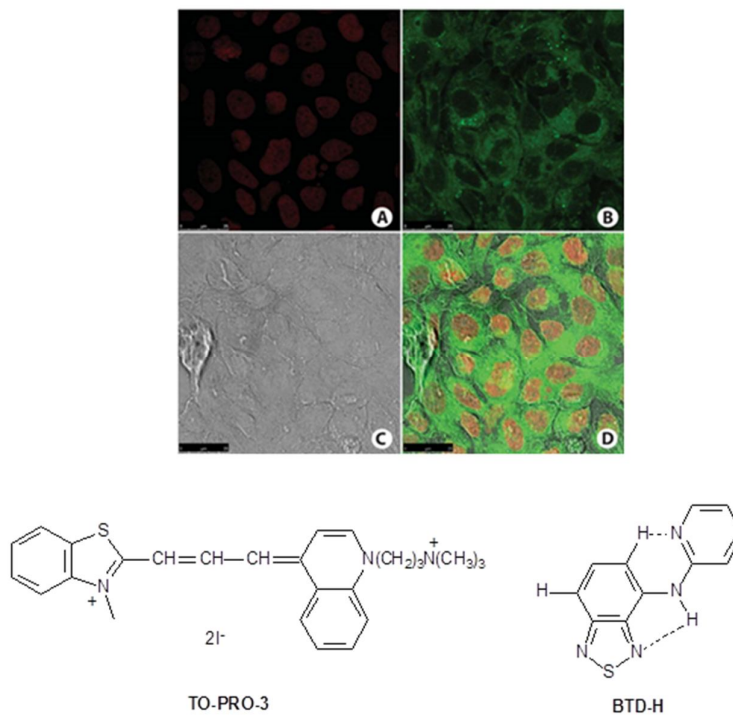


Figura 8. Células cancerígenas MCF-7. (A) Núcleo celular marcado com TO-PRO-3 (vermelho). (B) Sinal de fluorescência celular encubado com **BTD-H** (verde) distribuído exclusivamente nas mitocôndrias. (C) Imagem de contraste das células. (D) Sobreposição de todos os sinais fluorescentes e imagem de contraste das células. (Adaptada da ref. 23)

A microscopia confocal se baseia na microscopia normal, cujo funcionamento é dado através do uso de luz transmitida para observar uma espécie que contenha coloração inerente. A microscopia confocal é usada para observação de células e tecidos e também para criar imagens tridimensionais e observar reações celulares. Dentre as suas vantagens estão: fácil controle

através do computador, produção de imagens digitais, excelente resolução, alta sensibilidade (capaz de coletar a fluorescência de uma única molécula).²⁴

Uma propriedade visada para que sejam produzidas imagens de qualidade é a solubilidade dos marcadores em água,²⁵ o que acaba sendo uma limitação para o uso de lantanídeos como marcadores, visto que a síntese de matrizes solúveis em água para complexos de lantanídeo é, na maioria dos casos, de alta complexidade. Ainda assim, biossondas luminescentes formadas a partir de lantanídeos geralmente possuem permeabilidade na membrana celular, o que é extremamente desejável durante os experimentos.²⁶ Outras duas características que os tornam altamente versáteis são suas linhas de emissões estreitas e seus longos tempos de vida.²⁷

2. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivos:

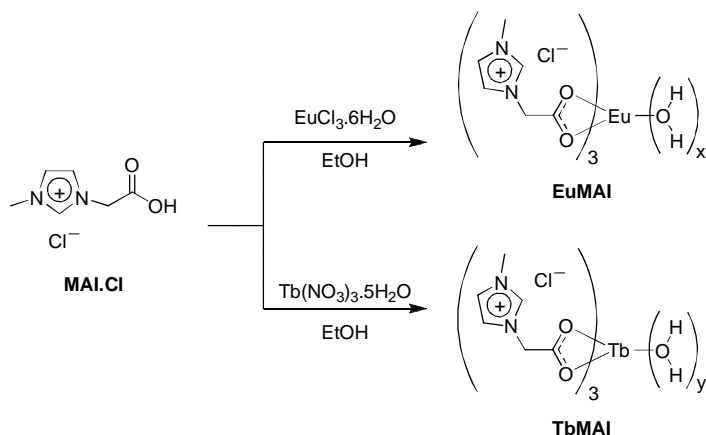
- A síntese de dois complexos, de Tb^{3+} e de Eu^{3+} , tendo como ligante o TSIL (cloreto de 1-metil-3-carboximetilimidazólio, **MAI.Cl**), com a finalidade de obter complexos com as propriedades luminescentes únicas dos complexos de lantanídeo e adicionar a elas a solubilidade em água através do ligante ionicamente marcado com um ânion hidrofílico.

- Caracterizar os complexos obtidos através de diferentes técnicas espectroscópicas (RMN, ESI-MS, FTIR-ATR) e através de estudos fotofísicos.

- Realizar testes de imageamento celular para testar os complexos obtidos como biossondas para marcação celular.

3. Parte Experimental

Foram sintetizados, a partir do ligante **MAI.Cl** (sintetizado no laboratório via procedimento descrito na ref. 2b), dois novos complexos de Tb^{3+} e Eu^{3+} , solúveis em água, como mostra o Esquema 1.



Esquema 1. Síntese dos complexos de Eu^{3+} e Tb^{3+} , solúveis em água.

Os complexos foram obtidos diluindo-se em 50 mL de etanol 0,33 mmol de $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ ou de $TbNO_3 \cdot 5H_2O$ e 1 mmol do TSIL **MAI.Cl**. Uma solução de KOH diluída em etanol foi utilizada para ajustar o pH a, no máximo, 6. A complexação dura aproximadamente 30 minutos, sob agitação, a 30 °C. É importante ressaltar que o pH deve ser ajustado lentamente. Em torno do pH 3, o produto, sob a forma de um precipitado branco, já começa a surgir, de maneira que se adicionada base em excesso os grupos OH^- complexam-se ao íon Ln^{3+} precipitando hidróxido de lantanídeo junto ao produto de interesse. O produto é então filtrado e lavado com etanol. Alternativamente, o produto, em vez de filtrado, é diretamente seco com um auxílio de um rota-evaporador. Posteriormente, é deixado sob pressão reduzida a aproximadamente 70° C. O rendimento de ambas as sínteses é quantitativo.

O material foi caracterizado por espectroscopia de RMN, massas (ESI-MS(/MS)), IV e fluorescência. Também foram conduzidos experimentos de imageamento celular.

TbMAI (1,5 mg/mL) – 1H RMN (D_2O – 300 MHz) δ em ppm: 12,44, 13,89, 14,96, 16,51, 20,10. O espectro de ^{13}C RMN não pode ser adquirido devido às propriedades paramagnéticas deste complexo.

EuMAI – ^1H RMN (D_2O – 300 MHz) δ em ppm: 7,30, 3,70. ^{13}C RMN (D_2O – 75 MHz) δ em ppm: 175,30, 126,00, 126,20, 54,70, 38,50.

3.1 Análises de ESI-MS

Foram realizadas em modo positivo (m/z 50 – 2000) em um instrumento HRMS, Q-TOF (Maxis 4G, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As amostras foram diluídas em H_2O e foram diretamente injetadas na fonte com uma vazão de 5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ após serem solubilizadas por 30 minutos com auxílio de um vortex. As condições da fonte foram ajustadas da seguinte forma: capilar 4.5 kV, *end plate offset* 500 V, gás nebulizador 0,3 bar, gás secante 4.0 L/min, temperatura 180 °C.

3.2 Dados Fotofísicos

Os espectros de fotoluminescência e as curvas de decaimento de tempo de vida foram coletadas em um espectrofluorímetro FLUOROLOG3 ISA/Jobin-Yvon equipado com uma fotomultiplicadora Hamamatsu R928P, um fosforímetro SPEX 1934 D, uma lâmpada de Xe de 450 W e uma lâmpada de Xe-Hg de 150 W. Todos os espectros foram corrigidos para a resposta espectral dos monocromadores, e o detector via correção espectral fornecida pelo fabricante. Os valores de rendimento quântico absoluto foram adquiridos em um espectrômetro Fluorolog 3, com uma esfera de integração Quanta-Phi (Jobin Yvon) adicional. As soluções aquosas foram preparadas com a diluição de 0,05 mmol dos complexos.

2.3 FTIR-ATR

Os espectros de IV foram obtidos em um instrumento Equinox 55 Fourier Transform da Bruker. Os espectros de FTIR-ATR foram coletados utilizando-se uma cela de ATR, de 7 cm de comprimento (10 reflexões), da Pike Technologies, cobrindo a região de $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, utilizando-se um detector

DTGS. Cada espectro de FTIR-ATR é a média de 32 scans, utilizando-se ar como referência, com resolução nominal espectral em 4 cm^{-1} . Todos os espectros foram coletados a $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura do equipamento).

2.4 Análises de RMN

Todas as análises de RMN foram feitas em um espectrômetro Varian Mercury Plus (7,05 T) operando em 300 MHz para ^1H e em 75,46 MHz para ^{13}C . As amostras de RMN foram preparadas dissolvendo-se os complexos de lantanídeo em água deuterada (D_2O). Um capilar selado contendo $\text{D}_2\text{O}/\text{TMSP-d}_4$ foi utilizado como referência externa para ajustar a escala.

4. Resultados e Discussão

Depois de sintetizados, os complexos **EuMAI** e **TbMAI** foram, primeiramente, analisados por RMN (Figura 9 e Figura 10).

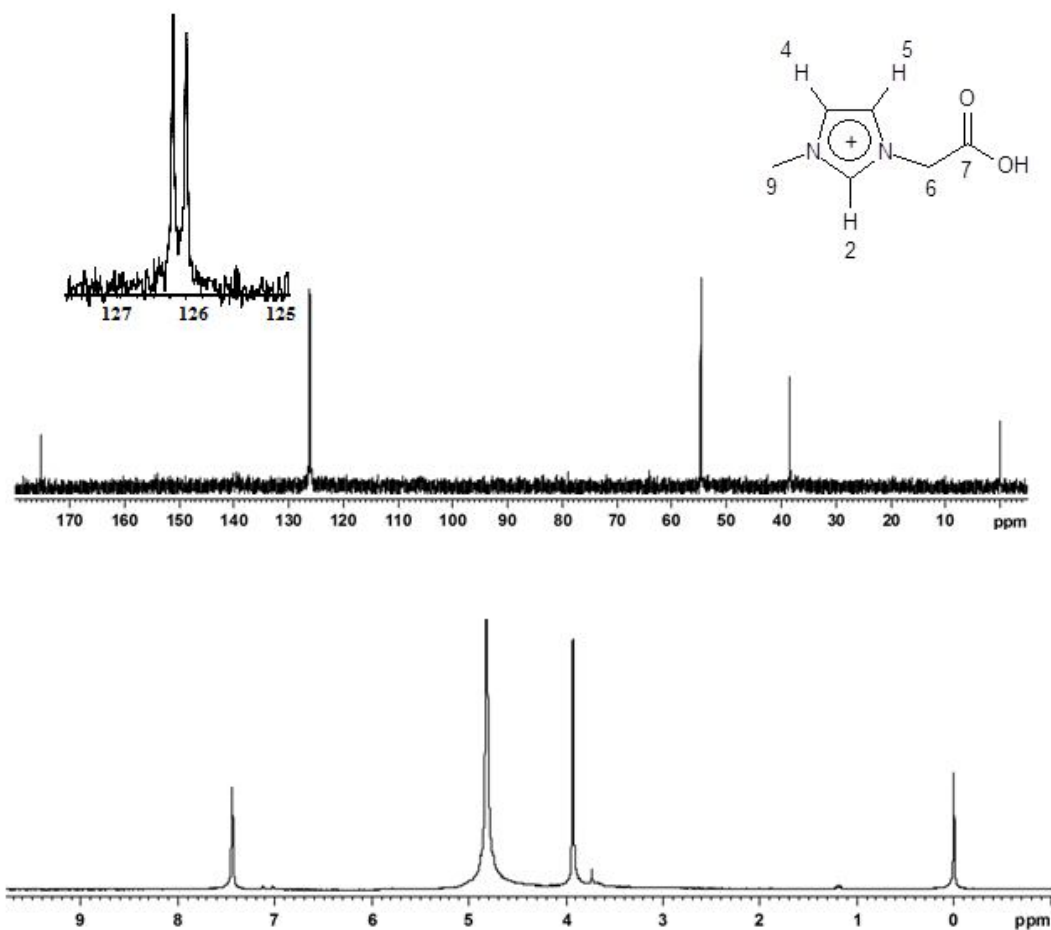


Figura 9. Espectros de ^{13}C RMN (acima) e 1H RMN (abaixo) do complexo **EuMAI** em D_2O .

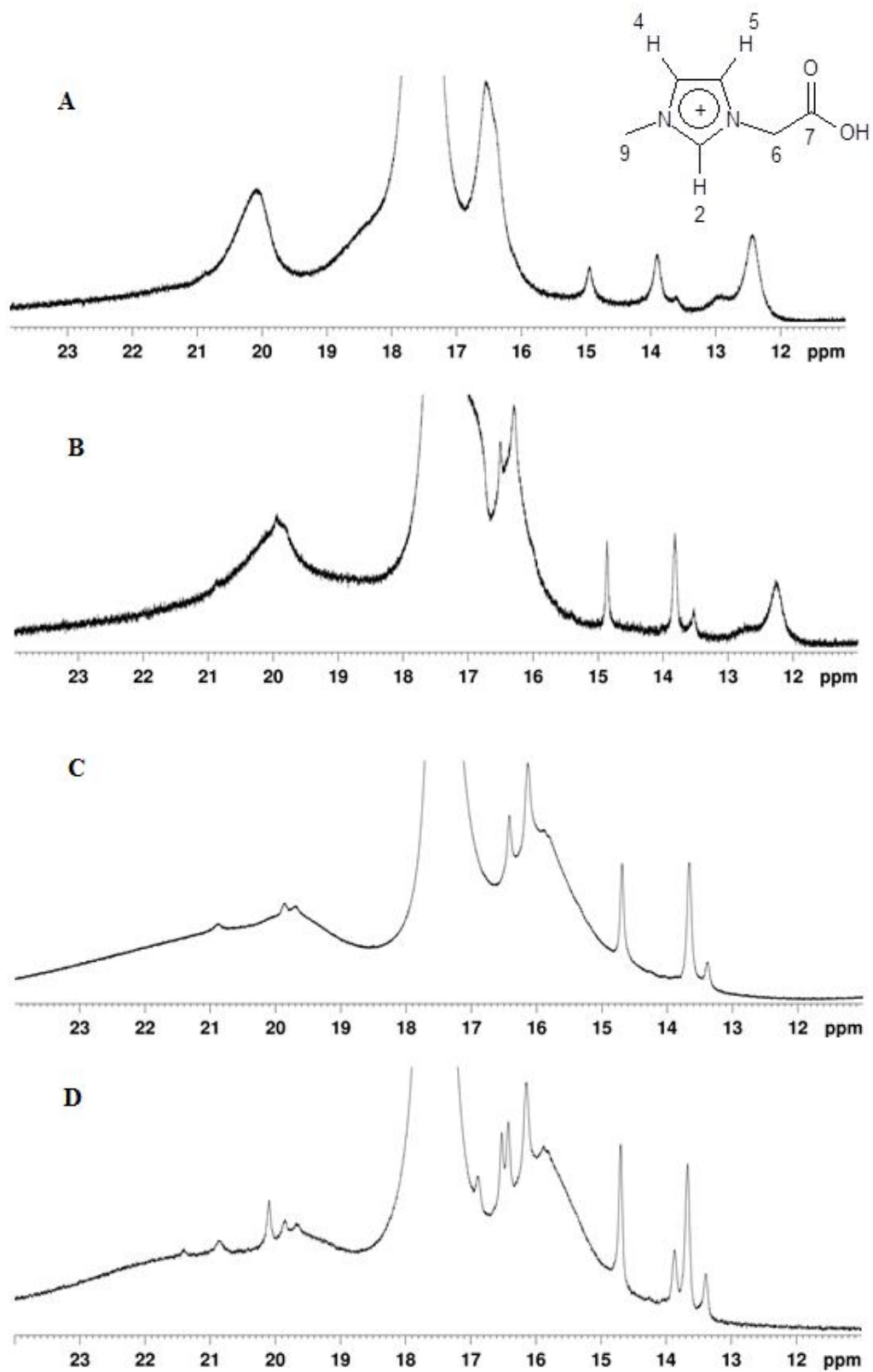


Figura 10. Espectros de ^1H RMN do complexo **TbMAI** em D_2O a (A) 1,5 mg/mL, (B) 3,0 mg/mL, (C) 7,5 mg/mL, (D) 15,0 mg/mL.

As Tabela 3 e a Tabela 4 mostram os deslocamentos químicos dos carbonos e dos hidrogênios, respectivamente, do complexo **EuMAI**.

Tabela 3. Deslocamentos químicos dos átomos de carbono do complexo **EuMAI**.

Carbono	Deslocamento químico (ppm)
TMSP	0
2	-
4	126,0
5	126,2
6	54,7
7	175,3
9	38,5

Tabela 4. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio do complexo **EuMAI**.

Hidrogênio	Deslocamento químico (ppm)
TMSP	0
2	-
4	7,3
5	7,3
6	-
9	3,7
Solvente (D ₂ O)	4,6

O espectro de ¹³C do complexo **EuMAI** revelou cinco sinais típicos do ligante. Contudo, o sinal referente ao C2 não aparece, o que pode ser explicado devido à troca de ¹H por ²H (deutério – D), uma vez que este é um hidrogênio relativamente ácido.

O não aparecimento dos sinais de ¹³C cujo hidrogênio é trocado por deutério é esperado por dois motivos principais: perda de sinal pela ineficiência do NOE e diminuição da intensidade do sinal pela formação de um multipletto.

Uma das maiores contribuições para a intensidade dos sinais nos espectros de ¹³C é proveniente do *Nuclear Overhauser Effect* (NOE) que, por sua vez, depende do mecanismo de relaxação longitudinal dipolar. O NOE pode ser definido como uma variação na intensidade de um sinal devido à perturbação da situação de equilíbrio pelas transições de spin de outra ressonância, sendo que as espécies responsáveis por ambos os sinais encontram-se próximas o suficiente para compartilhar um acoplamento dipolar.²⁸ Em outras palavras, a saturação de um sinal, equalizando-se as populações de spin em suas correspondentes transições, pela aplicação de fracos pulsos do oscilador de radiofrequências (B₁), força o sistema a se

reorganizar para atingir novamente uma situação de equilíbrio. Esta reorganização dos spins do sistema é dada por um processo de relaxação-cruzada e a sua consequência é o NOE (Figura 11).²⁸

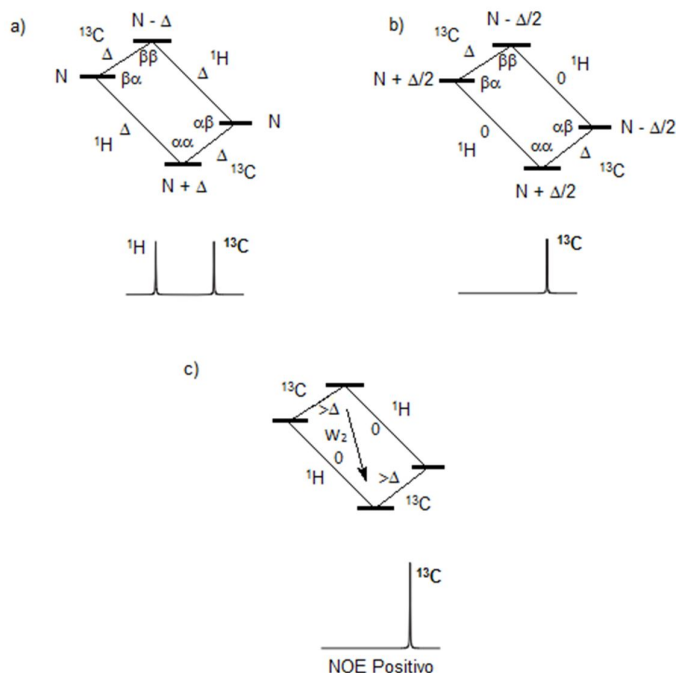


Figura 11. Diagrama de energia e diferença populacional dos estados para os spins de ^1H e ^{13}C de $4N$ spins, cuja proximidade é suficiente para possibilitar um acoplamento dipolar. a) Equilíbrio Térmico. b) Após a saturação dos spins do ^1H . c) Após a relaxação-cruzada via W_2 . (Adaptada da ref. 28)

O processo W_2 envolve um mecanismo de relaxação dipolar, sem o qual o NOE não ocorre. É interessante destacar que a relaxação é um processo não espontâneo e depende do movimento caótico das moléculas em solução.²⁸

A troca de hidrogênio por deutério torna o processo de relaxação dipolar ineficiente, já que este depende de γ^2 ($\gamma_{\text{H}} = 267,53 \times 10^6 \text{ rad/T.s}$ e $\gamma_{\text{D}} = 41,1 \times 10^6 \text{ rad/T.s}$), gerando perda do sinal.²⁹ Além disso, o acoplamento do deutério com o carbono resulta na diminuição da intensidade do sinal pela própria formação de um multipletto.

O espectro de ^1H confirma esta troca, já que o sinal referente ao H2 também não foi observado. De fato, no espectro de ^1H observam-se apenas os hidrogênios H4 e H5, em 7,3 ppm e o H9 em 3,7 ppm. O H6 foi sobreposto pelo sinal do solvente em 4,6 ppm.

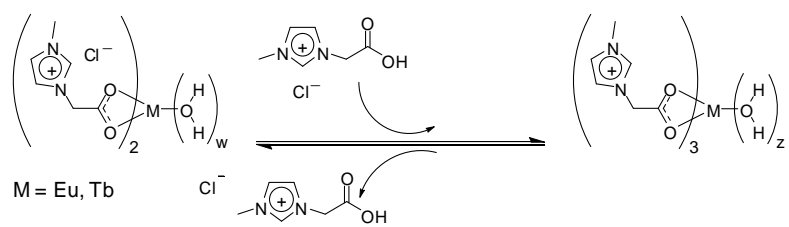
As propriedades paramagnéticas do complexo **TbMAI** possivelmente fazem com que os núcleos relaxem muito rápido, tornando inviável a aquisição do espectro de ^{13}C . No caso do complexo **EuMAI**, os efeitos paramagnéticos na relaxação nuclear não foram tão pronunciáveis já que estes variam com os tempos de relaxação eletrônicos.³⁰ Ainda assim, foi possível monitorar a ressonância dos núcleos de ^1H para o complexo **TbMAI**, o que revelou observações inesperadas.

Foram obtidos quatro espectros em quatro diferentes concentrações do complexo em água deuterada (Figura 10). O primeiro espectro, obtido a uma concentração de 1,5 mg/mL, mostra cinco sinais característicos do ligante **MAI**. Contudo, à medida que a concentração foi aumentada, o número de sinais também aumentou revelando a formação de mais de uma espécie presente em equilíbrio em solução. Ao atingir uma concentração de 15 mg/mL, observaram-se quatorze sinais distintos com intensidades que variam relativamente às concentrações das espécies em solução.

É também visível o deslocamento para valores maiores de deslocamento químico (*Lanthanide Induced Shift* – LIS), bem como o alargamento dos sinais do espectro, característicos do ambiente paramagnético do metal. A magnitude deste deslocamento é dependente essencialmente de duas contribuições: contribuição de contato (através da ligação – Interação de Fermi) e pseudo-contato (interações dipolares). As interações de contato dependem da covalência da ligação metal-ligante. O termo de pseudo-contato, responsável pela contribuição dipolar ao deslocamento químico, varia com $1/r^3$, onde r é a distância entre os dois dipolos.

De maneira geral, as contribuições de contato ao deslocamento dos sinais afetam apenas os núcleos topologicamente próximos ao centro metálico, de forma que a partir de três ligações elas começam a se tornar negligenciáveis.

A presença de mais de uma espécie em equilíbrio em solução foi confirmada com análises de espectrometria de massas de alta resolução (ESI-MS/MS), como mostra o Esquema 2.



Esquema 2. Equilíbrio das espécies dos complexos **EuMAI** e **TbMAI** formadas em solução aquosa.

A espectroscopia de RMN pode viabilizar a quantificação dos ligantes presentes em cada espécie, se respeitados alguns critérios como, por exemplo, o tempo de $5T_1$ do núcleo com maior tempo de relaxação para a recuperação de 99,33% da magnetização em z .²⁸ Contudo, dada a complexidade dos espectros de compostos paramagnéticos, principalmente devido ao alargamento dos sinais, a obtenção deste tipo de informação torna-se problemática. Neste caso, a espectrometria de massas de alta resolução permite quantificar o número de ligantes complexados ao metal através da obtenção de massas de alta resolução, dos padrões isotópicos e da análise das fragmentações por MS/MS. As Figura 12-Figura 15 mostram os espectros de MS/MS referentes às espécies encontradas em solução e o Esquema 3 mostra as massas calculadas e obtidas destas.

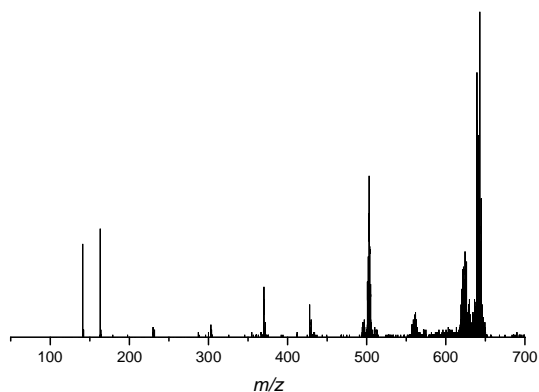


Figura 12. ESI(+)-MS/MS dos sinais relativos ao Eu^{3+} complexado a três ligantes **MAI** e dois ânions cloreto como contra-íons (m/z 643 e padrão isotópico).

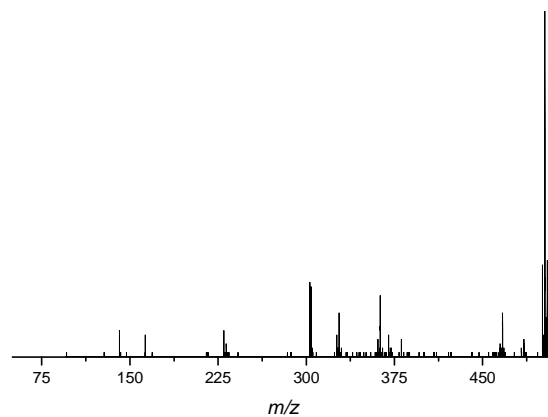


Figura 13. ESI(+)-MS/MS dos sinais relativos ao Eu^{3+} complexado a dois ligantes **MAI** associados a dois ânions cloreto como contra-íons (m/z 503 e padrão isotópico).

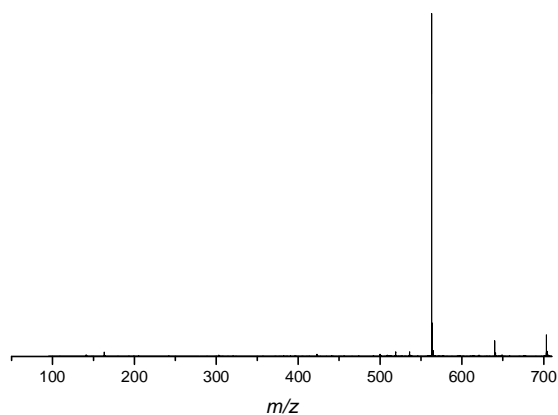


Figura 14. ESI(+)-MS/MS dos sinais relativos ao Tb^{3+} complexado a três ligantes **MAI**, associados a dois ânions cloreto como contra-íons, e a três moléculas de H_2O (m/z 703 – seleção monoisotópica).

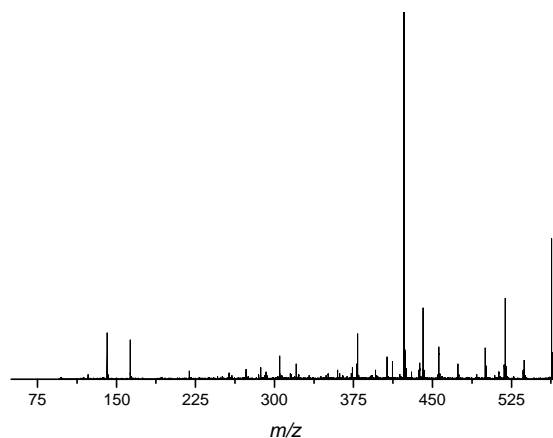
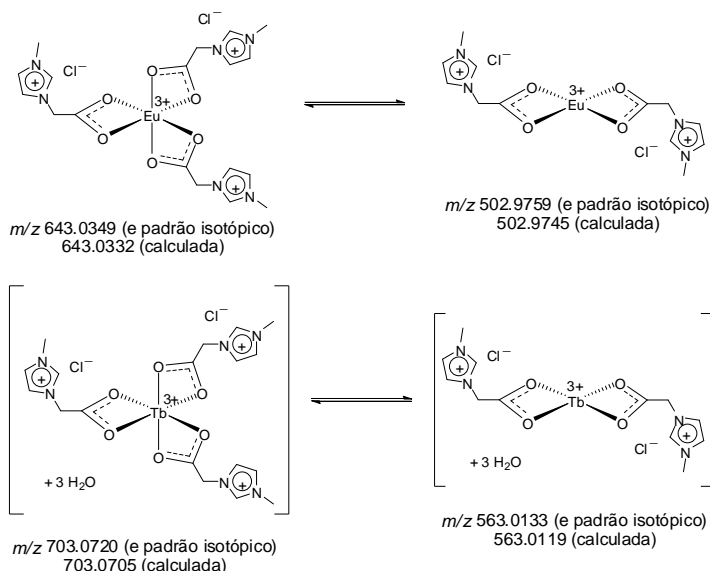


Figura 15. ESI(+)-MS/MS dos sinais relativos ao Tb^{3+} complexado a dois ligantes **MAI**, associados a dois ânions cloreto como contra-íons, e a três moléculas de H_2O (m/z 563 – seleção monoisotópica).



Esquema 3. Estruturas detectadas e caracterizadas por ESI(+)-MS/MS no equilíbrio proposto. As moléculas de água foram omitidas da esfera de coordenação para maior clareza.

A partir destes resultados, foi possível observar a formação de duas espécies distintas dos complexos **EuMAI** e **TbMAI**, uma complexada com dois ligantes **MAI** e outra com três.

É interessante observar que em todos os espectros MS/MS foi possível detectar a presença de um sinal em m/z 141, característico do ligante **MAI**, incluindo o espectro de MS o que se revela como sendo mais um indício do equilíbrio presente em solução.

Diferentemente de outras espectrometrias de massas, o grande diferencial da técnica utilizada, está justamente no mecanismo da fonte de ionização, que garante confiança quanto à formação das espécies em solução. A ionização por electrospray (ESI) inicia-se com um potencial aplicado a um capilar metálico pelo qual a solução altamente diluída atravessa. O campo elétrico gerado na ponta do capilar polariza as moléculas do solvente e do analito, de forma que estas se orientam sob a influência do campo. Isso gera um acúmulo de carga na superfície do líquido. Ainda sob a influência do potencial aplicado, a gota formada na ponta do capilar adquire um formato de cone (cone de Taylor) que se desintegra para formar gotículas com alta densidade de carga superficial. Posteriormente, um jato de N_2 aquecido a $180^\circ C$ é usado para secar o solvente. A própria repulsão eletrostática entre cargas

de mesmo sinal faz com que estas se separem (explosão de Coulomb) (Figura 16).³¹

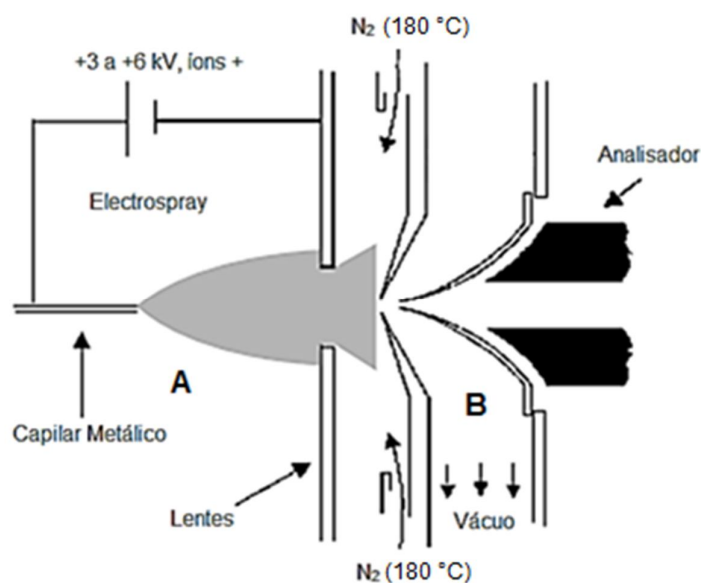


Figura 16. Diagrama dos componentes do ESI. Aqui é interessante observar que a região A, onde ocorre a formação do aerossol está submetida à pressão atmosférica. (Adaptada da ref. 31)

Aqui é essencial observar que, diferentemente do que ocorre em outras fontes, a transferência dos íons para a fase gasosa não é um processo drástico.³² Outro diferencial do ESI é o fato de que a formação do aerossol, a qual conduz à conseqüente formação dos íons, ocorre sob pressão atmosférica. Sendo assim, é possível estabelecer de maneira elegante uma ponte entre a solução e a fase gasosa, de tal forma que as críticas quanto à infidelidade da espectroscopia de massas no que diz respeito a descrever o que realmente acontece nas soluções, devido ao alto vácuo sob o qual as amostras são submetidas para a formação dos íons, tornam-se obsoletas.³³ Em outras palavras, isso significa que as diferentes espécies dos complexos **EuMAI** e **TbMAI** observadas nos espectros dificilmente foram formadas na fonte, mas já estavam presentes na solução.

Há uma indagação, no entanto, que merece ser discutida com maior profundidade. A razão m/z dos padrões isotópicos e das fragmentações é informante quanto à composição das espécies e não quanto às suas estruturas. É notável, neste caso, a possível presença dos isômeros de massa

das estruturas observadas no Esquema 3, cuja coordenação ao centro metálico não é dada através dos átomos de oxigênio, mas sim com a formação de carbenos *N*-heterocíclicos que se coordenam diretamente ao metal (Figura 17).

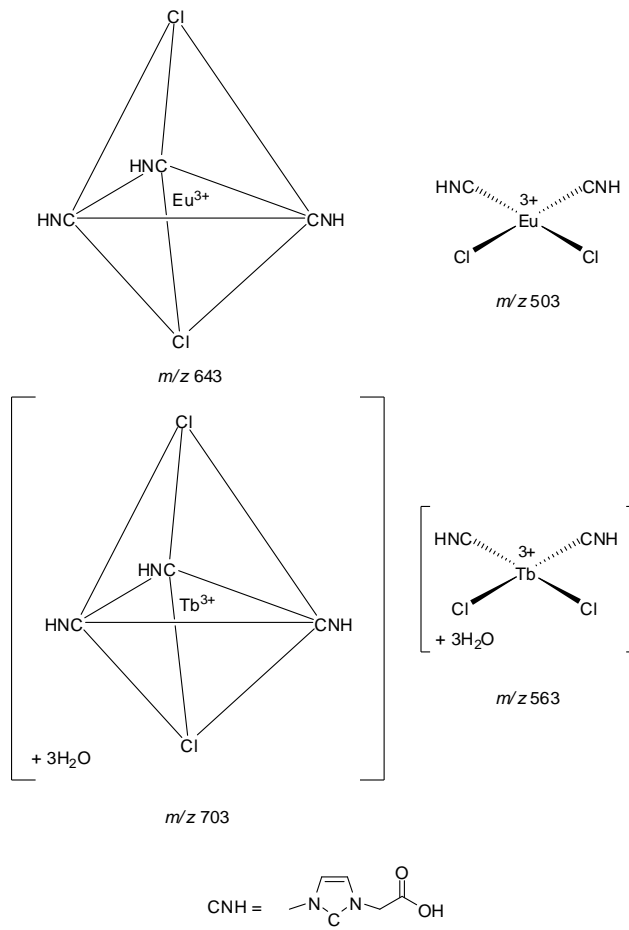


Figura 17. Possíveis isômeros de massa das espécies observadas de **EuMAI** e **TbMAI**.

É fato que, apesar do seu caráter macio, carbenos que são doadores- σ podem se ligar efetivamente a metais mais eletropositivos.³⁴ Contudo, geralmente, as sínteses que envolvem a formação de complexos de lantanídeo cujo um dos ligantes é um carbeno *N*-heterocíclico ocorrem através da protonólise de ligações Ln-N.³⁵ Sendo assim, os precursores e as condições reacionais para que este tipo de processo aconteça são bem diferentes das condições utilizadas na síntese dos complexos **EuMAI** e **TbMAI**. Além disso, existe uma preferência de coordenação dos lantanídeos a elementos mais eletronegativos como oxigênio ou flúor, de maneira que o carbeno somente se

coordenaria ao centro metálico após a coordenação dos átomos de oxigênio já ter ocorrido. Ainda assim, se ambos os sítios houvessem se coordenado, as massas observadas nos espectros seriam diferentes para cada quebra heterolítica de ligação C-H, para posterior formação do respectivo carbeno *N*-heterocíclico. Adicionalmente a isso, o espectro de ^{13}C RMN do **EuMAI** mostraria um sinal típico de carbeno, caso houvesse ocorrido a sua formação.

Os espectros de IV também revelaram dados importantes de complexação através do grupo carboxilato (Figura 18). O estiramento de carboxilas de um ácido carboxílico é observado em torno de 1700 cm^{-1} enquanto o estiramento de carboxilatos é observado em torno de 1600 cm^{-1} .³⁶ Isso acontece devido ao aumento da ressonância do grupo carboxilato, gerando, conseqüentemente, uma diminuição na constante de força de ambas as ligações CO e, por sua vez, uma diminuição na energia da ligação e, conseqüentemente, no número de onda. No caso, 1625 cm^{-1} para o **EuMAI** e 1623 cm^{-1} para o **TbMAI**.

Os sinais em 3426 e 3420 cm^{-1} são referentes às bandas OH das águas complexadas. Os sinais em 1170 e 1167 cm^{-1} são referentes às deformações dos grupos CH do anel imidazólio.³⁷ O duplete em 2920 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} no espectro do **EuMAI** é referente ao estiramento $\text{Csp}^3\text{-H}$ do metileno (ressonância de Fermi). Os sinais em 1385 e 1380 cm^{-1} estão relacionados ao estiramento simétrico do grupo carboxilato.

É possível ainda observar o caráter bidentado do carboxilato coordenado ao metal, através da comparação entre os $\Delta_{\text{ASS-SIM}}$ das espécies de carboxilato livre e complexado, onde $\Delta_{\text{ASS-SIM}}$ é a diferença entre os modos vibracionais assimétrico e simétrico, respectivamente, do estiramento deste grupo.³⁸

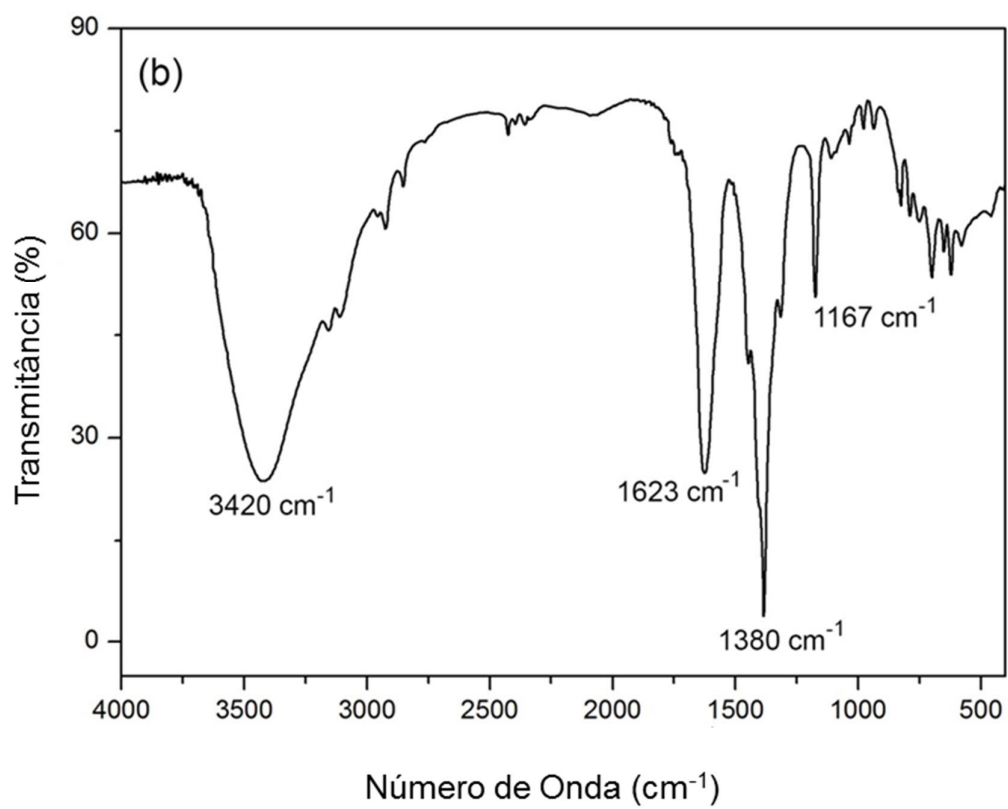
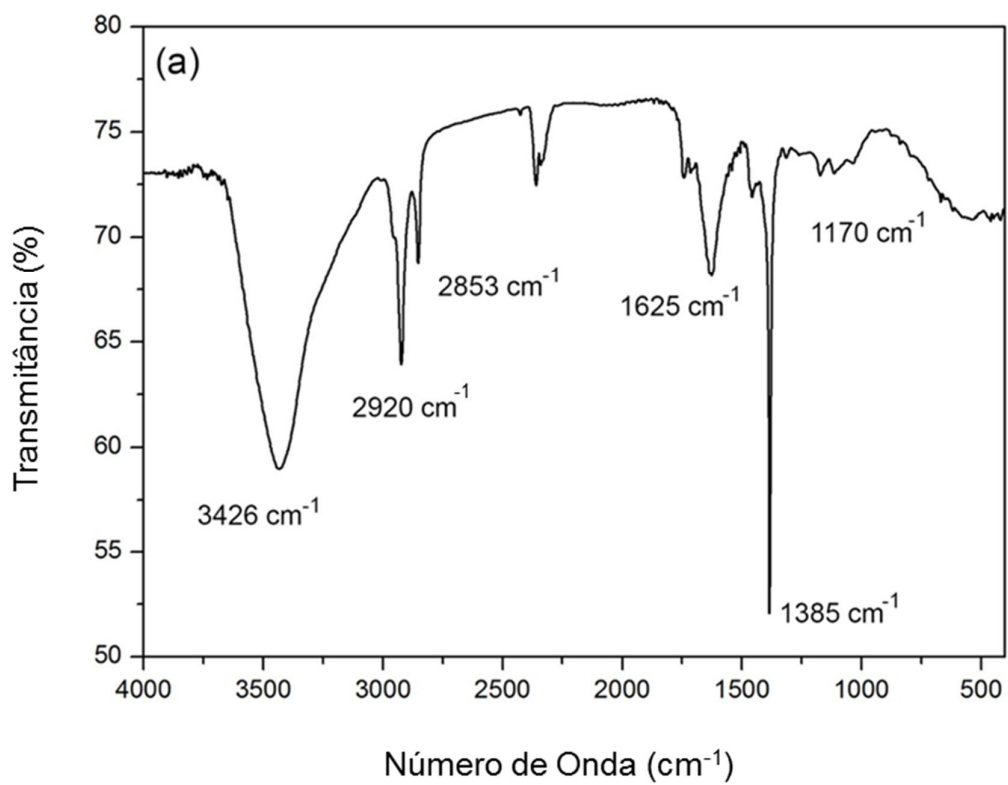


Figura 18. Espectros de FTIR-ATR do **EuMAI** (a) e **TbMAI** (b).

Isso acontece porque a coordenação monodentada faz com que os átomos de oxigênio percam sua equivalência. A consequência é um aumento em $\nu_{ASS}(\text{CO}_2)$, uma diminuição em $\nu_{SIM}(\text{CO}_2)$ e, por sua vez, um aumento na separação Δ entre as frequências de vibração relativamente ao ligante livre.³⁹ Assim sendo, define-se que Δ seja a diferença entre os modos vibracionais para o ligante livre, e Δ' a diferença entre estes modos vibracionais para o carboxilato complexado. Caso $\Delta > \Delta'$, então o caráter do ligante é bidentado, por outro lado, caso $\Delta < \Delta'$, o caráter do ligante é monodentado. A Figura 19 mostra uma ilustração dos modos vibracionais dos estiramentos simétricos e assimétricos para o **MAI.Cl** enquanto a Tabela 5 mostra os valores de estiramento simétrico e assimétrico do grupo carboxilato, bem como os valores calculados de $\Delta_{ASS-SIM}$ para o ligante livre e complexado.

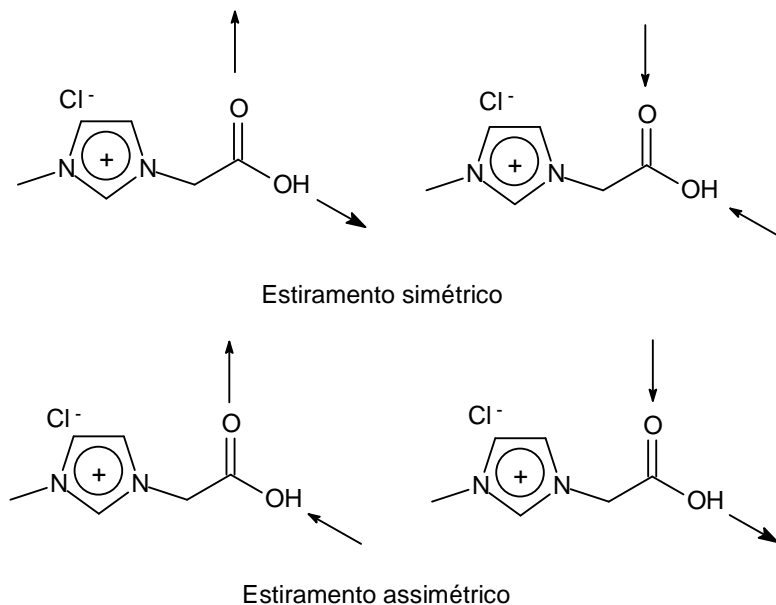


Figura 19. Modos vibracionais de estiramento simétrico e assimétrico do ácido carboxílico do **MAI.Cl**, representados vetorialmente.

Tabela 5. Valores dos estiramentos simétricos e assimétricos da ligação CO e valores de $\Delta_{ASS-SIM}$ para os complexos **EuMAI** e **TbMAI** e para o ligante **MAI.Cl**.

	Ligante MAI.Cl ^a	Complexo EuMAI	Complexo TbMAI
Estiramento assimétrico (cm ⁻¹)	1733	1625	1623
Estiramento simétrico (cm ⁻¹)	1166	1385	1380
$\Delta_{ASS-SIM}$ (cm ⁻¹)	567	240	243

^a Dados extraídos da ref. 40.

Como observado, $\Delta > \Delta'$, ou seja, a análise mostra que o caráter do ligante nos complexos **EuMAI** e **TbMAI** é bidentado. É válido ressaltar, no entanto, que os experimentos de IV são feitos com o material sólido. Em solução aquosa, este comportamento pode ser diferente, e é o que se observa mais à frente.

Como esperado, a presença do ligante ionofílico e a geometria com a qual este se coordenou ao centro metálico teve uma influência direta nos padrões de emissão e excitação dos compostos, no que diz respeito às transições geradas e suas respectivas intensidades. A Figura 20 mostra o espectro de emissão no estado estacionário do **EuMAI** e do **TbMAI** adquiridos em solução aquosa.

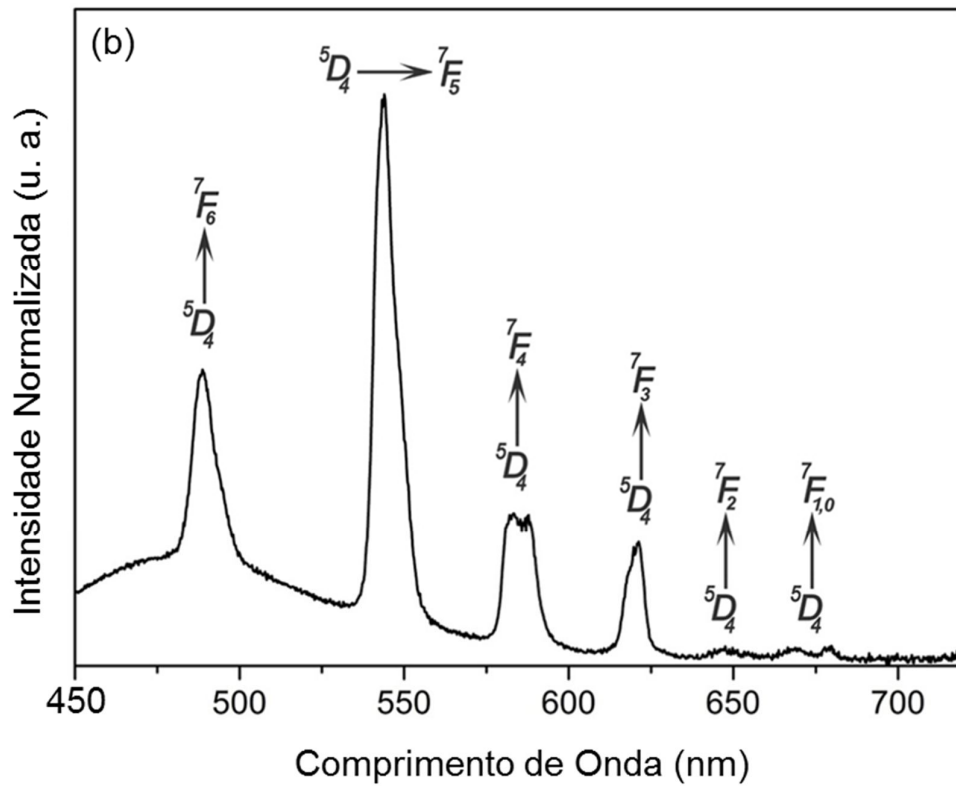
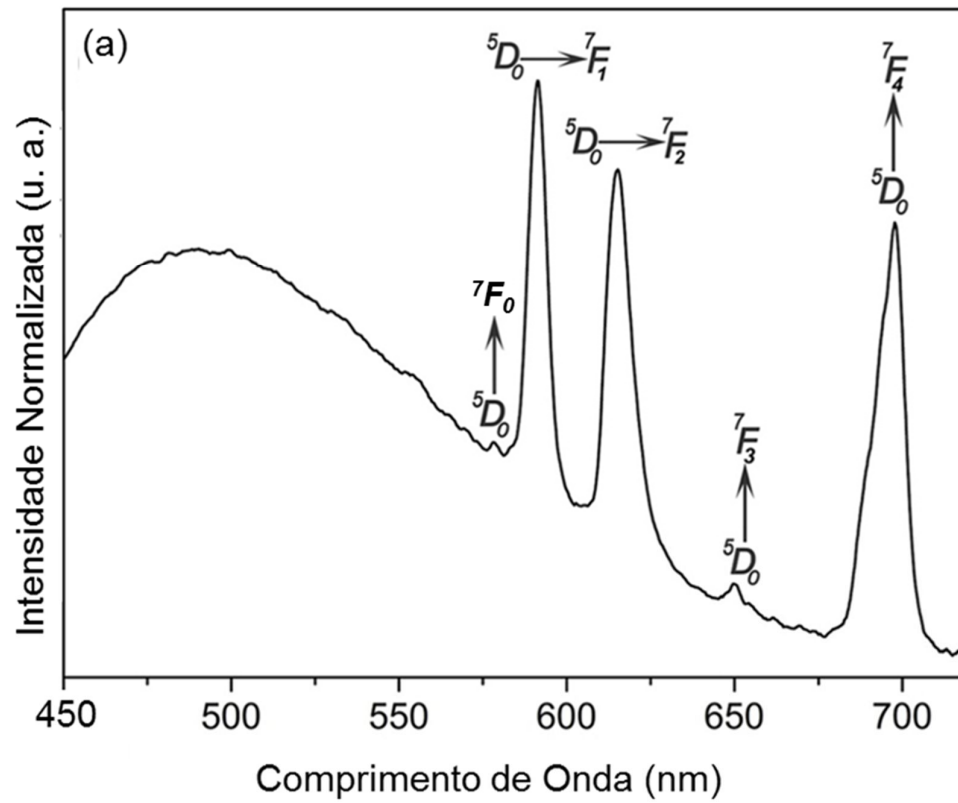


Figura 20. Espectros de emissão do EuMAI (a) e do TbMAI (b).

O espectro de emissão do complexo **EuMAI** é dominado pelos padrões de emissão ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ e ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$. A transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ é parcialmente permitida pela regra de seleção $\Delta J = 1$ dipolo magnética, sendo esta independente do ambiente químico e simetria do íon Eu^{3+} . Por outro lado, a transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ é dipolo elétrico induzida. Segundo o formalismo de Judd, em ambientes onde há ausência de um centro de inversão, as regras de paridade não se aplicam, de maneira que as transições $4f^6 \rightarrow 4f^6$ se tornam transições entre os estados:¹⁶

$$w[{}^5D_0(4f^6)] + x[4f^55d^1] \rightarrow y[{}^7F_2(4f^6)] + z[4f^55d^1], \text{ onde } w \gg x \text{ e } y \gg z$$

A transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ é dominante em ambientes centrossimétricos, isso significa que nestes ambientes a razão $R = I({}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2) / I({}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1)$ (coeficiente e de assimetria), onde I representa a intensidade das transições, é pequena. O valor de R obtido para o complexo **EuMAI** foi de 1,20, o que é um valor baixo, mostrando a existência de um ambiente de alta simetria.

Por outro lado, a presença da transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ só é permitida nos ambientes cuja simetria é representada pelo grupo pontual C_{6v} , C_6 , C_{3v} , C_3 , C_{4v} , C_4 , C_{2v} , C_2 , C_s ou C_1 .¹⁶ Estes grupos pontuais não possuem centro de inversão. Desta maneira, o espectro de emissão do **EuMAI** também revela indícios de mais de uma espécie em equilíbrio em solução. Nockemann mostra que a especiação de lantanídeos em TSILs apesar de pouco abordada na literatura, de fato pode ocorrer.⁴¹

A partir dos tempos de vida obtidos para o complexo **EuMAI**, foi possível calcular sua taxa de decaimento total (A_{tot}) e, calculando-se seus coeficientes de emissão espontânea (A_{0j})⁴², foi possível obter a sua taxa de decaimento radiativo (A_{rad}).

Com estes dados em mãos, utilizando-se a regra de Horrocks,⁴³ calculou-se o número de moléculas de água coordenadas ao centro metálico:

$$n_w = 1,11(A_{tot} - A_{rad} - 0,31) \quad (1)$$

Oito moléculas de água fazem parte da primeira esfera de coordenação de ambas as espécies de **EuMAI** encontradas em solução. Contudo, o ESI-MS não detectou todas estas moléculas de água, provavelmente porque as mesmas são facilmente liberadas no processo de ESI e porque o gás secante utilizado era em uma temperatura suficientemente alta (180 °C) para provocar a descoordenação das mesmas.

O caráter altamente higroscópico dos complexos impediu a formação de monocristais para posterior análise de DRX. Ainda assim, a geometria do **EuMAI** foi otimizada, via Sparkle/PM3⁴⁴ (Figura 21).

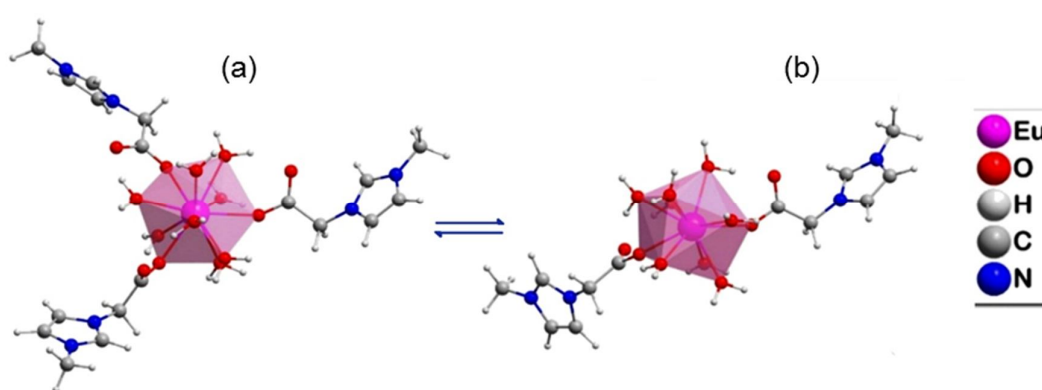


Figura 21. Geometria otimizada do complexo **EuMAI** e a sua dissociação em solução aquosa calculada via Sparkle/PM3. Espécie coordenada a três (a) e a dois (b) ligantes **MAI**.

Segundo os estudos teóricos, a espécie de Eu^{3+} coordenada a três ligantes **MAI** (Figura 21a) apresenta-se conectada a onze átomos de oxigênio, sendo oito provenientes das moléculas de água coordenadas ao centro metálico (regra de Horrocks). Para assumir a forma conectada a dez átomos de oxigênio (Figura 21b), um dos ligantes **MAI** é dissociado. O número de moléculas de água, no entanto, continua sendo oito.

Diferentemente do observado nas análises de IV, os ligantes **MAI** possuem caráter monodentado, com comprimentos de ligação Eu-O-MAI inferiores aos das moléculas de água coordenadas ao Eu^{3+} devido à carga negativa do grupo carboxilato. Relembrando que as análises fotoquímicas, das quais são extraídos os dados para o cálculo do número de moléculas de água coordenadas, são feitas em solução aquosa, de maneira que o complexo na

fase sólida pode ter menos moléculas de água coordenadas, o que possibilita uma coordenação bidentada do ligante, como foi observado nas análises de IV.

Também foram obtidos os espectros de excitação dos complexos através do monitoramento das transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ do Eu^{3+} e $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ do Tb^{3+} (Figura 22).

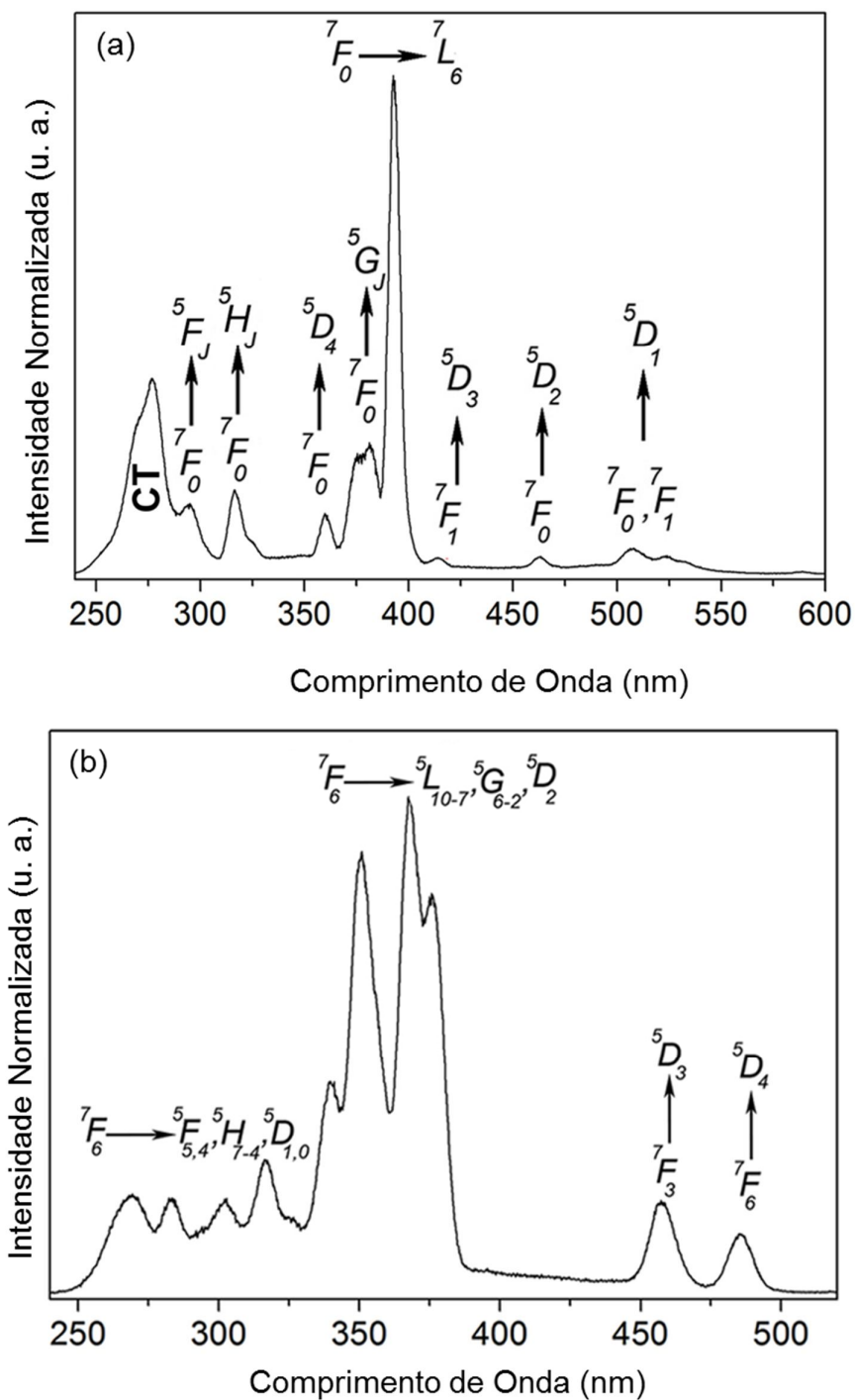


Figura 22. Espectros de excitação do EuMAI (a) e do TbMAI (b).

Os espectros de excitação são compostos, predominantemente, por um padrão de linhas finas, característicos das transições 4f-4f dos íons Ln^{3+} . Isso significa que o caminho fotofísico principal responsável pela luminescência de ambas as amostras é dado através de excitação direta. Ainda assim, no espectro de excitação do **EuMAI** há um pico em 275 nm mostrando que o **MAI.CI** atua como ligante antena, ainda que a sensitização seja reduzida. Isso fez com que a emissão no vermelho do complexo **EuMAI**, quando sob a incidência de radiação UV, fosse pouco intensa.

Mais especificamente, o sinal em 275 nm é uma banda de transferência de carga do ligante para o metal (*Ligand to Metal Charge Transfer* - LMCT). Este tipo de transferência é bastante similar ao mecanismo de sensitização de Dexter ilustrado na Figura 23.

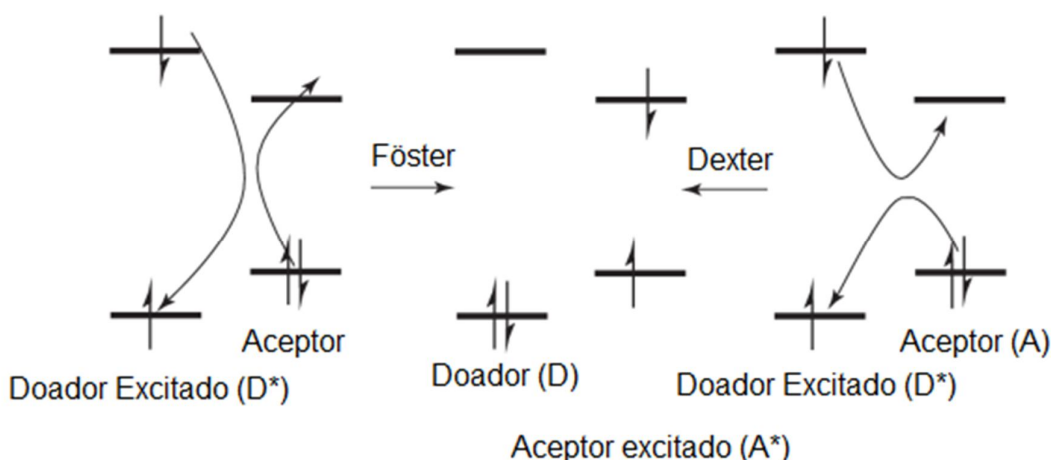


Figura 23. Mecanismos de transferência de energia no processo de sensitização. (Adaptada da ref. 45)

No mecanismo de Förster, ocorre uma transferência de energia do estado doador, quando este sai de seu estado excitado em direção ao estado de menor energia, ao aceitador, de maneira que este aceitador é excitado.

Por outro lado, o mecanismo de Dexter inclui a transferência, não exclusivamente de energia, porém de elétrons entre os estados doador e aceitador. No caso do **EuMAI**, o estado doador é o ligante **MAI.CI** e o aceitador o íon Eu^{3+} . É interessante observar que esta banda de transferência de carga não aparece no espectro de excitação do **TbMAI** já que os íons Tb^{3+} tem menor propensão a reduzir para Tb^{2+} que os íons de Eu^{3+} .

A partir disso, utilizou-se o modelo Sparkle/PM3 para calcular as taxas de transferência de energia do complexo **EuMAI** (Tabela 6), na tentativa de compreender a causa da ineficiência do processo de sensitização.

Tabela 6. Valores calculados para o **EuMAI** via Sparkle/PM3 da transferência de energia e retro-transferência de energia intramolecular.

Estados do Ligante (cm ⁻¹)		Estado 4f (cm ⁻¹)	R _L (Å) ^a	Taxa de transferência (s ⁻¹)	Taxa de retro-transferência de energia (s ⁻¹)
Singleto (37325,3)	→	⁵ D ₄ (27586)	7,12	4,30 x 10 ¹	2,14 x 10 ⁻¹⁹
Tripleto (17582,2)	→	⁵ D ₁ (19027)	7,24	3,15 x 10 ⁹	4,03 x 10 ¹²
Tripleto (17582,2)	→	⁵ D ₀ (17293)	7,24	6,97 x 10 ⁹	1,79 x 10 ⁹

^a O valor R_L é a distância entre o estado doador, localizado nos ligantes orgânicos, e o núcleo do íon Eu³⁺.

Estudos revelaram que, para complexos de Tb³⁺, a melhor eficiência de sensitização ocorre quando o estado excitado tripleto está acima de 3000 cm⁻¹ superior ao estado emissor ⁵D₄ do metal.⁴⁶ Para complexos de Eu³⁺, no entanto, o entendimento dos fatores que conduzem à supressão da luminescência são mais complicados devido à presença de inúmeros estados excitados além do estado emissor ⁵D₀.⁴⁷ Ainda assim, os mesmos estudos mostraram que o *gap* de energia ótimo entre o estado tripleto do ligante e o estado ⁵D₀ do Eu³⁺ é acima de 6000 cm⁻¹.⁴⁶

Aqui se observa que há transferência de energia do estado tripleto para os estados ⁵D₁ e ⁵D₀ do Eu³⁺. Contudo, a taxa de retro transferência do nível ⁵D₁ do Eu³⁺ para o estado tripleto do ligante é da ordem de mil vezes superior à sua taxa de transferência.

O estado ⁵D₀ está energeticamente abaixo do estado tripleto, de maneira que, recebendo energia via emissão do estado tripleto, o estado ⁵D₀ pode, assim, emitir na região do vermelho. Contudo, sua energia, ainda que inferior, é muito próxima a do estado tripleto. Sendo assim, há a possibilidade de retro-transferência de energia e é exatamente o que se verifica a partir dos estudos teóricos. A taxa de transferência de energia é da mesma ordem da taxa de retro transferência, o que provoca a supressão da emissão no vermelho ⁵D₀ → ⁷F₂.

É preciso ainda levar em consideração que apesar de, indubitavelmente, a energia do estado tripleto exercer grande influência no processo de sensitização, esta sozinha não é fator determinante. A geometria adotada pelo complexo, bem como as águas coordenadas ao metal também exercem influência na luminescência do material.⁴⁸ No caso do complexo **EuMAI**, é possível que os osciladores OH das moléculas de água coordenadas ao metal tenham se acoplado, em um processo de ressonância, aos estados emissores 5D_0 e 5D_1 , de maneira que a vibração daqueles grupos competem com a emissão de energia via processos radiativos.⁴⁹ Isso pode ser verificado pelos valores experimentais e calculados para a taxa de decaimento não-radiativo e radiativo apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores teóricos e experimentais dos parâmetros de intensidade Ω_2 , Ω_4 e Ω_6 , tempo de vida (t), taxas de decaimento radiativo (A_{rad}) e não-radiativo (A_{nrad}), eficiência quântica (η) e rendimento quântico (q) do complexo **EuMAI**.

EuMAI	Ω_2	Ω_4	Ω_6	t (ms)	A_{rad} (s^{-1})	A_{nrad} (s^{-1})	η (%)	q (%)
Experimental	3,19	3,87	-	0,13	202,7	8131,0	2,40	>1,00
Teórico^a	3,22	3,80	0,32	-	204,94	8128,5	2,46	0,08

^a Valores derivados do modelo otimizado via Sparkle/PM3.

.Os erros dos parâmetros de intensidade calculados em relação aos obtidos experimentalmente são inferiores a 2%, mostrando que a geometria otimizada do **EuMAI** para as espécies di e tricoordenadas está de acordo com o que realmente ocorre em solução.

Todas as fontes de supressão da luminescência citadas anteriormente contribuem para os baixíssimos valores de rendimento quântico do material.

Por outro lado, o complexo **TbMAI** apresentou rendimento quântico de 17%, muito superior ao do Eu^{3+} , e um tempo de vida de 0,40 ms, o que é um valor baixo e pode ser atribuído também aos osciladores OH das moléculas de água coordenadas, bem como à energia do estado excitado tripleto ser abaixo do estado emissor 5D_4 .

O tempo de vida do complexo **EuMAI** é relativamente pequeno devido aos mesmos processos não-radiativos já citados. A Figura 24 ilustra as curvas de decaimento de tempo de vida de ambos os complexos.

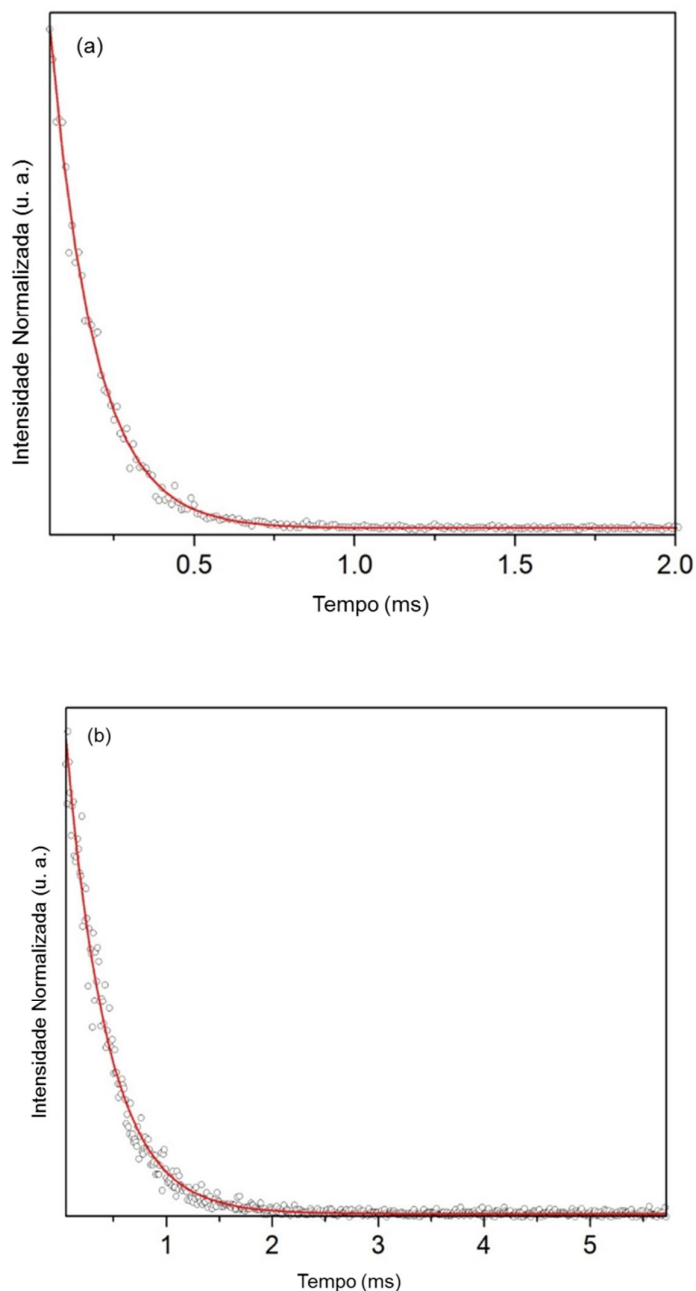
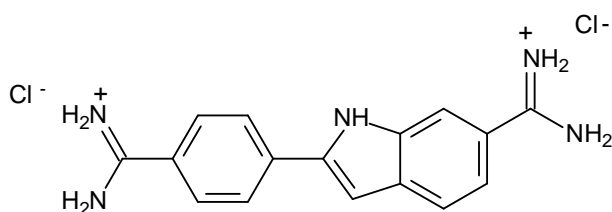
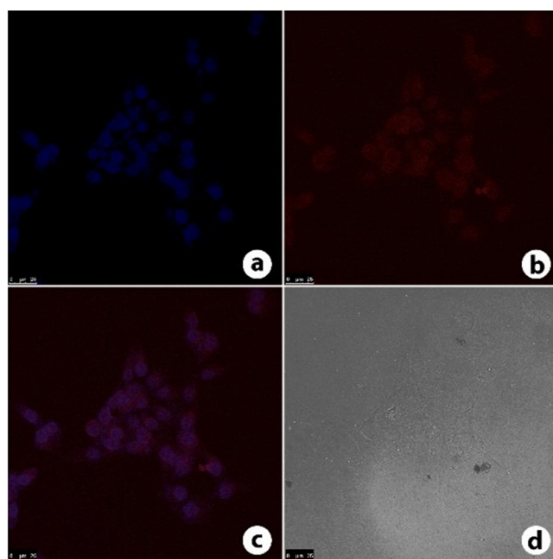


Figura 24. Curva de decaimento de tempo de vida do **EuMAI** (a) e do **TbMAI** (b) adquiridos em temperatura ambiente, através das excitações em 395 nm e 367 nm, respectivamente, durante o monitoramento das transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ do Eu^{3+} e $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ do Tb^{3+} . As linhas vermelhas sólidas correspondem ao melhor ajuste, $R > 0,99$.

Finalmente, foram conduzidos experimentos de imageamento celular para testar os complexos **EuMAI** e **TbMAI** como possíveis marcadores celulares. Os experimentos foram conduzidos com células cancerígenas MDA-MB-231, uma linhagem de câncer de mama bastante invasiva.

Ambos os complexos foram capazes de transpassar a membrana celular sem que houvesse formação de precipitado durante o experimento. A Figura 25 ilustra as imagens das células marcadas com **EuMAI**.



DAPI

Figura 25. Células MDA-MB-231. (a) Mostra o núcleo das células marcadas com DAPI (marcador comercial; azul) apenas. (b) Mostra o padrão de luminescência do **EuMAI** com pequenas associações à região perinuclear e uma coloração homogênea na região citoplasmática (vermelha). (c) Imagens (a) e (b) sobrepostas. (d) Imagem de contraste de fase das células MDA-MB-231 com seus aspectos morfológicos normais. *É importante ressaltar que a coloração vermelha foi artificialmente intensificada para facilitar a visualização da imagem, não representado, assim, a coloração real da amostra.*

A imagem da Figura 25b mostra o padrão de luminescência dos íons Eu^{3+} com pequenas associações à região perinuclear e uma coloração homogênea na região do citoplasma. Além disso, nenhuma associação à região nuclear, ou seja, não há afinidade do complexo **EuMAI** à estrutura de DNA nem a outras moléculas nucleares. Estas células marcadas com **EuMAI** apresentaram um brilho pouco intenso devido às razões já discutidas e embasadas nos experimentos fotofísicos, bem como nos estudos teóricos. Sendo assim, os resultados revelam que o **EuMAI** não é interessante para ser usado como marcador celular.

Por outro lado, as células MDA-MB-231 marcadas com o complexo **TbMAI** apresentaram um brilho verde intenso, característico dos íons Tb^{3+} , também associado à região perinuclear e, também, homoganeamente distribuído à região citoplasmática (Figura 26). O complexo **TbMAI** também não mostrou nenhuma afinidade ao núcleo da célula, mesmo após procedimentos de permeabilização.

A região perinuclear supracitada está associada exclusivamente ao retículo endoplasmático celular,⁵⁰ o que mostra a grande seletividade do marcador para seleção exclusiva de uma única organela. De fato, a maioria dos marcadores celulares com afinidade específica a esta região celular são de difícil planejamento e síntese, contrastando com os complexos em questão, já que sua rota sintética é relativamente simples.⁵¹

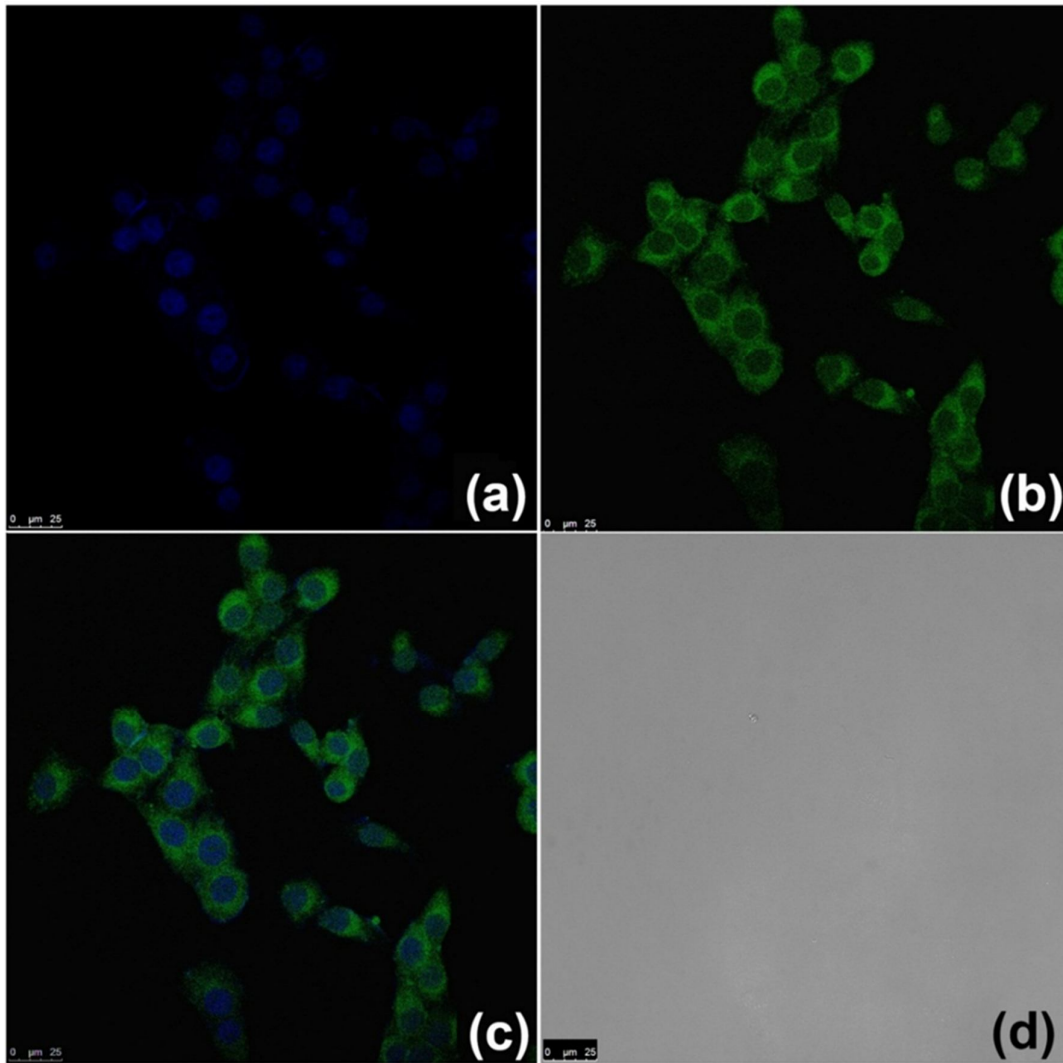


Figura 26. Células MDA-MB-231. (a) Mostra o núcleo das células marcadas com DAPI (marcador comercial; azul) apenas. (b) Mostra o padrão de luminescência do **TbMAI** altamente associada à região perinuclear e uma pequena coloração homogênea na região citoplasmática (verde). (c) Imagens (a) e (b) sobrepostas. (d) Imagem de contraste de fase das células MDA-MB-231 com seus aspectos morfológicos normais. Não houve nenhuma alteração nas imagens das células MDA-MB-231 marcadas com o complexo **TbMAI**, de maneira que estas mostram seu brilho real.

5. Conclusão & Perspectivas

Foram sintetizados dois novos complexos de európio e térbio ionicamente marcados com ânions hidrofílicos, o que permitiu que ambos fossem solúveis em água. Uma combinação de técnicas espectroscópicas e cálculos teóricos foram utilizados para obter informações acerca da especiação dos complexos **EuMAI** e **TbMAI**. Foram observadas duas espécies, uma coordenada a três ligantes **MAI** e outra coordenada a dois ligantes **MAI**, ambas observadas tanto por RMN como por ESI-MS.

A espectroscopia de fluorescência, bem como os cálculos teóricos permitiram identificar as limitações e fontes de supressão da luminescência que afetaram o rendimento quântico do complexo de **EuMAI**. Tanto a energia do estado tripleto quanto a absorção de energia dos osciladores OH são fatores contribuintes.

Ambos os complexos foram testados como biossondas em experimentos de imageamento celular. Como previsto pelo baixo rendimento quântico, o complexo **EuMAI** não se mostrou um bom candidato a biossonda. Contudo, o complexo **TbMAI** mostrou intensa luminescência, ambos os complexos **EuMAI** e **TbMAI** associados à região perinuclear (exclusivamente no retículo endoplasmático), sem nenhuma associação ao núcleo celular.

Como perspectiva, novos complexos ionicamente marcados com ânions hidrofílicos serão sintetizados, complexados com Eu^{3+} e Tb^{3+} e testados como uma nova classe de marcadores celulares fluorescentes seletivos.

6. Bibliografia

- (1) Plechkova, N. V.; Seddon, K. R. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 123.
- (2) (a) Silva, W. S. D.; Lapis, A. A. M.; Suarez, P. A. Z.; Neto, B. A. D. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2011**, *68*, 98(b) Oliveira, F. F. D.; dos Santos, M. R.; Lalli, P. M.; Schmidt, E. M.; Bakuzis, P.; Lapis, A. A. M.; Monteiro, A. L.; Eberlin, M. N.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10140(c) dos Santos, M. R.; Diniz, J. R.; Arouca, A. M.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Tamborim, S. M.; Parize, A. L.; Suarez, P. A. Z.; Neto, B. A. D. *ChemSusChem* **2012**, *5*, 716(d) Ramos, L. M.; Guido, B. C.; Nobrega, C. C.; Corrêa, J. R.; Silva, R. G.; de Oliveira, H. C. B.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Neto, B. A. D. *Chemistry - A European Journal* **2013**, *19*, 4156(e) Alvim, H. G. O.; de Lima, T. B.; de Oliveira, H. C. B.; Gozzo, F. C.; de Macedo, J. L.; Abdelnur, P. V.; Silva, W. A.; Neto, B. A. D. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1420(f) Merlet, C.; Rotenberg, B.; Madden, P. A.; Salanne, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**(g) Dupont, J.; Migowski, P. *Chem.-Eur. J.* **2007**, *13*, 32.
- (3) Petkovic, M.; Seddon, K. R.; Rebelo, L. P. N.; Pereira, C. S. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1383.
- (4) Weingartner, H.; Cabrele, C.; Herrmann, C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 415.
- (5) (a) Mele, A.; Tran, C. D.; Lacerda, S. H. D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 4364(b) Dupont, J.; Suarez, P. A. Z.; De Souza, R. F.; Burrow, R. A.; Kintzinger, J. P. *Chem.-Eur. J.* **2000**, *6*, 2377(c) Fumino, K.; Wulf, A.; Ludwig, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 3830(d) Urahata, S. M.; Ribeiro, M. C. C. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 1855(e) Bini, R.; Bortolini, O.; Chiappe, C.; Pieraccini, D.; Siciliano, T. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 598.
- (6) Schroder, U.; Wadhawan, J. D.; Compton, R. G.; Marken, F.; Suarez, P. A. Z.; Consorti, C. S.; de Souza, R. F.; Dupont, J. *New J. Chem.* **2000**, *24*, 1009.
- (7) Dupont, J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 341.
- (8) Lopes, J.; Padua, A. A. H. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 3330.
- (9) Zhao, W.; Leroy, F.; Heggen, B.; Zahn, S.; Kirchner, B.; Balasubramanian, S.; Muller-Plathe, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15825.
- (10) Lee, S.-g. *Chem. Commun.* **2006**, 1049.
- (11) (a) Nockemann, P.; Thijs, B.; Postelmans, N.; Van Hecke, K.; Van Meervelt, L.; Binnemans, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13658(b) Wang, D.; Wang, H.; Li, H. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5*, 6268(c) Shao, Y.-F.; Yan, B.; Li, Q.-P. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 381.
- (12) Hänninen, P.; Härmä, H. *Lanthanide Luminescence Photophysical, Analytical and Biological Aspects*; Springer: Nova Iorque, EUA, 2011.
- (13) Huheey, J. E. *Inorganic Chemistry-Principles of Structure and Reactivity*; 3^a ed.; Harper & Row: Nova Iorque, EUA, 1983.
- (14) Li, Y.; Zheng, F.-K.; Liu, X.; Zou, W.-Q.; Guo, G.-C.; Lu, C.-Z.; Huang, J.-S. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 6308.
- (15) Solé, J. G.; Bausá, L. E.; Jaque, D. *An Introduction to the Optical Spectroscopy of Inorganic Solids*; Wiley: Hoboken, EUA, 2005.
- (16) Tanner, P. A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5090.

- (17) Weissman, S. I. *The Journal of Chemical Physics* **1942**, *10*, 214.
- (18) Crosby, G. A.; Alire, R. M.; Whan, R. E. *J. Chem. Phys.* **1961**, *34*, 743.
- (19) Whan, R. E.; Crosby, G. A. *J. Mol. Spectrosc.* **1962**, *8*, 315.
- (20) (a) Latva, M.; Takalo, H.; Mukkala, V. M.; Matachescu, C.; RodriguezUbis, J. C.; Kankare, J. *J. Lumin.* **1997**, *75*, 149(b) De Silva, C. R.; Li, J.; Zheng, Z.; Corrales, L. R. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 4527(c) Samuel, A. P. S.; Xu, J.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 687.
- (21) Kleiner, M. *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 2370.
- (22) Baek, N. S.; Nah, M. K.; Kim, Y. H.; Roh, S. G.; Kim, H. K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 443.
- (23) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Gatto, C. C.; Ramos, L. M.; de Vasconcelos, N. M.; Corrêa, J. R.; Costa, M. B.; de Oliveira, H. C. B.; Silva, R. G. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1524.
- (24) Hibbs, A. R. *Confocal Microscopy for Biologists*; Springer: Melbourne, Australia, 2004.
- (25) (a) Chen, Y.; Guo, W.; Ye, Z.; Wang, G.; Yuan, J. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6266(b) Deiters, E.; Song, B.; Chauvin, A.-S.; Vandevyver, C. D. B.; Gummy, F.; Buenzli, J.-C. G. *Chem.-Eur. J.* **2009**, *15*, 885.
- (26) Hu, Z.-J.; Tian, X.-H.; Zhao, X.-H.; Wang, P.; Zhang, Q.; Sun, P.-P.; Wu, J.-Y.; Yang, J.-X.; Tian, Y.-P. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12467.
- (27) Binnemans, K. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4283.
- (28) Claridge, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2^a ed.; Elsevier: Oxford, Reino Unido, 2009.
- (29) James, T. L. "Fundamentals of NMR," 1998.
- (30) Bertini, I.; Luchinat, C.; Aime, S. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, R7.
- (31) Hoffmann, E. d.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*; 3^a ed.; Wiley: Hoboken, EUA, 2007.
- (32) Santos, L. S. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 235.
- (33) Coelho, F.; Eberlin, M. N. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 5261.
- (34) Arnold, P. L.; Casely, I. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3599.
- (35) (a) Zhang, J.; Yao, H.; Zhang, Y.; Sun, H.; Shen, Q. *Organometallics* **2008**, *27*, 2672(b) Arnold, P. L.; Turner, Z. R.; Germeroth, A. I.; Casely, I. J.; Bellabarba, R.; Tooze, R. P. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 6808(c) Li, Z.; Xue, M.; Yao, H.; Sun, H.; Zhang, Y.; Shen, Q. *J. Organomet. Chem.* **2012**, *713*, 27.
- (36) Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*; 3^a ed.; Wiley: Chichester, Inglaterra, 2001.
- (37) Grondin, J.; Lassegues, J.-C.; Cavagnat, D.; Buffeteau, T.; Johansson, P.; Holomb, R. *J. Raman Spectrosc.* **2011**, *42*, 733.
- (38) Do, L. H.; Hayashi, T.; Moenne-Loccoz, P.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1273.
- (39) Deacon, G. B.; Phillips, R. J. *Coord. Chem. Rev.* **1980**, *33*, 227.
- (40) Xuan, X.; Wang, N.; Xue, Z. *Spectrosc. Acta A* **2012**, *96*, 436.
- (41) Nockemann, P.; Thijs, B.; Lunstroot, K.; Parac-Vogt, T. N.; Goerller-Walrand, C.; Binnemans, K.; Van Hecke, K.; Van Meervelt, L.; Nikitenko, S.; Daniels, J.; Hennig, C.; Van Deun, R. *Chem.-Eur. J.* **2009**, *15*, 1449.
- (42) Rodrigues, M. O.; da Costa, N. B.; de Simone, C. A.; Araujo, A. A. S.; Brito-Silva, A. M.; Paz, F. A. A.; de Mesquita, M. E.; Junior, S. A.; Freire, R. O. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 4204.
- (43) Supkowski, R. M.; Horrocks, W. D. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *340*, 44.

- (44) Freire, R. O.; Rocha, G. B.; Simas, A. M. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1638.
- (45) Atwood, D. A. *The Rare Earth Elements Fundamentals and Applications*; Wiley: Chichester, Reino Unido, 2012.
- (46) van der Tol, E. B.; van Ramesdonk, H. J.; Verhoeven, J. W.; Steemers, F. J.; Kerver, E. G.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. *Chem.-Eur. J.* **1998**, *4*, 2315.
- (47) D'Aleo, A.; Pointillart, F.; Ouahab, L.; Andraud, C.; Maury, O. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 1604.
- (48) (a) D'Aleo, A.; Xu, J.; Moore, E. G.; Jocher, C. J.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 6109(b) D'Aleo, A.; Moore, E. G.; Szigethy, G.; Xu, J.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 9316.
- (49) Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; de Sousa, A. S.; Williams, J. A. G.; Woods, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 493.
- (50) Zhong, Y.; Fang, S. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 28057.
- (51) Srikun, D.; Albers, A. E.; Nam, C. I.; Iavarone, A. T.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4455.



RightsLink®

[Home](#)
[Create Account](#)
[Help](#)


ACS Publications
High quality. High impact.

Title: Water-Soluble Tb³⁺ and Eu³⁺ Complexes with Ionophilic (Ionically Tagged) Ligands as Fluorescence Imaging Probes

Author: Julia R. Diniz, José R. Correa, Daniel de A. Moreira, Rafaela S. Fontenele, Aline L. de Oliveira, Patrícia V. Abdelnur, José D. L. Dutra, Ricardo O. Freire, Marcelo O. Rodrigues, and Brenno A. D. Neto

Publication: Inorganic Chemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Sep 1, 2013

Copyright © 2013, American Chemical Society

User ID
Password
<input type="checkbox"/> Enable Auto Login
LOGIN
Forgot Password/User ID? If you're a copyright.com user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a RightsLink user or want to learn more?

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

[BACK](#)
[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2014 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#)
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Water-Soluble Tb³⁺ and Eu³⁺ Complexes with Ionophilic (Ionically Tagged) Ligands as Fluorescence Imaging Probes

Julia R. Diniz,[†] José R. Correa,[†] Daniel de A. Moreira,[‡] Rafaela S. Fontenele,[†] Aline L. de Oliveira,[†] Patrícia V. Abdelnur,[§] José D. L. Dutra,^{||} Ricardo O. Freire,^{||} Marcelo O. Rodrigues,^{*,‡} and Brenno A. D. Neto^{*,†}

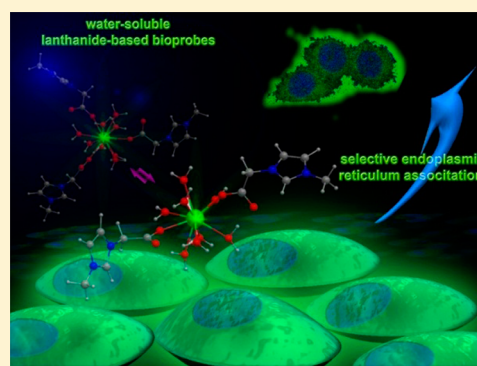
[†]Laboratory of Medicinal and Technological Chemistry and [‡]LIMA-Laboratório de Inorgânica e Materiais, University of Brasília (IQ-UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70904970, P.O. Box 4478, Brasília-DF, Brazil

[§]National Center for Agroenergy Research, Brazilian Enterprise for Agricultural Research, EMBRAPA Agroenergy, 3448-4246 Brasília-DF, Brazil

^{||}Pople Computational Chemistry Laboratory, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

S Supporting Information

ABSTRACT: This article describes a straightforward and simple synthesis of ionically tagged water-soluble Eu³⁺ and Tb³⁺ complexes (with ionophilic ligands) applied for bioimaging of invasive mammal cancer cells (MDA-MB-231). Use of the task-specific ionic liquid 1-methyl-3-carboxymethyl-imidazolium chloride (MAI-Cl) as the ionophilic ligand (ionically tagged) proved to be a simple, elegant, and efficient strategy to obtain highly fluorescent water-soluble Eu³⁺ (EuMAI) and Tb³⁺ (TbMAI) complexes. TbMAI showed an intense bright green fluorescence emission selectively staining endoplasmic reticulum of MDA-MB-231 cells.



INTRODUCTION

Ionic liquids (ILs) and task-specific ionic liquids (TSILs) has become a reality for development of novel technologies and industrial application.¹ These ionic fluids are found widespread in many research and technological areas.^{2–8} TSILs are commonly used, for instance, as organocatalysts, solvents, or ligands for metallic complexes which are usually applied as catalysts.^{9–13} Due to their easily tunable properties, which are the net result of an appropriate combination of both cations and anions, the range of application for such materials is practically unlimited, especially for those based on the imidazolium cation.^{14–16} It has been estimated that $\sim 10^6$ combinations of known cations and anions are capable of forming ILs (or TSILs),¹⁷ thus making the reality of selecting and tuning a specific property for these ionic fluids virtually unlimited. Considering these features, some ligands have been tagged with imidazolium cations (also known as ionophilic ligands¹⁸) aiming to increase both their solubilities and affinities for a specific medium.^{19–21} It is known that water miscibility (and with a plethora of organic solvents), polarity, viscosity, density, and other physicochemical properties can be fine tuned by tailoring a TSIL (or IL) with a suitable cation–anion combination.²²

Bioimaging experiments are of paramount importance for biomedical, biological, and diagnostic technological growth and advance, as recently reviewed.²³ Today, there is huge interest

on the search of novel lanthanide-based water-soluble luminescent bioprobes in order to improve the quality of bioimaging.^{24–26} Their good characteristics encompass large Stoke shifts, narrow emission line spectra, long-wavelength emission, and long luminescence lifetimes; and have therefore brought fluorescent lanthanide-based probes to a prominent position.^{27–29} Cellular membrane permeability is considered to be one of the most desired features for efficient bioimaging experiments.³⁰ To a broad range of biological assays, cellular membrane permeability is, indeed, the most important characteristic of a fluorogenic dye.³¹ Fluorescent lanthanide complexes are highly sensitive fluorophores and usually capable of transposing the cell membrane.³² In addition to all these attractive properties, lanthanide-based bioprobes have the advantage of low intrinsic cytotoxicity.^{33,34} Despite all promising features observed for those bioprobes, it remains many drawbacks to be overcome. For instance, a straightforward synthesis of a water-soluble lanthanide bioprobe is among the most challenging tasks for development of this class of materials. Considering that lanthanide complexes are usually water insoluble,³⁵ it is more than reasonable to suggest that the use of ionophilic ligands bearing hydrophilic anions (e.g., chloride, bromide, iodide, and others) may be one of the best

Received: July 9, 2013

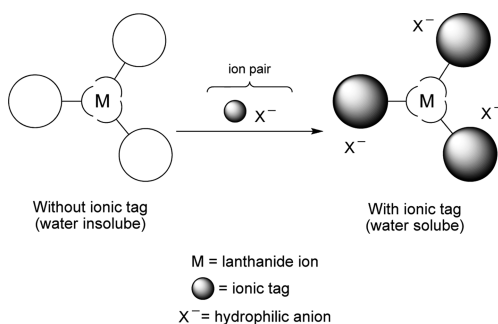
Published: August 14, 2013

strategies to overcome this major shortcoming, which currently narrows the biological application³⁶ of such promising class of materials.³⁷ Indeed, as already reviewed,^{38–40} water solubility is a *sine qua non* condition toward an efficient lanthanide bioprobe development.

As expected, the combination of ILs and/or TSILs with fluorescent lanthanide-containing compounds has flourished with very promising results.⁴¹ Typically, a substantial beneficial effect over the luminescent properties of lanthanide complexes is observed when doped with or dissolved in ILs (or TSILs), as recently reviewed.⁴² Such ionic fluids (manly those based on the imidazolium cation) are known to be transparent through almost the whole visible and near-infrared spectral regions.⁴³ Moreover, these molten salts are capable of participating in the sensitization process of lanthanide complexes.⁴⁴ Somehow surprising, most reported studies describe the use of both ILs and TSILs as solvents or as the cationic moiety of the lanthanide-based structure (lanthanide metals as the anionic moieties) rather than ligands directly attached to the metal center. The use of ionophilic ligands directly attached to the lanthanide metal is a strategy barely explored, despite it has been proved to be a very promising approach for formation of new luminescent ionogels.⁴⁵ Indeed, this can be regarded as the unexplored world of task-specific ionic liquids, i.e., their use as ionophilic ligands for novel fluorescent water-soluble lanthanide complexes.

In this context, it is reasonable to envisage the combination of a TSIL (as the ionophilic ligand with hydrophilic anions) with lanthanides to afford new fluorescent water-soluble complexes. Hopefully, those new complexes may have their physicochemical properties fine tuned and influenced by the presence of the ionic tag tethered to their structures (Scheme 1); therefore, good water solubility and chemical stability are expected, which are properties usually observed for imidazolium derivatives bearing hydrophilic anions.⁴⁶

Scheme 1. Strategy Aiming at Synthesis of Water-Soluble Lanthanide Complexes Using Ionically-Tagged (Ionophilic) Ligands^a



^aNote that the ionic tag can be an imidazolium cation and the lanthanide complex (left) is usually water insoluble. Also note the anion (X^-) can be hydrophilic in order to facilitate the solubility in an aqueous medium.

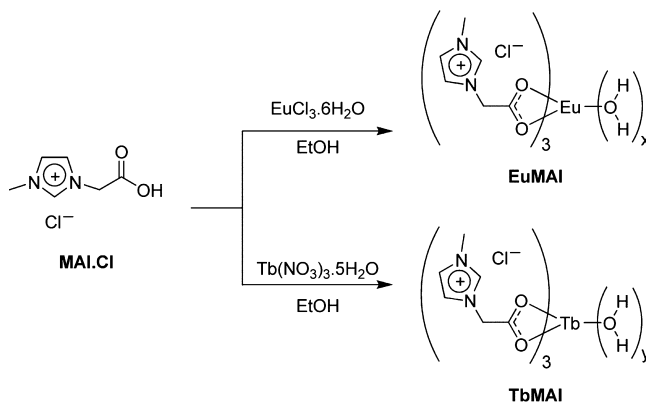
Due to our interest in the development of novel fluorescent bioprobes^{47–49} and in the chemistry and application of lanthanide-based compounds,^{50–52} we present herein a probe design based on the use of a hydrophilic TSIL (1-methyl-3-carboxymethylimidazolium chloride, MAI·Cl) as the ionophilic ligand aiming at formation of new water-soluble fluorescent Eu^{3+} and Tb^{3+} complexes. These new lanthanide-based

complexes were applied for cell-imaging experiments with invasive breast cancer cells lineage (MDA-MB-231).

RESULTS AND DISCUSSION

Initially, we synthesized two new Eu^{3+} and Tb^{3+} complexes (Scheme 2) using the known ionophilic ligand MAI·Cl that we

Scheme 2. Synthesis of Two Novel Water-Soluble Complexes (EuMAI and TbMAI) Using the Ionophilic Ligand MAI·Cl



already used in the synthesis of Pd, Cu, and Ni complexes.⁵³ The two fluorescent lanthanides complexes, designated as **EuMAI** and **TbMAI**, were precipitated at pH 6.0 from ethanolic solutions containing a metal-to-ligand ratio of 1:3. Both complexes were shown to be totally water soluble at room temperature and highly hygroscopic in character.

As one could expect, the presence of the ionophilic ligands had a direct effect over the observed spectroscopic properties measured in aqueous solutions. Figure 1 exhibits the excitation spectra of **EuMAI** and **TbMAI** acquired at room temperature while monitoring the $\text{Eu}^{3+} \ ^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_2$ and $\text{Tb}^{3+} \ ^5\text{D}_4 \rightarrow \ ^7\text{F}_5$ transitions at 610 and 542 nm, respectively.

Spectra are dominated by a series of narrow peaks typical of 4f–4f transitions of the Ln^{3+} ions, indicating that direct excitation is the photophysical pathway responsible for the high luminescence of the samples. Steady-state emission spectra of **EuMAI** and **TbMAI** obtained in aqueous solutions are shown in Figure 2.

Spectra were composed of narrow bands characteristic of the $\text{Eu}^{3+} \ ^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_j$ transitions. Those attributed to the $^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_2$ and $^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_1$ transitions give the major contribution to **EuMAI** photoluminescence. It is well established that the $\text{Eu}^{3+} \ ^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_1$ transitions are governed by the magnetic dipole mechanism, hence, largely independent of the coordination sphere. However, the $\text{Eu}^{3+} \ ^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_2$ emission band, which is allowed by the electric dipole mechanism, is extremely sensitive to the symmetry around the Ln^{3+} ion and therefore known as a *hypersensitive* transition. It has been established that the intensity ratio between $^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_2$ and $^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_1$ transitions can be used as an internal probe to depict the symmetry around the Eu^{3+} ions.⁵⁴ Europium complexes with a low symmetric coordination sphere, such as $\text{Eu}(\beta\text{-diketonates})_3$, have shown $^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_2/{}^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_1$ ratios ranging from 8 to 12, whereas a ratio of 0.67 has been associated to centrosymmetric compounds.⁵⁵ **EuMAI** complex has a $^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_2/{}^5\text{D}_0 \rightarrow \ ^7\text{F}_1$ value of 1.20, indicating that the local environment associated with Eu^{3+} ions is found in high symmetry. It may be justified, in

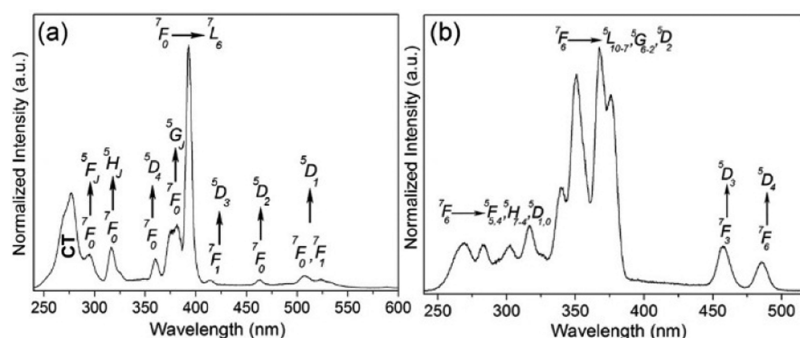


Figure 1. Excitation spectra of (a) EuMAI and (b) TbMAI. Aqueous solutions at 0.05 mmol.

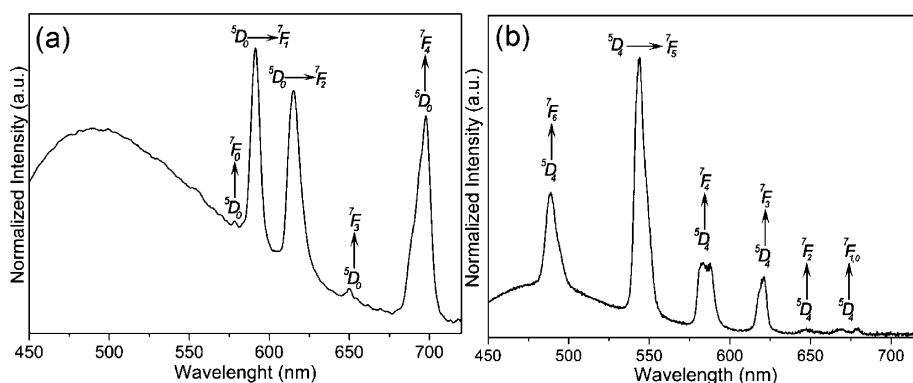
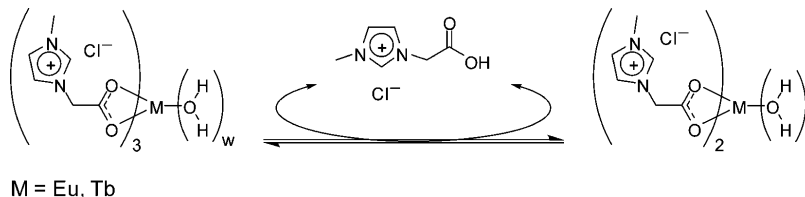


Figure 2. Emission spectra of (a) EuMAI and (b) TbMAI. Aqueous solutions at 0.05 mmol.

Scheme 3. EuMAI and TbMAI Equilibria Observed in Aqueous Solutions

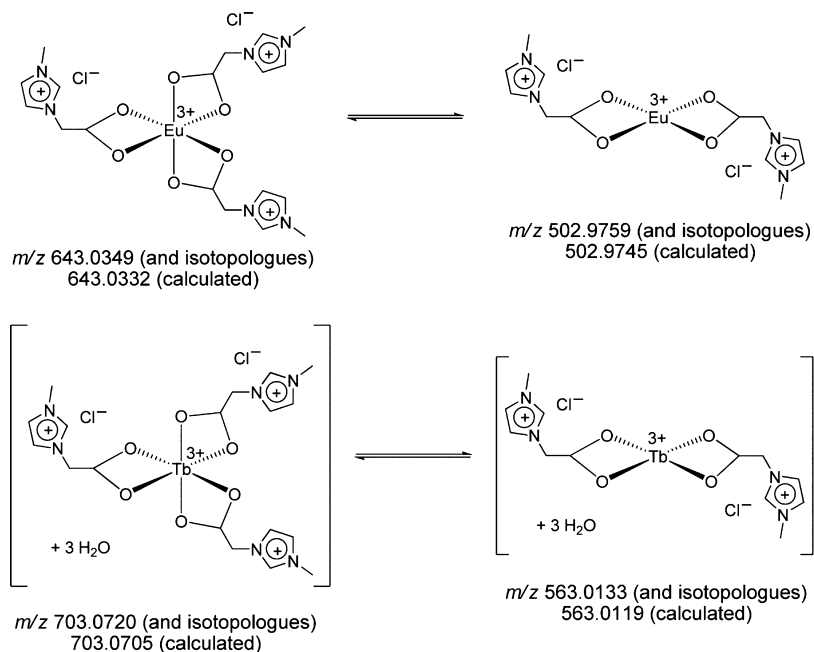


principle, by substitution of one MAI ligand for water molecules and the consequent conformational changes associated with ligand exchange. Although the emission spectrum of EuMAI displayed a typical profile of centrosymmetric complexes, it was possible to observe a peak centered at ca. 579 nm attributed to the $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ transitions. The presence of the $\text{Eu}^{3+} \ ^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ transitions indicated that the local symmetry around the Ln^{3+} ion is low and without an inversion center. Indeed, the selection rule for the electric dipole transition suggested that $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ appears only if the point group of the Eu^{3+} ions is C_s , C_{nv} , or C_n .⁵⁶ These results demonstrated an equilibrium among distinct europium species in solution. To confirm this feature, NMR and electrospray (tandem) mass spectrometry (ESI-MS(/MS)) experiments were conducted. Photophysical data proved to be in good agreement with the data depicted from simple NMR analysis (see Supporting Information, Figures S1 and S2) and ESI(+)-MS(/MS) analyses (Figures S5–S8, Supporting Information). This equilibrium was also noted for the new Tb^{3+} complex (TbMAI), and Scheme 3 exemplifies this specific behavior.

ESI(+)-MS(/MS) was very efficient for detection and characterization of the metallic species (in equilibrium) found in solution. ESI-MS provides continuous snapshots of the ionic composition in solution,⁵⁷ and the obtained results reflect the

dynamic equilibrium observed for both complexes (Scheme 3). By high-resolution ESI(+)-MS(/MS) it was possible to detect and characterize by collision-induced dissociation (structural diagnostic) the Ln^{3+} derivatives with two and three ligands in aqueous solution (Scheme 4). As observed for the NMR experiments, results from ESI-MS were also in accordance with the photophysical data. Interestingly, the Tb^{3+} derivatives were also detected and characterized with three H_2O molecules (see Figures S7 and S8, Supporting Information). It is worth noting that in all ESI-MS analyses there is a signal of m/z 141 attributed to the MAI cation, therefore pointing firmly to the proposed ligand dissociation/association equilibrium (Scheme 4) for both complexes.

Judd–Ofelt theory has been an important tool to calculate the spectroscopic properties of Eu^{3+} derivatives from their corrected emission spectra.^{58,59} Following the described standard protocol,⁶⁰ the radiative decay rates from eq 1 were utilized to estimate the presence of water molecules coordinated to Eu^{3+} ions.⁶¹ The number of water molecules coordinated to the metal center (n_w) was calculated from the phenomenological equation proposed by Supkowski and Horrocks (eq 1),^{56,61,62} where A_{tot} (total decay rates) and A_{rad} (radiative rates) are expressed in ms^{-1} (Table 1).

Scheme 4. Structures Detected and Characterized by High-Resolution ESI(+)-MS(/MS) in the Proposed Equilibria^a

^aCoordinated water molecules have been omitted in the metal coordination sphere for clarity. The ion of m/z 141 (free cation MAI) was also detected (see Figures S5–S8, Supporting Information) in accordance with the proposed equilibrium.

Table 1. Theoretical and Experimental Intensity Parameters Ω_2 , Ω_4 , and Ω_6 , Radiative (A_{rad}) and Nonradiative (A_{nrad}) Decay Rates Quantum Efficiency (η), and Quantum Yield (q)

EuMAI	Ω_2	Ω_4	Ω_6	t (ms)	A_{rad} (s^{-1})	A_{nrad} (s^{-1})	η (%)	q (%)
experimental	3.19	3.87	-	0.13	202.7	8131.0	2.40	>1.00
theoretical ^a	3.22	3.80	0.32	-	204.9	8128.5	2.46	0.08

^aValues derived from the optimized Sparkle/PM3 model.⁶³

$$n_w = 1.11 \cdot (A_{\text{tot}} - A_{\text{rad}} - 0.31) \quad (1)$$

Application of Horrocks rule to EuMAI leads to $n_w = 8$. On the basis of all spectroscopic and spectrometric evidence, the structures of the complex and its dissociation in aqueous solution were also optimized via Sparkle/PM3⁶³ (Figure 3).

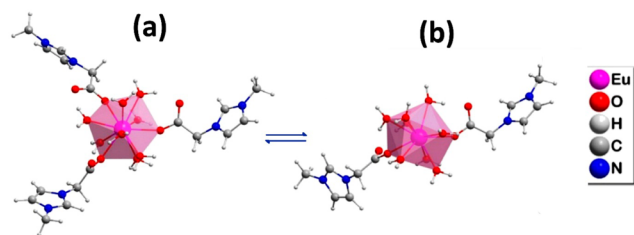


Figure 3. Optimized structure of EuMAI and its dissociation in aqueous solution calculated at Sparkle/PM3. Two main species found in solution (equilibrium) bearing three ligands (a) and two ligands (b) were optimized. Note that the calculated structures are in accordance with data obtained by NMR and ESI-MS as well as photophysical data.

Theoretical structures of EuMAI species presented the Eu^{3+} ions coordinated with 11 oxygen atoms, 3 and 2 of which arise from the MAI ligands (Figure 3), and the coordination spheres are completed by aqua ligands; hence, the coordination symmetry of the Ln^{3+} center may be described as a distorted monocapped pentagonal antiprism. The bond lengths among Eu^{3+} ions and MAI ligands are shorter than those of Eu^{3+} and

aqua ligands, due to the negative charge on the carboxylate oxygen atoms which may increase the binding to the metal center. It is important to note that Figure 3b shows the MAI ligands in opposite position to each other, therefore justifying the centrosymmetric profile of the emission spectrum. Tables 1 and 2 show the values for the spectroscopic properties and energy transfer rates calculated for EuMAI, respectively.

The calculated values exhibited in Table 1 are in good agreement with those obtained experimentally, evidencing the accuracy of the theoretical methodology.⁶⁴ The intramolecular energy transfer, back transfer, and quantum yield of emission for EuMAI were calculated considering that the Eu^{3+} levels arise from the metal ion at an intermediate coupling, the energy of the ligand singlet state must be lower than $40,000 \text{ cm}^{-1}$, and the triplet level of the lowest energy must be related to the singlet state previously chosen. Values of energy transfer rates exhibited in Table 2 indicate that the energy transfer occurred from the triplet state (from the ligand) to the $^5\text{D}_1$ and $^5\text{D}_0$ levels of the Eu^{3+} ion. It is possible to note that the R_L values, that is, the distance from the donor state located at the organic ligands and the Eu^{3+} ion nucleus, are a bit higher. Values down to 5.0 contributed for optimizing the energy transfer rates. Moreover, in both cases the back transfer rates were very high, mainly for EuMAI. This fact strongly contributed to a quencher effect for the $^5\text{D}_0$ emitter state. All this evidence suggested that vibronic coupling of the O–H oscillators from the aqua ligands and the triplet $^5\text{D}_{1,0}$ resonance acted as efficient nonradiative channels for Eu^{3+} emission, thus providing a plausible

Table 2. Calculated Values of Intramolecular Energy Transfer and Back-Transfer Rates for EuMAI^a

	ligand state (cm ⁻¹)		4f state (cm ⁻¹)	R _L (Å)	transfer rate (s ⁻¹)	back-transfer rate (s ⁻¹)
EuMAI Sparkle/PM3 Structure	singlet (37325.3)	→	⁵ D ₄ (27586)	7.12	4.30 × 10 ¹	2.14 × 10 ⁻¹⁹
	triplet (17582.2)	→	⁵ D ₁ (19027)	7.24	3.15 × 10 ⁹	4.03 × 10 ¹²
	triplet (17582.2)	→	⁵ D ₀ (17293)	7.24	6.97 × 10 ⁹	1.79 × 10 ⁹

^aThe R_L value is the distance from the donor state located at the organic ligands and the Eu³⁺ ion nucleus.

explanation for the short lifetime and low experimental quantum yields. The high values of A_{nrad} are in accordance with this fact (see Table 1).

The Tb³⁺ ions showed moderately influenced transitions by the symmetry of the ligand environment; however, those transitions combine induced electric dipole (ED) and magnetic dipole (MD) characters and no isolated MD transition like those of the Eu³⁺ ions. Therefore, this experiment is difficult due to the complex *J* degeneracy of the emitting levels of the Tb³⁺, preventing a wide spectroscopic investigation such as that performed for Eu³⁺ ions. The emission spectrum of TbMAI (see Figure 2) acquired at room temperature displayed the typical green Tb³⁺ emission associated with the ⁵D₄ → ⁷F_J transitions. The ⁵D₄ → ⁷F₅ transition centered at ca. 542 nm is the strongest one and corresponds to ca. 30% of the integrated emission spectrum. TbMAI showed a quantum yield of emission of 17% and a short lifetime (τ) of 0.40 ms. It may be justified by the contributions of O–H oscillators and due to the calculated triplet level to be below the Tb ⁵D₄ emitter state. Previous reports have demonstrated that when the energy difference between the lowest triplet state of the ligand is lower than about 2000 cm⁻¹, the thermal back transfer plays an important role for photoluminescence quenching.⁶⁵

Finally, both complexes were tested as probes in bioimaging experiments to stain MDA-MB-231 cancer cells. First, it is noted that both complexes were capable of transposing the cell membrane, and no precipitation could be noted during the cellular experiments, which are highly desired features. The MDA-MB-231 cells stained with EuMAI showed a slight red fluorescence signal with a distribution pattern (Figure 4) closely related with the fluorescence pattern observed with the samples incubated with TbMAI (discussed below). The fluorescent signal of EuMAI on MDA-MB-231 cells showed a minor association with a perinuclear region plus a homogeneous stain through the cell cytoplasm. The Eu³⁺-based compound also shows no fluorescent signal related with the cell's nucleus region; therefore, there is no affinity for DNA or others nuclear molecules, even after cell permeabilization procedures. Experiments with EuMAI show that this complex is not a good candidate for bioimaging because of its low fluorescence intensity inside the cells. Indeed, this quenching effect in the aqueous cellular environment could be expected, as already depicted from the photophysical data.

The MDA-MB-231 cells stained with TbMAI, however, showed an intense and a bright green fluorescence pattern associated with a wide perinuclear region plus homogeneous staining through the cell cytoplasm (Figure 5), therefore contrasting with the fluorescence intensity observed for EuMAI. Interestingly, the wide perinuclear region that shows a strong stain pattern (bright green) can be associated with endoplasmic reticulum, as compared with the common pattern observed for this organelle.⁶⁶ Indeed, probes capable of exclusive selection of the endoplasmic reticulum in the highly complex cellular environment are very difficult to design, therefore making their planning and synthesis a hard task.⁶⁷

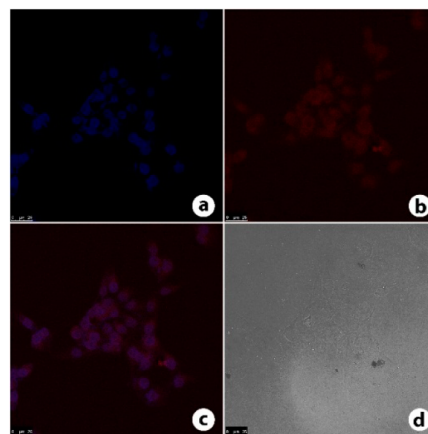


Figure 4. MDA-MB-231 cells. (a) Sample stained only with DAPI (blue). (b) Fluorescence pattern of EuMAI with minor association with the perinuclear region plus a homogeneous staining through the cell cytoplasm (red). Samples stained with EuMAI show no red fluorescent signal over the nucleus region. (c) Overlay image between a and b. (d) Phase contrast image of MDA-MB-231 cells with normal morphological aspects. Importantly, the red fluorescence emission of EuMAI showed herein was artificially slightly improved to facilitate visualization, and it does not represent the actual staining (color intensity) observed for this derivative.

TbMAI also showed no fluorescent signal associated with the cell's nucleus region. This feature demonstrated, by exclusion, no affinity of TbMAI with DNA or others nuclear structures such as histone basic proteins, even after cell permeabilization procedures, which would improve the chances of TbMAI to get inside of the cell nucleus. TbMAI showed a bright green fluorescent signal that persisted for all analysis time periods without fading off, hence making TbMAI an outstanding probe for bioimaging experiments to stain endoplasmic reticulum selectively.

EXPERIMENTAL SECTION

The detailed procedure for the syntheses of LnMAI (Ln = Eu³⁺, Tb³⁺) derivatives, NMR and high-resolution ESI-MS spectra, and fluorescence lifetime decay procedures are available in the Supporting Information.

CONCLUSION

Fluorescent lanthanide complexes based on the TSIL MAI-Cl constitute an attractive class of water-soluble compounds with high potential to be applied as a new family of molecular probes for bioimaging application. In this work, we performed a design of optical bioprobes based on hydrophilic TSIL as ligands and lanthanide ions for cell imaging. NMR spectra and ESI(+)-MS(/MS) provide strong evidence of the equilibrium among distinct lanthanide species in solution. In fact, substitution of one MAI ligand directly coordinated to Ln³⁺ ions by water molecules was favored in more dilute solutions. TbMAI displayed a green emission and lifetime of 0.40 ms when

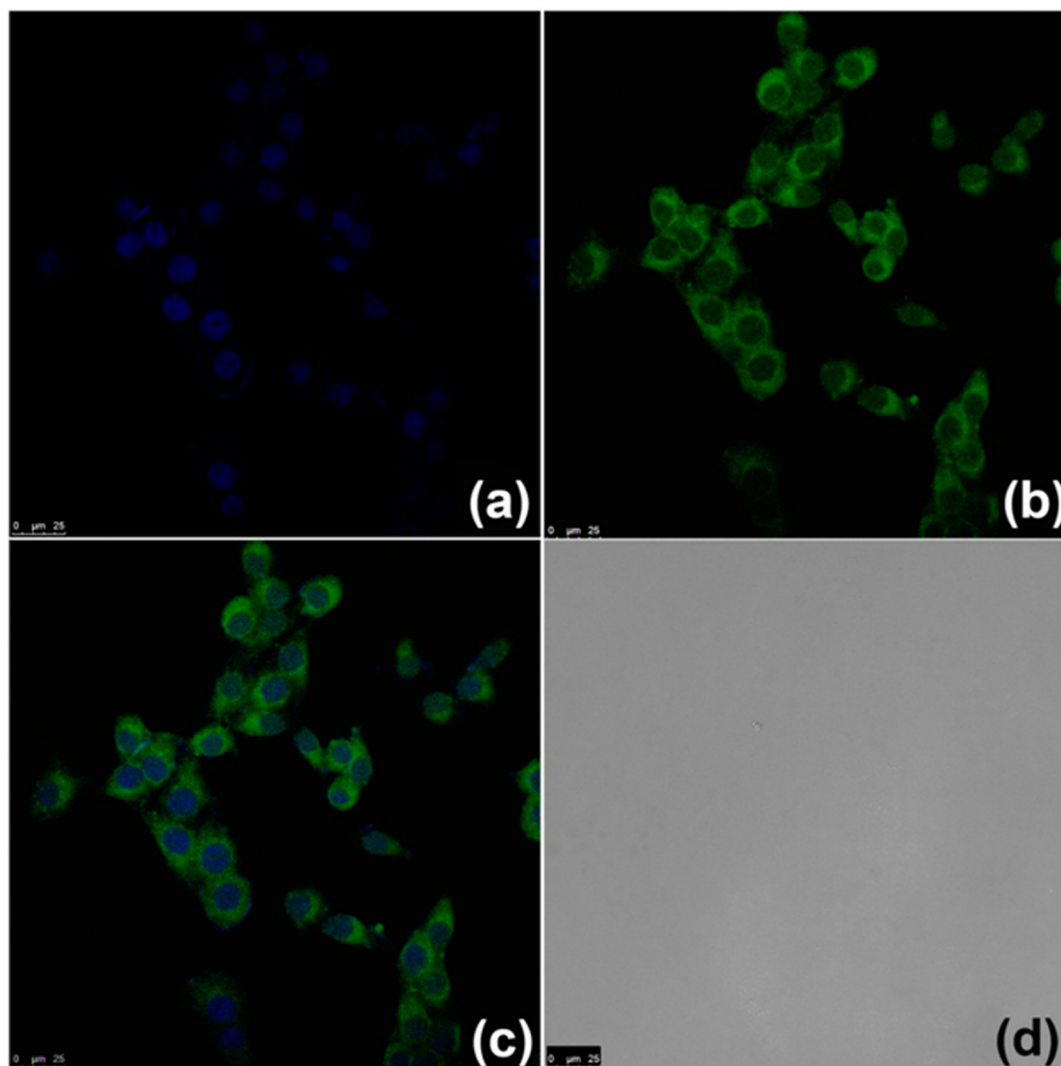


Figure 5. MDA-MB-231 cells. (a) Sample stained only with DAPI (blue). (b) Fluorescence pattern of **TbMAI** slightly associated with the perinuclear region plus a minor homogeneous staining through the cell cytoplasm (green). Further significant feature observed in b was no green staining over the nucleus region on the samples stained with **TbMAI**. (c) Overlay image between DAPI and **TbMAI**. (d) Phase contrast image of MDA-MB-231 cells with normal morphological aspects. Bright green fluorescence emission of **TbMAI** showed herein is the actual staining observed for this derivative.

excited at 367 nm. The coordination geometries, intensity parameters, and energy transfer rates for **EuMAI** were also calculated using Sparkle/PM3. Theoretical intensity parameters, quantum efficiencies, and quantum yields are in good agreement with experimental ones, clearly attesting to the efficacy of the theoretical methodologies. Both complexes were applied as molecular probes in cellular imaging experiments using MDA-MB-231 cells lineage. The good dispensability and prominent luminescent properties presented by **TbMAI** complex make it a molecular probe for further bioimaging experiments. Furthermore, its selectivity toward the endoplasmic reticulum opens up a new avenue for rational design of novel selective fluorescent bioprobes based on the strategy described herein.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

Experimental procedures, NMR spectra, ESI(+)-MS(/MS) analyses, lifetime decay curves. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marcelozohio@unb.br (M.O.R.); brenno.ipi@gmail.com (B.A.D.N.).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge CAPES, FAPDF, FINATEC, CNPq (INCT-Inami and INCT-Catalysis), FACEPE (APT-0859-1.06/08), FAPITEC-SE, and DPP-UnB for partial financial support. M.O.R. is also indebted to Leonis L. Luz.

■ REFERENCES

- (1) Plechkova, N. V.; Seddon, K. R. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 123–150.
- (2) Feroci, M.; Chiarotto, I.; Inesi, A. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 204–219.
- (3) Prediger, P.; Genisson, Y.; Correia, C. R. D. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 238–256.

- (4) Dupont, J.; Eberlin, M. N. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 257–272.
- (5) Pechtl, M. H. G.; Sahler, S. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 220–228.
- (6) Suarez, P. A. Z.; Ramalho, H. F. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 229–237.
- (7) Dupont, J.; Meneghetti, M. R. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2013**, *18*, 54–60.
- (8) Scholten, J. D.; Leal, B. C.; Dupont, J. *ACS Catal.* **2012**, *2*, 184–200.
- (9) Sebesta, R.; Kmentova, I.; Toma, S. *Green Chem.* **2008**, *10*, 484–496.
- (10) Lombardo, M.; Trombini, C. *ChemCatChem* **2010**, *2*, 135–145.
- (11) Tang, S. K.; Baker, G. A.; Zhao, H. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4030–4066.
- (12) Chaturvedi, D. *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 1236–1248.
- (13) Olivier-Bourbigou, H.; Magna, L.; Morvan, D. *Appl. Catal. A: Gen.* **2010**, *373*, 1–56.
- (14) Dupont, J.; de Souza, R. F.; Suarez, P. A. Z. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3667–3691.
- (15) Dupont, J.; Scholten, J. D. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1780–1804.
- (16) Dupont, J. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1223–1231.
- (17) Weingartner, H.; Cabrele, C.; Herrmann, C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 415–426.
- (18) Consorti, C. S.; Aydos, G. L. P.; Ebeling, G.; Dupont, J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 237–240.
- (19) Lee, S. G. *Chem. Commun.* **2006**, 1049–1063.
- (20) Consorti, C. S.; Aydos, G. L. P.; Ebeling, G. *Organometallics* **2009**, *28*, 4527–4533.
- (21) Consorti, C. S.; Aydos, G. L. P.; Ebeling, G.; Dupont, J. *Appl. Catal. A: Gen.* **2009**, *371*, 114–120.
- (22) Hallett, J. P.; Welton, T. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3508–3576.
- (23) Neto, B. A. D.; Correa, J. R.; Silva, R. G. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 5291–5301.
- (24) Chen, Y. G.; Guo, W. H.; Ye, Z. Q.; Wang, G. L.; Yuan, J. L. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6266–6268.
- (25) Endres, P. J.; MacRenaris, K. W.; Vogt, S.; Meade, T. J. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2049–2059.
- (26) Deiters, E.; Song, B.; Chauvin, A. S.; Vandevyver, C. D. B.; Gummy, F.; Bunzli, J. C. G. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 885–900.
- (27) Steemers, F. J.; Meuris, H. G.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; vanderTol, E. B.; Verhoeven, J. W. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4229–4235.
- (28) Zhou, J.; Zhu, X. J.; Chen, M.; Sun, Y.; Li, F. Y. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6201–6210.
- (29) Pal, R.; Parker, D. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1020–1033.
- (30) Guo, D. L.; Chen, T.; Ye, D. J.; Xu, J. Y.; Jiang, H. L.; Chen, K. X.; Wang, H.; Liu, H. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2884–2887.
- (31) Nadler, A.; Schultz, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 2408–2410.
- (32) Hu, Z. J.; Tian, X. H.; Zhao, X. H.; Wang, P.; Zhang, Q.; Sun, P. P.; Wu, J. Y.; Yang, J. X.; Tian, Y. P. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12467–12469.
- (33) Wong, K.-L.; Law, G.-L.; Murphy, M. B.; Tanner, P. A.; Wong, W.-T.; Lam, P. K.-S.; Lam, M. H.-W. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 5190–5196.
- (34) Palmer, R. J.; Butenhoff, J. L.; Stevens, J. B. *Environ. Res.* **1987**, *43*, 142–156.
- (35) de Bettencourt-Dias, A.; Barber, P. S.; Bauer, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6987–6994.
- (36) Zhao, Q.; Huang, C. H.; Li, F. Y. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2508–2524.
- (37) Bunzli, J. C. G.; Piguet, C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 1048–1077.
- (38) Bunzli, J. C. G. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2729–2755.
- (39) Bunzli, J. C. G. *Chem. Lett.* **2009**, *38*, 104–109.
- (40) Bunzli, J. C. G.; Comby, S.; Chauvin, A. S.; Vandevyver, C. D. B. *J. Rare Earths* **2007**, *25*, 257–274.
- (41) Li, H. R.; Shao, H. F.; Wang, Y. G.; Qin, D. S.; Liu, B. Y.; Zhang, W. J.; Yan, W. D. *Chem. Commun.* **2008**, 5209–5211.
- (42) Feng, J.; Zhang, H. J. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 387–410.
- (43) Eliseeva, S. V.; Bunzli, J. C. G. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 189–227.
- (44) Binnemans, K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2592–2614.
- (45) Wen, T. T.; Li, H. R.; Wang, Y. G.; Wang, L. Y.; Zhang, W. J.; Zhang, L. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 1607–1612.
- (46) Dupont, J.; Suarez, P. A. Z. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 2441–2452.
- (47) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Gatto, C. C.; Ramos, L. M.; de Vasconcelos, N. M.; Corrêa, J. R.; Costa, M. B.; de Oliveira, H. C. B.; Silva, R. G. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1524–1532.
- (48) Oliveira, F. F. D.; Santos, D.; Lapis, A. A. M.; Correa, J. R.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Moreira, P. F.; de Oliveira, V. C.; Quina, F. H.; Neto, B. A. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6001–6007.
- (49) Alvim, H. G. O.; Fagg, E. L.; de Oliveira, A. L.; de Oliveira, H. C. B.; Freitas, S. M.; Xavier, M.-A. E.; Soares, T. A.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Silva, W. A.; Neto, B. A. D. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4764–4777.
- (50) Weber, I. T.; de Melo, A. J. G.; Lucena, M. A. D.; Rodrigues, M. O.; Alves, S. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4720–4723.
- (51) Weber, I. T.; Terra, I. A. A.; de Melo, A. J. G.; Lucena, M. A. D.; Wanderley, K. A.; Paiva-Santos, C. D.; Antonio, S. G.; Nunes, L. A. O.; Paz, F. A. A.; de Sa, G. F.; Junior, S. A.; Rodrigues, M. O. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 3083–3087.
- (52) Rodrigues, M. O.; Dutra, J. D. L.; Nunes, L. A. O.; de Sa, G. F.; de Azevedo, W. M.; Silva, P.; Paz, F. A. A.; Freire, R. O.; Junior, S. A. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 19951–19957.
- (53) Oliveira, F. F. D.; dos Santos, M. R.; Lalli, P. M.; Schmidt, E. M.; Bakuzis, P.; Lapis, A. A. M.; Monteiro, A. L.; Eberlin, M. N.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10140–10147.
- (54) Binnemans, K. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4283–4374.
- (55) Kirby, A. F.; Foster, D.; Richardson, F. S. *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *95*, 507–512.
- (56) Tiseanu, C.; Parvulescu, V. I.; Kumke, M. U.; Dobroiu, S.; Gessner, A.; Simon, S. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 5784–5791.
- (57) Coelho, F.; Eberlin, M. N. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 5261–5263.
- (58) Borges, A. S.; Dutra, J. D. L.; Freire, R. O.; Moura, R. T.; Da Silva, J. G.; Malta, O. L.; Araujo, M. H.; Brito, H. F. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 12867–12878.
- (59) dos Santos, E. R.; Freire, R. O.; da Costa, N. B.; Paz, F. A. A.; de Simone, C. A.; Júnior, S. A.; Araújo, A. A. S.; Nunes, L. A. n. O.; de Mesquita, M. E.; Rodrigues, M. O. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 7928–7936.
- (60) Rodrigues, M. O.; Paz, F. A.; Freire, R. O.; de Sa, G. F.; Galembeck, A.; Montenegro, M. C.; Araujo, A. N.; Alves, S. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12181–12188.
- (61) Liu, F. Y.; Roces, L.; Ferreira, R. A. S.; Garcia-Granda, S.; Garcia, J. R.; Carlos, L. D.; Rocha, J. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 3696–3701.
- (62) Supkowski, R. M.; Horrocks, W. D., Jr. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *340*, 44–48.
- (63) Freire, R. O.; Rocha, G. B.; Simas, A. M. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1638–1645.
- (64) Dutra, J. D. L.; Freire, R. O. *J. Photochem. Photobiol., A* **2013**, *256*, 29–35.
- (65) Latva, M.; Takalo, H.; Mikkala, V. M.; Matachescu, C.; RodriguezUbis, J. C.; Kankare, J. *J. Lumin.* **1997**, *75*, 149–169.
- (66) Zhong, Y. W.; Fang, S. Y. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 28057–28066.
- (67) Srikun, D.; Albers, A. E.; Nam, C. I.; Iavaron, A. T.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4455–4465.