



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Compostos de Coordinación como Sondas Luminiscentes
por Imaxe Óptica**

**Compuestos de Coordinación como Sondas
Luminiscentes por Imagen Óptica**

Coordination Compounds as Optical Imaging Probes

Antía Freire García

Curso: 2020 - 2021.

Convocatoria: Setembro

Directores: *David Esteban Gómez
Carlos Platas Iglesias*

Memoria do Traballo de Fin de
Grao en Química pola UDC presentada por
Dña. **Antía Freire García** na Facultade de
Ciencias da Universidade da Coruña.

Setembro 2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus directores, Dr. David Esteban Gómez e Dr. Carlos Platas Iglesias, por descubrireme de maneira tan divertida o increíble mundo dos lantanoides, por axudarme e por acompañarme tanto durante a elaboración deste traballo. Grazas a Dra. Tamara Hermida Gómez, por tantas celuliñas, ratos e risas.

Quero dar as grazas tamén a Rocío, Charlene, Aurora e Fátima, por estar conmigo cada día demostrando que ata a peor purificación é mellor con música (e en compañía).

Grazas á miña familia, de sangue e escollida, por todo o apoio, cariño e paciencia durante estes anos (que non foi pouco). En especial a Mauro, por estar sempre ao meu carón, enchendo de bós momentos esta etapa da miña vida.

Finalmente, quero agradecer as miñas compañeiras e compañeiros por todo o compartido durante estes longos 6 anos.

ABREVIATURAS

AnAP: 2-aminoacetofenona

cyclen: 1,4,7,10-tetraazacyclododecane

DO3A: ácido 1,4,7,10-tetraazacyclododecano-1,4,7-triacético

DOTA: ácido 1,4,7,10-tetraazacyclododecano-1,4,7,10-tetracético

ED: dipolo eléctrico

eq: equivalentes

ESI: ionización por electrospray

HAP: hidroxiacetofenona

IRM: imaxe por resonancia magnética

MD: dipolo magnético

min: minutos

MPLC: *medium performance liquid chromatography*

MS: espectrometría de masas

MAP: metoxiacetofenona

Redox: reducción-oxidación

RMN: resonancia magnética nuclear

SAP: *Square-antiprismatic* (antiprisma cadrado)

^tBu: tert-butil

UV-Vis: Ultravioleta-visible

CONTIDOS

1. Resumo	1
2. Introducción	3
2.1. Sondas luminiscentes en bioimaxe	3
2.2. Química de coordinación dos lantanoides	5
2.2.1. Características xerais dos lantanoides	5
2.2.2. Compostos de coordinación dos ións lantanoides	8
2.2.3. Propiedades ópticas	9
2.2.4. Propiedades luminescentes do Eu(III)	12
2.3. Ligandos macrocíclicos e derivados do DOTA	13
2.4. Técnicas microscópicas para a aplicación de sondas luminiscentes	14
2.4.3. Microscopía de fluorescencia convencional	15
2.4.4. Microscopía de fluorescencia confocal	15
2.4.5. Outras técnicas de interese	16
2.5. Estudos de viabilidade e toxicidade celular	17
3. Precedentes e obxectivos	18
4. Experimental	20
4.1. Disolventes e reactivos	20
4.2. Calendario de traballo	20
4.3. Preparación de disolucións	21
4.4. Síntese <i>in situ</i> do complexo Eu(DO3A-o-AnAP)	21
4.5. Síntese	22
4.5.1. Síntese do ligando DO3A-MFAM	22
4.5.2. Síntese <i>in situ</i> do complexo Eu(DO3A-MFAM)	23
4.5.3. Técnicas de purificación	24
4.5.4. Técnicas de caracterización	25
4.6. Estudo fotofísico	25
4.6.1. Espectroscopía electrónica de absorción ultravioleta-visible	26
4.6.2. Espectroscopía electrónica de excitación e emisión	26

4.6.3.	Cálculo do rendemento cuántico de emisión	26
4.6.4.	Determinación dos tempos de vida de emisión	27
4.6.5.	Estimación do número de moléculas de auga coordinadas (q).....	27
4.7.	Estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> do Eu(DO3A-FMAM).....	28
4.7.1.	Cultivo da liña celular	28
4.7.2.	Ensaio de viabilidade celular	29
4.7.3.	Análise dos datos obtidos.....	29
5.	Resultados e discusión	31
5.1.	Síntese e caracterización.....	31
5.2.	Estudo fotofísico	32
5.2.1.	Espectroscopía electrónica de absorción ultravioleta-visible	32
5.2.2.	Espectroscopía electrónica de excitación e emisión.....	35
5.2.3.	Cálculo do rendemento cuántico de emisión	37
5.2.4.	Determinación dos tempos de vida de emisión	38
5.2.5.	Estimación do número de moléculas de auga coordinadas (q).....	39
5.3.	Ensaio de viabilidade celular	39
6.	Conclusións	41
7.	Bibliografía.....	45
8.	Anexos.....	51
8.1.	Espectros	51
8.1.1.	Espectros de masas.....	51
8.1.2.	Espectros de RMN	52
8.1.3.	Espectros IR.....	54
8.1.4.	Espectros de excitación	55
8.2.	Estudo de viabilidade celular	58
8.2.1.	Resultados cuantitativos	58
8.2.2.	Análise estadístico	58

1. RESUMO

A bioimaxe é unha ferramenta fundamental en moitas áreas da bioloxía e da biomedicina que experimentou grandes avances nos últimos anos. Unha das técnicas máis empregadas en bioimaxe é a microscopía de fluorescencia, facendo uso de sondas luminiscentes que funcionen como marcadores. Existen moitos tipos de sondas luminiscentes diferentes, podendo destacar polas súas propiedades fotofísicas características as baseadas en complexos con ións lantanoides. No presente traballo realizouse un estudo fotofísico comparativo de 5 complexos de Eu(III) con ligandos derivados do macrociclo DO3A (DO3A-*p*-metoxiacetofenona, DO3A-*o*-metoxiacetofenona, DO3A-*p*-hidroxiacetofenona, DO3A-*o*-hidroxiacetofenona e DO3A-*o*-aminoacetofenona), análogos a complexos de Gd(III) xa estudados en bibliografía como axentes de contraste en IRM. A maiores, sintetizouse un sexto complexo cunha nova funcionalización do DO3A (DO3A-*N*-metilftalimida acetamida), que foi caracterizado estrutural e fotofísicamente. Como parte do estudo fotofísico realizado para os 6 complexos anteriores analizáronse os seus espectros de absorción, excitación e emisión, determináronse os seus rendementos cuánticos de emisión, tempos de vida do estado excitado e número de hidratación. Finalmente, levouse a cabo un ensaio preliminar da biocompatibilidade do complexo sintetizado (Eu(DO3A-MFAM)) mediante un estudo de viabilidade celular en células *HFF-1*.

Palabras chave: lantanoides, sondas luminiscentes, bioimaxe, química de coordinación, europio, complexos metálicos, viabilidade celular.

RESUMEN

La bioimagen es una herramienta clave en muchas áreas de la biología y la biomedicina que ha experimentado grandes avances en los últimos años. Una de las técnicas más utilizadas en bioimagen es la microscopía de fluorescencia, haciendo uso de sondas luminiscentes que funcionen como marcadores. Existen muchos tipos diferentes de sondas luminiscentes, pudiendo destacar las basadas en complejos con iones lantanoides por sus características fotofísicas. En el presente trabajo se ha realizado un estudio fotofísico comparativo de 5 complejos de Eu(III) con ligandos derivados del macrociclo DO3A (DO3A-*p*-metoxiacetofenona, DO3A-*o*-metoxiacetofenona, DO3A-*p*-hidroxiacetofenona, DO3A-*o*-hidroxiacetofenona y DO3A-*o*-aminoacetofenona), análogos a los complejos Gd(III) ya estudiados en bibliografía como agentes de contraste en IRM. A mayores, se ha sintetizado un sexto complejo con una nueva funcionalización del DO3A (DO3A-*N*-metilftalimida acetamida), que se

caracterizó estructural y fotofísicamente. Como parte del estudio fotofísico realizado para los 6 complejos anteriores, se analizaron sus espectros de absorción, excitación y emisión, y se determinaron sus rendimientos cuánticos de emisión, el tiempo de vida del estado excitado y el número de hidratación. Finalmente, se realizó un ensayo preliminar de biocompatibilidad del complejo sintetizado (Eu (DO3A-MFAM)) mediante un estudio de viabilidad celular en células *HFF-1*.

Palabras clave: lantanoides, sondas luminiscentes, bioimagen, química de coordinación, europio, complejos metálicos, viabilidad celular.

ABSTRACT

Bioimaging is a key tool in many areas of biology and biomedicine that has experienced great advances in recent years. One of the most used techniques in bioimaging is fluorescence microscopy, which makes use of luminescent probes that function as markers. There are many different types of luminescent probes, among which stand out those based on complexes with the lanthanoid ions, due to their peculiar photophysical properties. In the present work a comparative photophysical study has been carried out, analyzing five Eu(III) complexes with ligands derived from the DO3A macrocycle (DO3A-*p*-methoxyacetophenone, DO3A-*o*-methoxyacetophenone, DO3A-*p*-hydroxyacetophenone, DO3A-*o*-hydroxyacetophenone and DO3A-*o*-aniline acetophenone), analogues to the Gd(III) complexes already studied in the literature as contrast agents in MRI. A sixth complex with a new functionalization of DO3A (DO3A-*N*-methylphthalimide acetamide) was synthesized, as its structural and photophysical properties characterized. The photophysical studies carried out for the six complexes include the analysis of their absorption, excitation and emission spectra, their emission quantum yields, the lifetime of the excited state and their hydration numbers. Finally, a preliminary biocompatibility test of the synthesized complex (Eu(DO3A-MFAM)) was performed by means of a cell viability study using *HFF-1* cells.

Keywords: lanthanoids, luminescent probes, bioimaging, coordination chemistry, europium, metal complexes, cell viability.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Sondas luminiscentes en bioimaxe

O estudo dos diferentes procesos biolóxicos, trastornos metabólicos e outras enfermidades son áreas de especial importancia dentro da biomedicina. Un maior entendemento dos fenómenos moleculares implicados é imprescindible para o desenvolvemento de novas estratexias e fármacos para combater de maneira efectiva estas enfermidades. Para conseguir isto, unha ferramenta fundamental é a bioimaxe.¹ Grazas a ela é posible realizar o seguimento a tempo real de procesos biomoleculares e celulares, cuantificar a presenza dun metabolito, estudar diversas interaccións a un nivel molecular, etc.² O concepto de bioimaxe inclúe varias técnicas de visualización, que idealmente non deberían ser invasivas nin interferir cos diferentes procesos vitais. Entre estas destacan a microscopía confocal de barrido con láser e a microscopía óptica de fluorescencia convencional, así como a imaxe por resonancia magnética nuclear (RMN) e as técnicas baseadas en raios-X ou na imaxe nuclear.³

Existen diferentes tipos de compostos que se poden empregar como marcadores en bioimaxe, dependendo do método de visualización utilizado. Este traballo céntrase nas sondas luminiscentes, que gañaron moita importancia grazas ao desenvolvemento e melloras na microscopía de fluorescencia nos últimos anos. Pódense definir estas sondas como sistemas moleculares con grupos cromóforos na súa estrutura, capaces de detectar e indicar diferentes factores como por exemplo a cantidade dun tipo celular específico, dunha molécula implicada nun proceso fisiolóxico, etc.⁴ Desta forma é posible recompilar información dende niveis celulares ou subcelulares, ata tecidos e organismos pluricelulares. As propiedades fotofísicas máis importantes a ter en conta neste tipo de compostos son: a) as lonxitudes de onda de excitación e de emisión máximas; b) a intensidade da fluorescencia, que ven dada polo seu rendemento cuántico e o seu coeficiente de extinción molar; c) o tempo de vida do estado excitado. Estas propiedades, xunto con outros factores como a sensibilidade e a especificidade, serán as que determinen a calidade e aplicacións dunha sonda.⁵

As sondas luminiscentes pódense clasificar de maneira xeral en función da súa natureza orgánica ou inorgánica. As orgánicas foron as primeiras en ser estudadas e aplicadas en imaxe óptica, xa que moitas delas están presentes de forma natural en diversos organismos. Actualmente, a maior parte das sondas empregadas seguen pertencendo a esta categoría.⁶

Por outra banda, as sondas inorgánicas están baseadas en compostos de coordinación ou complexos metálicos, nos que o átomo metálico central presenta propiedades fotofísicas de interese. Destacan especialmente os complexos con ións dos metais lantanoides, como por exemplo o europio e o terbio.³ As vantaxes de usar estes metais nas sondas son as súas excepcionais propiedades ópticas: a) bandas de emisión intensas e estreitas; b) tempos de vida do estado excitado longos, que permiten suprimir o efecto da autofluorescencia de fondo; c) unha alta fotoestabilidade ao longo do tempo.⁷ Outro aspecto interesante destas sondas é a posibilidade de alterar as súas propiedades químicas modificando os ligandos presentes na súa estrutura, podendo así deseñar complexos que presenten un comportamento determinado.^{8,9} As propiedades desexables ao preparar estes complexos para a súa aplicación en imaxe óptica son: a) que teña lugar unha boa transferencia de enerxía entre o grupo antena (ver apartado 2.2.3. *Propiedades ópticas*) e o centro metálico, b) que a lonxitude de onda de absorción máxima se atope no rango visible, de xeito que non se dane o medio a estudar co uso de radiación UV, c) resposta a distintos factores como o pH ou o potencial electroquímico (sondas intelixentes).

Existen múltiples exemplos na bibliografía de sondas baseadas en europio e terbio para o seu uso como sondas luminescentes en bioimaxe.¹⁰⁻¹⁴ Entre estas pódense destacar sistemas dispoñibles comercialmente, como a serie de sondas luminescentes *Eurotracker* (**Figura 1**).¹⁵

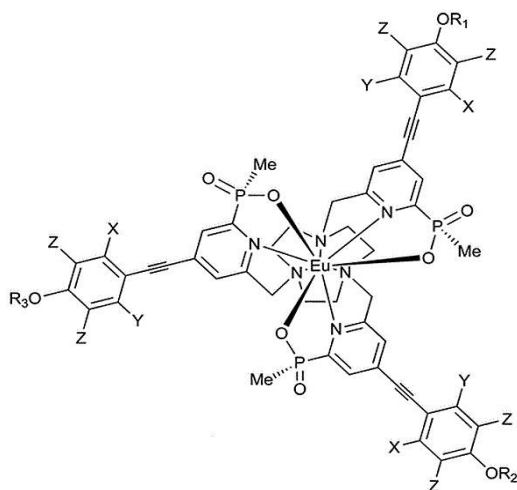


Figura 1: Modelo da serie de sondas luminescentes de Eu(III) patentadas baixo o nome *Eurotracker*.¹⁵

Igualmente, existen complexos con outros metais non lantanoides como rutenio(II), osmio(II), renio(I), iridio(III), rodio(III), platino(II), ouro(I) ou zinc(II) que foron estudados como potenciais sondas luminiscentes, se ben de momento teñen unha menor implantación que os complexos derivados de ións lantanoides.¹⁴

2.2. Química de coordinación dos lantanoides

2.2.1. Características xerais dos lantanoides

Denomínanse lantanoides os 15 elementos químicos con números atómicos entre o 57 (lantano, La) e o 71 (lutecio, Lu). Estes elementos presentan propiedades químicas moi similares, determinadas en gran medida pola estrutura da súa rexión orbital máis externa, é dicir, os seus orbitais de valencia. A estrutura electrónica deste conxunto de elementos consiste nun *core* de xenon e os electróns de valencia dos orbitais 4*f* e 6*s*. Os orbitais 4*f* carecen de nodos radiais, o que resulta nunha nun carácter máis compacto dos mesmos. Como consecuencia disto, son orbitais que se atopan pouco apantallados e contraídos en torno ao núcleo, rodeados polos orbitais 5*d*, 6*s* e 6*p* máis externos.¹⁶ Isto pódese observar claramente na **Figura 2**, onde se representa a función de probabilidade de distribución radial para os orbitais máis externos dun lantanoide típico como é o Sm^{3+} .¹⁷

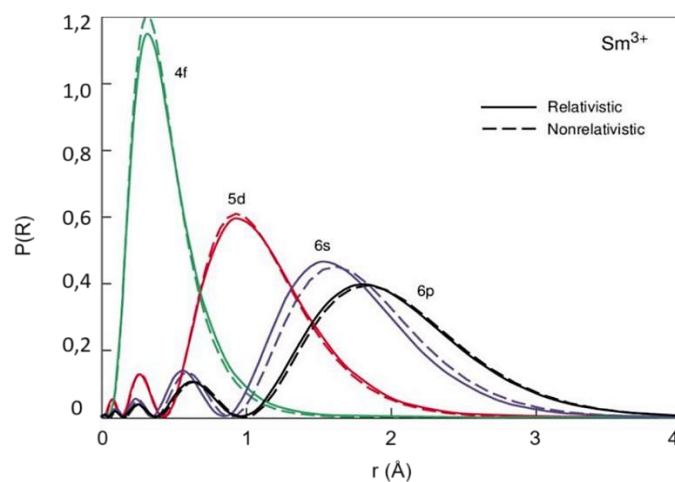


Figura 2: Función de probabilidade radial de atopar electróns a unha distancia dada do núcleo para os orbitais 4*f*, 5*d*, 6*s* e 6*p* do Sm^{3+} .¹⁷

Polo tanto, o modelo de configuración electrónica para o estado fundamental dos lantanoides é $[\text{Xe}]4f^n5d^06s^2$, onde o valor de *n* se vai incrementando dende 1 ata 14. Sen embargo, hai 3 excepcións que presentan un electrón nos orbitais 5*d*: o cerio,

pola proximidade enerxética entre estes orbitais e os 4f, o gadolinio, que mantén os orbitais 4f semioocupados, e o lutecio, que ten chea a capa 4f.¹⁸

Variación do radio iónico e contracción lantánida

Ao avanzar na serie dos lantanoides obsérvase unha diminución do radio atómico e iónico segundo aumenta o número atómico. Esta tendencia é o que se coñece como contracción lantánida (**Figura 3**). A causa deste fenómeno reside no baixo efecto apantallante dos electróns ocupando os orbitais 4f sobre aqueles electróns ocupando ese mesmo subnivel, grazas á marcada direccionalidade destes orbitais. Deste xeito, ao incrementarse o número atómico e con el o número de electróns nestes orbitais, o aumento do apantallamento entre os electróns 4f vese superado polo efecto do aumento da carga nuclear efectiva sobre os mesmos.¹⁶

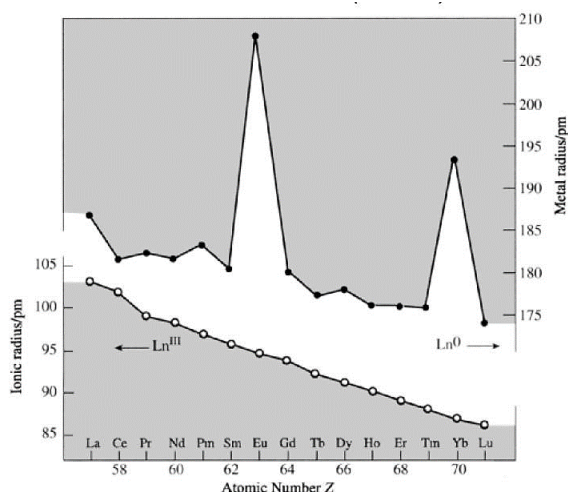


Figura 3: Tendencias no tamaño do radio atómico e iónico nos metais lantanoides.¹⁸

Como se pode observar na **Figura 3**, no caso do radio atómico atópanse anomalías para o Eu e o Yb que poderían estar asociadas á súa diferente estrutura cristalina e que condicionarían a estimación do valor do radio determinado a partir da metade da distancia M-M. Por outra banda, outros autores suxiren que no caso destes dous metais un dos electróns que nos demais lantanoides ocuparía a banda de condución 5d_{6s} se atopa no seu lugar nos orbitais 4f. Isto resultaría nun aumento de tamaño debido ás repulsións interelectrónicas, provocando esta irregularidade.¹⁸

Estado de oxidación e propiedades redox

Se ben na química acuosa dos lantanoides predomina o estado de oxidación +3, en disolución acuosa tamén se poden xerar catións en estados de oxidación +2 (Eu, Yb, Sm) e máis raramente +4 (Ce), que tenden a oxidarse e reducirse

respectivamente. A dominancia do estado de oxidación formal +3 é resultado do balance existente entre as enerxías de ionización e as enerxías de hidratación ou coordinación. Por unha banda, a primeira e segunda enerxías de ionización dos lantanoides son relativamente baixas, xa que implican electróns do orbital 6s (moi externo). Sen embargo, a terceira enerxía de ionización é maior, ao implicar a retirada de electróns dos orbitais 4f, máis compactos e atraídos polo núcleo (ou dos orbitais 5d nas excepcións mencionadas anteriormente). Este aumento do valor da terceira enerxía de ionización vese compensado polo incremento na enerxía de hidratación do catión +3, o cal está asociado ao menor tamaño que presentan os catións neste estado de oxidación grazas ás baixas repulsións interelectrónicas dunha capa 4f moi compactada.^{16,18,19} O balance enerxético de todos estes factores implicados amósase na **Figura 4**.

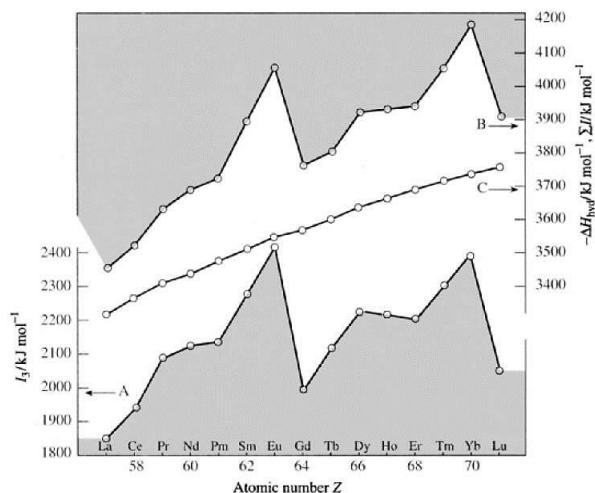


Figura 4: Variación da terceira enerxía de ionización (A), da suma das tres enerxías de ionización (B) e da entalpía de hidratación do catión trivalente, en escala negativa (C), que determinan en conxunto o estado de oxidación.¹⁸

No relativo aos potenciais de redución, estes varían levemente na serie dos lantanoides ($E^0_{(La^{3+}/La)} = -2,38$ V, $E^0_{(Lu^{3+}/Lu)} = -2,20$ V), atopándose poucas irregularidades. O catión Eu^{2+} pode ser xerado en medio acuoso por redución, e a súa oxidación é un proceso relativamente lento. Algo semellante ocorre cos catións Sm^{2+} e Yb^{2+} , se ben nestes casos a súa oxidación é rápida.¹⁹ Os estados de oxidación superiores a +3 non son enerxéticamente posibles debido á gran carga nuclear efectiva á que están sometidos os demais electróns dos orbitais 4f, excepto no caso xa mencionado do cerio.¹⁶

Na **Táboa 1** recóllense algunhas das propiedades máis relevantes dos lantanoides.

Táboa 1: Resumo das propiedades dos lantanoides.¹⁸

Property	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Atomic number	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
Number of naturally occurring isotopes	4	1	7	—	7	2	7	1	7	1	6	1	7	2
Outer electron configuration	4f ¹ 5d ¹ 6s ²	4f ³ 6s ²	4f ⁴ 6s ²	4f ⁵ 6s ²	4f ⁶ 6s ²	4f ⁷ 6s ²	4f ⁷ 5d ¹ 6s ²	4f ⁹ 6s ²	4f ¹⁰ 6s ²	4f ¹¹ 6s ²	4f ¹² 6s ²	4f ¹³ 6s ²	4f ¹⁴ 6s ²	4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ²
Atomic weight	140.116(1)	140.90765(2)	144.24(3)	—	150.36(3)	151.964(1)	157.25(3)	158.92534(2)	162.50(3)	164.93032(2)	167.26(3)	168.93421(2)	173.04(3)	174.967(1)
Metal radius (CN 6)/pm	181.8	182.4	181.4	183.4	180.4	208.4	180.4	177.3	178.1	176.2	176.1	175.9	193.3	173.8
Ionic radius (CN 6)/pm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IV	87	85	—	—	—	—	—	76	—	—	—	—	—	—
III	102	99	98.3	97	95.8	94.7	93.8	92.3	91.2	90.1	89.0	88.0	86.8	86.1
II	—	—	129 ^(a)	—	122 ^(b)	117	—	—	107	—	—	103	102	—
E°(M ⁴⁺ /M ³⁺)/V	1.72	3.2 ^(c)	—	—	—	—	—	—	3.1 ^(c)	—	—	—	—	—
E°(M ³⁺ /M ²⁺)/V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
E°(M ³⁺ /M)/V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
E°(M ²⁺ /M ⁺)/V	-2.34	-2.35	-2.32	-2.29	-2.30	-1.99	-2.28	-2.31	-2.29	-2.33	-2.32	-2.32	-2.22	-2.30
MP/°C	798	931	1021	1042	1074	822	1313	1365	1412	1474	1529	1545	819	1663
BP/°C	3433	3520	3074	(3000)	1794	1429	3273	3230	2567	2700	2868	1950	1196	3402
ΔH _{ion} /kJ mol ⁻¹	5.2(±1.2)	11.3(±2.1)	7.13	—	8.9(±0.4)	—	—	—	—	—	—	—	—	3.35
ΔH _{hyd} /kJ mol ⁻¹	398	331	289	—	165(±17)	176	301	293	280	280	280	247	159	414
ΔH _f (monatomic gas)/kJ mol ⁻¹	419	356	328	301	207	178	398	389	291	301	317	232	152	—
Ionization energies/kJ mol ⁻¹	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1st	541	522	530	536	542	547	595	569	567	574	581	589	603	513
2nd	1047	1018	1034	1052	1068	1085	1172	1112	1126	1139	1151	1163	1175	1341
3rd	1940	2090	2128	2140	2285	2425	1999	2122	2230	2221	2207	2305	2408	2054
ΔH (hydration Ln ³⁺)/kJ mol ⁻¹	3370	3413	3442	3478	3515	3547	3571	3605	3637	3667	3691	3717	3739	3760
Density(25°C)/g cm ⁻³	6.770	6.773	7.007	—	7.520	5.234	7.900	8.229	8.550	8.795	9.066	9.321	6.965	9.840
Electrical resistivity (25°C)/μ ohm cm	73	68	64	(50)	88	90	134	114	57	87	87	79	29	79

^(a)CN = 8.

^(b)CN = 7.

^(c)Estimated values since these M^{IV} are not stable in aqueous solution.

2.2.2. Compostos de coordinación dos ións lantanoides

Os ións lantanoides forman complexos de coordinación cunha elevada compoñente electrostática e moi baixa contribución covalente. Isto é debido a que os orbitais fronteira 4f son moi internos e teñen un solapamento moi pouco efectivo cos orbitais dos ligandos. Por esta mesma razón, estes orbitais non teñen unha grande influencia na estereoquímica dos complexos, e os ligandos distribúense no espazo minimizando as repulsións entre eles.¹⁶

Os ións lantanoides son ácidos de Lewis duros,^{20,21} polo que segundo a clasificación de ácidos e bases de Pearson, forman complexos estables con ligandos con átomos dadores duros, como o osíxeno e o nitróxeno, así como co ión fluoruro. Ademais, a dureza dos catións lantanoides increméntase ao avanzar na serie como resultado da contracción lantánida xa comentada. Esta diminución do radio iónico tradúcese tamén nunha diminución do índice de coordinación dos catións (dende un máximo de 12 ao inicio da serie ata un máximo de 9). Os complexos máis estables de lantanoides son aqueles formados con ligandos macrocíclicos de tipo poliamino policarboxilato, entre os que destacan os derivados do *cyclen* (1,4,7,10-tetraazacyclododecano), como por exemplo o DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazacyclododecano-1,4,7,10-tetraacético) ou o DO3A (ácido 1,4,7,10-tetraazacyclododecano-1,4,7-triacético) (**Figura 5**).¹⁶

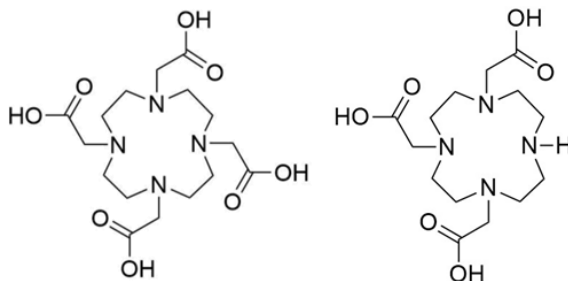


Figura 5: Esquerda: Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA). Dereita: Ácido 1,4,7-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (DO3A).

2.2.3. Propiedades ópticas

Gran parte das aplicacións comerciais, tecnolóxicas e do interese en investigación dos lantanoides derivan das súas singulares propiedades ópticas e magnéticas. En primeiro lugar, no relativo aos seus espectros electrónicos de absorción, pódense considerar tres tipos de transicións electrónicas:

- 1) Transicións electrónicas de transferencia de carga: Teñen lugar entre orbitais centrados no metal e orbitais dos ligandos, dando lugar a bandas de absorción moi enerxéticas pola grande diferenza de enerxía entre ambos orbitais. Ademais, tamén son transicións moi intensas, ao non estar prohibidas polas regras de selección, e anchas, polo desdoblamento vibracional.
- 2) Transicións electrónicas *d-f*: Están centradas no ion lantanoide e son raramente observadas, debido á grande diferenza enerxética entre estes orbitais.
- 3) Transicións electrónicas *f-f*: Están centradas tamén no centro metálico e son moi abundantes, grazas a presenza de múltiples niveis excitados relativamente próximos en enerxía. Na **Figura 6** recóllense os diferentes termos espectrais e niveis enerxéticos implicados nas transicións *f-f* máis comúns, xunto co termo do estado fundamental correspondente para cada un dos ións lantanoides.²² Estas transicións dan lugar a bandas de absorción pouco intensas, xa que son transicións prohibidas pola regra de Laporte.¹⁶ Se ben esta regra pode relaxarse mediante distintos mecanismos como o acoplamento vibracional, a mestura de orbitais con diferente valor de *l* ou un carácter parcialmente covalente no enlace metal-ligando, estas vías de relaxación son menos eficaces nos lantanoides que nas transicións *d-d* dos metais de transición. Unha das principais causas disto é a elevada diferenza de enerxía entre os orbitais *4f* e *5d*. Sen embargo, as transicións

f-f, aínda que pouco intensas, son estreitas e ben definidas, xa que se ven pouco afectadas polo entorno. Ademais, polo carácter interno e compacto destes orbitais, normalmente os espectros de absorción dun ión lantanoide varían pouco independentemente do ligando presente.³

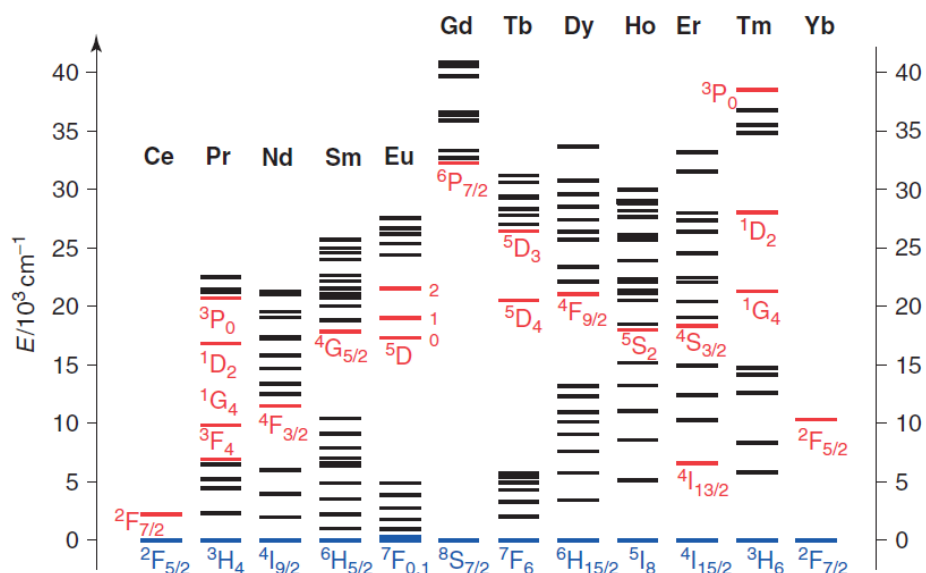


Figura 6: Diagrama de niveis enerxéticos dos catións trivalentes lantanoide. En azul indícase o estado fundamental, e en vermello os estados excitados implicados nas transicións *f-f* máis habituais.²²

A maiores, os compostos de lantanoide son a miúdo luminescentes. O termo luminescente fai referencia a dous tipos de fenómenos de emisión de luz: a fluorescencia e a fosforescencia. A fluorescencia é un proceso de emisión radiativa rápida dada por unha transición permitida dende un estado excitado de alta enerxía a outro de menor enerxía coa mesma multiplicidade de *spin* ($\Delta S = 0$). Por outra banda, a fosforescencia correspóndese cunha emisión radiativa con tempos de vida maiores, por tratarse de transicións prohibidas nas que están implicados niveis con diferente multiplicidade de *spin* ($\Delta S \neq 0$).^{16,23}

Os espectros de emisión dos catións lantanoide presentan características análogas aos de absorción, con bandas estreitas e definidas debidas ás transicións emisivas *f-f*. Todos os lantanoide son luminescentes menos o La^{3+} e o Lu^{3+} , destacando especialmente o Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} e Dy^{3+} por emitiren na rexión visible do espectro (**Táboa 2**).

Táboa 2: Resumo das principais transicións visibles dos ións lantanoides coas súas respectivas intensidades de emisión.²⁴

Trivalent lanthanide ion	Color of the visible luminescence due to the main transitions	Intensity of the emission
Europium	Red $^3D_0 \rightarrow ^7F_2$ (615 nm) or Red-orange when $^3D_0 \rightarrow ^7F_1$ (590 nm) as important as the $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	Strong
Terbium	Green, $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ (545 nm)	Strong
Dysprosium	Yellow, $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$ (575 nm)	Medium
Samarium	Orange-red, $^4G_{5/2} \rightarrow ^6H_{7/2}$ (600 nm)	Medium
Praseodymium	Red, $^1D_2 \rightarrow ^3H_4$ (600 nm) and $^3P_0 \rightarrow ^3F_2$ (650 nm)	Weak
Erbium	Green, $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ (545 nm)	Weak
Holmium	Red, $^5F_5 \rightarrow ^5I_8$ (650 nm)	Weak
Thulium	Blue, $^1G_4 \rightarrow ^3H_6$ (480 nm)	Weak

Estas emisións propias dos lantanoides son tipicamente febles, xa que a absorción é limitada e por tanto os niveis enerxéticos excitados están pouco poboados. Sen embargo, existen diferentes mecanismos que permiten incrementar a intensidade da emisión, como por exemplo a transferencia enerxética dende estados excitados dos ligandos a niveis excitados do centro metálico. Este proceso é o que se coñece como “efecto antena”, denominándose “grupos antena” aos compoñentes dos ligandos que poden absorber enerxía e transmitila ao ión metálico (grupos cromóforos).^{3,24,25} Deste xeito conséguese incrementar en gran medida a intensidade da emisión do catión lantanoide.

Estes procesos de fluorescencia e fosforescencia son representados frecuentemente en diagramas de Jablonski (**Figura 7**). Nos complexos que inclúen un grupo antena, este é capaz de absorber enerxía poboando un estado excitado singlete (S_1). O propio grupo cromóforo pode relaxarse ao estado fundamental de novo emitindo fluorescencia (transición $S_1 \rightarrow S_0$), pode ter lugar un cruce de sistemas a estados triplete e emitir fosforescencia (transición $T_1 \rightarrow S_0$) ou, idealmente, transferir enerxía dende estes estados triplete a estados excitados do lantanoide, de maneira que a relaxación radiativa ao estado fundamental resulte en procesos de emisión luminescente do ión lantanoide.^{3,26} No caso dos ións Eu^{3+} e Tb^{3+} , como se pode observar no diagrama da **Figura 7**, a emisión é debida a transicións $^5D_J \rightarrow ^7F_J$. En ámbolos dous casos o estado 7F_J está desdoblado en 6 niveis con diferentes valores de J , o que dá lugar a múltiples transicións electrónicas (**Figura 7B**).

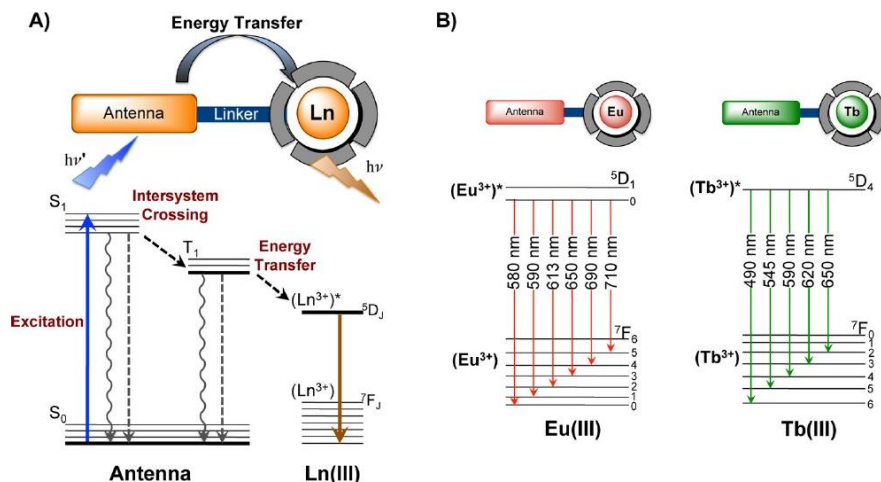


Figura 7: A) Diagrama de Jablonski representando o proceso de transferencia enerxética entre un ligando cun grupo antena e un centro metálico luminescente de Eu(III) ou Tb(III). B) Transicións luminescentes de complexos de europio e terbio coas súas lonxitudes de onda habituais correspondentes.²⁶

Todos estes procesos de relaxación compiten cos procesos non radiativos de conversión interna e relaxación vibracional, nos que o disolvente empregado ten un papel importante. Por exemplo, os osciladores O-H da auga favorecen esta esactivación do estado excitado do ión lantanoide, efecto coñecido como *quenching*.²³

2.2.4. Propiedades luminescentes do Eu(III)

O europio é un lantanoide singular, cunha capa 4f semichea no seu estado fundamental ($[Xe] 4f^7 6s^2$) que da lugar a anomalías no seu radio atómico, na terceira enerxía de ionización e no potencial de redución Eu^{3+}/Eu^{2+} . No relativo as súas propiedades ópticas, estas seguen o explicado anteriormente para os ións lantanoides, se ben a luminescencia do europio é especialmente eficiente grazas á presenza de múltiples estados excitados moi próximos en enerxía ao estado fundamental. Isto permite a existencia dun gran número de transicións radiativas dende estados excitados de elevada enerxía, favorecendo así que teñan lugar transicións con diferente multiplicidade de *spin* e se orixinen procesos de emisión fosforescente.²⁷ Sen embargo, dada a feble absorción electrónica do ión, é necesario incorporar grupos antena para incrementar a eficiencia do proceso.

Os espectros de emisión dos complexos de europio presentan diversas bandas dadas polas transicións $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 0-6$). Entre estas atópanse dúas transicións especialmente útiles: $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ e $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$. A denominada transición hipersensible

$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ ($\lambda \approx 615\text{nm}$; color vermello) está moi influenciada pola simetría do entorno de coordinación do ión metálico no complexo e a natureza dos ligandos, polo que permite a detección de cambios na esfera de coordinación do europio. Por outra banda, a transición $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ (puramente de dipolo magnético) ten unha intensidade practicamente independente do entorno químico do ión, e proporciona unha estimación do seu tempo de vida radiativo. A maiores, o estudo da transición $^5D_0 \leftarrow ^7F_0$ permite determinar o número de especies de europio con diferente coordinación. As transicións aos niveis 7F_5 e 7F_6 a miúdo non se poden observar por ser moi febles e atoparse no NIR fora do rango de detección dos espectrofluorímetros convencionais.^{24,28}

A maioría destas transicións son transicións de dipolo eléctrico (ED), é dicir, transicións inducidas pola interacción do campo eléctrico oscilante dos fotóns cos momentos dipolares eléctricos do composto. De maneira similar, tamén se poden dar transicións de dipolo magnético inducidas pola interacción do campo magnético da radiación electromagnética cos momentos dipolares magnéticos da estrutura. Unha diferenza fundamental entre ámbolos dous tipos de transición é que mentres que as transicións ED *f-f* están prohibidas pola a regra de Laporte, este criterio de selección non se aplica ás transicións MD. Aínda así, a intensidade das transicións MD, a pesares de estar permitidas, son normalmente inferiores ás das transicións ED. Ademais, as intensidades das transicións ED varían segundo a simetría do complexo e as características dos ligandos.²⁸ Na **Táboa 3** recóllese a modo de resumo as transicións emisivas do Eu^{3+} coas súas propiedades.²⁸

Táboa 3: Resumo das transicións electrónicas emisivas do Eu(III) coas súas propiedades correspondentes.²⁸

Transition ^a	Dipole character ^b	Wavelength range (nm)	Relative intensity ^c	Remarks
$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	ED	570–585	vw to s	Only observed in C_n , C_{nv} and C_s symmetry
$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	MD	585–600	s	Intensity largely independent of environment
$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	ED	610–630	s to vs	Hypersensitive transition; intensity very strongly dependent on environment
$^5D_0 \rightarrow ^7F_3$	ED	640–660	vw to w	Forbidden transition
$^5D_0 \rightarrow ^7F_4$	ED	680–710	m to s	Intensity dependent on environment, but no hypersensitivity
$^5D_0 \rightarrow ^7F_5$	ED	740–770	vw	Forbidden transition
$^5D_0 \rightarrow ^7F_6$	ED	810–840	vw to m	Rarely measured and observed

^a Only transitions starting from the 5D_0 level are shown.

^b ED = induced magnetic dipole transition, MD = magnetic dipole transition.

^c vw = very weak, w = weak, m = medium, s = strong, vs = very strong.

2.3. Ligandos macrocíclicos e derivados do DOTA

No presente traballo realizárase unha caracterización fotofísica de complexos de europio con ligandos macrocíclicos derivados do DO3A (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético cun substituínte na posición 10), que a súa vez é un derivado do DOTA.

As características químicas dos ións lantanoides, como a súa estrutura orbital ou a súa acidez e dureza de Pearson, determinan a súa capacidade para formar compostos de coordinación moi estables con ligandos macrocíclicos quelatos. Este tipo de ligandos espertou un grande interese nos últimos anos, o que levou a preparación dunha enorme variedade de macrociclos, como por exemplo os poliazamacrociclos saturados, macrociclos con grupos imina (bases de Schiff), éteres coroa, polioxamacrociclos, polioxaamacrociclos, coroandos, criptandos, cavitandos, calixarenos, ciclodextrinas, catenanos etc.²⁹ Ademais, moitos destes sistemas presentan propiedades moi interesantes, como poden ser a sensibilidade a variacións de pH, resposta redox, propiedades cromoxénicas ou a compatibilidade con sistemas biolóxicos.^{10,13}

O ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) é un derivado do *cyclen* con catro brazos carboxilato, descrito por primeira vez en 1976.³⁰ Pouco despois de ser sintetizado, foi empregado como ligando quelatante adecuado para a complexación de diferentes ións lantanoides,³¹ concretamente para o catión europio(III).³²

Dende entón, fóronse preparando múltiples derivados do DOTA con aplicacións moi variadas. Entre estas destaca especialmente o seu uso en medicina, como axentes de contraste para resonancia magnética de imaxe e como sondas para bioimaxe ou para terapia con radionúcleos.^{33,34} Trátase dun macrociclo facilmente funcionalizable, podéndose substituír os grupos carboxilato presentes na estrutura do DOTA por outros grupos funcionais. Así mesmo, o DOTA pódese conxugar con péptidos, anticorpos e hormonas, ampliando as súas potenciais aplicacións.³³ Do mesmo xeito, é posible incorporar grupos cromóforos á súa estrutura que funcionen como grupos antena para aumentar a emisión luminescente do catión metálico, unha estratexia amplamente utilizada no desenvolvemento de sondas luminescentes de europio(III)^{25,35} e terbio(III).²² Sen dúbida, a súa fácil funcionalización, xunto coa elevada estabilidade e inercia química *in vivo*³⁶ que presentan moitos dos complexos de lantanoides cos seus derivados, son proba do gran potencial deste ligando e os outros relacionados en bioimaxe.

2.4. Técnicas microscópicas para a aplicación de sondas luminescentes

O primeiro microscopio de fluorescencia empregado en investigación desenvolveuse na década de 1910 para investigar a autofluorescencia de bacterias,

protozoos e tecidos animais e vexetais. Nesta fase inicial, empregáronse por primeira vez os fluorocromos para tinguir diferentes estruturas biolóxicas. Desde entón, desenvolvéronse numerosas sondas luminescentes para a imaxe óptica de células ou tecidos, así como compoñentes subcelulares. Dependendo da natureza da sonda, é posible facer observacións *in vivo* ou *ex vivo*.³⁷

Este tipo de sondas pódense empregar en diferentes tipos de microscopios de fluorescencia. Os dous máis comúns son o microscopio de fluorescencia e o microscopio de fluorescencia confocal.

2.4.3. Microscopía de fluorescencia convencional

Nas últimas décadas leváronse a cabo grandes avances na microscopía de fluorescencia. Un microscopio óptico de fluorescencia (**Figura 8**) é semellante a un microscopio óptico convencional, pero está equipado cunha fonte de luz de alta intensidade, normalmente lámpadas de mercurio que poden emitir nun amplo espectro (dende o visible ata ultravioleta). Mediante unha serie de filtros é posible seleccionar a lonxitude de onda da luz incidente, da luz recollida, e eliminar calquera radiación ultravioleta reflexada non desexada.³⁸ A maioría destes microscopios iluminan a mostra dende arriba, polo que reciben o nome de microscopios de epifluorescencia. Así, a lente do obxectivo funciona á vez como condensador da luz incidente e como colector da luz emitida pola mostra.

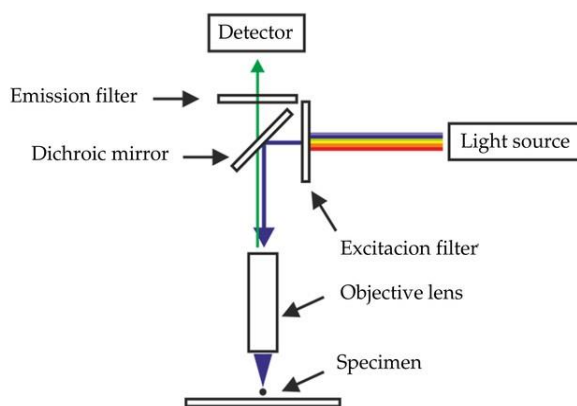


Figura 8: Representación dos compoñentes e funcionamento dun microscopio de epifluorescencia convencional.^{38,39}

2.4.4. Microscopía de fluorescencia confocal

A microscopía confocal de barrido láser (CSLM) está baseada no acoplamento dunha fonte de luz láser a un microscopio óptico (**Figura 9**). A luz procedente deste láser enfócase mediante un sistema de espellos nun único plano

vertical atravesando a mostra. Nas seccións por encima e por debaixo deste plano, a intensidade da iluminación diminúe drasticamente, quedando excluídas da imaxe obtida. Deste xeito, é posible realizar seccións ópticas e obter imaxes das distintas capas da mostra, conseguindo incluso xerar imaxes tridimensionais. Esta é unha técnica extremadamente útil para tomar imaxes de mostras biolóxicas de maior grosor, de tecidos, biofilms, etc.^{40,41}

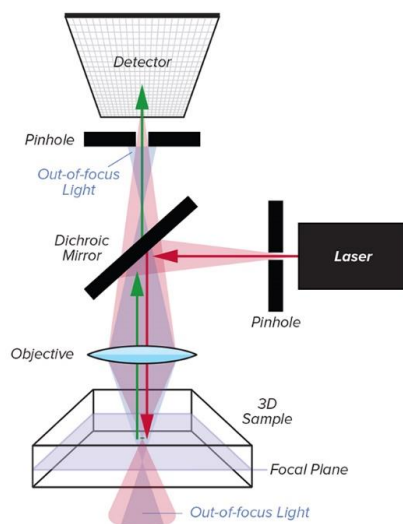


Figura 9: Representación dos compoñentes e funcionamento dun microscopio confocal de barrido láser.

2.4.5. Outras técnicas de interese

Nos últimos anos desenvolvéronse un gran número de técnicas que combinan a luminescencia coa microscopía. Entre elas pódese destacar a microscopía de imaxe por tempo de vida (FLIM). Esta técnica permite xerar imaxes en función dos diferentes tempos de vida de luminescencia das distintas especies emisivs presentes na mostra.⁴¹ O uso de sondas con tempos de vida longos (superiores a 1 μ s) incrementa as posibilidades de uso desta técnica. Pode empregarse acoplada á microscopía confocal ou tamén a outras técnicas como a microscopía de excitación multifotón. Esta última gañou importancia co recente desenvolvemento de fontes láser NIR,⁸ destacando especialmente a microscopía bifotónica (2P). Na absorción 2P a lonxitude de onda de excitación duplícase, ao absorber a mostra dous fotóns simultaneamente, desprazándose cara os rangos de transparencia biolóxica (máxima profundidade de penetración dos fotóns no NIR).

2.5. Estudos de viabilidade e toxicidade celular

O primeiro paso para avaliar a biocompatibilidade de calquera composto con potencial uso en sistemas biolóxicos son os estudos de citotoxicidade ou viabilidade celular *in vitro*. Estes permiten determinar se un composto de interese ten efectos citotóxicos que podan producir a morte ou danar un cultivo celular. Para levar a cabo estes estudos de viabilidade celular pódense empregar diferentes métodos, entre os cales destacan: a) o recuento de células con colorantes vitais; b) a detección de enzimas sinalizadoras de estrés ou de certos produtos metabólicos; c) a citometría de fluxo; d) o seguimento da transformación de substratos enzimáticos.⁴²

Na actualidade, os métodos máis utilizados baséanse en medir a transformación dun reactivo engadido ao medio de cultivo, que ten lugar como consecuencia da actividade metabólica das células viables. Normalmente empréganse reactivos que dan lugar a produtos fluorescentes ou coloreados. Os métodos deste tipo máis destacados son os ensaios de redución de sales de tetrazolio, como por exemplo os MTT e WST, e os de redución da resazurina.⁴³ Este último foi o utilizado no presente traballo (kit comercial *PrestoBlue*®). Como se pode ver no esquema da **Figura 10**, no ambiente reductor citosólico das células viables a resazurina (color azul) redúcese a resorufina (color vermello), dando lugar a un cambio na absorbancia do cultivo. Deste xeito, este composto funciona como indicador de viabilidade celular detectable mediante medidas espectrofotométricas. Uns valores altos de absorbancia implicarán unha elevada viabilidade celular na mostra, que poderá ser determinada seguindo o protocolo proporcionado pola casa comercial.⁴⁴

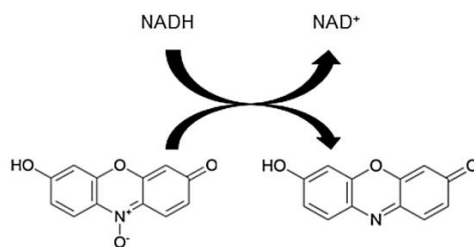


Figura 10: Esquema da redución da resazurina a resorufina en células viables ⁴²

3. PRECEDENTES E OBXECTIVOS

Como xa se mencionou na *Introdución*, ligandos derivados do DOTA como por exemplo o DO3A presentan importantes aplicacións como axentes de contraste en IRM ao formar complexos con gadolinio. Neste traballo realizarase un estudo fotofísico para avaliar as propiedades ópticas como sondas luminescentes de complexos de Eu(III) análogos a estes sistemas de Gd(III) (**Figura 11**).

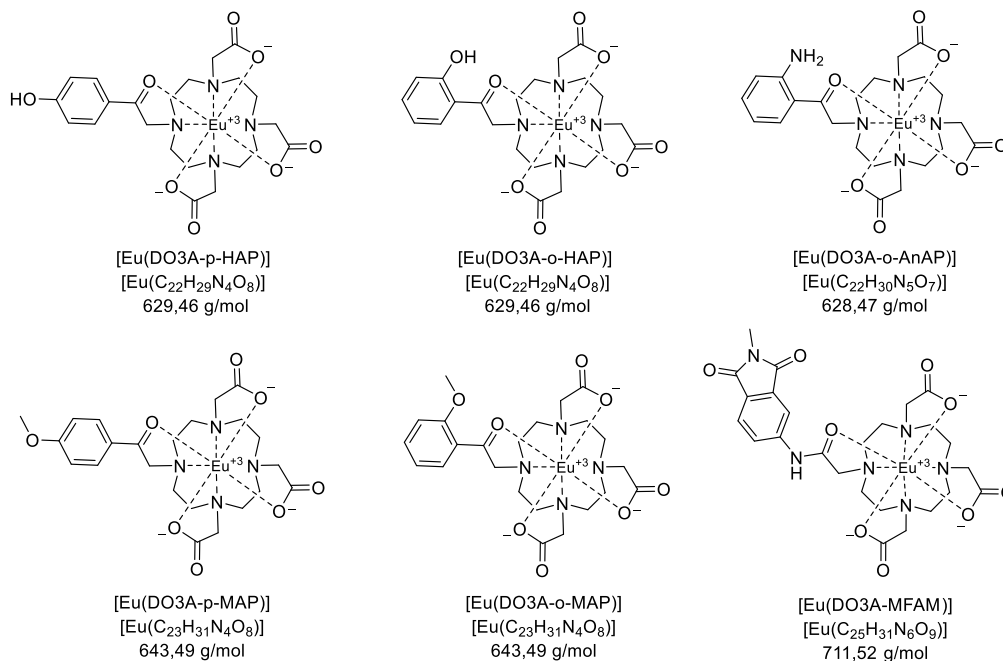


Figura 11: Estruturas e peso molecular dos 6 complexos de Eu(III) con ligandos derivados do DO3A estudados neste traballo.

O funcionamento como axentes de contraste en imaxe por resonancia magnética dos complexos de gadolinio cos ligandos DO3A-*p*-hidroxiacetofenona (DO3A-*p*-HAP) e DO3A-*o*-hidroxiacetofenona (DO3A-*o*-HAP) xa foi previamente estudado por membros do grupo de investigación no que se realizou este traballo.⁴⁵ Estes sistemas amosaron unha resposta intelixente ao pH no intervalo fisiolóxico, polo que é de interese avaliar se este comportamento se manifesta tamén nas propiedades ópticas dos complexos isoestructurais con Eu(III) (Eu(DO3A-*o*-HAP) e Eu(DO3A-*p*-HAP)). Así mesmo, neste traballo preténdese comparar as súas propiedades ópticas coas de sistemas relacionados estruturalmente: DO3A-*o*-metoxiacetofenona (Eu(DO3A-*o*-MAP)), DO3A-*p*-metoxiacetofenona (Eu(DO3A-*p*-MAP)) e DO3A-*o*-aminoacetofenona (Eu(DO3A-*o*-AnAP)). O complexo Eu(DO3A-*p*-MAP) xa está

descrito na bibliografía⁴⁶, pero os demais non, o que fai que sexa moi interesante levar a cabo este estudo comparativo.

A maiores, propúxose estudar o efecto sobre as propiedades ópticas dunha funcionalización diferente do DO3A, cun novo grupo cromóforo, o DO3A-*N*-metilftalimida acetamida (DO3A-MFAM), analizando tamén a súa viabilidade celular para avaliar a súa potencial aplicación como sonda luminescente en bioimaxe.

Este traballo pódese dividir polo tanto nas seguintes partes:

- Síntese, purificación e caracterización mediante espectrometría de masas, RMN e IR do novo ligando DO3A-MFAM, así como a síntese *in situ* e caracterización dos complexos Eu(DO3A-*o*-AnAP) e Eu(DO3A-MFAM).
- Estudo fotofísico completo dos seis complexos de Eu(III) presentados na **Figura 11**, realizando un análise dos seus espectros electrónicos de absorción, de excitación e emisión, así como a determinación dos seus tempos de vida, rendemento cuántico de emisión e número de hidratación.
- Ensaio da viabilidade celular do complexo Eu(DO3A-MFAM), a modo de avaliación preliminar para a súa aplicación como sonda luminescente en sistemas biolóxicos.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Disolventes e reactivos

A continuación indícanse os reactivos (**Táboa 4**) e disolventes (**Táboa 5**) que foron empregados na realización deste traballo.

Táboa 4: Reactivos empregados.

Reactivo	Proveedor
Carbonato potásico anhidro (K_2CO_3) 99%	Alfa Aesar
Ácido clorhídrico (HCl) 37% QP	Panreac
Perlas de hidróxido de sodio (NaOH) PRS-CODEX	Panreac
Disolución de hidróxido de sodio deuterado (NaOD) 99% D	Sigma Aldrich
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) ACS reagent, $\geq 99,8\%$	Sigma Aldrich
Ácido trifluoroacético (TFA) HPLC, $\geq 99\%$	Sigma Aldrich

Táboa 5: Disolventes empregados.

Disolvente	Proveedor
Metanol (MeOH) HPLC, $\geq 99,9\%$	Fischer Chemical
Acetonitrilo (CH_3CN) HPLC, $\geq 99,9\%$	Fischer Chemical
Auga (Milli-Q)	-
Diclorometano (CH_2Cl_2) AR	Fischer Chemical
Auga deuterada (D_2O) 99% D	Eurisotop

4.2. Calendario de traballo

O traballo organizouse tal e como se mostra na **Figura 12**.

Mes	Xaneiro					Febreiro				Marzo					Abril					Maio					Xuño					Xullo				
Semanas	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Preparación das disolucións																																		
Síntese <i>in situ</i> de Eu(DO3A-o-AnAP)																																		
Síntese e caracterización de DO3A-MFAM																																		
Síntese <i>in situ</i> e caracterización de (Eu(DO3A-MFAM)																																		
Estudo fotofísico																																		
Estudo de viabilidade celular																																		
Tratamento de datos																																		
Procura bibliográfica																																		
Elaboración da memoria																																		

Figura 12: Calendario de traballo.

4.3. Preparación de disolucións

Estes complexos foron proporcionados polo grupo de investigación no que se realizou este traballo. En primeiro lugar, preparáronse disolucións nai 10^{-2} M (1 mL) disolvendo a cantidade correspondente de cada complexo en auga milli-Q. A continuación, obtivéronse as disolucións diluídas 10^{-4} M para o estudo fotofísico tomando alícuotas de 30 μ L e engadindo unha disolución tampón TRIS-HCl (0,1 M, pH=7) ata un volume final de 3 mL, axustando ao pH correspondente en cada caso (Táboa 6).

Táboa 6: Condicións das disolucións preparadas.

	PM (g/mol)	Masa (mg)	Conc.-dis. nai (M)	Conc.-dis. diluída (M)	pH
<i>Eu(DO3A-o-HAP)</i>	629,46	6,3	10^{-2}	10^{-4}	4,9 9,4
<i>Eu(DO3A-p-HAP)</i>	629,46	6,3	10^{-2}	10^{-4}	5,1 8,9
<i>Eu(DO3A-o-MAP)</i>	643,49	6,4	10^{-2}	10^{-4}	7,4
<i>Eu(DO3A-p-MAP)</i>	643,49	6,4	10^{-2}	10^{-4}	7,4

Tamén se replicaron as disolucións anteriores en D_2O para levar a cabo a determinación dos tempos de vida e do número de hidratación.

4.4. Síntese *in situ* do complexo *Eu(DO3A-o-AnAP)*

Primeiro, preparáronse 2 mL dunha disolución nai 10^{-2} M do ligando DO3A-o-AnAP (0,0100 g, $2,09 \cdot 10^{-2}$ mmol, 1 eq), proporcionado polo grupo de investigación, en auga milli-Q. A partir desta disolución tomouse unha alícuota de 1 mL, e se engadiu a sal $Eu(CF_3SO_3)_3$ (0,0062 g, $1,04 \cdot 10^{-2}$ mmol, 1 eq) (Figura 13). Axustouse o pH da disolución a 7,4 con NaOH e introduciuse nun baño de ultrasóns durante 5min.

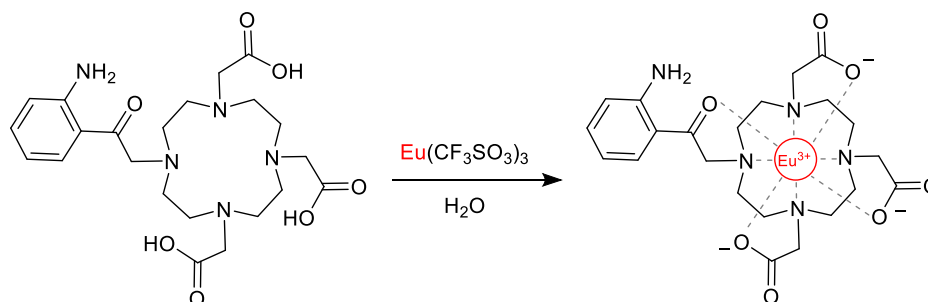


Figura 13: Esquema xeral da reacción de síntese *in situ* do complexo *Eu(DO3A-o-AnAP)*.

Finalmente, preparouse unha disolución diluída 10^{-4} M para o estudo fotofísico tomando unha alícuota de 30 μ L e engadindo disolución tampón TRIS-HCl (0,1 M,

pH=7) ata un volume final de 3 mL (pH final de 7,4). Do mesmo xeito, preparouse tamén unha disolución 10^{-4} M en D_2O para levar a cabo a determinación dos tempos de vida e do número de hidratación.

4.5. Síntese

4.5.1. Síntese do ligando DO3A-MFAM

Disolveuse o precursor ^tBu-DO3A (1) (0,1000g, 0,19 mmol, 1 eq) en CH_3CN (10 mL) e se engadiu K_2CO_3 (0,0671g, 0,489 mmol, 2,5 eq), axitando a mestura. Sobre esta engadiuse por goteo unha disolución do brazo cromóforo (2) (0,0564 g, 0,223 mmol, 1,15 eq) en CH_3CN (10mL) (**Figura 14**). Esta mestura mantívose en axitación a temperatura ambiente durante 13 días, tomando mostras para espectrometría de masas cada poucos días para seguir o avance da reacción. A continuación filtrouse a disolución para eliminar o carbonato, que se lavou con CH_3CN , e concentrouse a disolución no rotavapor ata obter un aceite amarelo. O produto foi purificado mediante MPLC de fase normal cunha columna de alúmina neutra irregular (20 g 40-60 μ m) empregando CH_2Cl_2 e MeOH como eluíntes. Concentráronse de novo as fraccións puras obtidas, obténdose ^tBu-DO3A-MFAM como un aceite amarelo cun rendemento do 87%.

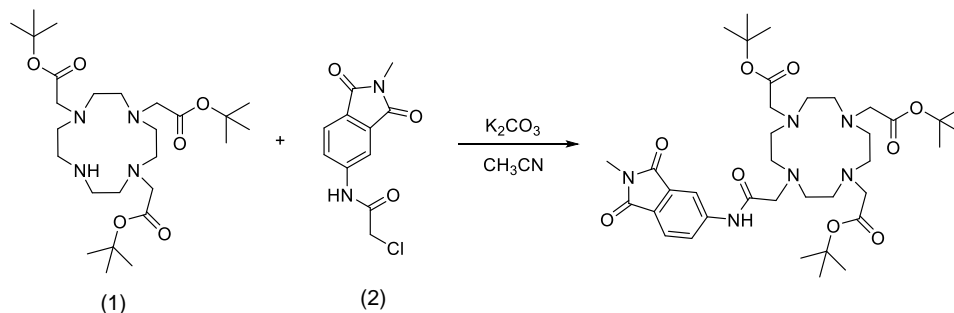


Figura 14: Esquema xeral da reacción de síntese do ligando precursor ^tBu-DO3A-MFAM.

MS (ESI+, MeOH): m/z (I%): 731,4326 (100) [$C_{37}H_{59}N_6O_9^+$]

O precursor ^tBu-DO3A-MFAM (0,1209 g, 0,165 mmol) foi posteriormente hidrolizado disolvéndoo nunha mestura 1:1 CH_2Cl_2 :TFA (4 mL) e deixándoo en axitación a temperatura ambiente durante 24 h (**Figura 15**). Transcorrido este tempo parouse a reacción e concentrouse a sequidade, engadindo auga e empregando a liña de baleiro para eliminar completamente o TFA. Finalmente o produto hidrolizado purificouse mediante MPLC de fase inversa utilizando unha columna C18 (F0012-20g-C18-HP 15 μ m) con H_2O e CH_3CN , ambos disolventes cun 0,1% de TFA, como

eluíntes. Liofilizáronse as fraccións puras obténdose DO3A-MFAM como un sólido branco cun rendemento do 53%.

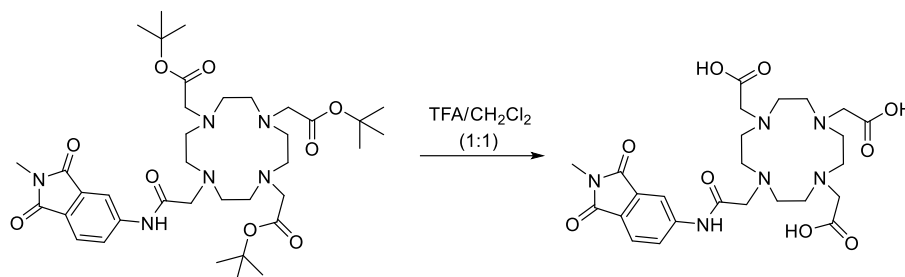


Figura 15: Esquema da reacción de hidrólise do precursor para obter o ligando de interese DO3A-MFAM.

MS (ESI+, H₂O): *m/z* (I%): 563,2460 (100) [C₂₅H₃₅N₆O₉⁺], 585,2278 (82,3) [C₂₅H₃₄N₆NaO₉⁺]. **AE** exp. (calc.): %C: 41,70 (41,76), %H: 4,37 (4,34), %N: 9,76 (9,58) Calculado para C₂₅H₃₅N₆O₉ · (C₂F₃O₂H)_{2,75}. **IR** (ATR, cm⁻¹): 1730 [ν(C=O)], 3000 [ν(O-H)]. **¹H-RMN** (D₂O, 298K, 300 MHz): δ (ppm) = 8,06 – 7,13 (b, 3H), 4,38 – 2,40 (b, 27H). **¹³C-RMN** (D₂O, 298K, 126 MHz): δ (ppm) = 174,0; 169,97; 169,17; 143,14; 132,64; 126,08; 124,29; 113,98; 54,98; 51,25; 48,14; 23,44.

4.5.2. Síntese *in situ* do complexo Eu(DO3A-MFAM)

O ligando DO3A-MFAM (0,0542 g, 0,0619 mmol, 1 eq) disolveuse en 2 mL de H₂O, e engadiuse Eu(CF₃SO₃)₃ (0,0389 g, 0,0649 mmol, 1,05 eq), empregando NaOH para elevar o pH da disolución ata un valor de 7,5 (**Figura 16**). A disolución permaneceu en axitación a temperatura ambiente durante 10 días, facendo un seguimento da formación do complexo mediante espectrometría de masas. Transcorrido este tempo engadiuse un 50% máis de exceso de Eu(CF₃SO₃)₃ (0,0189 g, 0,0315 mmol, 0,5 eq) para favorecer a formación do complexo, axustando de novo o pH a 6,5. Finalmente o complexo foi purificado mediante MPLC de fase inversa utilizando unha columna C18 ultra-acuosa (F004-6g-C18-AQ 15µm) con H₂O e CH₃CN puros como eluíntes. Liofilizáronse as fraccións puras obtendo un sólido branco (0,0127 g, 29% de rendemento), do cal se preparou unha disolución diluída 10⁻⁴ M en H₂O e en D₂O para realizar o estudo fotofísico.

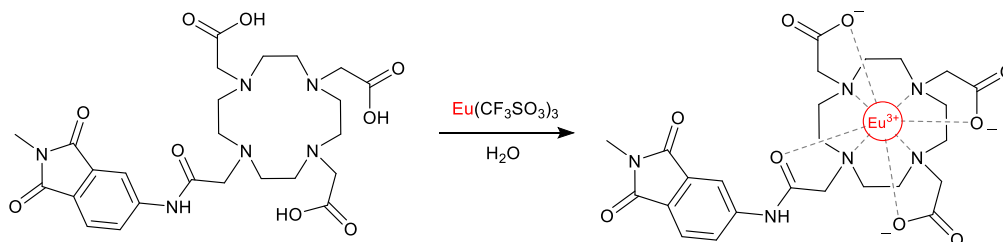


Figura 16: Esquema da síntese *in situ* do complexo Eu(DO3A-MFAM).

MS (ESI+, H₂O): *m/z* (I%): 713,076 (100) e 711,1097 (72,89) [C₂₅H₃₂EuN₆O₉⁺].
IR (ATR, cm⁻¹): **¹H-RMN** (D₂O, 298K, 300 MHz): δ (ppm) = 1640 [ν(C=O)]. **¹H-RMN** (D₂O, 298K, 300 MHz): δ (ppm) = 34,48 – 33,00 (m, 2H), 31,46 – 28,08 (m, 6H), 11,69 – 7,19 (m, 5H), 4,12 – 2,45 (m, 7H), 1,82 – -1,04 (m, 6H), -2,18 – -5,72 (m, 8H), -7,87 – -14,49 (m, 25H), -15,99 (s, 1H), -16,14 (s, 1H), -17,33 (s, 1H), -17,54 (s, 1H).

4.5.3. Técnicas de purificación

Todas as purificacións foron levadas a cabo empregando MPLC (*Medium Performance Liquid Chromatography*) nun cromatógrafo Puriflash XS 420 InterChim cun detector UV-VIS pertencente ao grupo de investigación React!. O precursor ¹Bu-DO3A-MFAM foi purificado mediante MPLC en fase normal cunha columna de alúmina neutra irregular (20 g, 40-60 μm) como fase estacionaria e CH₂Cl₂ e MeOH como eluúntes. A purificación iniciouse cun 100% de CH₂Cl₂ durante 9 min, seguido dun gradiente de elución de 3 min ata un 95% CH₂Cl₂ mantido 6min, e outros 3 min de gradiente ata un 90% CH₂Cl₂ mantido 6 min. O composto eluíu a 95:5 CH₂Cl₂:MeOH (t_R= 13min).

Por outra banda, o ligando DO3A-MFAM purificouse mediante MPLC de fase inversa cunha columna C18-HP (F0012-20g-C18-HP 15 μm) como fase estacionaria e H₂O e CH₃CN, ambos con 0,1% de TFA, como eluúntes. A purificación comezou cun 95% de H₂O durante 8 min, seguido dun gradiente de elución de 3 min ata un 63% de H₂O mantido 3min, e a continuación outros 6 min de gradiente ata un 100% de CH₃CN mantido 5min. O composto eluíu a 63:37 H₂O:CH₃CN (t_R= 11,11min).

Finalmente, o complexo Eu(DO3A-MFAM) foi purificado mediante MPLC de fase inversa empregando unha columna C18 ultra-acuosa (F004-6g-C18-AQ 15μm) como fase estacionaria e H₂O e CH₃CN puros como eluúntes. Iniciouse a purificación cun 100% de H₂O durante 6 min, seguido dun gradiente de elución de 4 min ata un 45% de H₂O mantido 2 min, e outros 4 min de gradiente ata un 100% de CH₃CN mantido 5 min. O complexo eluíu a 43:57 H₂O:CH₃CN (t_R= 10,87min).

4.5.4. Técnicas de caracterización

Empregáronse unha serie de técnicas de caracterización diferentes para confirmar a identidade dos compostos sintetizados:

Espectroscopía RMN: Rexistráronse os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C a temperatura ambiente usando un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE 300, (300 MHz na frecuencia do ^1H) localizado no Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA) da Universidade da Coruña, e un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE 500 (500 MHz na frecuencia do ^1H equipado cunha criosonda dual $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ e unha sonda BBI, localizado no Servizo de Apoio á Investigación (SAI) da Universidade da Coruña.

Espectrometría de masas: Os espectros de masas obtivéronse usando ionización por electrospray (ESI), tanto en modo positivo como negativo, usando un espectrómetro de masas LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QStar Elite localizado no SAI da Universidade da Coruña.

Análise elemental: A composición porcentual de carbono, nitróxeno e hidróxeno foi determinada por combustión nun analizador elemental FlashEA1112 (*ThermoFinnigan*) no Servizo de Apoio á Investigación (SAI) da Universidade da Coruña.

Espectroscopía infravermella: Os espectros de IR rexistráronse pola técnica de ATR (*Attenuated Total Reflectance*) cun espectrofotómetro FT-IR Nicolet iS 10 de *Thermo Scientific*, equipado cun accesorio *Thermo Scientific Smart iTR*, nas instalacións do Centro de Investigacións Científicas Avanzadas da Universidade da Coruña.

Medicións de pH: As medidas de pH realizáronse a temperatura ambiente usando un pH-metro HANNA HI5522 equipado cun eléctrodo de pH HANNA HI1330.

4.6. Estudo fotofísico

Rexistráronse os espectros de absorción, excitación e emisión dos seis complexos de europio estudados ($\text{Eu}(\text{DO3A-}o\text{-MAP})$, $\text{Eu}(\text{DO3A-}p\text{-MAP})$, $\text{Eu}(\text{DO3A-}p\text{-HAP})$, $\text{Eu}(\text{DO3A-}o\text{-HAP})$, $\text{Eu}(\text{DO3A-}o\text{-AnAP})$ e $\text{Eu}(\text{DO3A-MFAM})$). Determináronse tamén os seus tempos de vida de emisión e calculáronse os rendementos cuánticos e número de hidratación de cada complexo.

4.6.1. Espectroscopía electrónica de absorción ultravioleta-visible

Rexistráronse os espectros de absorción dos complexos empregando un espectrofotómetro UV-VIS V-650 (JASCO). No caso dos complexos Eu(DO3A-*p*-HAP) e Eu(DO3A-*o*-HAP), con grupos hidroxilo, tomáronse as medidas de absorbancia a dous valores de pH distintos para avaliar a influencia deste parámetro.

4.6.2. Espectroscopía electrónica de excitación e emisión

Os espectros de excitación e emisión rexistráronse nun espectrofluorímetro Fluoromax Plus-P (Horiba Scientific) equipado cunha lámpada de espectro continuo de xenon libre de ozono de 150 W, con corrección espectral para a variación da intensidade da lámpada e detector R928P de contador de fotóns PMT (185-850 nm).

Para todos os espectros axustouse a apertura (*slits*) de saída do monocromador e de entrada do detector en función das propiedades emisivas do composto a estudar. Os espectros de excitación realizáronse rexistrando un único barrido, medindo a emisión a 613 nm, o pico de maior interese para o Eu(III) pola súa cor e intensidade relativa (transición $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$),²⁸ fronte a un rango de lonxitudes de onda de excitación do ultravioleta. As lecturas fixéronse cada 0,5 nm.

Os espectros de emisión rexistráronse como promedio de tres barridos con lectura cada 0,1 nm, excitando ás lonxitudes de onda seleccionadas en función dos máximos de excitación de cada complexo. En todos os espectros de emisión se aplicou a correspondente corrección sinal/ruído no detector para diminuír a contribución de emisión da lámpada, empregando o software controlador do equipo.

4.6.3. Cálculo do rendemento cuántico de emisión

O rendemento cuántico (ϕ) defínese como a relación entre o número de fotóns absorbidos pola mostra e o número de fotóns emitidos, sendo polo tanto indicativo da eficiencia do proceso emisivo. Calculouse empregando como patrón unha disolución de tris(dipicolinato)europio(III) de cesio, seguindo os métodos estándar suxeridos na bibliografía,⁴⁷ de acordo coa ecuación 1:

$$\phi_{\text{relativo}}^{EuL} = \frac{\phi_x}{\phi_r} = \frac{E_x}{E_r} \cdot \frac{A_r(\lambda_r)}{A_x(\lambda_x)} \cdot \frac{I_r(\lambda_r)}{I_x(\lambda_x)} \cdot \frac{n_x^2}{n_r^2} \quad (1)$$

Onde os subíndices *x* identifican os parámetros da mostra e os subíndices *r* os do composto de referencia. *E* é a intensidade de emisión obtida ao integrar a curva de emisión, *A* é a absorbancia á lonxitude de onda de excitación, *I* é a intensidade da luz de excitación a esa lonxitude de onda e *n* é o índice de difracción da disolución. Dado

que se empregou a mesma lonxitude de onda de excitación para a mostra que para a referencia (279 nm), e ao estar ambos compostos disoltos no mesmo medio, a expresión anterior simplifícase para dar a ecuación 2:

$$\phi_{\text{relativo}}^{\text{EuL}} = \frac{\phi_x}{\phi_r} = \frac{E_x}{E_r} \cdot \frac{A_r(\lambda_r)}{A_x(\lambda_x)} \quad (2)$$

De xeito que empregando o valor de rendemento cuántico do patrón de referencia atopado en bibliografía^{47,48} é posible determinar o rendemento cuántico dos complexos de Eu(III) (Ecuación 3).

$$\phi_x = \frac{E_x}{E_r} \cdot \frac{A_r(\lambda_r)}{A_x(\lambda_x)} \cdot \phi_r \quad (3)$$

4.6.4. Determinación dos tempos de vida de emisión

Para determinar o tempo de vida de emisión dos compostos estudados levouse a cabo unha excitación pulsada a diferentes lonxitudes de onda, seleccionadas en función das propiedades emisivas de cada complexo, recollendo a emisión a 613 nm durante diferentes intervalos dependendo do caso. O valor do tempo de vida determinouse empregando unha regresión non lineal do decaemento exponencial da emisión co software Origin 9.⁴⁹

4.6.5. Estimación do número de moléculas de auga coordinadas (q)

O número de moléculas de auga coordinadas ao Eu(III) na primeira esfera de coordinación (parámetro q) pódese estimar a partir dos tempos de vida de emisión dos compostos disoltos en H₂O e D₂O. Segundo o método Beeby,⁴⁶ a q pode ser calculada de acordo coa expresión 4:

$$q = A(k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}} - B - C) \quad (4)$$

Na que A é unha constante de proporcionalidade representativa da sensibilidade do ión lantanoide ao *quenching* vibracional que proporcionan os osciladores OH; k a velocidade de desactivación do estado excitado do ión en H₂O e D₂O, que equivale á inversa dos tempos de vida; B un parámetro corrector do *quenching* provocado polas moléculas de auga do disolvente (non coordinadas) e C un parámetro corrector do *quenching* inducido por amidas (no caso de estar presentes no complexo). Para os complexos de Eu(III) os valores destes parámetros son: A= 1,20 ms; B= 0,25 ms⁻¹; C= 0,075 ms⁻¹.

4.7. Estudo de citotoxicidade *in vitro* do Eu(DO3A-FMAM)

4.7.1. Cultivo da liña celular

Para avaliar a citotoxicidade do complexo Eu(DO3A-FMAM) utilizouse unha liña celular inmortalizada comercial HFF-1 (*Human Foreskin Fibroblasts*; ATCC SCRC-1041) de fibroblastos de prepucio humano (**Figura 17**). Esta liña celular foi cultivada en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Lonza, España) suplementado cun 20% de soro fetal bovino (SFB; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, EE. UU.) e un 1% de penicilina/estreptomicina (P/E; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, EE. UU.), e mantida en condicións estándar a 37°C e 5% de CO₂ nunha estufa de cultivo (*Steri-Cult CO₂ Incubator HEPA Class 100*, *Termo Electron Corporation*, Madrid).

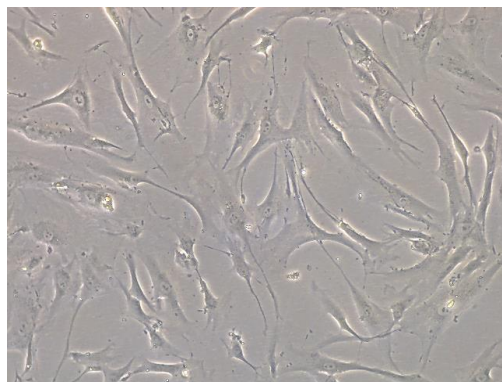


Figura 17: Fibroblastos da liña celular HFF-1 ATCC SCRC-1041. 7

As células para levar a cabo o ensaio de viabilidade celular obtivéronse mediante un protocolo estándar de subcultivo celular. En primeiro lugar eliminouse o medio de cultivo e se realizou un lavado con suero salino (*Fresenius Kabi*, España). A continuación engadiuse tripsina (2X, 37°C durante 3-5min; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, EE. UU.), unha enzima que permite eliminar as adhesións das células á placa de cultivo, desprendéndooas da súa superficie. Posteriormente inactivouse esta enzima utilizando soro Ringer Lactato (*Grifols*, España) e se centrifugou a suspensión a 800 x g durante 10 min. Decantouse o sobrenadante e o precipitado celular resuspendeuse en 10 mL de Ringer Lactato para proceder ao recuento celular na cámara de recuento Neubauer (*Marienfeld*, Alemania). Finalmente, centrifugouse de novo e se resuspendeu o precipitado celular en medio de cultivo DMEM 20% de SFB e 1% P/E nunha proporción dun millón de células por mililitro de medio.

As células sementáronse nunha placa de 48 pociños (*Corning Incorporated*, EE. UU.) a razón de 20.000 células por pociño, cun volume final de 500 μL de medio en cada un. Sementáronse dous pociños por cada concentración a testar e un de control negativo por réplica ao que non se lle engade o complexo. Incubáronse durante un período de 24 h a 37°C, transcorrido o cal se procedeu a iniciar o ensaio de viabilidade celular.

4.7.2. Ensaio de viabilidade celular

En base ao atopado en bibliografía⁸ decidiuse testar o efecto de 5 concentracións diferentes do complexo Eu(DO3A-FMAM): 10, 20, 50, 100 e 200 μM . Realizáronse dúas réplicas de cada concentración e un control negativo por réplica, ao cal non se lle engadiu complexo (unicamente contén os fibroblastos co medio de cultivo). Unha vez máis, incubáronse durante 24 h a 37°C.

Transcorrido este tempo, retirouse o medio e se engadiron en cada pociño 180 μL de medio de cultivo e 20 μL do reactivo *PrestoBlue® Viability Reagent* (*ThermoFisher Scientific*, EE. UU.). Este reactivo é unha solución de resazurina (de cor azul), que se reduce a resorufina (de cor vermello) como consecuencia da actividade metabólica das células viables. Como resultado pódese detectar un cambio na absorbancia das mostras. Para determinar a porcentaxe de viabilidade celular en cada caso seguiuuse o protocolo proporcionado pola casa comercial.⁴⁴

Preparáronse ademais un branco por réplica, engadindo en cada pociño unicamente medio de cultivo e o *PrestoBlue®*, sen fibroblastos, e se incubou a placa durante 1h en escuridade a 37°C. Transcorrido o tempo de incubación, realizouse un traspaso a unha placa de 96 pociños, dividindo o contido de cada pociño da placa orixinal (de 48 pociños) entre dous pociños (100 μL por pociño). Desta forma obtivéronse dous duplicados por cada pociño da placa orixinal.

Finalmente, mediuse a absorbancia a 570nm e 600nm (segundo indica o fabricante) de cada pociño cun lector espectrofotométrico de placas SinergyHTX (*Biotek*, EE. UU.). Para a lectura e procesamento dos valores obtidos empregouse o programa informático *Gen5*.

4.7.3. Análise dos datos obtidos

Unha vez calculados as porcentaxes de viabilidade celular para cada tratamento, identificáronse e se eliminaron os datos anómalos presentes empregando un test de Grubbs ao 95% de confianza,⁵⁰ utilizando o software Microsoft Excel.

A continuación, comprobouse que os datos anteriores pertencesen a unha poboación con distribución normal mediante un test de Shapiro-Wilk,⁵¹ requisito necesario para poder aplicar posteriormente un test ANOVA. Para isto utilizouse a interface *R Commander* co paquete *MASS 7.3-51.4*.

Finalmente, levouse a cabo un test paramétrico de análise da varianza (ANOVA) para avaliar se os valores de viabilidade celular asociados a cada concentración estudada presentaban diferencias estatisticamente significativas entre eles. Este test realizouse segundo o suxerido na bibliografía⁵⁰ co paquete de ferramentas para análises de datos de Microsoft Excel.

5. RESULTADOS E DISCUSIÓN

5.1. Síntese e caracterización

O ligando protexido ^tBu-DO3A-MFAM foi preparado mediante a funcionalización do precursor comercial ^tBu-DO3A, tal e como se indica no apartado 4. *Experimental*, cun rendemento do 87%. A análise elemental e o espectro de masas MS-ESI⁺ confirmou que o produto obtido se trata da especie de fórmula C₃₇H₅₈N₆O₉ (sinais a *m/z* 731,4326 e 753,4143 correspondentes aos ións pseudomoleculares [C₃₇H₅₈N₆O₉⁺] e [C₃₇H₅₈N₆NaO₉⁺] respectivamente. O ligando DO3A-MFAM obtívose mediante a hidrólise do composto anterior tal e como se describe no apartado 4. *Experimental*, cun rendemento do 53%. O espectro de masas MS-ESI⁺ confirmou a formación da especie con fórmula C₂₅H₃₄N₆O₉ (sinais a *m/z* 563,2460, 585,2278 e 601,1975 correspondentes aos ións pseudomoleculares [C₂₅H₃₅N₆O₉⁺], [C₂₅H₃₄N₆NaO₉⁺] e [C₂₅H₃₄KN₆O₉⁺] respectivamente. Por outra banda, o espectro IR rexistrado mediante a técnica ATR amosa unha tensión $\nu(\text{C}=\text{O})$ a aproximadamente 1730 cm⁻¹, así como unha banda ancha correspondente coa tensión $\nu(\text{O}-\text{H})$ a aproximadamente 3000 cm⁻¹, características de ácidos carboxílicos.

O ligando DO3A-MFAM foi caracterizado tamén mediante RMN de ¹H (298 K, 300 MHz) e de ¹³C (298 K, 126 MHz) en D₂O (ver apartado 8. Anexos). No espectro de ¹H-RMN obsérvanse sinais moi anchos de difícil asignación. Esta situación é observada de xeito habitual en ligandos macrocíclicos deste tipo, e débese á presenza de procesos dinámicos de intercambio entre diferentes conformacións presentes en disolución. Se estes procesos de intercambio non son suficientemente rápidos con respecto á escala temporal de RMN para que se promedien os sinais dos diferentes confórmeros, nin suficientemente lentos para observar sinais separados para as diferentes especies, obsérvanse sinais anchos (réxime de intercambio intermedio). A protonación dos grupos amino do ligando e a presenza de enlaces de hidróxeno intramoleculares favorece unha maior rixidez do ligando, limitando a velocidade de intercambio entre as diferentes conformacións. A pesares disto, pódense diferenciar dous grupos de sinais no espectro de protón, un na rexión alifática (4,38 – 2,40 ppm, 27H) e outro na aromática (8,06 – 7,13 ppm, 3H), que coinciden co esperado para este ligando. No espectro ¹³C-RMN ocorre algo similar, aparecendo tamén sinais anchos a desprazamentos que se corresponden co predito para a estrutura do ligando. A maiores, cabe destacar a presenza dun sinal cuadruplete (119,7 – 112,6 ppm) característico do TFA, por acoplamento do carbono cos tres átomos de flúor veciños situados a un enlace de distancia.

Finalmente, levouse a cabo a síntese *in situ* do complexo Eu(DO3A-MFAM) a partir do ligando anterior, segundo se indica no apartado 4. *Experimental*, cun rendemento do 29%. O baixo rendemento xunto coa elevada duración da reacción de complexación indican unha cinética de formación do complexo lenta, tal e como se observa habitualmente en complexos derivados de DOTA. A formación do Eu(DO3A-MFAM) foi confirmada polo espectro de masas MS-ESI⁺, que amosou sinais correspondentes aos diferentes ións pseudomoleculares a *m/z*: 356,9659 para [C₂₅H₃₃EuN₆O₉²⁺], e a 711,1097 e 713,0764 para [C₂₅H₃₂EuN₆O₉⁺]. A presenza de dous picos cunha separación de dúas unidades neste último pico é característico da presenza de europio, xa que este elemento presenta dous isótopos naturais separados por dúas unidades de masa [¹⁵¹Eu, 47.8%; e ¹⁵³Eu, 52.2%]. Por outra banda, o espectro IR rexistrado mediante a técnica ATR amosa a tensión $\nu(\text{C}=\text{O})$ propia dos grupos carboxilato a aproximadamente 1640 cm⁻¹, desprazada con respecto á atopada no ligando libre. Ademais, desaparece a tensión $\nu(\text{O}-\text{H})$ a aproximadamente 3000 cm⁻¹ presente no ligando libre. Todo isto permite confirmar a formación do complexo Eu(DO3A-MFAM).

Este complexo foi caracterizado tamén mediante ¹H-RMN (298K, 300 MHz), obténdose un espectro típico dun complexo paramagnético, con sinais no intervalo de -18 – 35 ppm característico dos complexos de europio con ligandos derivados de DOTA. A pesar de tratarse dun espectro difícil de asignar, pódese diferenciar claramente o grupo de sinais a 34 – 28 ppm típicos de complexos con xeometría de coordinación de antiprisma cadrado (SAP).^{52,53} Nesta rexión sería esperable atopar 4 sinais correspondentes aos 4 hidróxenos axiais do DO3A. Sen embargo, obsérvanse 7/8 sinais, o que parece indicar a presenza de 2 isómeros SAP diferentes. Se ben isto non puido ser confirmado aínda, unha posibilidade é a existencia de dúas conformacións do grupo N-metil ftalimida con respecto ao carbonilo do grupo acetamida.

Todos os espectros correspondentes á caracterización dos compostos sintetizados se atopan no apartado 8. Anexos.

5.2. Estudo fotofísico

5.2.1. Espectroscopía electrónica de absorción ultravioleta-visible

Os espectros de absorción recollidos dos complexos estudados amósanse na **Figura 18**. Os máximos de absorción correspondentes para cada un destes compostos atópanse na **Táboa 7**:

Táboa 7: Máximos de absorción rexistrados para cada un dos compostos estudados.

	<i>pH</i>	λ_{max}/nm
<i>Eu(DO3A-o-HAP)</i>	4,9	266, 337
	9,4	271, 390
<i>Eu(DO3A-p-HAP)</i>	5,1	306, 352
	8,9	354
<i>Eu(DO3A-o-MAP)</i>	7,4	267, 338
<i>Eu(DO3A-p-MAP)</i>	7,4	306
<i>Eu(DO3A-o-AnAP)</i>	7,4	271, 396
<i>Eu(DO3A-MFAM)</i>	6,3	254, 319

Os espectros de absorción dos complexos *Eu(DO3A-o-HAP)*, *Eu(DO3A-o-MAP)*, *Eu(DO3A-o-AnAP)* e *Eu(DO3A-MFAM)* presentan dúas bandas de absorción, mentras que os análogos substituídos en *para* amosan unha banda principal a 306 nm, cun ombro a uns 352 nm. A absorptividade e posición das bandas presentan valores típicos das transicións $\pi-\pi^*$ y $n-\pi^*$.⁵⁴

Como se pode ver na **Figura 18**, o complexo cunha maior absorptividade é o *Eu(DO3A-MFAM)*, pero o máximo de absorción que presenta se atopa na rexión UV do espectro, o que dificulta o seu uso como sonda luminiscente mediante as técnicas de microscopía de fluorescencia habituais.

Nos compostos sensibles ao pH (*Eu(DO3A-o-HAP)* e *Eu(DO3A-p-HAP)*) obsérvase un desprazamento das bandas trala desprotonación do grupo fenol a pH básico. Isto débese á deslocalización da carga do alcóxido xerado e a conseguinte formación dun enolato con propiedades ópticas diferentes ás do hidroxilo. No caso do *Eu(DO3A-o-HAP)*, a banda menos enerxética amosa un claro desprazamento batocrómico xunto cun aumento da intensidade ao incrementar o pH (desprotonación), mentras que a outra banda diminúe de intensidade. No caso do *Eu(DO3A-p-HAP)* tamén se observa un desprazamento cara o vermello na única banda de absorción presente.

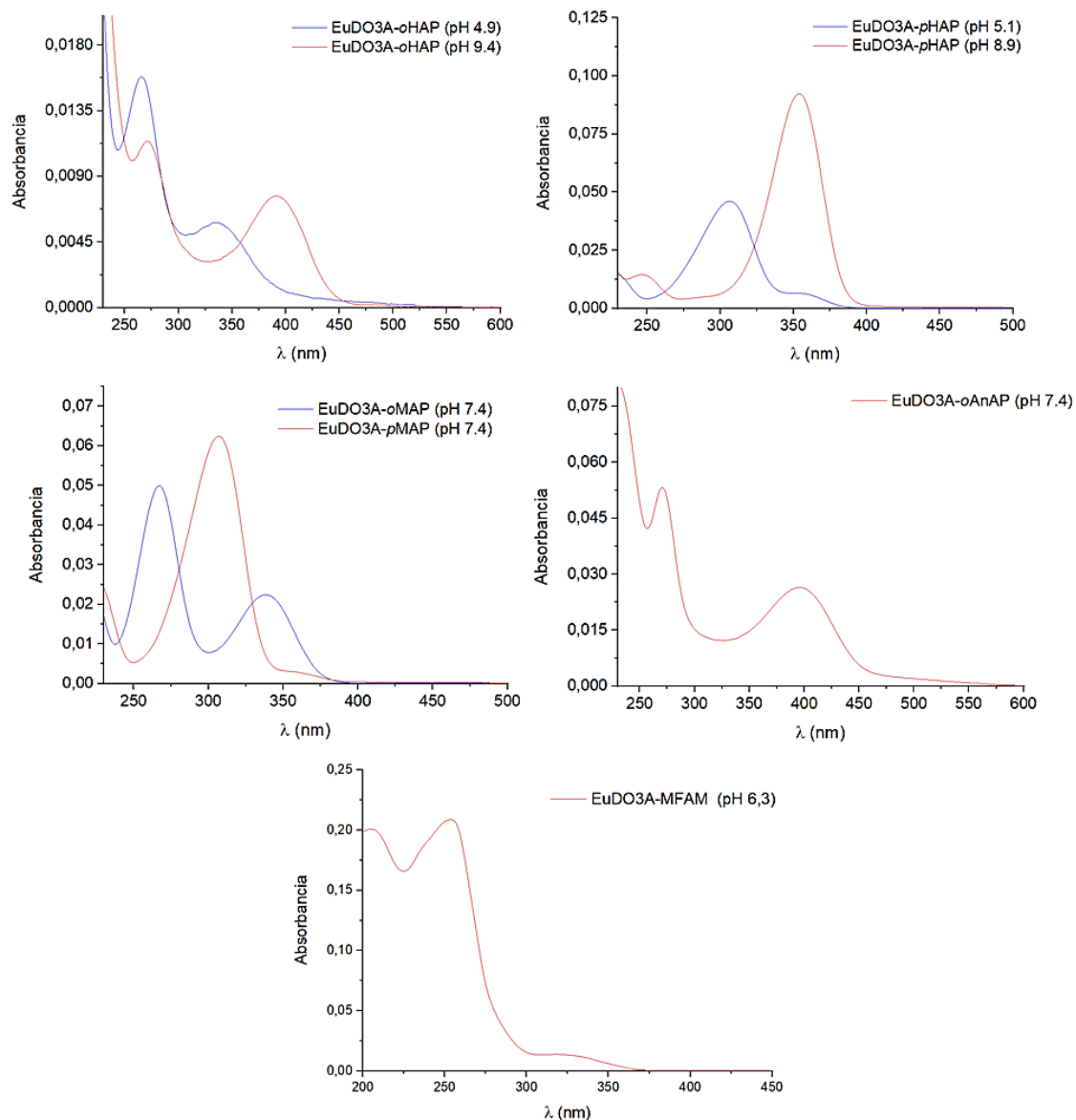


Figura 18: Espectros de absorción rexistrados para as disolucións acuosas 10^{-4} M preparadas de cada complexo, ao pH indicado en cada caso ($d = 0,1$ cm).

Os valores de pH seleccionados para rexistrar os espectros de Eu(DO3A-o-HAP) e Eu(DO3A-p-HAP) baseáronse nos publicados para compostos isostructurais de gadolinio.⁴⁵ Neste estudo, rexistráronse os espectros de absorción do Gd(DO3A-o-HAP) a valores de pH entre 4,5 e 9,9, e entre 4 e 8,8 para o Gd(DO3A-p-HAP), determinando valores de pK_a de $7,69 \pm 0,04$ para Gd(DO3A-o-HAP) e $7,01 \pm 0,03$ para Gd(DO3A-p-HAP).

5.2.2. Espectroscopía electrónica de excitación e emisión

Rexistráronse os espectros de excitación para cada un dos complexos, e se obtiveron os valores máximos de lonxitude de onda de excitación que se amosan na **Táboa 8**. Todos os espectros se poden atopar no apartado 8. Anexos.

Táboa 8: Máximos de excitación seleccionados para cada complexo.

	<i>pH</i>	λ_{max}/nm
<i>Eu(DO3A-o-HAP)</i>	4,9	350
	9,4	328
<i>Eu(DO3A-p-HAP)</i>	5,1	314
	8,9	309
<i>Eu(DO3A-o-MAP)</i>	7,4	350
<i>Eu(DO3A-p-MAP)</i>	7,4	310
<i>Eu(DO3A-o-AnAP)</i>	7,4	400
<i>Eu(DO3A-MFAM)</i>	6,3	319

A continuación, realizáronse os espectros de emisión de cada complexo excitando nos máximos de excitación seleccionados previamente (**Táboa 8**). No caso dos complexos con brazos hidroxiafetofenona sensibles ao pH, comprobouse que a emisión diminúe drasticamente nos complexos co grupo fenol desprotonado (**Figura 19**). Isto débese á aparición dunha banda de transferencia de carga (TC) coa deslocalización da carga do alcóxido formado. Esta banda TC é menos enerxética que o estado excitado do Eu(III), polo que non ten lugar a transferencia de enerxía e se suprime o efecto antena. Á vista destes resultados, continuouse o estudo fotofísico traballando unicamente coas especies protonadas.

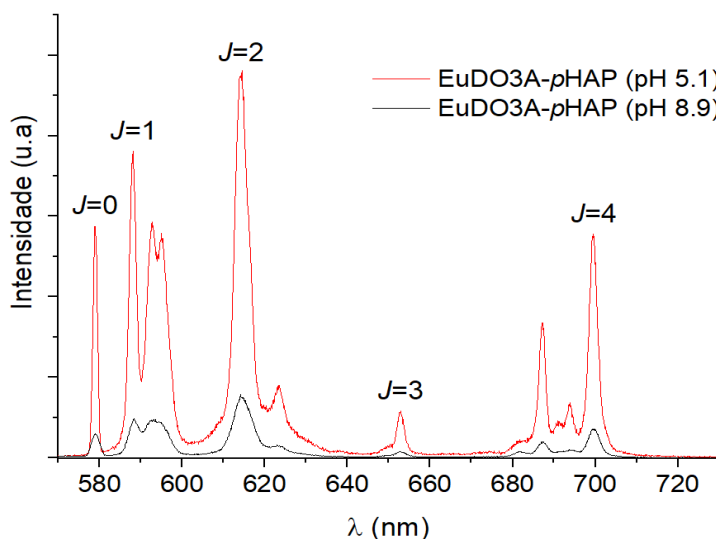


Figura 19: Comparación dos espectros de emisión rexistrados para a especie protonada (vermello) e desprotonada (negro) do complexo *Eu(DO3A-p-HAP)* (10^{-4} M, $\lambda_{ex}= 314/309$ nm).

Na **Figura 20** recóllese os espectros de emisión obtidos para cada complexo, amosando todos eles os patróns característicos do Eu(III). Se ben son bastante similares, existen certas diferenzas que se poden apreciar con certa claridade.

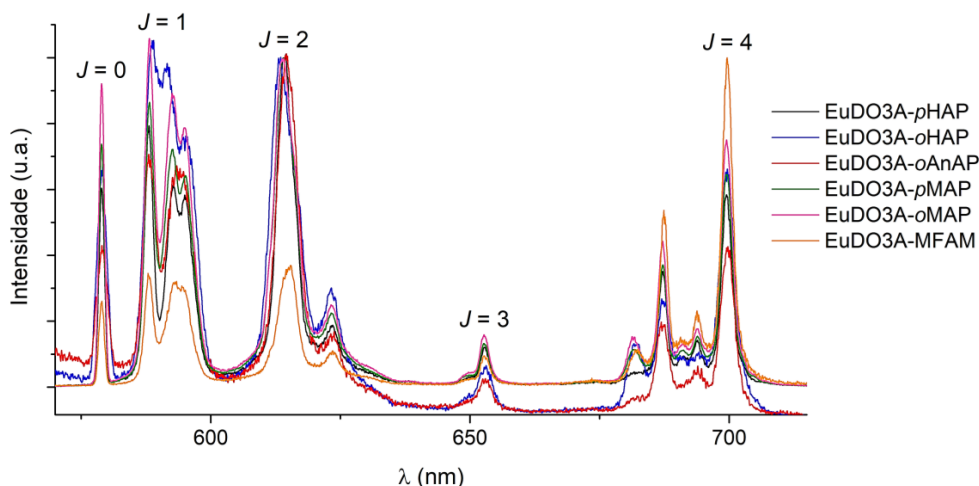


Figura 20: Representación superposta dos espectros de emisión rexistrados para cada complexo, excitando en cada caso na lonxitude de onda do máximo de excitación correspondente.

Nos seis complexos estudados poden diferenciarse 5 rexións correspondentes ás transicións do europio ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ con $J = 0-4$, que aparecen aproximadamente a: 579 nm ($J = 0$), 585-599 nm ($J = 1$), 609-627 nm ($J = 2$), 650-656 nm ($J = 3$) e 676-704 nm ($J = 4$).

A banda de emisión ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ que se pode observar nestes espectros é inusualmente intensa, tendo en conta que se trata dunha transición prohibida polas regras de selección e que polo tanto adoita ser moi feble. Esta intensidade desta banda normalmente indica que o composto pertence aos grupos de simetría C_{nv} , C_n ou C_s . Por outra banda, a presenza dunha única compoñente para a transición ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ indica a presenza dunha única especie en disolución, ou diferentes confórmeros con entornos de coordinación moi similares. O campo cristalino orixinado polos ligandos desdobra o termos espectroscópicos en $2J+1$ compoñentes. Posto que para a transición ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ $J = 0$ para o estado fundamental e o excitado, tan só se espera unha compoñente.²⁸

A baixa simetría do campo cristalino vese confirmada pola aparición de tres compoñentes na transición ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, xa que para simetrías máis elevadas é habitual observar dúas compoñentes. Neste tipo de complexos, a presenza do brazo cromóforo

unido ao macrociclo (DO3A) provoca que a simetría C_4 dos complexos tipo [Gd(DOTA)]⁻ en disolución se transforme nunha simetría C_1 . Esta transición $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ é de dipolo magnético inducido (MD), polo que xeralmente a súa intensidade integrada é independente do entorno químico do europio. Como xa se mencionou, o número de compoñentes nos que aparece desdobrada esta transición dependerá do grupo de simetría ao que pertenza a especie estudada.

Por outra banda, as transicións restantes $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$ e $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ son inducidas por dipolo eléctrico (DE) e sensibles á relaxación das regras de selección por acoplamento vibrónico. Este acoplamento, así como o desdoblamento destas bandas, aumenta ao diminuír a simetría do complexo. É de especial interese a transición hipersensible $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, cuxa intensidade vai a variar en función do entorno químico do catión.

Rexistráronse tamén os espectros de emisión destes seis complexos excitando a 279 nm para poder levar a cabo o cálculo do rendemento cuántico de emisión (débense excitar os complexos e o patrón á mesma lonxitude de onda).

5.2.3. Cálculo do rendemento cuántico de emisión

Calculáronse os rendementos cuánticos dos complexos estudados usando como referencia unha disolución $7,5 \cdot 10^{-6}$ M de tris(dipicolinato)europio(III) de cesio, empregando as disolucións 10^{-4} M dos complexos preparadas en H₂O. No caso de Eu(DO3A-*o*-HAP) e Eu(DO3A-*p*-HAP) foron utilizadas as disolucións de pH 4,9 e 5,1 respectivamente.

Para realizar este cálculo tómanse os valores de absorbancia dos complexos a 279 nm e as integrais da emisión baixo excitación a esa mesma lonxitude de onda. Con estes datos, xunto co rendemento cuántico bibliográfico da referencia (24%)^{47,48}, obtivéronse os rendementos cuánticos que se recollen na **Táboa 9**:

Táboa 9: Datos correspondentes ao cálculo do rendemento cuántico de emisión de cada complexo. *Datos do patrón usado como referencia

	A_{279nm}	<i>Integral emisión</i> _{279nm}	Φ (%)
<i>Eu(DO3A-o-HAP)</i>	0,01144	$1,50 \cdot 10^5$	0,4
<i>Eu(DO3A-p-HAP)</i>	0,0206	$8,50 \cdot 10^4$	1,6
<i>Eu(DO3A-o-MAP)</i>	0,03204	$5,35 \cdot 10^6$	6,0
<i>Eu(DO3A-p-MAP)</i>	0,02664	$9,42 \cdot 10^6$	6,9
<i>Eu(DO3A-o-AnAP)</i>	0,04323	$8,91 \cdot 10^4$	<0,2
<i>Eu(DO3A-FMAM)</i>	0,05437	$4,64 \cdot 10^5$	0,31
<i>[Eu(pic)₃]³⁻</i>	0,04866	$3,22 \cdot 10^7$	24*

Os rendementos cuánticos dos complexos con substituíntes hidroxilo e amino, así como o de Eu(DO3A-FMAM), foron moi baixos, se ben dentro dos valores típicos para complexos de europio. Os complexos co substituínte metoxilo sen embargo amosaron rendementos máis elevados, razoablemente consistentes co publicado en bibliografía para o Eu(DO3A-p-MAP) de 9,8%.⁴⁶ Isto parece indicar unha maior eficacia do proceso de transferencia de enerxía nestes complexos.

5.2.4. Determinación dos tempos de vida de emisión

Obtivéronse as gráficas de decaemento exponencial para cada complexo, en H₂O e D₂O (ver apartado 8. Anexos). A partir delas, se realizou un axuste por regresión non lineal de decaemento monoexponencial, conseguindo así os tempos de vida de emisión en ms recollidos na **Táboa 10**.

Táboa 10: Tempos de vida determinados en H₂O e D₂O para cada complexo.

	<i>pH</i>	τ_{H_2O} /ms	τ_{D_2O} /ms
<i>Eu(DO3A-o-HAP)</i>	4,9	0,510	2,104
<i>Eu(DO3A-p-HAP)</i>	5,1	0,456	0,814
<i>Eu(DO3A-o-MAP)</i>	7,4	0,630	2,285
<i>Eu(DO3A-p-MAP)</i>	7,4	0,628	2,243
<i>Eu(DO3A-o-AnAP)</i>	7,4	0,389	0,910
<i>Eu(DO3A-FMAM)</i>	6,3	0,614	2,278

O tempo de vida de emisión obtido para o Eu(DO3A-p-MAP) coincide co valor atopado en bibliografía, de 0,63 ms.⁴⁶ Os valores dos tempos de vida son próximos aos medidos para diferentes complexos derivados de DOTA que conteñen unha molécula de auga coordinada ao ión metálico (0.5-0.6 ms).⁵⁵ O complexo Eu(DO3A-o-AnAP) presenta un tempo de vida máis curto, o que probablemente se debe a unha menor enerxía do estado excitado triplete centrado no ligando. Se esta enerxía é baixa comparada con nivel ⁵D₀ do europio, a transferencia de enerxía non é eficiente, podéndose observar procesos de retrotransferencia (dende o lantánido ao ligando) que reducen o tempo de vida. É tamén destacable que todas as curvas se puideron axustar perfectamente a unha expresión monoexponencial, o que suxire que existe unha única especie emisiva en disolución. Pódese apreciar como os tempos de vida determinados en D₂O son considerablemente máis longos que os medidos en H₂O, xa que os osciladores O-D son considerablemente menos eficaces á hora de desactivar a emisión do ión metálico, debido á súa menor enerxía vibracional asociada á maior masa do deuterio comparado co protio.

5.2.5. Estimación do número de moléculas de auga coordinadas (q)

A partir dos tempos de vida obtidos anteriormente en H₂O e D₂O, foi posible calcular o número de moléculas de auga na primeira esfera de coordinación dos complexos (parámetro q) segundo o método de Beeby (incertidume de $\pm 0,3$) (**Táboa 11**).⁴⁶

Táboa 11: Números de hidratación calculados para cada complexo mediante o método Beeby..

	q
<i>Eu(DO3A-o-HAP)</i>	1,5
<i>Eu(DO3A-p-HAP)</i>	0,9
<i>Eu(DO3A-o-MAP)</i>	1,1
<i>Eu(DO3A-p-MAP)</i>	1,1
<i>Eu(DO3A-o-AnAP)</i>	1,51
<i>Eu(DO3A-MFAM)</i>	1

Todos os complexos amosan números de hidratación próximos a 1, se ben os valores calculados para o *Eu(DO3A-o-HAP)* e o *Eu(DO3A-o-AnAP)* son algo máis elevados, probablemente debido á desactivación provocada polos grupos -OH e -NH₂ establecendo enlaces de hidróxeno co átomo de osíxeno da acetofenona, ou tamén debido á presenza de procesos de retrotransferencia comentados no apartado anterior. Estes resultados son consistentes co descrito en bibliografía para complexos análogos de Gd(III) con aplicacións como axentes de contraste.⁴⁵

5.3. Ensaio de viabilidade celular

Calculouse a porcentaxe de viabilidade celular para cada unha das condicións ensaiadas de *Eu(DO3A-FMAM)* a partir das medidas de absorbancia realizadas, tal e como se indica no protocolo comercial.⁴⁴ Como se realizaron réplicas de cada tratamento, calculáronse tamén os valores de viabilidade celular promedio para cada un deles, xunto coas súas desviacións estándar.

Na **Figura 21** recóllense os resultados obtidos para as distintas concentracións do complexo de Eu(III). Ningún destes tratamentos presentou un efecto citotóxico sobre as células HFF-1 segundo a normativa ISO para a avaliación biolóxica de dispositivos médicos.⁵⁶ Esta normativa determina que unha sustancia é considerada tóxica cando provoca unha redución na viabilidade celular de máis do 30%, algo que non se observou en ningunha das condicións ensaiadas.

Ademais, non parece haber diferenzas importantes entre os distintos tratamentos, tal e como confirmou o test ANOVA realizado (apartado 8. Anexos). Este test estatístico determinou que non hai diferenzas estatisticamente significativas entre os valores de viabilidade celular obtidos para cada concentración de complexo Eu(DO3A-FMAM). Estes resultados son prometedores, mais sería interesante en ensaios futuros analizar tamén a distribución e localización subcelular do complexo, realizando estudos *in vitro* da luminescencia deste complexo.

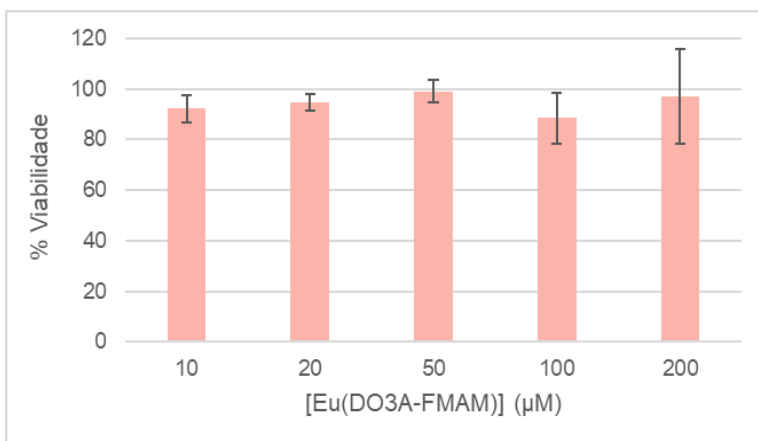


Figura 21: Porcentaxes de viabilidade celular obtidos para cada concentración ensaiada do complexo Eu(DO3A-MFAM).

Os resultados numéricos correspondentes á gráfica anterior (**Figura 21**), así como os resultados no análise estadístico realizado, atópanse na **Táboa 12** do apartado Anexos.

6. CONCLUSIÓN

A partir dos datos obtidos no presente traballo, pódense extraer as seguintes conclusións:

- O ligando DO3A-MFAM foi eficazmente sintetizado e purificado, cun rendemento global do 46%.
- Os complexos de Eu(DO3A-o-AnAP) e Eu(DO3A-MFAM) foron sintetizados *in situ* de maneira exitosa.
- As técnicas de espectrometría de masas (ESI⁺), espectroscopía de RMN de ¹H e ¹³C e espectroscopía infravermella permitiron caracterizar e confirmar a obtención tanto do ligando DO3A-MFAM como do complexo Eu(DO3A-MFAM).
- O espectro de ¹H-RMN do complexo Eu(DO3A-MFAM) parece indicar a presenza de 2 isómeros SAP en disolución, se ben isto require un maior estudo.
- A análise dos espectros de absorción dos seis complexos estudados neste traballo permitiu identificar diferenzas xerais entre eles, e especificamente entre os isómeros *orto* e *para* dos complexos cos grupos metoxiacetofenona e hidroxiacetofenona. Ademais, tamén se observou un desprazamento batocrómico das bandas dos complexos co grupo hidroxiacetofenona, sensibles ao pH, ao desprotonárense en medio básico.
- Os espectros de emisión dos complexos co brazo hidroxiacetofenona (Eu(DO3A-o-HAP) e Eu(DO3A-p-HAP)) amosaron intensidades de emisión moi superiores para as especies protonadas fronte ás desprotonadas. Así mesmo, a morfoloxía dos espectros de emisión dos seis compostos correspóndese coa esperada para este tipo de complexos de Eu(III), e puido ser relacionada coa simetría dos mesmos.
- Os rendementos cuánticos de emisión calculados para os complexos co grupo metoxiacetofenona (Eu(DO3A-o-MAP) e Eu(DO3A-p-MAP)) foron considerablemente superiores aos dos demais complexos estudados, o que pode denotar unha maior eficacia do proceso de transferencia de enerxía dende este grupo cromóforo ao centro metálico. Ademais, estes complexos tamén amosaron tempos de vida do estado excitado lixeiramente máis longos.

- A determinación dos tempos de vida en H₂O e D₂O permitiu confirmar a presenza dunha única molécula de auga na primeira esfera de coordinación dos seis complexos estudados.
- No estudo de viabilidade celular realizado para o complexo Eu(DO3A-MFAM) non se detectou ningún efecto citotóxico nas concentracións de composto ensaiadas.

CONCLUSIONES

A partir los datos obtenidos en el presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El ligando DO3A-MFAM fue sintetizado y purificado eficazmente, con un rendimiento global del 46%.
- Los complejos Eu(DO3A-o-AnAP) y Eu(DO3A-MFAM) se sintetizaron *in situ* de manera exitosa.
- Las técnicas de espectrometría de masas (ESI⁺), espectroscopía de RMN ¹H y ¹³C y espectroscopía de infrarrojos permitieron caracterizar y confirmar la obtención tanto del ligando DO3A-MFAM como del complejo Eu(DO3A-MFAM).
- El espectro de ¹H-NMR del complejo Eu(DO3A-MFAM) parece indicar la presencia de 2 isómeros SAP en disolución, aunque esto requiere un mayor estudio.
- El análisis de los espectros de absorción de los seis complejos estudiados en este trabajo permitió identificar diferencias generales entre ellos, y específicamente entre los isómeros *orto* y *para* de los complejos con los grupos metoxiacetofenona e hidroxiacetofenona. Además, también se observó un desplazamiento batocrómico de las bandas de los complejos con el grupo hidroxiacetofenona, sensible al pH, al desprotonarse en medio básico.
- Los espectros de emisión de los complejos de brazos de hidroxiacetofenona (Eu(DO3A-o-HAP) y Eu(DO3A-p-HAP)) mostraron intensidades de emisión mucho más altas para las especies protonadas que para las desprotonadas. Asimismo, la morfología de los espectros de emisión de los seis compuestos se corresponde con la esperada para este tipo de complejos de Eu(III), y ha podido ser relacionada con su simetría.

- Los rendimientos cuánticos de emisión calculados para los complejos con el grupo metoxiacetofenona (Eu(DO3A-o-MAP) y Eu(DO3A-p-MAP)) fueron considerablemente superiores a los del resto de complejos estudiados, lo que puede denotar una mayor eficiencia del proceso de transferencia de energía de este grupo cromóforo al centro metálico. Además, estos complejos también mostraron tiempos de vida del estado excitado ligeramente más largos.
- La determinación de los tiempos de vida en H₂O y D₂O permitió confirmar la presencia de una sola molécula de agua en la primera esfera de coordinación de los seis complejos estudiados.
- En el estudio de viabilidad celular realizado para el complejo Eu(DO3A-MFAM) no se detectó ningún efecto citotóxico para las concentraciones del compuesto ensayadas.

CONCLUSIONS

The work carried out during this final dissertation allowed to reach the following conclusions:

- The ligand DO3A-MFAM was efficiently synthesized and purified, with an overall yield of 46%.
- The Eu(DO3A-o-AnAP) and Eu(DO3A-MFAM) complexes were successfully prepared *in situ*.
- The characterization performed using mass spectrometry (ESI⁺), ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and infrared spectroscopy made it possible to confirm the successful preparation of both the DO3A-MFAM ligand and the Eu(DO3A-MFAM) complex.
- The ¹H-NMR spectrum of the Eu(DO3A-MFAM) complex suggests the presence of two square antiprismatic (SAP) isomers in solution, although this issue requires further study.
- The analysis of the absorption spectra of the six complexes studied in this work allowed us to identify general differences between them, and specifically between the *ortho* and *para* isomers of the complexes bearing methoxyacetophenone and hydroxyacetophenone groups. Furthermore, a bathochromic displacement of the bands of the complexes with the hydroxyacetophenone group, sensitive to pH, was also observed when deprotonated in basic medium.

- The emission spectra of the complexes with the hydroxyacetophenone arm (Eu(DO3A-o-HAP) and Eu(DO3A-p-HAP)) showed much higher emission intensities for the protonated species than for the deprotonated ones. Likewise, the morphology of the emission spectra of the six compounds corresponds to that expected for this type of Eu(III) complexes, and it has been possible to associate it with their symmetry.
- The emission quantum yields calculated for the complexes with the methoxyacetophenone group (Eu(DO3A-o-MAP) and Eu(DO3A-p-MAP)) were considerably higher than those of the rest of the complexes studied, which may denote a greater efficiency of the energy transfer process of this chromophore group to the metal center. Furthermore, these complexes also exhibited slightly longer lifetimes of the excited state.
- The determination of the lifetimes in H₂O and D₂O made it possible to confirm the presence of a single water molecule in the first coordination sphere of the six complexes studied.
- In the cell viability study carried out for the Eu(DO3A-MFAM) complex, no cytotoxic effect was detected for the tested concentrations of this compound.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Gao, P., Pan, W., Li, N. Tang, B. (2019). Fluorescent probes for organelle-targeted bioactive species imaging. *Chemical Science*, 10, 6035–6071.
2. Fritzen, D. L., Giordano, L., Rodrigues, L. C. V. & Monteiro, J. H. S. K. (2020). Opportunities for persistent luminescent nanoparticles in luminescence imaging of biological systems and photodynamic therapy. *Nanomaterials*, 10, 1–38.
3. Chauvin, A.-S. (2021). Visible Emitting Lanthanide Ions in Bioimaging. *Springer, Cham*. 1–45.
4. Dutta, T., Pal, K. Koner, A. L. (2020). Cellular metabolic activity marker via selective turn-ON detection of transporter protein using nitrobenzoxadiazole-based fluorescent reporter. *Scientific Reports 2020 10:1* 10, 1–9.
5. Kasten, F. H. (1999). Introduction to Fluorescent Probes: Properties, History and Applications. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, 17–39.
6. Niu, G., Zhang, R., Shi, X., Park, H., Xie, S., & Kwok, R. et al. (2020). AIE luminogens as fluorescent bioprobes. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, 123, 115769.
7. Liu, Y., Tu, D., Zhu, H., Ma, E., Chen, X. (2013). Lanthanide-doped luminescent nano-bioprobes: from fundamentals to biodetection. *Nanoscale*, 5(4), 1369-1384.
8. Hamon, N., Roux, A., Beyler, M., Mulatier, J., Andraud, C., & Nguyen, C. et al. (2020). Pyclyen-Based Ln(III) Complexes as Highly Luminescent Bioprobes for In Vitro and In Vivo One- and Two-Photon Bioimaging Applications. *Journal Of The American Chemical Society*, 142(22).
9. Ma, H., Song, B., Wang, Y., Liu, C., Wang, X., & Yuan, J. (2017). Development of organelle-targetable europium complex probes for time-gated luminescence imaging of hypochlorous acid in live cells and animals. *Dyes and Pigments*, 140, 407-416.

10. Montgomery, C. P., Murray, B. S., New, E. J., Pal, R. & Parker, D. (2009). Cell-Penetrating Metal Complex Optical Probes: Targeted and Responsive Systems Based on Lanthanide Luminescence. *Accounts of Chemical Research*, *42*, 925–937.
11. Walton, J. W., Bourdolle, A., Butler, S. J., Soulie, M., Delbianco, M., McMahon, B. K., ... & Parker, D. (2013). Very bright europium complexes that stain cellular mitochondria. *Chemical Communications*, *49*(16), 1600-1602.
12. Yu, J., Parker, D., Pal, R., Poole, R., Cann, M. (2006). A Europium Complex That Selectively Stains Nucleoli of Cells. *Journal Of The American Chemical Society*, *128*(7), 2294-2299.
13. McMahon, B. K., Pal, R., Parker, D. (2013). A bright and responsive europium probe for determination of pH change within the endoplasmic reticulum of living cells. *Chemical Communications*, *49*, 5363–5365.
14. Murray, B. S., New, E. J., Pal, R., Parker, D. (2008). Critical evaluation of five emissive europium(III) complexes as optical probes: correlation of cytotoxicity, anion and protein affinity with complex structure, stability and intracellular localisation profile. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *6*, 2085–2094.
15. Butler, S. J., Delbianco, M., Lamarque, L., McMahon, B. K., Neil, E. R., Pal, R., Zwier, J. M. (2015). EuroTracker® dyes: design, synthesis, structure and photophysical properties of very bright europium complexes and their use in bioassays and cellular optical imaging. *Dalton Transactions*, *44*(11), 4791-4803.
16. Weller, M., Overton, T., Rourke, J., & Armstrong, F. (2018). *Inorganic chemistry* (7th ed.). Oxford University Press.
17. Clark, D. L. (2000). The chemical complexities of plutonium. *Los Alamos Science*, *26*, 364-381.
18. Greenwood, N., Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the elements* (2nd ed.). Butterworth-Heinemann.
19. Housecroft, C., Sharpe, A. (2012). *Inorganic chemistry* (4th ed.). Pearson.
20. Pearson, R. G. (2002). Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society*, *85*, 3533–3539.

21. Gispert, J. R. (2000). *Química de coordinación*. Edicions Universitat de Barcelona.
22. Bünzli, J.-C. G., Piguet, C. (2005). Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chemical Society Reviews*, 34, 1048–1077.
23. Andres, J., & Chauvin, A. (2012). Lanthanides: Luminescence. *Encyclopedia Of Inorganic And Bioinorganic Chemistry*.
24. Andres, J., & Chauvin, A. (2012). Lanthanides: Luminescence Applications. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*.
25. Nonat, A., Esteban-Gómez, D., Valencia, L., Perez-Lourido, P., Barriada, J. L., Charbonnière, L. J., & Platas-Iglesias, C. (2019). The role of ligand to metal charge-transfer states on the luminescence of Europium complexes with 18-membered macrocyclic ligands. *Dalton Transactions*, 48(12), 4035-4045.
26. Heffern, M. C., Matosziuk, L. M., Meade, T. J. (2013). Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging. *Chemical Reviews*, 114, 4496–4539.
27. Weissman, S. I. (1942). Intramolecular energy transfer the fluorescence of complexes of europium. *The Journal of Chemical Physics*, 10(4), 214-217.
28. Binnemans, K. (2015). Interpretation of europium (III) spectra. *Coordination Chemistry Reviews*, 295, 1-45.
29. Alexander, V. (2002). Design and Synthesis of Macrocyclic Ligands and Their Complexes of Lanthanides and Actinides. *Chemical Reviews*, 95, 273–342.
30. Stetter, H. & Frank, W. (1976). Complex Formation with Tetraazacycloalkane-N,N',N'',N'''-tetraacetic Acids as a Function of Ring Size. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 15, 686–686.
31. Desreux, J. F. (1980). Nuclear magnetic resonance spectroscopy of lanthanide complexes with a tetraacetic tetraaza macrocycle. Unusual conformation properties. *Inorganic chemistry*, 19(5), 1319-1324.

32. Spirlet, M. R., Rebizant, J., Desreux, J. F., & Loncin, M. F. (1984). Crystal and molecular structure of sodium aqua (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetato) europate (III) tetrahydrate Na⁺ (EuDOTA. H₂O)·4H₂O, and its relevance to NMR studies of the conformational behavior of the lanthanide complexes formed by the macrocyclic ligand DOTA. *Inorganic Chemistry*, 23(3), 359-363.
33. Stasiuk, G. J. & Long, N. J. (2013). The ubiquitous DOTA and its derivatives: the impact of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid on biomedical imaging. *Chemical Communications*, 49, 2732–2746.
34. Chilla, S. N. M., Henoumont, C., Elst, L. vander, Muller, R. N., Laurent, S. (2017). Importance of DOTA derivatives in bimodal imaging. *Israel Journal of Chemistry*, 57, 800–808.
35. Regueiro-Figueroa, M., Bensenane, B., Ruscsak, E., Esteban-Gomez, D., Charbonniere, L. J., Tircso, G., ... & Platas-Iglesias, C. (2011). Lanthanide dota-like complexes containing a picolinate pendant: structural entry for the design of LnIII-based luminescent probes. *Inorganic chemistry*, 50(9), 4125-4141.
36. Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J., & Lauffer, R. B. (1999). Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chemical reviews*, 99(9), 2293-2352.
37. Mason, W. (1999). *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*. Academic Press.
38. Microscopy.berkeley.edu. (2019). The Epifluorescence Microscope. Available at: http://microscopy.berkeley.edu/courses/tlm/fluor/fluor_micro.html [Accessed 29 Jun. 2021].
39. Majtner, T. (2015). Texture-Based Image Description in Fluorescence Microscopy. *Doctoral theses, Dissertations, Masaryk University, Faculty of Informatics, Brno*.
40. Wilson, T. (Ed.). (1990). *Confocal microscopy* (Vol. 426, pp. 1-64). London: Academic press.
41. Brock, T., Madigan, M., & Guerrero, R. (2015). *Brock biología de los microorganismos* (14th ed.). Pearson Educación.

42. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. In S. Markossian *et al.*, *Assay Guidance Manual*. Retrieved July 15, 2021, from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/pdf/Bookshelf_NBK53196.pdf.
43. Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S. & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods in Molecular Biology*, 1601, 1–17.
44. *Product Sheet: PrestoBlue Cell Viability Reagent*. (2019). Retrieved July 18, 2021, from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018370-PrestoBlueCellViabilityReagent-PI.pdf>.
45. Leone, L., Esteban-Gómez, D., Platas-Iglesias, C., Milanese, M., Tei, L. (2019). Accelerating water exchange in GdIII–DO3A-derivatives by favouring the dissociative mechanism through hydrogen bonding. *Chemical Communications*, 55, 513–516.
46. Beeby, A., Bushby, L. M., Maffeo, D., Williams, J. A. G. (2002). Intramolecular sensitisation of lanthanide(III) luminescence by acetophenone-containing ligands: the critical effect of para-substituents and solvent. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 2, 48–54.
47. Chauvin, A. S., Gummy, F., Imbert, D., & Bünzli, J. C. G. (2004). Europium and terbium tris (dipicolinates) as secondary standards for quantum yield determination. *Spectroscopy letters*, 37(5), 517-532.
48. *Erratum*. (2007), 40(1), 193-193
49. Origin 9. (2012). Northampton, MA, USA: OriginLab Corporation.
50. Miller, J., Maté Jiménez, C., & Miller, J. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica* (4th ed.). Prentice Hall.
51. Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.

52. Kumas, C., Fernando, W. S., Zhao, P., Regueiro-Figueroa, M., Kiefer, G. E., Martins, A. F., Sherry, A. D. (2016). Unexpected Changes in the Population of Coordination Isomers for the Lanthanide Ion Complexes of DOTMA–Tetraglycinate. *Inorganic chemistry*, 55(18), 9297-9305.
53. Aime, S., Botta, M., Fasano, M., Marques, M. P. M., Geraldes, C. F., Pubanz, D., & Merbach, A. E. (1997). Conformational and coordination equilibria on DOTA complexes of lanthanide metal ions in aqueous solution studied by 1H-NMR spectroscopy. *Inorganic chemistry*, 36(10), 2059-2068.
54. Engel, T., Reid, P., & Hehre, W. (2013). *Physical chemistry* (3rd ed.). Pearson.
55. Gündüz, S., Vibhute, S., Botár, R., Kálmán, F. K., Tóth, I., Tircsó, G., ... & Angelovski, G. (2018). Coordination properties of GdDO3A-based model compounds of bioresponsive MRI contrast agents. *Inorganic chemistry*, 57(10), 5973-5986.
56. International Standard ISO 10993-5 (2009). Biological evaluation of medical devices: Test for *in vitro* cytotoxicity.

8. ANEXOS

8.1. Espectros

8.1.1. Espectros de masas

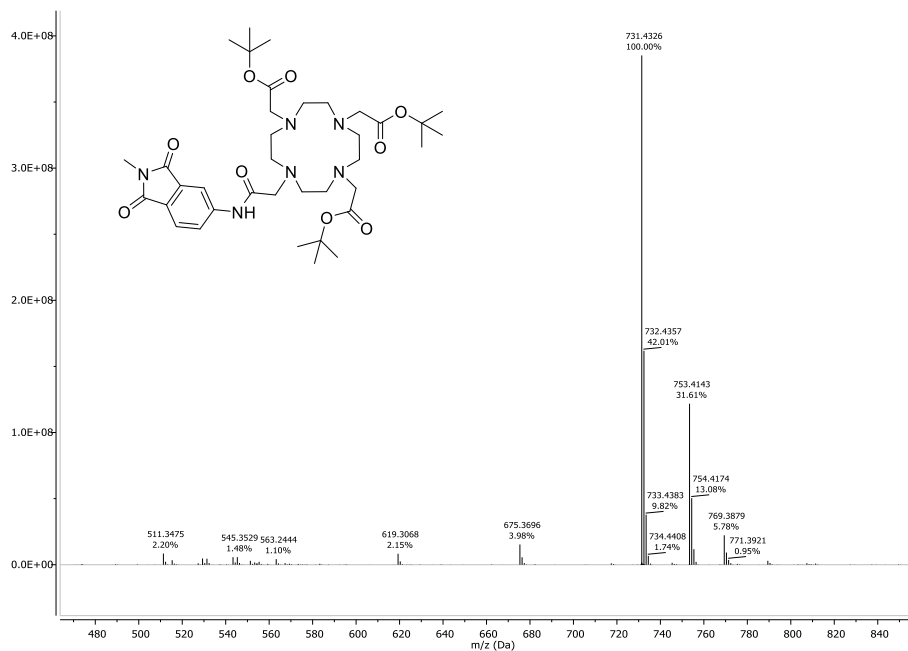


Figura 22: Espectro de masas (ESI+) do precursor do ligando *t*-Bu-DO3A-MFAM.

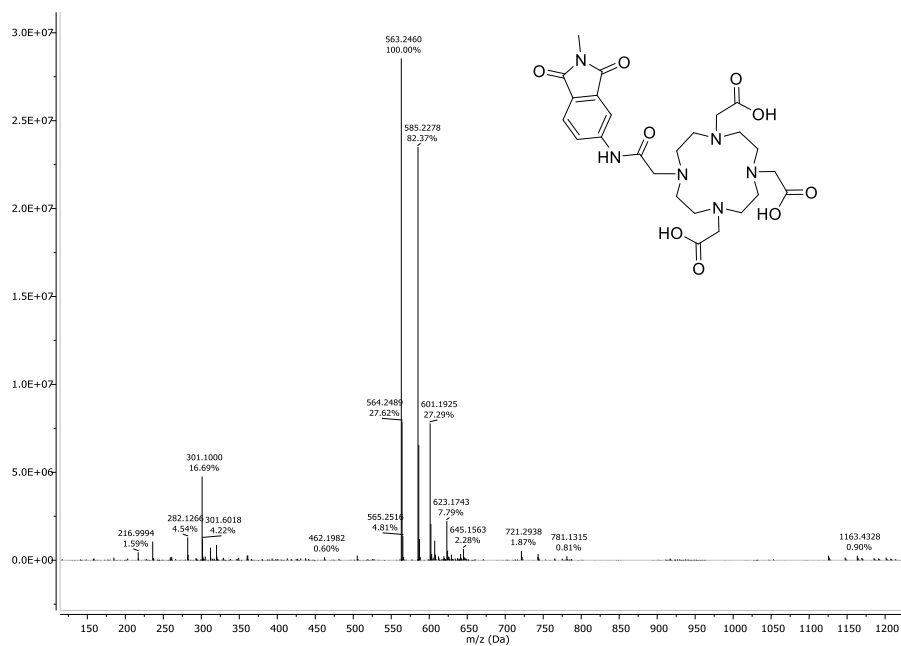


Figura 23: Espectro de masas (ESI+) do ligando DO3A-MFAM.

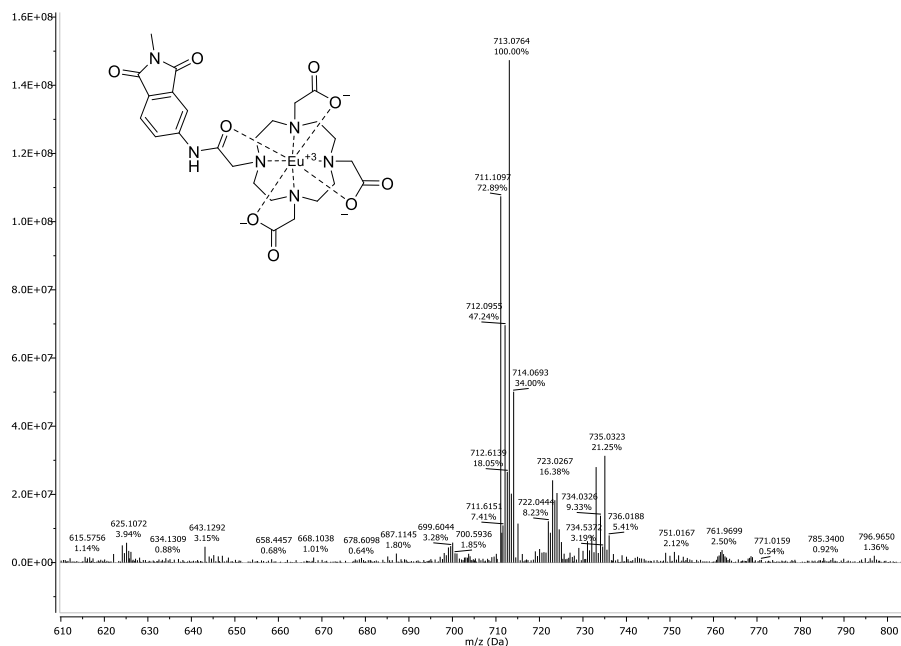


Figura 24: Espectro de masas (ESI+) do complexo Eu(DO3A-MFAM).

8.1.2. Espectros de RMN

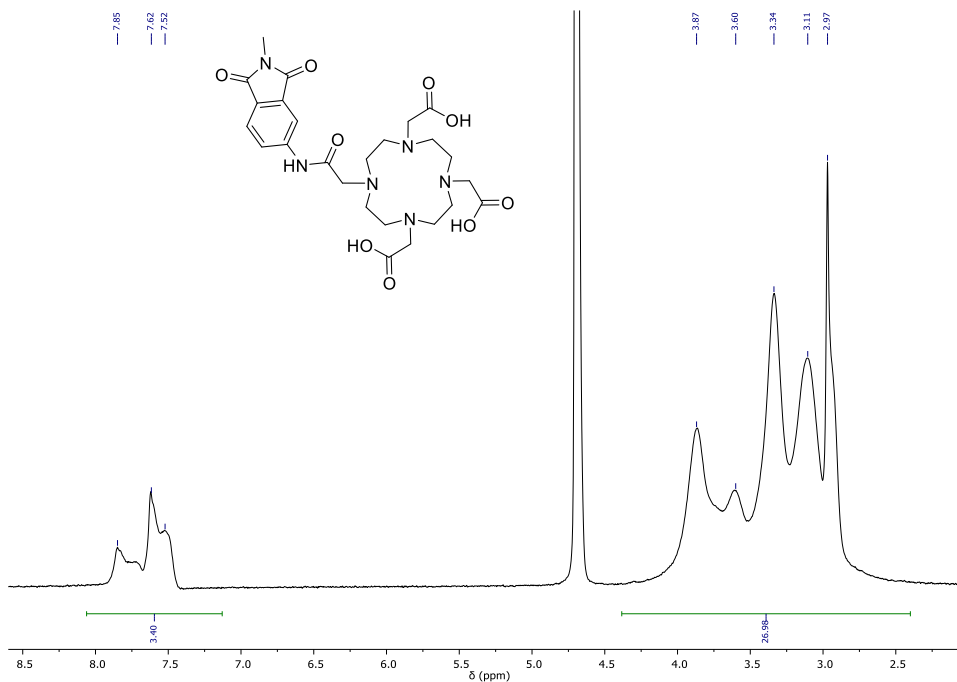


Figura 25: Espectro ¹H-RMN (298K, D₂O, 300 MHz) do ligando DO3A-MFAM.

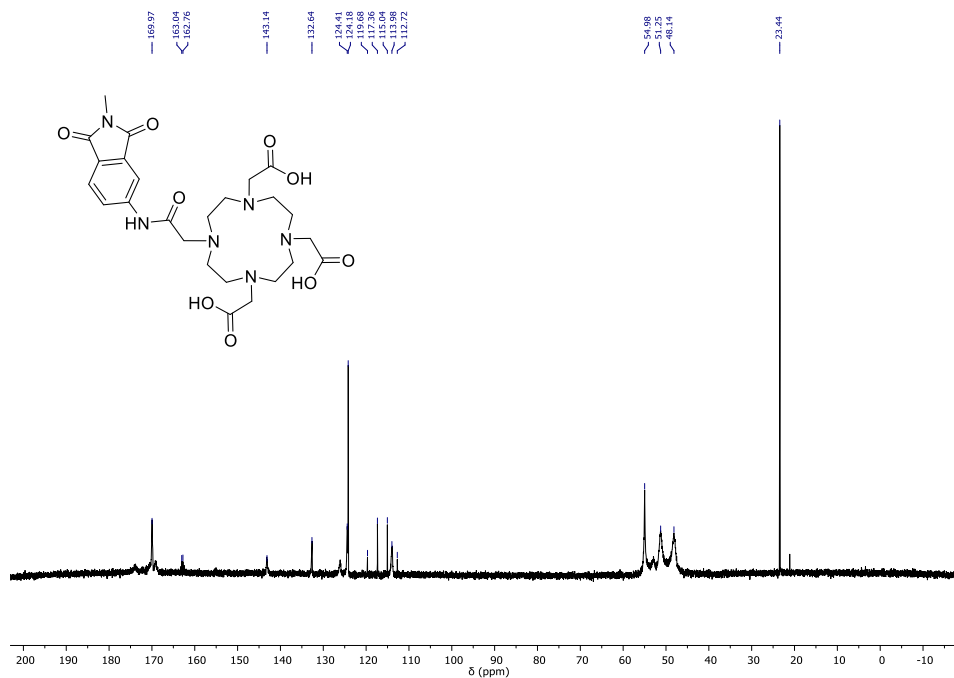


Figura 26: Espectro ^{13}C -RMN (298K, D_2O , 126 MHz) do ligando DO3A-MFAM.

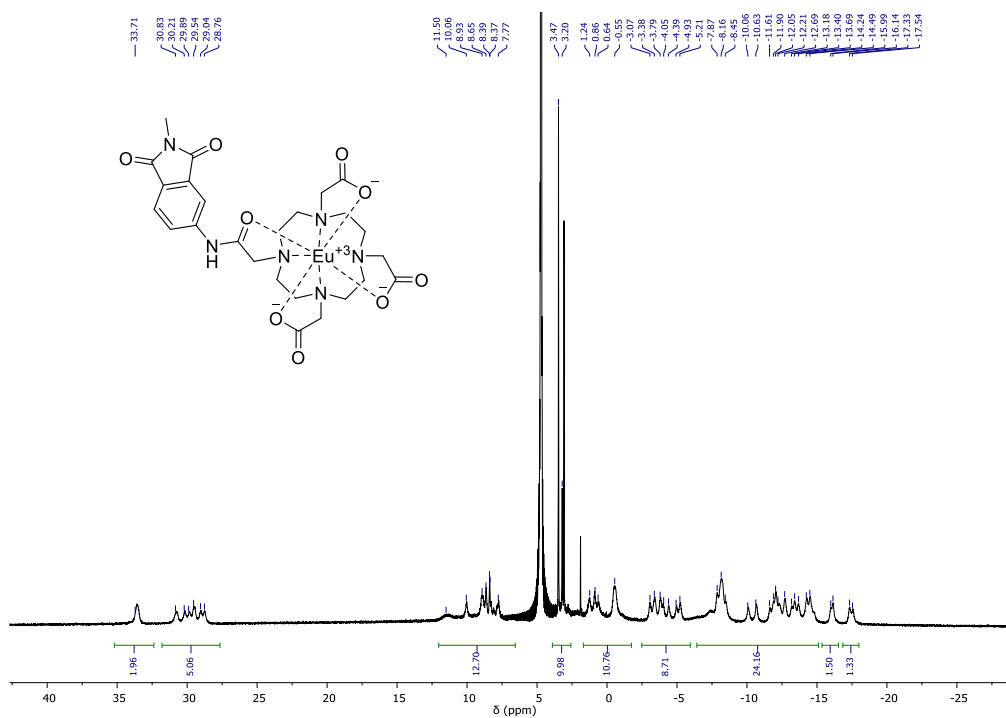


Figura 27: Espectro ^1H -RMN (298K, D_2O , 300 MHz) do complexo Eu(DO3A-MFAM).

8.1.3. Espectros IR

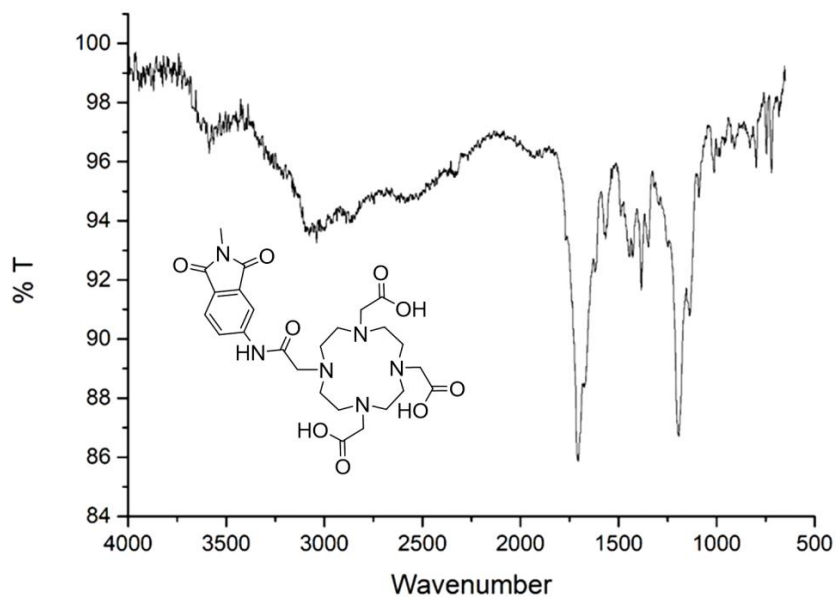


Figura 28: Espectro IR do ligando DO3A-MFAM.

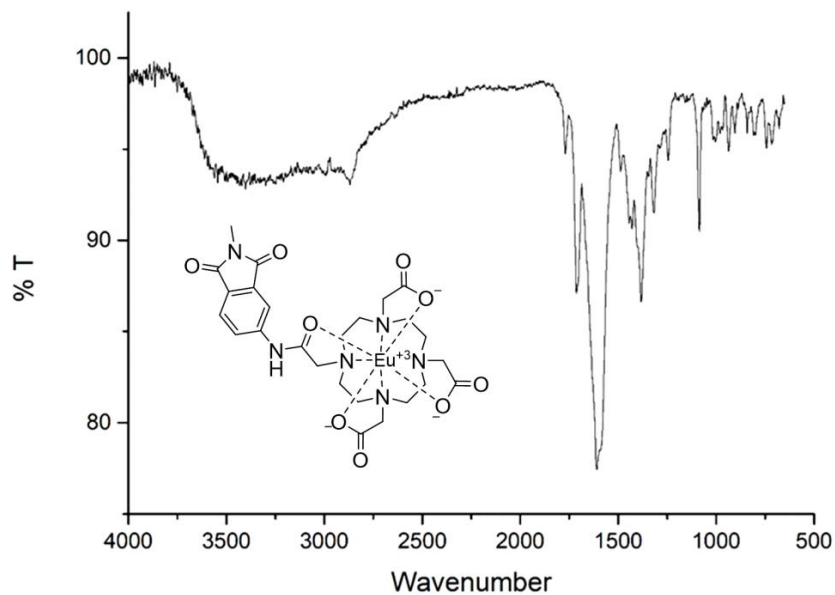


Figura 29: Espectro IR do complexo Eu(DO3A-MFAM).

8.1.4. Espectros de excitación

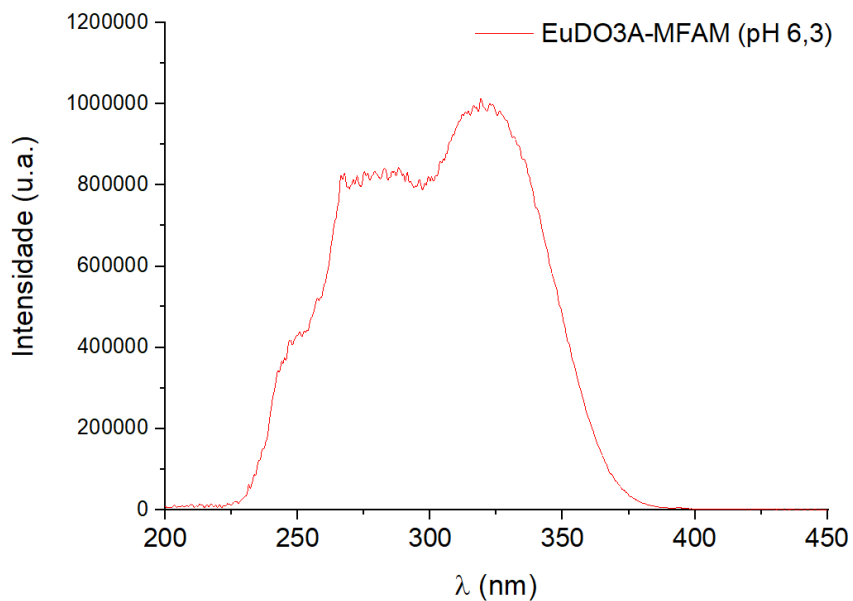


Figura 30: Espectro de excitación do complexo Eu(DO3A-MFAM) ($\lambda_{em} = 613$ nm).

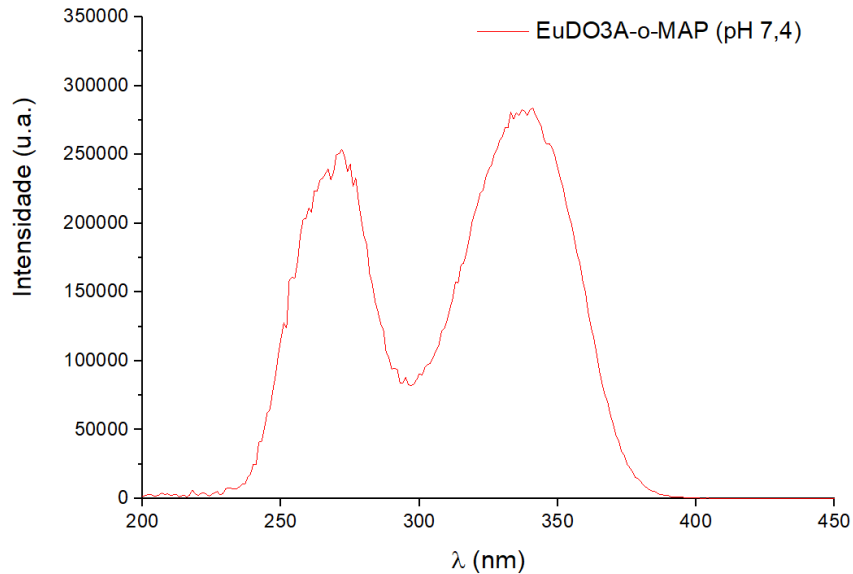


Figura 31: Espectro de excitación do complexo Eu(DO3A-o-MAP) ($\lambda_{em} = 613$ nm).

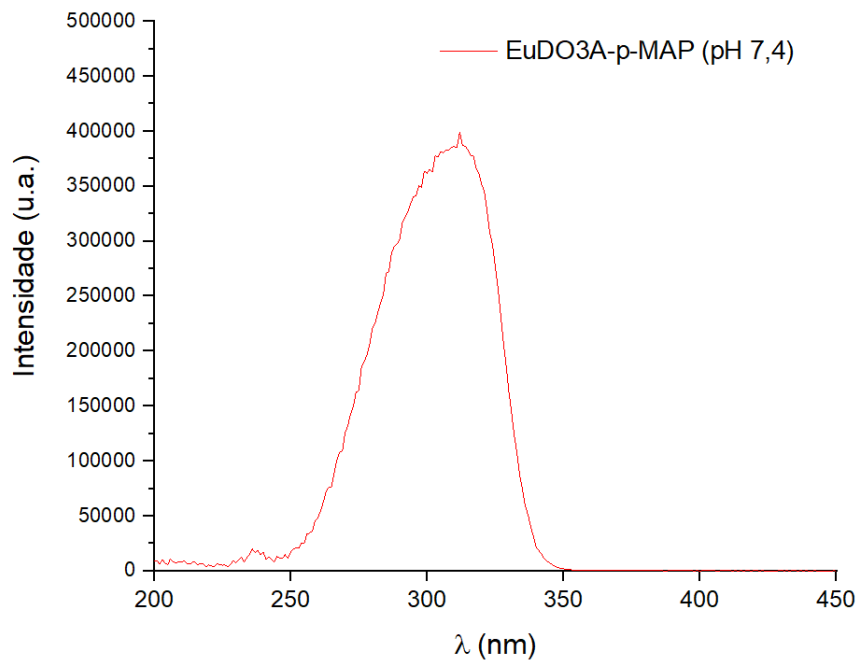


Figura 32: Espectro de excitación do complexo Eu(DO3A-p-MAP) ($\lambda_{em} = 613$ nm).

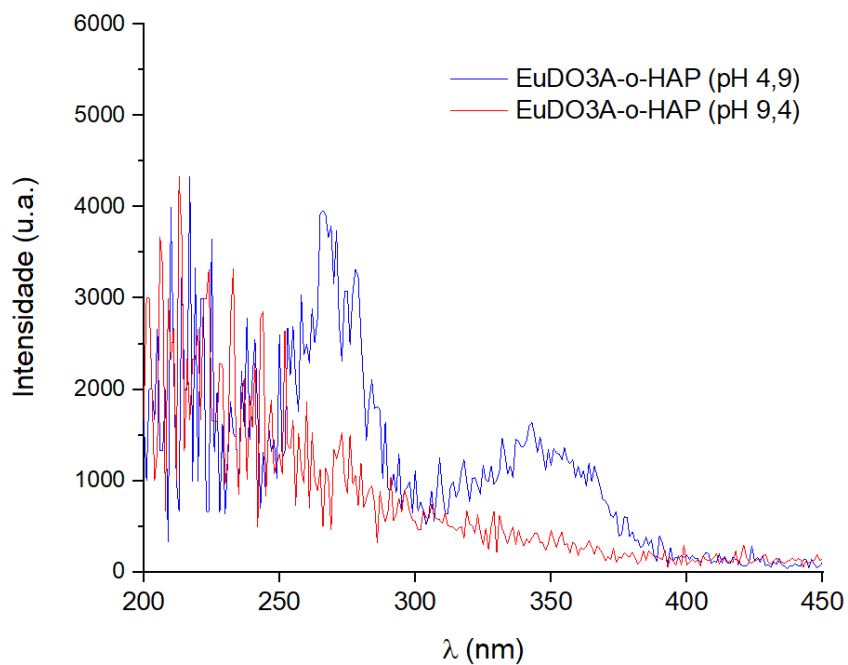


Figura 33: Espectro de excitación do complexo Eu(DO3A-o-HAP) a pH 4,9 (azul) e pH 9,4 (vermello) ($\lambda_{em} = 613$ nm).

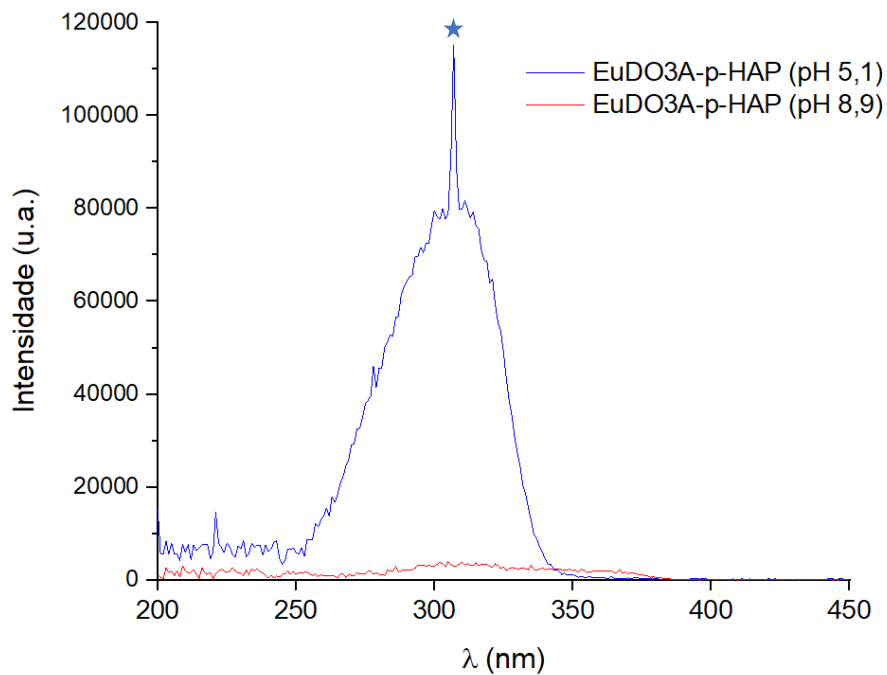


Figura 34: Espectro de excitación do complexo Eu(DO3A-p-HAP) a pH 5,1 (azul) e pH 8,9 (vermello) ($\lambda_{em} = 613$ nm). Aparece sinalizada cunha estrela unha banda de dispersión.

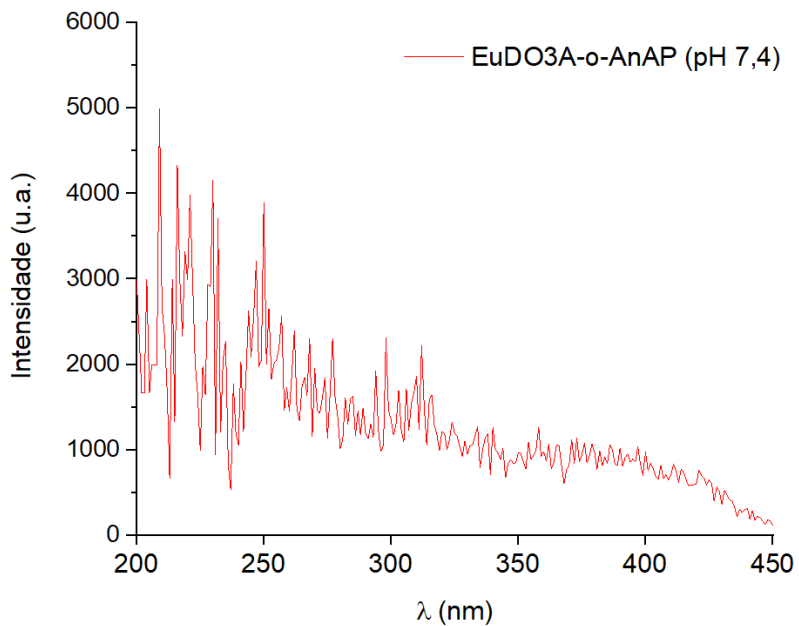


Figura 35: Espectro de excitación do complexo Eu(DO3A-o-AnAP) ($\lambda_{em} = 613$ nm).

8.2. Estudo de viabilidade celular

8.2.1. Resultados cuantitativos

Táboa 12: Porcentaxes de viabilidade celular promedio e valores de desviación estándar calculados para as direcentes concentracións do complexo Eu(DO3A-MFAM) ensaiadas.

[Eu(DO3A-MFAM)] (μM)	% Viabilidade promedio	SD
10	92,26	5,43
20	94,56	3,34
50	99,06	4,38
100	88,39	10,08
200	96,92	18,72

8.2.2. Análise estadístico

Test de normalidade Shapiro-Wilk

- H_0 : os datos pertencen a unha poboación cunha distribución de datos normal.
- p-valor crítico = 0,05

Táboa 13: Valores calculados para cada concentración ensaiada do complexo Eu(DO3A-MFAM) do estatístico SW, xunto cos seus correspondentes valores tabulados (SWt) e o p-valor asociado para un nivel de confianza do 95% ($\alpha = 0,05$).

[Eu(DO3A-MFAM)] (μM)	SW	SW t (0.05)	p-valor
100	0,906	0,767	0,376
200	0,783	0,767	0,086

- Conclusión: acéptase a H_0 . Todos os datos se axustan a unha distribución normal (p-valor > p-valor_{crítico}).

Análise da varianza (ANOVA)

- H_0 : as medias das mostras difiren significativamente.

RESUMEN				
Tratamentos	Conta	Suma	Promedio	Varianza
200 μM	3	290,760364	96,9201212	350,324447
100 μM	3	265,168539	88,3895131	101,607218
50 μM	4	396,234437	99,0586092	19,2059726
20 μM	4	378,256909	94,5642271	11,1793024
10 μM	4	369,025205	92,2563012	29,5245719

ANÁLISE DE VARIANZA

<i>Orixe de las variacións</i>	<i>Suma de cadrados</i>	<i>Grados de liberdade</i>	<i>Promedio de los cadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidade</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	232,727762	5	46,5455523	0,51545801	0,75997397	3,10587524
Dentro de los grupos	1083,59287	12	90,2994059			
Total	1316,32063	17				

- Conclusión: Rexéitase a H_0 . Non hai diferencias estatisticamente significativas entre as medias ($F < F_{crit}$, a un p-valor $> 0,05$).