

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Química e Bioquímica



# **Complexos Organometálicos de Tc(I)/Re(I) para Imagiologia Molecular de Tecidos Neoplásicos**

---

Carolina Maria Candeias de Moura

**Tese orientada por:**

Doutor António Manuel Rocha Paulo

Doutora Isabel Rego dos Santos (co-orientadora)

**Doutoramento em Química**

Especialidade Química Inorgânica

**2011**



O trabalho apresentado nesta tese foi realizado no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas na Unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas do Instituto Tecnológico e Nuclear (ITN), sob a orientação do Doutor António Manuel Rocha Paulo. O trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/38469/2007.



## Agradecimentos

---

Ao meu orientador, Doutor António Paulo, expresse o meu sincero e profundo reconhecimento pelos conhecimentos transmitidos, que muito ajudaram a minha formação científica, e pela forma rigorosa como orientou esta tese. A sua total disponibilidade, capacidade de discussão, apoio e incentivo foram determinantes para a realização deste trabalho.

À Doutora Isabel Rego dos Santos agradeço a oportunidade que me concedeu para realizar este trabalho no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas.

À Professora Doutora Maria José Calhorda agradeço a disponibilidade demonstrada.

À Doutora Lurdes Gano agradeço o seu empenho na realização dos estudos de biodistribuição, assim como o apoio nos restantes ensaios biológicos, os conhecimentos transmitidos, a sempre disponibilidade, a amizade e a ajuda na revisão desta tese.

À Doutora Filipa Mendes agradeço o empenho na realização de parte dos estudos biológicos desta tese, a amizade, a sempre disponibilidade, as sugestões durante a escrita da tese e revisão, e essencialmente a paciência que teve para discutir questões por vezes meramente existenciais.

À Doutora Célia Fernandes agradeço acima de tudo a sua disponibilidade para resolver todos os problemas relacionados com o HPLC, a boa disposição no laboratório, a amizade, a troca de ideias bem como os conhecimentos transmitidos ao longo de todo o trabalho.

À Doutora Paula Raposinho agradeço a realização de alguns estudos de biodistribuição desta tese e a boa disposição.

À Doutora Filomena Botelho e Mestre Margarida Abrantes (Instituto Biomédico de Investigação de Luz e Imagem-IBILI, Universidade de Coimbra) agradeço a obtenção das imagens em câmara gama e a disponibilidade demonstrada.

À Margarida Videira, à Patrícia Kromer e à Teresa Esteves agradeço a amizade e a ajuda que me deram em partes deste trabalho.

À Elisabete Correia agradeço a realização dos estudos de biodistribuição bem como a boa disposição constante.

Ao Amadeu Rodrigues agradeço o apoio técnico prestado em várias circunstâncias.

Ao Doutor Joaquim Marçalo agradeço a sua disponibilidade na realização de alguns dos espectros de massa apresentados neste trabalho, e ao Doutor Pedro Vaz e Doutor Paulo Madeira a realização dos espectros de HR-ESI/MS na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Ao Sr. António Soares e à Vânia Silva agradeço a forma cuidadosa com que efectuaram as análises elementares de C,H, N de todos os compostos apresentados nesta tese.

À Doutora Isabel Cordeiro dos Santos agradeço a resolução das estruturas moleculares presentes nesta tese.

Aos meus colegas do Grupo de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas agradeço a colaboração, o incentivo e acima de tudo a amizade demonstrada. Agradeço em especial aos meus colegas de laboratório, Carina, Catarina, Célia, Francisco, Margarida, Raquel e Susana com quem convivi nos dias bons e nos dias maus. Agradeço ainda aos restantes elementos que não sendo do grupo GRC conviveram comigo durante a realização deste trabalho.

À Sofia Gama agradeço as discussões científicas e a amizade.

À Marta Santos agradeço acima de tudo a amizade fora e dentro do ITN, a disponibilidade e acima de tudo os conselhos sempre acertados no *design* desta tese.

A todos os meus amigos agradeço o estímulo e amizade, a paciência e a compreensão pela minha falta de disponibilidade.

À Chao Min pela companhia durante a escrita da tese.

Por fim, um agradecimento muito especial aos meus pais, à minha irmã e à Mafalda pois sem eles nada disto teria sido possível.

Carolina

## Resumo

---

O trabalho apresentado nesta tese envolveu o estudo químico/radioquímico e a avaliação biológica de complexos de  $\text{Re(I)}/^{99\text{m}}\text{Tc(I)}$  funcionalizados com pequenas moléculas, derivados de benzamidas e sais de trifenilfosfónio, com o objectivo de verificar se tinham interesse para conceber sondas radioactivas para detecção *in vivo* de tecidos neoplásicos.

A primeira parte incidiu sobre complexos funcionalizados com derivados de benzamidas, dirigidos à melanina depositada intracelularmente em células do melanoma melanótico. Inicialmente pretendiam-se explorar complexos com ligandos doadores ( $\text{N}_{\text{pz}},\text{H},\text{S}$ ), ( $\text{N}_{\text{pz}},\text{N},\text{N}$ ) e ( $\text{N}_{\text{pz}},\text{N},\text{O}$ ), contendo grupos pirazolilo como função coordenante comum. No entanto, o complexo modelo de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  com o doador ( $\text{N}_{\text{pz}},\text{H},\text{S}$ ), *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}\{\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}(\text{CO})_3](\text{Tc1})$ , apresentou um perfil de biodistribuição em ratinho pouco favorável e a funcionalização foi efectuada unicamente para as outras classes de ligandos. Os complexos obtidos (**Tc2-Tc9**), identificados quimicamente por comparação em HPLC com os congéneres de Re (**Re2-Re9**), revelaram uma elevada afinidade para a melanina, mas uma baixa captação em células melanóticas do melanoma murino. Este comportamento reflecte a incapacidade dos complexos atravessarem a membrana celular, provavelmente como resultado do seu carácter hidrofílico. Para obter compostos com características biológicas mais promissoras, sintetizaram-se complexos (**Re11-Re17/Tc11-Tc17**) com ligandos doadores ( $\text{N}_{\text{pz}},\text{N},\text{O}$ ), ( $\text{N}_{\text{py}},\text{N},\text{O}$ ) e ( $\text{S},\text{N},\text{O}$ ), com menor massa molecular e funcionalizados com grupos N-dietilo e N-pirrolidina. O complexo **Tc16**, estabilizado por um ligando derivado da cisteamina do tipo ( $\text{S},\text{N},\text{O}$ ) e funcionalizado com o grupo N-dietilo, foi o que apresentou maior captação tumoral em ratinhos com melanoma induzido.

Na segunda parte estudaram-se complexos (**Re18-Re-23/Tc18-Tc23**) funcionalizados com derivados de trifenilfosfónio e estabilizados por ligandos doadores ( $\text{S},\text{N},\text{O}$ ), ( $\text{N}_{\text{pz}},\text{N},\text{N}$ ) e ( $\text{N}_{\text{pz}},\text{N},\text{O}$ ), dirigidos às mitocôndrias de células tumorais. Em geral, os complexos **Tc18-Tc23** apresentaram valores de captação celular e mitocondrial moderados. Essa captação é condicionada pelos valores de potencial das membranas plasmática e mitocondrial, o que indica que estes complexos podem ser promissores para conceber sondas radioactivas para alveijamento das mitocôndrias de tecidos neoplásicos.



## Abstract

---

This thesis describes chemical, radiochemical and biological studies of Re(I)/<sup>99m</sup>Tc(I) tricarbonyl complexes functionalized with small molecules, benzamide derivatives and triphenylphosphonium salts, aimed at the design of radioactive probes for *in vivo* detection of neoplastic tissues.

The first part of the work focused on Re(I)/<sup>99m</sup>Tc(I) tricarbonyl complexes bearing benzamide derivatives for the targeting of melanin, which is deposited intracellularly in melanotic melanoma cells. To obtain these complexes, pyrazolyl-containing bifunctional chelators with (N<sub>pz</sub>,H,S), (N<sub>pz</sub>,N,N) and (N<sub>pz</sub>,N,O) donor atom sets were initially envisaged. However, a model <sup>99m</sup>Tc complex anchored by a (N<sub>pz</sub>,H,S) donor ligand, *fac*-[<sup>99m</sup>Tc{κ<sup>3</sup>-H(μ-H)B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>pz)}(CO)<sub>3</sub>] (**Tc1**), showed an unfavorable biodistribution profile in mice, and the functionalization with the benzamide derivatives proceeded only for the other classes of ligands. The resulting <sup>99m</sup>Tc complexes (**Tc2-Tc9**), chemically identified by HPLC comparison with the rhenium congeners (**Re2-Re9**), showed a high melanin affinity but a low uptake in murine melanotic melanoma cells. Such behavior certainly reflects the inability of the complexes to cross the cell membrane, as a consequence of their hydrophilicity. Searching to improve the biological properties of the compounds, new complexes (**Re11-Re17/Tc11-Tc17**), stabilized by (N<sub>pz</sub>,N,O), (N<sub>py</sub>,N,O) and (S,N,O) donor ligands presenting lower molecular weight and functionalized with N-diethyl and N-pyrrolidine groups, were synthesized. Complex **Tc16**, anchored by a (S,N,O)-donor cysteamine-based chelator and functionalized with a N-diethyl group, showed the highest tumor uptake in a melanoma-bearing mice.

For the targeting of mitochondria, new complexes (**Re18-Re-23/Tc18-Tc23**) containing triphenylphosphonium derivatives and stabilized by bifunctional chelators with (N,N,N), (N<sub>pz</sub>,N,O) and (S,N,O) donor atom sets were synthesized and evaluated. In general, these phosphonium-containing <sup>99m</sup>Tc complexes (**Tc18-Tc23**) showed moderate cellular and mitochondrial uptake values, which are dependent on the mitochondrial and plasma membrane potentials. These features indicate that these complexes are promising to be applied in the design of radioactive probes for the targeting of mitochondria from neoplastic tissues.



## Palavras-Chave

---

Complexos tricarbonilo Re(I)/<sup>99m</sup>Tc(I)

Radiofármacos Específicos

Detecção tumoral

Benzamidas

Melanina

Trifenilfosfónio

Mitocôndrias

## Keywords

---

Re/<sup>99m</sup>Tc tricarbonyl complexes

Specific Radiopharmaceuticals

Tumoral detection

Benzamides

Melanin

Triphenylphosphonium

Mitochondria



# Índice Geral

---

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Palavras-Chave	ix
Keywords	ix
Índice Geral	xi
Índice de figuras	xxi
Índice de tabelas	xxix
Índice de esquemas	xxxii
Lista de símbolos e abreviaturas	xxxiii
Preâmbulo	1
1. Introdução	3
1.1. Medicina Nuclear e radiofármacos: considerações gerais	5
1.2. Tecnécio	12
1.2.1. Aspectos básicos da química e radioquímica do Tecnécio	12
1.2.2. Química do Tecnécio relevante para radiofármacos	14
1.3. Radiofármacos para detecção do melanoma: estado da arte	19
1.3.1. Aspectos gerais	19
1.3.2. Sondas radioactivas para alvejamento da melanina	24
1.3.2.1. Derivados de Benzamidas Radiohalogenados	25
1.3.2.2. Complexos de <sup>99m</sup> Tc funcionalizados com benzamidas e derivados	27
1.4. Catiões deslocalizados para detecção tumoral: estado da arte	30

1.4.1. Mitocôndrias e o seu papel no cancro	30
1.4.2. Catiões deslocalizados com interesse para o desenvolvimento de sondas radioactivas	32
1.5. Objectivo do trabalho	36
2. Complexos de Tc(I)/Re(I) com ligandos derivados do pirazolo e funcionalizados com benzamidas ou seus fragmentos	39
2.1. Introdução	41
2.2. Síntese e caracterização dos complexos de tricarbonilo de Re(I)/ <sup>99m</sup> Tc(I) com boratos de bis(azolilo) assimétricos	43
2.2.1. Síntese e caracterização dos complexos de Re(I)	45
2.2.2. Síntese, caracterização e avaliação biológica do complexo de tecnécio- <sup>99m</sup>	55
2.2.2.1. Síntese e caracterização	55
2.2.2.2. Estabilidade <i>in vitro</i>	58
2.2.2.3. Biodistribuição e estabilidade <i>in vivo</i>	60
2.3. Síntese e caracterização de complexos tricarbonilo de Re(I)/ <sup>99m</sup> Tc(I) com ligandos do tipo pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxílico funcionalizados com derivados de benzamidas	65
2.3.1. Síntese e caracterização dos ligandos funcionalizados	65
2.3.2. Síntese e caracterização dos complexos de rénio <i>fac</i> -[Re( $\kappa^3$ -L)(CO) <sub>3</sub> ](L = L <sup>2</sup> -L <sup>9</sup> )	76
2.3.3. Síntese, caracterização e avaliação biológica dos complexos <i>fac</i> -[ <sup>99m</sup> Tc( $\kappa^3$ -L)(CO) <sub>3</sub> ](L = L <sup>2</sup> -L <sup>9</sup> )	82
2.3.3.1. Síntese e caracterização	82
2.3.3.2. Estabilidade <i>in vitro</i> e ligação à melanina	85
2.3.3.3. Estudos de captação celular	88
2.3.3.4. Biodistribuição e estabilidade <i>in vivo</i>	90
2.4. Conclusões	95
3. Complexos de Tc(I)/Re(I) com ligandos do tipo X-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> N(R)CH <sub>2</sub> COO- (X = 3,5-Me <sub>2</sub> pz, py, EtS-) contendo grupos do tipo N-alquilamina	97

<b>3.1. Introdução</b>	<b>99</b>
<b>3.2. Síntese, caracterização e avaliação biológica dos complexos de Re(I)/<sup>99m</sup>Tc(I) estabilizados pelo ligando [(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> (L<sup>10</sup>)</b>	<b>101</b>
3.2.1. Síntese e caracterização do composto L <sup>10</sup> H e do respectivo complexo de rénio	101
3.2.2. Síntese, caracterização e avaliação biológica do complexo de tecnécio- <sup>99m</sup>	108
<b>3.3. Síntese e caracterização de complexos de tricarbonilo de Re(I)/<sup>99m</sup>Tc com ligandos tridentados (N<sub>2</sub>O) e (S,N,O) funcionalizados com fragmentos do tipo alquilamina</b>	<b>112</b>
3.3.1. Síntese e caracterização dos ligandos funcionalizados com fragmentos do tipo alquilamina (L <sup>11</sup> H-L <sup>17</sup> H)	112
3.3.2. Síntese e caracterização dos complexos de rénio <i>fac</i> -[Re(κ <sup>3</sup> -L)(CO) <sub>3</sub> ] (L=L <sup>11</sup> -L <sup>17</sup> )	116
3.3.3. Síntese, caracterização e avaliação biológica dos complexos <i>fac</i> -[ <sup>99m</sup> Tc(κ <sup>3</sup> -L)(CO) <sub>3</sub> ] (L=L <sup>11</sup> -L <sup>17</sup> )	123
3.3.3.1. Síntese e caracterização	123
3.3.3.2. Efeito do pH nos valores de log D <sub>o/w</sub> e determinação do pK <sub>a</sub> para os complexos Tc16 e Tc17	125
3.3.3.3. Determinação da afinidade para a melanina	130
3.3.3.4. Captação celular em linhas celulares melanóticas e amelanóticas de melanoma	131
3.3.3.5. Avaliação da expressão dos receptores sigma	134
3.3.3.6. Estudos de competição com o haloperidol	135
3.3.3.7. Biodistribuição e estabilidade <i>in vivo</i>	137
<b>3.4. Conclusões</b>	<b>143</b>
<b>4. Complexos de Tc(I)/Re(I) contendo derivados do trifenilfosfónio</b>	<b>147</b>
<b>4.1. Introdução</b>	<b>149</b>
<b>4.2. Síntese e caracterização de complexos de tricarbonilo de Re(I)/<sup>99m</sup>Tc com ligandos tridentados (N,N,N) (N,N,O) e (S,N,O) contendo derivados de trifenilfosfónio</b>	<b>151</b>

4.2.1. Síntese e caracterização dos ligandos funcionalizados e dos respectivos complexos de rênio	151
4.2.2. Síntese, caracterização e avaliação biológica dos complexos $fac-[^{99m}Tc(\kappa^3-L)(CO)_3]$ (L=L <sup>18</sup> -L <sup>23</sup> )	161
4.2.2.1. Síntese e caracterização	161
4.2.2.2. Estudos de captação celular em células tumorais	164
4.2.2.3. Estudos de captação em mitocôndrias isoladas	168
4.2.2.4. Efeito do potencial da membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial na captação celular	170
<b>4.3. Conclusões</b>	<b>174</b>
<b>5. Conclusões e Perspectivas</b>	<b>179</b>
<b>6. Parte Experimental</b>	<b>187</b>
6.1. Solventes e reagentes	189
6.2. Técnicas de purificação e caracterização	189
6.3. Síntese e caracterização dos ligandos	192
6.3.1. Síntese e caracterização dos compostos intermediários	192
6.3.1.1. Na[H <sub>3</sub> B(tim <sup>Me</sup> )], 5	192
6.3.1.2. N-(2-Bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo, 8	192
6.3.1.3. 2-aminoetilcarbamato de terc-butilo, 9	193
6.3.1.4. 2-(2-(3,5-dimetilpirazolil)etilamino)etilcarbamato de terc-butilo, 10	193
6.3.1.5. 3-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)amino) propanoato de etilo, 11	193
6.3.1.6. Ácido 3-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)amino)propanóico, 12	194
6.3.1.7. (2-((4-(N-(2-dietilamino)etilamino)carbamoil)butil)(2-(3,5-dimetilpirazolil ))amino)etilcarbamato de terc-butilo, 13	194
6.3.1.8. 2-((4-(4-(2-dietilamino)etilcarbamoil)fenilcarbamoil)butil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etilo)amino)etilcarbamato de terc-butilo, 14	195
6.3.1.9. 2-(2-(3,5-dimetilpirazolil)etilamino)etanoato de etilo, 15	195
6.3.1.10. 4-Bromobutirato de benzilo, 16	196
6.3.1.11. 4-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)(2-(etoxicarbonil)etil)amino) butanoato de benzilo, 17	196

6.3.1.12. Ácido 4-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)(2-(etoxicarbonil)etil)amino)butanóico, 18	197
6.3.1.13. 2-((4-(N-((2-dietilamino)etilamino)carbamoil)butil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)etanoato de etilo, 19	197
6.3.1.14. 2-((4-(4-(2-(dietilamino)etilcarbamoil)fenilcarbamoil)butil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)acetato de etilo, 20	198
6.3.1.15. 3-acetil-4-oxopentanoato de etilo, 21	199
6.3.1.16. 2-(N-(2-hidroxi)etil)-3,5-dimetilpirazolil)etanoato de etilo, 22	199
6.3.1.17. 2-(N-(2-Bromo)etil)-3,5-dimetilpirazolil)acetato de etilo, 23	199
6.3.1.18. 2-(2-(N-(2-(2-(terc-butoxicarbonil)amino)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)acetato de etilo, 24	200
6.3.1.19. 2-(2-((N-(2-(2-(terc-butoxicarbonil)etil(terc-butoxicarbonil)amino)etil)amino))-3,5-dimetilpirazolil)acetato de etilo, 25	200
6.3.1.20. Ácido 2-(2-(N-(2-(2-(terc-butoxicarbonil)etil(terc-butoxicarbonil)amino)etil)amino))-3,5-dimetilpirazolil)acético, 26	201
6.3.1.21. 2-(1-(2-((terc-butoxicarbonil)(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)acetato de 2,5-dioxopirrolidina, 27	201
6.3.1.22. Ácido 4-(terc-butoxicarbonil)amino)butanóico, 28	202
6.3.1.23. 4-(4-(2-(dietilamino)etilcarbamoil)fenilcarbamoil)butil)carbamato de terc-butilo, 29	202
6.3.1.24. 4-(4-(aminobutanoil)oxiamino)-N-(2-(dietilamino)etil)benzamida, 30	203
6.3.1.25. N-(2-(terc-butoxicarbonil))((2-(4-(((2-(dietilamino)etil)carbamoil)metil)-3,5-dimetilpirazolil)etil))amino)etil)carbamato de terc-butilo, 31	203
6.3.1.26. N-(2-((terc-butoxicarbonil)(2-(4-(((3-(((4-((2-dietilamino)etil)fenil)carbamoil)propil)carbamoil)metil)-3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)etil)carbamato de terc-butilo, 32	204
6.3.1.27. 3-acetil-4-oxopentanoato de benzilo, 33	204
6.3.1.28. 2-(N-(2-hidroxi)etil)-3,5-dimetilpirazolil)etanoato de benzilo, 34	205
6.3.1.29. 2-(N-(2-bromo)etil)-3,5-dimetilpirazolil)etanoato de benzilo, 35	205
6.3.1.30. 2-(N-(2-(2-etoxicarbonil)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)etanoato de benzilo, 36	206
6.3.1.31. Ácido 2-(N-(2-(2-etoxicarbonil)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)acético, 37	206

6.3.1.32. Acetato de 2-(2-(4-(2-(2dietilamino)etilamino)2-oxoetil)-3,5-dimetilpirazol)etilanimino) etilo, 38	207
6.3.1.33. 2-(2-(4-(2-(4-(4-(2-dietilamino)etilcarbamoil)fenil)carbamoil)butil)-3,5-dimetilpirazolil)etilanimino)etanoato de etilo, 39	207
6.3.1.34. Ácido 2-(2-(3,5-dimetilpirazol)etilamino)acético, 40	208
6.3.1.35. Ácido 2-((2-piridina)metilamino)acético, 41	208
6.3.1.36. N,N-dietil-N-3-((2-(etiltio)etil)amino)propilamina, 42	209
6.3.1.37. Brometo de (4-(bromometil)benzil)trifenilfosfónio, 44	209
6.3.1.38. Brometo de (4-((2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)butil)trifenilfosfónio, 45	210
6.3.1.39. Brometo de (4-(((2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)metil)benzil)trifenilfosfónio, 46	211
6.3.1.40. Brometo de (4-((2-(3,5-dimetilpirazol)etil)(2-etoxi-2-oxoetil)amino)butil)trifenilfosfónio, 47	211
6.3.1.41. Brometo de (4-(((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)(2-etoxi-2-oxoetil)amino)metil)benzil)trifenilfosfónio, 48	212
6.3.1.42. (2-(2-(etiltio)etilamino)etanoato de etilo, 49	213
6.3.1.43. Brometo de 4-((2-etoxi-2-oxoetil)(2-etiltio)etilamino)butiltrifenilfosfónio, 50	213
6.3.1.44. Brometo de (4-(((2-etoxi-2-oxoetil)(2-etiltio)etil)amino)metil)benzil)butil)trifenilfosfónio, 51	214
6.3.2. Síntese e Caracterização dos Ligandos Finais	215
6.3.2.1. Na[H <sub>2</sub> B(tim <sup>Me</sup> )(3,5-Me <sub>2</sub> pz)], L <sup>1</sup>	215
6.3.2.2. 4-(2-aminoetil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)-N-(2-dietilamino)etil)butanamida, L <sup>2</sup>	215
6.3.2.3. 4-(4-(2-aminoetil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etilo)amino)butanamida)-N-(2-dietilamino)etil)benzamida, L <sup>3</sup>	216
6.3.2.4. Ácido 2-((4-(N-(2-(dietilamino)etilamino)carbamoil)butil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)acético, L <sup>4</sup> H	217
6.3.2.5. Ácido 2-((4-(4-(2-(dietilamino)etilcarbamoil)fenilcarbamoil)butil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)acético, L <sup>5</sup> H	217
6.3.2.6. 2-(N-(2-((2-aminoetil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)-N-(2-(dietilamino)etil)acetamida, L <sup>6</sup>	218
6.3.2.7. 4-(4-(2-(1-(2-((2-aminoetil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazol)etilcarbamoil)butilcarbamoil)-N-(2-dietilamino)etil)benzamida, L <sup>7</sup>	219

6.3.2.8.	Ácido 2-(2-(4-(2-(2-dietilamino)etilcarbamoil)etil)-3,5-dimetipirazolil)etilanimo)acético, L <sup>8</sup> H	219
6.3.2.9.	Ácido 2-(2-(4-(2-(4-(4-(2-(2-dietilamino)etil)carbamoil)fenil)carbamoil)butilcarbamoil)etil)-3,5-dimetipirazolil)etilanimo)acético, L <sup>9</sup> H	220
6.3.2.10.	Ácido 2-(2-(etiltio)etilamino)acético, L <sup>10</sup> H	221
6.3.2.11.	Ácido 2-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)(2-pirrolidina)etil)aminoacético, L <sup>11</sup> H	221
6.3.2.12.	Ácido 2-((2-(dietilamino)etil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)aminoacético, L <sup>12</sup> H	222
6.3.2.13.	Ácido 2-((piridina-2-metil)((2-pirrolidina)etil)amino)acético, L <sup>13</sup> H	223
6.3.2.14.	Ácido 2-((2-(dietilamino)etil)(piridina-2-metil)amino)acético, L <sup>14</sup> H	223
6.3.2.15.	Ácido 2-((2-(etiltio)etil)(2-(pirrolidina)etil)amino)acético, L <sup>15</sup> H	224
6.3.2.16.	Ácido 2-((2-(dietilamino)etil)(2-(etiltio)etil)amino)acético, L <sup>16</sup> H	224
6.3.2.17.	Ácido 2-((3-(dietilamino)propil)(2-(etiltio)etil)amino)acético, L <sup>17</sup> H	225
6.3.2.18.	4-((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)butil trifenilfosfónio, L <sup>18</sup>	226
6.3.2.19.	4-(((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetilpirazol)etil)amino)metil)benzil trifenilfosfónio, L <sup>19</sup>	227
6.3.2.20.	4-((carboximetil)(2-(3,5-dimetilpirazolilo)etil)amino)butil trifenilfosfónio, L <sup>20</sup> H	227
6.3.2.21.	4-(((carboximetil)(2-(3,5-dimetilpirazol)etil)amino)metil)benzil trifenilfosfónio, L <sup>21</sup> H	228
6.3.2.22.	4-((carboximetil)(2-(etiltio)etil)amino)butil trifenilfosfónio, L <sup>22</sup> H	229
6.3.2.23.	4-(((carboximetil)(2-etiltio)etil)amino)metil)benzil)butil trifenilfosfónio, L <sup>23</sup> H	229
<b>6.4.</b>	<b>Síntese e caracterização dos complexos de Rénio</b>	<b>230</b>
6.4.1.	Síntese dos materiais de partida	230
6.4.2.	Síntese e caracterização dos complexos 2-4 e Re1	230
6.4.2.1.	<i>fac</i> -[Re{κ <sup>3</sup> -H(μ-H)B(tim <sup>Me</sup> )(pz)}(CO) <sub>3</sub> ], 2	230
6.4.2.2.	<i>fac</i> -[Re{κ <sup>3</sup> -HB(tim <sup>Me</sup> )(pz) <sub>2</sub> }(CO) <sub>3</sub> ], 3	231
6.4.2.3.	<i>fac</i> -[Re{κ <sup>3</sup> -H(μ-H)B(tim <sup>Me</sup> )(3,5-Me <sub>2</sub> -4-EtOOCCH <sub>3</sub> pz)}(CO) <sub>3</sub> ], 4	231
6.4.2.4.	<i>fac</i> -[Re{κ <sup>3</sup> -H(μ-H)B(tim <sup>Me</sup> )(3,5-Me <sub>2</sub> -pz)}(CO) <sub>3</sub> ], Re1	232
6.4.3.	Síntese e caracterização dos complexos Re2-Re23	233
6.4.3.1.	<i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (κ <sup>3</sup> -L <sup>2</sup> )](CF <sub>3</sub> COO), Re2	233
6.4.3.2.	<i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (κ <sup>3</sup> -L <sup>3</sup> )](CF <sub>3</sub> COO), Re3	234

6.4.3.3. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>4</sup> )], Re4	234
6.4.3.4. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>5</sup> )], Re5	235
6.4.3.5. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>6</sup> )](CF <sub>3</sub> COO), Re6	235
6.4.3.6. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>7</sup> )](CF <sub>3</sub> COO), Re7	236
6.4.3.7. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>8</sup> )], Re8	237
6.4.3.8. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>9</sup> )], Re9	237
6.4.3.9. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>10</sup> )], Re10	238
6.4.3.10. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>11</sup> )], Re11	239
6.4.3.11. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>12</sup> )], Re12	239
6.4.3.12. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>13</sup> )], Re13	240
6.4.3.13. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>14</sup> )], Re14	241
6.4.3.14. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>15</sup> )], Re15	241
6.4.3.15. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>16</sup> )], Re16	242
6.4.3.16. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>17</sup> )], Re17	242
6.4.3.17. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>18</sup> )]Br <sub>2</sub> , Re18	243
6.4.3.18. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>19</sup> )](CF <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> , Re19	244
6.4.3.19. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>20</sup> )](CF <sub>3</sub> COO), Re20	245
6.4.3.20. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>21</sup> )](CF <sub>3</sub> COO), Re21	246
6.4.3.21. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>22</sup> )](CF <sub>3</sub> COO), Re22	247
6.4.3.22. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>23</sup> )](CF <sub>3</sub> COO), Re23	248
6.4.4. Caracterização estrutural dos complexos de Re por difracção de Raios- X	249
6.4.4.1. <i>fac</i> -[Re{κ <sup>3</sup> -H(μ-H)B(tim <sup>Me</sup> )(pz)}(CO) <sub>3</sub> ], 2	249
6.4.4.2. <i>fac</i> -[Re{κ <sup>3</sup> -HB(tim <sup>Me</sup> )(pz)} <sub>2</sub> (CO) <sub>3</sub> ], 3	250
6.4.4.3. <i>fac</i> -[Re{κ <sup>3</sup> -H(μ-H)B(tim <sup>Me</sup> )(3,5-Me <sub>2</sub> -4-EtOOCCH <sub>3</sub> pz)}(CO) <sub>3</sub> ], 4	251
6.4.4.4. <i>fac</i> -[Re{κ <sup>3</sup> -H(μ-H)B(tim <sup>Me</sup> )(3,5-Me <sub>2</sub> -pz)}(CO) <sub>3</sub> ], Re1	252
6.4.4.5. <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> (k <sup>3</sup> -L <sup>10</sup> )], Re10	253
<b>6.5. Síntese e caracterização dos complexos de <sup>99m</sup>Tc</b>	<b>254</b>
6.5.1. Condições de manipulação de compostos radioactivos	254
6.5.2. Síntese do precursor <i>fac</i> -[ <sup>99m</sup> Tc(H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	254
6.5.3. Síntese e caracterização dos complexos de <sup>99m</sup> Tc, Tc1-Tc23	254
<b>6.6. Determinação da lipofilia dos complexos de <sup>99m</sup>Tc</b>	<b>256</b>
<b>6.7. Determinação dos pK<sub>a</sub></b>	<b>257</b>
<b>6.8. Estudo da carga dos complexos de <sup>99m</sup>Tc</b>	<b>257</b>
<b>6.9. Estabilidade <i>in vitro</i></b>	<b>257</b>

<b>6.10. Ensaio de ligação à melanina</b>	<b>258</b>
<b>6.11. Estudos de captação celular</b>	<b>259</b>
6.11.1. Linhas celulares	259
6.11.2. Cultura e manutenção de linhas celulares	260
6.11.3. Estudos de captação celular	260
6.11.4. Estudos de competição com o haloperidol	262
6.11.5. Estudos de alteração do potencial da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial	262
<b>6.12. Testes de citotoxicidade</b>	<b>263</b>
<b>6.13. Estudos de captação em mitocôndrias isoladas</b>	<b>264</b>
6.13.1. Isolamento de mitocôndrias	264
6.13.2. Estudos de captação mitocondrial	265
<b>6.14. Quantificação proteica</b>	<b>265</b>
<b>6.15. <i>Western blot</i></b>	<b>265</b>
<b>6.16. Biodistribuição e estabilidade <i>in vivo</i></b>	<b>266</b>
6.16.1. Estudos de biodistribuição em animais saudáveis	267
6.16.2. Estudos de biodistribuição em animais com tumores induzidos	267
6.16.2.1. Inoculação de ratinhos com células do melanoma	267
6.16.2.2. Ensaio de biodistribuição	267
6.16.2.3. Obtenção de imagens em câmara gama	268
6.16.3. Estabilidade <i>in vivo</i>	268
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>271</b>



## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.1.</b> Exemplos de imagens de um coração de uma pessoa normal (esquerda) e do coração de uma pessoa com doença coronária (direita), obtidas com o radiofármaco $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmina (adaptado de Dilworh et al)	5
<b>Figura 1.2.</b> Representação esquemática da utilização de uma fonte externa de radiação em Radiologia (esquerda) e de um radiofármaco (direita) em Medicina Nuclear (adaptado de Healthtalk)	6
<b>Figura 1.3.</b> Principais modos de decaimento de um núcleo instável (adaptado de Marsrover)	7
<b>Figura 1.4.</b> Representação esquemática de radiofármacos de perfusão vs radiofármacos específicos	8
<b>Figura 1.5.</b> Estruturas de diferentes biomoléculas contendo $^{11}\text{C}$ e $^{18}\text{F}$ para imagiologia por PET	10
<b>Figura 1.6.</b> Abordagem bifuncional para a concepção de radiofármacos específicos de elementos metálicos	11
<b>Figura 1.7.</b> Esquema de decaimento dos isótopos radioactivos presentes no gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$	13
<b>Figura 1.8.</b> Gerador isotópico de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$	13
<b>Figura 1.9.</b> Estruturas moleculares de radiofármacos de $^{99m}\text{Tc}$ aprovados para uso clínico	15
<b>Figura 1.10.</b> Principais centros metálicos de Tc utilizados no desenvolvimento de radiofármacos específicos (BM = Biomolécula) (adaptado de Liu et al)	16
<b>Figura 1.11.</b> Síntese do precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e composição de um kit Isolink®	18
<b>Figura 1.12.</b> Exemplos de complexos com a unidade $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$	19
<b>Figura 1.13.</b> Estrutura proposta da eumelanina e da feomelanina. Estas estruturas são apenas representações formuladas a partir de estudos de metabolismo. Os grupos (COOH) podem ser COOH ou H, ou mais raramente outros substituintes. Estas posições podem ainda estar disponíveis para ligação a outras unidades. As setas indicam os locais por onde o polímero continua	20
<b>Figura 1.14.</b> Etapas principais da metastização do melanoma (adaptado da referência 75)	21

<b>Figura 1.15.</b> Marcadores moleculares e respectivos radiofármacos utilizados para imagiologia por SPECT e PET do melanoma maligno. (MC1R - receptor das melanocortinas; HMW-MAA - antigénios de elevado peso molecular associados ao melanoma maligno; RGD - arginina-glicina-ácido aspártico; [ <sup>18</sup> F]FDG - [ <sup>18</sup> F]-2-fluor-2-desoxiglucose; GLUT - transportador da glucose; AA - aminoácido; AAT - transportador de aminoácidos; [ <sup>18</sup> F]FLT - 3- <sup>18</sup> F-fluoro-3'-deoxi-L-timidina) (adaptado de Ren et al)	22
<b>Figura 1.16.</b> Estrutura molecular da [ <sup>18</sup> F]FDG	23
<b>Figura 1.17.</b> Exemplos de benzamidas radioiodadas para detecção ou terapia do melanoma maligno e suas metástases	26
<b>Figura 1.18.</b> Exemplos de benzamidas radiofluoradas para detecção do melanoma maligno e metástases	27
<b>Figura 1.19.</b> Exemplos de complexos de <sup>99m</sup> Tc derivados de benzamidas para detecção do melanoma maligno e suas metástases	29
<b>Figura 1.20.</b> Estrutura da mitocôndria (adaptado de Cesar et al)	31
<b>Figura 1.21.</b> Estrutura dos complexos <sup>99m</sup> Tc-Tetrofosmina e <sup>99m</sup> Tc-Sestamibi	33
<b>Figura 1.22.</b> Representação esquemática da captação dos catiões derivados do trifenilfosfónio pela mitocôndria (adaptado de Zhou et al)	33
<b>Figura 1.23.</b> Exemplos de sondas radioactivas derivadas dos catiões fosfónio, para detecção tumoral	34
<b>Figura 1.24.</b> Exemplos de complexos utilizados como sondas radioactivas derivadas dos catiões fosfónio, para detecção tumoral	35
<b>Figura 2.1.</b> Estrutura dos complexos de Re/ <sup>99m</sup> Tc com ligandos do tipo boratos de bis(azolilo) (A), pirazolo-diamina (B) ou do tipo pirazolo-aminocarboxílico (C) que se pretendiam funcionalizar com pequenas moléculas com afinidade para a melanina	41
<b>Figura 2.2.</b> Exemplos de boratos de bis(mercaptoimidazolilo) funcionalizados com farmacofóros derivados da piperazina para visualização dos receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>1A</sub>	44
<b>Figura 2.3.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (com inserção do espectro de <sup>11</sup> B) do composto L <sup>1</sup> em CD <sub>3</sub> CN (S - solvente)	47
<b>Figura 2.4.</b> Estrutura do complexo 2	49
<b>Figura 2.5.</b> Estrutura do complexo 3	50
<b>Figura 2.6.</b> Estrutura do complexo Re1	51
<b>Figura 2.7.</b> Estrutura do complexo 4	52

<b>Figura 2.8.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (com inserção do espectro de $^{11}\text{B}$ ) para o complexo fac-[Re{ $\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}$ }(CO) $_3$ ] (Re1) em CDCl $_3$ (S - solvente)	54
<b>Figura 2.9.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do complexo fac-[Re{ $\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}$ }(CO) $_3$ ] (Re1) em CDCl $_3$ (S - solvente)	54
<b>Figura 2.10.</b> Cromatogramas de HPLC: A - Precursor fac-[ $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$ ] $^+$ ; B - Síntese do complexo Tc1, 75 °C, 30 min; C- Síntese do complexo Tc1, T $_{\text{amb}}$ , 30 min; D - Tc1 após purificação por HPLC; E - Co-injecção dos compostos Re1 e Tc1	57
<b>Figura 2.11.</b> Estrutura dos aminoácidos histidina e cisteína	59
<b>Figura 2.12.</b> Estabilidade do complexo Tc1 na presença de cisteína e histidina em PBS (pH = 7,4) a 37 °C	60
<b>Figura 2.13.</b> Fixação (% DI/g órgão) nos órgãos/tecidos mais relevantes para o complexo Tc1	62
<b>Figura 2.14.</b> Cromatogramas de HPLC do a) sangue e b)urina de ratinhos injectados (1 h p.i.) com o complexo Tc1	63
<b>Figura 2.15.</b> Comparação dos resultados de biodistribuição mais relevantes (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) dos complexos modelo Tc1, fac-[ $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\{3,5\text{-Mepz}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2\}\}^+$ (6) $^{51}$ e fac-[ $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\{3,5\text{-Mepz}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COO}\}\}^+$ (7) $^{54}$ em ratinhos fêmea CD1	64
<b>Figura 2.16.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de L $^5\text{H}$ em CD $_3\text{OD}$ (*- H $_2\text{O}$ residual; S - solvente)	75
<b>Figura 2.17.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de L $^5\text{H}$ em CD $_3\text{OD}$ (S - solvente)	75
<b>Figura 2.18.</b> Espectro de [ $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ] g-HSQC de L $^5\text{H}$ em CD $_3\text{OD}$ , na zona dos carbonos e protões alifáticos	76
<b>Figura 2.19.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do complexo de rénio Re6 em CD $_3\text{OD}$ (*- H $_2\text{O}$ residual; S -solvente)	78
<b>Figura 2.20.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do complexo de rénio Re6 em CD $_3\text{OD}$	79
<b>Figura 2.21.</b> Espectro de RMN [ $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ] g-HSQC do complexo Re6 em CD $_3\text{OD}$ , na zona dos grupos CH $_2$	79
<b>Figura 2.22.</b> Espectro de IV do complexo Re6, em pastilhas de KBr	81
<b>Figura 2.23.</b> Espectro de massa do complexo Re4 (HR ESI-MS; modo positivo)	81
<b>Figura 2.24.</b> Cromatogramas de HPLC: A - Síntese do complexo Tc5 a pH 7,4 ; B - Síntese do complexo Tc5 a pH 5,5	84
<b>Figura 2.25.</b> Cromatogramas de HPLC obtidos por co-injecção dos complexos Re7 (detecção UV) e Tc7 (detecção $\gamma$ )	84

<b>Figura 2.26.</b> Captação celular* dos complexos Tc2-Tc9 em células B16-F1 em função do tempo de incubação a 37 °C (*expressa em percentagem da actividade total adicionada por milhão de células)	89
<b>Figura 2.27.</b> Fixação (% DI/g órgão) nos principais órgãos/tecidos e excreção total (% DI) dos complexos Tc2-Tc9	93
<b>Figura 2.28.</b> Cromatogramas de HPLC dos complexos Tc7 e Tc9 do sangue (A) e da urina (B), após 1 h de administração	94
<b>Figura 3.1.</b> Estrutura das três classes de complexos descritos no capítulo 3	100
<b>Figura 3.2.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do ligando L <sup>10</sup> H em CD <sub>3</sub> OD (S - solvente)	102
<b>Figura 3.3.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do ligando L <sup>10</sup> H em CD <sub>3</sub> OD (S - solvente)	102
<b>Figura 3.4.</b> Cromatograma de HPLC da mistura reaccional obtida por reacção de L <sup>10</sup> H com o precursor fac-[Re(H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CO) <sub>3</sub> ]Br	103
<b>Figura 3.5.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do complexo Re10 para T = 20 °C em CD <sub>3</sub> OD (* H <sub>2</sub> O residual; S - solvente)	104
<b>Figura 3.6.</b> Espectro de <sup>13</sup> C do complexo Re10 para T = 20 °C em CD <sub>3</sub> OD (S - solvente)	104
<b>Figura 3.7.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H do complexo Re10 a diferentes temperaturas em CD <sub>3</sub> OD (S -solvente)	105
<b>Figura 3.8.</b> Espectros de RMN de <sup>13</sup> C do complexo Re10 a diferentes temperaturas em CD <sub>3</sub> OD na zona dos grupos CH <sub>2</sub> (S - solvente)	105
<b>Figura 3.9.</b> Processo de inversão piramidal do átomo de enxofre (adaptado de $\bar{O}ae$ )	106
<b>Figura 3.10.</b> Estruturas de raios-X das moléculas A e B do complexo Re10	108
<b>Figura 3.11.</b> Cromatogramas de HPLC dos compostos Re10 (detecção UV) e Tc10 (detecção $\gamma$ )	109
<b>Figura 3.12.</b> Fixação (% DI/g órgão) nos órgãos/tecidos mais relevantes e excreção total (% DI) para o complexo Tc10	111
<b>Figura 3.13.</b> Cromatogramas de HPLC da urina e sangue de ratinhos injectados (1 h p.i.) com o complexo Tc10	112
<b>Figura 3.14.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de L <sup>13</sup> H em CD <sub>3</sub> OD (* H <sub>2</sub> O residual, S - solvente)	115
<b>Figura 3.15.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de L <sup>13</sup> H em CD <sub>3</sub> OD (S - solvente)	115
<b>Figura 3.16.</b> Espectro de [ <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C] g-HSQC de L <sup>13</sup> H em CD <sub>3</sub> OD, na zona dos grupos CH <sub>2</sub>	116
<b>Figura 3.17.</b> Espectro de IV do complex Re16, em pastilhas de KBr	118

<b>Figura 3.18.</b> Espectro de ESI-MS do complexo Re16 (modo positivo)	119
<b>Figura 3.19.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do complexo Re13 em $\text{CD}_3\text{OD}$ ( $^*\text{H}_2\text{O}$ residual, S - solvente)	120
<b>Figura 3.20.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do complexo Re13 em $\text{CD}_3\text{OD}$ (S - solvente)	120
<b>Figura 3.21.</b> Espectro de RMN [ $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ] g-HSQC do complexo Re13 em $\text{CD}_3\text{OD}$ , na zona dos grupos $\text{CH}_2$	121
<b>Figura 3.22.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do complexo Re16 à temperatura de 20 e 60 °C, em $\text{CD}_3\text{OD}$ (S - solvente)	122
<b>Figura 3.23.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do complexo Re16 à temperatura de 20 e 60 °C, em $\text{CD}_3\text{OD}$ (S - solvente)	122
<b>Figura 3.24.</b> Cromatogramas de HPLC dos compostos Re14 (detecção UV) e Tc14 (detecção $\gamma$ )	124
<b>Figura 3.25.</b> Electroforetogramas dos complexos Tc16 e Tc17 obtidos por electroforese a potencial constante ( $V = 300\text{V}/1 \text{ h}$ ), utilizando tiras de papel Whatman 3MM como suporte e tampão tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) como electrólito	126
<b>Figura 3.26.</b> Gráfico do factor de capacidade ( $k'$ ) em função do pH da fase móvel para os complexos Re16/Tc16 e Re17/Tc17.	128
<b>Figura 3.27.</b> Gráfico do factor de capacidade ( $k'$ ) em função do pH da fase móvel para a 2,4,6-colidina	129
<b>Figura 3.28.</b> Captação celular* dos complexos Tc11-Tc17 em células B16-F1 em função do tempo de incubação a 37 °C (*expressa em percentagem da actividade total adicionada por milhão de células)	132
<b>Figura 3.29.</b> Captação celular* dos complexos Tc11-Tc17 em células A375 em função do tempo de incubação a 37 °C (*expressa em percentagem da actividade total adicionada por milhão de células)	132
<b>Figura 3.30.</b> Esquema geral da técnica Western Blot	134
<b>Figura 3.31.</b> Western blot obtido após incubação de várias linhas celulares com um anticorpo específico para os receptores $\sigma_1$	135
<b>Figura 3.32.</b> Captação celular por milhão de células dos complexos Tc11, Tc12 e Tc16 na presença de haloperidol em concentrações crescentes, após 4 h de incubação em células B16-F1	136
<b>Figura 3.33.</b> Captação celular por milhão de células dos complexos Tc11 na presença de haloperidol em concentrações crescentes, após 4 h de incubação em células A375	136

<b>Figura 3.34.</b> Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) para os principais órgãos/tecidos dos complexos Tc11-Tc17	140
<b>Figura 3.35.</b> Razões tumor/sangue e tumor/músculo para os complexos Tc15-Tc17	141
<b>Figura 3.36.</b> Imagem de um ratinho C57BL/6 inoculado com células B16-F1 e com o complexo Tc16, 1 h p.i., em câmara gama (a seta indica o local do tumor)	142
<b>Figura 4.1.</b> Estrutura geral dos complexos descritos no capítulo 4	150
<b>Figura 4.2.</b> Espectro de IV do complexo Re19 em pastilhas de KBr	156
<b>Figura 4.3.</b> Espectro de ESI-MS do complexo Re20 (modo positivo)	157
<b>Figura 4.4.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do complexo Re19 em $\text{CD}_3\text{OD}$ (S - solvente; $^*\text{H}_2\text{O}$ - água residual)	158
<b>Figura 4.5.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do complexo Re19 em $\text{CD}_3\text{OD}$ (S - solvente)	158
<b>Figura 4.6.</b> Espectro de RMN [ $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ ] g-COSY do complexo Re19 em $\text{CD}_3\text{OD}$ (S - solvente, $^*\text{H}_2\text{O}$ - água residual)	159
<b>Figura 4.7.</b> Espectro de RMN [ $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ] g-HSQC do complexo Re19 em $\text{CD}_3\text{OD}$ , na zona dos grupos $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$	159
<b>Figura 4.8.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ do complexo Re23 a 20 e a 60 °C em $\text{CD}_3\text{OD}$ (S - solvente; $^*\text{H}_2\text{O}$ - água residual)	161
<b>Figura 4.9.</b> Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ do complexo Re23 a 20 e a 60 °C em $\text{CD}_3\text{OD}$ (S - solvente)	161
<b>Figura 4.10.</b> Cromatogramas de HPLC do complex Re21 (detecção UV) e Tc21 (detecção $\gamma$ )	163
<b>Figura 4.11.</b> Captação celular por milhão de células dos complexos Tc18-Tc23 pelas células B16-F1, PC-3 e MCF-7 ao fim de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h	164
<b>Figura 4.12.</b> Western blot de extractos proteicos de várias linhas celulares com um anticorpo para a Pgp. A actina foi utilizada como controlo interno	166
<b>Figura 4.13.</b> Captação celular por mg de proteína dos complexos Tc18-Tc23: a) nas células MCF-7 e b) nas células MCF-7/MDR1, em função do tempo de incubação; c) nas células MCF-7 e MCF-7/MDR1, após 4 h de incubação	167
<b>Figura 4.14.</b> Captação celular por milhão de células dos complexos Tc18, Tc20 e Tc21 pelas células H69 e H69/Lx4 ao fim de 15 min, 30 min e 1 h a 37 °C	168

<b>Figura 4.15.</b> Captação mitocondrial por milhão de células dos complexos Tc18-Tc23 em mitocôndrias isoladas ao fim de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h e 3 h a 37 °C	169
<b>Figura 4.16.</b> Comparação da captação celular e da captação mitocondrial dos complexos Tc18-Tc23 em células PC-3, após 3 h de incubação (* expressa em percentagem da actividade total adicionada por milhão de células) ( <sup>a</sup> para Tc18 o tempo de incubação foi de 2 h)	170
<b>Figura 4.17.</b> Captação celular por milhão de células dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23 em células PC-3, na presença de soluções tampão com diferentes concentrações de K <sup>+</sup> e ainda na presença da valinomicina (Val), ao fim de 4 h	171
<b>Figura 4.18.</b> Captação celular por milhão de células dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23 pelas células PC-3 ao fim de 4 h, após incubação adicional (15 min) com nigericina ou com nigericina e ubaína	172
<b>Figura 4.19.</b> Captação celular por milhão de células dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23 pelas células PC-3 ao fim de 4 h, após incubação adicional (15 min) com diferentes concentrações de CCCP	173
<b>Figura 6.1.</b> Diagrama ORTEP de 2; os elipsóides vibracionais foram desenhados com uma probabilidade de 40%	249
<b>Figura 6.2.</b> Diagrama ORTEP de 3. Os elipsóides vibracionais foram desenhados com uma probabilidade de 40%	250
<b>Figura 6.3.</b> Diagrama ORTEP de 4. Os elipsóides vibracionais foram desenhados com uma probabilidade de 40%	251
<b>Figura 6.4.</b> Diagrama ORTEP de Re1. Os elipsóides vibracionais foram desenhados com uma probabilidade de 40%	252
<b>Figura 6.5.</b> Diagrama ORTEP de Re10. Os elipsóides vibracionais foram desenhados com uma probabilidade de 40%	253
<b>Figura 6.6.</b> Esquema das condições experimentais utilizadas nos estudos de alteração dos potenciais de membrana plasmático e mitocondrial. Na 1 <sup>a</sup> placa adicionaram-se os complexos de <sup>99m</sup> Tc nas respectivas soluções durante 4 h: 1 - Solução tampão K <sup>+</sup> 5 mM; 2 - Solução tampão K <sup>+</sup> 60 mM; 3 - Solução tampão K <sup>+</sup> 120 mM; 4 - Solução tampão K <sup>+</sup> 120 mM + valinomicina (1 µg/mL)	263



## Índice de tabelas

---

Tabela 1.1. Emissores $\beta^+$ com interesse em PET e suas propriedades físicas	9
Tabela 1.2. Emissores $\gamma$ com interesse em SPECT e suas propriedades físicas	10
Tabela 2.1. Comprimentos (Å) e ângulos ( $^\circ$ ) de ligação mais significativos para o complexo 2	49
Tabela 2.2. Comprimentos (Å) e ângulos ( $^\circ$ ) de ligação mais significativos para o complexo 3	50
Tabela 2.3. Comprimentos (Å) e ângulos ( $^\circ$ ) de ligação mais significativos para o complexo Re1	51
Tabela 2.4. Comprimentos (Å) e ângulos ( $^\circ$ ) de ligação mais significativos para o complexo 4	52
Tabela 2.5. Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) do complexo fac- $[\text{}^{99m}\text{Tc}\{\text{K}^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}\text{(CO)}_3]$ (Tc1)	61
Tabela 2.6. Tempos de retenção ( $t_R$ ) e valores de $\log D_{o/w}$ para os complexos Tc2-Tc9	85
Tabela 2.7. Percentagem de ligação à melanina dos complexos Tc2-Tc9 e dos complexos-modelo 6 e 7, após 1 h de incubação a 37 $^\circ\text{C}$ ([melanina] = 0,5 mg/10 mL)	86
Tabela 2.8. Percentagem de ligação à melanina na presença de n-propanol e após lavagem com soluções com diferentes forças iônicas, durante 1 h a 37 $^\circ\text{C}$ ([melanina] = 0,5 mg/10 mL)	88
Tabela 2.9. Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) dos complexos Tc2-Tc5	91
Tabela 2.10. Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) dos complexos Tc6-Tc9	92
Tabela 3.1. Comprimentos (Å) e ângulos ( $^\circ$ ) de ligação mais significativos para o complexo Re10	107
Tabela 3.2. Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) para o complexo Tc10	110
Tabela 3.3. Tempos de retenção ( $t_R$ ) e valores de $\log D_{o/w}$ (pH 7,4) para os complexos Tc11-Tc17	125

<b>Tabela 3.4.</b> Valores de $\log D_{o/w}$ para os complexos Tc16 e Tc17 a pH 2,7; 7,4 e 10,6	126
<b>Tabela 3.5.</b> Valores de $pK_{HPLC}$ e $pK_a$ para os complexos Re16-Re17, Tc16-Tc17 e 2,4,6-colidina	129
<b>Tabela 3.6.</b> Percentagem de ligação à melanina para os complexos Tc11-Tc17, após 1 h a 37 °C ([melanina] = 0,5 mg/10 mL)	130
<b>Tabela 3.7.</b> Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) dos complexos Tc11-Tc14	138
<b>Tabela 3.8.</b> Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) dos complexos Tc15-Tc17	139
<b>Tabela 4.1.</b> Tempos de retenção ( $t_R$ ) e valores de $\log D_{o/w}$ (pH 7,4) para os complexos Tc18-Tc23	163
<b>Tabela 6.1.</b> Dados Cristalográficos para o complexo 2	249
<b>Tabela 6.2.</b> Dados Cristalográficos para o complexo 3	250
<b>Tabela 6.3.</b> Dados Cristalográficos para o complexo 4	251
<b>Tabela 6.4.</b> Dados Cristalográficos para o complexo Re1	252
<b>Tabela 6.5.</b> Dados Cristalográficos para o complexo Re10	253
<b>Tabela 6.6.</b> Condições Experimentais usadas na preparação dos complexos de $^{99m}Tc$ ; tempos de retenção ( $t_R$ ) e valores de $\log D_{o/w}$ para os complexos de $^{99m}Tc$	255

## Índice de esquemas

---

Esquema 2.1. Síntese dos complexos de rénio do tipo fac-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim <sup>Me</sup> )(pz)}(CO) <sub>3</sub> ]	45
Esquema 2.2. Compostos resultantes da reacção entre o NaBH <sub>4</sub> e quantidades equimolares de 3,5-dimetilpirazolo e 2-mercaptometilimidazolo	46
Esquema 2.3. Síntese do ligando Na[H <sub>2</sub> B(tim <sup>Me</sup> )(3,5-Me <sub>2</sub> pz)] (L <sup>1</sup> )	47
Esquema 2.4. Síntese do complexo fac-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim <sup>Me</sup> )(3,5-Me <sub>2</sub> pz)}(CO) <sub>3</sub> ] (Re1)	48
Esquema 2.5. Síntese do complexo fac-[ <sup>99m</sup> Tc{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim <sup>Me</sup> )(3,5-Me <sub>2</sub> pz)}(CO) <sub>3</sub> ] (Tc1)	57
Esquema 2.6. Síntese dos ligandos finais L <sup>2</sup> e L <sup>3</sup>	66
Esquema 2.7. Síntese dos ligandos finais L <sup>4</sup> H e L <sup>5</sup> H	68
Esquema 2.8. Síntese do composto intermediário 2-(1-(2-((terc-butoxicarbonil)(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)acetato de 2,5-dioxopirrolidina (27)	70
Esquema 2.9. Síntese do composto 4-(4-(aminobutanoiloxiamino)-N-(2-dietilamino)etil)benzamida (30)	71
Esquema 2.10. Síntese dos compostos L <sup>6</sup> e L <sup>7</sup>	72
Esquema 2.11. Síntese dos ligandos finais L <sup>8</sup> H e L <sup>9</sup> H	73
Esquema 2.12. Síntese dos complexos fac-[Re( $\kappa^3$ -L)(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> (L = L <sup>2</sup> -L <sup>5</sup> ) (Re2-Re5), funcionalizados através da amina central	77
Esquema 2.13. Síntese dos complexos fac-[Re( $\kappa^3$ -L)(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> (L = L <sup>6</sup> -L <sup>9</sup> ) (Re6-Re9), funcionalizados através do anel de pirazolo	77
Esquema 2.14. Síntese dos complexos fac-[ <sup>99m</sup> Tc( $\kappa^3$ -L)(CO) <sub>3</sub> ] (L = L <sup>2</sup> -L <sup>5</sup> ) (Tc2-Tc5), funcionalizados através da amina central	82
Esquema 2.15. Síntese dos complexos fac-[ <sup>99m</sup> Tc( $\kappa^3$ -L)(CO) <sub>3</sub> ] (L = L <sup>6</sup> -L <sup>9</sup> ) (Tc6-Tc9), funcionalizados através do anel de pirazolo	83
Esquema 3.1. Síntese do ligando L <sup>10</sup> H	101
Esquema 3.2. Síntese do complexo Re10	103
Esquema 3.3. Síntese do complexo Tc10	109
Esquema 3.4. Síntese dos ligandos L <sup>11</sup> H e L <sup>12</sup> H	113
Esquema 3.5. Síntese dos ligandos L <sup>13</sup> H e L <sup>14</sup> H	113
Esquema 3.6. Síntese dos ligandos L <sup>15</sup> H e L <sup>16</sup> H	114

<b>Esquema 3.7.</b> Síntese do ligando L <sup>17</sup> H	114
<b>Esquema 3.8.</b> Síntese dos complexos de Re(I) funcionalizados com o grupo N-pirrolidina (Re11, Re13, Re15)	117
<b>Esquema 3.9.</b> Síntese dos complexos de Re(I) funcionalizados com o grupo N-dietilo (Re12, Re14, Re16, Re17)	117
<b>Esquema 3.10.</b> Síntese dos complexos de <sup>99m</sup> Tc(I) funcionalizados com o grupo N-pirrolidina (Tc11, Tc13 e Tc15)	123
<b>Esquema 3.11.</b> Síntese dos complexos de <sup>99m</sup> Tc(I) funcionalizados com o grupo N-dietilo (Tc12, Tc14, Tc16 e Tc17)	124
<b>Esquema 4.1.</b> Síntese dos ligandos derivados do pirazolo-diamina (N,N,N) L <sup>18</sup> e L <sup>19</sup>	152
<b>Esquema 4.2.</b> Síntese dos ligandos derivados do pirazolo-aminocarboxílico (N,N,O) L <sup>20</sup> H e L <sup>21</sup> H	153
<b>Esquema 4.3.</b> Síntese dos ligandos derivados da cisteamina (S,N,O) L <sup>22</sup> H e L <sup>23</sup> H	154
<b>Esquema 4.4.</b> Síntese dos complexos de Re(I) (Re18-Re23)	155
<b>Esquema 4.5.</b> Síntese dos complexos de <sup>99m</sup> Tc funcionalizados com o catião trifenilfosfônio (Tc18-Tc23)	162

## Lista de símbolos e abreviaturas

---

**5-HT<sub>1A</sub>** - receptores 5-hidroxitriptamina subtipo 1<sup>A</sup>

**aa** - aminoácido

**AAT** - transportador de aminoácidos

**Ac** - anticorpo

**acaH** - 2,4-pentadiona

**aq** - aquoso

**ATP** - adenosina trifosfato

**BM** - molécula biologicamente activa ou biomolécula

**BOC** - tert-butoxicarbonilo

**BOC<sub>2</sub>O** - dicarbonato de di-terc-butilo

**br** - *broad*, sinal largo

**bz** - benzilo

**BZA** - benzamida

**cpm** - contagens por minuto

**CPPP** - Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

**CT** - tomografia computadorizada

**Cys** - cisteína

**d** - duplete

**D<sub>o/w</sub>** - coeficiente de distribuição octanol-água

**DI** - dose injectada

**DIPEA** - diisopropiletilamina

**DMBA** - 7,12-dimetilbenzil- $\alpha$ -antraceno

**DMEM** - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**DMF** - dimetilformamida

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**DNA** - ácido desoxirribonucleico

**DTPA** - ácido dietilenotriaminapentacético

**e<sup>-</sup>** - electrão

**e.g.** - por exemplo

**EDC** - N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

**EDDA** - ácido etilenodiamino diacético

**EGFR-TK** - factor epidérmico do receptor da tirosina cinase

**ESI/QITMS** - espectrometria de massa - ressonância electrónica de iões com transformada de Fourier

**Et** - etilo

**EtOH** - etanol

**fac** - facial

**FBS** - soro fetal bovino

**[<sup>18</sup>F]-FDG** - [<sup>18</sup>F]-2-fluoro-2-deoxi-D-glicose

**[<sup>18</sup>F]FLT** - 3-<sup>18</sup>F-fluoro-3'-deoxi-L-timidina

**GCR** - Grupo de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas

**GLUT** - transportador da glucose

**HBTU** - hexafluorofosfato de O-(benzotriazolo-1-ilo)-N,N,Nh,Nh-tetrametilurónio

**His** - histidina

**HMDP** - hidroximetilenodifosfonato

**HMPAO** - hexametilpropileno amino oxima

**HMW-MAA** - antigénios de elevado peso molecular associados ao melanoma maligno

**HPLC** - cromatografia líquida de alta pressão

**HR-ESI/MS** - espectrometria de massa de alta resolução com ionização por electrospray

**HYNIC** - ácido hidrazino nicotínico

**IBILI** - Instituto Biomédico de Investigação de Luz e Imagem

**ITLC** - cromatografia em camada fina instantânea

**ITN** - Instituto Tecnológico e Nuclear

**IV** - infravermelho

**[<sup>123</sup>I]-BZA** - <sup>123</sup>I-N-(2-dietilaminoetil)-4-iodobenzamida

**[<sup>123</sup>I]-BZA<sub>2</sub>** - <sup>123</sup>I-N-(2-dietilaminoetil)-2-iodobenzamida

**[<sup>123</sup>I]-BZM** - <sup>123</sup>I-iodobenzamida

**[<sup>123</sup>I]-IMBA** - N-(2-dietilaminoetil)-3-[<sup>123</sup>I]iodo-4-metoxibenzamida

**[<sup>123</sup>I]-PIMBA** - 4-[<sup>123</sup>I]iodo-N-[2-(1-piperidinil)etil]benzamida

**J** - constante de acoplamento (Hz) entre dois núcleos

**L** - ligando

**LBF** - ligando bifuncional

**LET** -transferência linear de energia

**m** - multiplete

**mRNA** - ácido ribonucleico mensageiro

**MAG<sub>3</sub>** - mercaptoacetiltriglicina

**MC1R** - receptor das melanocortinas

**MDP** - metilenodifosfonato

**MDR** - resistência a múltiplos fármacos  
**Me** - metilo  
**MeOH** - metanol  
**MIBI** - metoxisobutilisonitrilo  
**MRI** - ressonância magnética  
**MTT** - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
**N** - número de neutrões  
**NADPH** - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina  
**NEt<sub>3</sub>** - trietilamina  
**NHS** - N-hidroxisuccinimida  
**PBS** - tampão fosfato salino  
**PET** - Tomografia por Emissão de Positrão  
**Pgp** - glicoproteína-P  
**p.i.** - após injeção/após incubação  
**PPh<sub>3</sub>** - trifenilfosfina  
**P** - coeficiente de partição  
**Pd/C** - paládio em carvão activado  
**py** - piridina  
**pz** - pirazolo  
**\*pz** - pirazolo substituído  
**q** - quarteto  
**R<sub>f</sub>** - factor de retenção  
**RGD** - sequência de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido Aspártico  
**RMN** - ressonância magnética nuclear  
**ROS** - espécies reactivas de oxigénio  
**RPMI** - *Roswell Park Memorial Institute medium*  
**rpm** - rotações por minuto  
**s** - singleto  
**S** - solvente  
**SIMS** - espectrometria de massa por ionização secundária  
**SLCL** - tumores pulmonares de pequenas células  
**SNC** - Sistema Nervoso Central  
**sol** - solução  
**SPECT** - tomografia por emissão de fóton único  
**t** - tripleto  
**<sup>t</sup>Bu** - terc-butilo

$T_{amb}$  - temperatura ambiente  
**TBAB** - brometo de tetrabutilamónio  
**TFA** - ácido trifluoroacético  
**THF** - tetrahidrofurano  
 $tim^{Me}$  - 2-mercapto-1-metilimidazolilo  
**TMS** - tetrametilsilano  
**TPMP** - metiltrifenilfosfónio  
**TPP** - tetrafenilfosfónio  
**TRIS** - tris(hidroximetilo)aminometano  
 $t_R$  - tempo de retenção  
 $t_0$  - tempo morto da coluna  
 $t_{1/2}$  - tempo de semi-vida  
**US** - Ultra-sonografia  
**UV** - Ultravioleta  
**UV-vis** - Ultravioleta-Vísivel  
**Val** - valinomicina  
*vs* - *versus*  
**Z** - nº atómico  
 **$\alpha$ -MSH** - hormona estimuladora do melanócito  
 $\Delta\psi_m$  - potencial de membrana mitocondrial  
 $\Delta\psi_p$  - potencial da membrana plasmática

$\alpha$  - alfa

$\beta$  - beta

$\gamma$  - gama

$\kappa$  - hapticidade

$\delta$  - desvio químico

$\nu$  - frequência

$\mu$  - ligação em ponte

## Preâmbulo

---

A imagiologia molecular é geralmente definida como a visualização, caracterização e medição *in vivo* dos processos biológicos ao nível celular ou molecular, de forma não invasiva. Pressupõe a utilização de sondas, biomarcadores, que interagem com um determinado alvo, originando diferentes imagens de acordo com as alterações moleculares que ocorrem na zona de interesse. A possibilidade de visualizar estas alterações moleculares *in vivo* tem um enorme interesse no diagnóstico clínico, permitindo a detecção precoce e a caracterização em tempo real das patologias, a monitorização das terapias e o apoio ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Actualmente, as técnicas de imagem médica que se consideram com interesse no âmbito da imagiologia molecular são as técnicas nucleares de imagem, a ressonância magnética (MRI), a ultra-sonografia (US) e a imagiologia óptica.

O MRI, a tomografia computadorizada (CT) e a ultra-sonografia (US) são as técnicas de imagiologia médica mais difundidas e mais utilizadas do ponto de vista clínico. Possibilitam a obtenção de imagens com elevada resolução espacial das lesões morfológicas, mas fornecem essencialmente informação de natureza estrutural. Por sua vez, as técnicas nucleares de imagiologia disponíveis para utilização clínica, nomeadamente a tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) e a tomografia de emissão de positrão (PET), são mais sensíveis e por isso mesmo mais promissoras como técnicas de imagiologia molecular. No entanto, a resolução espacial obtida com as técnicas de imagiologia nuclear é relativamente baixa no que se refere a detalhes anatómicos. De forma a ultrapassar esta limitação, nos últimos anos tem-se assistido ao desenvolvimento de sistemas híbridos, tais como SPECT-CT, PET-CT ou PET/MRI. Nestes sistemas as técnicas MRI e CT fornecem informação anatómica de alta resolução enquanto as técnicas nucleares, SPECT ou PET, fornecem informação molecular ou funcional. Desta forma, é possível obter informação anatómica e molecular ou funcional numa única sessão de um exame de diagnóstico.

As técnicas nucleares SPECT e PET envolvem a utilização de radiofármacos, fármacos que contêm na sua composição um isótopo radioactivo, que são administrados em concentrações muito baixas. Esta característica possibilita estudar um dado processo bioquímico sem o perturbar, conferindo um carácter não-invasivo às técnicas nucleares. Pelo contrário, outras técnicas de imagiologia médica, como o MRI, requerem a utilização de concentrações mais elevadas de agentes de contraste, o que pode levar a uma interferência indesejável com o processo em estudo e/ou saturação dos alvos moleculares

que se pretendem visualizar. Por isso mesmo, o SPECT e o PET têm tido um grande impacto em áreas como a oncologia, neurologia ou ainda cardiologia.

O cancro é uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos, a par das doenças cardiovasculares. Uma em cada três ou quatro pessoas desenvolverão um cancro nalguma fase da sua vida. No entanto, a possibilidade de cura está continuamente a crescer com o aumento do diagnóstico precoce da doença oncológica. As técnicas nucleares de imagem, PET e SPECT, surgem como alternativas únicas para o diagnóstico precoce e estadiamento do cancro. Actualmente encontram-se aprovados para uso clínico um número relativamente elevado de radiofármacos que permitem avaliar o estado funcional de diferentes órgãos ou tecidos e diagnosticar diferentes tipos de cancro que lhe possam estar associados. Os desenvolvimentos recentes ao nível da genómica e proteómica humanas vieram, em certa medida, introduzir um novo paradigma na concepção de novos radiofármacos, uma vez que têm vindo a identificar novos alvos moleculares que é importante visualizar *in vivo*. Assim, a síntese e caracterização química e biológica de novas sondas radioactivas, capazes de detectarem selectivamente *in vivo* esses alvos moleculares, é um dos desafios mais estimulantes que se coloca actualmente na química radiofarmacêutica. Trata-se de uma área multidisciplinar em que se cruzam conhecimentos de Química, Radioquímica, Radiofarmácia, Bioquímica, Biologia Molecular e Medicina.

Muitos dos isótopos radioactivos com interesse médico correspondem a radiometais. Por isso mesmo, a Química Inorgânica tem um papel importante na concepção de novos radiofármacos, os quais deverão dotar a Medicina Nuclear do século XXI de novas ferramentas para visualizar de forma não invasiva as alterações bioquímicas e fisiológicas associadas a diferentes patologias, mesmo antes dos respectivos sintomas se manifestarem. O trabalho apresentado nesta tese insere-se neste âmbito e pretendia obter dados químicos, radioquímicos e biológicos que permitissem uma concepção mais racional de complexos organometálicos de  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  com interesse para detecção tumoral. Mais concretamente, os complexos a estudar deveriam conter pequenas moléculas (derivados de benzamidas ou sais de trifenilfosfónio) que lhe devam conferir a capacidade de se acumular selectivamente em determinadas células tumorais.

# Capítulo 1

---

## Introdução



# 1. Introdução

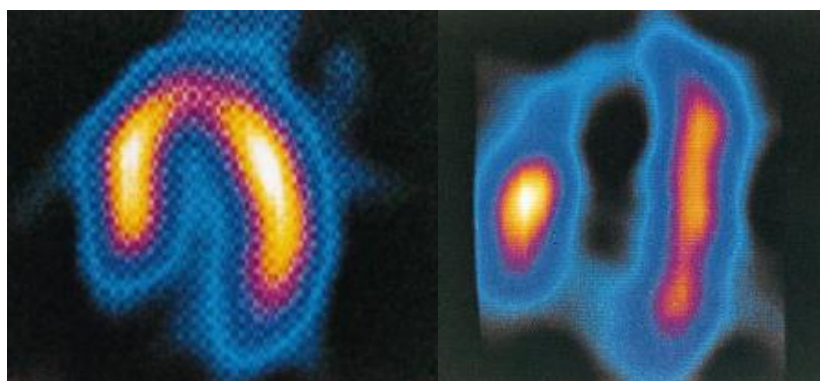
---

## 1.1. Medicina Nuclear e radiofármacos: considerações gerais

---

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica que utiliza isótopos radioactivos em aplicações de diagnóstico ou de terapia. Quando a finalidade é de diagnóstico tem um carácter não invasivo pois permite observar o estado fisiológico dos tecidos sem alterar os processos a avaliar, permitindo observar a função sem provocar a sua alteração. Para aplicações terapêuticas, permite por exemplo a utilização de radiação ionizante para destruição de tecidos neoplásicos.

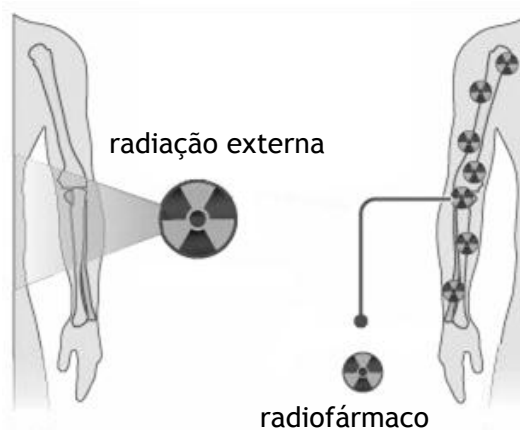
Nos últimos anos, a importância da Medicina Nuclear tem aumentado significativamente, sendo actualmente uma das especialidades com maior relevo no âmbito da imagiologia médica, a par de técnicas radiológicas como a tomografia computadorizada (CT), a ressonância magnética (MRI) ou a ultra-sonografia (US).<sup>1</sup> O seu carácter não invasivo e a possibilidade de visualizar *in vivo* processos fisiológicos associados a diferentes patologias explicam a importância crescente da Medicina Nuclear (figura 1.1).<sup>1-3</sup>



**Figura 1.1.** Exemplos de imagens de um coração de uma pessoa normal (esquerda) e do coração de uma pessoa com doença coronária (direita), obtidas com o radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmina (adaptado de Dilworth *et al*)<sup>4</sup>

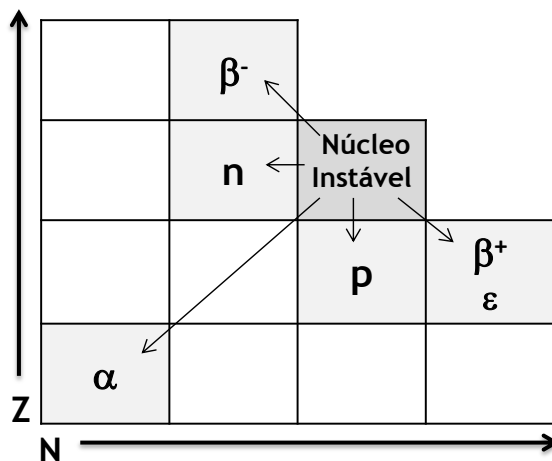
A obtenção de imagens em Medicina Nuclear envolve a administração de radiofármacos que correspondem a fármacos que contêm isótopos radioactivos na sua composição e são administrados aos pacientes em concentrações baixas ( $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  M). A imagem é obtida a partir de detectores externos que recebem o sinal de radiação emitido pelo isótopo

radioactivo. Neste processo, o radiofármaco pode ser visto como uma fonte radioactiva que se encontra no interior do corpo (figura 1.2). A obtenção de imagens é pois feita de modo fundamentalmente diferente de outras técnicas de imagem médica que utilizam radiações, como é o caso da radiografia convencional em que se utilizam raios-X provenientes de uma fonte externa.<sup>1,2</sup> Do ponto de vista do paciente, os procedimentos envolvidos na aquisição de imagens em Medicina Nuclear são simples, sendo a dose de radiação a que o paciente fica submetido inferior à recebida durante a realização de uma radiografia ou de uma Tomografia Axial Computorizada.



**Figura 1.2.** Representação esquemática da utilização de uma fonte externa de radiação em Radiologia (esquerda) e de um radiofármaco (direita) em Medicina Nuclear (adaptado de Healthtalk)<sup>5</sup>

Os radiofármacos correspondem geralmente a compostos orgânicos ou inorgânicos de composição definida. São administrados mais frequentemente a um paciente por via intravenosa, fixando-se preferencialmente num determinado órgão ou tecido alvo.<sup>6,7</sup> O radionuclídeo, componente essencial do radiofármaco, é um nuclídeo instável que sofre decaimento radioactivo pela emissão de raios  $\gamma$  e/ou de partículas subatómicas (e.g.  $\alpha$ ,  $\beta^+$ ,  $\beta^-$ , e<sup>-</sup> Auger) (figura 1.3). Apesar de os radionuclídeos poderem ocorrer naturalmente, aqueles que são utilizados na preparação de radiofármacos são produzidos em reactores nucleares ou em ciclotrões.<sup>6</sup>



**Figura 1.3.** Principais modos de decaimento de um núcleo instável (adaptado de Marsrover)<sup>8</sup>

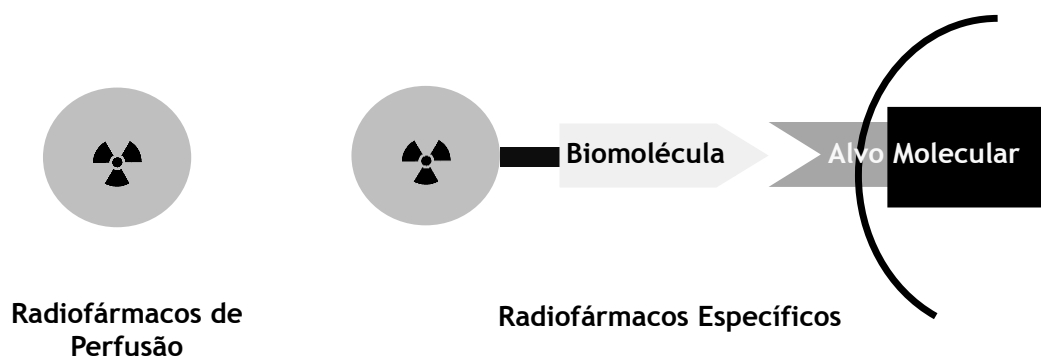
Os radiofármacos utilizados para diagnóstico e/ou terapia distinguem-se pelo tipo de radionuclídeos que incorporam, no que respeita às suas propriedades físicas como sejam o tipo e energia da radiação emitida e o tempo de semi-vida ( $t_{1/2}$ ).<sup>1,6,9</sup>

Os radiofármacos com interesse em **terapia** devem incluir na sua composição um radionuclídeo emissor de partículas carregadas, tais como partículas  $\beta^-$  ou  $\alpha$ , electrões de conversão interna ou electrões Auger. Estas partículas são caracterizadas por um pequeno poder de penetração, mas apresentam uma transferência linear de energia (LET) elevada, ionizando o meio que atravessam e causando uma série de efeitos que resultam na morte das células que irradiam. Como exemplo de radionuclídeos com interesse em terapia, podemos citar o  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{90}\text{Sr}$  e  $^{153}\text{Sm}$ , entre outros.<sup>9-12</sup>

Nas aplicações de **diagnóstico**, tira-se partido de fotões  $\gamma$  emitidos directamente pelos radionuclídeos ou resultantes da interacção de positrões ( $\beta^+$ ) com electrões do meio. Os fotões  $\gamma$  apresentam um baixo poder de ionização e uma grande capacidade de atravessar os tecidos, o que permite a sua eficiente detecção externa e a minimização da dose de radiação a que fica exposto o paciente. Para além do tipo de radiação emitida, o tempo de semi-vida é outro factor a ter em conta na escolha de um radionuclídeo para aplicações de diagnóstico; deve ser curto o suficiente para minimizar a dose de radiação mas suficientemente longo para permitir a preparação, administração, distribuição e acumulação do radiofármaco no órgão ou tecido alvo, assim como para a aquisição de imagens.<sup>1,7,13</sup>

A maior parte dos radiofármacos que se encontram actualmente em utilização clínica correspondem a radiofármacos de **perfusão**, cuja biodistribuição é determinada

exclusivamente pelas suas características físico-químicas (Figura 1.4). Estes radiofármacos são transportados no sangue e atingem o órgão-alvo na proporção do fluxo sanguíneo. Não têm locais específicos de ligação e pensa-se que são distribuídos de acordo com o seu tamanho, carga e lipofilia.<sup>1,6,7</sup> O interesse em desenvolver radiofármacos que forneçam informação, ao nível molecular, das alterações bioquímicas associadas a diferentes patologias levou à investigação e desenvolvimento de **radiofármacos específicos**. Para estes radiofármacos, a biodistribuição é condicionada pela presença de uma molécula biologicamente activa, que pode ser uma pequena molécula orgânica, um péptido ou um anticorpo. Estas biomoléculas podem ser antagonistas ou agonistas com capacidade de reconhecer dados receptores celulares sobreexpressos em determinados tecidos ou órgãos, bem como substratos ou inibidores de enzimas, açúcares ou nucleótidos. A capacidade da biomolécula reconhecer um dado alvo-molecular (receptor, enzima, DNA) vai determinar a fixação do radiofármaco no tecido pretendido. O uso de radiofármacos específicos veio alargar o âmbito e as potencialidades das técnicas nucleares de imagem, tornando-as ferramentas importantes ao nível da imagiologia molecular (figura 1.4).<sup>1,6,7</sup>



**Figura 1.4.** Representação esquemática de radiofármacos de perfusão vs radiofármacos específicos<sup>1,6</sup>

Em Medicina Nuclear existem duas técnicas para obtenção de imagens para fins de diagnóstico: o **PET** (tomografia por emissão de positrões) e o **SPECT** (tomografia de emissão de fóton único).

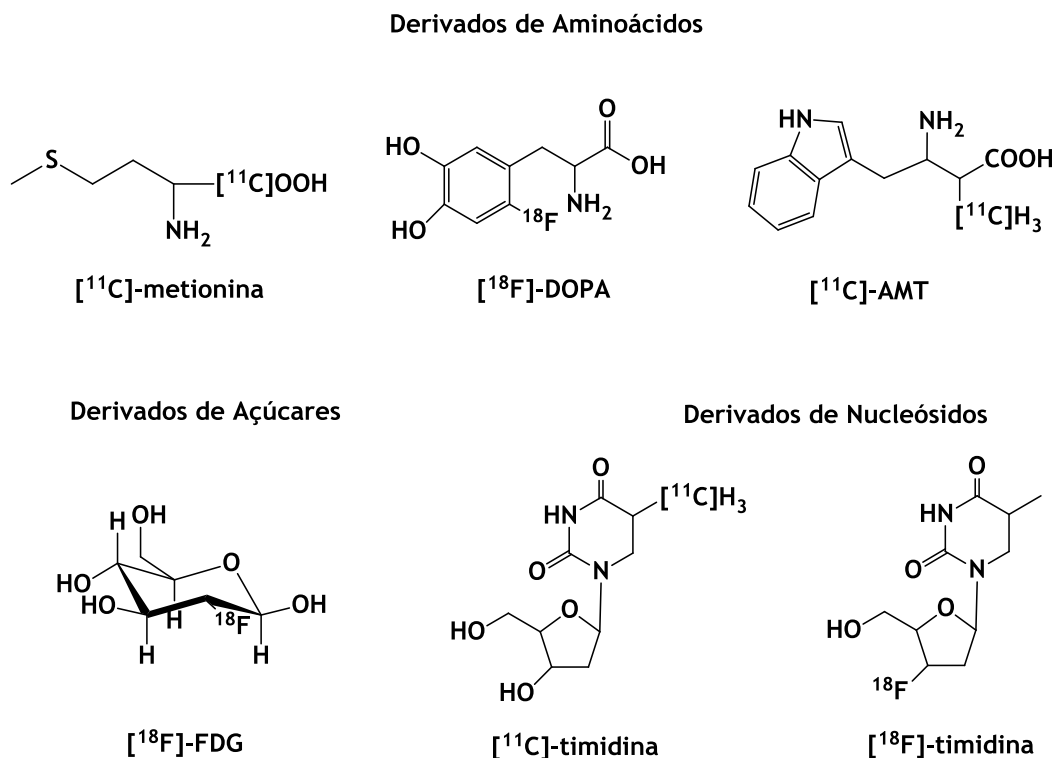
Na técnica PET recorre-se à administração de radiofármacos contendo um radionuclídeo emissor de positrões e a obtenção de imagem envolve a detecção simultânea de dois fótons  $\gamma$  de 511 KeV, emitidos em direcções opostas e resultantes da reacção de aniquilação do positrão com os electrões do meio.

**Tabela 1.1.** Emissores  $\beta^+$  com interesse em PET e suas propriedades físicas<sup>1,6</sup>

Radionuclídeo	$t_{1/2}$	$E_{\text{máx}}$ (MeV)
<sup>15</sup> O	2 min	1,7
<sup>13</sup> N	10 min	1,2
<sup>11</sup> C	20 min	1,0
<sup>18</sup> F	110 min	0,7
<sup>82</sup> Rb	76 s	3,4
<sup>68</sup> Ga	68 min	1,9
<sup>64</sup> Cu	13 h	5,11

Como se pode ver na tabela 1.1, a maior parte dos radionuclídeos com interesse em PET são de elementos não metálicos. Inicialmente, a investigação em PET foi dominada pela incorporação de radioisótopos de elementos não metálicos (ex: <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>18</sup>F) em diferentes classes de biomoléculas, nomeadamente derivados de aminoácidos, nucleósidos ou açúcares (figura 1.5).<sup>14,15</sup> À partida, a incorporação deste tipo radioisótopos nas biomoléculas não altera o seu comportamento biológico o que pode ser considerado uma vantagem na perspectiva da obtenção de radiofármacos específicos. No entanto, com excepção do <sup>18</sup>F, os emissores  $\beta^+$  de elementos não metálicos apresentam um tempo de semi-vida muito curto que condiciona a síntese dos radiofármacos e limita a sua utilização clínica. Por esta razão, devido às suas propriedades físicas favoráveis, alguns radiometais emissores de positrões, como o <sup>64</sup>Cu e o <sup>68</sup>Ga (tabela 1.1), têm vindo a assumir uma importância crescente na investigação de radiofármacos para PET.<sup>7,15-17</sup>

A maior parte dos radionuclídeos usados em PET têm que ser produzidos em ciclotrão. Como já referido, o seu tempo de semi-vida curto limita a sua utilização a centros de Medicina Nuclear que se situem próximos destas unidades. O curto período de semi-vida obriga também a que se desenvolvam processos de síntese radioquímica rápidos. Estas exigências implicam elevados custos económicos, o que faz com que haja um grande interesse em desenvolver radiofármacos alternativos para uso em SPECT, pois permitem uma utilização clínica de rotina, mais acessível e económica.



**Figura 1.5.** Estruturas de diferentes biomoléculas contendo <sup>11</sup>C e <sup>18</sup>F para imagiologia por PET<sup>1,15,17</sup>

O SPECT é uma técnica de imagiologia médica que envolve a administração ao paciente de um radiofármaco contendo um radionuclídeo emissor de fótons  $\gamma$  com energia adequada (100-250 keV) para uma detecção eficiente no exterior do corpo, utilizando um equipamento designado por câmara gama. A imagem tomográfica é obtida à medida que um detector, constituído por um cristal único de NaI(Tl), vai rodando em torno do paciente, permitindo assim obter imagens nos diversos planos anatómicos. O SPECT teve um grande impacto em Medicina Nuclear, uma vez que oferece a possibilidade de utilizar moléculas contendo radionuclídeos com tempos de semi-vida mais longos, o que lhe confere uma maior disponibilidade a custos reduzidos, comparativamente aos agentes utilizados em PET (tabela 1.2).<sup>1,7,13</sup>

**Tabela 1.2.** Emissores  $\gamma$  com interesse em SPECT e suas propriedades físicas<sup>1,6</sup>

Radionuclídeo	$t_{1/2}$	Radiação $\gamma$ / keV(%)
<sup>99m</sup> Tc	6,02 h	140 (90)
<sup>67</sup> Ga	3,26 d	93 (38), 185 (21), 300 (17), 394 (5)
<sup>111</sup> In	2,83 d	171 (91), 245 (94)
<sup>123</sup> I	13,20 h	159 (83)
<sup>201</sup> Tl	3,04 d	167 (11)

Como se pode ver pela tabela 1.2, muitos dos radionuclídeos ( $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ) com interesse em SPECT são elementos metálicos. Há a destacar o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  que é actualmente o radionuclídeo mais utilizado em SPECT e teve um papel crucial no desenvolvimento da Medicina Nuclear enquanto especialidade médica. No caso dos radiometais, a concepção de radiofármacos específicos é uma tarefa exigente, na medida em que é necessário associar as biomoléculas a um dado metal sem afectar as características biológicas das mesmas. Para esse efeito existem diferentes possibilidades, sendo a abordagem bifuncional a mais explorada (figura 1.6.).<sup>16,18</sup>



**Figura 1.6.** Abordagem bifuncional para a concepção de radiofármacos específicos de elementos metálicos<sup>7</sup>

Nesta abordagem são utilizados ligandos bifuncionais (LBF) que apresentam capacidade para coordenar e estabilizar o metal e que, ao mesmo tempo, apresentam grupos funcionais adequados para ligação à biomolécula. A escolha do LBF é determinada pela natureza e pelo estado de oxidação do metal, podendo existir um espaçador entre o metal e a biomolécula. A presença do espaçador permite aumentar a distância da biomolécula ao centro metálico, de modo a minimizar a possibilidade de alterar as suas propriedades biológicas. O espaçador pode ainda ser explorado como modelador da farmacocinética, mediante introdução de grupos funcionais de natureza diversa. Esta abordagem tem sido aplicada com sucesso na marcação de uma grande variedade de biomoléculas, sendo de destacar os péptidos e os anticorpos. Também tem sido explorada para marcar pequenas moléculas orgânicas que necessitam de atravessar a membrana plasmática para atingir alvos intracelulares. No entanto, neste caso conduziu em geral a resultados biológicos menos promissores comparativamente aos péptidos e anticorpos marcados.<sup>7,18,19</sup>

## 1.2. Tecnécio

### 1.2.1. Aspectos básicos da química e radioquímica do Tecnécio

O tecnécio é um metal de transição artificial que não apresenta isótopos estáveis e pertence ao grupo 7 da Tabela Periódica dos Elementos. Foi descoberto por Segré e Perrier em 1938, em Berkeley (Califórnia, EUA), quando estudavam a irradiação de um alvo de molibdénio metálico com deuterões num ciclotrão. O Tc foi o primeiro elemento a ser produzido artificialmente, conhecendo-se actualmente 27 isótopos ( $^{91}\text{Tc}$  -  $^{110}\text{Tc}$ ) de tecnécio, sete dos quais metaestáveis.<sup>1</sup>

De todos os isótopos de tecnécio, o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é o mais relevante devido à sua importância em imagiologia médica. Esta importância advém de um conjunto de propriedades físicas e químicas adequadas à sua utilização em exames de diagnóstico por SPECT, entre as quais se pode destacar:

- Emissão de radiação  $\gamma$  monocromática com a energia de 141 keV, suficientemente elevada para atravessar os tecidos e ser detectada eficientemente pelos cristais de NaI(Tl) da câmara gama, com obtenção de imagens de elevada qualidade;
- Tempo de semi-vida ( $t_{1/2} = 6,02$  h) suficientemente longo para permitir a síntese do radiofármaco, o seu controlo de qualidade, a administração ao paciente e a aquisição de imagens, mas suficientemente curto para minimizar a exposição do paciente à dose de radiação;
- Facilidade de obtenção a partir de um gerador comercial de molibdénio-99/tecnécio-99m ( $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ );
- Química de coordenação muito variada, o que permite preparar uma grande variedade de complexos com diferentes propriedades físico-químicas e biológicas.

O gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  contém  $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^{2-}$  adsorvido no topo de uma coluna de alumina. O  $^{99}\text{Mo}$  tem um tempo de semi-vida de 66 h e decai por emissão  $\beta^-$  para o estado metaestável  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (86%) e para o estado fundamental  $^{99}\text{Tc}$  (14%) (figura 1.7). O  $^{99}\text{Mo}$  decai continuamente para  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  aumentando a concentração deste até se atingir um equilíbrio transitório, ao fim de um período de cerca de 22 h. O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é separado através da eluição com uma solução de NaCl 0,9%, sendo recolhido num frasco sob vácuo na forma química de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ). O molibdato fica retido na coluna decaindo novamente para  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  que poderá ser recolhido em eluições subsequentes (figura 1.8). A

concentração de  $\text{TcO}_4^-$  no eluído é baixa ( $10^{-7}$  a  $10^{-8}\text{M}$ ) pelo que a síntese dos radiofármacos é necessariamente realizada em soluções aquosas diluídas, obtidas directamente a partir do gerador (figura 1.8).<sup>4,13,16,18,20-22</sup>

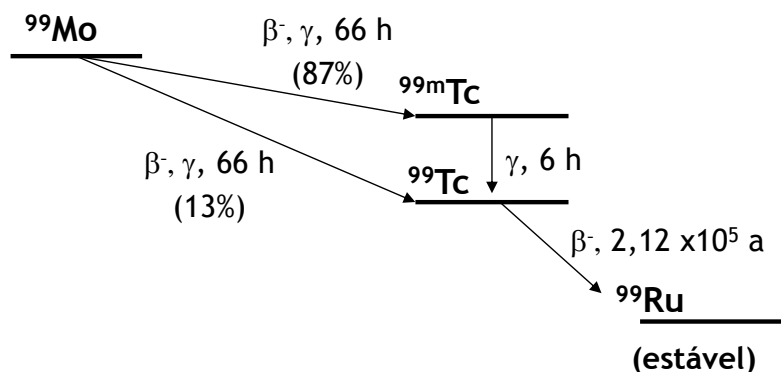


Figura 1.7. Esquema de decaimento dos isótopos radioactivos presentes no gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ <sup>6</sup>

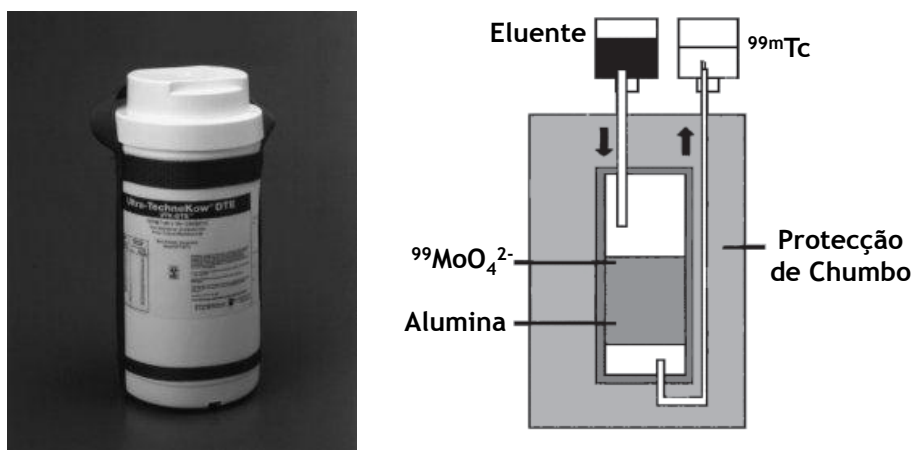


Figura 1.8. Gerador isotópico de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ <sup>7,21</sup>

O tecnécio pode existir em oito estados de oxidação diferentes, entre -1 e +7, cuja estabilidade depende do tipo de ligandos e do ambiente químico. Em meio aquoso, o  $\text{TcO}_4^-$  é muito estável e não forma directamente complexos com os ligandos. Consequentemente, a síntese dos radiofármacos obriga à redução do  $^{99\text{m}}\text{Tc(VII)}$  a estados de oxidação inferiores. A redução do Tc (VII) a estados de oxidação mais baixos é conseguida através da utilização de diferentes agentes redutores e diferentes condições reaccionais (pH, temperatura, concentração), sendo condicionada pela natureza dos ligandos estabilizadores. Os sais estanosos ( $\text{SnCl}_2$ , citrato de estanoso ou tartarato estanoso) e o borohidreto de sódio são alguns exemplos de agentes redutores capazes de reduzir o pertecnetato em meio aquoso.<sup>1,6</sup> Até recentemente, os estados de oxidação intermédios Tc(III) e (V) eram os mais

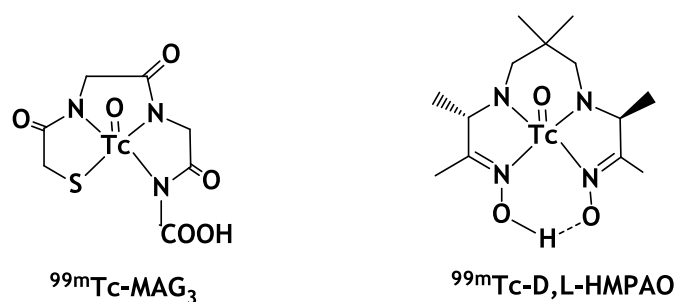
explorados para a síntese de radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$ . No entanto, nos últimos anos, os complexos tricarbonilo de Tc(I) têm assumido uma importância crescente na investigação e desenvolvimento de novos radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$ .<sup>20,22</sup>

A natureza diluída do  $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4^-]$  faz com que não seja possível caracterizar os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  pelas técnicas convencionais utilizadas em química inorgânica, como a difracção de raios-X ou as espectroscopias de RMN e IV. Assim, a identificação estrutural destes complexos baseia-se na comparação com compostos análogos de  $^{99}\text{Tc}$  ou de Re, isolados macroscopicamente e caracterizados pelas técnicas convencionais. Admite-se que os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{99}\text{Tc}$  ou de Re têm a mesma estrutura química se apresentarem idêntico comportamento cromatográfico quando analisados por HPLC. Os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  são detectados através da emissão de radiação  $\gamma$ , enquanto a detecção dos complexos de  $^{99}\text{Tc}$  ou de Re é efectuada por ultravioleta-visível (UV/Vis). A utilização de  $^{99}\text{Tc}$  tem o inconveniente deste isótopo ser um emissor  $\beta^-$  com um tempo de semi-vida longo ( $t_{1/2} = 2,12 \times 10^5$  anos), o que exige algum cuidado na manipulação dos seus compostos. Assim, tem vindo a tornar-se prática corrente a utilização de complexos de Re para identificar os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ . Devido à contracção dos lantanídeos, o Tc e Re apresentam raios atómicos praticamente coincidentes (1,35 e 1,37 ppm, respectivamente) e, por essa razão, os complexos de Re e Tc são estruturalmente muito similares. A semelhança química entre o Re e Tc faz com que os seus complexos tenham tamanho, forma, momento dipolar, carga formal, mobilidade iónica e lipofilia similares. As principais diferenças entre o comportamento químico destes complexos surgem a nível das propriedades redox e da cinética das reacções de substituição. Os complexos de Re são mais fáceis de oxidar e, portanto, mais difíceis de reduzir, sendo mais inertes cineticamente que os complexos análogos de Tc.<sup>1,7</sup>

### 1.2.2. Química do Tecnécio relevante para radiofármacos

A utilização do  $^{99m}\text{Tc}$  em imagiologia médica iniciou-se com estudos de visualização da tiróide mediante a administração de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (VII). Em seguida, durante as décadas de 1960 e 1970, foram introduzidos diferentes radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  que permitiram avaliar alterações do estado funcional de diferentes estruturas e órgãos (e.g. esqueleto, rins ou fígado), bem como diagnosticar várias patologias. Estes radiofármacos, designadamente o  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP (HMDP = hidroximetilendifosfonato),  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP (MDP = metilendifosfonato) e  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA (DTPA = Ácido Dietilenotriaminopentacético), foram desenvolvidos sem qualquer apoio da química de coordenação do tecnécio. Apesar da sua estrutura molecular não ser conhecida, muitos deles ainda se encontram em uso clínico. A partir da década de

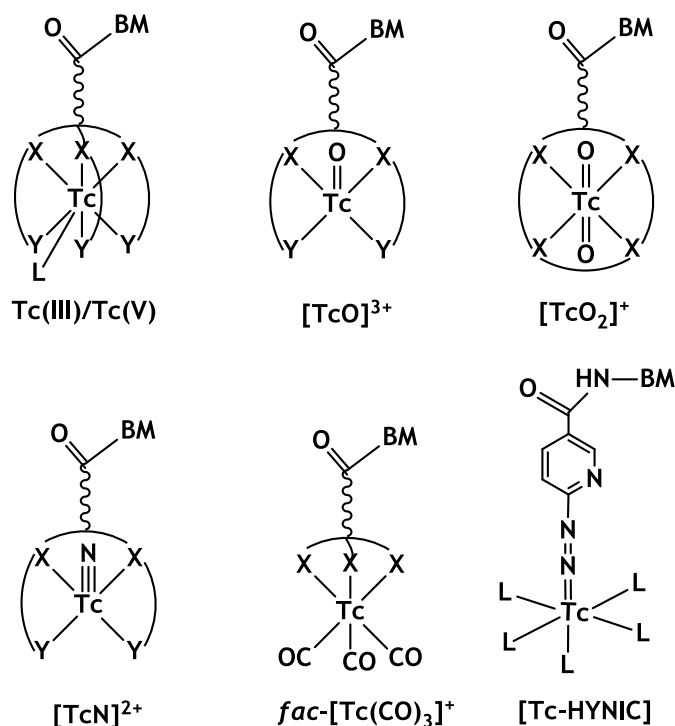
1980, a química de coordenação do Tc passou a ter grande importância no desenvolvimento de radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  e permitiu obter, por exemplo, vários oxocomplexos de Tc(V) com a unidade  $[\text{TcO}]^{3+}$ . O  $^{99m}\text{Tc}$ -D,L-HMPAO e o  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub> são exemplos de oxocomplexos de Tc(V) com estruturas moleculares bem definidas e conhecidas e que foram aprovados para uso clínico como radiofármacos para estudo da perfusão cerebral e da função renal, respectivamente (figura 1.9).<sup>9</sup>



**Figura 1.9.** Estruturas moleculares de radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  aprovados para uso clínico<sup>2,9</sup>

A química inorgânica e organometálica do Tc tem vindo a assumir um papel fundamental na concepção de radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$ , tendo ganho especial relevância no âmbito do desenvolvimento de radiofármacos específicos. Na última década tem vindo a ser efectuado um grande esforço de investigação na química radiofarmacêutica do Tc com o objectivo de obter complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  funcionalizados com biomoléculas e com interesse potencial como radiofármacos específicos. Foram investigados complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  funcionalizados com uma grande diversidade de biomoléculas, como sejam anticorpos monoclonais, antagonistas de receptores do sistema nervoso central, oligonucleótidos e nucleósidos.<sup>13,15-17,23</sup> Apesar dos esforços desenvolvidos, os radiofármacos específicos de  $^{99m}\text{Tc}$  que foram aprovados para uso clínico são em número reduzido.<sup>24-27</sup>

A contribuição da química inorgânica e organometálica do Tc é fundamental para conceber novos complexos de Tc com interesse para o desenvolvimento de radiofármacos específicos. Para esse efeito, têm vindo a ser estudados diferentes centros metálicos que, através da utilização de ligandos bifuncionais adequados, permitem uma ligação eficaz do  $^{99m}\text{Tc}$  às biomoléculas (figura 1.10).<sup>13,28,29</sup>



**Figura 1.10.** Principais centros metálicos de Tc utilizados no desenvolvimento de radiofármacos específicos (BM = Biomolécula) (adaptado de Liu *et al*)<sup>7</sup>

Até recentemente, os oxo-complexos de Tc(V), contendo a unidade  $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$ , foram os mais explorados na marcação de biomoléculas com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .<sup>18</sup> Para estabilizar esta unidade, utilizam-se geralmente ligandos tetradentados, usualmente doadores de N e S. Uma das principais desvantagens dos oxo-complexos de Tc(V) é a possível formação de estereoisômeros.<sup>7</sup> Estes isômeros podem apresentar diferentes características físico-químicas e um comportamento biológico diferente, o que pode ser desfavorável, uma vez que a presença de alguns desses isômeros pode reduzir a eficácia do radiofármaco. Por outro lado, a funcionalização dos ligandos tetradentados com as moléculas biologicamente activas pode ser bastante exigente, uma vez que requer frequentemente a utilização de diferentes estratégias de protecção e desprotecção.<sup>23</sup>

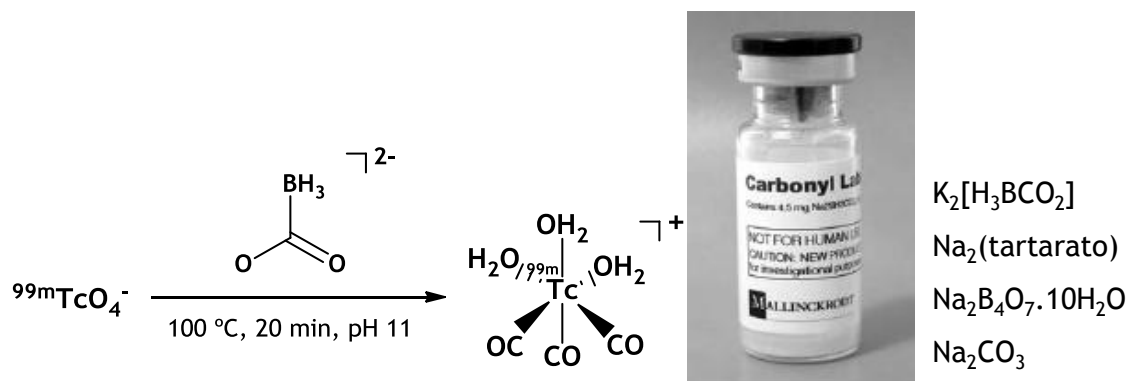
Com o objectivo de ultrapassar algumas das limitações inerentes à aproximação baseada em oxocomplexos de Tc(V), foram introduzidos novos fragmentos metálicos e novas aproximações para marcar biomoléculas com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , como indicado na figura 1.10. Dessas aproximações, a aproximação HYNIC (ácido hidrazinonicotínico) e a aproximação organometálica, baseadas respectivamente em complexos com os centros metálicos  $[\text{Tc-HYNIC}]$  e  $\text{fac-}[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ , têm vindo a assumir uma importância crescente nos últimos anos.

Na aproximação  $[\text{Tc-HYNIC}]$ , o ligando HYNIC pode coordenar ao metal de forma mono ou bidentada, sendo necessária a utilização de co-ligandos para satisfazer a esfera

de coordenação do metal. Estes co-ligandos têm como átomos doadores azoto e oxigénio, e incluem o ácido etilenodiamino diacético (EDDA), gluconato, ácido nicotínico ou tricina, entre outros. Desta forma, é possível obter complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  estáveis e facilmente funcionalizáveis com uma grande variedade de biomoléculas. A grande vantagem desta abordagem é a possibilidade de se poder regular a lipofilia e farmacocinética dos complexos através da escolha de diferentes combinações de co-ligandos.<sup>23,30-32</sup> No entanto, a natureza da ligação Tc-N envolvida na coordenação do HYNIC ao metal permanece desconhecida, o que constitui uma desvantagem da aplicação desta metodologia no desenvolvimento de radiofármacos.

O fragmento  $\text{fac-}[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  pode ser considerado um dos centros metálicos mais promissores para obtenção de complexos de Tc com características adequadas para conjugação a biomoléculas.<sup>33-38</sup> Neste fragmento a coordenação dos ligandos CO envolve a formação de uma ligação  $\sigma$  entre a orbital não-ligante do átomo de carbono e uma orbital vazia (d ou p) do metal. O estabelecimento da ligação  $\sigma$  aumenta a densidade electrónica do metal e promove uma forte retrodoação  $\pi$  para uma orbital  $\pi^*$  do ligando carbonilo.<sup>39,40</sup> A formação da ligação  $\sigma$  e a retrodoação  $\pi$  são sinérgicas o que leva à formação de uma ligação M-C muito estável e muito pouco reactiva mesmo em meio biológico. A estabilidade dos complexos tricarbonilo de Tc(I) face a reacções de oxidação, em meio aquoso e numa vasta gama de pH, constitui uma vantagem significativa da aproximação organometálica comparativamente à aproximação clássica baseada em complexos com a unidade  $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$ .<sup>22</sup>

Em meio aquoso, a entrada na química dos complexos tricarbonilo de Tc(I) é feita através do precursor  $\text{fac-}[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ . A síntese original deste precursor envolvia a redução de  $[\text{TcO}_4^-]$  com  $\text{BH}_3/\text{THF}$ , na presença de 1 atm de CO e de  $\text{NaBH}_4$ .<sup>41</sup> Embora este método permitisse obter o aquo-complexo  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ , a sua aplicação na preparação de radiofármacos em meio hospitalar não era viável devido à elevada toxicidade do CO gasoso. Posteriormente, Alberto *et al.* demonstraram que o boranocarbonato de potássio ( $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$ ) pode actuar como redutor e fonte de CO, uma vez que, mediante hidrólise em meio aquoso, liberta CO e reduz simultaneamente o Tc(VII) a Tc(I), originando o aquo-complexo  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  (figura 1.11).<sup>42-44</sup> As características do boranocarbonato permitiram a introdução de uma formulação na forma de *kit* liofilizado para obtenção do precursor tricarbonilo. Este *kit*, comercializado para fins de investigação com o nome de *Isolink* (Covidien, Petten, Holanda) (figura 1.11), permite a preparação do complexo  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  num único passo de forma quantitativa, por adição de  $[\text{H}_3\text{BCO}_2^-]$  seguido de aquecimento a 100 °C durante 20 min.



**Figura 1.11.** Síntese do precursor  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  e composição de um *kit Isolink*®

A relevância da aplicação dos complexos  $\text{fac-}[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  ( $\text{M} = {}^{99m}\text{Tc}, \text{Re}$ ) no desenvolvimento de radiofármacos advém da inércia dos ligandos CO e da versatilidade química do precursor, devido ao carácter lábil das três moléculas de água coordenadas ao metal. Os ligandos H<sub>2</sub>O podem ser substituídos por ligandos com denticidade e características electrónicas e/ou estereoquímicas bem diversas, o que permite preparar uma grande variedade de complexos. O fragmento  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  apresenta dimensões reduzidas, uma geometria quase esférica, formando em geral complexos octaédricos com elevada estabilidade cinética e termodinâmica. Estas características potenciam a sua utilização na concepção de radiofármacos, utilizando ligandos unidentados, bidentados e tridentados, com uma grande diversidade de átomos doadores (ex: P, S, N, O, C, H) e facilmente funcionalizáveis com biomoléculas.<sup>45-56</sup> Comparativamente a outros centros metálicos de Tc, o fragmento organometálico tem uma lipofilia intrínseca superior o que poderá conduzir a complexos com uma maior facilidade para atravessar a membrana celular por difusão, sendo de grande importância nas situações em que o respectivo alvo molecular se encontra no interior das células.

Para desenvolvimento de radiofármacos específicos, têm sido explorados essencialmente complexos do tipo  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\kappa^3\text{-L})(\text{CO})_3]$  (L = ligando), estabilizados por uma enorme variedade de ligandos tridentados, com diferentes sistemas de átomos doadores, tais como aminas alifáticas,<sup>57</sup> aminas N-heterocíclicas aromáticas (piridinas<sup>58</sup> e pirazolos<sup>50-52,54,55,59,60</sup>), ácidos carboxílicos,<sup>54</sup> mercaptoimidazolos,<sup>46,47,61</sup> tioéteres,<sup>50</sup> tióis<sup>62</sup> e fosfinas<sup>63-65</sup> (figura 1.12). Nos últimos anos, os complexos com a unidade  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  foram utilizados para marcação de uma grande variedade de biomoléculas, nomeadamente pequenos péptidos, açúcares, aminoácidos, nucleótidos ou antagonistas de receptores do sistema nervoso central.<sup>34,37,52</sup> No entanto, apesar dos resultados promissores obtidos, até à

data, não se encontra em aplicação clínica nenhum radiofármaco contendo a unidade *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ .

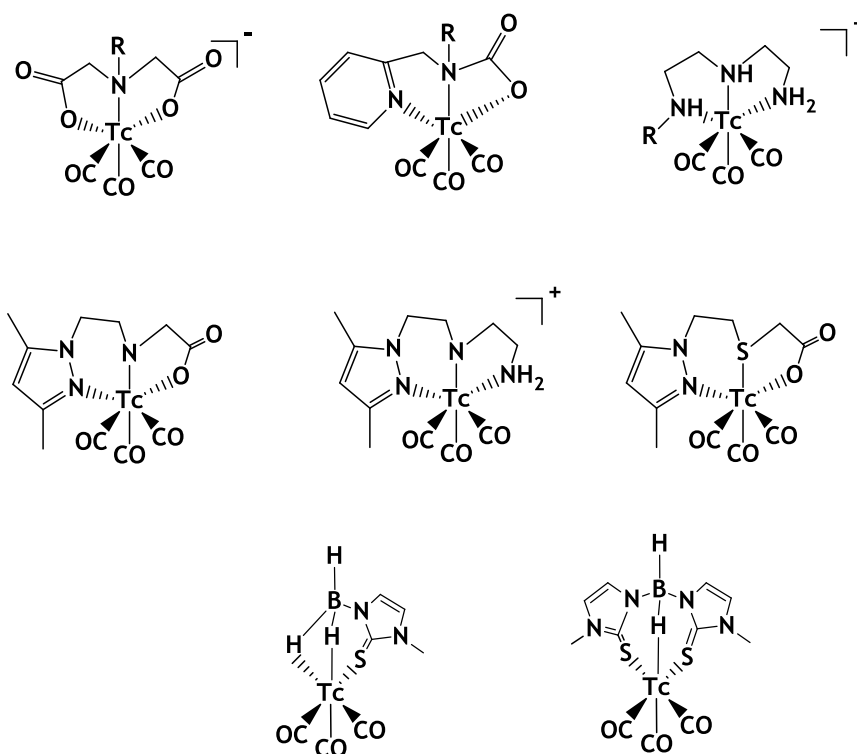


Figura 1.12. Exemplos de complexos com a unidade *fac*- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ <sup>47,48,54,55,57,58,60,66</sup>

### 1.3. Radiofármacos para detecção do melanoma: estado da arte

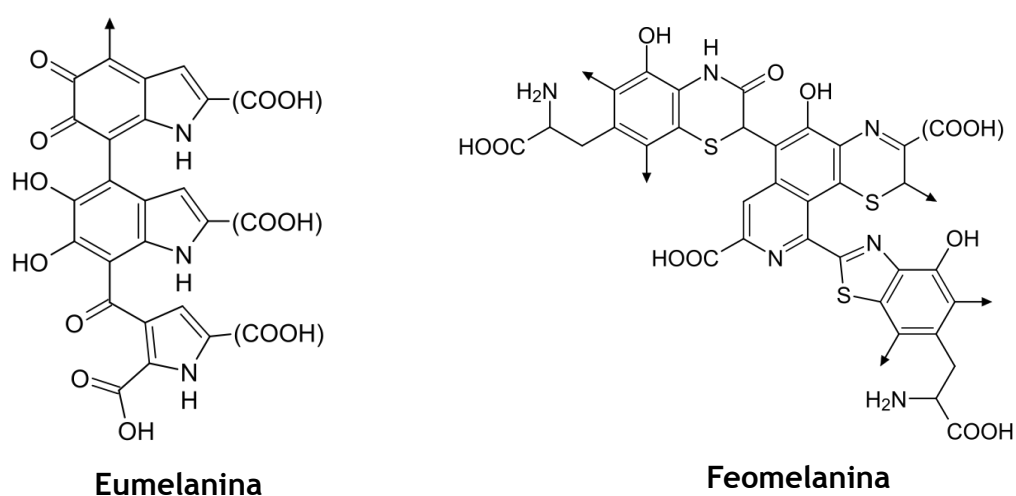
#### 1.3.1. Aspectos gerais

O melanoma é o tipo de cancro da pele mais perigoso e um dos tumores malignos mais agressivos devido à elevada probabilidade de formação de metástases com consequente disseminação por diferentes órgãos e tecidos. Em Portugal surgem, anualmente, cerca de 1000 novos casos de melanoma maligno. Apesar de representar apenas 8% dos cancros de pele, o melanoma maligno é responsável por mais de 90% das mortes deste tipo de cancro. Em média, 15 a 20% dos doentes morrem ao fim de cinco anos após o diagnóstico. O aspecto inicial do melanoma é variado mas habitualmente caracteriza-se pelo aparecimento de um pequeno nódulo ou mancha, de cor negra de alcatrão, sobre pele aparentemente sã, ou sobre sinais pré-existentes.<sup>67-69</sup>

O melanoma tem origem nos melanócitos que são células que produzem melanina, o pigmento responsável pela cor da pele e do cabelo. Os melanócitos encontram-se na

camada basal da epiderme e nos folículos capilares. Em condições normais, em resposta a uma exposição a radiação UV (por exemplo sol), os melanócitos são estimulados a produzirem mais melanina, fazendo com que a pele bronzeie.<sup>67</sup>

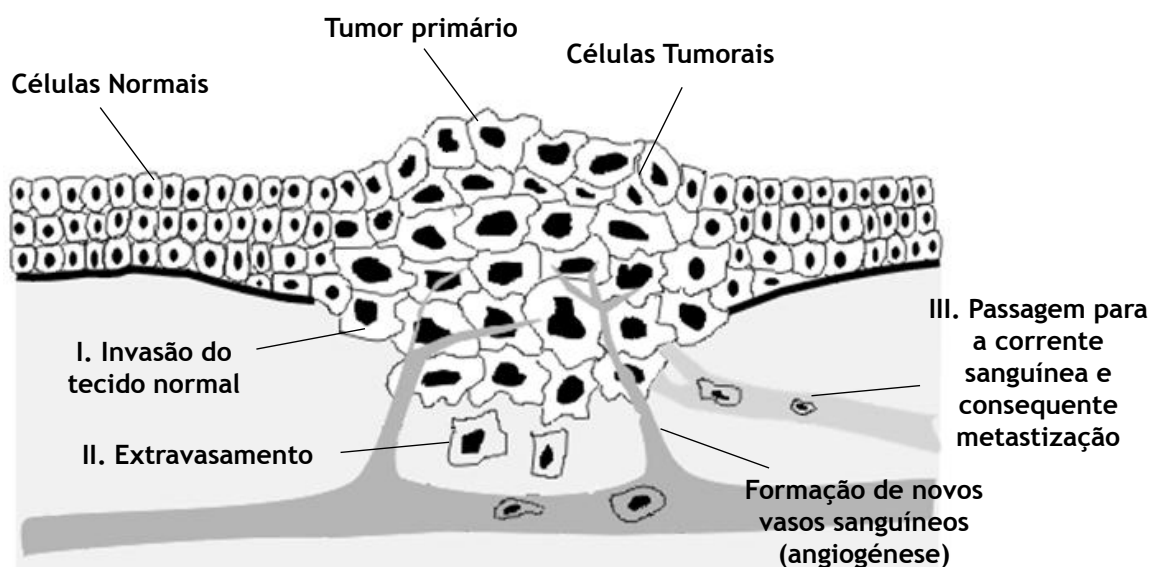
A melanina é um polímero amorfo, irregular, composto da mistura de dois pigmentos, eumelaninas e feomelaninas, cuja principal função é a pigmentação e protecção dos tecidos contra os efeitos nocivos da radiação solar (figura 1.13). A produção de melanina é feita pelos melanócitos a partir da polimerização da tirosina, por intermédio da acção da tirosinase. A tirosina polimerizada deposita-se em vesículas denominadas melanossomas. No melanoma maligno a formação de melanina aumenta muito devido à elevada actividade da tirosinase.<sup>69,70</sup>



**Figura 1.13.** Estrutura proposta da eumelanina e da feomelanina. Estas estruturas são apenas representações formuladas a partir de estudos de metabolismo. Os grupos (COOH) podem ser COOH ou H, ou mais raramente outros substituintes. Estas posições podem ainda estar disponíveis para ligação a outras unidades. As setas indicam os locais por onde o polímero continua<sup>71</sup>

O melanoma surge quando os melanócitos se tornam malignos e caracteriza-se pelo crescimento e divisão descontrolados destas células, invadindo e destruindo tecidos adjacentes, podendo mesmo espalhar-se para lugares distantes no corpo. Existem vários tipos de melanoma que variam de acordo com a origem e localização das lesões, incidência e nível de pigmentação. Ocorre geralmente na pele, no entanto, pode também ocorrer nos olhos (melanoma ocular ou melanoma intra-ocular) e mais raramente surge nas meninges, no aparelho digestivo, nos gânglios linfáticos ou noutras áreas onde há melanócitos. Um tipo mais raro de melanoma corresponde ao melanoma amelanótico em que as células não produzem melanina e que representa cerca de 2-8% dos casos de melanoma.<sup>67,68,72,73</sup>

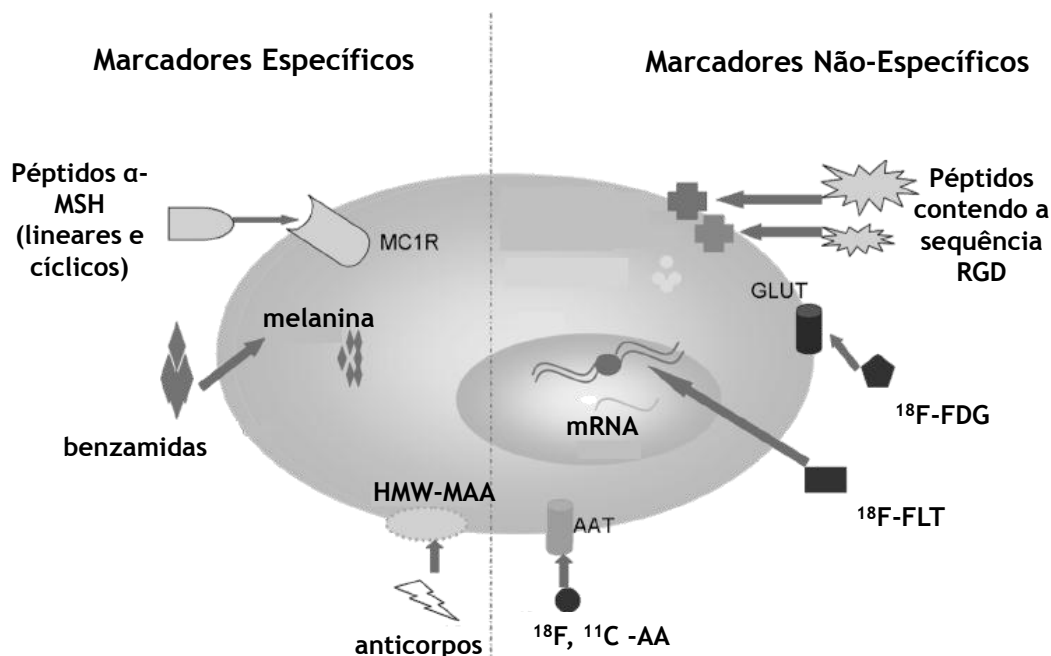
O tratamento do melanoma é quase sempre cirúrgico. Quando o tratamento é efectuado nas fases iniciais apresenta em geral elevadas taxas de cura. Todavia quando o tumor já é muito volumoso as probabilidades de cura ficam drasticamente reduzidas, existindo o risco eminente de invasão de tecidos e órgãos vizinhos ou distantes através da formação de metástases. As metástases correspondem a novas lesões tumorais, formadas a partir de outras mas sem que exista continuidade entre elas. Na formação das metástases, as células tumorais desprendem-se do tumor primário, passam para a corrente sanguínea, implantando-se noutras partes do corpo onde se multiplicam e originam um cancro generalizado (figura 1.14). Em cada um destes passos, as células malignas têm de superar os sistemas de controlo do organismo que mantêm as células nos seus locais primários. As metástases mais comuns do melanoma surgem nos gânglios linfáticos ou em órgãos como o fígado, pulmões e cérebro.<sup>67,74</sup>



**Figura 1.14.** Etapas principais da metastização do melanoma (adaptado da referência 75)

O melanoma maligno metastático apresenta um mau prognóstico devido, em parte, ao alto grau de resistência intrínseca e/ou adquirida das metástases à acção dos agentes antineoplásicos utilizados na quimioterapia e imunoterapia. Outro aspecto da malignidade está relacionado com a detecção. Apesar dos melanomas primários poderem ser geralmente detectados na fase inicial através de exame visual, a detecção de metástases para um estadiamento adequado, bem como o reestadiamento após tratamento, é uma tarefa por vezes mais complicada. A ocorrência de micrometástases (não detectáveis visualmente) antes do tratamento do tumor primário parece explicar a incapacidade actual de prevenir a doença metastática que pode manifestar-se meses ou anos mais tarde. O diagnóstico precoce das metástases do melanoma é portanto fundamental para a cura

deste cancro. As técnicas de imagiologia molecular como o SPECT e o PET surgem como uma alternativa, pois permitem detectar pequenas alterações moleculares sem que para isso haja alteração na estrutura anatómica. Neste sentido é pois importante o desenvolvimento de radiofármacos que permitam o diagnóstico precoce das metástases do melanoma maligno. Investigação na área da biologia do melanoma permitiu introduzir novos marcadores moleculares relevantes, que podem ser alvo para detecção do melanoma.<sup>69</sup> Os marcadores moleculares estudados para o desenvolvimento de radiofármacos para diagnóstico do melanoma maligno podem ser específicos ou não específicos do melanoma (figura 1.15). A proliferação celular, a apoptose, a hipóxia e a angiogénese são exemplos de processos celulares comuns a outros tipos de cancro que se podem alvejar para detecção não específica do melanoma.



**Figura 1.15.** Marcadores moleculares e respectivos radiofármacos utilizados para imagiologia por SPECT e PET do melanoma maligno. (MC1R - receptor das melanocortinas; HMW-MAA - antigénios de elevado peso molecular associados ao melanoma maligno; RGD - arginina-glicina-ácido aspártico; [<sup>18</sup>F]FDG - [<sup>18</sup>F]-2-fluor-2-desoxiglucose; GLUT - transportador da glucose; AA - aminoácido; AAT - transportador de aminoácidos; [<sup>18</sup>F]FLT - 3-<sup>18</sup>F-fluoro-3'-deoxi-L-timidina) (adaptado de Ren *et al*)<sup>69</sup>

O radiofármaco mais utilizado para diagnóstico do melanoma maligno é a [<sup>18</sup>F]-2-fluor-2-desoxiglucose ([<sup>18</sup>F]FDG) (figura 1.16), um análogo da glucose. A [<sup>18</sup>F]FDG é transportada para o interior das células pelo transportador da glucose (GLUT) que se encontra presente na membrana celular. Dentro da célula a [<sup>18</sup>F]FDG é fosforilada a [<sup>18</sup>F]FDG-6-fosfato, tal como a glucose. No entanto, não sofre metabolização subsequente e fica retida no interior da célula.<sup>1</sup> Este radiofármaco acumula-se em células com alto

consumo de glucose e que sobreexpressam o GLUT, como é o caso das células de tumores em crescimento rápido. Não é um radiofármaco específico para o melanoma, sendo também utilizada para detectar e/ou confirmar a malignidade de outro tipo de tumores, nomeadamente o cancro do pulmão, cólon, mama ou linfomas.

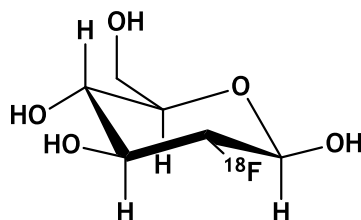


Figura 1.16. Estrutura molecular da  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$

O PET com  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  é utilizado para a detecção de metástases de melanoma e para o acompanhamento sistemático de pacientes submetidos a terapêuticas anti-tumorais. No entanto, a  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  apresenta problemas de sensibilidade, não sendo indicada para a detecção de micrometástases.<sup>76,77</sup> Outra das limitações da  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  é a falta de especificidade. A  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  não fica apenas retida em células tumorais mas também noutras células que utilizam elevados níveis de glucose, como é o caso de células de tecidos infectados ou inflamados, células musculares e do coração. Esta retenção de actividade no coração e músculo pode por vezes interferir com a visualização de tumores e metástases, principalmente na zona do tórax. A  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  apresenta também limitações ao nível da detecção de tumores ou metástases localizados no cérebro devido ao elevado consumo energético basal deste órgão.<sup>69,78,79</sup>

As limitações da  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  associadas às características únicas do melanoma, nomeadamente a sua capacidade de metastização, motivaram o estudo de marcadores específicos deste tipo de cancro. Como indicado na figura 1.15, os marcadores moleculares específicos investigados para detecção *in vivo* do melanoma com sondas radioactivas incluem os antigénios de elevado peso molecular associados ao melanoma maligno (HMW-MAA), os receptores das melanocortinas e o pigmento melanina.<sup>69</sup>

Os HMW-MAA encontram-se expressos em mais de 80% das lesões de melanoma humano. Anticorpos monoclonais contra HMW-MAA foram sintetizados e avaliados como radiofármacos para detecção ou radioimunoterapia do melanoma. Estes compostos foram mesmo avaliados em ensaios clínicos apresentando captações tumorais razoáveis. No entanto, apresentaram uma elevada captação em tecidos normais, incluindo fígado, baço e intestino, o que limita a sua utilização clínica.<sup>69,80</sup>

O receptor da melanocortina 1 (MC1R) encontra-se sobreexpresso em mais de 80% dos tumores de melanoma humano, sendo a hormona alfa-estimuladora dos melanócitos ( $\alpha$ -MSH) o ligando natural deste receptor. Vários análogos peptídicos da  $\alpha$ -MSH, acíclicos ou cíclicos, foram marcados com diferentes radionuclídeos com o objectivo de obter radiopéptidos para diagnóstico (e.g.  $^{18}\text{F}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ) ou terapia (e.g.  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  e  $^{212}\text{Pb}$ ) do melanoma. Os radiopéptidos resultantes apresentaram de uma maneira geral uma elevada afinidade e selectividade para os receptores MC1R. Muitos destes compostos foram avaliados numa fase pré-clínica em ratinhos com tumor induzido, tendo conduzido a resultados promissores. No entanto, estes resultados promissores ainda não foram confirmados no homem, provavelmente devido à maior densidade dos receptores MC1R nas células do melanoma murino comparativamente a células do melanoma humano.<sup>23,69,81,82</sup>

Com excepção dos melanomas amelanóticos que representam cerca de 2-8% dos melanomas, a melanina surge como um alvo molecular alternativo para diagnóstico do melanoma maligno. A presença de elevadas quantidades deste pigmento nas células tumorais do melanoma face às células normais (cerca de 20 vezes mais),<sup>83</sup> faz prever que o seu alvejamento permita uma maior sensibilidade na detecção do melanoma comparativamente ao alvejamento dos receptores MC1R. Desta forma, nos últimos anos tem-se assistido à investigação de novos compostos para alvejamento da melanina, tendo em vista encontrar radiofármacos úteis para o diagnóstico ou terapia do melanoma melanótico, tal como será discutido a seguir.<sup>72,73</sup>

### 1.3.2. Sondas radioactivas para alvejamento da melanina

O desenvolvimento de sondas radioactivas para detecção do melanoma melanótico iniciou-se em finais da década de 1970. Os estudos iniciais envolveram pequenas moléculas marcadas envolvidas na síntese da melanina, seja como precursores ou falsos precursores<sup>84</sup> (e.g. tiouracilos radioiodados) ou como inibidores da enzima tirosinase (e.g.  $^{123}\text{I}$ - $\alpha$ -metiltirosina).<sup>84,85</sup> Estudos de biodistribuição em modelos animais com tumores induzidos mostraram que alguns destes compostos apresentavam uma elevada acumulação tumoral. No entanto, nenhum se mostrou adequado para uso clínico, principalmente devido a uma farmacocinética pouco favorável.

A partir dos finais da década de 1980, a investigação nesta área centrou-se essencialmente na concepção de sondas radioactivas com capacidade de se ligarem ao pigmento melanina. Para atingir este objectivo, foram estudadas diferentes classes de

compostos, desde pequenas moléculas orgânicas até compostos de maior massa molecular como péptidos e anticorpos.<sup>69</sup>

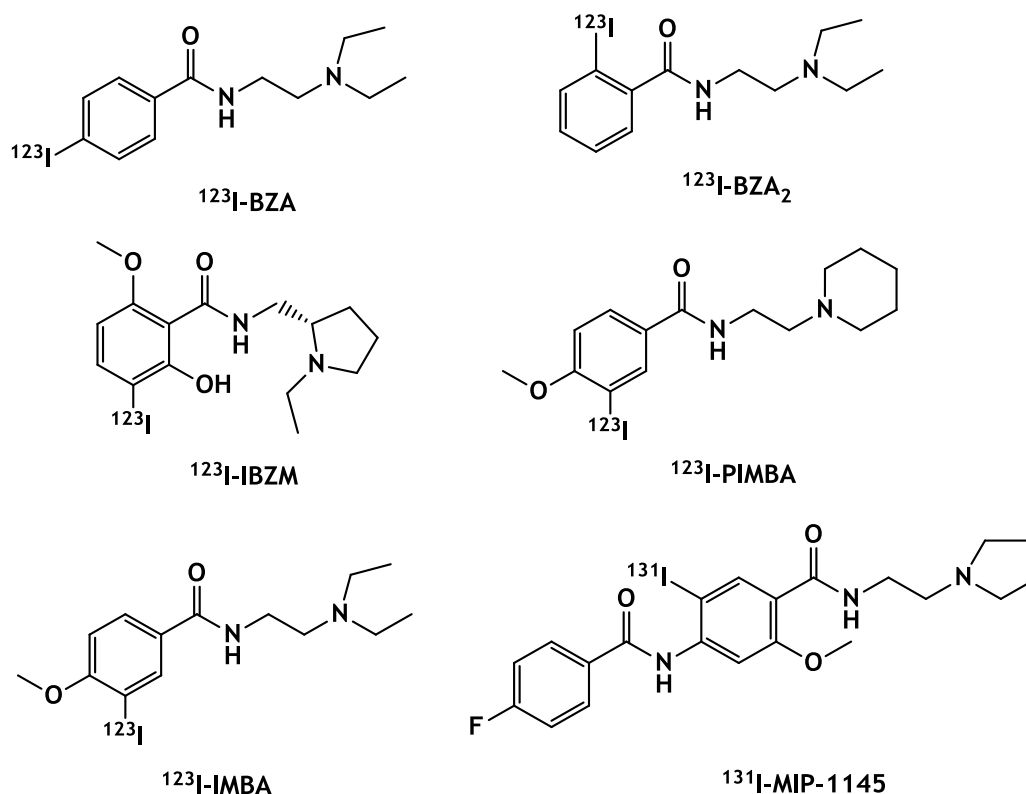
A utilização dos péptidos e anticorpos parte do pressuposto de que o melanoma é um tumor de crescimento rápido, em que a lise celular é frequente e é acompanhada da libertação da melanina para o meio extracelular. Os péptidos e os anticorpos apresentam um elevado peso molecular e não conseguem atravessar a membrana celular por difusão. Por esta razão, apenas se podem ligar à melanina extracelular e não à melanina intracelular das células normais, sendo mais adequados para desenvolver radiofármacos para terapia do melanoma melanótico e não para o seu diagnóstico precoce. Tirando partido desta estratégia, foram avaliados péptidos e anticorpos marcados com <sup>188</sup>Re para terapia do melanoma.<sup>86</sup> No entanto, a elevada retenção renal observada para alguns destes compostos limita a sua utilidade clínica.<sup>87,88,89,90</sup>

Para imagiologia das metástases e micrometástases do melanoma têm sido estudadas pequenas moléculas orgânicas que apresentem a capacidade de atravessar a membrana plasmática e com afinidade para a melanina intracelular.<sup>69,91</sup> Até à data, os melhores resultados foram obtidos com pequenas moléculas orgânicas do tipo benzamida. Como descrito a seguir, os derivados de benzamidas foram marcados com diferentes radionuclídeos (<sup>18</sup>F, <sup>123/131</sup>I e <sup>99m</sup>Tc) e foram alvo de diferentes estudos de avaliação pré-clínica em modelos animais e de ensaios clínicos em humanos.<sup>92,93</sup>

### 1.3.2.1. Derivados de Benzamidas Radiohalogenados

A utilização das benzamidas para detecção do melanoma melanótico foi descrita inicialmente na década de 90 do século XX por Moreau e seus colaboradores. Estes autores verificaram que benzamidas marcadas com <sup>125</sup>I se acumulavam no tracto uveal do olho que contém elevadas concentrações de melanina. Por essa razão, consideraram que tinham potencial interesse para detecção do melanoma.<sup>94</sup> Deste então, inúmeras benzamidas radioiodadas foram avaliadas como sondas para detecção do melanoma maligno por SPECT (figura 1.17).<sup>91,95-110</sup> Como se pode ver na figura 1.17, as benzamidas radioiodadas que têm vindo a ser estudadas apresentam uma estrutura relacionada. A maior parte das variações estruturais efectuadas incluem a introdução de diferentes substituintes no anel aromático e a utilização de diferentes amins acíclicas ou cíclicas, como sejam a N-2-dietilamina, a piperazina ou a pirrolidina. A avaliação biológica de diferentes derivados de benzamidas radioiodadas, em ratinhos C57BL/6 inoculados com células de melanoma B16, revelou captações tumorais moderadamente elevadas (5,5-6,7% da dose injectada por g (% DI/g) ao fim de 1 h pós incubação (p.i.)). Os derivados <sup>123</sup>I-BZA, <sup>123</sup>I-BZA<sub>2</sub> e <sup>123</sup>I-IBZM (figura 1.17)

foram seleccionados para ensaios clínicos em humanos. Esses ensaios clínicos mostraram que estes derivados podem detectar *in vivo* o melanoma maligno e suas metástases, com elevada sensibilidade e especificidade.<sup>97,98,105</sup>



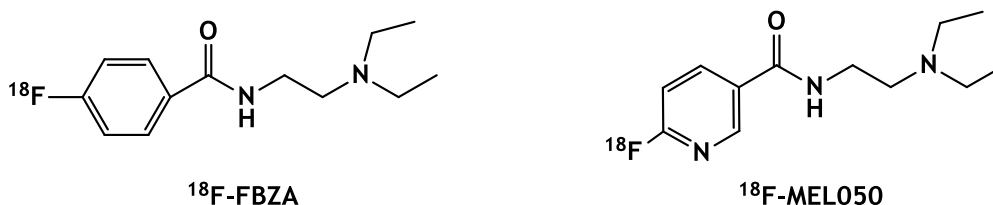
**Figura 1.17.** Exemplos de benzamidas radioiodadas para detecção ou terapia do melanoma maligno e suas metástases<sup>49,91,95,97,101,111</sup>

Inicialmente, o mecanismo envolvido na fixação de iodobenzamidas nas células tumorais do melanoma foi alvo de controvérsia. Alguns autores propuseram que a acumulação das benzamidas nestas células era devida à ligação aos receptores sigma ( $\sigma$ ) cuja função é ainda desconhecida mas que se encontram sobreexpressos em tumores como o melanoma, cancro da próstata e cancro da mama.<sup>112-114</sup> Esta hipótese teve em conta a elevada afinidade (da ordem do nanomolar) do composto <sup>123</sup>I-BZA e análogos para os receptores  $\sigma_1$ .<sup>96</sup> No entanto, foi demonstrado que a presença do composto “frio” (que também apresenta afinidade para os receptores) em concentrações crescentes conduz a um aumento da retenção tumoral, o que sugeriu o envolvimento de um mecanismo independente de receptores.<sup>98,115,116</sup> O envolvimento das benzamidas na síntese da melanina foi outra das hipóteses sugeridas para explicar a retenção tumoral destes compostos, mas tal hipótese não foi confirmada.<sup>117</sup> Estudos de espectrometria de massa por ionização secundária (SIMS) com a I-BZA demonstraram que este composto se localiza no interior das células, mais especificamente nos melanossomas, local onde a melanina é

sintetizada e armazenada, o que parece confirmar que os derivados de benzamida se acumulam nas células de melanoma devido à sua elevada afinidade para a melanina.<sup>118,119</sup> Considera-se que as benzamidas interagem com a melanina através do estabelecimento de ligações não-covalentes.<sup>70,120</sup> Devido ao carácter aniónico da melanina, esta associação é essencialmente de natureza iónica e envolve a amina terciária dos derivados de benzamidas que se encontra protonada a pH fisiológico. Esta interacção pode ainda envolver forças de van der Waals e/ou processos de transferência de carga entre os anéis aromáticos das benzamidas e os grupos indole presentes na melanina.<sup>120</sup>

Os bons resultados obtidos com as benzamidas radioiodadas levaram à investigação de compostos marcados com <sup>131</sup>I para aplicação em terapia.<sup>111,116,121</sup> Entre os compostos descritos o [<sup>131</sup>I]MIP-1145<sup>111</sup> (figura 1.17) apresentou uma rápida eliminação dos órgãos não alvo e uma retenção tumoral prolongada, resultados favoráveis para o prosseguimento para ensaios clínicos.

Mais recentemente, devido à importância crescente do PET, têm sido desenvolvidos compostos derivados das benzamidas marcados com <sup>18</sup>F (figura 1.18).<sup>110,122-125</sup> Destes compostos, há a destacar o <sup>18</sup>F-FBZA e o <sup>18</sup>F-MEL050 que apresentaram, respectivamente, captações tumorais de 5,94 e 9,3% (% DI/g, 2 h p.i.) em ratinhos C57BL/6 inoculados com células murinas de metástases pulmonares B16-F10.<sup>123,125</sup>



**Figura 1.18.** Exemplos de benzamidas radiofluoradas para detecção do melanoma maligno e metástases<sup>110,123</sup>

### 1.3.2.2. Complexos de <sup>99m</sup>Tc funcionalizados com benzamidas e derivados

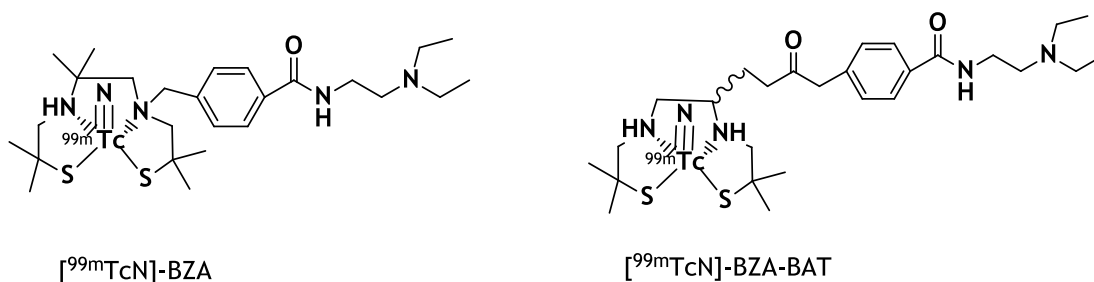
Apesar de algumas benzamidas radioiodadas apresentarem características adequadas para a detecção *in vivo* do melanoma por SPECT, o <sup>123</sup>I apresenta algumas desvantagens que limitam a sua utilização, nomeadamente os elevados custos associados à sua produção em ciclotrão. O <sup>99m</sup>Tc surge como uma alternativa devido às suas características físicas muito favoráveis para uso em SPECT, bem como à facilidade de obtenção a baixos custos. No entanto, a obtenção de complexos de <sup>99m</sup>Tc funcionalizados com benzamidas ou seus derivados para detecção *in vivo* do melanoma é mais desafiante. À partida, os complexos finais de <sup>99m</sup>Tc apresentam uma massa molecular superior às

benzamidas iodadas, o que pode dificultar a passagem dos complexos através da membrana celular, condição essencial para que se possam ligar à melanina intracelular.

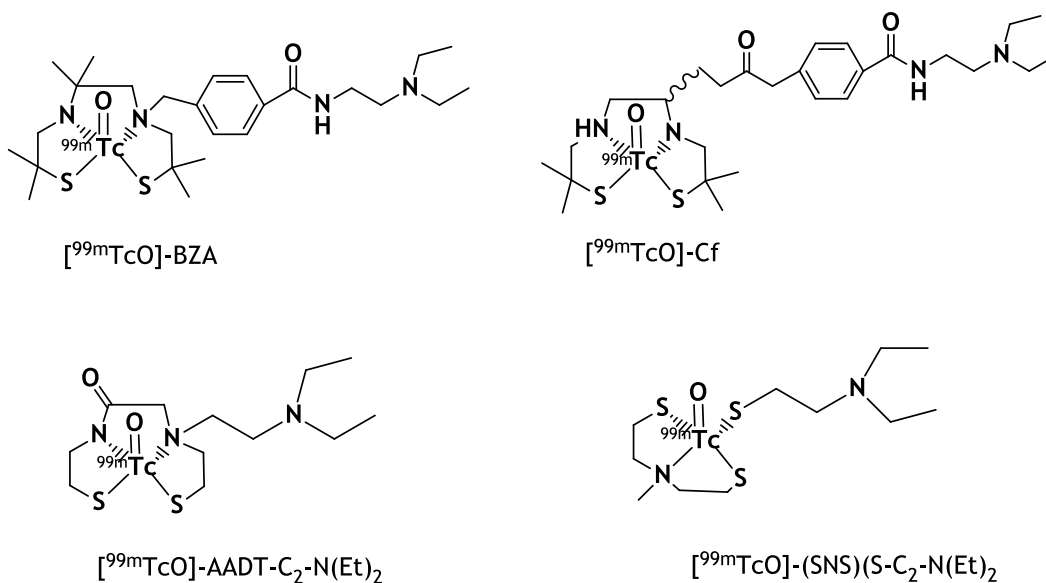
Os primeiros complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  que foram estudados como sondas radioactivas para detecção do melanoma correspondiam a nitretos de Tc(V) estabilizados por ligandos  $\text{N}_2\text{S}_2$  e funcionalizados com a unidade N-(2-dietilaminoetil)benzamida ( $[\text{}^{99m}\text{TcN}]\text{-BZA}$  e  $[\text{}^{99m}\text{TcN}]\text{-BZA-BAT}$ ) (figura 1.19).<sup>126-128</sup> Estes complexos apresentaram uma baixa afinidade para o melanoma com valores de captação tumoral relativamente baixos (0,5-1,6% DI/g em ratinhos C57BL/6 com melanoma B16). Oxocomplexos de Tc(V) contendo o mesmo tipo de ligando e o mesmo farmacóforo ( $[\text{}^{99m}\text{TcO}]\text{-BZA}$  e  $[\text{}^{99m}\text{TcO}]\text{-Cf}$ ) apresentaram uma maior captação tumoral no mesmo modelo animal, no entanto com valores consideravelmente inferiores aos apresentados pelas benzamidas radioiodadas mais promissoras.<sup>129-131</sup> Posteriormente, foi introduzido o oxocomplexo de Tc(V)  $[\text{}^{99m}\text{TcO}]\text{-AADT-C}_2\text{-N}(\text{Et})_2$ , contendo apenas a amina terminal N-(2-dietilaminoetilo), sem a porção aromática da benzamida que aparece mimetizada pelo centro metálico  $[\text{Tc=O}]^{3+}$  estabilizado pelo ligando tetradentado  $\text{N}_2\text{S}_2$ .<sup>132</sup> Até à data, o composto  $[\text{}^{99m}\text{TcO}]\text{-AADT-C}_2\text{-N}(\text{Et})_2$  foi o complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  que apresentou a melhor captação tumoral num modelo animal de melanoma (7,60% DI/g em ratinhos C57BL/6 com melanoma B16, 1 h p.i.). Foram ainda explorados outras classes de oxocomplexos de Tc(V) funcionalizados com fragmentos derivados das benzamidas, nomeadamente complexos mistos do tipo 3+1 ( $[\text{}^{99m}\text{TcO}]\text{-(SNS)}(\text{S-C}_2\text{-N}(\text{Et})_2)$ ).<sup>133,134</sup> No entanto, estes complexos mistos apresentaram um comportamento biológico menos favorável que o obtido para o complexo  $[\text{}^{99m}\text{TcO}]\text{-AADT-C}_2\text{-N}(\text{Et})_2$ .

Mais recentemente, já durante o decurso do trabalho experimental que deu origem a esta tese, Alberto e colaboradores introduziram os primeiros compostos com a unidade  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  funcionalizados com derivados de benzamidas.<sup>135</sup> Nestes compostos o anel aromático da benzamida é mimetizado pelo ciclopentadienilo que se apresenta coordenado à unidade  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  e funcionalizado com aminas terciárias cíclicas ou acíclicas. Apenas o composto contendo uma amina cíclica,  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]\text{-IBP}$  (figura 1.19), foi avaliado biologicamente *in vitro* e *in vivo*. Este composto apresentou uma elevada afinidade para a melanina bem como uma captação tumoral de 3,39% DI/g (em ratinhos C57BL/6 com melanoma B16-F1, 1 h p.i.). No entanto, apresentou uma excreção hepatobiliar com elevada captação na zona abdominal, o que é desfavorável para a sua utilização como traçador para detecção do melanoma.

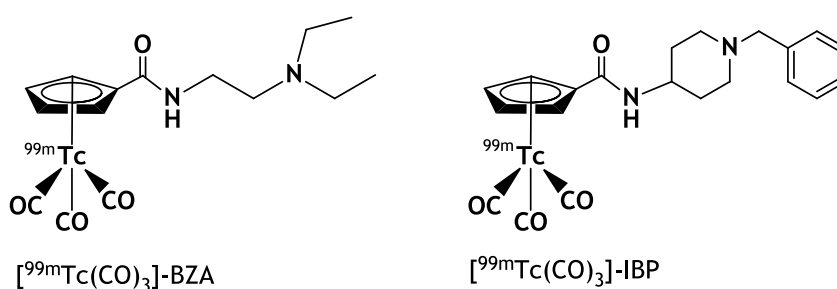
Complexos contendo a unidade  $[Tc \equiv N]^{2+}$



Complexos contendo a unidade  $[Tc=O]^{3+}$



Complexos contendo a unidade *fac*- $[Tc(CO)_3]^+$



**Figura 1.19.** Exemplos de complexos de  $^{99m}Tc$  derivados de benzamidas para detecção do melanoma maligno e suas metástases<sup>126,127,129,132,133,135</sup>

Em resumo, os resultados descritos na literatura indicam que é possível obter complexos de  $^{99m}Tc$  funcionalizados com derivados de benzamidas, ou que mimetizam este tipo de compostos, sem comprometer a sua afinidade para o melanoma. No entanto, os

complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  não conseguiram igualar os resultados obtidos com as benzamidas radioiodadas, não constituindo por isso uma melhor alternativa. Assim, pode-se considerar que a investigação de novos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  para alveijamento da melanina em células de melanoma ainda apresenta um grande interesse em química radiofarmacêutica.

#### 1.4. Catiões deslocalizados para detecção tumoral: estado da arte

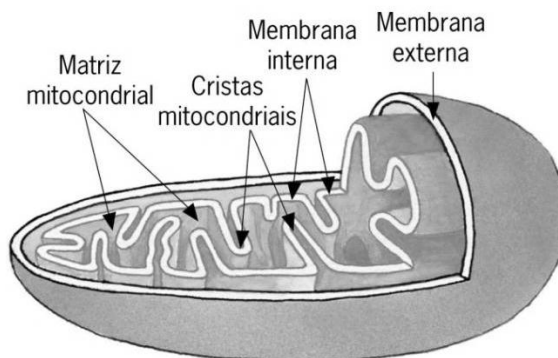
---

Os catiões lipofílicos deslocalizados são outro exemplo de pequenas moléculas que têm vindo a despertar interesse na concepção de radiofármacos para detecção tumoral. Este tipo de compostos acumula-se selectivamente nas mitocôndrias das células tumorais por estas apresentarem um potencial de membrana mitocondrial mais negativo do que as mitocôndrias das células normais, como discutido com mais detalhe a seguir. Contrariamente aos derivados das benzamidas, os catiões lipofílicos não são específicos para um determinado tipo de tumor, podendo ser vistos como traçadores “universais” para detecção tumoral, à semelhança da  $^{18}\text{F}$ -FDG.<sup>136</sup>

##### 1.4.1. Mitocôndrias e o seu papel no cancro

As mitocôndrias são organelos presentes em todas as células eucarióticas e responsáveis, em condições aeróbias, pela obtenção da maior parte da energia necessária ao funcionamento celular, sob a forma de ATP. As mitocôndrias estão presentes em grande quantidade em células do sistema nervoso (na extremidade dos axónios), do coração e do sistema muscular, uma vez que estes tecidos/orgãos apresentam uma maior necessidade de energia. Toda a actividade da mitocôndria está intimamente dependente da sua divisão em compartimentos especializados, delimitados por membranas.

Cada mitocôndria possui duas membranas, a membrana externa e a membrana interna, que delimitam dois compartimentos, o espaço intermembranar (entre as membranas externa e interna) e a matriz mitocondrial (envolvida pela membrana interna). A membrana interna tem geralmente uma superfície superior à da membrana externa uma vez que forma pregas ou cristas (figura 1.20).<sup>74</sup>



**Figura 1.20.** Estrutura da mitocôndria (adaptado de Cesar *et al*)<sup>137</sup>

A principal fonte de energia celular é a glucose, cuja degradação completa em dióxido de carbono, água e ATP ocorre em três etapas fundamentais: glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. Na fosforilação oxidativa ocorre uma série de reacções de oxidação-redução na membrana interna da mitocôndria que culminam com a redução do oxigénio a água. Em cada uma destas reacções de oxidação ocorre transferência de electrões de um estado de alta energia para um estado de baixa energia, com consequente libertação de energia para o sistema. Segundo a teoria quimiosmótica, esta energia é utilizada para bombear protões desde a matriz mitocondrial até ao espaço intermembranar criando um gradiente de protões através da membrana interna da mitocôndria. Esta distribuição desigual de protões e cargas eléctricas através da membrana mitocondrial interna (matriz mitocondrial - lado negativo; espaço intermembranar - lado positivo) origina um gradiente electroquímico transmembranar (força motriz protónica) que é utilizada para posterior síntese de ATP. A força motriz protónica que é gerada pela fosforilação oxidativa apresenta um componente químico ( $\Delta\text{pH}$ ) e um componente eléctrico. O componente eléctrico ou potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) é um indicador do estado da função bioenergética do organelo, visto que dele depende a integração adequada das diversas vias metabólicas que convergem na mitocôndria.<sup>138</sup> O  $\Delta\psi_m$  é a principal força motriz responsável pela produção do ATP via fosforilação oxidativa, pela regulação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondriais, pela formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e ainda pela redução do NAD(P)H.<sup>74</sup>

Nos últimos anos, tem vindo a ser demonstrado o papel crucial da disfunção mitocondrial em doenças tão diversas como o cancro, diabetes, doenças degenerativas, entre outras. No caso da doença oncológica, foram identificadas diferenças entre as mitocôndrias de células normais e de células tumorais, nomeadamente na actividade metabólica mitocondrial, na composição molecular da mitocôndria, no DNA mitocondrial e ainda no  $\Delta\psi_m$ .<sup>136,139,140</sup> Estas alterações são consequência da maior necessidade energética das células tumorais, bem como da sua capacidade de resistir à morte celular programada

(apoptose), processos que envolvem as mitocôndrias. Por exemplo, o valor de  $\Delta\psi_m$  é mais negativo nas células tumorais do que em células epiteliais normais.<sup>141-145</sup> Este  $\Delta\psi_m$  mais negativo é prevalente no fenótipo das células tumorais, o que torna as mitocôndrias um alvo de interesse para o desenvolvimento de radiofármacos para detecção tumoral.<sup>146</sup>

A diferença de  $\Delta\psi_m$  entre as células normais e as células tumorais foi estudada inicialmente utilizando compostos catiónicos e lipofílicos que se acumulam nas mitocôndrias.<sup>147-149</sup> Devido à sua natureza lipofílica, estes compostos, conseguem atravessar a membrana mitocondrial interna sem a assistência de ionóforos (moléculas solúveis em lípidos, que permitem transportar iões através da bicamada lipídica da membrana celular). Por outro lado, a sua carga positiva permite a acumulação mitocondrial, devido ao valor negativo de  $\Delta\psi_m$ . Nestes estudos, a diferença de  $\Delta\psi_m$  encontrada entre as células de carcinoma do cólon CX-1 e as células normais CV-1 foi de 60 mV (-163 mV nas células tumorais vs -104 mV nas células normais).<sup>143</sup> De acordo com a equação de Nernst, a diferença de 60 mV no  $\Delta\psi_m$  entre as células normais e as células tumorais é teoricamente suficiente para uma acumulação dez vezes superior dos compostos catiónicos nas mitocôndrias das células tumorais face às células normais.<sup>139,140,146,150</sup> Adicionalmente, a existência de um potencial da membrana plasmática ( $\Delta\psi_p$ ) (-30 a -60 mV) entre o interior e o exterior da célula leva também a uma acumulação das espécies catiónicas no citoplasma, aumentando a disponibilidade destas para a captação mitocondrial. O  $\Delta\psi_p$  é causado por vários factores, sendo os mais importantes o transporte dos iões através da membrana celular e a permeabilidade selectiva da membrana a esses mesmos iões.<sup>74</sup>

#### 1.4.2. Catiões deslocalizados com interesse para o desenvolvimento de sondas radioactivas

Os radiofármacos <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi e <sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmina (Figura 1.21), aprovados para uso clínico como agentes de perfusão cardíaca, são catiões lipofílicos cuja captação celular envolve uma acumulação significativa nas mitocôndrias. Por essa razão, estes complexos também se mostraram adequados para detecção de tumores, devido ao facto dos valores de  $\Delta\psi_m$  serem mais negativos nas células tumorais comparativamente às células normais, como atrás referido.<sup>151,152</sup> No entanto, a captação tumoral destes complexos pode sofrer uma redução significativa devido ao desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos (MDR), relacionada com a expressão de determinadas proteínas (e.g. glicoproteína-P (Pgp)) que promovem o seu efluxo celular.<sup>153-155</sup> A elevada captação e retenção no coração, fígado e músculos, cujas células apresentam um elevado número de

mitocôndrias, é outra desvantagem associada à utilização do  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina para detecção de tumores.

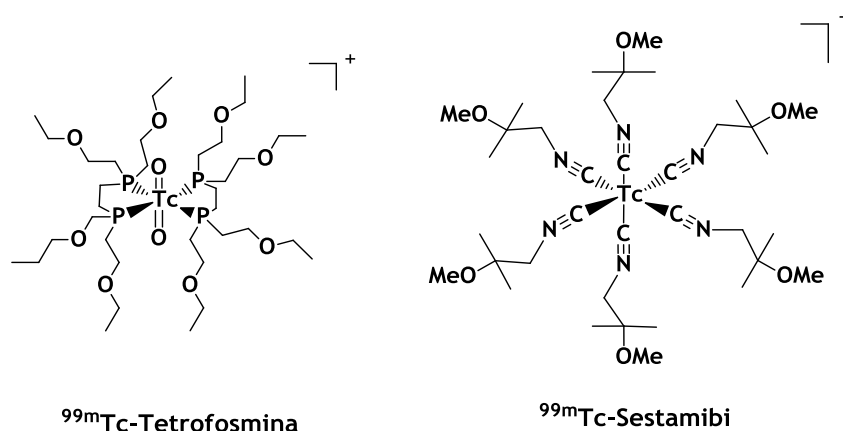


Figura 1.21. Estrutura dos complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina e  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi<sup>1</sup>

Como alternativa ao  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e à  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina, os cátions lipofílicos deslocalizados, nomeadamente os derivados de trifenilfosfônio, têm vindo a assumir uma importância crescente na concepção de sondas radioactivas dirigidas às mitocôndrias de células tumorais. O tetrafenilfosfônio (TPP) ou o metiltrifenilfosfônio (TPMP) (figura 1.22) são exemplos de compostos utilizados para esse fim, tendo sido marcados com diferentes radionuclídeos ( $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  e  $^{99m}\text{Tc}$ ) úteis para PET ou SPECT.<sup>136,156</sup>

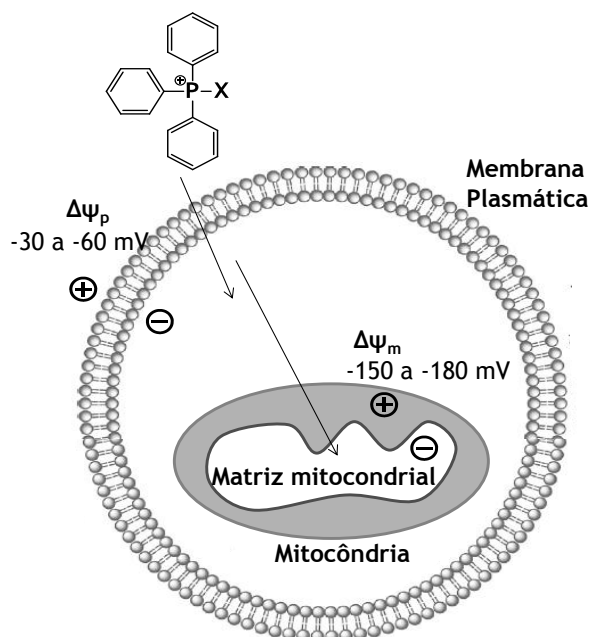
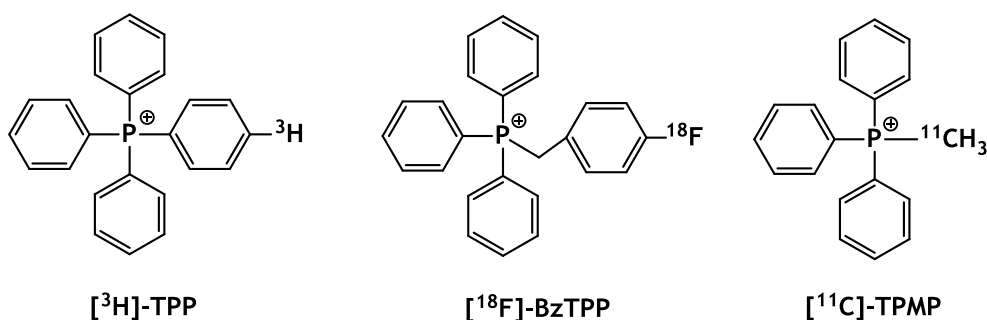


Figura 1.22. Representação esquemática da captação dos cátions derivados do trifenilfosfônio pela mitocôndria (adaptado de Zhou *et al*)<sup>157</sup>

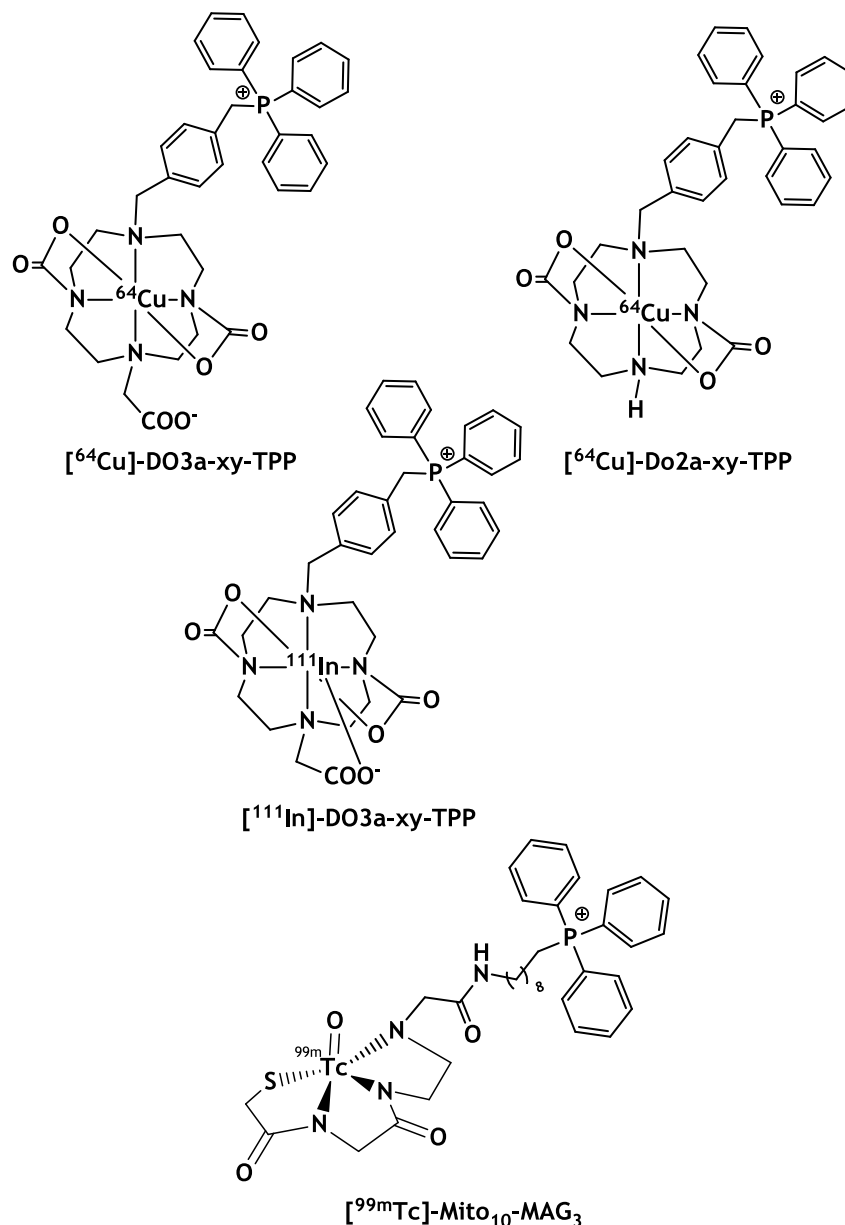
Os primeiros estudos para avaliar o potencial interesse de cátions lipofílicos deslocalizados no desenvolvimento de radiofármacos para detecção tumoral envolveram o composto  $^3\text{H}$ -tetrafenilfosfónio ( $^3\text{H}$ -TPP) (figura 1.23).<sup>158-160</sup> Este composto permitiu realizar estudos de biodistribuição em modelos animais, mas não tem interesse como radiofármaco, uma vez que o trítio é um emissor  $\beta^-$  de baixa energia e com um período de semi-vida longo ( $t_{1/2} = 12,3$  a). Estudos de biodistribuição do  $^3\text{H}$ -TPP em ratinhos normais e ratinhos com tumores induzidos mostraram que este composto apresenta uma captação tumoral superior à do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi no mesmo modelo animal.<sup>160</sup> Estes resultados motivaram o estudo subsequente de sais de fosfónio marcados com  $^{11}\text{C}$  ou  $^{18}\text{F}$ , tendo sido sintetizados e avaliados biologicamente os compostos  $^{11}\text{C}$ -trifenilmetilfosfónio ( $^{11}\text{C}$ -TPMP)<sup>161,162</sup> e 4-( $^{18}\text{F}$ -benzil) trifenilfosfónio ( $^{18}\text{F}$ -BzTPP) (figura 1.23)<sup>163-165</sup> Estudos de biodistribuição do composto radiofluorado  $^{18}\text{F}$ -FBzTPP em ratinhos com tumores induzidos mostraram uma baixa captação tumoral e uma acumulação considerável de radioactividade no fígado e coração. Estes dados indicaram que o composto  $^{18}\text{F}$ -FBzTPP não é promissor como radiofármaco para detecção de tumores por PET.<sup>166</sup>



**Figura 1.23.** Exemplos de sondas radioactivas derivadas dos cátions fosfónio, para detecção tumoral<sup>158,162,165</sup>

Mais recentemente, Liu e colaboradores introduziram e avaliaram biologicamente uma série de complexos de  $^{64}\text{Cu}$  funcionalizados com cátions trifenilfosfónio (figura 1.24).<sup>157,167-170</sup> Comparativamente aos radiofármacos  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetrofosmina, os complexos de  $^{64}\text{Cu}$  apresentaram uma captação mais selectiva pelas mitocôndrias das células tumorais em ratinhos atímicos com gliomas, com razões superiores tumor/coração.<sup>168</sup> Contudo, ainda apresentam fixações relativamente elevadas no fígado e no coração. A avaliação biológica de complexos de  $^{111}\text{In}$  análogos (Fig. 1.24) mostrou que apresentam uma captação tumoral similar. No entanto, a selectividade tumoral dos complexos de índio face a tecidos com elevado número de mitocôndrias como o coração, é menor que a dos complexos congéneres de  $^{64}\text{Cu}$ .<sup>157,167</sup> Segundo os autores, estes resultados

reflectem o carácter mais hidrofílico dos complexos de  $^{64}\text{Cu}$  ( $\log P = -1,0$  a  $-3,0$ ). Este carácter hidrofílico faz com que os complexos de  $^{64}\text{Cu}$  apresentem uma maior dificuldade em atravessar a membrana mitocondrial, localizando-se preferencialmente nas mitocôndrias das células tumorais que apresentam um valor superior de  $\Delta\psi_m$  comparativamente às células normais.<sup>169</sup>



**Figura 1.24.** Exemplos de complexos utilizados como sondas radioactivas derivadas dos cations fosfônio, para detecção tumoral<sup>167-169,171</sup>

O único exemplo de um complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  funcionalizado com derivados do trifenilfosfônio foi descrito apenas recentemente.<sup>171</sup> Trata-se do oxo-complexo de Tc(V) [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-Mito<sub>10</sub>-MAG<sub>3</sub> (figura 1.24) cujo interesse para a imagiologia do cancro foi avaliado

utilizando ratinhos com cancro da mama, induzido quimicamente com 7,12-dimetilbenzil- $\alpha$ -antraceno (DMBA). Este complexo apresentou uma captação tumoral relativamente baixa, que diminui ao longo do tempo, devido muito provavelmente ao seu efluxo, mediado por proteínas como a Pgp.

O estudo de complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  funcionalizados com derivados do trifenilfosfónio como sondas radioactivas para detecção de tumores por SPECT permanece uma área de investigação pouco explorada. No entanto, a investigação desta classe de compostos poderá ter grande impacto ao nível da oncologia nuclear, tendo em conta a importância das mitocôndrias no fenótipo tumoral e as características físicas muito favoráveis do  $^{99m}\text{Tc}$  como radionuclídeo para imagiologia por SPECT.

### 1.5. Objectivo do trabalho

---

As técnicas nucleares de imagem oferecem a possibilidade de detectar alterações a nível molecular e celular, implicadas no metabolismo do cancro. A detecção dessas alterações envolve o alvejamento de receptores, enzimas ou genes, pigmentos como a melanina, ou organelos como as mitocôndrias. Alguns desses alvos (e.g. mitocôndrias) são comuns à maior parte dos tumores e estão envolvidos em processos como a proliferação celular, apoptose, hipóxia e angiogénese. Outros alvos (e.g. melanina) podem ser mais específicos e dizem respeito apenas a determinadas classes de tumores. Muitos desses alvos localizam-se no interior das células, o que faz com que a captação celular dos radiofármacos deva ocorrer preferencialmente por difusão.

A melanina presente nas células do melanoma maligno ou as mitocôndrias das células tumorais são alguns exemplos de alvos intracelulares com relevância clínica, para os quais é necessário desenvolver radiofármacos específicos com capacidade de se difundir através da membrana celular. No caso dos metais de transição Tc e Re, a concepção de radiofármacos com estas características requer o acoplamento de fragmentos biologicamente activos a quelatos de massa molecular reduzida e com propriedades físico-químicas adequadas. Tal deve ser feito sem comprometer a actividade biológica dos conjugados resultantes, o que pode ser bastante desafiante pois é condicionado pelo balanço de um conjunto de factores, como a lipofilia, topologia, massa molecular e carga dos compostos.

O trabalho apresentado nesta tese tinha como principal objectivo a síntese, caracterização e avaliação biológica de complexos com a unidade  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  estabilizados por ligandos bifuncionais funcionalizados com pequenas moléculas capazes de conduzir a uma acumulação preferencial dos complexos em células do melanoma maligno.

De modo a atingir este objectivo, numa primeira fase pretendia-se explorar a química/radioquímica de novos complexos tricarbonilo de Re(I) e Tc(I) estabilizados preferencialmente por ligandos derivados do pirazolo e funcionalizados com derivados de benzamidas. Esperava-se obter complexos com afinidade para a melanina e relevantes para a concepção de radiofármacos para detecção do melanoma melanótico. Posteriormente e utilizando o mesmo tipo de ligandos, pretendia-se explorar novos complexos de  $^{99m}\text{Tc(I)}$  funcionalizados com sais de trifenilfosfónio e com capacidade para se acumular nas mitocôndrias das células tumorais, nomeadamente do melanoma, devido à alteração do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). Para atingir estes objectivos, o trabalho desenvolvido envolveu os seguintes passos:

1. Síntese e caracterização de ligandos bifuncionais tridentados contendo derivados de benzamidas ou catiões do tipo trifenilfosfónio;
2. Síntese e caracterização dos complexos com a unidade  $fac\text{-}[M(\text{CO})_3]^+$  ( $M = \text{Re}, ^{99m}\text{Tc}$ ) contendo derivados de benzamidas ou catiões do tipo trifenilfosfónio;
3. Avaliação biológica (*in vitro* e *in vivo*) dos complexos correspondentes de  $^{99m}\text{Tc(I)}$ .

Ao longo dos capítulos 2 e 3 desta tese será descrita a síntese, caracterização e avaliação biológica dos complexos de Re(I) e  $^{99m}\text{Tc(I)}$  funcionalizados com derivados de benzamidas. No capítulo 4, descrevem-se os complexos congéneres funcionalizados com catiões lipofílicos deslocalizados do tipo trifenilfosfónio. No capítulo 6, são dados os detalhes experimentais sobre todos os procedimentos e técnicas utilizadas.



# Capítulo 2

---

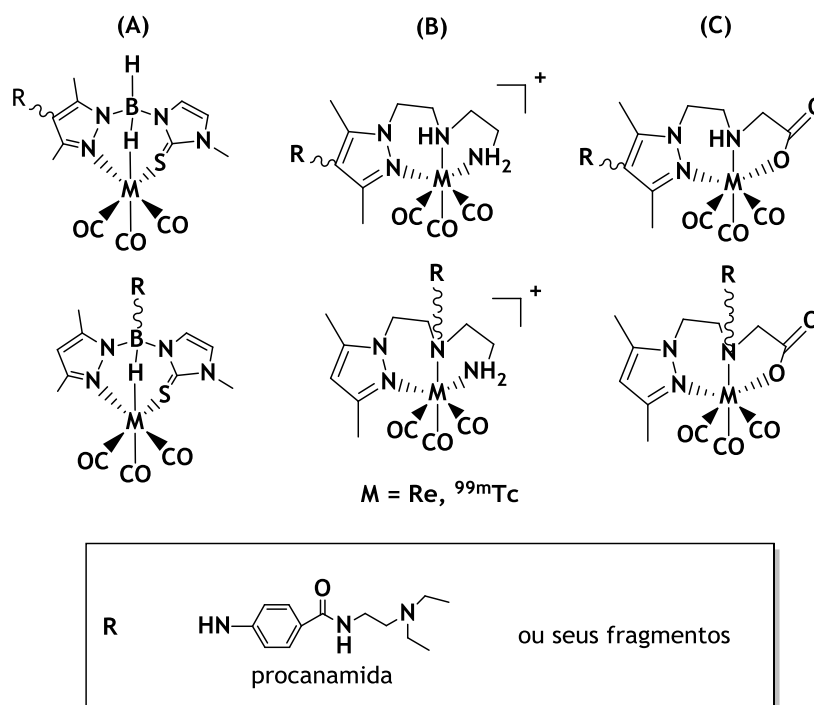
Complexos de Tc(I)/Re(I) com  
ligandos derivados do pirazolo e  
funcionalizados com benzamidas ou  
seus fragmentos



## 2. Complexos de Tc(I)/Re(I) com ligandos derivados do pirazolo e funcionalizados com benzamidas ou seus fragmentos

### 2.1. Introdução

Como mencionado no capítulo anterior, a carga, peso molecular, topologia ou lipofilia são propriedades físico-químicas que podem ser determinantes para a capacidade dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  atravessarem a membrana celular e atingirem a melanina localizada a nível intracelular, um requisito essencial para a sua utilização como sondas radioactivas para detecção *in vivo* do melanoma melanótico. Esperando otimizar estas características físico-químicas, decidimos estudar complexos tricarbonilo de Re(I) e  $^{99m}\text{Tc}$ (I) com três classes de ligandos bifuncionais: boratos de bis(azolilo) mistos contendo anéis de mercaptoimidazolilo e pirazolilo como funções coordenantes (A); compostos do tipo pirazolo-diamina (B); compostos do tipo pirazolo-aminocarboxílico (figura 2.1).



**Figura 2.1.** Estrutura dos complexos de Re/ $^{99m}\text{Tc}$  com ligandos do tipo boratos de bis(azolilo) (A), pirazolo-diamina (B) ou do tipo pirazolo-aminocarboxílico (C) que se pretendiam funcionalizar com pequenas moléculas com afinidade para a melanina

Os ligandos bifuncionais que pretendíamos explorar são potencialmente tridentados e apresentam como característica comum a presença de um anel de pirazolilo como função coordenante (figura 2.1). Aproveitando a estrutura química versátil destes ligandos, pretendia-se proceder à sua funcionalização com derivados de benzamida (procanamida) ou seus fragmentos.<sup>132</sup> A funcionalização com estas pequenas moléculas deveria conferir aos respectivos complexos de Re/<sup>99m</sup>Tc afinidade para a melanina.<sup>91,95-107,116,120,126-135,172</sup> Preferencialmente, esta funcionalização deveria ser efectuada através do átomo de boro ou da amina central e/ou através da posição 4 do anel de pirazolo. No caso da funcionalização através do anel de pirazolilo, esperava-se que essa funcionalização pudesse envolver intermediários e estratégias de síntese comuns para os diferentes tipos de ligandos (A-C).

Os compostos do tipo pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxílico já haviam sido explorados pelo grupo de Ciências Radiofarmacêuticas (GCR) do ITN como ligandos bifuncionais para estabilizar a unidade *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M = Re, <sup>99m</sup>Tc) e para funcionalização com diferentes biomoléculas.<sup>55,60</sup> Entre essas biomoléculas podem mencionar-se pequenos péptidos (e.g. análogos de bombesina<sup>52</sup>, péptidos contendo a sequência RGD<sup>59</sup> ou análogos peptídicos da hormona  $\alpha$ -MSH<sup>173</sup>) e quinazolinas<sup>55</sup> (pequenas moléculas orgânicas que actuam como inibidores do EGFR-TK). Os biocomplexos resultantes apresentaram em geral uma elevada estabilidade, tanto *in vitro* como *in vivo*, bem como um perfil biológico relativamente favorável, particularmente no que respeita à taxa de excreção que foi em geral relativamente elevada.<sup>51,54</sup> Estes resultados deixaram-nos antever que os ligandos do tipo pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxílico apresentavam os requisitos necessários para ser utilizados na concepção de sondas radioactivas para detecção do melanoma melanótico com base em complexos organometálicos de Re(I)/<sup>99m</sup>Tc(I).

Pelo contrário, não se encontravam descritos complexos de Re ou Tc com boratos de bis(azolilo) contendo anéis de pirazolilo e mercaptoimidazolilo como funções coordenantes. Considerámos que este tipo de compostos deveriam actuar como ligandos tridentados e tripodais, capazes de estabilizar a unidade *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M = <sup>99m</sup>Tc, Re) através da coordenação dos dois anéis de azolilo e do estabelecimento de uma ligação B-H...M (figura 2.1 A). Os complexos resultantes, *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>], seriam de baixo peso molecular e com carácter lipofílico. Devido a estas características, esperava-se que fossem adequados para conceber radiofármacos específicos para detecção do melanoma melanótico, mediante funcionalização com pequenas moléculas adequadas (figura 2.1 A).

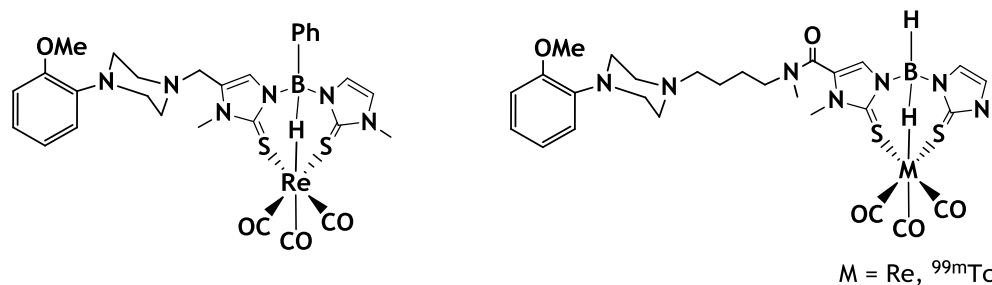
Na primeira parte deste capítulo descreve-se a síntese, caracterização e avaliação biológica de complexos modelo do tipo  $fac-[M\{\kappa^3-H(\mu-H)B(tim^{Me})(pz^*)\}(CO)_3]$  ( $M = Re, ^{99m}Tc$ ). Com estes estudos, pretendia-se verificar se apresentavam as características adequadas para posterior funcionalização com pequenas biomoléculas, tendo em vista a concepção de sondas radioactivas para detecção do melanoma melanótico por SPECT.

Na segunda parte do capítulo, serão descritos a síntese e caracterização de ligandos bifuncionais do tipo pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxílico funcionalizados com derivados de benzamidas, através da amina central e da posição 4 do anel de pirazolo (figura 2.1). Descreve-se também a síntese e caracterização dos respectivos complexos tricarbonilo de  $^{99m}Tc(I)/Re(I)$ . No caso dos complexos de  $^{99m}Tc$  serão ainda apresentados os resultados de estudos *in vitro* (estabilidade e ligação à melanina), estudos de captação celular em células do melanoma murino B16-F1 e estudos de biodistribuição em ratinhos com melanoma induzido.

## 2.2. Síntese e caracterização dos complexos de tricarbonilo de $Re(I)/^{99m}Tc(I)$ com boratos de bis(azolilo) assimétricos

---

Desde a sua descoberta em 1967 por Trofimenko, os boratos de poli(azolilo) constituem uma das classes de ligandos mais importantes da química de coordenação e organometálica, tendo sido utilizados para obter complexos com praticamente todos os metais e metalóides da Tabela Periódica.<sup>63,174-179</sup> Neste contexto, o grupo de Ciências Radiofarmacêuticas (GCR) do ITN demonstrou que os boratos de poli(mercaptoimidazolilo) apresentam os requisitos necessários para ser utilizados no desenvolvimento de radiofármacos específicos de  $^{99m}Tc$ .<sup>46,48</sup> Em particular, os boratos de bis(mercaptoimidazolilo) formam complexos do tipo  $fac-[M\{\kappa^3-H(\mu-H)B(tim^{BM})(tim^{Me})\}(CO)_3]$  ( $M=Re, ^{99m}Tc$ ;  $BM =$  biomolécula) que podem ser obtidos em meio aquoso e representaram os primeiros exemplos de complexos de  $^{99m}Tc$  contendo uma ligação  $B-H...Tc$ . Estes complexos são estáveis em meio fisiológico, mantendo-se o átomo de hidrogénio coordenado ao centro metálico mesmo na presença de um grande excesso de cloreto ou outros aniões coordenantes. No que respeita à sua aplicação na concepção de radiofármacos específicos, este tipo de complexos foram funcionalizados com antagonistas dos receptores serotoninérgicos  $5-HT_{1A}$  do Sistema Nervoso Central (SNC) com o objectivo de obter sondas radioactivas para visualização desse tipo de receptores por SPECT (figura 2.2).<sup>53,61</sup>



**Figura 2.2.** Exemplos de boratos de bis(mercaptoimidazolilo) funcionalizados com farmacóforos derivados da piperazina para visualização dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>

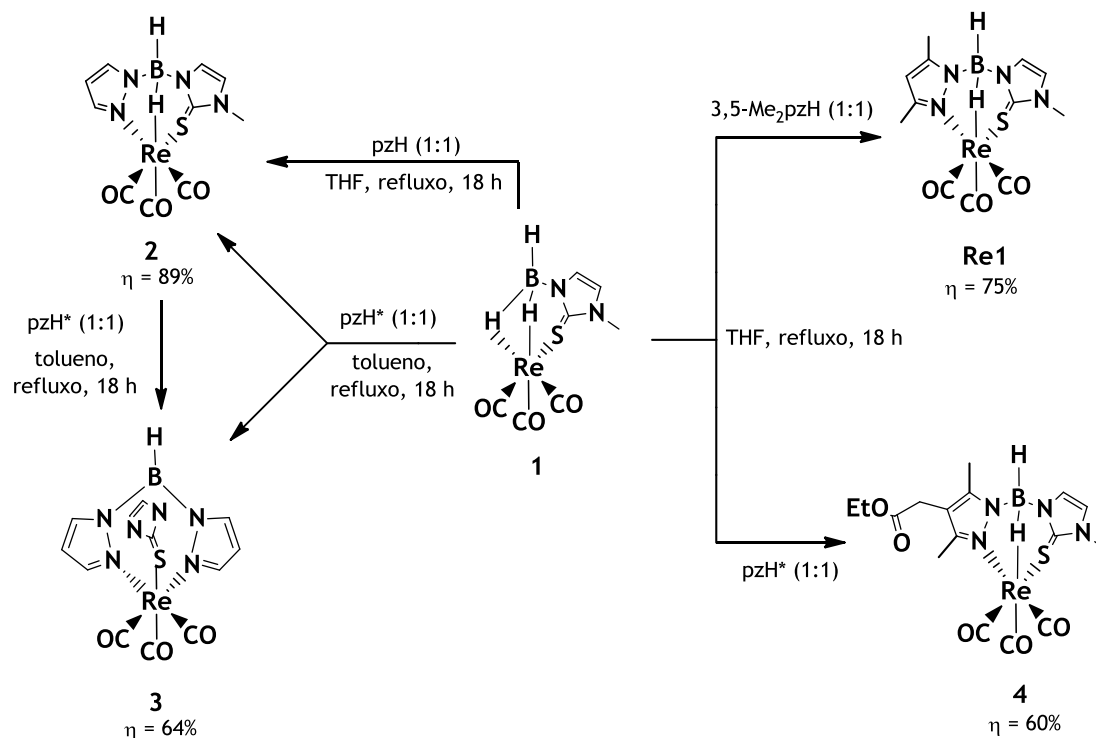
Contrariamente aos boratos de bis(mercaptoimidazolilo), os boratos de bis(pirazolilo) não se mostraram adequados para estabilizar a unidade  $fac-[M(CO)_3]^+$  (M = Re, Tc), independentemente das condições reaccionais (e.g. uso de solvente orgânico ou de meio aquoso) e precursores metálicos utilizados. Em meio aquoso, verificou-se que os boratos de bis(pirazolilo) sofriam facilmente reacções de hidrólise e/ou de desboronação, não se tendo mostrado adequados para ser explorados no desenvolvimento de radiofármacos com base na aproximação organometálica.<sup>53</sup> As razões que explicam as diferenças encontradas para a química e radioquímica de complexos contendo a unidade  $fac-[M(CO)_3]^+$  (M = Re, <sup>99m</sup>Tc) e estabilizados por boratos de bis(mercaptoimidazolilo) ou boratos de bis(pirazolilo) não foram completamente esclarecidas. Provavelmente, essas diferenças reflectem a maior flexibilidade e o carácter mais macio dos ligandos doadores de enxofre. Assim, decidimos avaliar se a combinação de um grupo mercaptoimidazolilo e de um grupo pirazolilo conduziria a boratos de bis(azolilo) mistos com capacidade para estabilizar complexos tricarbonilo de Re(I)/Tc(I). Como atrás mencionado, este estudo tinha como principal objectivo verificar se este tipo de complexos apresentavam potencial para ser explorados na concepção de sondas radioactivas para detecção do melanoma melanótico e suas metástases.

A síntese de boratos de bis(azolilo) mistos, efectuada usualmente por reacção do NaBH<sub>4</sub> com os azolos apropriados, pode ser uma tarefa exigente na medida em que pode conduzir a uma mistura de compostos, devido à formação simultânea dos ligandos simétricos, exigindo processos de purificação difíceis e morosos. De modo a contornar estas dificuldades, decidimos avaliar inicialmente a possibilidade de obter complexos  $fac-[Re\{\kappa^3-H(\mu-H)B(tim^{Me})(pz^*)\}(CO)_3]$  por reacção de  $fac-[Re\{\kappa^3-H(\mu-H)_2B(tim^{Me})\}(CO)_3]$ <sup>47</sup> (1), previamente descrito pelo nosso grupo, com os pirazolos adequados. Ao optar por esta estratégia, tivemos em conta que a ligação Re...B-H do complexo 1 pode ser facilmente quebrada por diferentes substratos, originando complexos mistos do tipo  $fac-[Re\{\kappa^3-H_2(\mu-H)B(tim^{Me})(L)\}(CO)_3]$  (L= PPh<sub>3</sub>, <sup>t</sup>BuNC, EtOOCCH<sub>2</sub>NC).<sup>180</sup> Na hipótese de se formarem os

complexos pretendidos do tipo  $fac-[Re\{\kappa^3-H(\mu-H)B(tim^{Me})(pz^*)\}(CO)_3]$ , proceder-se-ia seguidamente à síntese dos respectivos boratos de bis(azolilo) mistos de modo a estudar a possibilidade de sintetizar os complexos em meio aquoso, usando os materiais de partida  $fac-[M(H_2O)_3(CO)_3]^+$  ( $M = Re, {}^{99m}Tc$ ) relevantes para a preparação de radiofármacos com base na aproximação tricarbonilo.

### 2.2.1. Síntese e caracterização dos complexos de Re(I)

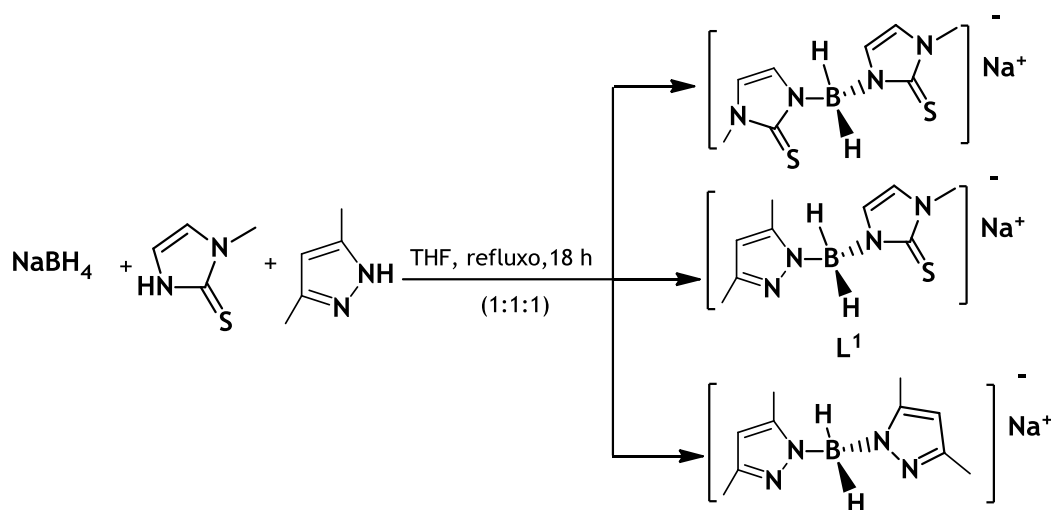
Estudaram-se reacções de  $fac-[Re\{\kappa^3-H(\mu-H)_2B(tim^{Me})\}(CO)_3]$ <sup>47</sup> (**1**) com o pirazolo, o 3,5-dimetilpirazolo e ainda com o composto 3,5-Me<sub>2</sub>-4-EtOOCCH<sub>2</sub>-pzH que apresenta uma função éster na posição 4 do anel, a posição que pretendíamos utilizar para a posterior funcionalização com pequenas moléculas. Como indicado no esquema 2.1, a reacção do complexo **1** com o pirazolo foi inicialmente estudada em tolueno, à temperatura de refluxo e utilizando uma razão molar 1:1 dos reagentes. No entanto, nestas condições ocorreu a formação de uma mistura do complexo pretendido  $fac-[Re\{\kappa^3-H(\mu-H)B(tim^{Me})(pz)\}(CO)_3]$  (**2**) e do complexo  $fac-[Re\{\kappa^3-HB(tim^{Me})(pz)_2\}(CO)_3]$  (**3**). Considerámos que a formação do complexo **3** devia envolver a reacção de **2** com pzH. Para confirmar, esta hipótese fez-se reagir **2**, após a sua purificação, com o pirazolo à temperatura de refluxo do tolueno. Verificámos que esta reacção leva à formação praticamente quantitativa do complexo **3**.



Esquema 2.1. Síntese dos complexos de rénio do tipo  $fac-[Re\{\kappa^3-H(\mu-H)B(tim^{Me})(pz)\}(CO)_3]$

Na medida em que a formação de **3** a partir de **2** é certamente um processo mais activado do que a formação de **2** a partir de **1**, decidimos estudar a reacção de **2** com pirazolo a uma temperatura inferior, utilizando THF sob refluxo, de modo a aumentar a selectividade da reacção. Em THF sob refluxo, a reacção de **1** com o pirazolo levou unicamente à formação do complexo **2**, garantindo-se assim a selectividade pretendida. Nas mesmas condições, a reacção de **1** com 3,5-Me<sub>2</sub>-pzH e 3,5-Me<sub>2</sub>-4-EtOOCCH<sub>2</sub>-pzH também conduziu quase exclusivamente à formação dos complexos **Re1** e **4**, sem se ter detectado a presença de complexos com borato de tris(azolilo) análogos ao composto **3**. Após purificação, os complexos **2-4** e **Re1** foram obtidos com rendimentos moderados entre 60-89%. Os complexos **Re1**, **2** e **4** são os primeiros exemplos de complexos de metais de transição com boratos de bis(azolilo) que contêm anéis de 2-mercaptoimidazolilo e de pirazolilo como grupos coordenantes.

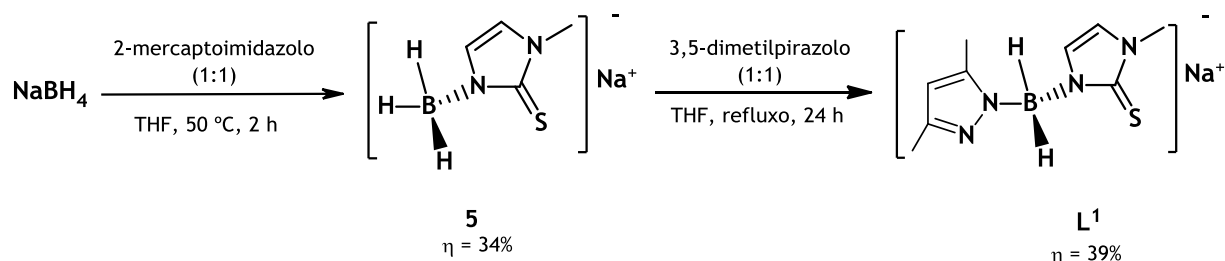
Tendo em conta que confirmámos que era possível sintetizar complexos do tipo *fac*-[Re{κ<sup>3</sup>-H(μ-H)B(tim<sup>Me</sup>)(pz)}(CO)<sub>3</sub>], avançámos com o estudo da síntese do complexo **Re1** por reacção do precursor *fac*-[Re(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> com o composto Na[H<sub>2</sub>B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>pz)] (**L**<sup>1</sup>). Para tal, foi necessário proceder à síntese de **L**<sup>1</sup>. Inicialmente, a síntese de **L**<sup>1</sup> foi tentada por reacção do NaBH<sub>4</sub> com quantidades equimolares de 3,5-dimetilpirazolo e 2-mercapto-1-metilimidazolo, em THF à temperatura de refluxo. No entanto, como indicado no esquema 2.2, obteve-se uma mistura de compostos da qual nunca se conseguiu obter **L**<sup>1</sup> na forma pura.



**Esquema 2.2.** Compostos resultantes da reacção entre o NaBH<sub>4</sub> e quantidades equimolares de 3,5-dimetilpirazolo e 2-mercaptometilimidazolo

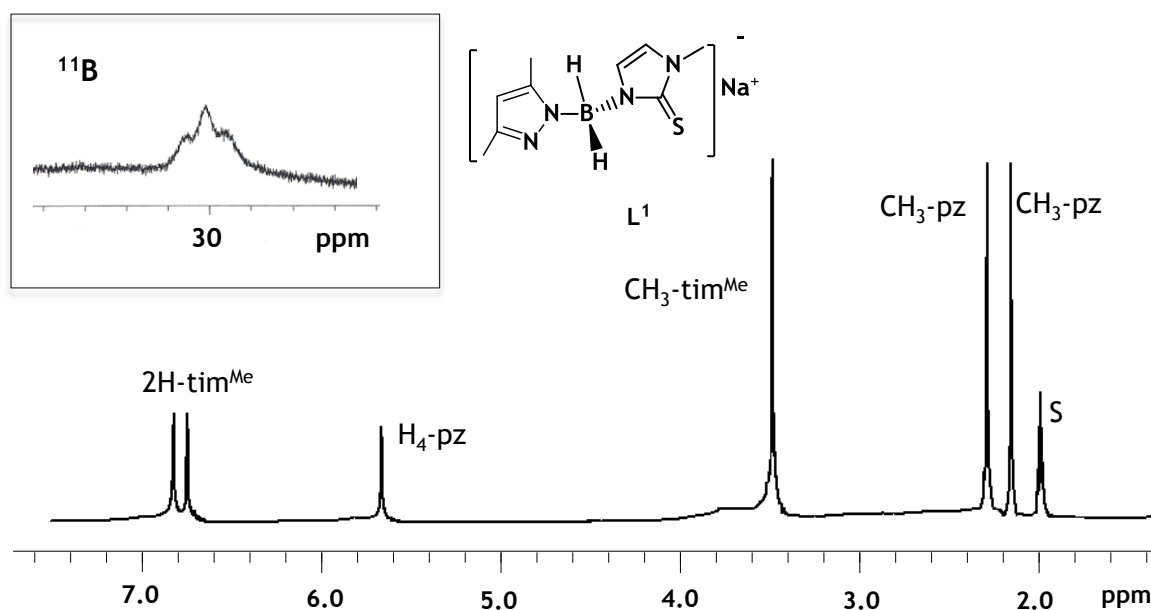
Tendo em conta as dificuldades encontradas, a síntese de **L**<sup>1</sup> foi estudada alternativamente por reacção de Na[H<sub>3</sub>B(tim<sup>Me</sup>)] (**5**),<sup>47</sup> já descrito na literatura, com 3,5-

dimetilpirazolo. Como indicado no esquema 2.3, esta reacção levou à formação do composto pretendido,  $L^1$ , que foi obtido com um rendimento global de 13% após purificação por recristalizações sucessivas em THF/n-hexano.



**Esquema 2.3.** Síntese do ligando  $\text{Na}[\text{H}_2\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(\text{3,5-Me}_2\text{pz})]$  ( $L^1$ )

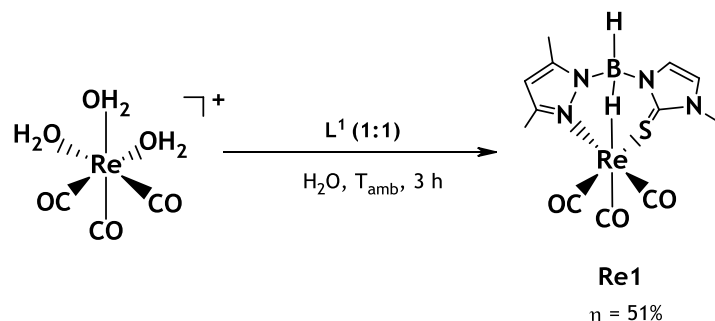
$L^1$  é um sólido branco, higroscópico e solúvel em solventes orgânicos polares e  $\text{H}_2\text{O}$ . A caracterização de  $L^1$  envolveu os métodos analíticos usuais, entre os quais IV, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{11}\text{B}$ , ESI-MS e análise elementar, que confirmaram a estrutura molecular do composto. Como exemplo, apresentam-se na figura 2.3 os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{11}\text{B}$  de  $L^1$ .



**Figura 2.3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (com inserção do espectro de  $^{11}\text{B}$ ) do composto  $L^1$  em  $\text{CD}_3\text{CN}$  (S - solvente)

Como atrás referido, foi avaliada a capacidade de coordenação de  $L^1$  face à unidade  $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ , em condições aquosas. Para tal fez-se reagir  $L^1$  com o precursor  $\text{fac-}[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$  numa relação molar de 1:1 em  $\text{H}_2\text{O}$  à temperatura ambiente (esquema 2.4). Observou-se a formação de um precipitado branco correspondente a **Re1** que foi

separado da mistura reaccional por centrifugação. A purificação de **Re1** foi efectuada por cromatografia em coluna de sílica-gel que permitiu obter o composto na forma pura com um rendimento de 51%.



**Esquema 2.4.** Síntese do complexo *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>pz)}](CO)<sub>3</sub>] (**Re1**)

Tal como os complexos **2-4**, cuja síntese foi atrás descrita, **Re1** é solúvel em solventes orgânicos polares e é estável tanto no estado sólido como em solução, mesmo na presença de ar. A caracterização química destes complexos envolveu a análise elementar, as técnicas espectroscópicas usuais (IV e RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e <sup>11</sup>B) e a difracção de raios-X.

Os monocristais utilizados na análise por difracção de raio-X de cristal único dos complexos **2-4** foram obtidos por recristalização de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/n-hexano, enquanto os monocristais de **Re1** foram obtidos por evaporação lenta de uma solução saturada do composto em CH<sub>3</sub>CN. Nas figuras 2.4-2.7 encontram-se representadas as estruturas moleculares obtidas para os complexos **2-4** e **Re1** e nas tabelas 2.1-2.4 apresentam-se os comprimentos e ângulos de ligação mais significativos.

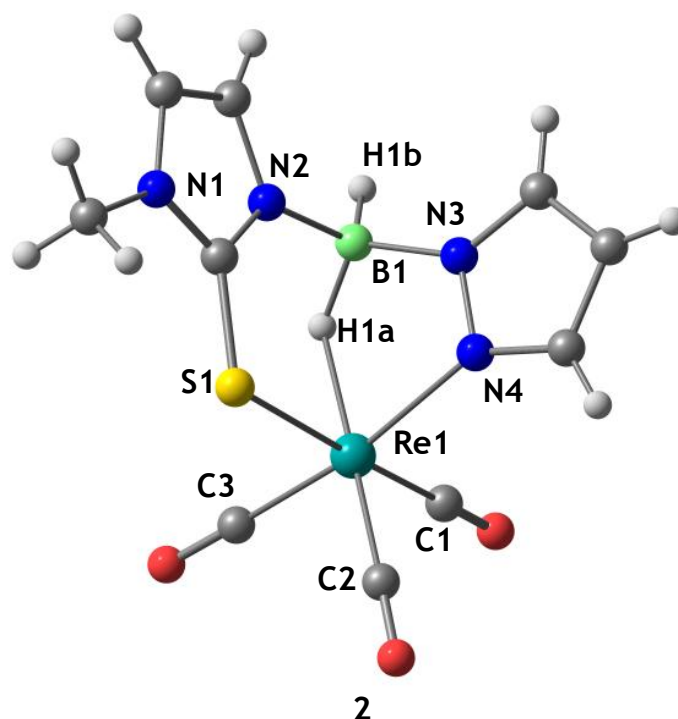
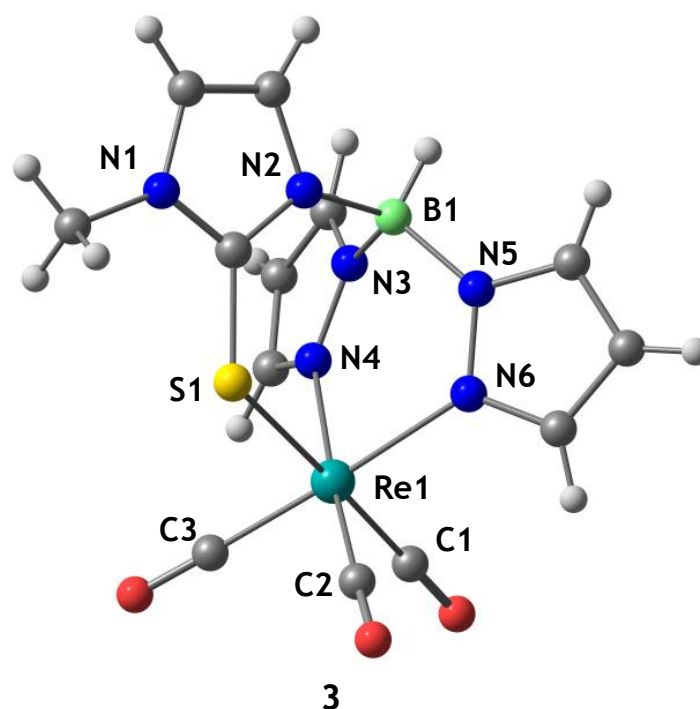


Figura 2.4. Estrutura do complexo 2

Tabela 2.1. Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação mais significativos para o complexo 2

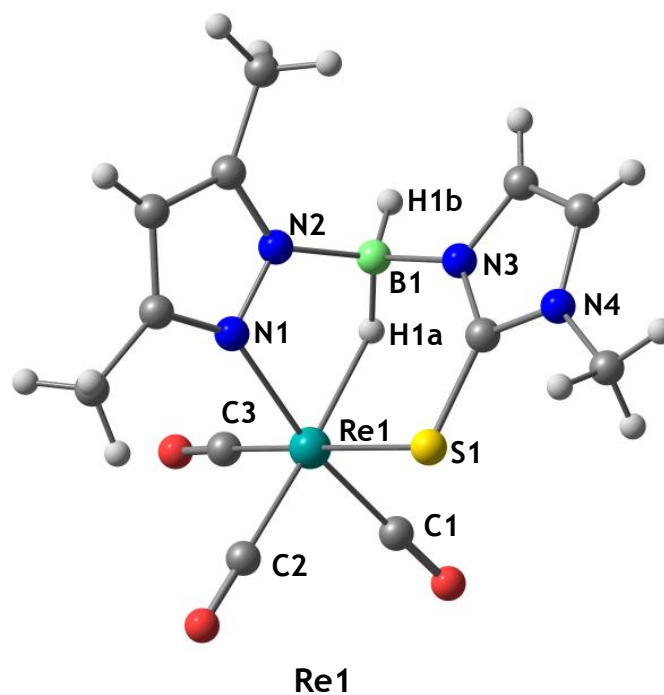
Comprimentos de ligação			
Re(1)-C(2)	1,913 (3)	Re(1)-N(4)	2,169(2)
Re(1)-C(1)	1,930 (3)	Re(1)-S(1)	2,4945(7)
Re(1)-C(3)	1,914 (3)	Re(1)-H(1A)	1,95 (3)
B(1)-H(1A)	1,24(3)	B(1)-H(1B)	1,10(3)
Ângulos de Ligação			
C(2)-Re(1)-C(1)	90,57 (12)	C(3)-Re(1)-S(1)	90,79 (8)
C(2)-Re(1)-C(3)	89,18 (12)	N(4)-Re(1)-S(1)	87,78 (6)
C(1)-Re(1)-C(3)	89,74 (12)	C(2)-Re(1)-H(1A)	179,1 (10)
C(2)-Re(1)-N(4)	101,06 (10)	C(1)-Re(1)-H(1A)	90,2 (9)
C(1)-Re(1)-N(4)	91,30 (10)	C(3)-Re(1)-H(1A)	90,4 (10)
C(3)-Re(1)-N(4)	169,70 (10)	N(4)-Re(1)-H(1A)	79,3 (10)
C(2)-Re(1)-S(1)	91,69 (8)	S(1)-Re(1)-H(1A)	87,5 (9)
C(1)-Re(1)-S(1)	177,69 (8)		



*Figura 2.5.* Estrutura do complexo 3

*Tabela 2.2.* Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação mais significativos para o complexo 3

Comprimentos de ligação			
Re(1)-C(2)	1,913 (4)	Re(1)-N(6)	2,178 (3)
Re(1)-C(1)	1,921 (5)	Re(1)-S(1)	2,4995 (10)
Re(1)-C(3)	1,912 (4)	Re(1)-N(4)	2,179 (3)
B(1)-N(3)	1,541 (5)		
Ângulos de Ligação			
C(2)-Re(1)-C(1)	89,75 (17)	C(3)-Re(1)-S(1)	89,65 (12)
C(2)-Re(1)-C(3)	89,72 (16)	N(4)-Re(1)-S(1)	91,82 (9)
C(1)-Re(1)-C(3)	89,87 (17)	C(2)-Re(1)-N(6)	91,88 (14)
C(2)-Re(1)-N(4)	175,84 (13)	C(1)-Re(1)-N(6)	92,22 (14)
C(1)-Re(1)-N(4)	91,52 (14)	C(3)-Re(1)-N(6)	177,38 (14)
C(3)-Re(1)-N(4)	94,25 (14)	N(4)-Re(1)-N(6)	84,11 (11)
C(2)-Re(1)-S(1)	86,93 (12)	S(1)-Re(1)-N(6)	88,36 (8)
C(1)-Re(1)-S(1)	176,65 (11)		



*Figura 2.6.* Estrutura do complexo Re1

*Tabela 2.3.* Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação mais significativos para o complexo Re1

Comprimentos de ligação			
Re(1)-C(2)	1,899(4)	Re(1)-N(1)	2,160(3)
Re(1)-C(1)	1,921(4)	Re(1)-S(1)	2,490(1)
Re(1)-C(3)	1,926(4)	Re(1)-H(1A)	1,94(3)
B(1)-H(1A)	1,20(4)	B(1)-H(1B)	1,09(3)
Ângulos de Ligação			
C(2)-Re(1)-C(1)	89,46(16)	C(3)-Re(1)-S(1)	177,11(11)
C(2)-Re(1)-C(3)	89,20(15)	N(1)-Re(1)-S(1)	87,61(8)
C(1)-Re(1)-C(3)	88,81(16)	C(2)-Re(1)-H(1A)	176,6(9)
C(2)-Re(1)-N(1)	99,59(13)	C(1)-Re(1)-H(1A)	93,8(10)
C(1)-Re(1)-N(1)	170,38(13)	C(3)-Re(1)-H(1A)	89,8(10)
C(3)-Re(1)-N(1)	94,52(13)	N(1)-Re(1)-H(1A)	77,2(10)
C(2)-Re(1)-S(1)	92,37(12)	S(1)-Re(1)-H(1A)	88,8(10)
C(1)-Re(1)-S(1)	88,78(11)		

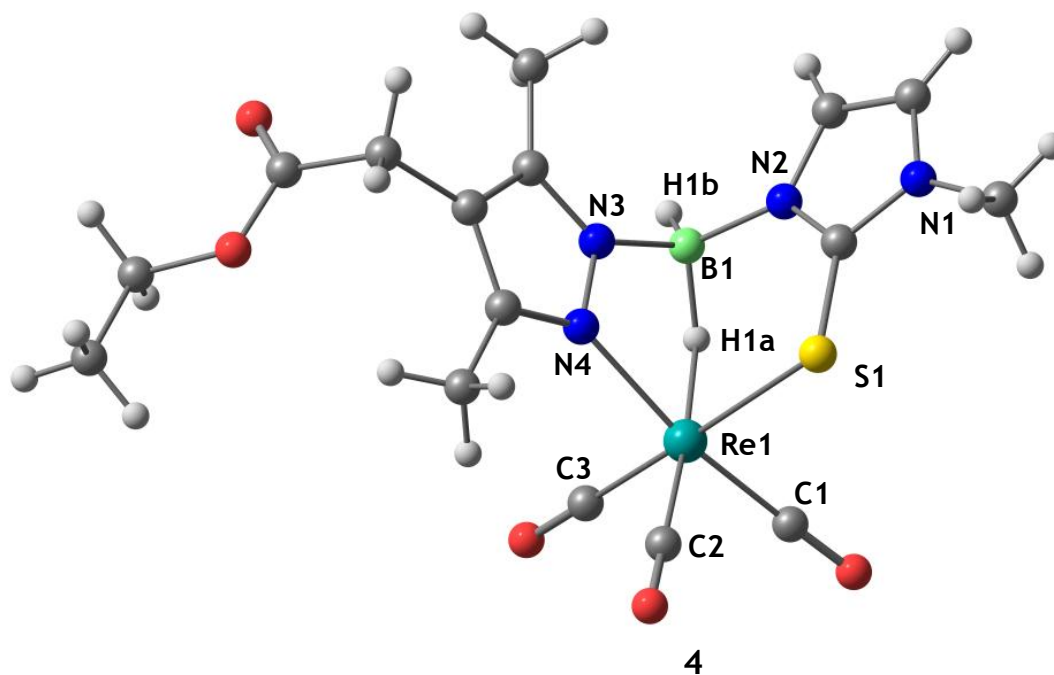


Figura 2.7. Estrutura do complexo 4

Tabela 2.4. Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação mais significativos para o complexo 4

Comprimentos de ligação			
Re(1)-C(2)	1,916 (4)	Re(1)-N(4)	2,158 (3)
Re(1)-C(1)	1,932 (4)	Re(1)-S(1)	2,5086(9)
Re(1)-C(3)	1,931 (4)	Re(1)-H(1A)	1,90(4)
B(1)-H(1A)	1,28 (4)	B(1)-H(1B)	1,07 (4)
Ângulos de Ligação			
C(2)-Re(1)-C(1)	90,30 (16)	C(3)-Re(1)-S(1)	89,26 (11)
C(2)-Re(1)-C(3)	89,04 (16)	N(4)-Re(1)-S(1)	86,60 (8)
C(1)-Re(1)-C(3)	90,18 (15)	C(2)-Re(1)-H(1A)	175,4 (12)
C(2)-Re(1)-N(4)	100,08 (14)	C(1)-Re(1)-H(1A)	86,1 (13)
C(1)-Re(1)-N(4)	93,47 (14)	C(3)-Re(1)-H(1A)	93,7 (13)
C(3)-Re(1)-N(4)	170,14 (13)	N(4)-Re(1)-H(1A)	77,4 (13)
C(2)-Re(1)-S(1)	92,76 (11)	S(1)-Re(1)-H(1A)	90,9 (13)
C(1)-Re(1)-S(1)	176,88 (11)		

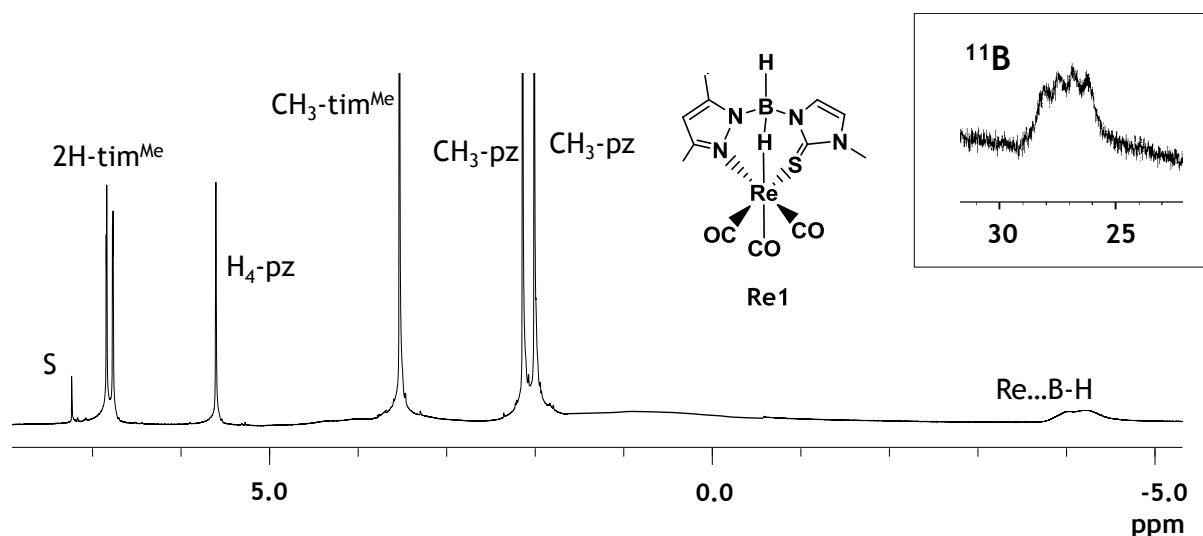
Os complexos 2-4 e Re1 apresentam uma geometria octaédrica distorcida, em que uma das faces do octaedro é ocupada pelos ligandos carbonilo. As três posições de coordenação restantes são ocupadas pelos átomos coordenantes (N,H,S) (2, 4 e Re1) ou (N,N,S) (3) do ligando tridentado.

Os átomos de hidrogénio ligados ao boro foram localizados directamente no mapa de densidade electrónica residual e foram refinados isotropicamente. No caso dos complexos **2**, **4** e **Re1**, tal permitiu confirmar a coordenação ao metal de um dos átomos de hidrogénio, tendo-se obtido distâncias Re...H-B com valores relativamente próximos e que variaram entre 1,90(4) e 1,95(3) Å. Estas distâncias podem ser consideradas comparáveis aos valores descritos anteriormente para o complexo **1** (distância média Re...H-B = 1,96 Å).<sup>47</sup> A estrutura do complexo **3** não apresenta nenhuma interacção B-H...Re, actuando o borato de tris(azolilo) como ligando tridentado ( $\kappa^3$ -S, N, N).

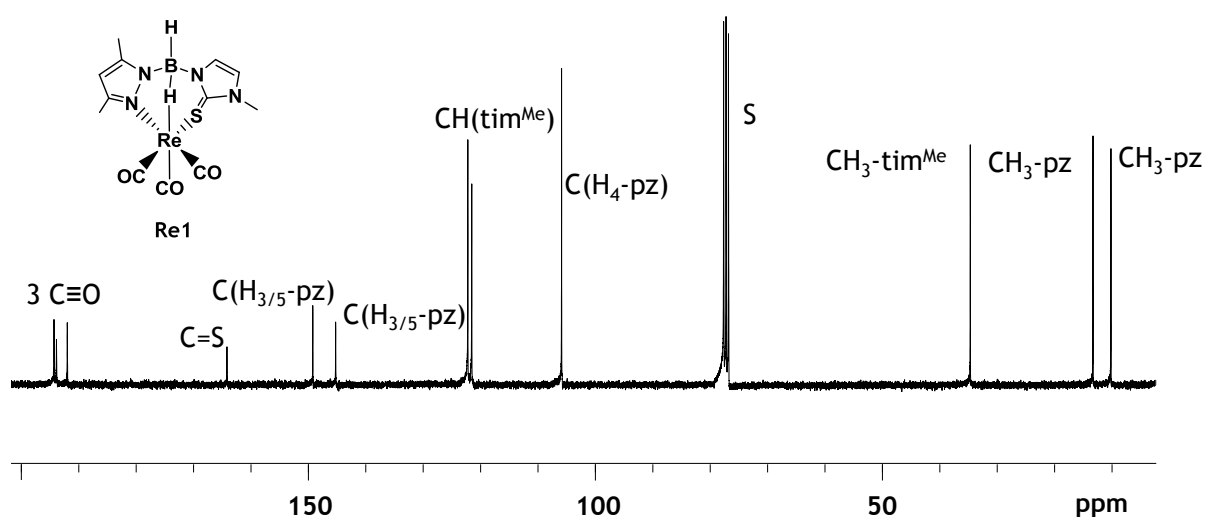
Os valores dos comprimentos de ligação Re-C (1,899(4)-1,932(4) Å), Re-S (2,4901(9)-2,5086(9) Å) e Re-N (2,158(3)-2,169(2) Å) encontrados para os complexos **2**, **4** e **Re1** são também comparáveis aos descritos na literatura para complexos similares com outros boratos de bis(azolilo).<sup>46,48</sup> O valor médio do comprimento de ligação Re-N do composto **3** é de 2,178(3) Å, sendo superior aos valores determinados para os complexos **2**, **4** e **Re1**. Esta diferença está provavelmente relacionada com o maior impedimento estereoquímico do ligando [HB(tim<sup>Me</sup>)(pz)<sub>2</sub>], devido à presença do segundo anel de pirazolilo. No entanto, este efeito não foi observado para a ligação Re-S que apresenta para o composto **3** (Re-S = 2,4995 (10) Å) um valor semelhante aos obtidos para os complexos **2**, **4** e **Re1**.

Para os complexos **2**, **4** e **Re1**, a coordenação dos boratos de bis(azolilo) define um anel quelante de cinco membros ((Re1)(N)(N)(B1)(H1a)) que contém o grupo pirazolilo e um anel quelante de seis membros ((Re1)(S1)(C)(N)(B1)(H1a)) contendo o grupo mercaptoimidazolilo. No anel de cinco membros, os ângulos de ligação N-Re-H1a são inferiores a 90° (77,2(10)-79,3(10)°), contrariamente ao anel de seis membros que apresenta um ângulo S1-Re-H1a muito próximo de 90° (87,5(10)-90,9(13)°). Estes parâmetros estruturais indicam que os anéis quelantes envolvendo grupos mercaptoimidazilo apresentam maior flexibilidade que os anéis quelantes que incorporam o grupo pirazolilo. Provavelmente, estes parâmetros estruturais justificam as diferenças encontradas para a capacidade de coordenação dos boratos de bis(mercaptoimidazolilo) ou de bis(pirazolilo) em complexos com a unidade *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M=Re, <sup>99m</sup>Tc), podendo explicar a menor tendência dos ligandos doadores de enxofre para sofrer processos de degradação.<sup>53</sup>

Os dados de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>11</sup>B e <sup>13</sup>C obtidos para os complexos **2-4** e **Re1** confirmaram que as estruturas encontradas no estado sólido são mantidas em solução. A título de exemplo apresentam-se nas figuras 2.8 e 2.9 os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>11</sup>B e <sup>13</sup>C do complexo **Re1**.



**Figura 2.8.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (com inserção do espectro de  $^{11}\text{B}$ ) para o complexo *fac*- $[\text{Re}\{\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}(\text{CO})_3]$  (**Re1**) em  $\text{CDCl}_3$  (S - solvente)



**Figura 2.9.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo *fac*- $[\text{Re}\{\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}(\text{CO})_3]$  (**Re1**) em  $\text{CDCl}_3$  (S - solvente)

Para os complexos **2**, **4** e **Re1**, a característica mais importante dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  é a presença de um sinal relativamente alargado entre -3,97 e -4,20 ppm correspondente ao hidrogénio envolvido na interacção B-H...Re, como se pode verificar pela análise do espectro de **Re1** apresentado na figura 2.8. Pelo contrário, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo **3** não apresenta nenhuma ressonância a campo alto atribuível a um B-H coordenado, o que é consistente com a coordenação ( $\kappa^3\text{-S,N,N}$ ) do borato de tris(azolilo). Para todos os complexos, não foi possível detectar nos respectivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  as ressonâncias do grupo B-H terminal devido ao alargamento dos sinais como consequência do momento quadrupolar do átomo de  $^{11}\text{B}$ .

Os espectros de RMN de  $^{11}\text{B}$  dos complexos **2**, **4** e **Re1** apresentam como característica comum a presença de um multipletto que aparece na gama de desvios químicos 25,04-27,5 ppm, como exemplificado para **Re1** na figura 2.8. A multiplicidade destes sinais é consistente com o facto de os dois átomos de hidrogénio, terminal e coordenado, ligados ao boro serem magneticamente diferentes. No caso do complexo **Re1**, o desvio químico de  $^{11}\text{B}$  do complexo é relativamente próximo ao encontrado para o ligando livre  $\text{L}^1$ . O espectro de RMN de  $^{11}\text{B}$  do complexo **3** apresenta um dupletto bem definido a 35,05 ppm devido ao acoplamento do núcleo de  $^{11}\text{B}$  com o hidrogénio terminal.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos para os complexos **2-4** e **Re1** apresentam os sinais previstos e são compatíveis com o modo de coordenação tridentado dos ligandos. No caso dos complexos com boratos de bis(azolilo) (**2**, **4** e **Re1**), os ligandos CO originam três ressonâncias entre 191,82 e 194,25 ppm como consequência da baixa simetria dos respectivos complexos. O complexo **3** origina apenas duas ressonâncias a 192,36 e 195,24 ppm que correspondem, respectivamente, ao ligando CO *trans* ao anel de 2-mercaptoimidazolilo e aos dois ligandos CO, magneticamente equivalentes, que se encontram em posição *trans* relativamente aos anéis de pirazolilo.

A caracterização dos complexos **2**, **4** e **Re1** por espectroscopia de IV não confirmou directamente a presença da interacção B-H...Re, uma vez que não se conseguiu atribuir uma banda associada à vibração de extensão  $\nu(\text{B-H}\dots\text{Re})$ . Provavelmente, essa banda encontra-se sobreposta com as bandas intensas devidas à vibração de extensão  $\nu(\text{C}\equiv\text{O})$  que aparecem na região 1891-2030  $\text{cm}^{-1}$ . Pelo contrário, foi possível identificar a banda  $\nu(\text{B-H}\dots\text{Re})$  para os complexos de Re(I) previamente descritos com boratos de bis(mercaptoimidazolilo), a qual aparece na gama 2060-2160  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>46,48</sup> A menor doação  $\sigma/\pi$  do grupo pirazolilo comparativamente ao grupo 2-mercaptoimidazolilo justifica provavelmente que a ligação B-H...Re seja mais fraca no caso dos complexos **2**, **4** e **Re1**, o que leva à sobreposição da banda  $\nu(\text{B-H}\dots\text{Re})$  com as bandas  $\nu(\text{C}\equiv\text{O})$ .<sup>181</sup> Para todos os complexos, **2-4** e **Re1**, os espectros de IV revelaram a presença de uma única banda  $\nu(\text{B-H})$  terminal na região 2468-2491  $\text{cm}^{-1}$ .

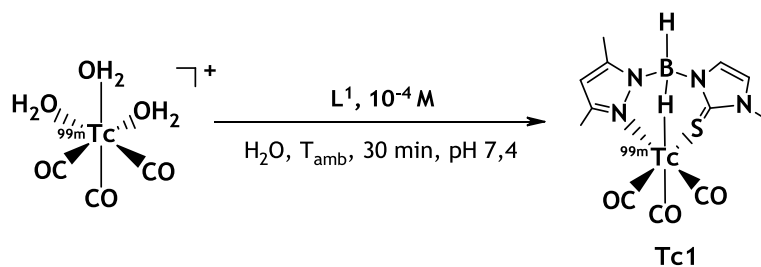
## 2.2.2. Síntese, caracterização e avaliação biológica do complexo de tecnécio-99m

### 2.2.2.1. Síntese e caracterização

Como discutido anteriormente, o ligando  $\text{L}^1$  revelou-se adequado para estabilizar o centro metálico *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ , levando à formação de um complexo tricarbonilo estável à

hidrólise e oxidação aeróbia e que foi obtido em condições aquosas. Estas características favoráveis levaram-nos a estudar a possibilidade de preparar o complexo congénere de  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}\{\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}\text{(CO)}_3]$  (**Tc1**). Para tal, fez-se reagir o precursor  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  com  $\text{L}^1$  utilizando diferentes condições experimentais, tendo-se seguido, por HPLC, a conversão do precursor no complexo pretendido. O precursor organometálico foi obtido por marcação de um *kit* liofilizado Isolink©, usando o procedimento referido na parte introdutória desta tese. Este procedimento envolveu a adição de  $\text{Na}[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]$  em  $\text{NaCl}$  0,9% ao *kit*, seguida de aquecimento a 100 °C durante 20 min. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a solução foi neutralizada a um pH de cerca de 7,4.

As reacções do precursor organometálico com  $\text{L}^1$  foram efectuadas inicialmente à temperatura de 75 °C, utilizando uma concentração final de ligando de  $10^{-4}$  M e um tempo de reacção de 30 min. No entanto, o complexo **Tc1** (esquema 2.5) não foi obtido de maneira quantitativa, utilizando estas condições experimentais. Como se pode verificar pelo cromatograma de HPLC apresentado na figura 2.10B, a reacção levou ao consumo completo do precursor  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  (figura 2.10A) com formação, em percentagens muito semelhantes, de duas espécies radioquímicas que apresentaram tempos de retenção de 21,28 e 22,52 min, respectivamente. A comparação dos tempos de retenção destas espécies com o tempo de retenção do complexo de rénio **Re1** (figura 2.10E) permitiu confirmar que a espécie com tempo de retenção superior ( $t_{\text{R}}=22,52$  min) correspondia ao complexo **Tc1**, como discutido a seguir com mais detalhe. A espécie com menor tempo de retenção ( $t_{\text{R}}=21,28$  min) não foi identificada quimicamente mas, eventualmente, a sua formação pode estar relacionada com processos de degradação do ligando, promovidos eventualmente pela temperatura relativamente elevada a que decorreu a reacção. É de salientar que nas mesmas condições reaccionais as reacções de  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  com  $\text{Na}[\text{H}_2\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})_2]$  conduzem exclusivamente à formação de complexo  $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}\{\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})_2\}\text{(CO)}_3]$ , não tendo sido detectada a presença de quaisquer impurezas radioquímicas.<sup>53</sup> Estes resultados indicam que o ligando ( $\text{L}^1$ ) ou o complexo **Tc1** apresentam uma maior tendência para sofrer processos de degradação, comparativamente a compostos congéneres que contêm apenas anéis de 2-mercaptoimidazolilo.<sup>46</sup>



Esquema 2.5. Síntese do complexo  $fac-[^{99m}\text{Tc}\{\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}_3(\text{CO})_3]$  (Tc1)

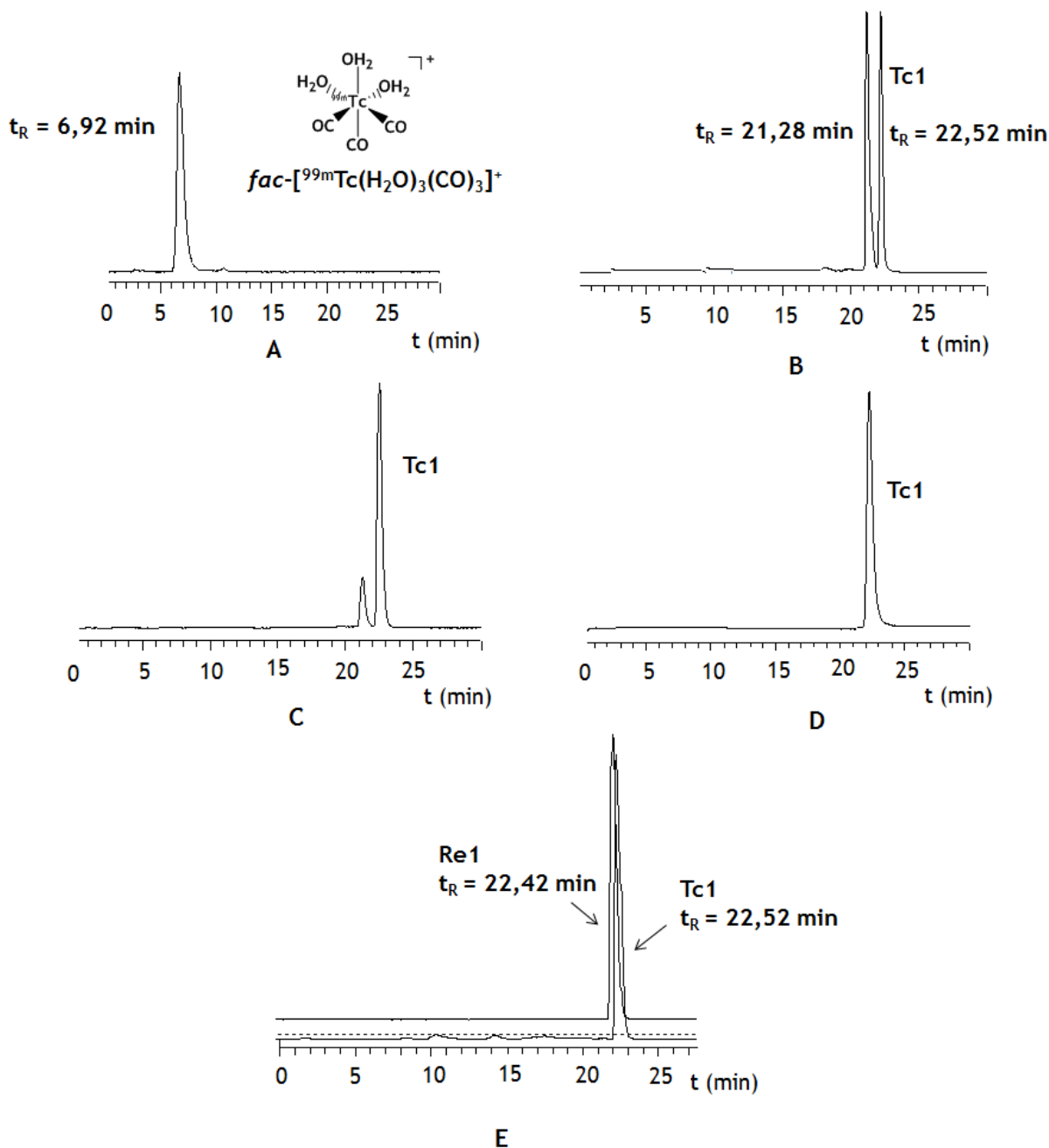


Figura 2.10. Cromatogramas de HPLC: A - Precursor  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ ; B - Síntese do complexo Tc1, 75 °C, 30 min; C - Síntese do complexo Tc1,  $T_{\text{amb}}$ , 30 min; D - Tc1 após purificação por HPLC; E - Co-injeção dos compostos Re1 e Tc1

Esperando minimizar a percentagem da impureza radioquímica que se formou a 75 °C, estudou-se a síntese de **Tc1** à temperatura ambiente, utilizando a mesma concentração de ligando ( $10^{-4}$  M). Como se pode ver pelo cromatograma de HPLC apresentado na figura 2.10C, a reacção efectuada à temperatura ambiente levou a um aumento do rendimento ( $\approx 95\%$ ) com que se obteve o complexo **Tc1**, com minimização significativa da formação da impureza radioquímica. Após purificação por HPLC, obteve-se o complexo **Tc1** com uma pureza radioquímica superior a 99% (figura 2.10D). Para a caracterização e avaliação *in vitro/in vivo* de **Tc1**, utilizou-se o complexo purificado por HPLC.

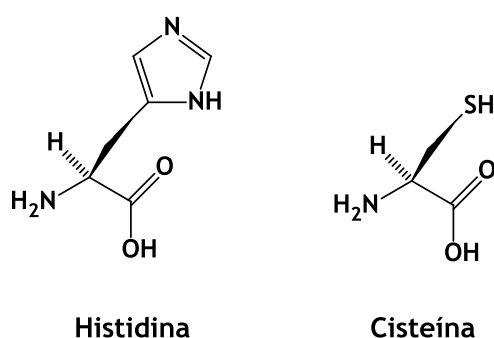
Como referido no capítulo introdutório, a concentração de  $^{99m}\text{Tc}$  é muito baixa ( $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  M) o que faz com que não seja possível caracterizar os seus complexos pelas técnicas espectroscópicas usuais. De modo a confirmar a natureza química do complexo *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}\{\text{K}^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}\text{(CO)}_3]$  (**Tc1**), procedeu-se à comparação do seu tempo de retenção em HPLC com o obtido para o complexo análogo de rénio *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}\{\text{K}^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}\text{(CO)}_3]$  (**Re1**) (figura 2.10E), uma metodologia aceite em química radiofarmacêutica para caracterizar complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ . Como se pode constatar pelos cromatogramas apresentados na figura 2.10E, o complexo **Tc1** apresentou um tempo de retenção praticamente coincidente com o do **Re1**, o que nos levou a considerar que estávamos em presença de complexos isoestruturais. Os tempos de retenção obtidos para os dois complexos não são exactamente iguais ( $\Delta t_R = 0,10$  min), uma vez que o cromatograma do complexo de rénio foi obtido utilizando um detector UV-vis, enquanto o cromatograma do complexo  $^{99m}\text{Tc}$  foi obtido com um detector  $\gamma$ . Estes detectores não se encontram ligados em paralelo mas sim em série, o que justifica a ligeira diferença nos tempos de retenção dos complexos **Re1** e **Tc1**.

A caracterização de **Tc1** envolveu ainda o estudo da sua lipofilia através da determinação do coeficiente de distribuição octanol-água ( $\log D_{o/w}$ ) a pH 7,4, utilizando o método de extracções múltiplas descrito na literatura,<sup>182</sup> o qual foi utilizado para determinar a lipofilia dos restantes complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  descritos nesta tese. O valor de  $\log D_{o/w}$  determinado para **Tc1** foi de  $1,78 \pm 0,04$ , o que indica que estamos em presença de um complexo com um carácter moderadamente lipofílico.

#### 2.2.2.2. Estabilidade *in vitro*

Os estudos de estabilidade *in vitro* indicam se os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  têm a capacidade de se manter intactos em condições aquosas e fisiológicas, o que é um requisito essencial para a sua utilização no desenvolvimento de radiofármacos. Por outro

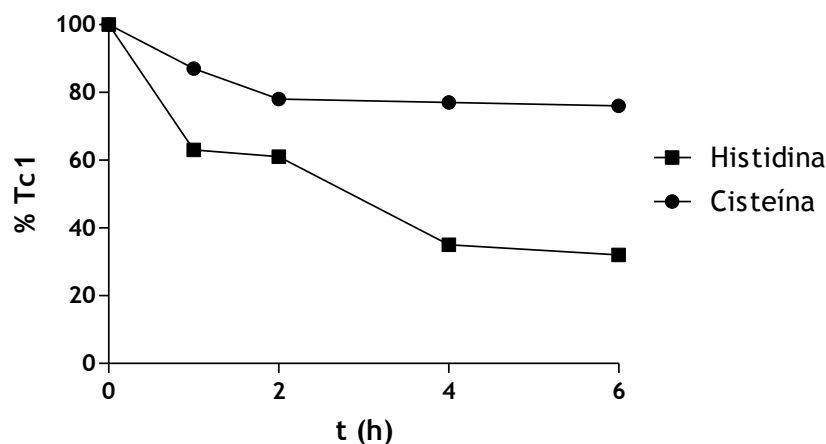
lado, permitem prever a estabilidade dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  *in vivo*, face à reoxidação e transquelatação do ligando por substratos biológicos que apresentem afinidade para o metal. Estes ligandos biológicos podem ser proteínas, aminoácidos ou outras moléculas presentes em circulação ou nos tecidos. Procedeu-se assim ao estudo da estabilidade *in vitro* do complexo Tc1 em condições fisiológicas (tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4; 37 °C) e através de ensaios competitivos com dois aminoácidos, a cisteína e a histidina (figura 2.11), que se encontram presentes em inúmeros tecidos biológicos e apresentam afinidade para a unidade  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ .



**Figura 2.11.** Estrutura dos aminoácidos histidina e cisteína

O complexo Tc1 foi incubado em PBS, a pH 7,4 e a 37 °C. A solução foi analisada por HPLC, ao fim de 24 h, verificando-se que o complexo Tc1 não sofreu reoxidação a  $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$  ou outros processos de degradação. Em particular, confirmou-se que a ligação Tc...H-B de Tc1 resiste às condições fisiológicas, como descrito previamente para compostos congéneres com boratos de bis(mercaptoimidazolilo).<sup>53</sup>

Nos ensaios competitivos com histidina e cisteína, utilizou-se uma concentração  $10^{-5}$  M de cada aminoácido o que corresponde a uma razão molar 100:1 face à concentração de Tc1, assumindo que se encontra presente em solução uma concentração  $10^{-7}$  M de Tc. As soluções resultantes foram analisadas por HPLC, ao fim de 1, 2, 4 e 6 h de incubação a 37 °C, de modo a avaliar a eventual transformação de Tc1, nomeadamente através de processos de transquelatação. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 2.12.



**Figura 2.12.** Estabilidade do complexo Tc1 na presença de cisteína e histidina em PBS (pH = 7,4) a 37 °C

O complexo Tc1 é instável na presença de histidina, verificando-se que apenas cerca de 30% do complexo inicial se encontra presente em solução ao fim de 6 h de incubação na presença deste aminoácido. A reactividade de Tc1 face à cisteína é menos acentuada, permanecendo intacto cerca de 80% do complexo após o mesmo tempo de incubação. Tal como Tc1, o composto  $fac-[^{99m}Tc\{\kappa^3-H(\mu-H)B(tim^{Me})_2\}(CO)_3]^{53}$  previamente descrito também apresenta tendência para reagir com estes aminoácidos. No entanto, ao contrário do verificado para Tc1, este complexo apresenta uma reactividade mais acentuada face à cisteína comparativamente à histidina.<sup>53</sup> Estes resultados reflectem certamente as diferentes capacidades de coordenação dos sistemas de átomos doadores ( $\kappa^3-H,S,N$ ) e ( $\kappa^3-H,S,S$ ) face à unidade  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3]^+$  e/ou diferenças de reactividade dos boratos de bis(azolilo) coordenados face, por exemplo, a um eventual ataque do átomo de boro pelos aminoácidos.

### 2.2.2.3. Biodistribuição e estabilidade in vivo

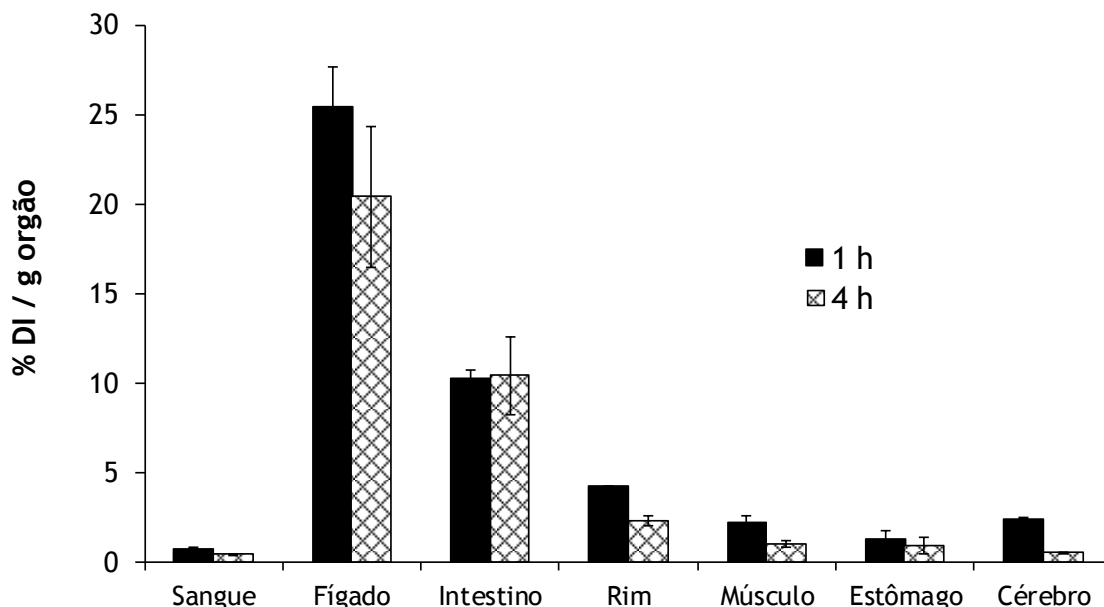
A avaliação do comportamento biológico de complexos radioactivos em modelos animais é importante, pois permite estudar a selectividade e especificidade dos complexos para determinados órgãos ou tecidos alvos, possibilitando ainda a avaliação da velocidade de distribuição e eliminação. Através destes estudos é também possível avaliar a estabilidade dos complexos radioactivos *in vivo*, relativamente à reoxidação, hidrólise ou metabolização na presença de biomoléculas, tais como enzimas tecidulares ou em circulação. Em particular, permitem determinar a taxa de depuração sanguínea e identificar as vias de excreção envolvidas na eliminação do composto, parâmetros que são

muito importantes na investigação e desenvolvimento de radiofármacos. De um modo geral, a depuração sanguínea deve ser rápida o suficiente para evitar irradiação excessiva do paciente, mas suficientemente lenta para permitir que o complexo radioactivo interaja com o seu alvo. Em relação às vias de excreção, a eliminação renal é vantajosa na medida em que geralmente é mais rápida e contribui para melhorar a razão alvo/fundo na região abdominal.

O comportamento biológico do complexo Tc1 foi estudado em ratinhos fêmea saudáveis Charles River da estirpe CD-1, a fim de avaliar a sua biodistribuição, farmacocinética e estabilidade *in vivo*. Os animais foram injectados com alíquotas de 100 µL (3,4-5,1 MBq) da solução de Tc1, por via intravenosa através da veia da cauda. Em seguida, os animais foram sacrificados a dois tempos diferentes (1 e 4 h p.i.) e os órgãos removidos, pesados e a sua actividade medida. Os resultados de biodistribuição foram calculados em percentagem de dose injectada por grama de órgão (% DI/g órgão) (tabela 2.5). A fixação de Tc1 nos órgãos mais relevantes é apresentada na figura 2.13.

**Tabela 2.5.** Resultados de biodistribuição (% DI g órgão) e excreção total (% DI) do complexo *fac*- $[^{99m}\text{Tc}\{\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})\}\text{(CO)}_3]$  (Tc1)

Órgão	Tempo de Sacrifício	
	1h	4h
Sangue	0,73 ± 0,04	0,43 ± 0,06
Fígado	25,5 ± 2,2	20,4 ± 3,9
Intestino	10,3 ± 0,4	10,4 ± 2,2
Baço	0,91 ± 0,06	0,35 ± 0,07
Coração	1,9 ± 0,2	0,64 ± 0,11
Rins	4,23 ± 0,02	2,3 ± 0,3
Músculo	2,2 ± 0,4	1,0 ± 0,2
Fémur	1,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Estômago	1,3 ± 0,4	0,9 ± 0,5
Pâncreas	2,22 ± 0,04	0,66 ± 0,18
Cérebro	2,4 ± 0,5	0,48 ± 0,06
Olhos	0,73 ± 0,04	0,15 ± 0,02
Excreção (% DI)	4,16 ± 3,68	7,5 ± 0,7



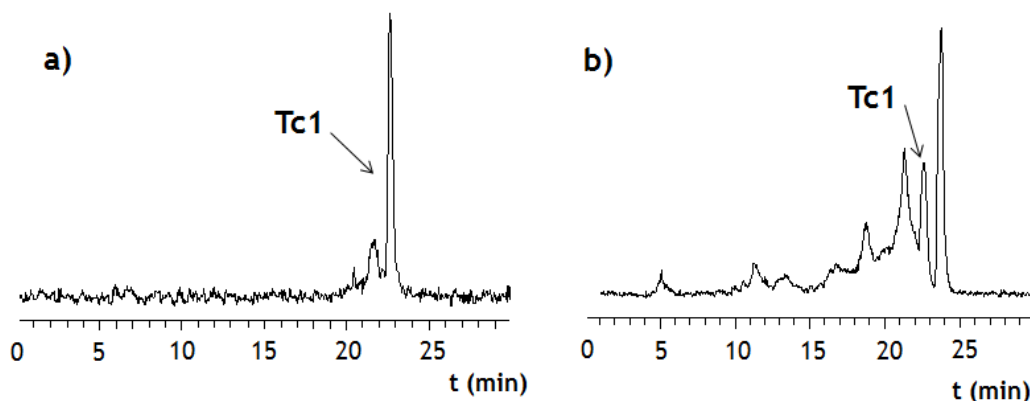
**Figura 2.13.** Fixação (% DI/g órgão) nos órgãos/tecidos mais relevantes para o complexo Tc1

O complexo Tc1 apresenta uma depuração sanguínea relativamente rápida, como se pode verificar pelos valores de actividade presentes em circulação (% DI/g =  $0,73 \pm 0,04$ , 1 h p.i.;  $0,43 \pm 0,04$ , 4 h p.i.). A retenção no estômago é baixa o que indica que este composto não sofre reoxidação *in vivo*, visto que o  $[^{99m}\text{TcO}_4]$  apresenta uma elevada afinidade para o estômago e tiróide.<sup>183</sup> Não foi encontrada nenhuma fixação preferencial em nenhum órgão ou tecido, excepto nos órgãos relacionados com as vias de excreção, como o fígado e intestinos e em menor grau os rins. Esta fixação hepática e intestinal indica que Tc1 deve ser excretado essencialmente por via hepatobiliar, reflectindo o seu carácter lipofílico. A excreção de Tc1 é muito lenta, tendo-se observado um valor de  $7,5 \pm 0,7\%$  DI às 4 h p.i. (tabela 2.5).

O complexo Tc1 apresenta a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, com uma fixação cerebral inicial significativa ( $2,4 \pm 0,5\%$  DI/g órgão, 1 h p.i.). Esta fixação diminui ao longo do tempo atingindo o valor de  $0,48 \pm 0,06\%$  DI/g órgão ao fim de 4 h p.i.. Um comportamento semelhante foi descrito anteriormente para os complexos  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-R})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})_2(\text{CO})_3)](\text{R}, \text{H}, \text{Ph})^{53}$  o que indica que os complexos de  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  com boratos de bis(azolilo) apresentam em geral a capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica. Esta capacidade reflecte certamente o seu carácter neutro e lipofílico e o seu peso molecular relativamente reduzido.

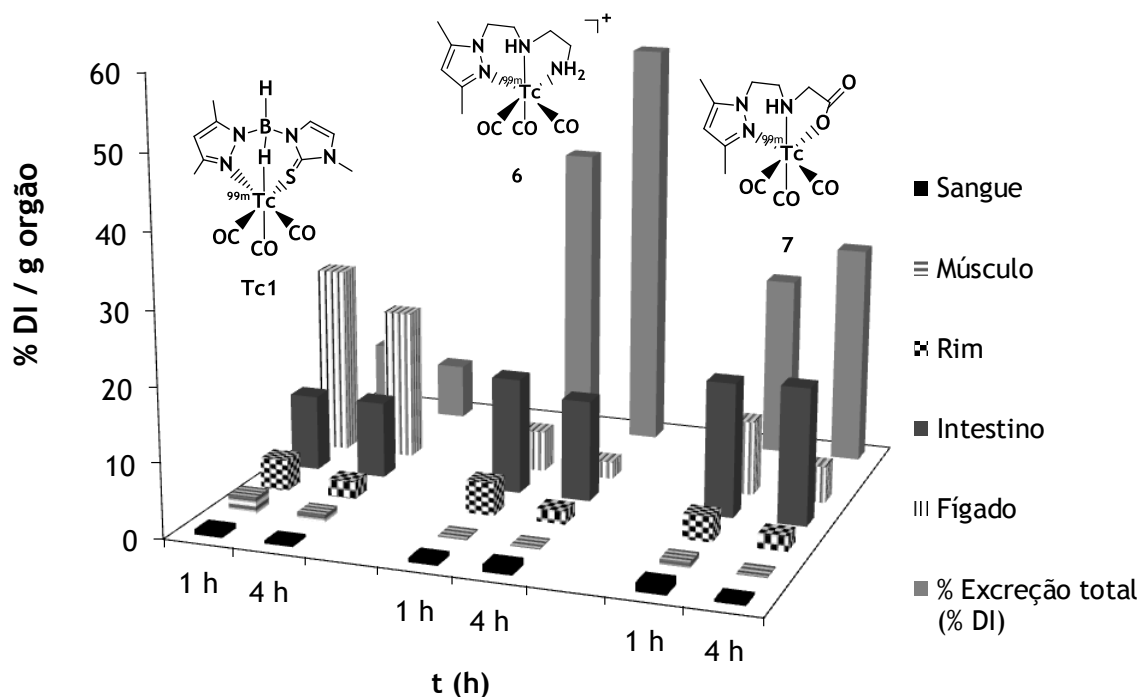
De modo a avaliar a estabilidade *in vivo* do complexo Tc1, procedeu-se à análise por HPLC de amostras de sangue e urina retiradas de ratinhos injectados (1 h p.i.) com o composto radioactivo (figura 2.14). Antes da análise por HPLC, a urina e o sangue foram

centrifugados, tendo-se ainda procedido à precipitação das proteínas plasmáticas do soro com etanol frio, procedimento que foi seguido para todos os estudos de estabilidade *in vivo* descritos nesta tese. Através do cromatograma apresentado na figura 2.14a, observa-se que a actividade em circulação corresponde quase exclusivamente ao complexo Tc1 (> 85%). Pelo contrário, a análise por HPLC da urina evidencia a presença de diferentes metabolitos, em percentagem claramente superior à de Tc1.



**Figura 2.14.** Cromatogramas de HPLC do a) sangue e b)urina de ratinhos injectados (1 h p.i.) com o complexo Tc1

Como se pode verificar pela análise dos dados apresentados na figura 2.15, as características biológicas de Tc1 são muito menos favoráveis do que as descritas na literatura para os complexos modelo de  $^{99m}\text{Tc(I)}$  (6 e 7) com ligandos do tipo pirazolo-diamina e do tipo pirazolo-aminocarboxílico, as outras classes de ligandos bifuncionais que pretendíamos explorar, tal como discutido na introdução deste capítulo.<sup>51,54</sup> Como visto atrás, o complexo Tc1 apresenta uma excreção lenta (inferior a 10% DI às 4 h p.i.) e uma elevada retenção no fígado. Pelo contrário, os complexos modelo 6 e 7 apresentam taxas de excreção relativamente elevadas (superiores a 30% DI à 1 h p.i.) e uma eliminação rápida dos órgãos não-alvo, características favoráveis para o desenvolvimento de radiofármacos específicos para detecção tumoral.



**Figura 2.15.** Comparação dos resultados de biodistribuição mais relevantes (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) dos complexos modelo Tc1,  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3\{3,5-Mepz(CH_2)_2NH(CH_2)_2NH_2\}]^+$  (6)<sup>51</sup> e  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3\{3,5-Mepz(CH_2)_2NHCH_2COO\}]$  (7)<sup>54</sup> em ratinhos fêmea CD1

Perante estes resultados e contrariamente ao previsto inicialmente, não se utilizou a estrutura do complexo Tc1 para funcionalização com derivados das benzamidas ou seus fragmentos, tendo em vista obter complexos de  $^{99m}Tc$  relevantes como sondas radioactivas para detecção do melanoma melanótico. Para atingir este objectivo, prosseguiu-se unicamente com a funcionalização de ligandos do tipo pirazolo-diamina e do tipo pirazolo-aminocarboxílico com derivados das benzamidas ou seus fragmentos, como descrito a seguir.

## 2.3. Síntese e caracterização de complexos tricarbonilo de Re(I)/<sup>99m</sup>Tc(I) com ligandos do tipo pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxílico funcionalizados com derivados de benzamidas

---

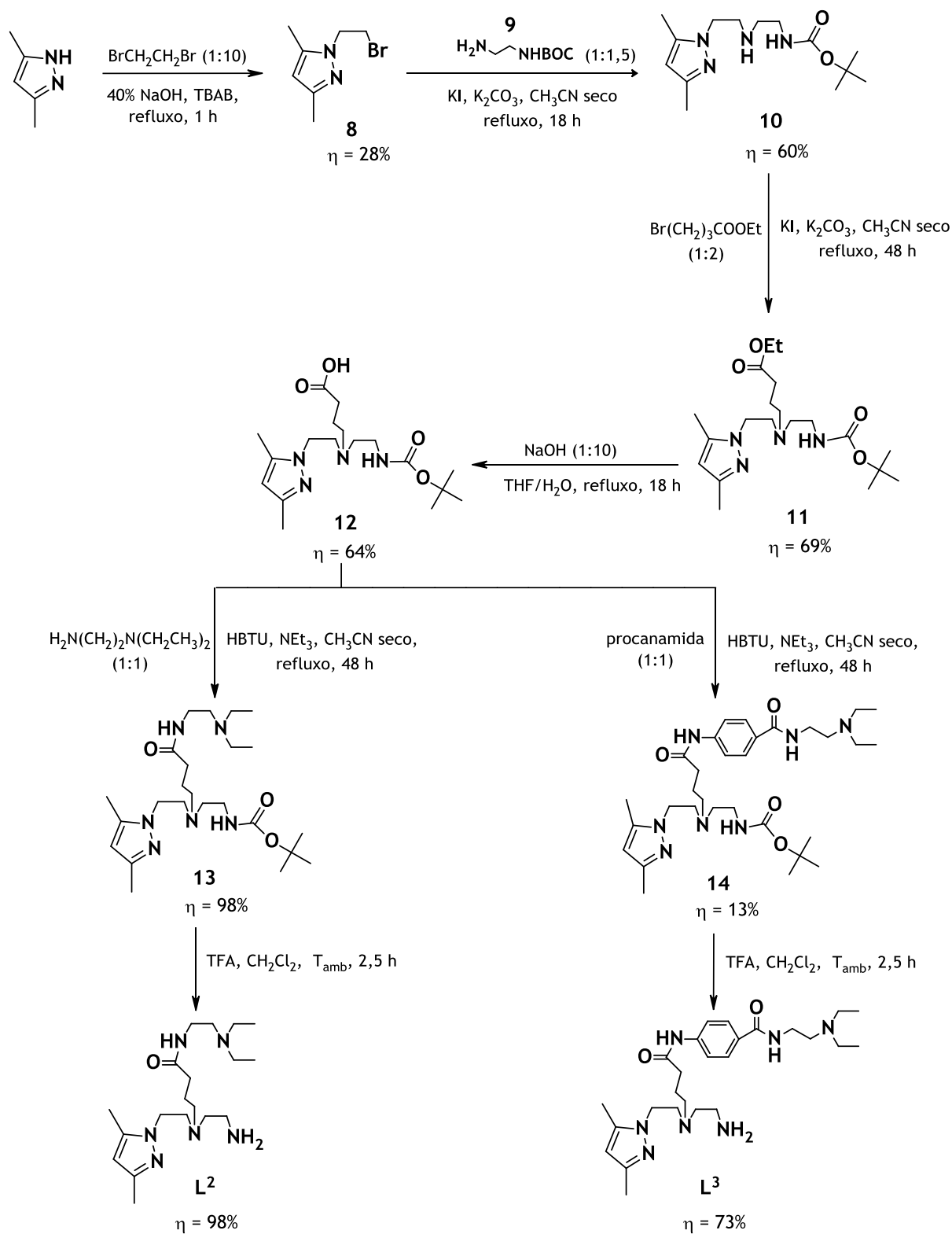
### 2.3.1. Síntese e caracterização dos ligandos funcionalizados

Aproveitando a versatilidade dos compostos do tipo pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxílico em termos de estratégias de funcionalização com pequenas biomoléculas, os derivados das benzamidas ou seus fragmentos foram introduzidos na estrutura dos ligandos bifuncionais através da amina central e da posição 4 do anel de pirazolo.

#### *Síntese dos ligandos do tipo pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxílico funcionalizados através da amina central (L<sup>2</sup>-L<sup>5H</sup>)*

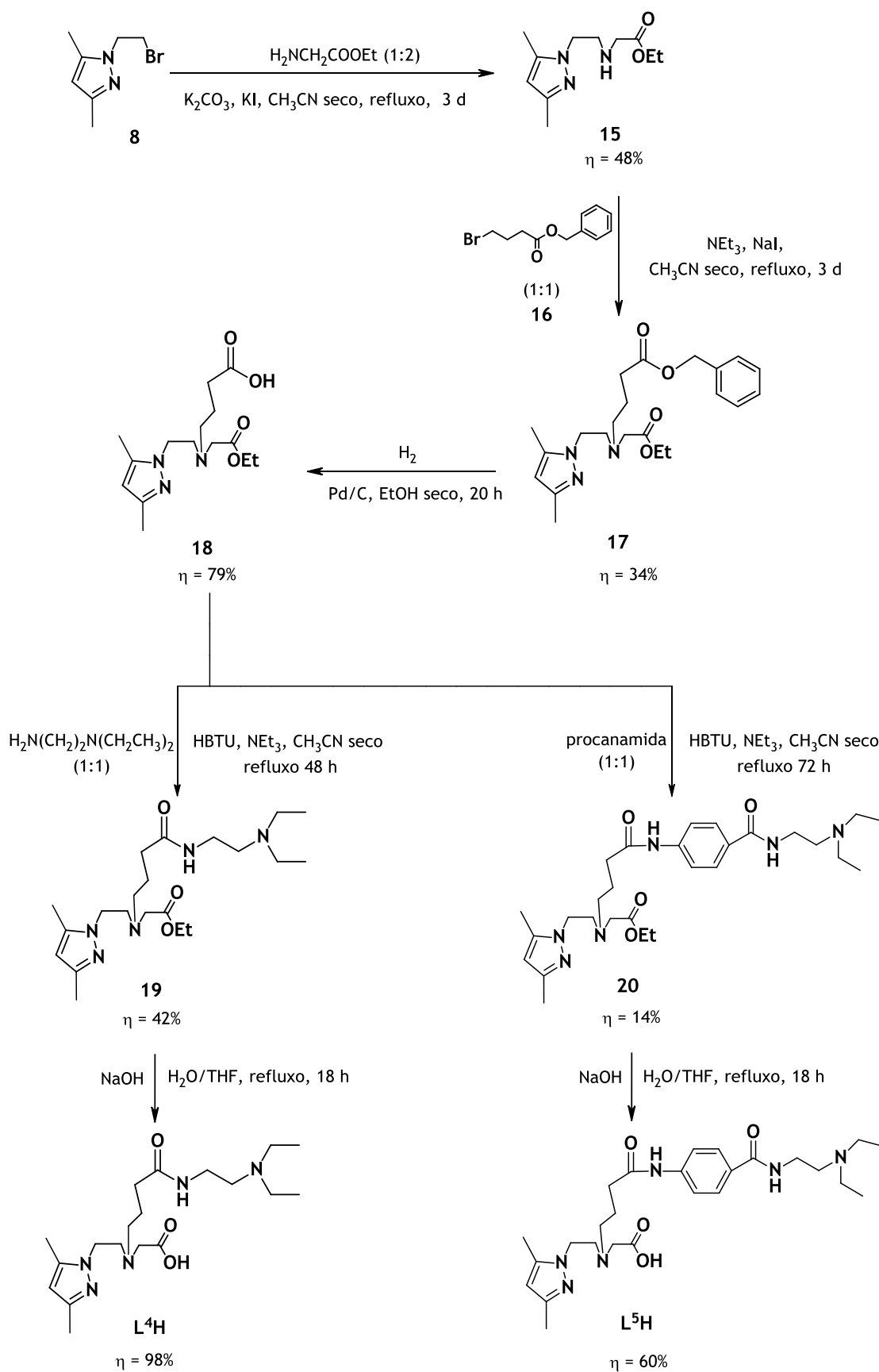
Os ligandos pirazolo-diamina funcionalizados com derivados das benzamidas através da amina central (L<sup>2</sup> e L<sup>3</sup>) foram sintetizados de acordo com as reacções apresentadas no esquema 2.6, a partir do precursor ácido 3-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)amino)propanóico (**12**) cuja síntese já tinha sido previamente descrita na literatura.<sup>51</sup>

Resumidamente, a síntese do precursor **12** envolveu a preparação do 2-bromoetil-3,5-dimetilpirazolo (**8**) que foi utilizado para obter um derivado pirazolo-diamina, composto **10**, cuja função amina primária se encontra protegida com o grupo terc-butoxicarbonilo (BOC). A reacção do composto **10** com 4-bromobutirato de etilo permitiu introduzir um braço butirato que, após hidrólise alcalina do éster, foi posteriormente utilizado para funcionalização com os derivados de benzamidas, como indicado no esquema 2.6. Essa funcionalização envolveu a reacção do composto **12** com 4-amino-N-(2-(dietilamino)etil)benzamida (procanamida) ou com 2-aminoetildietilamina, na presença do agente de acoplamento HBTU (hexafluorofosfato de O-(benzotriazolo-1-ilo)-N,N,N',N'-tetrametilurónio) em meio básico. Estas reacções conduziram à formação dos compostos **13** e **14** que, após remoção do grupo protector BOC com TFA em excesso, originaram os ligandos finais L<sup>2</sup> e L<sup>3</sup>.

Esquema 2.6. Síntese dos ligandos finais  $L^2$  e  $L^3$

Os ligandos pirazolo-aminocarboxílico ( $N_2O$ ) funcionalizados com derivados das benzamidas através da amina central ( $L^4H$  e  $L^5H$ ) foram sintetizados de acordo com as reacções apresentadas no esquema 2.7. Tal como para os ligandos congéneres pirazolo-diamina ( $L^2$  e  $L^3$ ), a ligação dos derivados das benzamidas foi efectuada usando um braço butirato e através da formação de funções amida. Para tal, foi necessário recorrer à protecção ortogonal das duas funções ácido carboxílico presentes na estrutura dos ligandos bifuncionais, utilizando grupos protectores éster etílico e éster benzílico que podem ser removidos sob diferentes condições reaccionais.

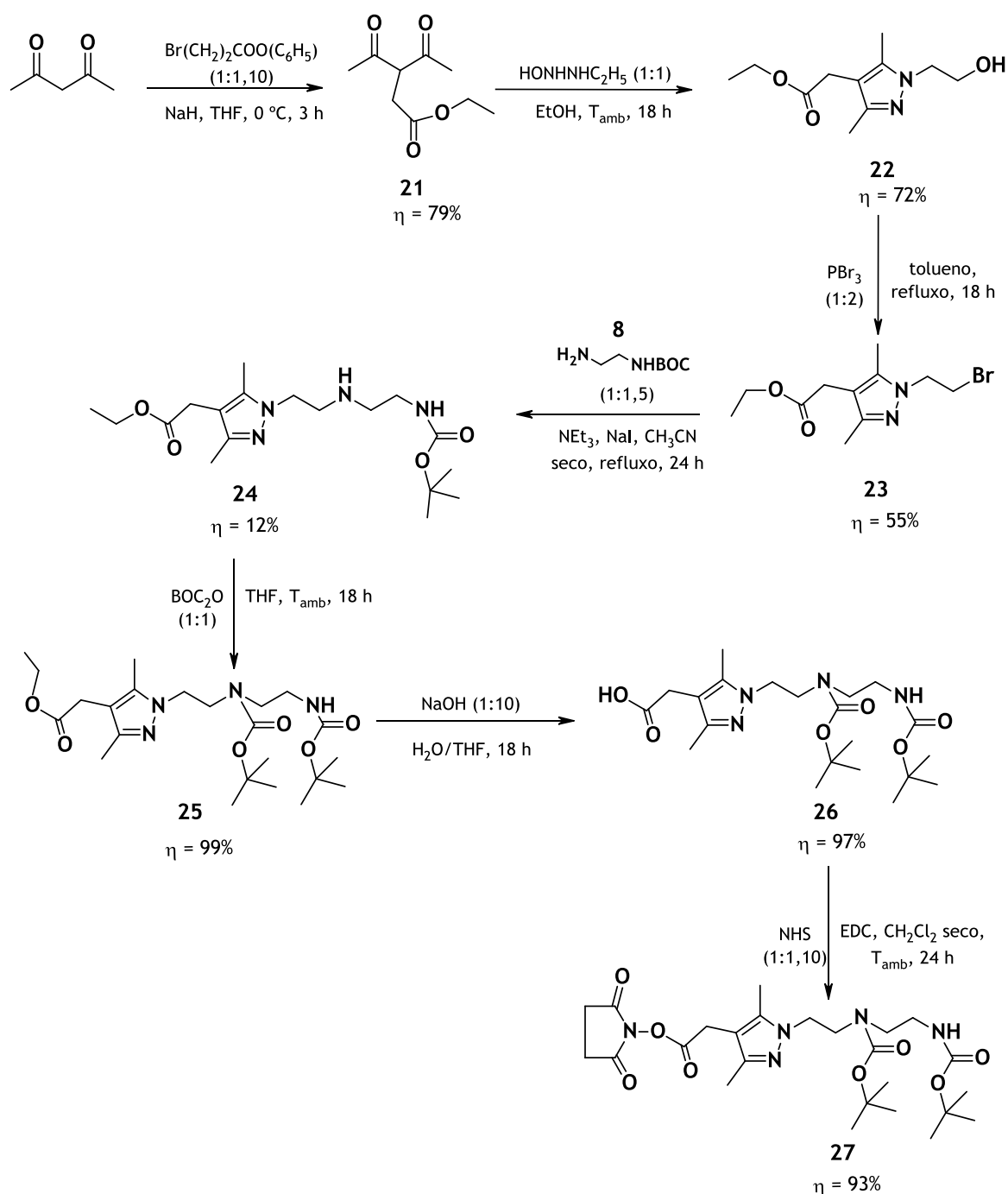
Tal como no caso de  $L^2$  e  $L^3$ , a síntese de  $L^4H$  e  $L^5H$  envolveu o 2-bromoetil-3,5-dimetilpirazolo (**8**) como composto de partida, o qual reagiu com glicinato de etilo com formação do derivado pirazolo-aminocarboxílico **15**, *via* substituição nucleofílica. Como indicado no esquema 2.7, a N-alquilação da amina secundária do composto **15** com 4-bromobutirato de benzilo (**16**) permitiu obter o composto **17** que apresenta uma função éster etílico e uma função éster benzílico de modo a permitir uma desprotecção selectiva, como atrás referido. A hidrogenação de **17** na presença de Pd/C como catalisador permitiu remover selectivamente o éster benzílico, formando-se o composto **18** que foi utilizado para a funcionalização com os derivados das benzamidas. Tal como no caso dos ligandos congéneres do tipo pirazolo-diamina, essa funcionalização envolveu a activação do grupo carboxílico de **18** com HBTU em meio básico seguida da reacção com 2-aminoetildietilamina ou procanamida. Os compostos resultantes, **19** e **20** respectivamente, foram sujeitos a hidrólise básica para remoção dos grupos éster etílico, obtendo-se dessa forma os ligandos finais  $L^4H$  e  $L^5H$ .


 Esquema 2.7. Síntese dos ligandos finais L<sup>4</sup>H e L<sup>5</sup>H

### *Síntese dos ligandos do tipo pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxílico funcionalizados através do anel de pirazolo*

A funcionalização dos anéis de pirazolo dos ligandos do tipo pirazolo-diamina ou pirazolo-aminocarboxílico envolveu uma estratégia comum que se baseou na formação de ligações amida com um grupo carboxílico presente como substituinte na posição 4 do anel.

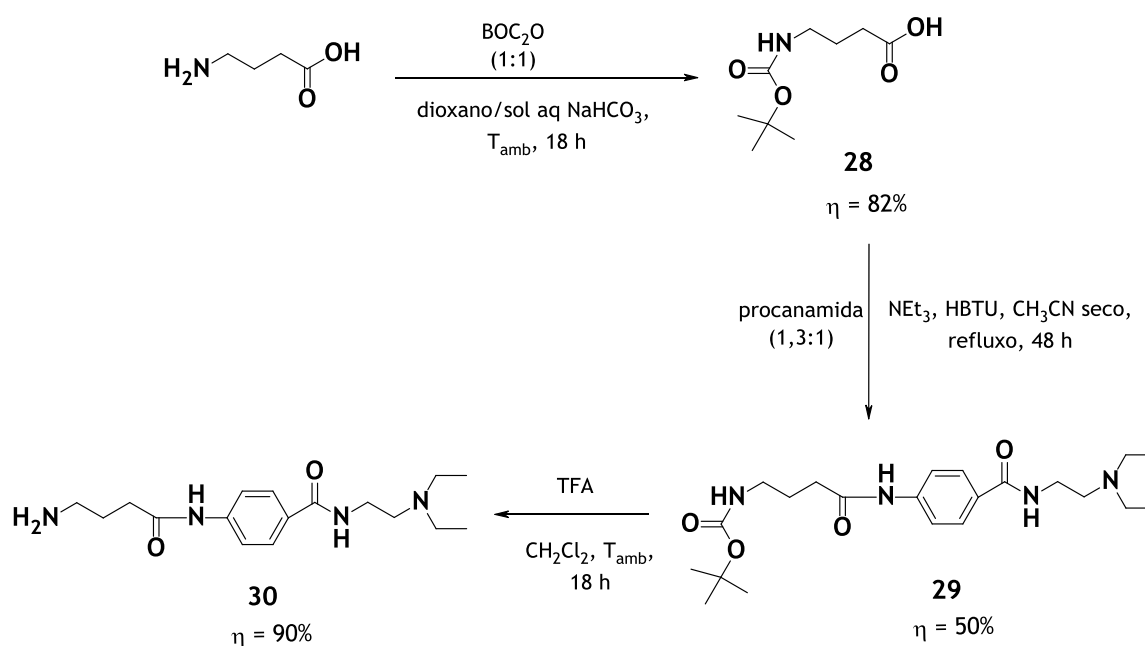
No caso dos ligandos pirazolo-diamina, essa estratégia envolveu como intermediário chave um éster de N-hidroxisuccinimida (composto **27**) cujas funções amina se apresentam protegidas com BOC, de modo a evitar reacções secundárias ao proceder-se à ligação com os derivados das benzamidas. Como indicado no esquema 2.8, a síntese deste intermediário chave foi iniciada com a reacção da 2,4-pentanodiona com bromoacetato de etilo. Esta reacção de C-alkilação permitiu obter o composto **21** que por ciclocondensação com a hidroxietilhidrazina originou o derivado hidroxietilpirazolo **22**, como descrito na literatura.<sup>50</sup> A bromação de **22** com  $\text{PBr}_3$  levou à obtenção do derivado bromoetilpirazolo **23**. A reacção de **23** com  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NHBOC}$  (**9**) permitiu obter **24** que corresponde a um composto do tipo pirazolo-diamina com uma função éster na posição 4 do pirazolo e com a amina terminal protegida com BOC. Seguidamente, a amina secundária de **24** foi também protegida com BOC, com formação do composto **25**. Procedeu-se à hidrólise alcalina da função éster de **25** e, finalmente, o derivado ácido resultante (**26**) foi utilizado para obter o composto intermediário **27** por reacção com N-hidroxisuccinimida (NHS) na presença de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida hidrocloreada (EDC).



**Esquema 2.8.** Síntese do composto intermediário 2-(1-(2-((terc-butoxicarbonil)(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)acetato de 2,5-dioxopirrolidina (**27**)

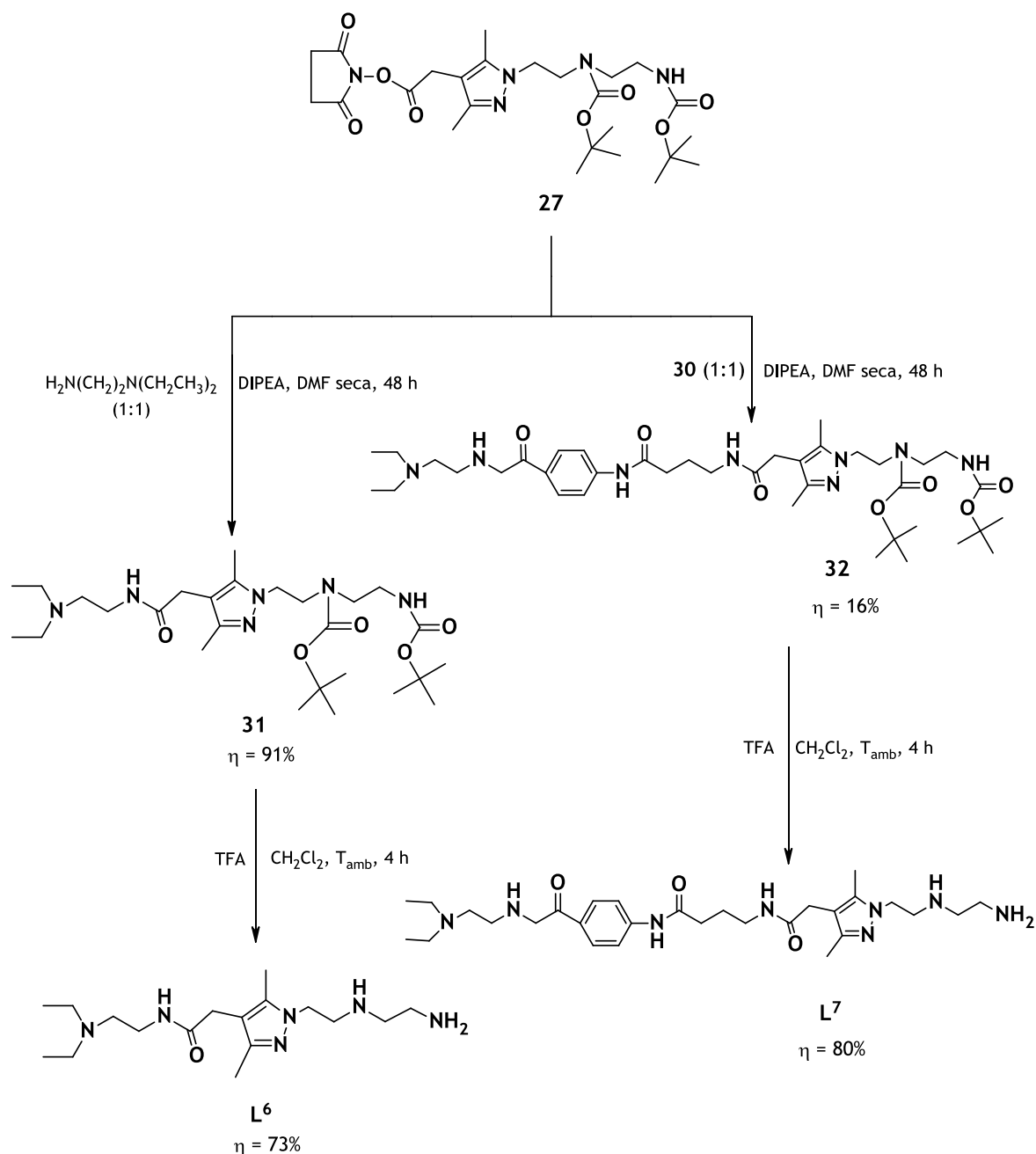
Com o objectivo de obter os ligandos finais funcionalizados através da posição 4 do anel de pirazolo, estudaram-se reacções do éster activado **27** com 2-aminoetildietilamina e com 4-amino-N-(2-(dietilamino)etil)benzamida (procanamida). Ao contrário do verificado para a 2-aminoetildietilamina, não foi possível promover a formação da ligação amida no

caso da procanamida. Atribuímos esta diferença ao carácter aromático da amina da procanamida que lhe confere menor reactividade comparativamente à amina alifática da 2-aminoetildietilamina. Assim, modificou-se a procanamida com um espaçador 3-carboxiaminoetil que apresenta uma amina alifática terminal, de modo a poder ligar a procanamida através da posição 4 do anel. A síntese do composto resultante (**30**) envolveu as reacções que se apresentam no esquema 2.9. Resumidamente, esta síntese foi efectuada por reacção da procanamida com ácido 4-aminobutírico, previamente protegido na amina terminal com BOC. Utilizou-se HBTU como agente de acoplamento e procedeu-se à remoção do grupo protector BOC com TFA.

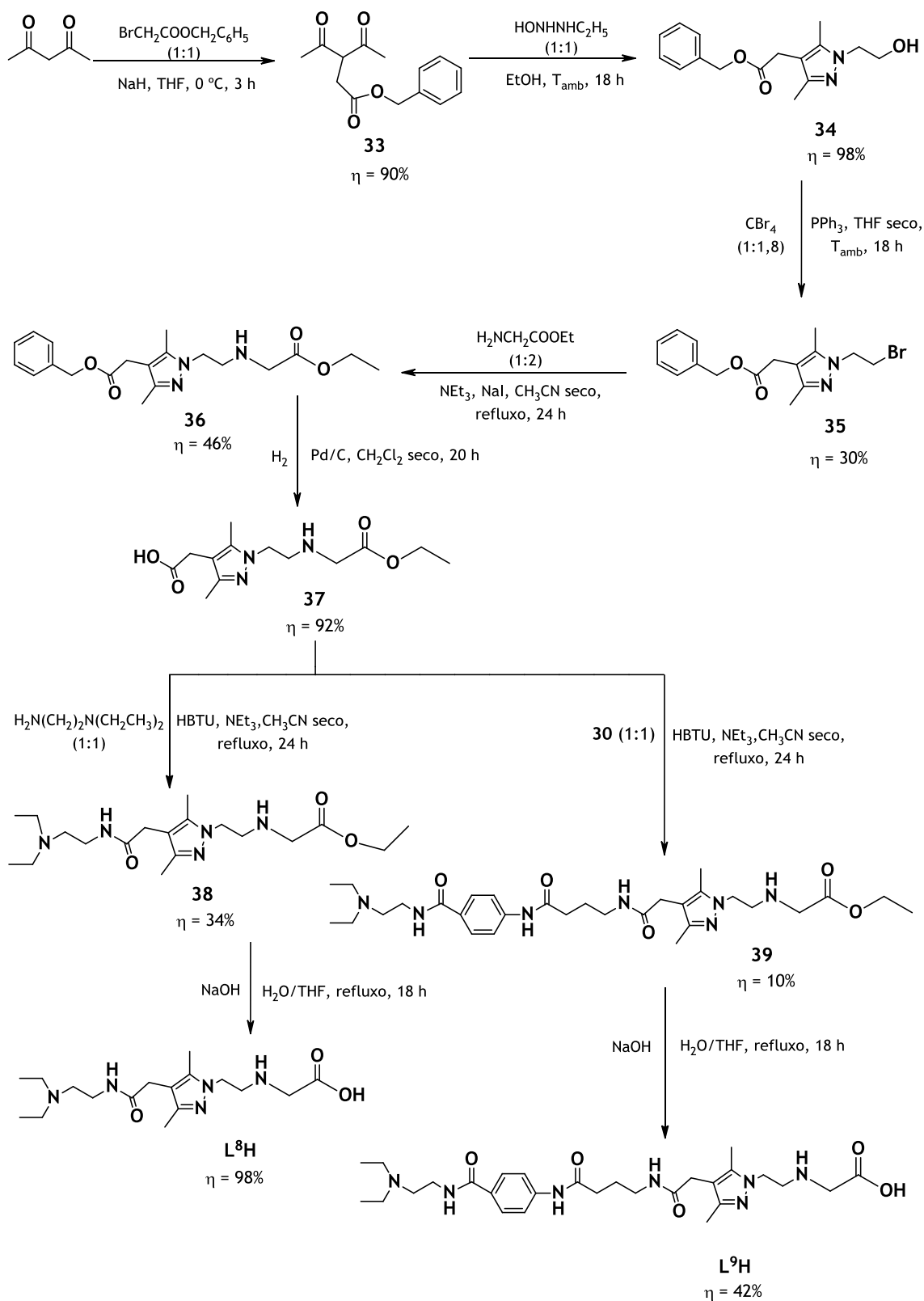


**Esquema 2.9.** Síntese do composto 4-(4-(aminobutanoiloxiamino)-N-(2-dietilamino)etil)benzamida (**30**)

Como indicado no esquema 2.10, a reacção do éster activado **27** com 2-aminoetildietilamina e com o composto **30** permitiu ligar com sucesso estas moléculas à estrutura do ligando pirazolo-diamina, através da posição 4 do anel de pirazolo. A remoção dos grupos BOC de **31** e **32** com excesso de TFA permitiu obter, de forma praticamente quantitativa, os ligandos finais **L<sup>6</sup>** e **L<sup>7</sup>**.

Esquema 2.10. Síntese dos compostos  $L^6$  e  $L^7$ 

A funcionalização dos ligandos pirazolo-aminocarboxílico através da posição 4 do anel de pirazolo foi efectuada utilizando uma estratégia relativamente semelhante à anteriormente descrita para os ligandos congéneres pirazolo-diamina, como se pode verificar pelas reacções que se apresentam no esquema 2.11. Esta estratégia de síntese baseou-se na utilização de um ligando pirazolo-aminocarboxílico, composto **36**, contendo uma função éster etílico e uma função éster benzílico. Esta protecção ortogonal dos grupos carboxílicos permitiu ligar selectivamente os derivados de benzamidas através da posição 4 do anel de pirazolo.



Esquema 2.11. Síntese dos ligandos finais L<sup>8</sup>H e L<sup>9</sup>H

A síntese do composto **36** foi iniciada com a reacção da 2,4-pentanodiona com bromoacetato de benzilo que levou à formação do composto **33** (esquema 2.11). A ciclocondensação deste composto com a hidroxietilhidrazina originou um derivado hidroxietilpirazolo (**34**) que foi bromado com  $\text{PBr}_3$ . A N-alquilação do composto resultante, **35**, com glicinato de etilo permitiu obter **36**. A hidrogenação de **36** na presença do catalisador Pd/C removeu selectivamente o éster benzílico presente na posição 4 do anel de pirazolo, levando à formação do composto **37** que foi em seguida utilizado para ligação dos derivados das benzamidas. Essa ligação foi efectuada por reacção de **37**, após activação com HBTU em meio básico, com 2-aminoetildietilamina ou com o composto **30**, tendo conduzido aos compostos funcionalizados **38** e **39**, respectivamente. A hidrólise básica da função éster etílico de **38** e **39** levou à obtenção dos ligandos finais  $\text{L}^8\text{H}$  e  $\text{L}^9\text{H}$ .

### *Caracterização dos Ligandos*

Os compostos  $\text{L}^2\text{-L}^9\text{H}$  são óleos amarelos, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. A sua caracterização envolveu a espectroscopia de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2-D), análise elementar e HR-ESI/MS.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos ligandos  $\text{L}^2\text{-L}^9\text{H}$  revelaram-se consistentes com as estruturas propostas. A atribuição dos diferentes sinais presentes nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  destes compostos baseou-se em experiências 2D ( $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$  g-COSY e  $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$  g-HSQC). Em particular, a realização de experiências 2D permitiu identificar, na maior parte dos casos, as ressonâncias devidas aos diferentes carbonos e protões metilénicos presentes na estrutura dos ligandos. A título de exemplo, apresentam-se nas figuras 2.16-2.18 os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$  g-HSQC obtidos para o ligando  $\text{L}^5\text{H}$ , incluindo a atribuição proposta para os diferentes sinais.

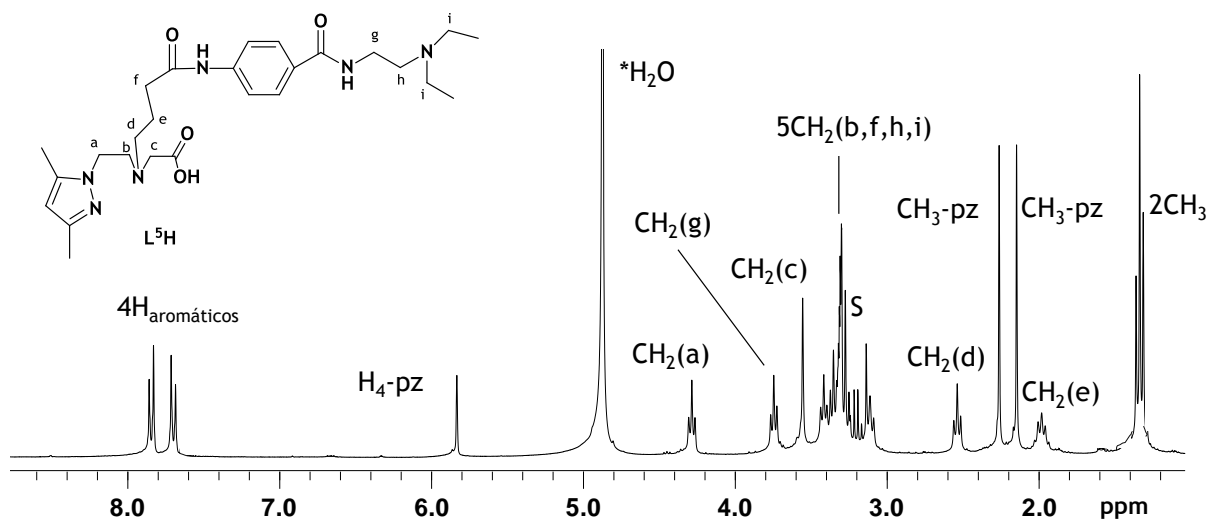


Figura 2.16. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de L<sup>5</sup>H em CD<sub>3</sub>OD (\*- H<sub>2</sub>O residual; S - solvente)

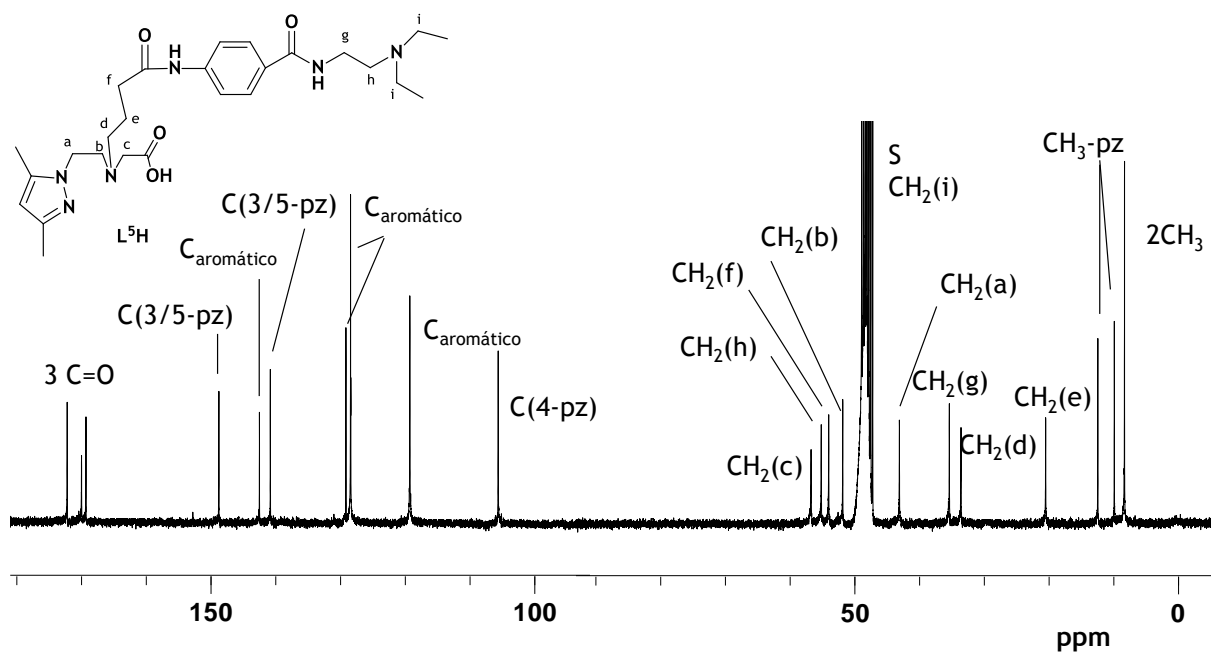


Figura 2.17. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de L<sup>5</sup>H em CD<sub>3</sub>OD (S - solvente)

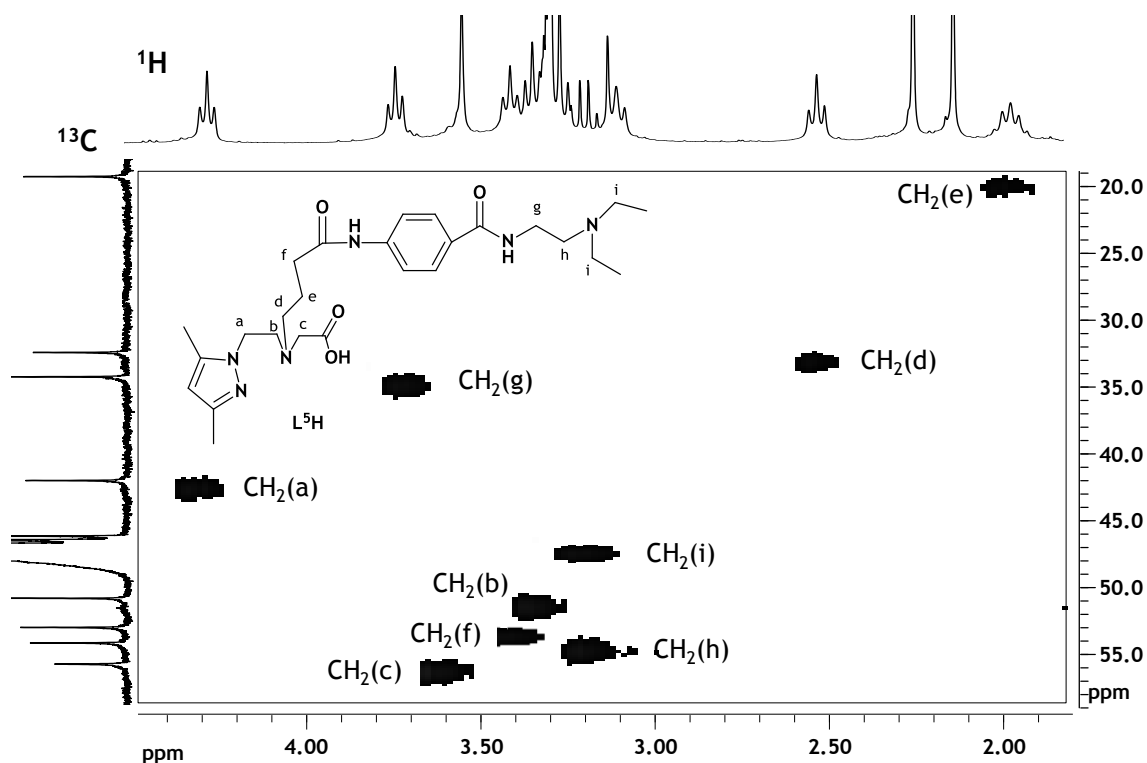
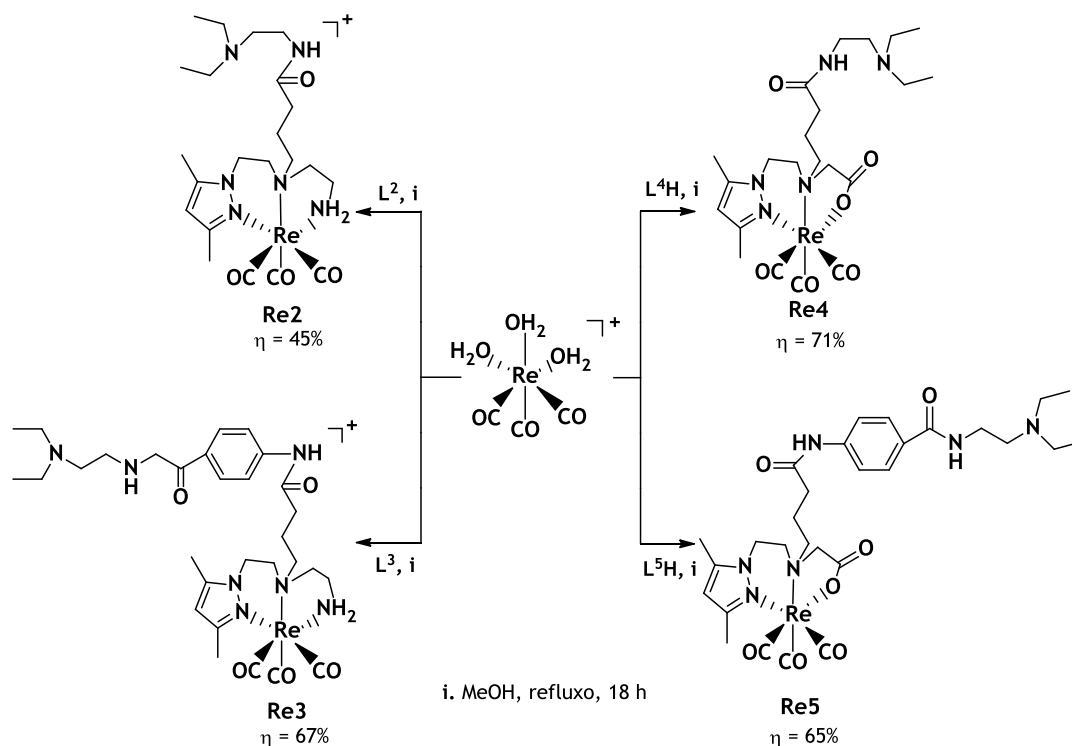


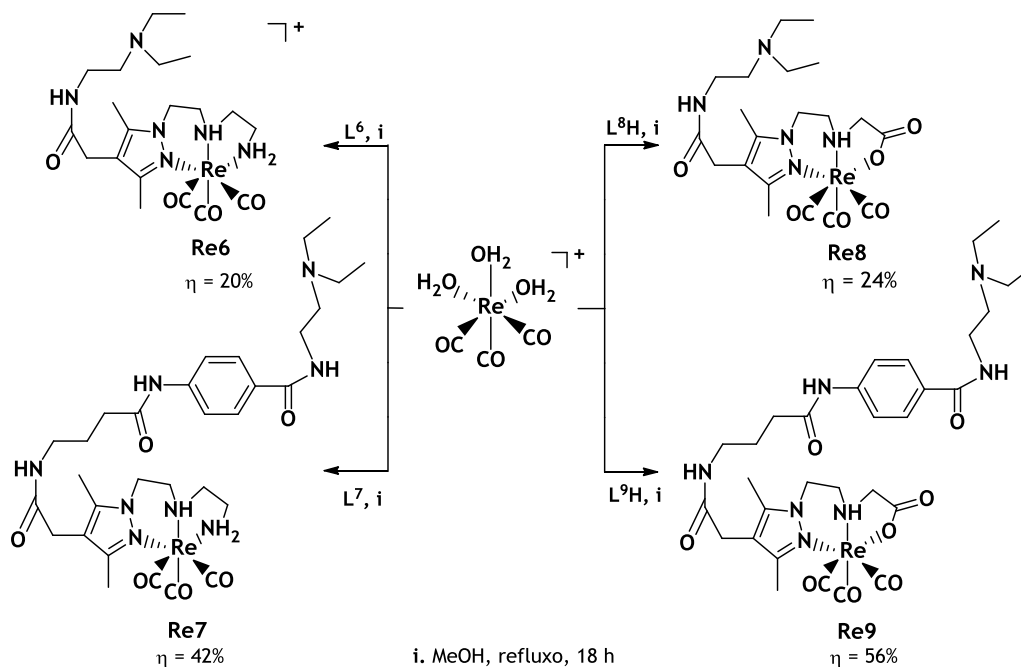
Figura 2.18. Espectro de  $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$  g-HSQC de  $\text{L}^5\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , na zona dos carbonos e prótons alifáticos

### 2.3.2. Síntese e caracterização dos complexos de rénio $\text{fac}[\text{Re}(\kappa^3\text{-L})(\text{CO})_3](\text{L} = \text{L}^2\text{-L}^9)$

Foram sintetizados complexos de rénio, **Re2-Re9**, com os ligandos funcionalizados através da amina central ( $\text{L}^2\text{-L}^5$ ) ou através da posição 4 do anel de pirazolo ( $\text{L}^6\text{-L}^9$ ), com o objectivo de os utilizar posteriormente na identificação química dos complexos congéneres de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Como indicado nos esquemas 2.12 e 2.13, a síntese dos complexos **Re2-Re9** foi efectuada por reacção dos compostos  $\text{L}^2\text{-L}^9\text{H}$  com o precursor  $\text{fac}[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$ , em metanol e com aquecimento à temperatura de refluxo. Ao fim de 18 h de reacção, as misturas reaccionais foram analisadas por HPLC, tendo-se verificado o consumo total do precursor  $\text{fac}[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  e a formação de uma nova espécie maioritária, correspondente aos complexos **Re2-Re9**. Para purificar os complexos **Re2-Re9** foi necessário recorrer a diferentes técnicas, tais como recristalização (**Re2**), lavagens com solventes orgânicos ou água (**Re3**, **Re4** e **Re7**), HPLC semi-preparativo (**Re6**) ou cromatografia em coluna de sílica-gel (**Re5**, **Re8** e **Re9**). Após purificação, os complexos foram isolados com rendimentos baixos a moderados (20-71%). Os rendimentos mais baixos são justificados pela perda dos compostos durante os processos de purificação, uma vez que a análise por HPLC das respectivas misturas reaccionais indicou que correspondiam às espécies maioritárias, como atrás mencionado.



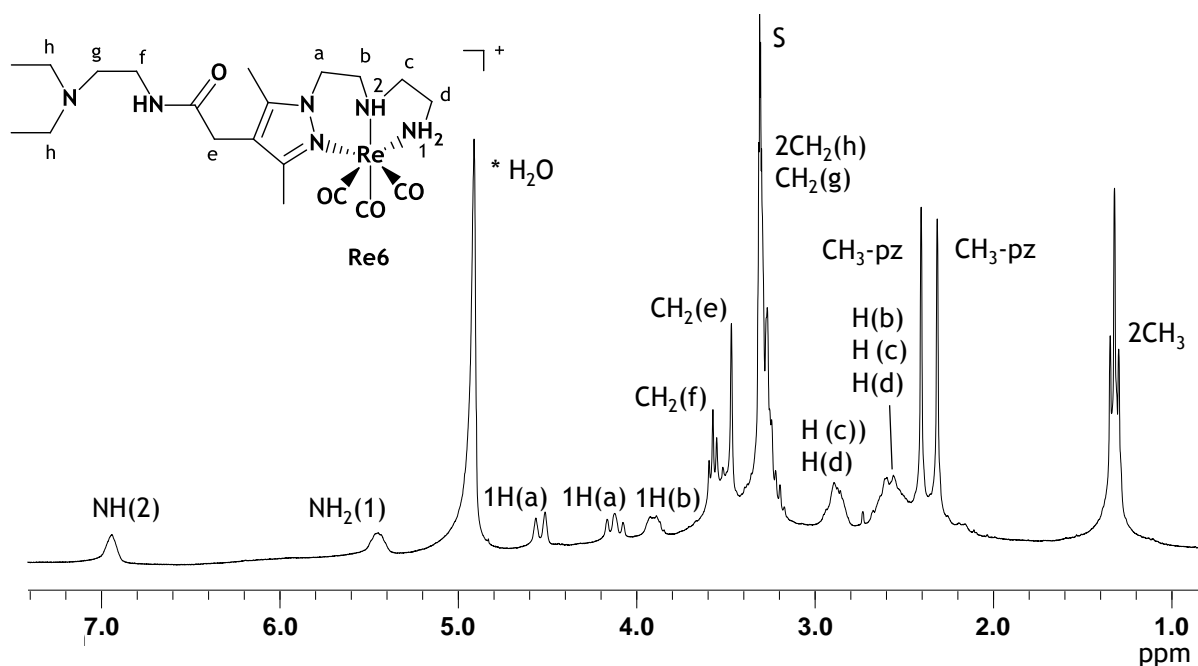
**Esquema 2.12.** Síntese dos complexos  $fac-[Re(\kappa^3-L)(CO)_3]^+$  ( $L = L^2-L^5$ ) (Re2-Re5), funcionalizados através da amina central



**Esquema 2.13.** Síntese dos complexos  $fac-[Re(\kappa^3-L)(CO)_3]^+$  ( $L = L^6-L^9$ ) (Re6-Re9), funcionalizados através do anel de pirazolo

Os complexos **Re2-Re9** foram obtidos na forma de sólidos microcristalinos (**Re2-Re5** e **Re8-Re9**) ou como óleos (**Re6-Re7**), de cor amarela ou branca. Apresentam uma grande estabilidade face à oxidação aeróbia e à hidrólise. São solúveis em meio aquoso e na maior parte dos solventes orgânicos polares. A caracterização destes complexos foi feita pelas técnicas analíticas usuais: IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , análise elementar e HR-ESI/MS.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para **Re2-Re9** são relativamente semelhantes, sendo as diferenças mais significativas resultantes da presença de diferentes derivados de benzamidas na estrutura dos compostos e da utilização de diferentes espaçadores. A título de exemplo, apresentam-se nas figuras 2.19 e 2.20 os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do complexo **Re6**. A atribuição dos sinais presentes nos espectros de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  dos compostos **Re2-Re9** baseou-se em experiências 2D de RMN (g-COSY e g-HSQC), apresentando-se na figura 2.21 o espectro bidimensional [ $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ] g-HSQC obtido para o complexo **Re6**.



**Figura 2.19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo de rênio **Re6** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (\*-  $\text{H}_2\text{O}$  residual; S - solvente)

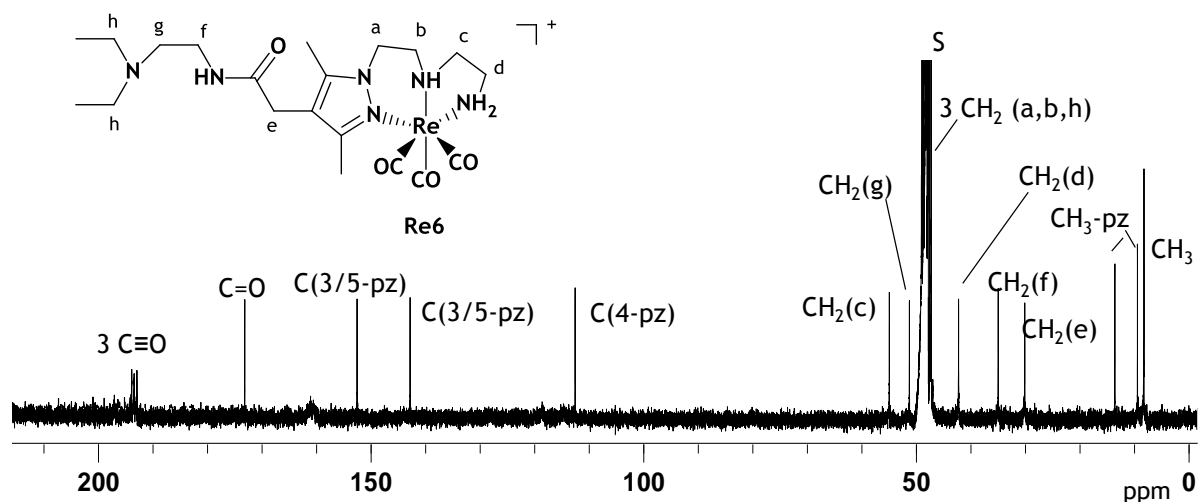


Figura 2.20. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo de rênio **Re6** em  $\text{CD}_3\text{OD}$

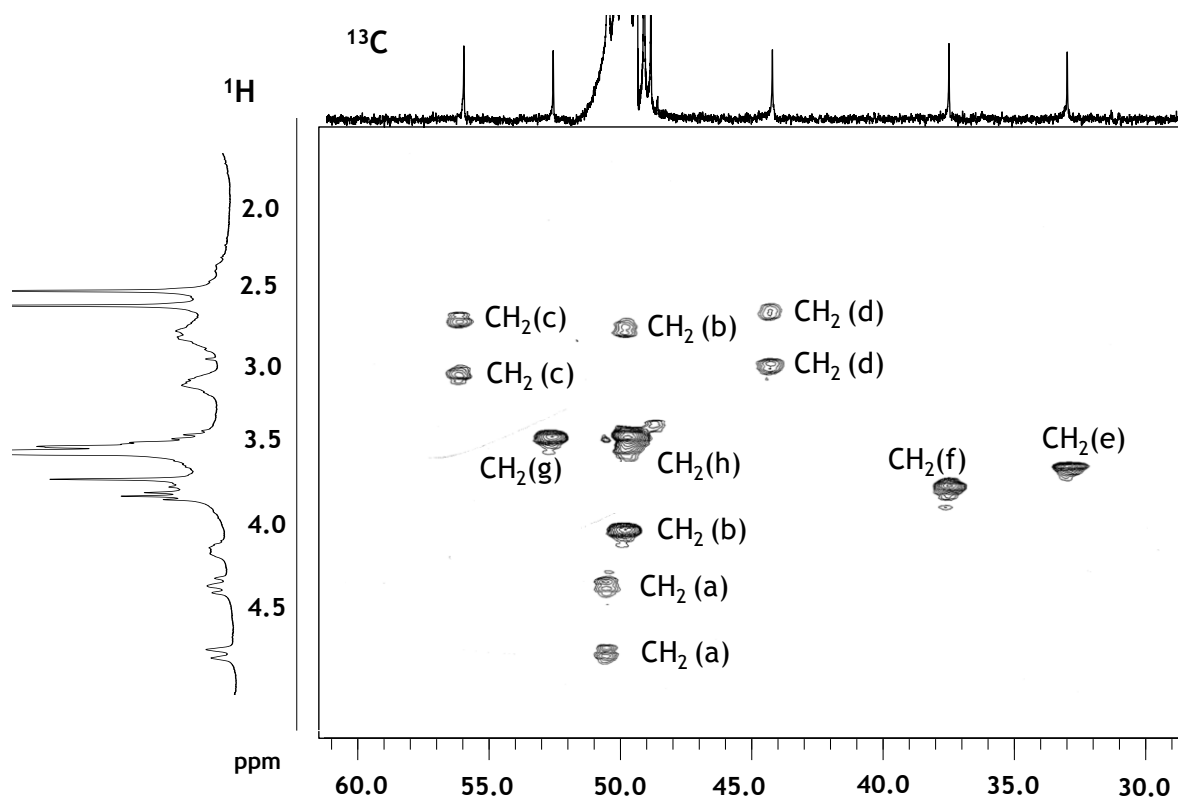


Figura 2.21. Espectro de RMN [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] g-HSQC do complexo **Re6** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , na zona dos grupos  $\text{CH}_2$

A característica mais relevante dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos **Re2-Re9** é a presença de um conjunto de multipletos devidos aos prótons dos grupos  $\text{CH}_2$  das cadeias alifáticas  $\text{pz}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  (**Re2**, **Re3**, **Re6** e **Re7**) e  $\text{pz}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COO}$  (**Re4**, **Re5**, **Re8** e **Re9**). Exceptuando alguma sobreposição ocasional, cada grupo  $\text{CH}_2$  origina dois sinais, integrando cada um deles para um próton, como exemplificado para **Re6** nas figuras 2.19 e 2.21. Este padrão de desdobramento é consistente com o carácter diastereotópico

destes prótons metilénicos e corrobora a coordenação tridentada ( $\kappa^3$ -N,N,N) ou ( $\kappa^3$ -N,N,O) dos ligandos, como verificado para outros complexos tricarbonilo de Re(I) com ligandos pirazolo-diamina ou pirazolo-aminocarboxílico que se encontram descritos na literatura.<sup>55,60,184</sup>

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **Re2-Re9** apresentam os sinais previstos, exceptuando nalguns casos a ausência de algumas ressonâncias dos grupos  $\text{CH}_2$  devido à sua sobreposição com o sinal do solvente. Como se pode verificar no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **Re6** (figura 2.20), os ligandos CO destes complexos de rênio originam três ressonâncias entre 190,72 e 197,80 ppm, o que reflecte a baixa simetria dos complexos. Em geral, as ressonâncias dos carbonos metilénicos das cadeias  $\text{pz}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  e  $\text{pz}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COO}$  dos ligandos bifuncionais coordenados encontram-se desviadas para campo baixo em relação às ressonâncias dos mesmos átomos de carbonos dos correspondentes ligandos livres. Por sua vez, as ressonâncias dos átomos de carbono dos grupos benzamida ou seus fragmentos apresentam desvios químicos semelhantes para os complexos e para os respectivos ligandos livres. Em suma, os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos complexos **Re2-Re9** também são consistentes com uma coordenação tridentada dos ligandos bifuncionais, através do azoto do anel pirazolilo, do átomo de azoto da amina central e ainda do azoto da amina terminal (**Re2**, **Re3**, **Re6** e **Re7**) ou do oxigénio do carboxilato (**Re4**, **Re5**, **Re8** e **Re9**).

A caracterização dos complexos **Re2-Re9** por espectroscopia de IV permitiu confirmar a presença da unidade  $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$  uma vez que os respectivos espectros IV apresentaram duas bandas  $\nu(\text{C}\equiv\text{O})$ , na gama de frequências  $1909\text{-}2032\text{ cm}^{-1}$ , devidas às vibrações de estiramento dos ligandos CO. Os valores destas frequências são comparáveis aos valores apresentados por outros complexos tricarbonilo de Re(I) com ligandos pirazolo-diamina ou pirazolo-aminocarboxílico descritos na literatura.<sup>55,60</sup> Para os complexos **Re4**, **Re5**, **Re8** e **Re9**, os respectivos espectros de IV permitiram confirmar a coordenação do grupo terminal carboxilato, uma vez que apresentam uma banda entre  $1645\text{ e }1677\text{ cm}^{-1}$  devido à vibração de extensão  $\nu(\text{C}=\text{O})$ .<sup>54,185</sup> A título de exemplo, apresenta-se na Figura 2.22 o espectro de IV do complexo **Re6**.

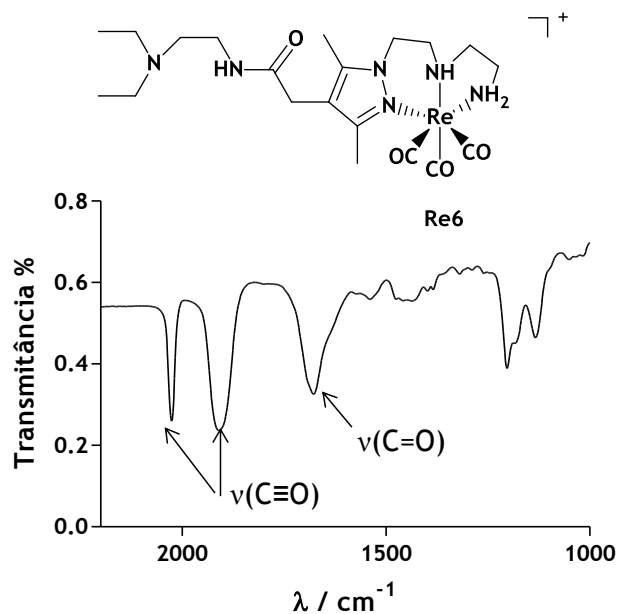


Figura 2.22. Espectro de IV do complexo Re6, em pastilhas de KBr

A espectrometria de massa confirmou a formulação proposta para os complexos Re2-Re9 observando-se picos com valores de  $m/z$  correspondentes aos respectivos iões moleculares, como exemplificado com o espectro do complexo Re4 que se apresenta na Figura 2.23.

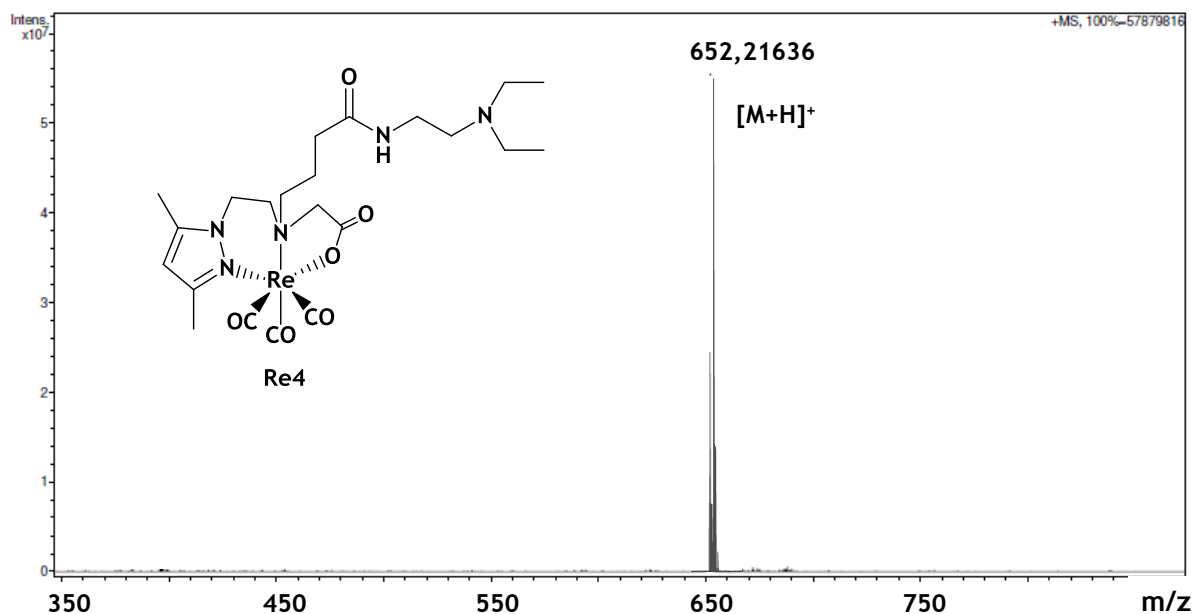
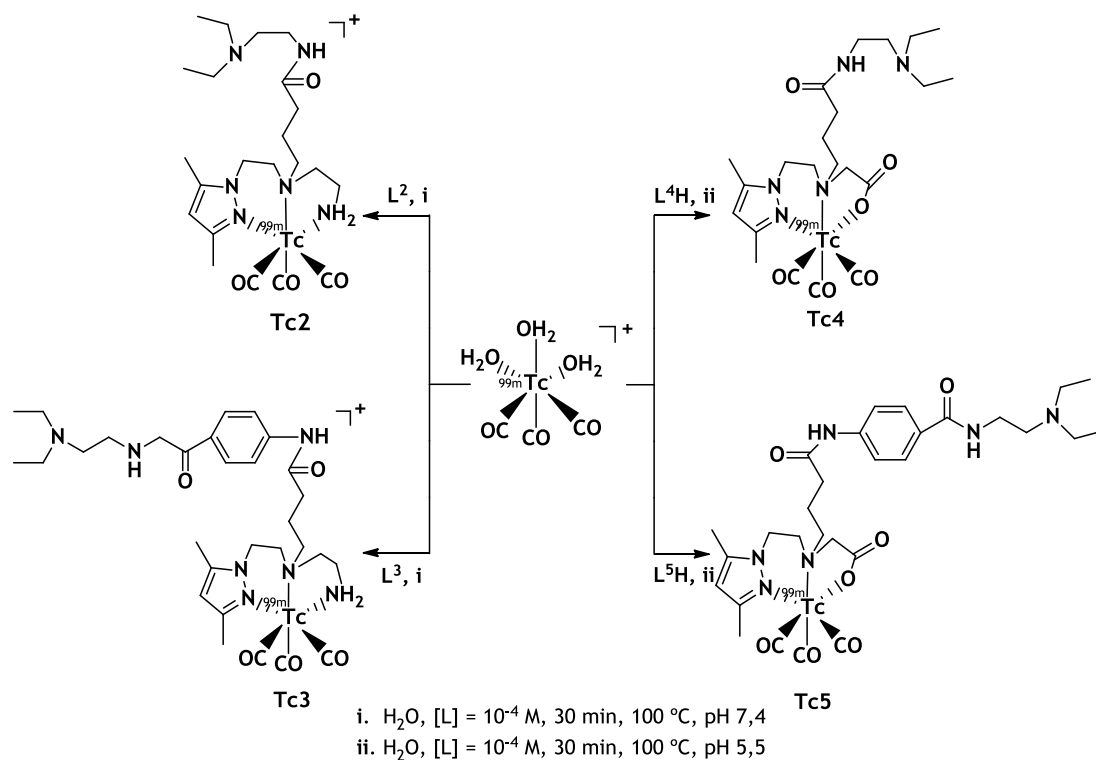


Figura 2.23. Espectro de massa do complexo Re4 (HR ESI-MS; modo positivo)

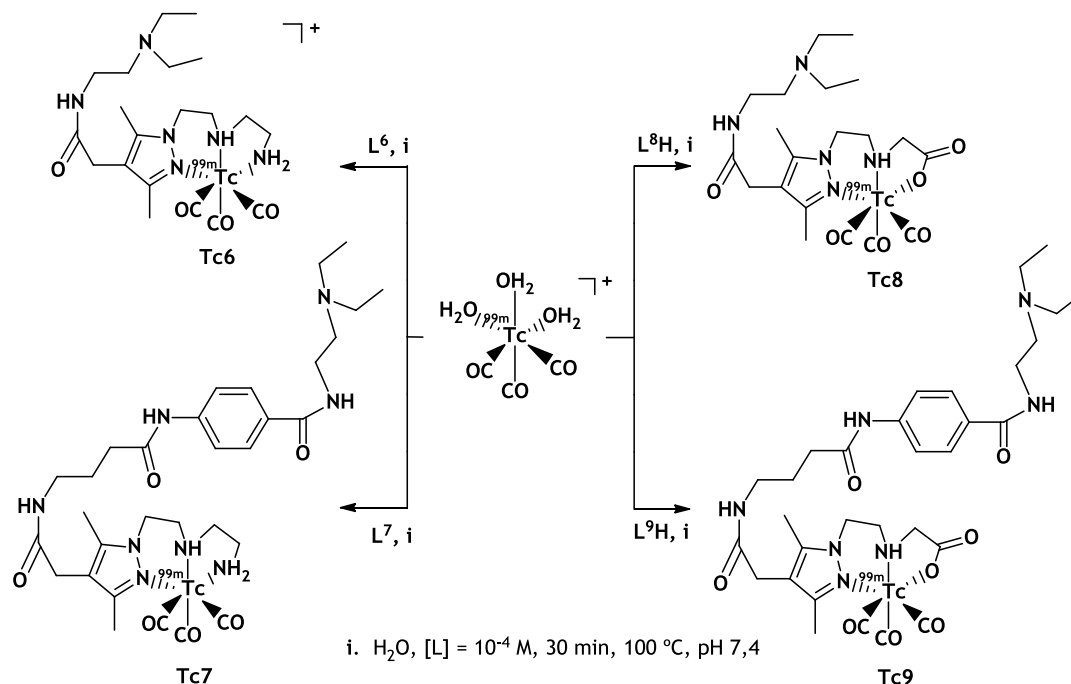
### 2.3.3. Síntese, caracterização e avaliação biológica dos complexos $fac-[^{99m}Tc(\kappa^3-L)(CO)_3]$ ( $L = L^2-L^9$ )

#### 2.3.3.1. Síntese e caracterização

Os complexos de  $^{99m}Tc$  (Tc2-Tc9) foram obtidos com rendimentos elevados ( $\geq 95\%$ ) por reacção dos respectivos ligandos ( $L^2-L^9H$ ) com o aquo-complexo  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ , utilizando concentrações finais de ligando de  $1 \times 10^{-4}$  M e efectuando as reacções com aquecimento a  $100^\circ C$  durante 30 min (esquemas 2.14 e 2.15).

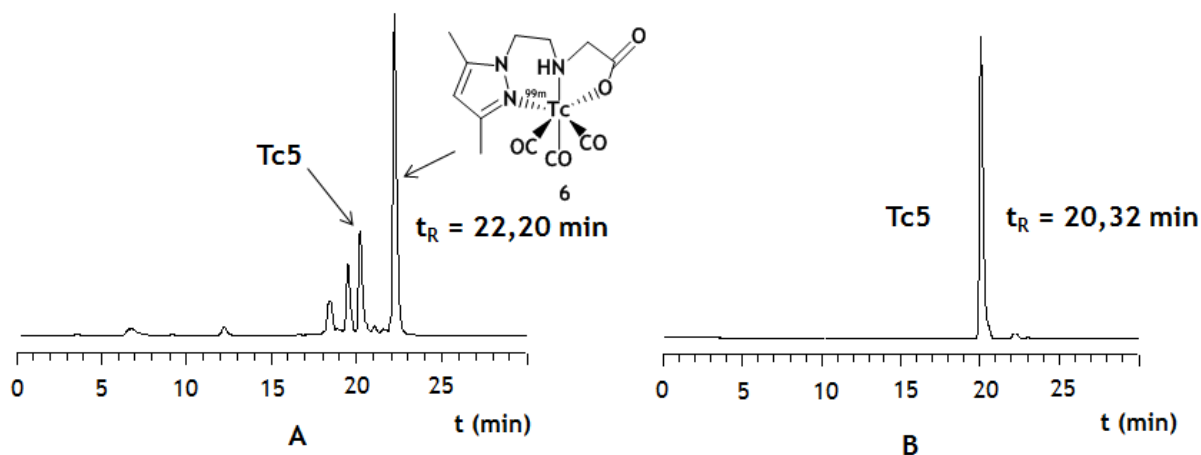


**Esquema 2.14.** Síntese dos complexos  $fac-[^{99m}Tc(\kappa^3-L)(CO)_3]$  ( $L = L^2-L^5$ ) (Tc2-Tc5), funcionalizados através da amina central



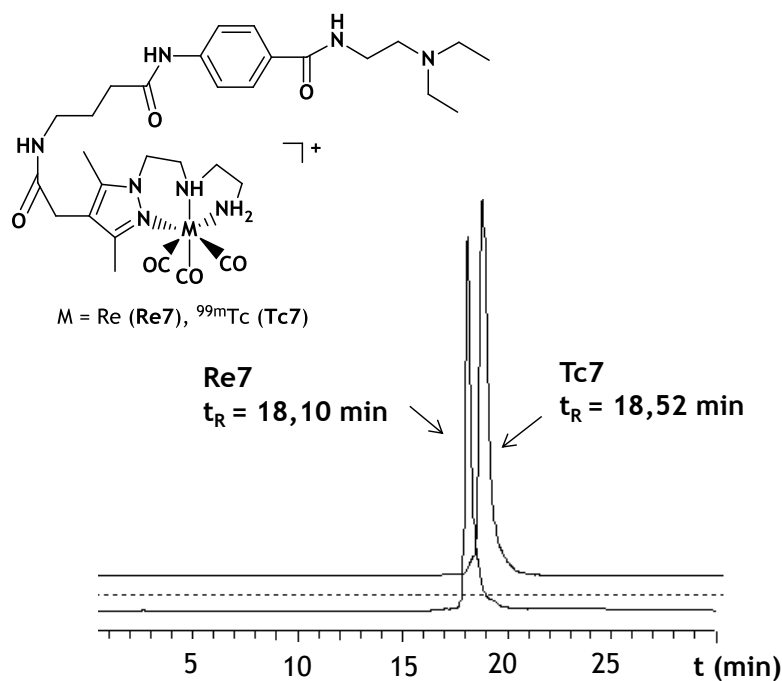
**Esquema 2.15.** Síntese dos complexos  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\kappa^3\text{-L})(\text{CO})_3]$  ( $\text{L} = \text{L}^6\text{-L}^9$ ) (Tc6-Tc9), funcionalizados através do anel de pirazolo

A síntese dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foi efectuada a pH 7,4, com excepção dos complexos contendo a unidade pirazolo-aminocarboxílico ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e funcionalizados através da amina central, Tc4 e Tc5. No caso de Tc4 e Tc5, as reacções a pH 7,4 foram acompanhadas pela formação de outras espécies radioquímicas, como exemplificado para Tc5 na figura 2.24A. Em particular, forma-se em maior percentagem uma impureza radioquímica ( $t_R = 22,20$  min) que foi identificada como correspondendo ao complexo  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(3,5\text{-Me}_2\text{pzCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COO})]$  (6) (figura 2.25).<sup>55</sup> Este complexo forma-se como resultado da hidrólise do espaçador propilénico utilizado para ligar os derivados das benzamidas aos ligandos bifuncionais. A ocorrência destes processos de hidrólise já havia sido observada durante a síntese de outros complexos de  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  com ligandos pirazolo-aminocarboxílico funcionalizados com outras biomoléculas, sendo muito provavelmente um processo mediado pelo metal.<sup>55</sup> A hidrólise foi evitada quando a síntese de Tc4 e Tc5 foi efectuada a pH 5,5. A este valor de pH os complexos foram obtidos com rendimentos superiores a 95%, como se pode constatar pela análise do cromatograma de HPLC da mistura reaccional do complexo Tc5 que se apresenta na figura 2.24B.



**Figura 2.24.** Cromatogramas de HPLC: A - Síntese do complexo Tc5 a pH 7,4 ; B - Síntese do complexo Tc5 a pH 5,5

Os complexos Tc2-Tc9 foram caracterizados por comparação dos seus tempos de retenção em HPLC (detecção  $\gamma$ ) com os tempos de retenção dos complexos análogos de Re (detecção UV). Verificou-se que cada par de complexos de Re e  $^{99m}\text{Tc}$  apresentaram tempos de retenção praticamente coincidentes (tabela 2.6), confirmando-se assim a identidade química dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ . A título de exemplo apresenta-se na figura 2.25, os cromatogramas obtidos após co-injecção dos complexos Re7 e Tc7.



**Figura 2.25.** Cromatogramas de HPLC obtidos por co-injecção dos complexos Re7 (detecção UV) e Tc7 (detecção  $\gamma$ )

**Tabela 2.6.** Tempos de retenção ( $t_R$ ) e valores de  $\log D_{o/w}$  para os complexos Tc2-Tc9

Complexo	$t_R$ (min)	Log $D_{o/w}$ (pH 7,4)
Tc2	17,88 (17,10) <sup>a</sup>	-0,38 ± 0,04
Tc3	18,50 (18,50) <sup>a</sup>	-0,29 ± 0,08
Tc4	19,40 (19,03) <sup>a</sup>	-0,16 ± 0,03
Tc5	20,32 (20,07) <sup>a</sup>	1,02 ± 0,02
Tc6	17,07 (16,53) <sup>a</sup>	-1,64 ± 0,01
Tc7	18,52 (18,10) <sup>a</sup>	-1,24 ± 0,05
Tc8	18,48 (18,18) <sup>a</sup>	-0,93 ± 0,01
Tc9	19,52 (19,18) <sup>a</sup>	-0,31 ± 0,01

<sup>a</sup> os valores indicados entre parêntesis referem-se aos complexos de Re

A caracterização dos complexos Tc2-Tc9 envolveu ainda a avaliação da sua lipofilia, apresentando-se na tabela 2.6 os valores de  $\log D_{o/w}$  a pH 7,4 determinados para os diferentes complexos. Com excepção de Tc5 ( $\log D_{o/w} = 1,02 \pm 0,02$ ), os restantes complexos são hidrofílicos com valores de  $\log D_{o/w}$  compreendidos entre -1,64 e -0,31. Os complexos catiónicos (Tc2, Tc3, Tc6 e Tc7) são mais hidrofílicos que os complexos neutros (Tc4, Tc5, Tc8 e Tc9) quando se apresentam funcionalizados com o mesmo derivado de benzamida. Como era de prever, a introdução do grupo procanamida contendo um anel benzénico (Tc3, Tc5, Tc7 e Tc9) torna os complexos mais lipofílicos comparativamente aos complexos congéneres funcionalizados com o fragmento mais pequeno (Tc2, Tc4, Tc6 e Tc8). No seu conjunto, os complexos apresentaram um carácter mais hidrofílico do que o esperado. Esse carácter hidrofílico reflecte certamente a protonação das aminas terciárias dos farmacóforos a pH fisiológico, não tendo sido compensado pela presença do fragmento organometálico.

### 2.3.3.2. Estabilidade *in vitro* e ligação à melanina

A avaliação *in vitro* dos complexos Tc2-Tc9 compreendeu o estudo da estabilidade *in vitro* em condições fisiológicas e ainda a determinação da afinidade dos compostos para a melanina. A análise por HPLC demonstrou que os complexos Tc2-Tc9 são estáveis em condições fisiológicas (PBS, pH 7,4; 37 °C), não sofrendo qualquer tipo de degradação ao fim de 24 h.

A avaliação da afinidade *in vitro* dos complexos Tc2-Tc9 para o pigmento melanina foi efectuada através do estudo da ligação dos complexos à melanina sintética disponível comercialmente. Na literatura apenas se encontravam descritos estudos semelhantes para moléculas radioiodadas.<sup>102,104,107</sup> Assim, foi necessário otimizar diferentes parâmetros

experimentais (tempo de incubação, concentração de melanina, entre outros) no sentido de transpor a metodologia descrita na literatura para os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ .

A capacidade de ligação dos complexos à melanina foi determinada através da co-incubação dos complexos Tc2-Tc9 com uma suspensão de melanina sintética em água destilada, numa concentração de 0,5 mg de melanina por 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foram previamente purificados por HPLC a fim de remover o ligando livre que também apresenta afinidade para a melanina, tendo sido verificado que competia com o complexo na ligação ao pigmento. A ligação dos complexos à melanina apresenta uma cinética muito rápida, observando-se a mesma percentagem de ligação após 1 e 24 h de incubação. Assim, os ensaios *in vitro* da ligação de Tc2-Tc9 à melanina sintética envolveram a incubação a 37 °C dos compostos com o pigmento durante 1 h. Ao fim deste tempo e após tratamento adequado, foram retiradas alíquotas do sobrenadante que contém a fracção de complexo que não se liga à melanina. A diferença de actividade entre estas alíquotas e alíquotas de tubos de controlo aos quais foi adicionado cada complexo em estudo, nas mesmas condições experimentais mas sem melanina, permitiu calcular a percentagem que se ligou à melanina, como descrito com mais detalhe na parte experimental. Na tabela 2.7 apresentam-se os valores de percentagem de ligação à melanina determinados para os complexos Tc2-Tc9 e também para os complexos modelo *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\{3,5\text{-Mepz}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2\}]^+$ <sup>51</sup> (6) e *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\{3,5\text{-Mepz}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COO}\}]$ <sup>55</sup> (7) (figura 2.15). O estudo dos complexos modelo permitiu avaliar o efeito da introdução dos fragmentos procanamida e 2-aminoetildietilamina na afinidade dos complexos funcionalizados para a melanina.

**Tabela 2.7.** Percentagem de ligação à melanina dos complexos Tc2-Tc9 e dos complexos-modelo 6 e 7, após 1 h de incubação a 37 °C ([melanina] = 0,5 mg/10 mL)

Complexo	% ligação à melanina
Tc2	79 ± 5
Tc3	94 ± 2
Tc4	77 ± 4
Tc5	71 ± 3
Tc6	76 ± 2
Tc7	67 ± 5
Tc8	60 ± 5
Tc9	87 ± 7
6	70 ± 2
7	0

Os complexos Tc2-Tc9 apresentam uma ligação à melanina moderada a elevada, com valores compreendidos entre 60 e 94%. De uma maneira geral, observa-se que os complexos catiónicos apresentam uma percentagem de ligação superior aos complexos congéneres neutros. O complexo modelo catiónico  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3\{3,5-Mepz(CH_2)_2NH(CH_2)_2NH_2\}]^+$  (6) apresenta uma elevada ligação à melanina, sendo mesmo comparável à apresentada pelos complexos Tc6 e Tc7 que resultaram da funcionalização da sua estrutura com os derivados da benzamida através do anel de pirazolo. Pelo contrário, o complexo  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3\{3,5-Mepz(CH_2)_2NHCH_2COO\}]$  (7) não apresentou qualquer afinidade para a melanina, mas a sua funcionalização com os grupos procanamida e 2-aminoetildietilamina originou complexos (Tc4, Tc5, Tc8 e Tc9) com elevada afinidade para este pigmento. Como referido no capítulo introdutório, a melanina é um polímero amorfo de carga global negativa.<sup>70,120</sup> Estudos *in vitro* mostraram que a ligação de diferentes substratos à melanina envolve essencialmente forças de natureza electrostática e interacções hidrofóbicas, dependendo do tipo de compostos.<sup>70,120</sup> A elevada afinidade para a melanina encontrada para o composto  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3\{3,5-Mepz(CH_2)_2NH(CH_2)_2NH_2\}]^+$  (6) é certamente justificado pelo seu carácter catiónico que potencia o estabelecimento de forças electrostáticas, ao contrário do que acontece para  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3\{3,5-Mepz(CH_2)_2NHCH_2COO\}]$  (7) que tem um carácter neutro.

Como dito anteriormente, a ligação dos derivados de benzamidas à melanina envolve duas componentes principais: forças electrostáticas e interacções hidrofóbicas.<sup>70,120</sup> De modo a elucidar qual destas componentes seria predominante na interacção com a melanina dos complexos de  $^{99m}Tc$  descritos neste capítulo foram efectuados estudos adicionais que envolveram a incubação de alguns dos complexos com melanina na presença de n-propanol e a avaliação do efeito da lavagem com soluções de força iónica diferente. Os estudos efectuados na presença de n-propanol (33% em solução aquosa) pretendiam elucidar o eventual envolvimento de interacções hidrofóbicas, uma vez que é o tipo de interacções que este álcool estabelece com o pigmento. As experiências que envolveram lavagens com soluções de diferente força iónica (soluções de NaCl de concentrações crescentes: 0,016 M e 2 M), após incubação prévia dos complexos de  $^{99m}Tc$  com a melanina, deveriam indicar o envolvimento de forças electrostáticas na interacção dos complexos com a melanina. Para realizar estes estudos, escolheram-se apenas os compostos Tc2-Tc5, funcionalizados através da amina central, uma vez que se pretendia avaliar essencialmente a influência da presença dos diferentes farmacóforos (procanamida vs 2-aminoetildietilamina) e da carga dos complexos na interacção com a

melanina. Nestes ensaios, a percentagem de ligação à melanina foi calculada como atrás descrito e os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela 2.8.

**Tabela 2.8.** Percentagem de ligação à melanina na presença de n-propanol e após lavagem com soluções com diferentes forças iónicas, durante 1 h a 37 °C ([melanina] = 0,5 mg/10 mL)

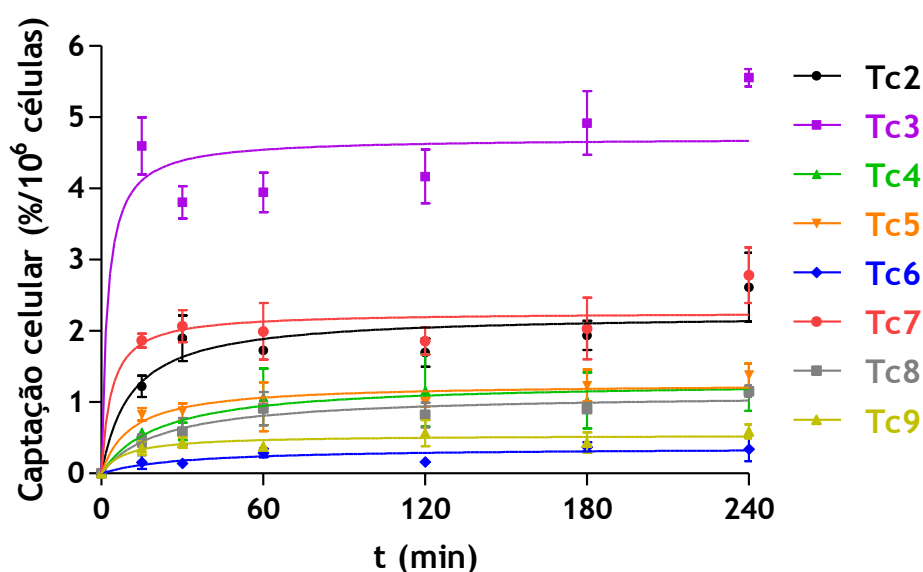
Composto	% ligação à melanina			
	H <sub>2</sub> O	n-propanol(33%)/H <sub>2</sub> O	1 <sup>a</sup> lavagem NaCl 0,016 M	2 <sup>a</sup> lavagem NaCl 2 M
Tc2	88 ± 6	79 ± 2	79 ± 5	23 ± 3
Tc3	94 ± 2	86 ± 5	76 ± 5	22 ± 2
Tc4	77 ± 4	30 ± 3	62 ± 4	49 ± 2
Tc5	71 ± 3	20 ± 2	60 ± 4	45 ± 5

Na presença de n-propanol, os complexos neutros (Tc4 e Tc5) sofrem um decréscimo pronunciado na sua percentagem de ligação à melanina que passa de valores da ordem dos 70-80% para valores da ordem dos 20-30%. Esta tendência não foi verificada para os complexos catiónicos, Tc2 e Tc3, cuja percentagem de ligação foi pouco afectada pela presença do n-propanol. Comparativamente aos complexos neutros, a percentagem de ligação dos complexos Tc2 e Tc3 foi mais afectada pela lavagem com soluções de NaCl de concentração crescente, diminuindo drasticamente após a lavagem com a solução de força iónica superior. Estes resultados indicam que a interacção com a melanina dos complexos catiónicos, Tc2 e Tc3, parece ser essencialmente de natureza electrostática. Por sua vez, para os complexos neutros Tc4 e Tc5 essa interacção parece ter predominantemente um carácter hidrofóbico.

### 2.3.3.3. Estudos de captação celular

Os estudos de captação celular permitem determinar a capacidade dos complexos atravessarem a membrana plasmática das células de modo a poderem interagir com a melanina localizada intracelularmente. Assim, procedeu-se à determinação da captação celular total dos complexos Tc2-Tc9 em células B16-F1 que correspondem a células de melanoma murino com elevados níveis de melanina.<sup>83</sup> Os ensaios foram efectuados por incubação dos complexos de <sup>99m</sup>Tc com as células em estudo segundo o protocolo descrito na parte experimental, o qual foi adoptado para os restantes estudos de captação celular que são descritos ao longo desta tese. De forma resumida, os complexos foram incubados com as células durante o período de tempo pretendido, em seguida removeu-se o meio de

cultura e procedeu-se à lavagem das células com uma solução de PBS frio. Esta lavagem permite remover os complexos radioactivos que não entraram nas células. Finalmente procedeu-se à lise das células com NaOH 1 M e mediu-se a actividade captada pelas células. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na figura 2.26. Antes da realização dos estudos de captação celular, avaliou-se a estabilidade *in vitro* dos complexos no meio de cultura das células. Após 4 h de incubação a 37 °C, a análise por ITLC-SG do meio de cultura contendo os complexos Tc2-Tc9 mostrou que estes não sofreram qualquer decomposição.



**Figura 2.26.** Captação celular\* dos complexos Tc2-Tc9 em células B16-F1 em função do tempo de incubação a 37 °C (\*expressa em percentagem da actividade total adicionada por milhão de células)

A percentagem de captação pelas células B16-F1 dos complexos Tc2-Tc9 foi relativamente baixa, com valores entre 0,07-5,56% da actividade total adicionada por milhão de células. De uma maneira geral, a lipofilia favorece a difusão passiva através da bicamada lipídica da membrana plasmática, quando associada a uma estrutura molecular adequada. Provavelmente, a baixa captação celular observada reflecte a hidrofília da maior parte dos complexos testados, sendo Tc5 ( $\log D_{o/w} = 1,02 \pm 0,12$ ) o único que apresentou um carácter lipofílico. No entanto, convém referir que Tc5 não foi o complexo que apresentou o maior valor de captação celular, o que foi observado para Tc3 ( $\log D_{o/w} = -0,29 \pm 0,08$ ) com uma captação celular de  $5,56 \pm 0,12\%$  após 4 h de incubação. Estes dados não permitem estabelecer uma clara correlação entre a lipofilia/hidrofília e a captação celular dos complexos, tendo em conta o número reduzido de complexos avaliados que apresentaram um carácter lipofílico.

#### 2.3.3.4. Biodistribuição e estabilidade *in vivo*

Os ensaios de biodistribuição dos complexos Tc2-Tc9 foram efectuados em ratinhos fêmea C57BL/6 (Charles River, 8-10 semanas, n = 4) com tumor induzido. Os tumores foram induzidos com células de melanoma murino B16-F1, de acordo com o procedimento descrito na parte experimental. Os resultados de biodistribuição foram calculados em percentagem de dose injectada por grama de órgão e encontram-se apresentados nas tabelas 2.9-2.10 e na figura 2.27.

Os complexos Tc2-Tc9 apresentaram uma depuração sanguínea rápida, observando-se uma actividade em circulação relativamente baixa (0,18-0,86% DI/g) ao fim de 4 h p.i.. De uma maneira geral, não se observou fixação significativa de actividade em nenhum órgão ou tecido, excepto nos órgãos relacionados com as vias de excreção. Em relação à via de eliminação, os complexos apresentam uma excreção renal e hepatobiliar, como evidenciado pela actividade captada pelos rins, fígado e intestino. Com excepção de Tc5, a actividade detectada ao nível do estômago para os complexos Tc2-Tc9 (entre 0,89-3,42% à 1h p.i.) pode ser considerada baixa, o que indica que estes compostos não sofrem processos de reoxidação a  $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ . O complexo Tc5 apresenta uma elevada retenção no estômago às 4 h p.i. ( $16,03 \pm 12,97\%$  DI/g órgão) sugerindo uma possível reoxidação a  $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$  ao longo do tempo. No entanto, como discutido a seguir, a análise de sangue e de urina de ratinhos injectados com Tc5 não permitiu detectar a presença de pertecnetato.

Os complexos Tc2-Tc9 apresentaram uma baixa fixação tumoral com valores compreendidos nos intervalos 0,24-1,21% (% DI/g) e 0,17-1,69 % (% DI/g), para 1 e 4 h p.i., respectivamente. Pode considerar-se que o complexo Tc7 é aquele que apresenta o perfil biológico mais favorável, apresentando a maior captação tumoral ( $1,69 \pm 0,39\%$  % DI/g às 4 h p.i.) e razões tumor/músculo e tumor/sangue relativamente elevadas, com valores de 28 e 5,3 às 4 h p.i., respectivamente.

**Tabela 2.9.** Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) dos complexos Tc2-Tc5

Órgão	Tempo de sacrifício							
	Tc2		Tc3		Tc4		Tc5	
	1 h	4 h	1 h	4 h	1 h	4 h	1 h	4 h
Sangue	0,70 ± 0,06	0,29 ± 0,03	0,53 ± 0,22	0,26 ± 0,19	1,02 ± 0,08	0,86 ± 0,68	0,33 ± 0,06	0,35 ± 0,05
Fígado	18,83 ± 6,48	10,24 ± 0,88	46,15 ± 5,98	34,09 ± 3,29	2,44 ± 0,05	2,07 ± 0,82	5,67 ± 1,01	1,37 ± 0,46
Intestino	15,35 ± 4,85	15,19 ± 2,82	16,14 ± 3,15	26,24 ± 5,81	12,94 ± 3,93	15,71 ± 2,39	38,86 ± 3,14	20,81 ± 14,29
Baço	2,45 ± 0,53	1,55 ± 0,91	1,61 ± 0,74	1,05 ± 0,25	0,39 ± 0,11	0,26 ± 0,08	0,17 ± 0,07	0,51 ± 0,31
Coração	1,77 ± 0,19	1,48 ± 0,07	0,40 ± 0,02	0,34 ± 0,05	0,47 ± 0,20	0,25 ± 0,06	0,13 ± 0,00	0,20 ± 0,03
Pulmões	0,92 ± 0,09	0,33 ± 0,14	0,69 ± 0,10	0,36 ± 0,04	0,75 ± 0,16	0,50 ± 0,20	0,27 ± 0,01	0,57 ± 0,20
Rins	18,52 ± 3,07	12,61 ± 1,04	6,93 ± 1,06	4,28 ± 0,33	2,40 ± 0,40	1,89 ± 0,62	0,93 ± 0,09	1,55 ± 0,35
Músculo	0,42 ± 0,01	0,28 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,17 ± 0,04	0,24 ± 0,15	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,01
Fémur	0,58 ± 0,13	0,36 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,13 ± 0,07	0,18 ± 0,02	0,25 ± 0,20	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,02
Estômago	1,37 ± 0,49	1,13 ± 0,15	3,42 ± 2,02	1,18 ± 0,38	2,29 ± 0,77	2,43 ± 1,42	2,24 ± 0,64	16,03 ± 12,97
Pâncreas	1,37 ± 0,10	0,77 ± 0,15	1,43 ± 0,92	0,11 ± 0,04	1,53 ± 1,26	0,43 ± 0,07	0,12 ± 0,04	0,18 ± 0,04
Olhos	1,09 ± 1,00	0,45 ± 0,19	-	-	0,84 ± 1,04	0,33 ± 0,12	0,13 ± 0,02	0,22 ± 0,06
Pele	0,80 ± 0,42	0,52 ± 0,12	0,56 ± 0,46	0,11 ± 0,06	0,33 ± 0,09	0,39 ± 0,07	0,17 ± 0,04	0,25 ± 0,04
Tumor	1,20 ± 0,08	0,87 ± 0,18	1,24 ± 0,27	0,60 ± 0,29	0,44 ± 0,16	0,45 ± 0,24	0,44 ± 0,22	0,54 ± 0,04
Excreção (% DI)	25,4 ± 7,0	44,4 ± 6,4	11,8 ± 1,0	18,0 ± 3,7	23,0 ± 4,1	23,8 ± 26,7	7,8 ± 2,3	39,0 ± 23,3

Tabela 2.10. Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) dos complexos Tc6-Tc9

Órgão	Tempo de sacrifício							
	Tc6		Tc7		Tc8		Tc9	
	1 h	4 h	1 h	4 h	1 h	4 h	1 h	4 h
Sangue	0,26 ± 0,03	0,20 ± 0,20	1,54 ± 0,28	0,32 ± 0,08	0,25 ± 0,05	0,18 ± 0,07	0,35 ± 0,02	0,20 ± 0,02
Fígado	26,24 ± 2,62	24,81 ± 0,68	26,94 ± 0,84	18,28 ± 1,24	3,36 ± 1,20	1,54 ± 0,17	4,70 ± 2,64	2,93 ± 2,79
Intestino	6,18 ± 0,97	9,28 ± 0,79	8,45 ± 1,41	16,87 ± 0,85	12,14 ± 1,37	16,03 ± 1,96	29,97 ± 4,88	34,87 ± 7,26
Baço	1,30 ± 0,75	0,86 ± 0,45	1,42 ± 0,12	1,40 ± 0,25	0,36 ± 0,10	0,38 ± 0,09	0,34 ± 0,05	0,29 ± 0,07
Coração	1,33 ± 0,34	1,17 ± 0,19	0,40 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,00
Pulmões	0,49 ± 0,14	0,44 ± 0,28	3,08 ± 1,85	0,51 ± 0,02	0,16 ± 0,07	0,18 ± 0,09	0,55 ± 0,37	0,17 ± 0,02
Rins	40,21 ± 4,95	34,42 ± 24,26	57,14 ± 4,79	16,65 ± 1,58	1,01 ± 0,18	0,67 ± 0,08	1,15 ± 0,06	0,62 ± 0,08
Músculo	0,15 ± 0,06	0,10 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,13 ± 0,09	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Fêmur	0,29 ± 0,04	0,17 ± 0,07	0,31 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,14 ± 0,08	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,00
Estômago	0,89 ± 0,41	0,68 ± 0,25	1,34 ± 0,61	0,34 ± 0,00	0,90 ± 0,42	0,25 ± 0,1	2,37 ± 1,10	0,24 ± 0,25
Pâncreas	0,41 ± 0,31	0,19 ± 0,04	0,69 ± 0,18	0,15 ± 0,01	0,75 ± 0,63	0,48 ± 0,07	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,05
Olhos	0,62 ± 0,45	0,23 ± 0,03	0,70 ± 0,21	0,31 ± 0,09	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,05	0,39 ± 0,10	0,28 ± 0,05
Pele	0,21 ± 0,06	0,10 ± 0,01	0,56 ± 0,09	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,05	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Tumor	1,00 ± 0,22	0,68 ± 0,23	1,21 ± 0,02	1,69 ± 0,39	0,24 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,17 ± 0,03
Excreção (% DI)	40,5 ± 4,8	44,6 ± 6,4	20,8 ± 7,7	44,8 ± 0,1	60,9 ± 0,8	69,7 ± 7,5	35,1 ± 2,3	38,0 ± 3,5

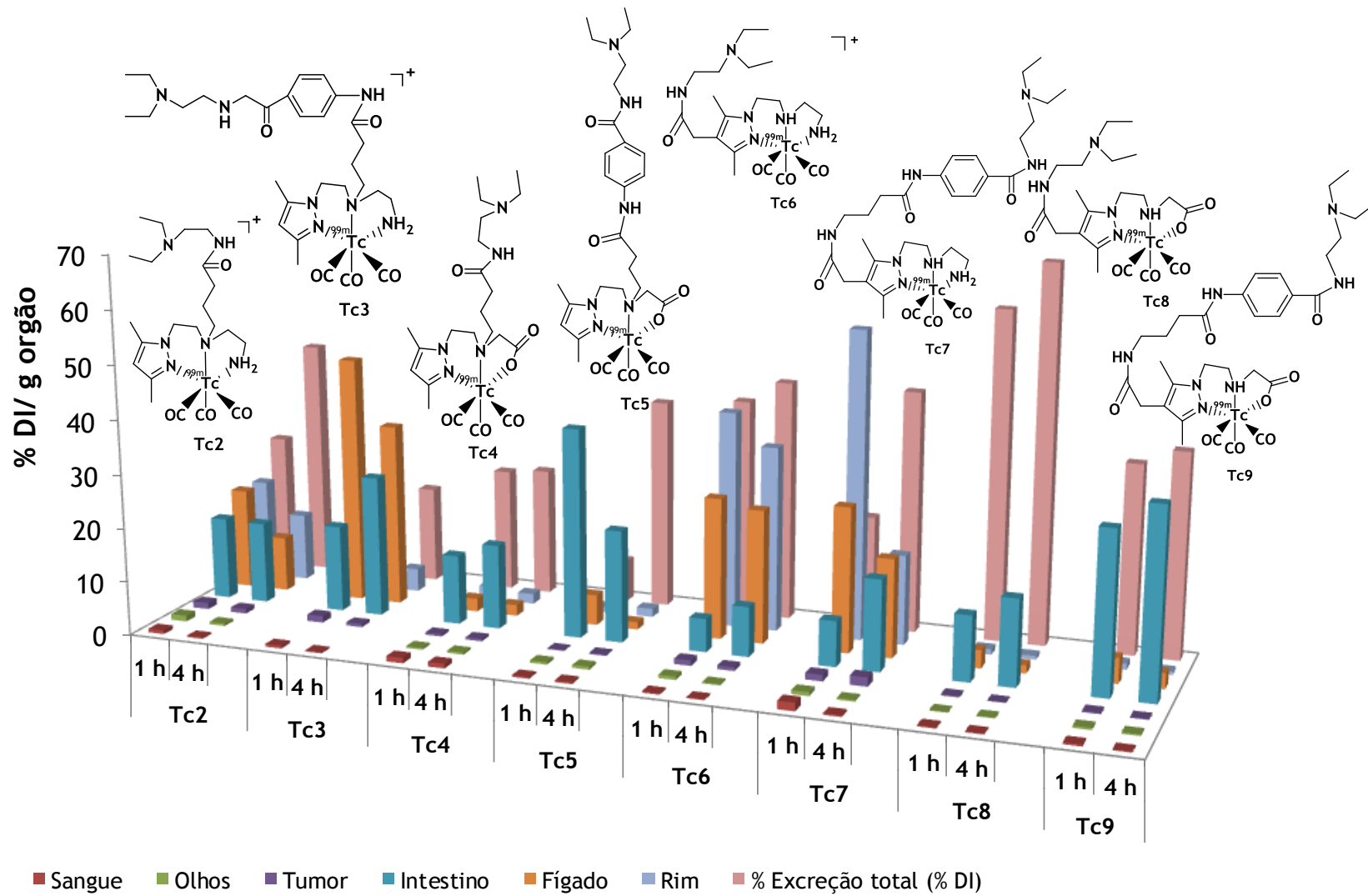
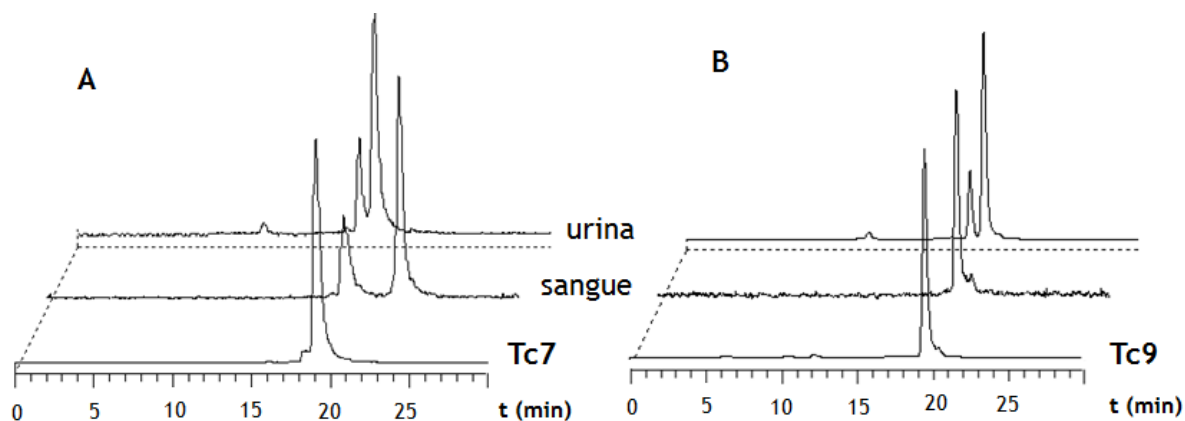


Figura 2.27. Fixação (% DI/g órgão) nos principais órgãos/tecidos e excreção total (% DI) dos complexos Tc2-Tc9

Foram ainda realizados estudos de estabilidade *in vivo* para os complexos Tc2-Tc9. Com excepção dos complexos Tc7 e Tc9, a análise por HPLC das amostras biológicas, após tratamento adequado, mostrou que a actividade presente na corrente sanguínea e na urina correspondia essencialmente aos complexos intactos. Estes resultados indicaram que os complexos em estudo apresentam, em geral, uma elevada estabilidade *in vivo*.



**Figura 2.28.** Cromatogramas de HPLC dos complexos Tc7 e Tc9 do sangue (A) e da urina (B), após 1 h de administração

No caso dos complexos Tc7 e Tc9, foi detectada a presença de metabolitos no sangue e/ou na urina, como se pode verificar pela análise dos cromatogramas de HPLC apresentados na figura 2.28. Para Tc7 foi detectado o complexo intacto ( $t_R=18,90$  min) na corrente sanguínea juntamente com outro complexo radioactivo com maior tempo de retenção ( $t_R=22,38$  min) e que surge em maior percentagem. O complexo Tc9, por sua vez, corresponde à espécie maioritária ( $\geq 95\%$ ) na corrente sanguínea. Para ambos os complexos, foi detectada na urina a presença de um metabolito, provavelmente com carácter mais hidrofílico, que apresentou tempos de retenção  $t_R=17,87$  e  $t_R=18,87$  min para Tc7 e Tc9, respectivamente. Tc7 e Tc9 apresentam como característica comum a presença de um espaçador propilénico para ligar o grupo 4-amino-N-(2-(dietilamino)etil)benzamida (procanamida) ao anel de pirazolo. Eventualmente, a formação dos metabolitos detectados na urina pode resultar da metabolização enzimática das ligações amida envolvidas na ligação do espaçador e da procanamida ao anel de pirazolo.

## 2.4. Conclusões

A primeira parte do capítulo incidiu sobre a síntese e caracterização de complexos de Re(I) com boratos de bis(azolilo) mistos, obtidos *in situ* por reacção do composto *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)<sub>2</sub>B(tim<sup>Me</sup>)}(CO)<sub>3</sub>] (1) com os pirazolos adequados. Este estudo permitiu obter com sucesso os complexos *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(pz)}(CO)<sub>3</sub>] (2), *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>pz)}(CO)<sub>3</sub>] (Re1) e *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -HB(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>-4-EtOOCCH<sub>2</sub>pz)}(CO)<sub>3</sub>] (4) que representam os primeiros exemplos de complexos de Re com boratos de bis(azolilo) contendo grupos 2-mercaptoimidazolilo e pirazolilo como funções coordenantes. A caracterização destes complexos por difracção de raios-X confirmou que os boratos de bis(azolilo) se coordenam ao centro metálico de forma tridentada através dos átomos de S, H e N. Seguidamente, estudou-se a possibilidade de preparar complexos análogos com <sup>99m</sup>Tc. Para esse efeito, sintetizou-se o composto Na[H<sub>2</sub>B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>pz)] (L<sup>1</sup>) e avaliou-se a sua capacidade de coordenação face à unidade *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> em meio aquoso, o que levou à síntese do complexo *fac*-[<sup>99m</sup>Tc{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>pz)}(CO)<sub>3</sub>] (Tc1). A avaliação *in vitro* de Tc1 confirmou que o composto apresenta uma elevada estabilidade em condições fisiológicas. No entanto, Tc1 sofre facilmente reacções de *trans*-quelatação com cisteína e histidina. O estudo da biodistribuição de Tc1 em ratinhos saudáveis mostrou que este complexo apresenta uma taxa de excreção muito lenta, com acumulação significativa de radioactividade na região abdominal. Estas características biológicas levaram-nos a considerar a estrutura de Tc1, ou de compostos relacionados, pouco adequada para ser usada na concepção de sondas radioactivas para detecção tumoral, nomeadamente para detecção do melanoma melanótico. Por esta razão, não se prosseguiu com a sua funcionalização com derivados de benzamidas ou seus fragmentos, como inicialmente previsto.

Na segunda parte do capítulo, efectuou-se a funcionalização de ligandos pirazolo-diamina e do tipo pirazolo-aminocarboxílico, explorados anteriormente no GCR, com derivados das benzamidas ou seus fragmentos (4-amino-N-(2-(dietilamino)etil)benzamida e 2-aminoetildietilamina). Os ligandos funcionalizados obtidos permitiram sintetizar uma família alargada de complexos do tipo *fac*-[M( $\kappa^3$ -L)(CO)<sub>3</sub>]<sup>0/+</sup> (L = L<sup>2</sup>-L<sup>9</sup>) (M=Re, <sup>99m</sup>Tc) estabilizados por ligandos tridentados (N,N,N) ou (N,N,O). Os complexos resultantes têm um carácter neutro ou catiónico e apresentam-se funcionalizados com os derivados de benzamida através da amina central do ligando ou da posição 4 do anel de pirazolo. Os complexos de Re (Re2-Re9) foram caracterizados pelas técnicas usuais em química (IV, RMN, ESI-MS, análise elementar) e utilizados como compostos modelo para identificar os complexos congéneres de <sup>99m</sup>Tc (Tc2-Tc9), mediante comparação do seu comportamento

em HPLC. Os complexos **Tc2-Tc9** apresentaram uma elevada estabilidade *in vitro* e, com excepção de **Tc5**, apresentaram um carácter hidrofílico. Todos apresentaram uma elevada afinidade *in vitro* para a melanina. Aparentemente, a interacção com a melanina envolve essencialmente forças electrostáticas no caso dos complexos catiónicos e interacções hidrofóbicas no caso dos complexos neutros. Estudos com células B16-F1 de melanoma murino mostraram uma captação celular relativamente baixa para os complexos **Tc2-Tc9**. Uma vez que estes complexos apresentaram uma elevada afinidade para a melanina, a baixa captação celular dos complexos reflecte provavelmente a sua incapacidade para atravessarem a membrana celular, devido ao seu carácter hidrofílico. Consistentemente, os estudos de biodistribuição em ratinhos com tumor induzido mostraram que **Tc2-Tc9** apresentam uma fixação tumoral relativamente baixa. Dos complexos estudados, **Tc7** foi aquele que apresentou uma captação tumoral superior, com razões tumor/sangue e tumor/músculo favoráveis que indicaram alguma selectividade para a sua acumulação no melanoma melanótico. No entanto, **Tc7** sofre degradação metabólica *in vivo* e a sua captação tumoral ainda é relativamente baixa. Por estas razões, mesmo o complexo **Tc7** não pode ser considerado uma sonda radioactiva promissora para detecção *in vivo* do melanoma melanótico.

# Capítulo 3

---

Complexos de Tc(I)/Re(I) com ligandos do tipo  $X-(CH_2)_nN(R)CH_2COO^-$  ( $X = 3,5$ -Me<sub>2</sub>pz, py, EtS-) contendo grupos do tipo N-alquilamina



### 3. Complexos de Tc(I)/Re(I) com ligandos do tipo X-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(R)CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> (X = 3,5-Me<sub>2</sub>pz, py, EtS-) contendo grupos do tipo N-alkilamina

---

---

#### 3.1. Introdução

---

Os resultados descritos no capítulo 2 demonstraram que era possível sintetizar complexos estáveis de <sup>99m</sup>Tc(I) do tipo *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(κ<sup>3</sup>-L)(CO)<sub>3</sub>]<sup>o/+</sup>, com ligandos contendo o grupo 3,5-dimetilpirazolilo como função coordenante e funcionalizados com benzamidas ou seus fragmentos. Os complexos estudados (Tc2-Tc9) apesar de revelarem uma elevada afinidade para a melanina, apresentaram de uma maneira geral uma baixa captação em células de melanoma murino B16-F1, assim como uma baixa fixação tumoral em ratinhos com tumores induzidos. Os baixos valores obtidos reflectem certamente a incapacidade dos complexos atravessarem a membrana celular, muito provavelmente como resultado do carácter hidrofílico da maior parte dos compostos testados.

Nos estudos descritos na literatura para outros complexos de <sup>99m</sup>Tc funcionalizados com derivados de benzamidas ou seus fragmentos não foi estabelecida uma correlação inequívoca entre a fixação tumoral e a lipofilia. No entanto, de uma maneira geral, verificou-se que os complexos com carácter hidrofílico e com maior massa molecular apresentavam em geral uma fixação tumoral inferior. Assim, na tentativa de obter complexos de <sup>99m</sup>Tc com características biológicas mais promissoras como sondas radioactivas para detecção do melanoma melanótico, decidimos estudar complexos similares aos descritos no capítulo anterior, mas que apresentassem uma menor massa molecular e um carácter mais lipofílico. Para obter compostos com estas características, focámo-nos em complexos neutros funcionalizados com os grupos N-dietilo e N-pirrolidina (figura 3.1) presentes na estrutura de muitos dos derivados de benzamidas que se mostraram promissores como sondas radioactivas para detecção do melanoma.<sup>101,106,132</sup> Nestes complexos, esperava-se que o quelato metálico mimetizasse a porção aromática das benzamidas, garantindo-se assim a redução do peso molecular. Utilizaram-se como ligandos bifuncionais ligandos doadores (N,N,O), do tipo pirazolo-aminocarboxílico e do tipo piridina-aminocarboxílico, e ligandos doadores (S,N,O) derivados da cisteamina, como indicado na figura 3.1. Ao estudar estas três classes de ligandos, tivemos em conta que deveriam formar complexos neutros e de reduzido peso molecular. No entanto, esses

complexos deveriam apresentar topologia e lipofilia variáveis, factores que podem ser determinantes da sua capacidade para atravessar a membrana celular das células de melanoma.

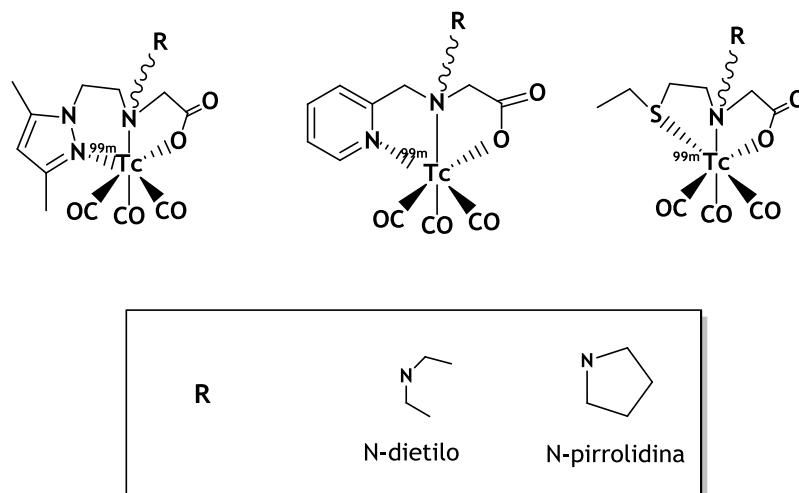


Figura 3.1. Estrutura das três classes de complexos descritos no capítulo 3

Os ligandos doadores (N,N,O), do tipo pirazolo-aminocarboxílico e do tipo piridina-aminocarboxílico, já haviam sido explorados como ligandos bifuncionais para estabilizar complexos com a unidade  $fac\text{-}[M(\text{CO})_3]^+$  ( $M=\text{Re}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ),<sup>55,58</sup> como visto no caso dos ligandos pirazolo-aminocarboxílicos no capítulo anterior. Pelo contrário, o ligando potencialmente tridentato doador (S,N,O) e derivado da cisteamina corresponde a um novo sistema cuja capacidade de coordenação face à referida unidade ainda não tinha sido avaliada. Assim, neste capítulo começa-se por descrever a síntese do composto  $[(\text{C}_2\text{H}_5)_5\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COOH}]$  ( $\text{L}^{10}\text{H}$ ) e os estudos efectuados para sintetizar e caracterizar os respectivos complexos tricarbonylo de  $\text{Re(I)}/^{99m}\text{Tc(I)}$ . Para o complexo de  $^{99m}\text{Tc(I)}$ , apresentam-se também os resultados do estudo da estabilidade (*in vitro/in vivo*) e da biodistribuição em modelos animais adequados. Estes estudos foram realizados com o objectivo de verificar se esta nova classe de doadores (S,N,O) apresentavam os requisitos necessários para serem usados como ligandos bifuncionais no desenvolvimento de sondas radioactivas para detecção do melanoma, com base na aproximação organometálica.

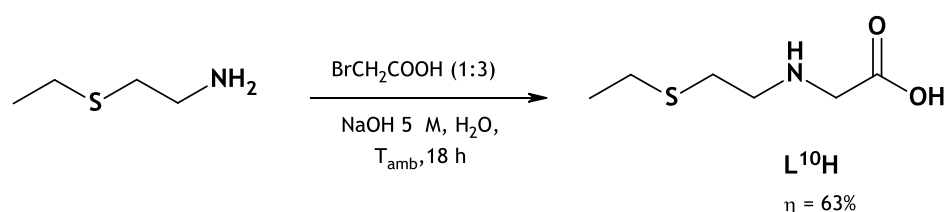
Descreve-se ainda a funcionalização das três classes de ligandos acima mencionadas com grupos N-diétilo e N-pirrolidina. Como indicado na figura 3.1, essa funcionalização foi efectuada através da amina central e conduziu a compostos do tipo  $\text{X}(\text{CH}_2)_n\text{N(R)CH}_2\text{COOH}$  ( $\text{X} = 3,5\text{-Me}_2\text{-pz}$ ,  $\text{py}$ ,  $\text{Et-S}$ ) que foram utilizados para preparar complexos tricarbonylo de  $^{99m}\text{Tc(I)}/\text{Re(I)}$ , cuja síntese e caracterização também são descritas neste capítulo. Este capítulo inclui ainda a discussão do comportamento biológico dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ , na perspectiva do seu interesse potencial como sondas radioactivas para

detecção *in vivo* do melanoma maligno. A avaliação destes complexos incluiu estudos *in vitro* (estabilidade e ligação à melanina), estudos de captação celular em células do melanoma murino B16-F1 e células amelanóticas A375 e ainda ensaios de biodistribuição em ratinhos com melanoma induzido. Como discutido adiante com mais detalhe, os receptores  $\sigma$  poderiam ser um alvo alternativo dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ , em particular no caso dos compostos funcionalizados com o grupo N-pirrolidina. Para tentar clarificar este aspecto, foram realizados estudos biológicos adicionais que envolveram a avaliação da expressão desses receptores nas linhas celulares utilizadas e ensaios de competição com haloperidol.

### 3.2. Síntese, caracterização e avaliação biológica dos complexos de $\text{Re(I)}/^{99m}\text{Tc(I)}$ estabilizados pelo ligando $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COO}^-]$ ( $\text{L}^{10}$ )

#### 3.2.1. Síntese e caracterização do composto $\text{L}^{10}\text{H}$ e do respectivo complexo de rénio

O composto  $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COOH}]$  ( $\text{L}^{10}\text{H}$ ) foi sintetizado num único passo, através da N-alkilação da 2-(etiltio)etanamina com ácido bromoacético na relação molar 1:3, em água e em meio básico, tal como indicado no esquema 3.1.



**Esquema 3.1.** Síntese do ligando  $\text{L}^{10}\text{H}$

$\text{L}^{10}\text{H}$  foi obtido com um rendimento de 63%, após neutralização a pH 6-7, evaporação e purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel.  $\text{L}^{10}\text{H}$  é um óleo amarelo, solúvel em solventes orgânicos polares e água, sendo estável à oxidação e hidrólise. A sua caracterização envolveu os métodos espectroscópicos usuais (IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e estudos 2-D), análise elementar e ESI-MS que forneceram dados consistentes com a formulação proposta, como se pode verificar pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  que se apresentam nas figuras 3.2 e 3.3, respectivamente.

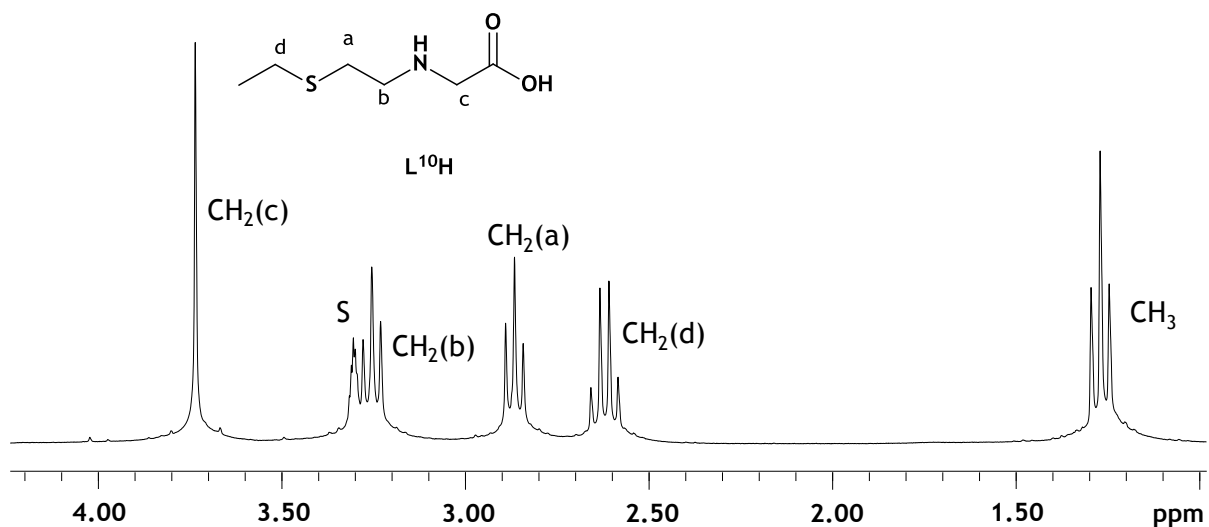


Figura 3.2. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ligando  $\text{L}^{10}\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente)

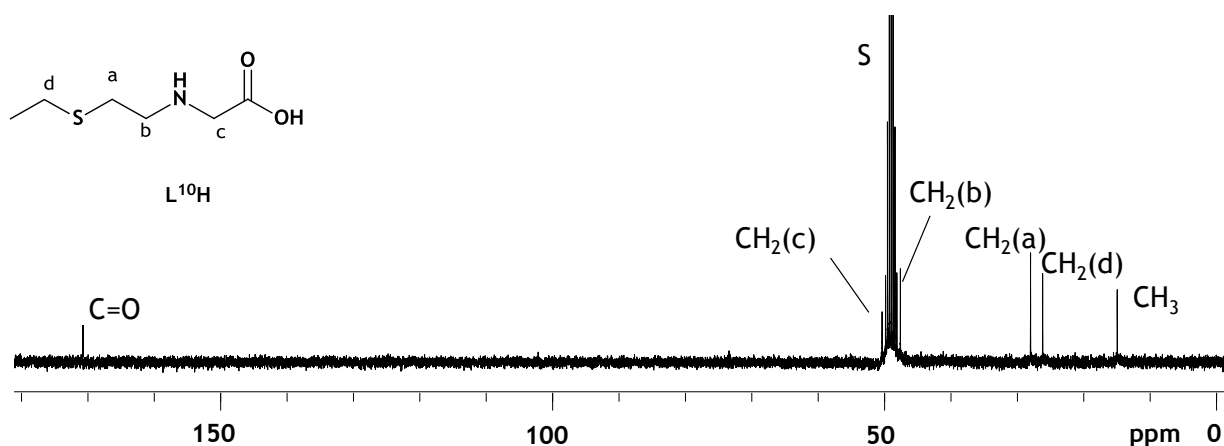
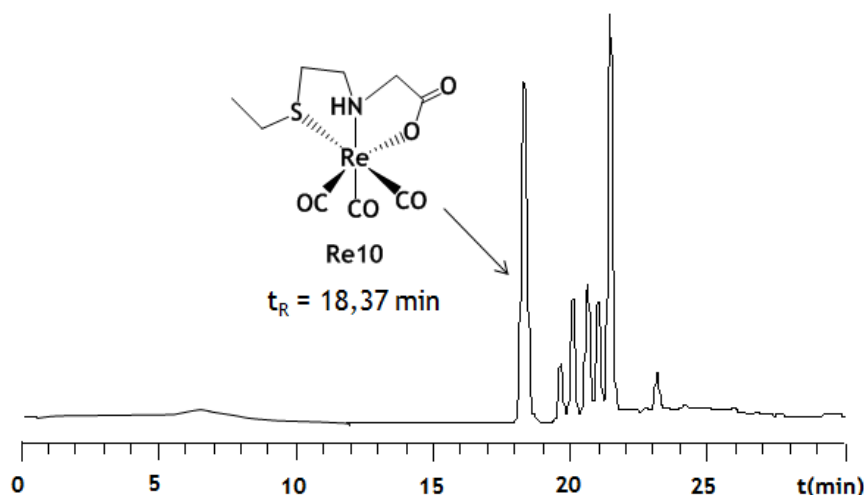
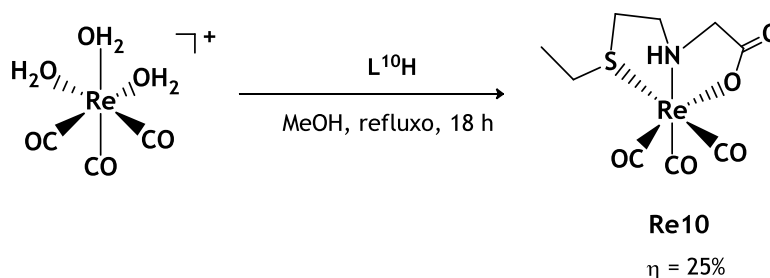


Figura 3.3. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ligando  $\text{L}^{10}\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente)

A reacção de ligando  $\text{L}^{10}\text{H}$  com o precursor  $\text{fac-}[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$  foi conduzida em metanol, à temperatura de refluxo, durante a noite. O controlo da reacção por HPLC mostrou o desaparecimento do sinal relativo ao ligando e o aparecimento de diferentes sinais com tempos de retenção superiores (figura 3.4). Após purificação por HPLC, a análise por ESI-MS confirmou que o pico com o tempo de retenção de 18,37 min correspondia ao complexo pretendido (**Re10**). O complexo **Re10** (esquema 3.2) foi obtido com um rendimento de 25%.



**Figura 3.4.** Cromatograma de HPLC da mistura reaccional obtida por reacção de  $L^{10}H$  com o precursor  $fac-[Re(H_2O)_3(CO)_3]Br$

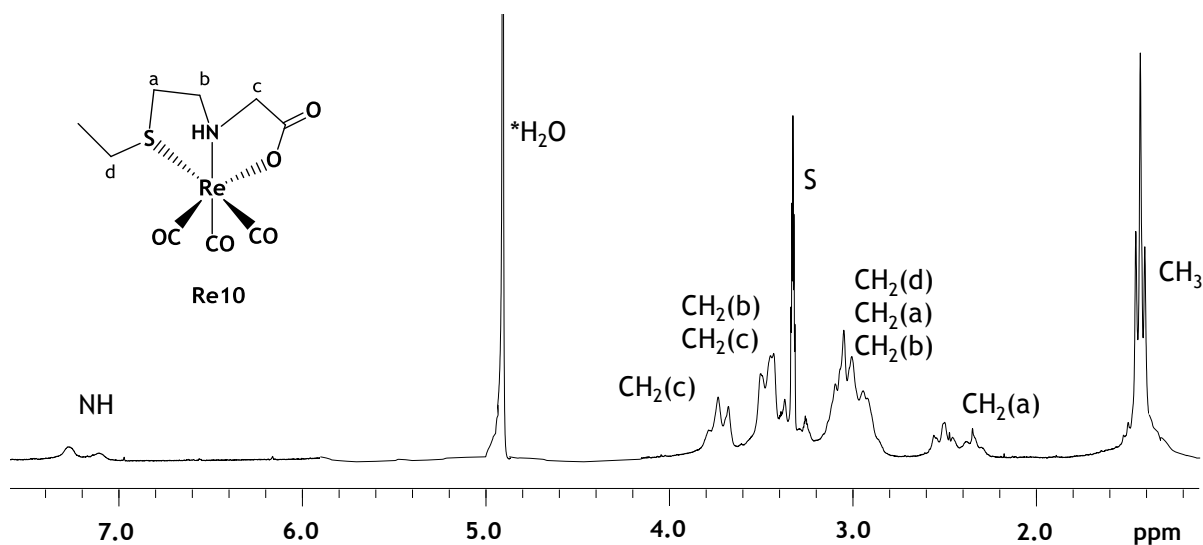


**Esquema 3.2.** Síntese do complexo **Re10**

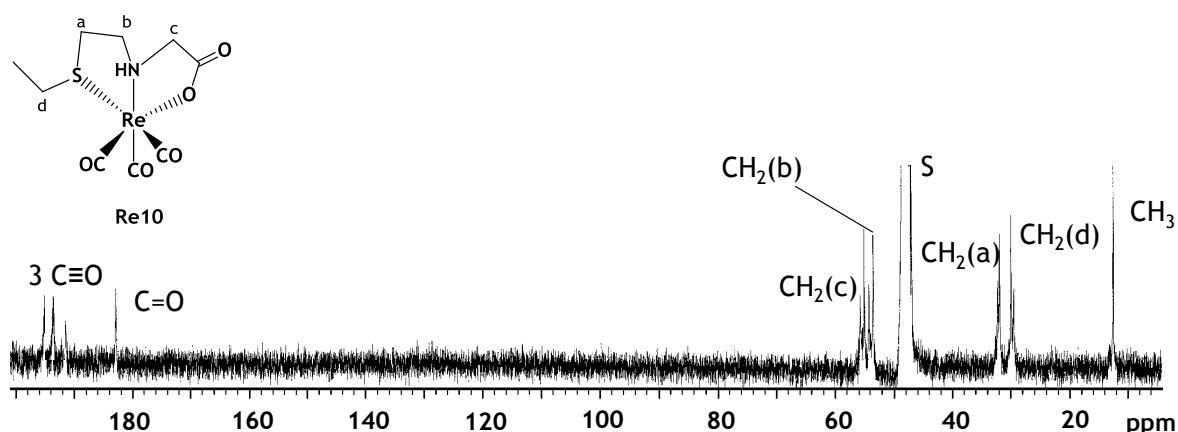
O complexo **Re10** revelou-se estável à hidrólise e oxidação aeróbia, é solúvel em solventes orgânicos polares, sendo insolúvel em água. A caracterização de **Re10** envolveu as técnicas espectroscópicas usuais (IV, RMN (1D e 2D) de  $^1H$  e de  $^{13}C$ ), análise elementar, ESI-MS e difracção de raios-X.

A caracterização de **Re10** por espectroscopia de IV permitiu confirmar a coordenação do ligando, em particular do grupo carboxilato, uma vez que a banda  $\nu(C=O)$  ( $1637\text{ cm}^{-1}$ ) aparece desviada comparativamente ao ligando livre ( $\Delta\nu = 56\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>54,55,185</sup> Há ainda a referir a presença de três bandas entre  $1876\text{-}2027\text{ cm}^{-1}$ , consistentes com a presença da unidade  $fac-[Re(CO)_3]^+$ .<sup>54,186,187</sup> No espectro de ESI-MS do complexo **Re10** observa-se um pico a  $m/z = 433,9$  que corresponde ao ião molecular  $[M+H]^+$  e apresenta o desdobramento previsto teoricamente.

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos à temperatura de 20 °C para **Re10** não permitiram inferir facilmente a estrutura do complexo em solução, como se pode verificar pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  que se apresentam nas figuras 3.5 e 3.6, respectivamente. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo **Re10** à temperatura de 20 °C apresenta sinais relativamente largos para a maior parte dos prótons, sendo possível identificar dois sinais para o grupo NH e dois sinais para cada um dos prótons metilénicos  $\text{CH}_2(\text{a})$  ligados ao átomo de enxofre. Para a mesma temperatura o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  também apresenta dois sinais para cada um dos grupos  $\text{CH}_2$  do complexo **Re10**. Estes dados indicaram a presença de duas espécies em solução envolvidas em processos de interconversão dinâmicos.



**Figura 3.5.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo **Re10** para  $T = 20\text{ °C}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (\*  $\text{H}_2\text{O}$  residual; S - solvente)



**Figura 3.6.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  do complexo **Re10** para  $T = 20\text{ °C}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente)

De modo a ter uma melhor compreensão sobre os processos dinâmicos em que se encontra envolvido o complexo **Re10**, foram efectuados estudos de RMN de  $^1\text{H}$  de

temperatura variável, entre  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , apresentando-se na figura 3.7 os espectros obtidos para algumas das temperaturas estudadas. Foi ainda traçado o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Re10 à temperatura de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (figura 3.8). A atribuição dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , proposta nas figuras 3.7 e 3.8, foi efectuada com base em experiências bidimensionais de  $[\text{}^1\text{H}, \text{}^1\text{H}]$  g-COSY e  $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C}]$  g-HSQC, realizadas às temperaturas de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

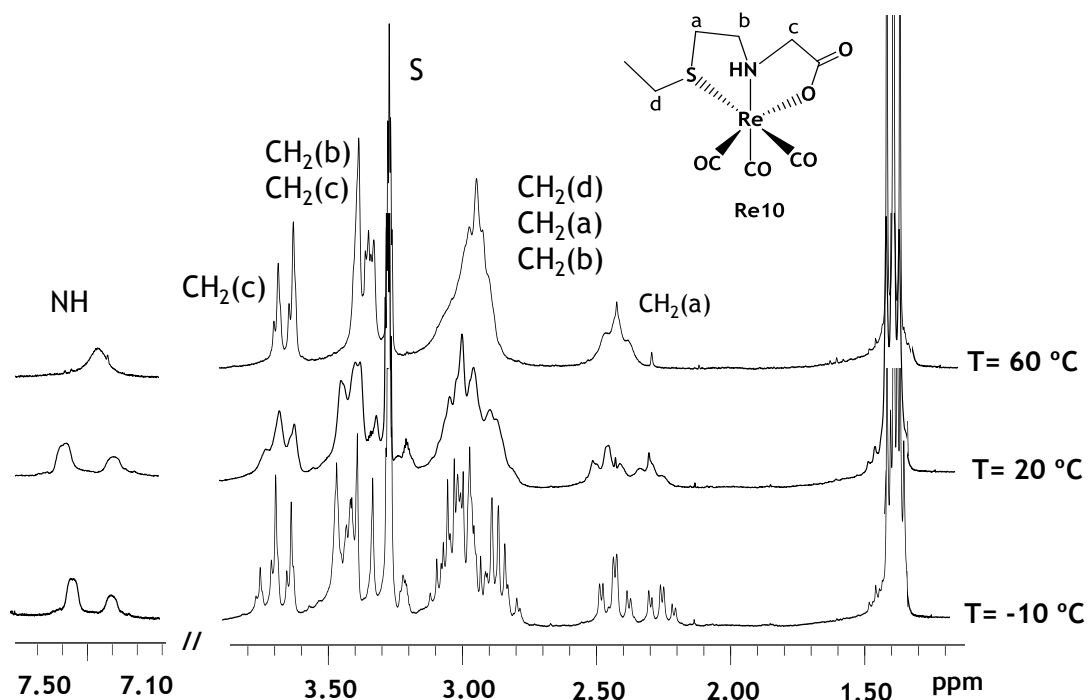


Figura 3.7. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo Re10 a diferentes temperaturas em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente)

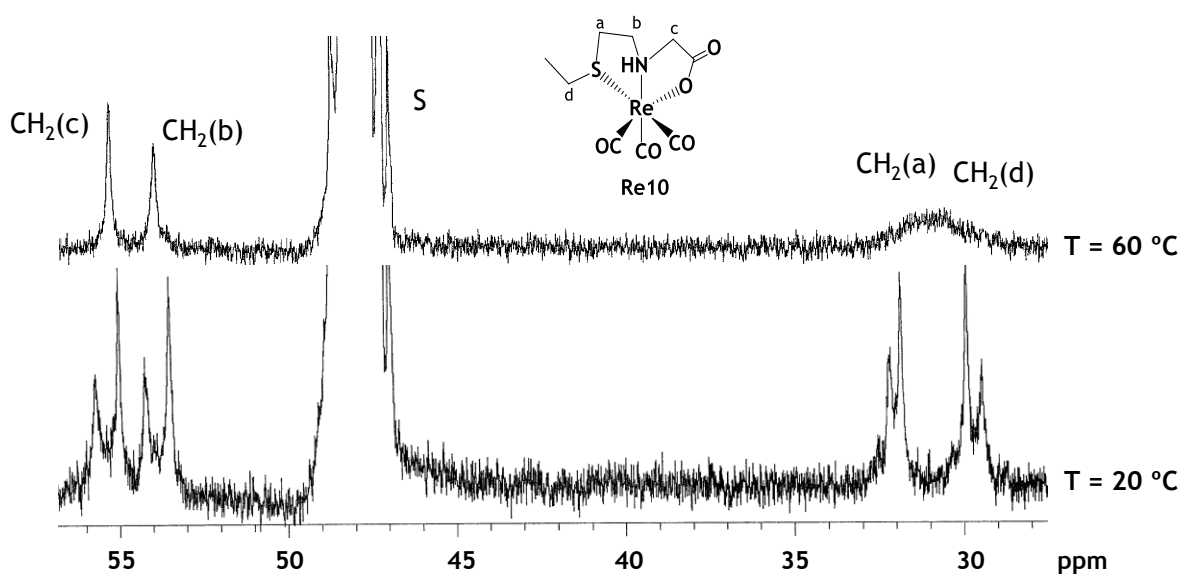
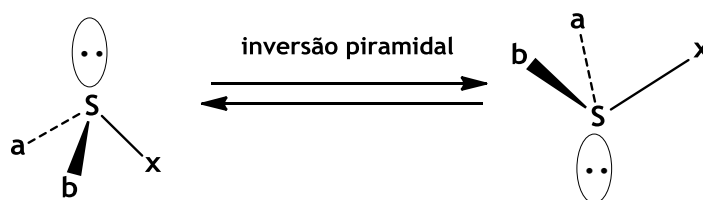


Figura 3.8. Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo Re10 a diferentes temperaturas em  $\text{CD}_3\text{OD}$  na zona dos grupos  $\text{CH}_2$  (S - solvente)

Ao descer a temperatura até  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , os sinais presentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ficaram mais estreitos e definidos, sendo este efeito mais fácil de seguir para os prótons NH e  $\text{CH}_2(\text{a})$ . A esta temperatura, o próton  $\text{CH}_2(\text{a})$  origina dois multipletos a 2,31 e 2,46 ppm e o grupo NH origina dois singletos a 7,18 e 7,37 ppm, com intensidades relativas de 2:1. À temperatura de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  os restantes prótons diastereotópicos originam um conjunto complexo de multipletos entre 2,8 e 3,8 ppm. Não se verificaram alterações do espectro quando se desceu a temperatura para valores inferiores a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . À temperatura de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , verificou-se que os prótons  $\text{CH}_2(\text{a})$  e NH originam sinais únicos e bem definidos a 2,44 e 7,25 ppm, respectivamente. O espectro de  $^{13}\text{C}$  obtido a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  também apresentou um único sinal para cada átomo de carbono dos grupos metilénicos, apesar de no caso dos grupos  $\text{CH}_2(\text{a})$  e  $\text{CH}_2(\text{d})$  esses sinais ainda se apresentarem relativamente largos e ocasionalmente sobrepostos. Os estudos de RMN a temperatura variável confirmaram que os processos dinâmicos observados para o composto **Re10** envolvem a interconversão entre duas espécies. A temperaturas baixas esta interconversão é suficientemente lenta para poder distinguir essas espécies por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . À medida que se aumenta a temperatura, essa interconversão torna-se mais rápida. No entanto, não foi possível atingir um regime de troca rápida mesmo à temperatura de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O comportamento dinâmico em solução observado para o complexo **Re10** é devido provavelmente à inversão piramidal do átomo de enxofre, tal como invocado para outros complexos de Re(I) com ligandos derivados de tioéteres.<sup>188</sup> Após coordenação ao metal, o átomo de enxofre fica com um carácter quiral e a inversão piramidal pode originar dois diastereoisómeros diferentes, como indicado na figura 3.9.<sup>188,189</sup>



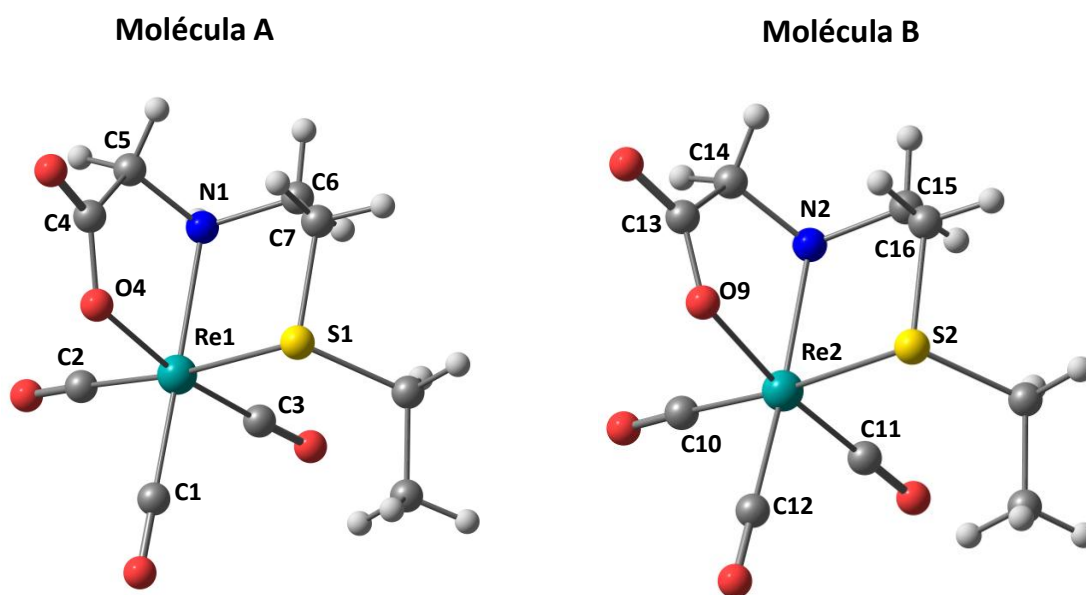
**Figura 3.9.** Processo de inversão piramidal do átomo de enxofre (adaptado de  $\text{Oae}$ )<sup>190</sup>

No caso do complexo **Re10**, a formação dos diastereoisómeros resulta das diferentes orientações do grupo etilo terminal e do par de electrões não-ligante do enxofre, que podem ficar *endo* ou *exo* em relação ao ligando carbonilo, em posição *trans* face ao oxigénio coordenado ao metal.<sup>189</sup>

A estrutura molecular no estado sólido do complexo **Re10** foi confirmada pela análise por difracção de raios-X de cristal único. Os cristais analisados foram obtidos a partir de uma solução saturada do composto em CH<sub>3</sub>CN. A estrutura determinada para **Re10** apresenta duas moléculas independentes (**A** e **B**) por unidade de célula assimétrica que são quimicamente equivalentes. Na tabela 3.1 apresentam-se os comprimentos e ângulos de ligação mais significativos das moléculas **A** e **B** do complexo **Re10**, apresentando-se na figura 3.10 as estruturas obtidas para cada uma dessas moléculas.

**Tabela 3.1.** Comprimentos (Å) e ângulos (°) de ligação mais significativos para o complexo **Re10**

Molécula A					
Re(1)-C(2)	1,921(5)	Re(1)-C(3)	1,891(6)	Re(1)-N(1)	2,210(4)
Re(1)-C(1)	1,924(6)	Re(1)-O(4)	2,135(4)	Re(1)-S(1)	2,4980(12)
C(3)-Re(1)-C(2)	87,5(2)	C(1)-Re(1)-O(4)	97,47(19)	C(3)-Re(1)-S(1)	95,87(15)
C(3)-Re(1)-C(1)	89,6(2)	C(3)-Re(1)-N(1)	95,84(19)	C(2)-Re(1)-S(1)	174,20(17)
C(2)-Re(1)-C(1)	90,0(2)	C(2)-Re(1)-N(1)	94,08(19)	C(1)-Re(1)-S(1)	94,68(16)
C(3)-Re(1)-O(4)	171,64(18)	C(1)-Re(1)-N(1)	173,32(19)	O(4)-Re(1)-S(1)	79,14(10)
C(2)-Re(1)-O(4)	96,93(18)	O(4)-Re(1)-N(1)	76,83(15)	N(1)-Re(1)-S(1)	80,92(11)
Molécula B					
Re(2)-C(11)	1,904(6)	Re(2)-C(12)	1,933(7)	Re(2)-N(2)	2,200(5)
Re(2)-C(10)	1,915(6)	Re(2)-O(9)	2,142(4)	Re(2)-S(2)	2,4806(14)
C(11)-Re(2)-C(10)	86,9(2)	C(12)-Re(2)-O(9)	95,74(19)	C(11)-Re(2)-S(2)	95,36(17)
C(11)-Re(2)-C(12)	89,3(2)	C(11)-Re(2)-N(2)	98,3(2)	C(10)-Re(2)-S(2)	174,9(2)
C(10)-Re(2)-C(12)	89,9(3)	C(10)-Re(2)-N(2)	93,2(2)	C(12)-Re(2)-S(2)	94,62(18)
C(11)-Re(2)-O(9)	173,42(19)	C(12)-Re(2)-N(2)	171,9(2)	O(9)-Re(2)-S(2)	80,01(10)
C(10)-Re(2)-O(9)	97,3(2)	O(9)-Re(2)-N(2)	76,49(15)	N(2)-Re(2)-S(2)	81,99(13)



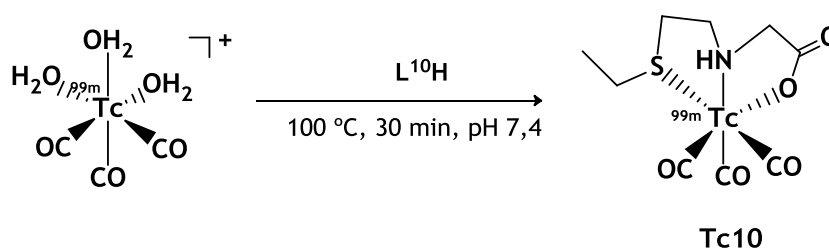
**Figura 3.10.** Estruturas de raios-X das moléculas A e B do complexo Re10

As duas moléculas independentes (A e B) não correspondem aos dois diastereoisómeros que foram encontrados em solução, uma vez que apresentam a mesma quiralidade em torno do átomo de enxofre. Para ambas as moléculas, o grupo substituinte etilo encontra-se em posição *endo* em relação ao ligando CO coordenado em posição *trans* face ao átomo de oxigénio do ligando tridentado.

O átomo de rênio apresenta-se hexacoordenado e a geometria de coordenação em torno do metal pode ser descrita como octaédrica distorcida. Os ligandos carbonilo ocupam uma das faces triangulares do octaedro, enquanto a outra face é ocupada pelos átomos coordenantes (S,N,O) do ligando L<sup>10</sup>. Os desvios à geometria octaédrica são facilmente comprovados pelos ângulos de ligação em torno do átomo de rênio que variam entre 86,9(2) e 95,87(15)°. Os valores dos comprimentos de ligação Re-C (1,891(6)-1,933(7) Å), Re-S (2,4806(14)-2,4980(12) Å), Re-O (2,135(4)- 2,142(4) Å) e Re-N (2,200(5)-2,210(4) Å) no complexo Re10 são comparáveis aos descritos na literatura para outros complexos octaédricos contendo a unidade *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> e o mesmo sistema de átomos doadores.<sup>49,50,54,60,191</sup>

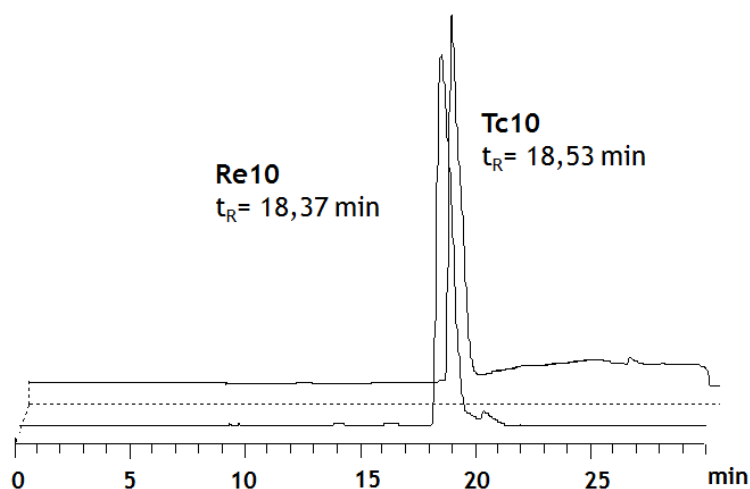
### 3.2.2. Síntese, caracterização e avaliação biológica do complexo de tecnécio-99m

A reacção do composto L<sup>10</sup>H com o precursor *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> foi efectuada em meio aquoso a um pH de 7,4, com aquecimento a 100 °C durante 30 min, usando uma concentração de ligando de 10<sup>-4</sup> M. Nestas condições o composto Tc10 foi obtido com um rendimento praticamente quantitativo (≥99%) (esquema 3.3).



**Esquema 3.3.** Síntese do complexo Tc10

A caracterização do complexo Tc10 por HPLC permitiu confirmar a sua estrutura química, mediante comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção do complexo de rénio congénere (Re10) (figura 3.11). O cromatograma de HPLC do complexo Re10 apresenta apenas um único pico, não se tendo verificado por esta técnica a presença de dois diastereoisómeros em solução, ao contrário do observado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Tal pode resultar de uma rápida interconversão dos diastereoisómeros na escala de tempo do HPLC ou, alternativamente, por não serem separáveis nas condições cromatográficas utilizadas.



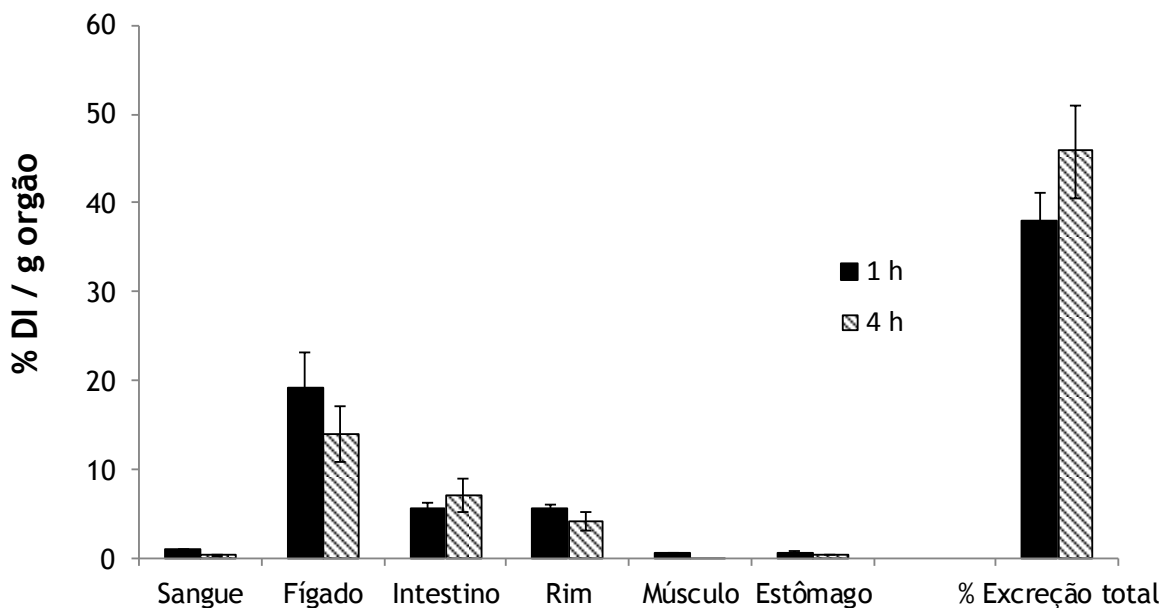
**Figura 3.11.** Cromatogramas de HPLC dos compostos Re10 (deteccção UV) e Tc10 (deteccção  $\gamma$ )

O complexo Tc10 tem um carácter lipofílico, com um valor de  $\log D_{o/w}$  a pH 7,4 de  $0,36 \pm 0,03$ . A avaliação da estabilidade *in vitro* em condições fisiológicas (PBS, pH 7,4; 37 °C) mostrou que o complexo Tc10 não sofre qualquer tipo de degradação ao fim de 24 h. Estudos *in vitro* efectuados na presença de cisteína e histidina, em concentrações de  $10^{-2}$  M, demonstraram que não se verifica qualquer transquelatação ou reoxidação do complexo a pertecnetato, mesmo após 6 h de incubação, o que mostra que o complexo tem uma elevada estabilidade cinética nas condições estudadas.

O comportamento *in vivo* do complexo Tc10 foi estudado em ratinhos CD-1 tendo sido avaliados parâmetros gerais como a distribuição e a eliminação, a taxa de depuração sanguínea, a velocidade de excreção e principais vias de eliminação. A biodistribuição foi efectuada para dois tempos diferentes (1 h e 4 h p.i.). Os resultados de biodistribuição foram calculados em percentagem de dose injectada por grama de órgão (% DI/g órgão) (tabela 3.2). A fixação de Tc10 nos órgãos e tecidos mais relevantes é apresentada na figura 3.12.

**Tabela 3.2.** Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) para o complexo Tc10

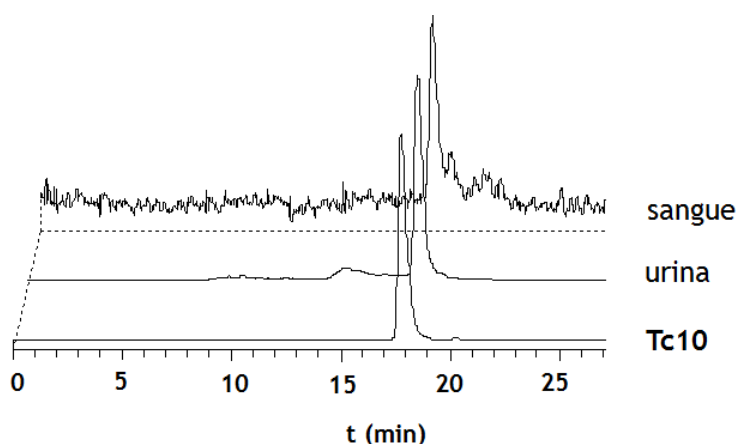
Órgão	Tc10	
	Tempo de sacrifício	
	1 h	4 h
Sangue	0,91 ± 0,02	0,33 ± 0,07
Fígado	19,2 ± 3,9	14,0 ± 3,1
Intestino	5,6 ± 0,6	7,0 ± 1,9
Baço	0,5 ± 0,1	0,20 ± 0,04
Coração	0,47 ± 0,06	0,15 ± 0,02
Pulmões	0,56 ± 0,12	0,31 ± 0,05
Rins	5,7 ± 0,4	4,1 ± 1,0
Músculo	0,63 ± 0,03	0,10 ± 0,02
Fémur	0,42 ± 0,05	0,11 ± 0,02
Estômago	0,57 ± 0,13	0,34 ± 0,06
Pâncreas	0,87 ± 0,10	0,41 ± 0,10
Cérebro	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Olhos	0,42 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Excreção (% DI)	38,0 ± 3,1	45,8 ± 5,2



**Figura 3.12.** Fixação (% DI/g órgão) nos órgãos/tecidos mais relevantes e excreção total (% DI) para o complexo Tc10

O complexo Tc10 apresenta uma depuração sanguínea rápida com valores baixos de actividade detectados no sangue e que vão diminuindo para tempos superiores ( $0,91 \pm 0,02$ , e  $0,33 \pm 0,07$ , % DI/g para 1 h e 4 h p.i., respectivamente). De uma maneira geral, não foi encontrada nenhuma fixação preferencial em nenhum órgão ou tecido, excepto nos órgãos envolvidos na excreção do composto como o fígado e em menor extensão o intestino e rins. A fixação nestes órgãos relaciona-se com o facto de o composto ser eliminado essencialmente por via hepatobiliar. Em relação à velocidade de excreção o complexo Tc10 é excretado de forma relativamente rápida atingindo valores de excreção total de 38,0% DI ao fim de 1 h p.i., que aumenta para 45,8% às 4 h p.i.. Há ainda a referir que o composto não apresenta retenção significativa no estômago, o que significa que o complexo é estável à reoxidação *in vivo*.

Foram ainda efectuados estudos de estabilidade *in vivo* mediante a análise por HPLC de sangue e urina de ratinhos injectados com o complexo Tc10, 1 h após administração (figura 3.13). A actividade presente em circulação e na urina corresponde essencialmente ao complexo Tc10. Estes resultados demonstram que Tc10 apresenta uma elevada estabilidade *in vivo*.



**Figura 3.13.** Cromatogramas de HPLC da urina e sangue de ratinhos injectados (1 h p.i.) com o complexo Tc10

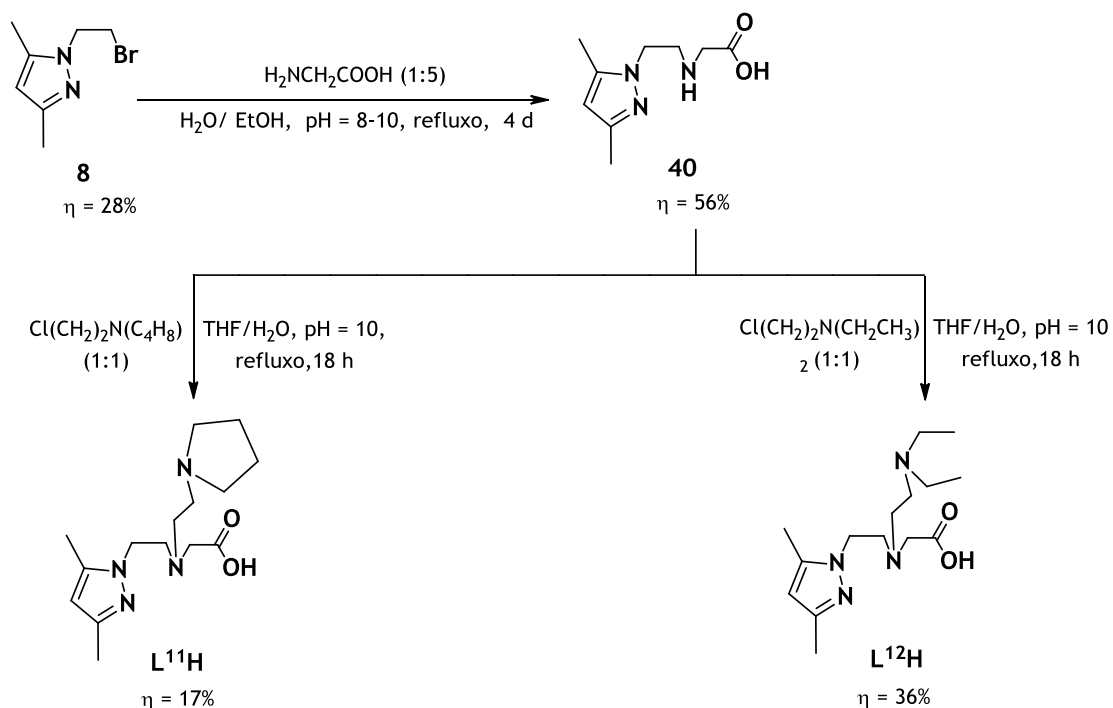
Em suma, o composto  $L^{10}H$  apresentou características adequadas para prosseguir com a sua funcionalização com os grupos N-dietilo e N-pirrolidina, através da amina central, tendo em vista obter complexos tricarbonilo de  $^{99m}Tc(I)$  relevantes para o desenvolvimento de sondas radioactivas para detecção do melanoma melanótico por SPECT. Avançou-se para a síntese desses ligandos funcionalizados, juntamente com a síntese de ligandos congéneres doadores ( $N_2O$ ) do tipo pirazolo-aminocarboxílico e piridina-aminocarboxílico.

### 3.3. Síntese e caracterização de complexos de tricarbonilo de $Re(I)/^{99m}Tc$ com ligandos tridentados ( $N_2O$ ) e ( $S,N,O$ ) funcionalizados com fragmentos do tipo alquilamina

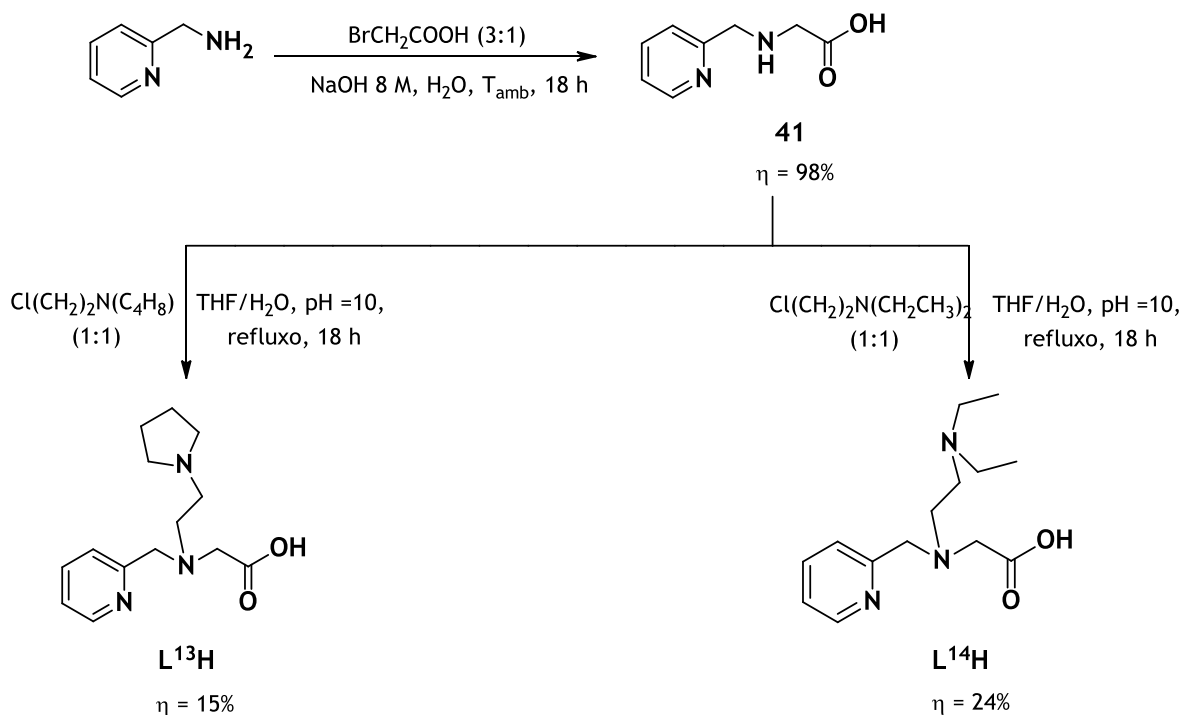
#### 3.3.1. Síntese e caracterização dos ligandos funcionalizados com fragmentos do tipo alquilamina ( $L^{11}H-L^{17}H$ )

A síntese dos novos ligandos ( $L^{11}H-L^{16}H$ ) foi efectuada como indicado nos esquemas 3.4-3.6, utilizando uma metodologia semelhante que se baseou na reacção de N-alquilação dos derivados aminocarboxílicos adequados (**40**, **41** e  $L^{10}H$ ) com os compostos clorados 1-(2-cloroetil)pirrolidina e 2-cloroetil-N,N-dietilamina. Os derivados aminocarboxílicos **40** e **41** já se encontravam descritos e a sua síntese foi efectuada de acordo com os métodos da literatura.<sup>55,58</sup> Resumidamente, o composto **40** foi sintetizado por N-alquilação do N-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo (**8**) com excesso de glicina a pH moderadamente alcalino

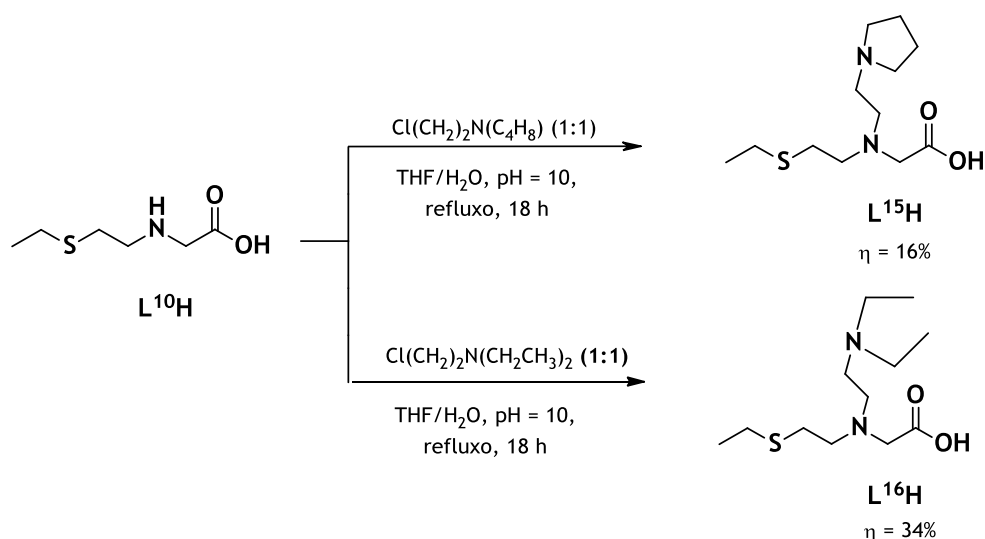
(esquema 3.4), enquanto **41** foi obtido de modo similar por reacção de 2-picolilamina em excesso com ácido bromoacético em meio fortemente básico (esquema 3.5).



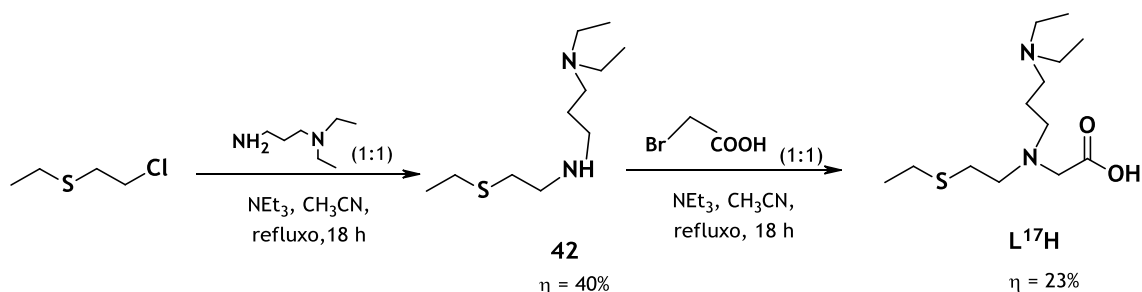
Esquema 3.4. Síntese dos ligandos L<sup>11</sup>H e L<sup>12</sup>H



Esquema 3.5. Síntese dos ligandos L<sup>13</sup>H e L<sup>14</sup>H



Como se verá mais à frente, do conjunto dos complexos de <sup>99m</sup>Tc com os ligandos L<sup>11</sup>H-L<sup>16</sup>H, o complexo com o ligando L<sup>16</sup>H foi aquele que apresentou melhores características biológicas, tanto *in vivo* como *in vitro*. De forma a tentar otimizar essas características, optou-se por estudar o complexo de <sup>99m</sup>Tc com um ligando congénere (L<sup>17</sup>) contendo um espaçador propilénico para ligação do grupo N-dietilo. Esperava-se que o complexo com L<sup>17</sup> fosse ligeiramente mais lipofílico e apresentasse eventualmente uma maior captação celular e tumoral. Como indicado no esquema 3.7, o ligando L<sup>17</sup>H foi sintetizado em dois passos. O passo inicial consistiu na síntese de um derivado aminotioéter, composto **42**, por reacção do 2-cloroetil-etilsulfano, disponível comercialmente, com N,N-dietilpropano-1,3-diamina numa relação molar de 1:1. Seguidamente, a N-alkilação da amina secundária do composto **42** com ácido bromoacético permitiu obter o ligando final L<sup>17</sup>H.



Os compostos L<sup>11</sup>H-L<sup>17</sup>H são estáveis ao ar e são solúveis nos solventes orgânicos polares mais comuns, como álcoois ou CH<sub>3</sub>CN, sendo ainda solúveis em água. A caracterização destes compostos envolveu RMN (1-D/2-D) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, IV, análise elementar

e ESI-MS. A caracterização espectroscópica dos compostos permitiu confirmar a estrutura molecular dos ligandos, como exemplificado pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $[\text{H}, ^{13}\text{C}]$  g-HSQC de  $\text{L}^{13}\text{H}$  apresentados nas figuras 3.14-3.16, respectivamente.

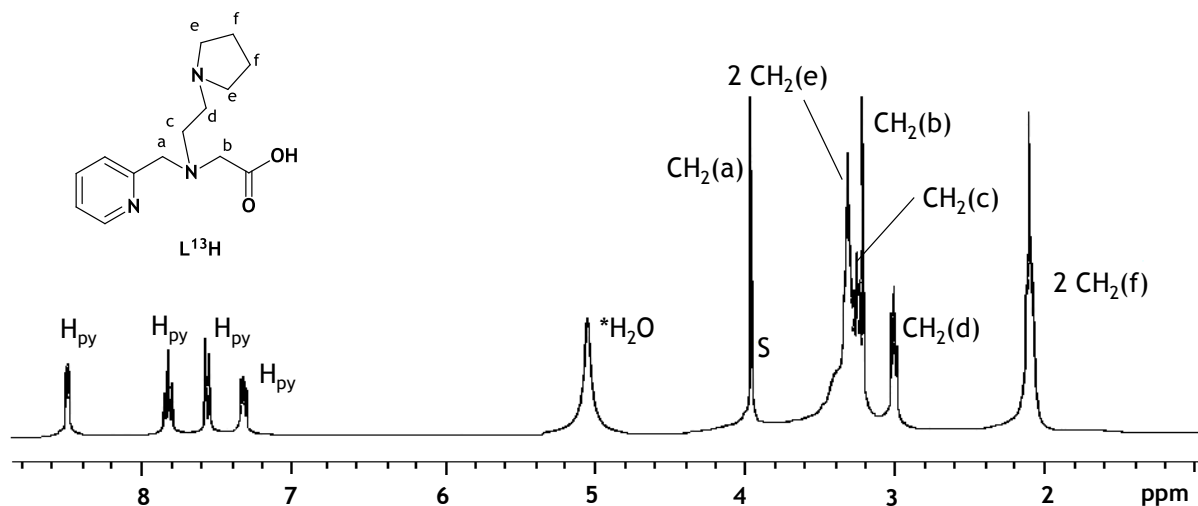


Figura 3.14. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{L}^{13}\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (\*  $\text{H}_2\text{O}$  residual, S - solvente)

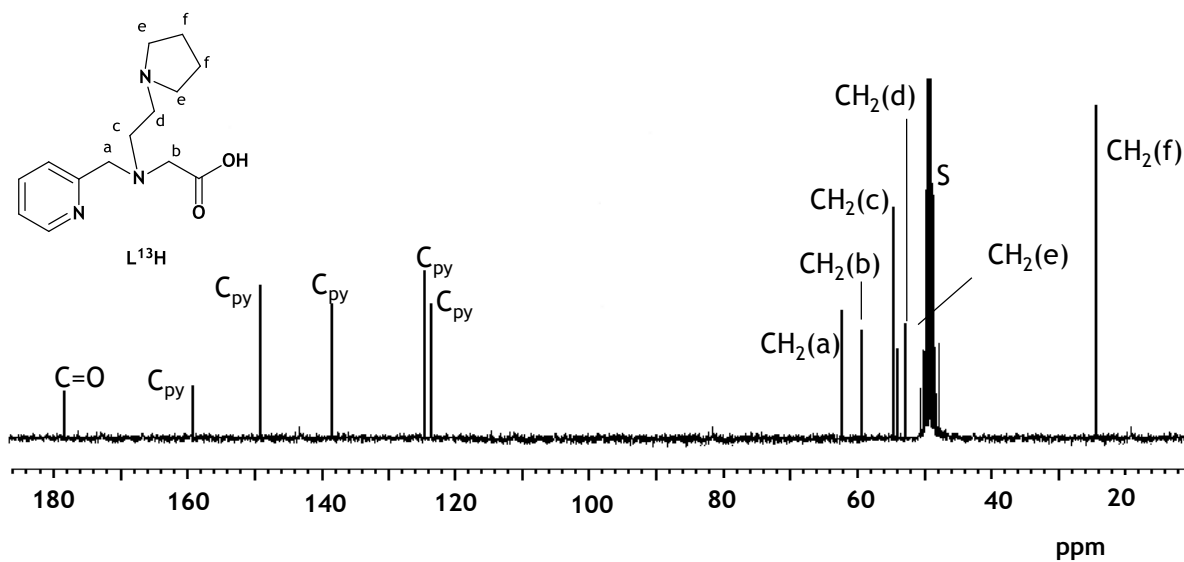


Figura 3.15. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de  $\text{L}^{13}\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente)

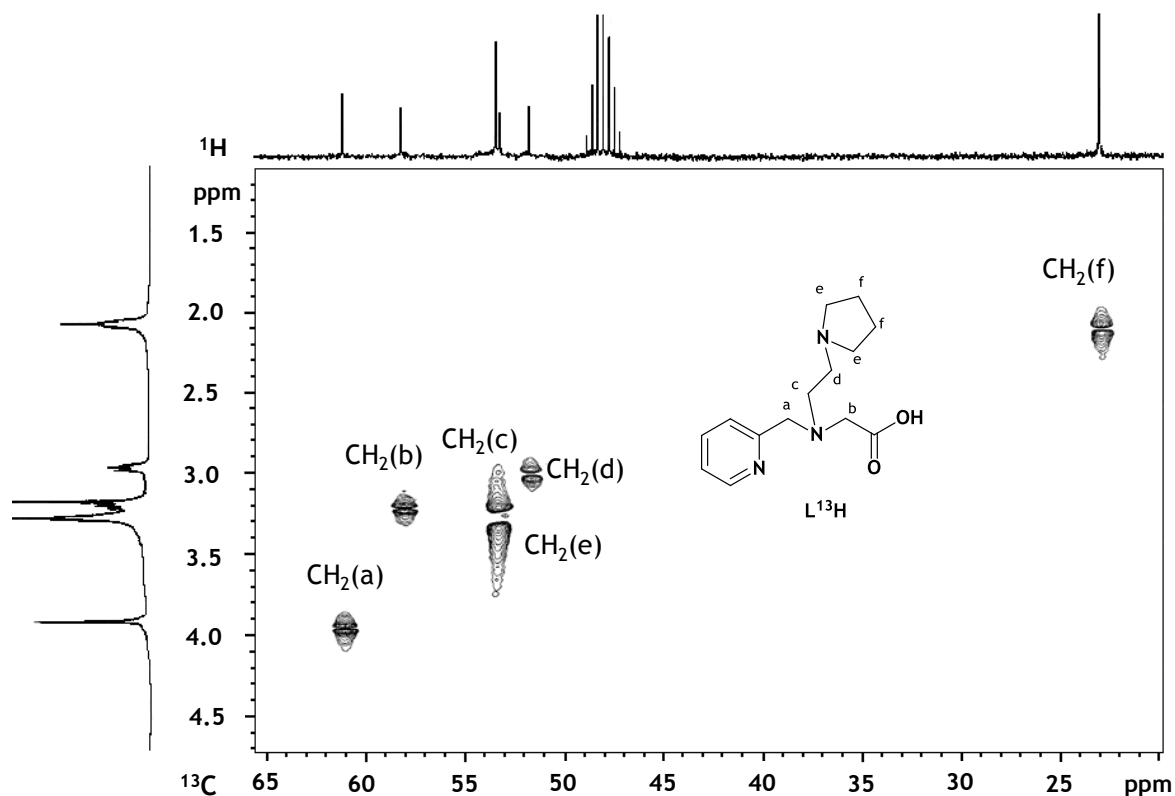
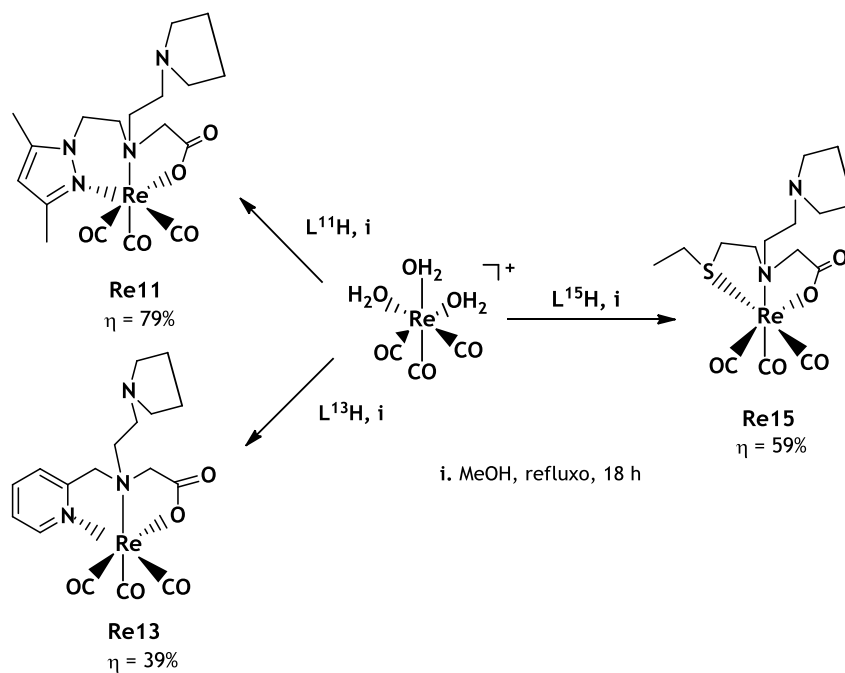


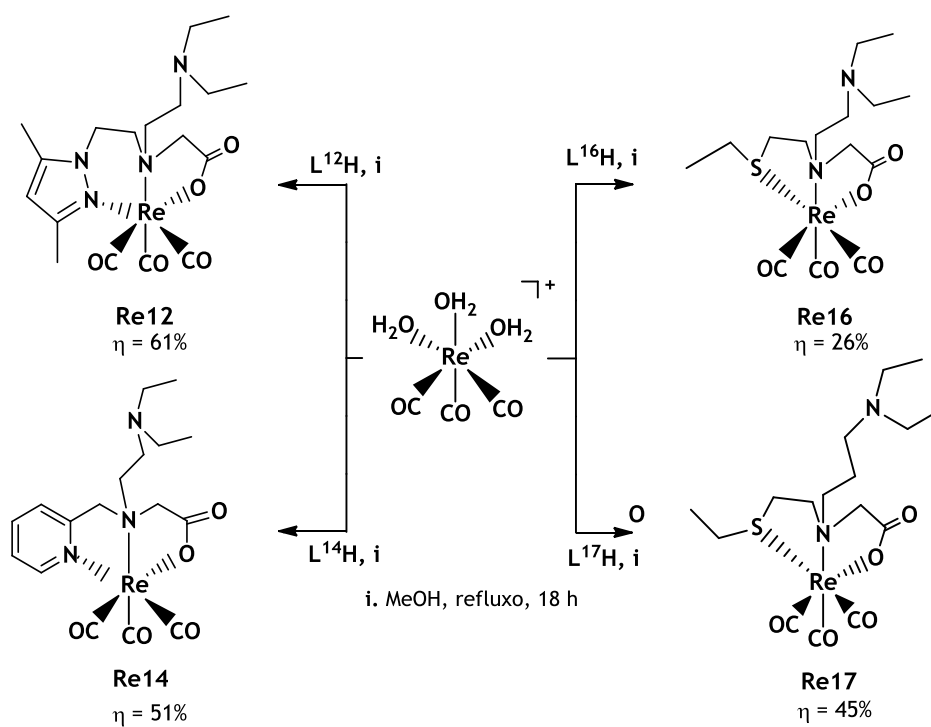
Figura 3.16. Espectro de [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] g-HSQC de  $\text{L}^{13}\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , na zona dos grupos  $\text{CH}_2$

### 3.3.2. Síntese e caracterização dos complexos de rénio $\text{fac-}[\text{Re}(\kappa^3\text{-L})(\text{CO})_3]$ ( $\text{L}=\text{L}^{11}$ - $\text{L}^{17}$ )

Como indicado nos esquemas 3.8 e 3.9, a reacção dos ligandos  $\text{L}^{11}\text{H}$ - $\text{L}^{17}\text{H}$  com  $\text{fac-}[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  em metanol, à temperatura de refluxo e durante a noite, permitiu obter os complexos  $\text{Re11-Re17}$ , estabilizados pelos ligandos ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e ( $\text{S,N,O}$ ) e funcionalizados com os grupos N-dietilo e N-pirrolidina. Após remoção do solvente sob vácuo, estes complexos foram purificados por HPLC ( $\text{Re11}$ ,  $\text{Re12}$ ,  $\text{Re13}$ ,  $\text{Re15}$ ,  $\text{Re16}$ ) e por cromatografia em coluna de sílica-gel ( $\text{Re14}$ ,  $\text{Re17}$ ), tendo sido obtidos com rendimentos entre 26-79%.



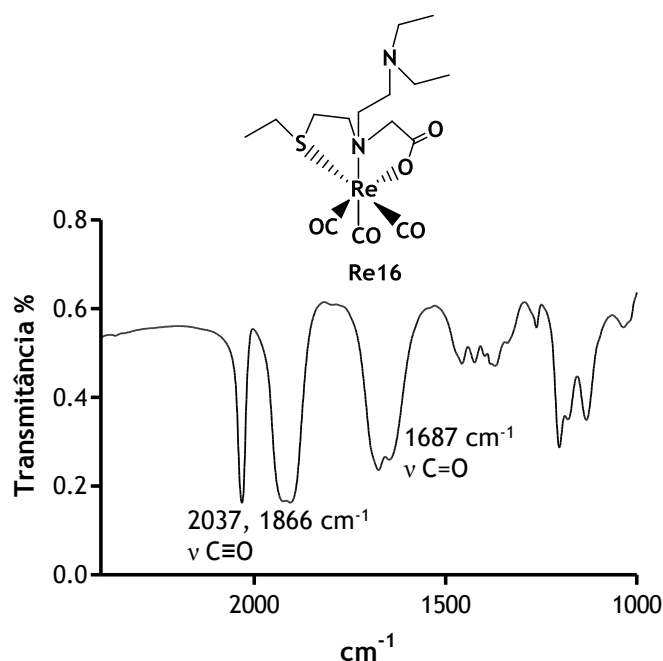
**Esquema 3.8.** Síntese dos complexos de Re(I) funcionalizados com o grupo N-pirrolidina (**Re11**, **Re13**, **Re15**)



**Esquema 3.9.** Síntese dos complexos de Re(I) funcionalizados com o grupo N-dietilo (**Re12**, **Re14**, **Re16**, **Re17**)

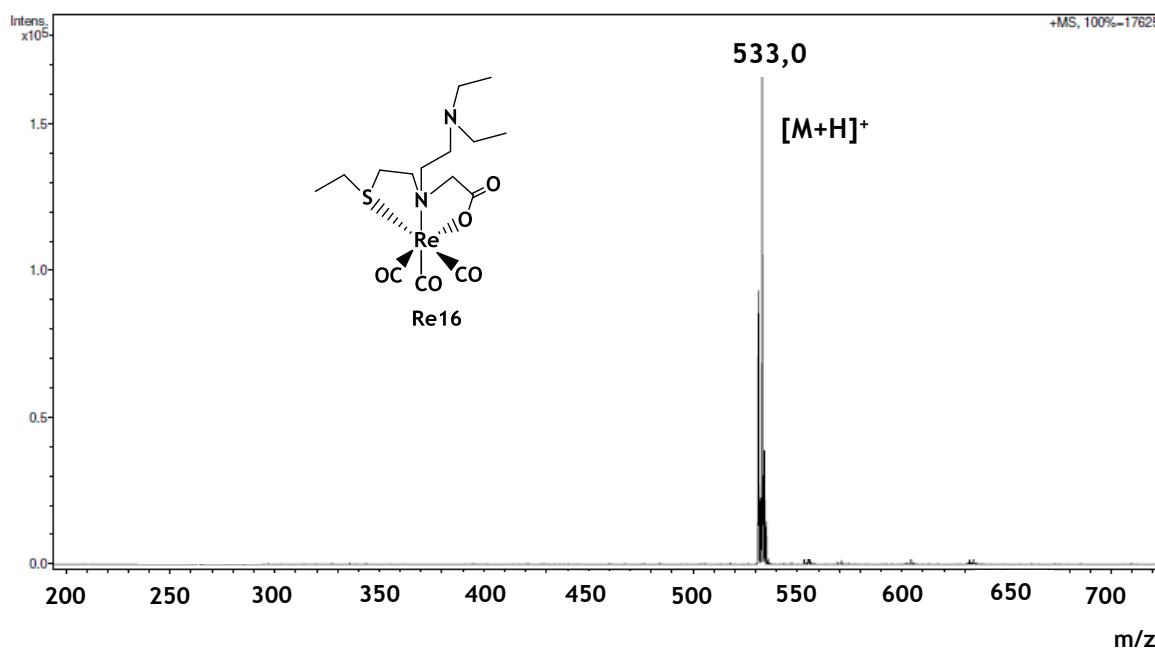
Os complexos **Re11-Re17** são estáveis à oxidação aeróbia e hidrólise e são solúveis na maior parte dos solventes orgânicos polares. A sua caracterização foi efectuada por espectroscopia de IV e de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (estudos 1-D e 2-D), ESI-MS e por análise elementar.

Nos espectros de IV dos complexos **Re11-Re17** podem ser observadas bandas de forte intensidade entre  $1866\text{-}2037\text{ cm}^{-1}$  devidas à vibração de extensão  $\nu(\text{C}\equiv\text{O})$ , consistente com a coordenação facial dos três grupos carbonilo. Os espectros incluem também a presença de bandas  $\nu(\text{C}=\text{O})$  entre  $1652\text{-}1679\text{ cm}^{-1}$ , desviadas em relação aos ligandos livres, confirmando a coordenação do grupo carboxilato dos ligandos ao metal. A título de exemplo apresenta-se na figura 3.17, o espectro de IV do complexo **Re16**.



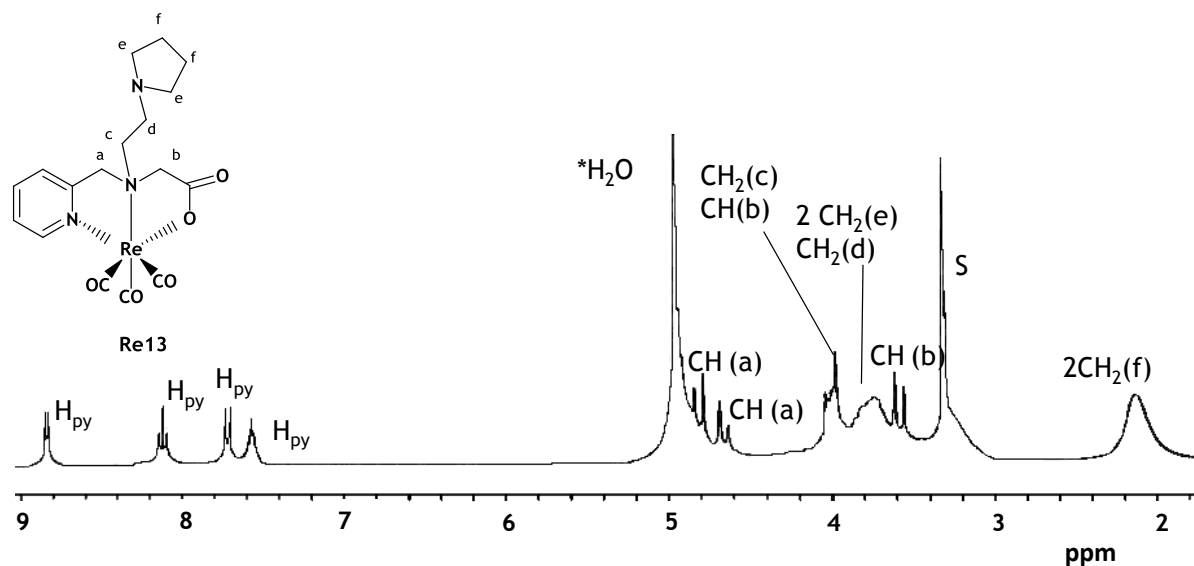
**Figura 3.17.** Espectro de IV do complex **Re16**, em pastilhas de KBr

Nos espectros ESI-MS dos complexos **Re12-Re17**, os picos de maior intensidade correspondem aos respectivos iões moleculares, como se pode verificar pela análise do espectro do complexo **Re16** que se apresenta na figura 3.18.

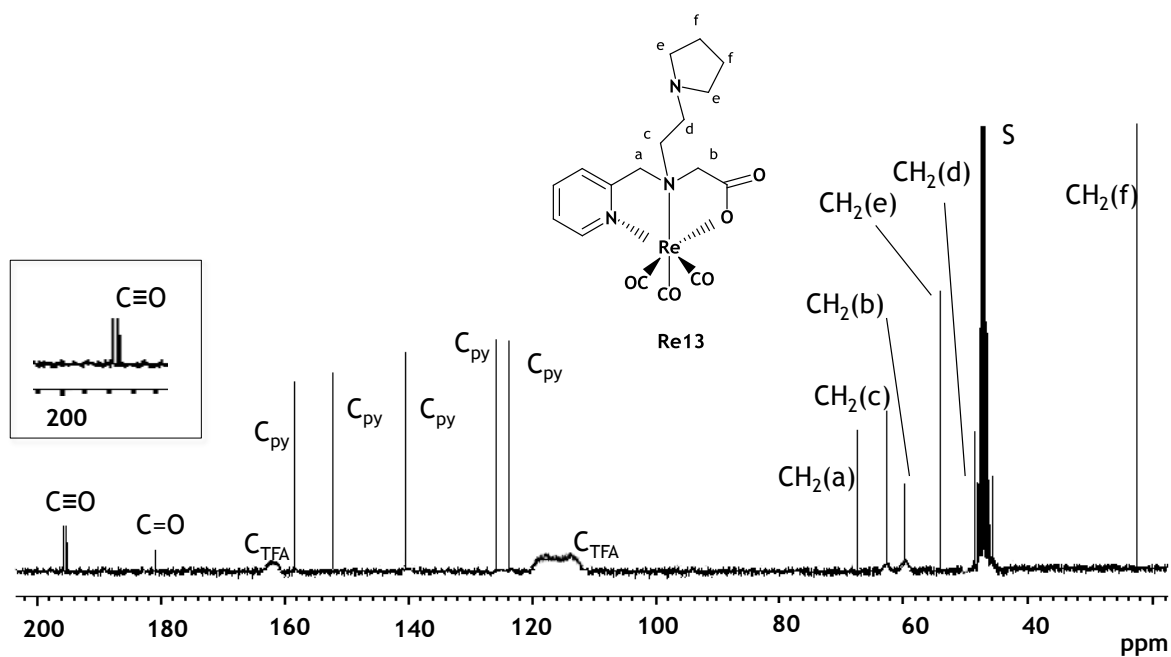


**Figura 3.18.** Espectro de ESI-MS do complexo **Re16** (modo positivo)

Ao contrário dos complexos **Re15-Re17** estabilizados pelos ligandos doadores (S,N,O), os complexos **Re11-Re14** estabilizados pelos ligandos doadores (N<sub>2</sub>O), do tipo pirazolo-aminocarboxílico e piridina-aminocarboxílico, apresentaram espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C facilmente interpretáveis e compatíveis com as estruturas moleculares dos compostos. Como exemplo representativo, apresentam-se os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, do complexo **Re13** nas figuras 3.19 e 3.20, respectivamente, incluindo a atribuição das diferentes ressonâncias que foi efectuada com base em experiências bidimensionais [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H] g-COSY e [<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C] g-HSQC (Fig. 3.21). Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos complexos **Re11-Re14** apresentam uma série de multipletos devidos aos prótons CH<sub>2</sub> da cadeia alifática que liga os diferentes átomos coordenantes. Cada um destes grupos CH<sub>2</sub> origina dois multipletos que integram cada um para um próton, exceptuando nos casos em que há sobreposição ocasional de alguns destes prótons. A presença destes multipletos é indicativo da coordenação de **L<sup>11</sup>-L<sup>14</sup>** como ligandos tridentados doadores (N<sub>2</sub>O), como discutido no capítulo anterior para complexos similares. Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C também forneceram dados compatíveis com este modo coordenação, na medida em que apresentaram três ressonâncias para os ligandos CO entre 192,85-197,35 ppm, confirmando que são todos magneticamente diferentes por se encontrarem em posição *trans* face a grupos coordenantes diferentes: o grupo N-heterocíclico, o azoto central e o carboxilato terminal.



**Figura 3.19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo **Re13** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $^*\text{H}_2\text{O}$  residual, S - solvente)



**Figura 3.20.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo **Re13** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente)

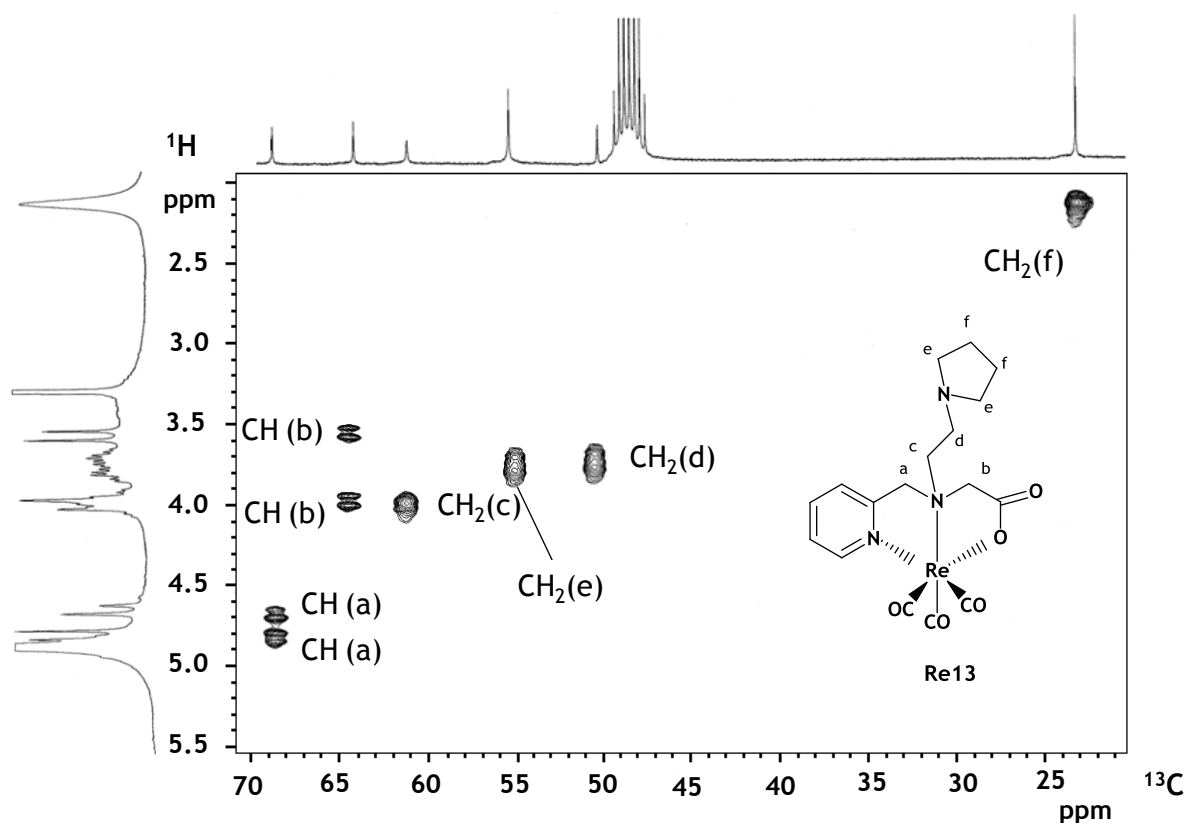


Figura 3.21. Espectro de RMN [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] g-HSQC do complexo **Re13** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , na zona dos grupos  $\text{CH}_2$

Para os complexos **Re15-Re17** estabilizados pelos ligandos bifuncionais derivados da cisteamina e doadores (S,N,O), a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  obtidos à temperatura ambiente revelou-se uma tarefa mais complicada. Como se pode ver pelo espectro do complexo **Re16** apresentado na figura 3.22, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  destes complexos apresentam à temperatura ambiente um conjunto de ressonâncias relativamente alargadas e bastante sobrepostas. Considerámos que este tipo de espectro reflectia a possível interconversão de diastereoisómeros, devido à inversão piramidal do enxofre como discutido no início do capítulo para o complexo modelo **Re10** estabilizado pelo mesmo sistema de átomos doadores. Decidimos então traçar espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a temperatura variável (-10 °C a 60 °C) para os complexos **Re15-Re17**. Verificámos que a temperatura afecta o perfil das ressonâncias presentes nos espectros, como se pode confirmar pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para **Re16** a 60 °C. No entanto, não foi fácil seguir o efeito da temperatura nos diferentes sinais, devido à complexidade dos espectros como resultado da presença de um grande número de prótons metilénicos associados à cadeia alifática que liga os átomos coordenantes, aos espaçadores e aos grupos N-pirrolidina e N-dietilo.

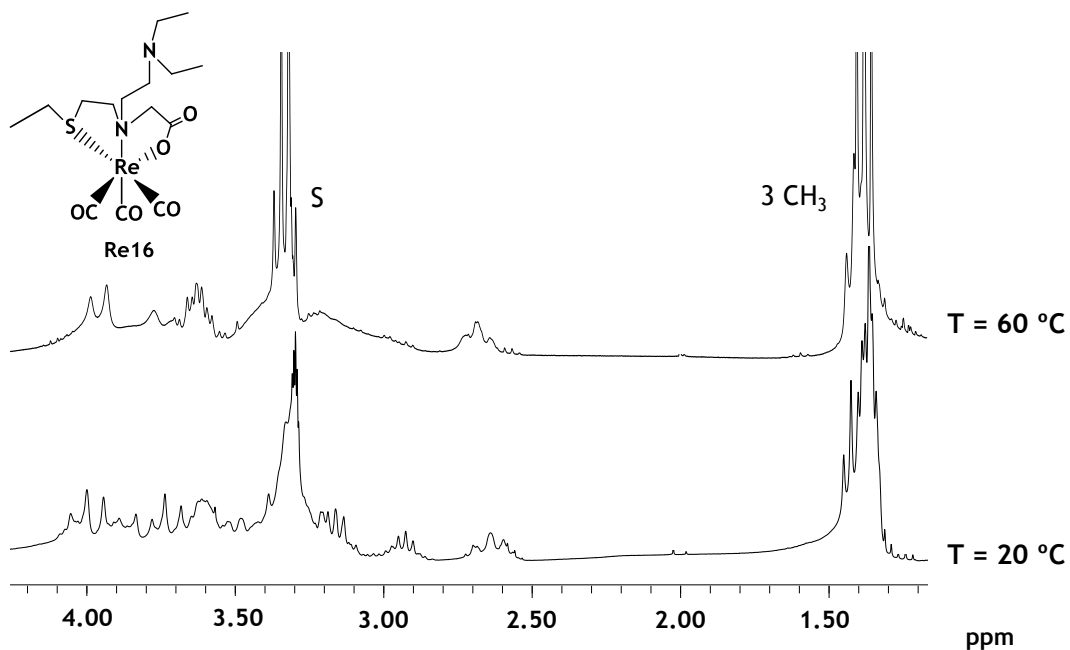


Figura 3.22. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo **Re16** à temperatura de 20 e 60 °C, em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente)

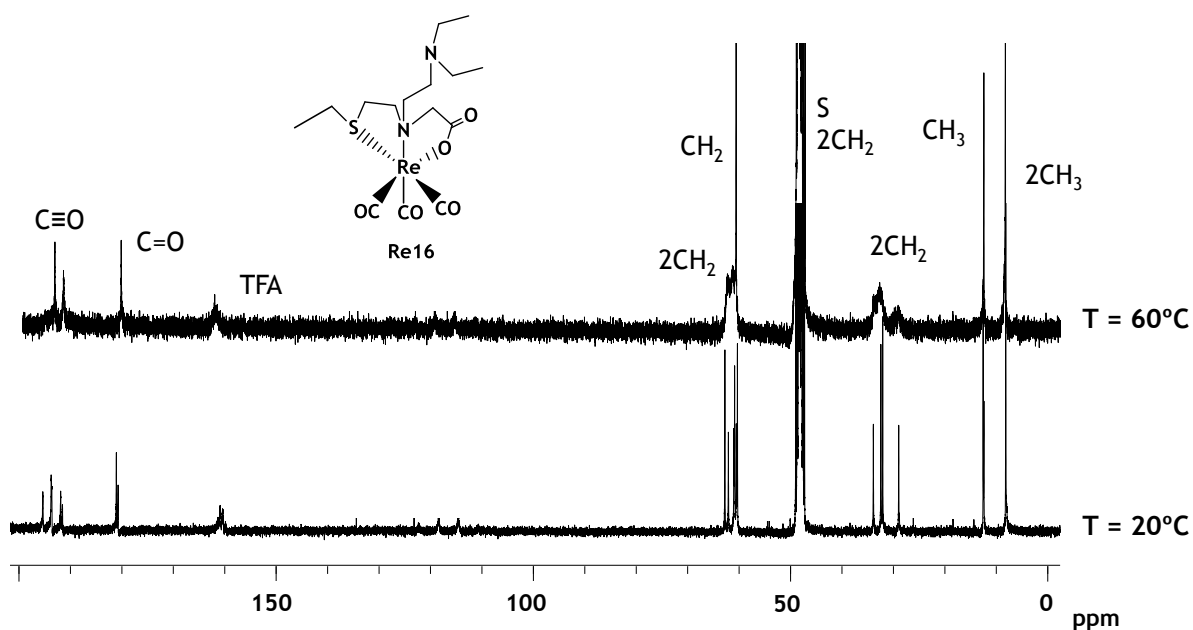


Figura 3.23. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo **Re16** à temperatura de 20 e 60 °C, em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente)

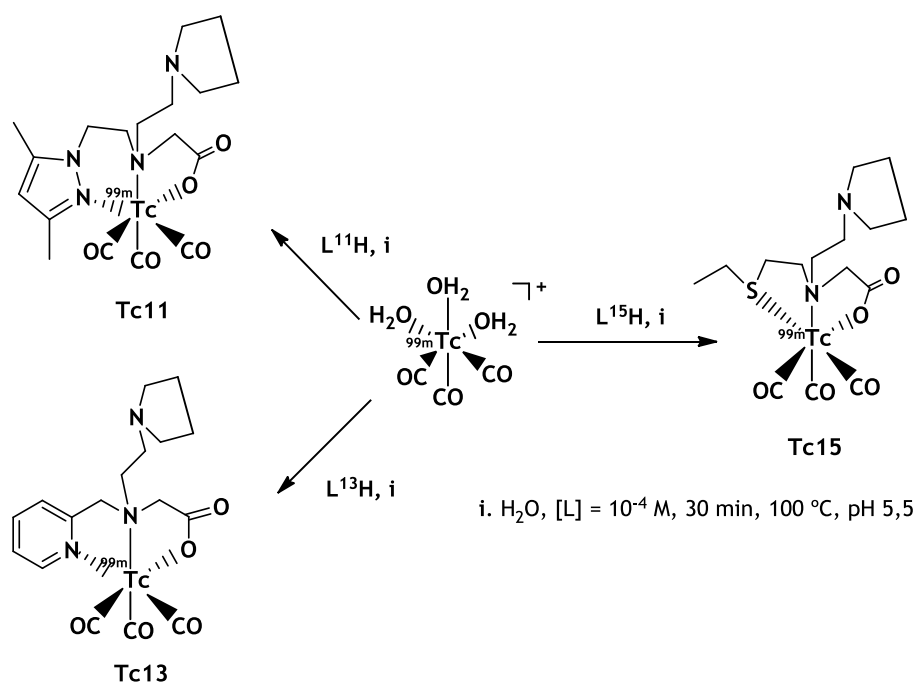
O efeito da temperatura nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos complexos **Re16-Re17** foi mais fácil de seguir, como se pode constatar pela análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **Re16** a 20 °C e a 60 °C que se apresentam na figura 3.23. À temperatura ambiente, o espectro apresenta dois sinais para cada um dos carbonos metilénicos, para o grupo metilo ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$ -) e para cada um dos grupos carboxilato, e ainda quatro sinais para

os ligandos  $C\equiv O$ . O aumento da temperatura para  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  levou a que cada um dos átomos de carbono metilénicos do espaçador e dos grupos N-pirrolidina (**Re15**) e N-dietilo (**Re16-17**) originasse um único sinal de  $^{13}\text{C}$  bem definido (figura 3.23). Os carbonos metilénicos da cadeia  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{COO}$  também são afectados pela temperatura mas apresentam-se relativamente alargados à temperatura de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o que indica que não se atingiu um regime de troca rápida. Estes dados podem ser interpretados com base na interconversão de dois diastereoisómeros e sugerem que essa interconversão atinge mais fortemente o ambiente químico dos átomos mais próximos dos átomos coordenantes e do centro metálico, como seria de esperar.

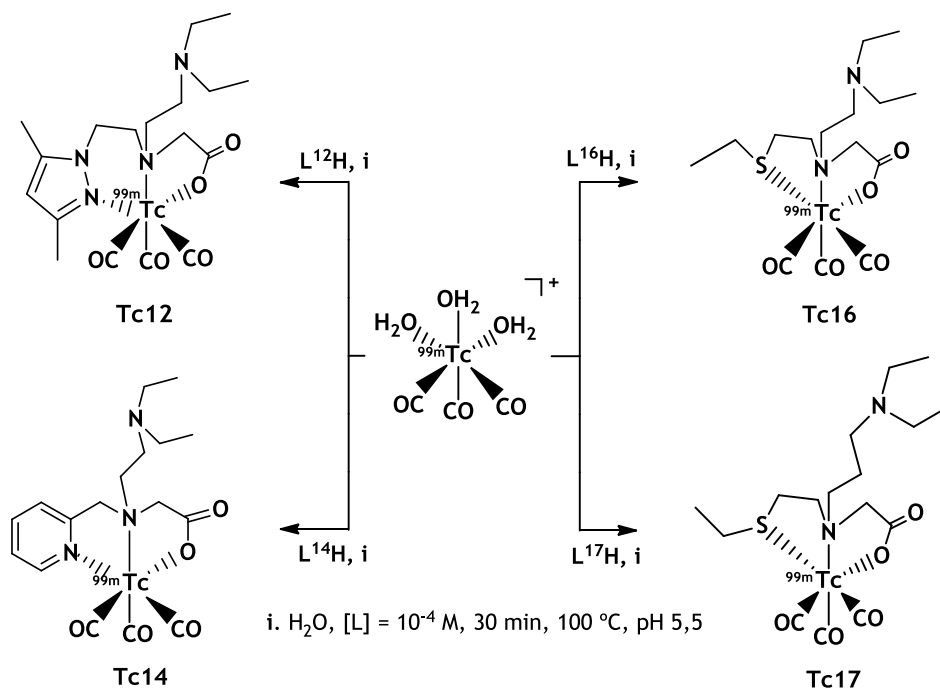
### 3.3.3. Síntese, caracterização e avaliação biológica dos complexos $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\kappa^3\text{-L})(\text{CO})_3]$ ( $\text{L}=\text{L}^{11}\text{-L}^{17}$ )

#### 3.3.3.1. Síntese e caracterização

Os complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (**Tc11-Tc17**) funcionalizados com os grupos N-pirrolidina ou N-dietilo foram obtidos com rendimentos elevados ( $\geq 95\%$ ) por reacção dos ligandos  $\text{L}^{11}\text{H-L}^{17}\text{H}$  com o aquo-complexo  $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, utilizando concentrações finais de ligando de  $1 \times 10^{-4}\text{ M}$  (esquemas 3.10 e 3.11). Como descrito no capítulo anterior para complexos com o mesmo tipo de ligandos, as sínteses foram efectuadas a pH 5,5 de modo a evitar processos de hidrólise.

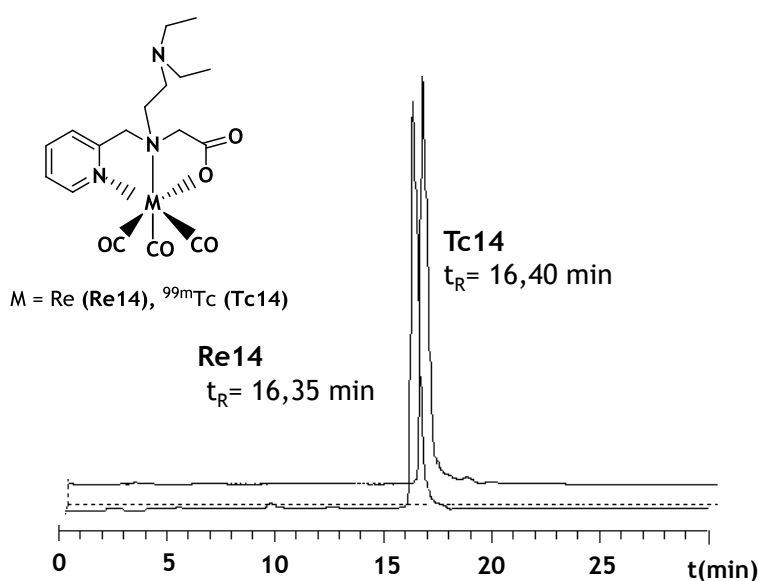


**Esquema 3.10.** Síntese dos complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{L})$  funcionalizados com o grupo N-pirrolidina (**Tc11**, **Tc13** e **Tc15**)



**Esquema 3.11.** Síntese dos complexos de  ${}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$  funcionalizados com o grupo N-dietilo (Tc12, Tc14, Tc16 e Tc17)

Os complexos Tc11-Tc17 foram caracterizados por comparação dos seus tempos de retenção obtidos por HPLC com os tempos de retenção dos complexos de rénio análogos (figura 3.24 e tabela 3.3). Estudos de estabilidade em condições fisiológicas (PBS, pH 7,4; 37 °C) demonstraram que os complexos Tc11-Tc17 são estáveis até 24 h, não sofrendo qualquer tipo de degradação ou hidrólise.



**Figura 3.24.** Cromatogramas de HPLC dos compostos Re14 (detecção UV) e Tc14 (detecção  $\gamma$ )

**Tabela 3.3.** Tempos de retenção ( $t_R$ ) e valores de  $\log D_{o/w}$  (pH 7,4) para os complexos Tc11-Tc17

Complexo	$t_R$ (min)	Log $D_{o/w}$ (pH 7,4)
Tc11	17,76 (17,56) <sup>a</sup>	1,10 ± 0,03
Tc12	18,85 (18,82) <sup>a</sup>	0,87 ± 0,03
Tc13	15,50 (15,40) <sup>a</sup>	-0,02 ± 0,03
Tc14	16,40 (16,35) <sup>a</sup>	0,00 ± 0,01
Tc15	16,85 (16,83) <sup>a</sup>	1,12 ± 0,06
Tc16	17,78 (17,77) <sup>a</sup>	0,53 ± 0,01
Tc17	17,90 (17,88) <sup>a</sup>	-0,72 ± 0,02

<sup>a</sup> os valores indicados entre parêntesis referem-se aos complexos de Re

A determinação do coeficiente de distribuição  $\log D_{o/w}$  a pH 7,4 dos complexos Tc11-Tc17 mostrou que esse parâmetro varia entre  $-0,72 \pm 0,02$  e  $1,12 \pm 0,06$ . Comparativamente aos compostos congêneres descritos no capítulo 2, estes complexos apresentam tendencialmente um carácter menos hidrofílico, sendo Tc17 ( $\log D_{o/w} = -0,72 \pm 0,02$ ) a excepção mais notória. Exceptuando o par Tc13/Tc14, verificou-se que a substituição do grupo N-dietilo pelo grupo N-pirrolidina levou a um aumento da lipofilia. Surpreendentemente, a introdução de um grupo  $\text{CH}_2$  adicional no espaçador usado para ligar o grupo N-dietilo aos ligandos bifuncionais (S,N,O) levou a uma diminuição significativa do valor de  $\log D_{o/w}$  a pH 7,4 que passa de 0,53 (complexo Tc16) para  $-0,72$  (complexo Tc17).

### 3.3.3.2. Efeito do pH nos valores de $\log D_{o/w}$ e determinação do $\text{pK}_a$ para os complexos Tc16 e Tc17

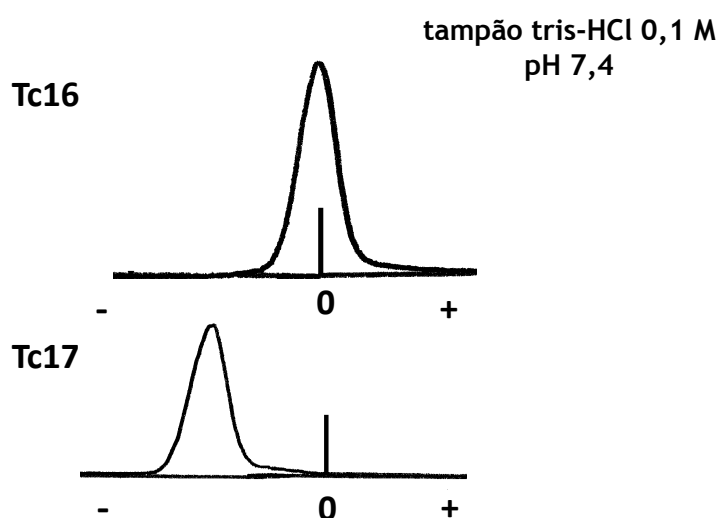
Colocámos a hipótese de que a tendência anómala encontrada para a lipofilia dos complexos Tc16 e Tc17 pudesse reflectir diferentes basicidades do grupo pendente N-dietilo, como resultado da presença de espaçadores diferentes. De modo a testar esta hipótese, avaliou-se o efeito do pH nos valores de  $\log D_{o/w}$ , procedeu-se aos estudo dos complexos por electroforese, para avaliar qualitativamente a sua carga a pH fisiológico, e determinaram-se os respectivos valores de  $\text{pK}_a$ . A determinação do  $\text{pK}_a$  foi ainda efectuada para os complexos congêneres de Re (Re16 e Re17).

Os valores obtidos para a determinação do  $\log D_{o/w}$  a diferentes valores de pH (2,7; 7,4 e 10,6) para os complexos Tc16 e Tc17 encontram-se apresentados na tabela 3.4.

**Tabela 3.4.** Valores de  $\log D_{o/w}$  para os complexos Tc16 e Tc17 a pH 2,7; 7,4 e 10,6

Complexo	Log $D_{o/w}$		
	pH =2,7	pH=7,4	pH=10,6
Tc16	- 0,19 ± 0,01	0,53 ± 0,01	1,01 ± 0,06
Tc17	- 1,12 ± 0,04	- 0,72 ± 0,02	1,23 ± 0,02

A pH 10,6, o complexo Tc17 ( $\log D_{o/w} = 1,23$ ) tem um carácter mais lipofílico do que o complexo Tc16 ( $\log D_{o/w} = 1,01$ ), ao contrário do observado a pH fisiológico e a pH 2,7 (Tabela 3.4). Ao analisar o efeito do pH na lipofilia dos complexos verifica-se que esta tende a aumentar com o aumento do valor de pH, o que reflecte certamente a crescente desprotonação da amina terminal e o aumento da percentagem das espécies neutras, mais lipofílicas, em solução. A pH alcalino as aminas terminais encontram-se desprotonadas para ambos os complexos e verifica-se a tendência esperada, sendo mais lipofílico o complexo (Tc17) contendo o espaçador com o grupo metilénico adicional. Aparentemente, a desprotonação da amina terminal deve ocorrer a pH inferior no caso do complexo Tc16, o que justifica que apresente um carácter mais lipofílico a pH fisiológico. Nesta hipótese, o complexo Tc16 deveria apresentar um carácter neutro a pH fisiológico enquanto Tc17 se deveria apresentar carregado. O estudo dos complexos por electroforese em papel, utilizando tampão tris-HCl 0,1 M a pH 7,4 como electrólito, confirmou que Tc16 é neutro a esse valor de pH enquanto Tc17 é catiónico, como se pode confirmar nos electroforetogramas apresentados na figura 3.25.



**Figura 3.25.** Electroforetogramas dos complexos Tc16 e Tc17 obtidos por electroforese a potencial constante ( $V = 300V/1 h$ ), utilizando tiras de papel Whatman 3MM como suporte e tampão tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) como electrólito

A diferente carga que foi encontrada para **Tc16** e **Tc17** a pH fisiológico reflecte certamente diferentes graus de protonação, como consequência de diferentes valores de  $pK_a$  dos complexos. Como já atrás referido, para clarificar este aspecto procedeu-se à determinação do  $pK_a$  dos complexos por HPLC de fase reversa, utilizando metodologias descritas na literatura.<sup>192-194</sup> Esta determinação foi também efectuada para os complexos de rénio congéneres (**Re16** e **Re17**) que, como visto atrás, foram caracterizados pelas técnicas analíticas usuais. A determinação do  $pK_a$  baseou-se no estudo do efeito do pH nos factores de capacidade dos complexos, usando como eluente misturas de acetonitrilo/tampão fosfato (pH = 3-12).<sup>133,193,194</sup>

O factor de capacidade ( $k'$ ) de um dado composto pode ser calculado com base no seu tempo de retenção ( $t_R$ ) e no tempo morto da coluna ( $t_0$ ), de acordo com a equação 3.1.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (3.1)$$

Para uma base fraca o factor de capacidade  $k'$ , para um dado valor de pH da fase móvel, é função do factor de capacidade ( $k'_B$ ) da base livre (B), do factor de capacidade ( $k'_{BH^+}$ ) do ácido conjugado e da constante de dissociação ( $K_a$ ) do equilíbrio  $BH^+ \rightleftharpoons B + H^+$ , como indicado na equação 3.2. Esta equação pode ser rearranjada sob a forma de uma equação Henderson Hasselbach (equação 3.3).

$$k' = \frac{k'_B + k'_{BH^+} ([H^+] / K_a)}{1 + ([H^+] / K_a)} \quad (3.2)$$

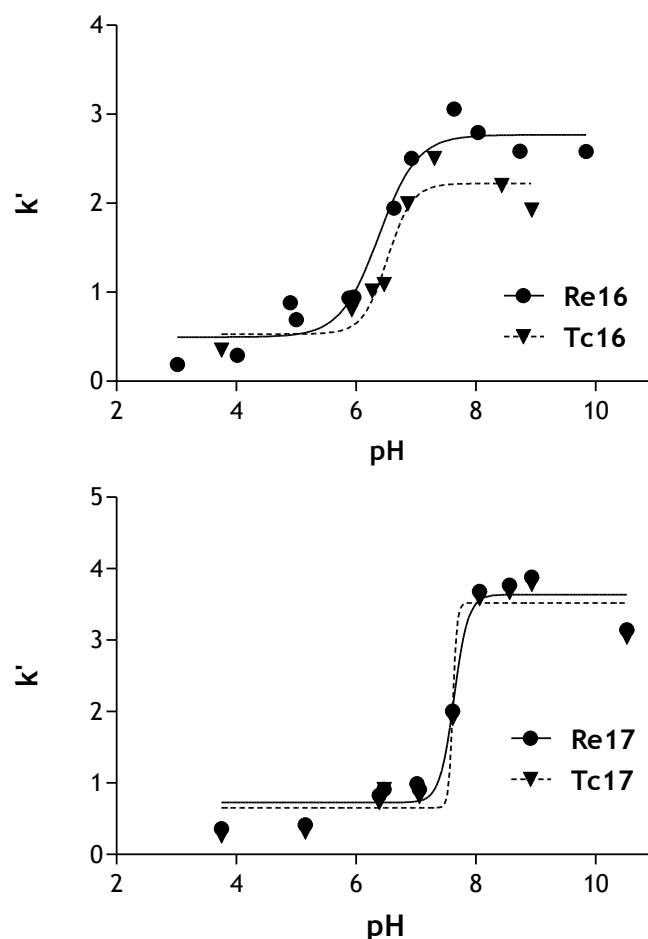
$$pK_a = pH + \log \left[ \frac{k'_B - k'}{k' - k'_{BH^+}} \right] \quad (3.3)$$

A representação gráfica do factor de capacidade ( $k'$ ), determinado experimentalmente, em função do pH da fase móvel origina uma curva sigmoidal, de acordo com a equação 3.3. Como os complexos em estudo (**Tc16/Re16** e **Tc17/Re17**) apresentam apenas um grupo ionizável, o ponto de inflexão da curva sigmoidal corresponde ao valor de  $pK_a$ .<sup>194-196</sup> O valor de  $pK_a$ , ou mais correctamente o valor de  $pK_{HPLC}$ ,

pode ainda ser obtido pela determinação do máximo da função primeira derivada (equação 3.4) dessa curva sigmoideal (equação 3.3).

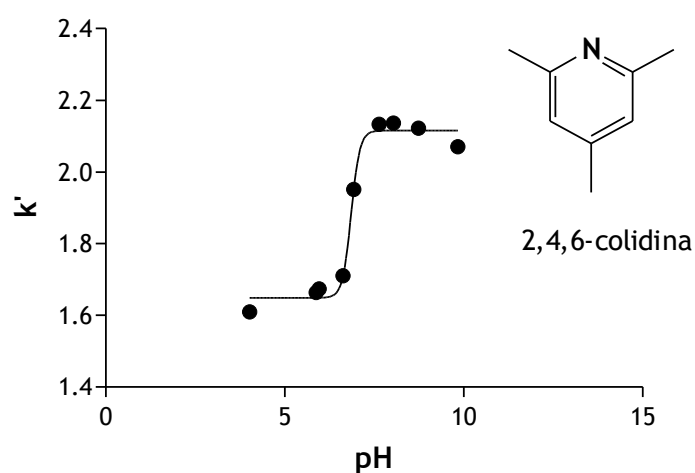
$$y' = \frac{d(k')}{d(\text{pH})} = 2,3 k'B \frac{K_a[\text{H}^+]}{(K_a + [\text{H}^+])^2} \quad (3.4)$$

Para os complexos **Re16/Tc16** e **Re17/Tc17**, foram determinados os valores dos factores de capacidade  $k'$  em função do pH, na gama de pH 3-12, com base nos tempos de retenção dos complexos e no tempo morto da coluna de fase reversa utilizada. A representação gráfica desses valores é apresentada na figura 3.26, juntamente com as curvas sigmoideais que foram obtidas pelo melhor ajuste matemático ao conjunto dos pontos experimentais. O máximo da primeira derivada dos gráficos representados nas figuras 3.26 permitiu calcular os valores de  $\text{pK}_{\text{HPLC}}$  dos complexos.



**Figura 3.26.** Gráfico do factor de capacidade ( $k'$ ) em função do pH da fase móvel para os complexos **Re16/Tc16** e **Re17/Tc17**.

De forma a estimar os valores de  $pK_a$ , obtidos geralmente em meio exclusivamente aquoso, determinou-se o  $pK_{HPLC}$  de uma base cujo  $pK_a$  se encontrava descrito na literatura e relativamente próximo dos valores de  $pK_a$  esperados para os complexos em estudo. A diferença entre os valores de  $pK_{HPLC}$  e  $pK_a$  deste composto de referência permitiria corrigir os valores  $pK_{HPLC}$  dos complexos e extrapolar os respectivos valores de  $pK_a$ .<sup>194</sup> Para esse efeito, usou-se a 2,4,6-colidina como composto de referência, apresentando-se na figura 3.27 a variação dos respectivos valores de  $k'$  em função do pH da fase móvel. Tal como descrito atrás para os complexos, determinou-se o valor de  $pK_{HPLC}$  da 2,4,6-colidina a partir da curva sigmoideal que melhor se ajustou aos pontos experimentais.



**Figura 3.27.** Gráfico do factor de capacidade ( $k'$ ) em função do pH da fase móvel para a 2,4,6-colidina

Os valores de  $pK_{HPLC}$  e  $pK_a$  determinados para os complexos **Re16-Re17** e **Tc16-Tc17** e para a 2,4,6-colidina encontram-se apresentados na tabela 3.5.

**Tabela 3.5.** Valores de  $pK_{HPLC}$  e  $pK_a$  para os complexos **Re16-Re17**, **Tc16-Tc17** e 2,4,6-colidina

Composto	$pK_{HPLC}$	$pK_a$
<b>Re16</b>	6,34	6,97
<b>Tc16</b>	6,58	7,21
<b>Re17</b>	7,64	8,27
<b>Tc17</b>	7,64	8,27
<b>2,4,6-colidina</b>	6,85	7,48 <sup>197</sup>

Os valores de  $pK_a$  obtidos para os complexos de Re são semelhantes aos obtidos para os complexos de Tc, confirmando que estamos na presença de compostos isoestruturais cuja ionização envolve a protonação do grupo pendente N-dietilo. O complexo **Tc16** apresenta um valor de  $pK_a$  inferior ao complexo **Tc17**, tendo-se obtido valores de 7,21 e 8,27, respectivamente. Tendo em conta estes valores de  $pK_a$ , a percentagem de complexos na forma neutra a pH fisiológico é cerca de 60 % e 10% para **Tc16** e **Tc17**, respectivamente. Estes resultados confirmam a hipótese inicial em que se considerou que a diferente lipofilia destes complexos era devida a diferentes valores de  $pK_a$ , não resultando de eventuais diferenças estruturais relacionadas com modos de coordenação diferentes dos ligandos. É de referir que o mesmo tipo de efeito já havia sido descrito para oxo-complexos de Tc(V) funcionalizados com o grupo N-dietilo, tendo sido também verificado que a introdução de um grupo metilénico adicional no espaçador entre a amina terciária e o ligando quelante leva a um aumento do  $pK_a$  dos complexos.<sup>133</sup>

### 3.3.3.3. Determinação da afinidade para a melanina

Procedeu-se à determinação da afinidade para a melanina dos complexos **Tc11-Tc17**, de acordo com a metodologia descrita no capítulo anterior para complexos congéneres. Este estudo foi ainda alargado aos complexos modelo *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\{\text{py}(\text{CH}_2)\text{NHCH}_2\text{COO}\}]^{58}$  (**43**) e *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\{\text{C}_2\text{H}_5\}\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COO}\}]$  (**Tc10**), tal como no capítulo anterior já se tinha avaliado o complexo *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\{3,5\text{-Mepz}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COO}\}]^{55}$  (**6**). Na tabela 3.6 apresentam-se as percentagens de ligação à melanina que foram encontradas para os diferentes complexos.

**Tabela 3.6.** Percentagem de ligação à melanina para os complexos **Tc11-Tc17**, após 1 h a 37 °C  
([melanina] = 0,5 mg/10 mL)

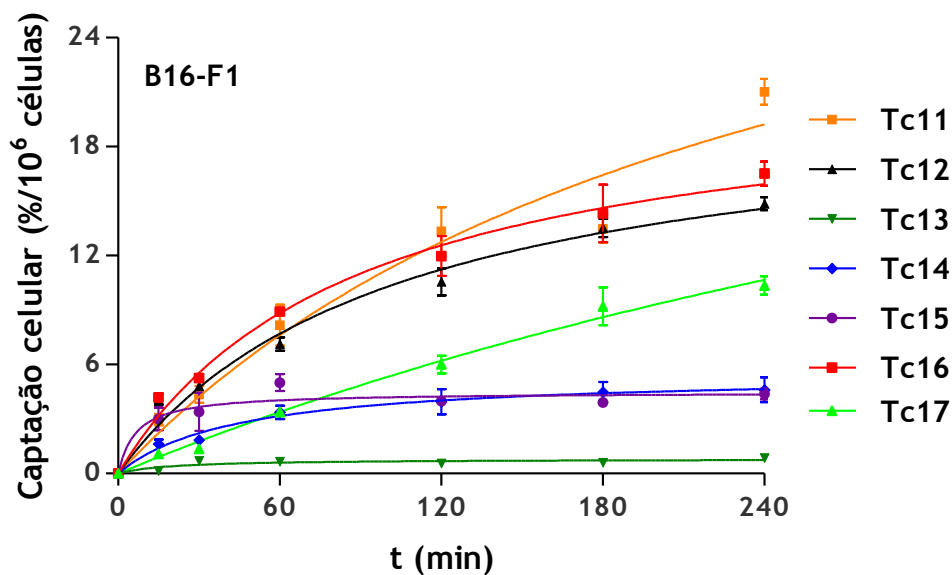
Complexo	% ligação à melanina
<b>Tc11</b>	87 ± 3
<b>Tc12</b>	74 ± 2
<b>Tc13</b>	62 ± 3
<b>Tc14</b>	48 ± 4
<b>Tc15</b>	36 ± 2
<b>Tc16</b>	23 ± 2
<b>Tc17</b>	31 ± 6

Os complexos **Tc11-Tc17** apresentaram uma afinidade para a melanina moderada a elevada que variou entre 23 e 87%. Os complexos modelo (**6**, **43** e **Tc10**) não apresentaram qualquer ligação à melanina, o que mostra que a introdução dos fragmentos N-dietilo e N-pirrolidina confere aos complexos afinidade para este pigmento.

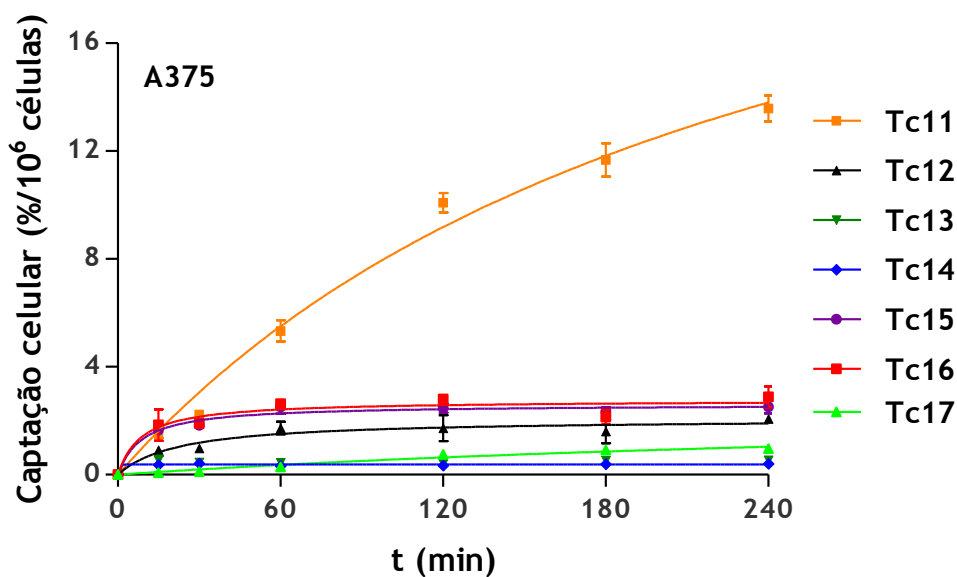
Para complexos com o mesmo tipo de ligando bifuncional, a substituição do grupo N-pirrolidina (**Tc11**, **Tc13** e **Tc15**) pelo grupo N-dietilo (**Tc12**, **Tc14** e **Tc16-Tc17**) conduz a uma diminuição da percentagem de ligação à melanina. Os complexos **Tc11** e **Tc12**, estabilizados pelos ligandos do tipo pirazolo-aminocarboxílico, foram aqueles que apresentaram maior afinidade para a melanina, enquanto os complexos **Tc15-Tc17** com os ligandos derivados da cisteamina doadores (S,N,O) apresentaram os valores mais baixos. Estudos descritos na literatura parecem indicar que a presença de anéis aromáticos na estrutura dos compostos leva ao estabelecimento de processos de transferência de carga, aumentando a sua interacção com a melanina.<sup>70,120</sup> Eventualmente, o estabelecimento deste tipo de interacções, conjuntamente com as interacções electrostáticas resultantes da presença das aminas terciárias pendentes, poderá explicar a elevada ligação à melanina dos complexos **Tc11-Tc14**, em especial no caso dos complexos **Tc11** e **Tc12** com ligandos do tipo pirazolo-aminocarboxílico.

#### **3.3.3.4. Captação celular em linhas celulares melanóticas e amelanóticas de melanoma**

Inicialmente procedeu-se ao estudo da captação celular dos complexos **Tc11-Tc17** em células de melanoma murino B16-F1 que contêm melanina (figura 3.28). Como se pode verificar pela análise do gráfico da figura 3.28, alguns dos complexos apresentaram valores de captação celular significativamente superiores aos obtidos para os complexos congéneres descritos no capítulo anterior. Tendo em conta estes resultados, decidimos estudar a captação celular dos complexos **Tc11-Tc17** em células de melanoma humano A375 que são amelanóticas, de forma a avaliar o papel da melanina na captação celular dos complexos (figura 3.29). A estabilidade *in vitro* dos complexos **Tc11-Tc17** no meio de cultura das células foi estudada através da análise por ITLC-SG. Este estudo demonstrou que não se observa qualquer decomposição dos complexos, mesmo após 4 h de incubação a 37 °C.



**Figura 3.28.** Captação celular\* dos complexos Tc11-Tc17 em células B16-F1 em função do tempo de incubação a 37 °C (\*expressa em percentagem da actividade total adicionada por milhão de células)



**Figura 3.29.** Captação celular\* dos complexos Tc11-Tc17 em células A375 em função do tempo de incubação a 37 °C (\*expressa em percentagem da actividade total adicionada por milhão de células)

A percentagem de captação nas células de melanoma murino B16-F1 dos complexos Tc11-Tc17 apresenta valores baixos a moderados, na gama 0,86-20,04% quando expressos em percentagem de actividade total por milhão de células (Figura 3.28). Os complexos Tc11, Tc16 e Tc12 foram aqueles que apresentaram os maiores valores de captação (21,02%  $\pm$  0,07; 16,52%  $\pm$  0,77; 14,86%  $\pm$  0,07 após 4 h de incubação, respectivamente),

enquanto **Tc13** e **Tc14** estabilizados pelos ligandos piridina-aminocarboxílicos apresentaram valores negligenciáveis. Com excepção do composto **Tc15**, os complexos com maior lipofilia (**Tc11**, **Tc12** e **Tc16**) são os que apresentam valores superiores de captação celular nas células B16-F1.

Comparando os valores de captação celular com a afinidade para a melanina, conclui-se que os compostos que apresentam maior afinidade para a melanina (**Tc11** e **Tc12**) apresentam uma captação celular considerável nas células B16-F1. No entanto, os compostos **Tc16** e **Tc17** estabilizados pelos ligandos doadores (S,N,O) também apresentam valores significativos de captação celular ( $16,52\% \pm 0,77$  e  $10,35 \pm 0,50$  após 4 h de incubação, respectivamente) apesar de a sua afinidade para a melanina ( $36\% \pm 0,02$  e  $23\% \pm 0,02$ , respectivamente) não ser muito elevada.

Nas células amelanóticas A375, verificou-se que **Tc11** é o único complexo que apresenta valores de captação celular moderados ( $13,58\% \pm 0,49$ , após 4 h de incubação), apresentando os restantes complexos, **Tc12-Tc17**, valores muito reduzidos ( $< 3\%$ ). Uma vez que a linha celular A375 não possui melanina, a maior captação e retenção celular do complexo **Tc11** nesta linha celular não pode ser justificada pela sua afinidade para a melanina. Por outro lado, como visto atrás, o complexo **Tc16** apresenta uma afinidade relativamente baixa para a melanina, mas apresentou valores significativos de captação celular em células B16-F1. Estes dados sugeriram que a interacção com a melanina, em certa medida, poderia não ser o único factor determinante da captação e retenção celulares observadas para estes complexos.

Como referido na parte introdutória, o mecanismo de captação celular mais comumente aceite para as benzamidas e seus derivados é a ligação dos compostos à melanina.<sup>118,120,126-128,133,172</sup> No entanto, a ligação aos receptores  $\sigma$  também tem sido proposta como alternativa, especialmente para compostos contendo grupos alquildialquilamina com elevada afinidade para estes receptores.<sup>96,108,109,198</sup> De forma a averiguar se os receptores  $\sigma$  teriam alguma contribuição no mecanismo de captação celular dos complexos, foram efectuados estudos de competição com o haloperidol, um ligando com reconhecida afinidade para os receptores  $\sigma$ . Este estudo foi efectuado para os complexos que apresentaram captações significativas em cada uma das linhas celulares utilizadas, ou seja complexos **Tc11**, **Tc12** e **Tc16** nas células B16-F1 e o complexo **Tc11** na linha celular A375. A expressão dos receptores  $\sigma$  nas células A375 encontra-se bem documentada na literatura.<sup>199</sup> Contrariamente, para as células B16-F1 não havia uma evidência clara da expressão dos receptores  $\sigma$ .<sup>122</sup> Como descrito a seguir, foram efectuados estudos para verificar se as células B16-F1 usadas nos ensaios de captação celular expressavam ou não receptores  $\sigma$ .

### 3.3.3.5. Avaliação da expressão dos receptores sigma

De forma a avaliar a expressão dos receptores  $\sigma$  em células B16-F1 recorreu-se à técnica de *western blot*, utilizando-se anticorpos (Ac) específicos para os receptores  $\sigma_1$ .

O *western blot* é uma técnica de biologia molecular utilizada para detectar proteínas em homogenatos de células ou extractos de tecidos biológicos. Esta técnica utiliza electroforese em gel para separar as proteínas, previamente desnaturadas, de acordo com a sua massa. As proteínas são posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde a proteína alvo é identificada através do uso de Ac específicos para a proteína. Na figura 3.30 encontra-se representada um esquema geral desta técnica.

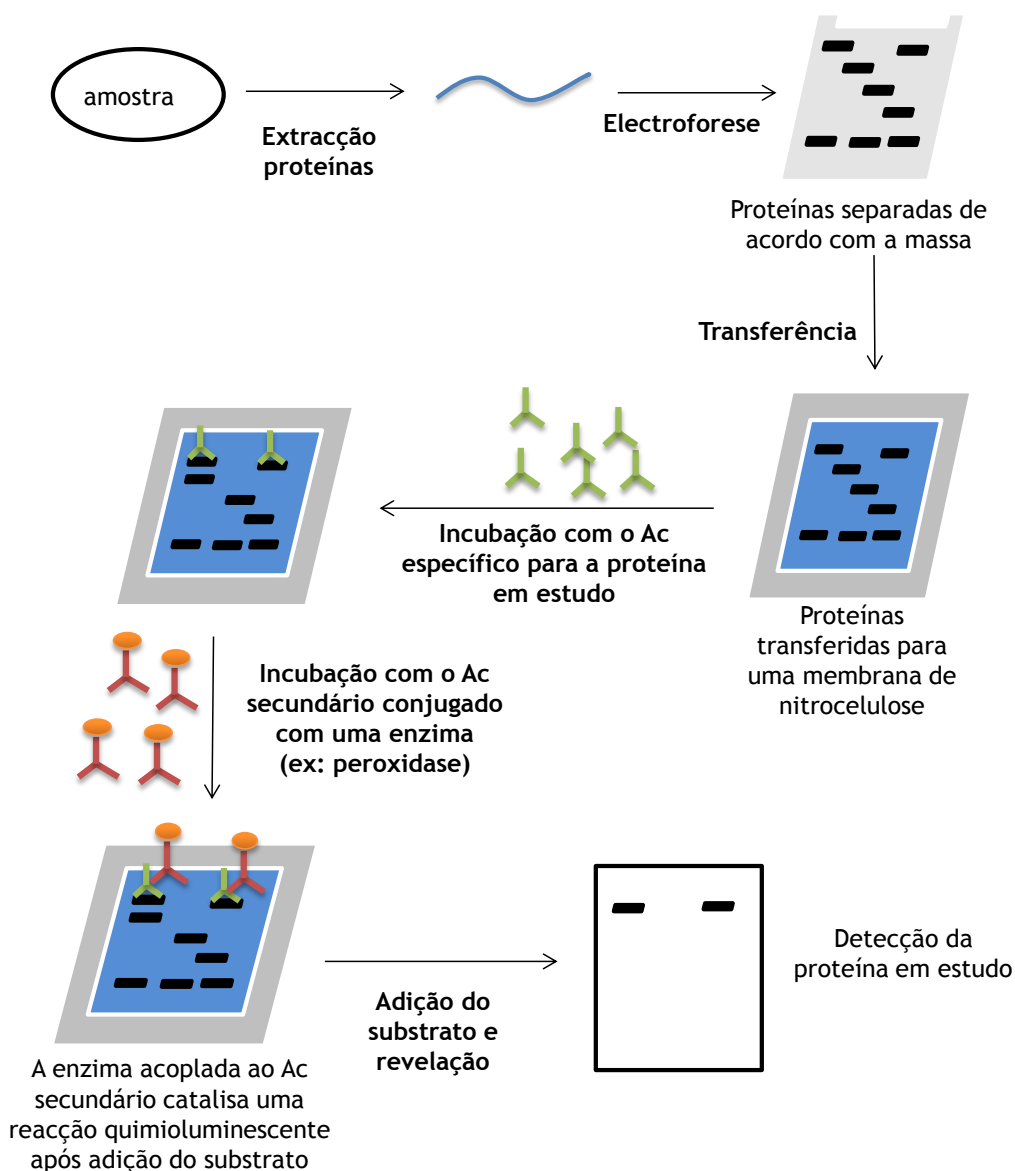
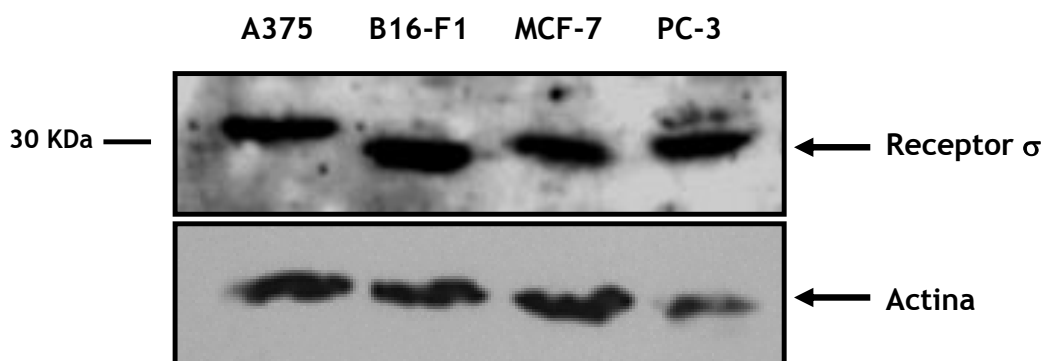


Figura 3.30. Esquema geral da técnica *Western Blot*

Na determinação da expressão dos receptores  $\sigma$  utilizaram-se, para além das células B16-F1, as linhas celulares A375<sup>199</sup> (melanoma de origem humana), MCF-7<sup>199,200</sup> (cancro da mama humano) e PC-3<sup>201</sup> (cancro da próstata humano), nas quais a expressão destes receptores se encontra descrita na literatura. A actina foi utilizada como controlo interno do *western blot*, visto ser uma proteína estrutural, presente em todas as células. Os resultados obtidos para o *western blot* encontram-se apresentados na figura 3.31.



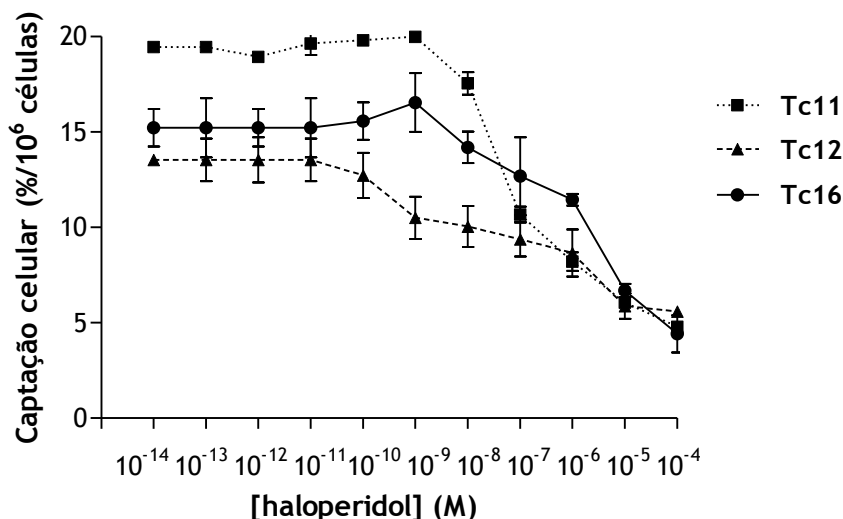
**Figura 3.31.** *Western blot* obtido após incubação de várias linhas celulares com um anticorpo específico para os receptores  $\sigma_1$

A análise da figura 3.31 revelou a presença de uma banda na zona dos 30 kDa referente ao receptor  $\sigma_1$ , para todas as linhas celulares estudadas. A presença desta banda confirma a presença de receptores  $\sigma_1$  nas células B16-F1. A ligeira diferença de massa molecular encontrada entre a banda da linha celular A375 e a da B16-F1 pode ser explicada por diferentes variantes de *splicing* que este receptor apresenta que originam ligeiras diferenças na massa molecular final das proteínas.<sup>112,200,201</sup>

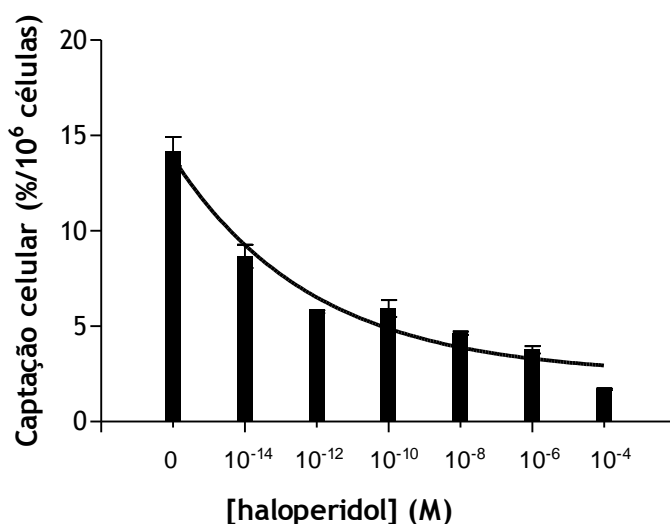
### 3.3.3.6. Estudos de competição com o haloperidol

Foram efectuados estudos de competição com o haloperidol nas linhas celulares B16-F1 e A375. Como atrás referido, nas células B16-F1 escolheram-se os complexos que apresentavam os maiores valores de captação (Tc11, Tc12 e Tc16). Nas células A375 efectuou-se apenas o estudo para o complexo Tc11.

As células foram incubadas com soluções de haloperidol com concentrações entre  $10^{-4}$  M e  $10^{-14}$  M e com o composto radioactivo durante 4 h. Os resultados obtidos para as células B16-F1 e A375 encontram-se representados nas figuras 3.32 e 3.33, respectivamente.



**Figura 3.32.** Captação celular por milhão de células dos complexos Tc11, Tc12 e Tc16 na presença de haloperidol em concentrações crescentes, após 4 h de incubação em células B16-F1



**Figura 3.33.** Captação celular por milhão de células dos complexos Tc11 na presença de haloperidol em concentrações crescentes, após 4 h de incubação em células A375

A incubação das células B16-F1 com o haloperidol e com os complexos Tc11, Tc12 e Tc16 levou a uma diminuição da captação celular dos complexos para concentrações superiores a  $10^{-9}$  M. Nesta linha celular, a captação do complexo Tc11 é afectada mais significativamente, verificando-se uma redução da captação celular de  $17,55 \pm 0,49\%$  para  $10,62 \pm 0,41\%$  quando a concentração de haloperidol passa de  $10^{-8}$  M para  $10^{-7}$  M. A incubação das células A375 com o complexo Tc11 e com haloperidol em concentrações crescentes foi acompanhada por uma diminuição acentuada da captação celular para concentrações de haloperidol tão baixas quanto  $10^{-14}$  M, verificando-se uma captação de

13,58 ± 0,49% na ausência de haloperidol e uma captação de 8,66 ± 0,61% na presença de uma concentração de 10<sup>-14</sup> M de haloperidol.

Dado que o haloperidol é um fármaco utilizado como neuroléptico, decidiu-se avaliar a toxicidade do haloperidol nas linhas celulares B16-F1 e A375 através da técnica do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Por exemplo, a toxicidade do haloperidol já tinha sido descrita anteriormente para células M4Beu.<sup>104</sup> O teste do MTT é um teste amplamente utilizado para determinação da viabilidade celular. Células B16-F1 e A375 foram incubadas durante 4 h com meio contendo haloperidol em concentrações entre 10<sup>-14</sup> e 10<sup>-4</sup> M. Verificou-se que existe um efeito tóxico para a linha celular B16-F1 a partir de concentrações de 10<sup>-4</sup> M de haloperidol, observando-se a presença de 63% de células viáveis. As células A375 revelaram uma maior sensibilidade à acção do composto, encontrando-se apenas 56% de células viáveis para concentrações de 10<sup>-5</sup> M de haloperidol. Estes ensaios de citotoxicidade mostraram que a viabilidade celular das células B16-F1 e A375 só é afectada pelo haloperidol para concentrações significativamente superiores às concentrações para as quais se verificou uma diminuição da captação celular dos complexos Tc11, Tc12 e Tc16. Estes dados indicam que a redução da captação celular dos complexos pode resultar do bloqueamento dos receptores  $\sigma$  pelo haloperidol, sugerindo o potencial envolvimento destes receptores no mecanismo de captação celular, em particular no caso do complexo Tc11.

#### 3.3.3.7. Biodistribuição e estabilidade *in vivo*

O comportamento biológico dos complexos Tc11-Tc17 foi estudado em ratinhos C57BL/6 inoculados com células B16-F1. Os resultados de biodistribuição foram calculados em percentagem de dose injectada por grama de órgão (% DI/g órgão) (tabelas 3.7 e 3.8). A fixação dos complexos Tc11-Tc17 nos órgãos/tecidos mais relevantes encontra-se ainda representada graficamente na figura 3.34.

Tabela 3.7. Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) dos complexos Tc11-Tc14

Orgão	Tempo de sacrifício							
	Tc11		Tc12		Tc13		Tc14	
	1 h	4 h	1 h	4 h	1 h	4 h	1 h	4 h
Sangue	0,82 ± 0,21	0,26 ± 0,08	0,99 ± 0,17	0,41 ± 0,12	0,79 ± 0,15	0,33 ± 0,08	0,48 ± 0,13	0,25 ± 0,06
Fígado	3,72 ± 0,53	2,19 ± 1,09	5,46 ± 1,54	2,86 ± 1,03	6,29 ± 0,69	5,08 ± 1,30	4,24 ± 0,64	2,31 ± 0,45
Intestino	26,80 ± 2,06	28,56 ± 2,15	25,91 ± 1,51	23,41 ± 2,78	17,39 ± 0,53	21,84 ± 6,71	18,74 ± 1,9	21,39 ± 2,04
Baço	0,86 ± 0,15	0,22 ± 0,14	0,92 ± 0,09	0,28 ± 0,07	0,45 ± 0,27	0,24 ± 0,07	0,66 ± 0,08	0,26 ± 0,05
Coração	0,75 ± 0,15	0,24 ± 0,02	0,71 ± 0,10	0,20 ± 0,05	1,13 ± 0,31	0,31 ± 0,03	0,86 ± 0,11	0,37 ± 0,08
Pulmões	1,47 ± 0,22	0,55 ± 0,10	0,93 ± 0,62	0,34 ± 0,19	0,69 ± 0,09	0,27 ± 0,06	0,79 ± 0,10	0,36 ± 0,1
Rins	7,21 ± 2,09	1,35 ± 0,28	3,92 ± 0,95	1,10 ± 0,26	3,10 ± 0,52	1,81 ± 0,23	4,77 ± 0,68	2,53 ± 0,35
Músculo	0,88 ± 0,24	0,15 ± 0,02	0,88 ± 0,08	0,16 ± 0,08	0,51 ± 0,13	0,28 ± 0,06	0,63 ± 0,22	0,22 ± 0,06
Fémur	0,66 ± 0,15	0,13 ± 0,02	0,64 ± 0,07	0,17 ± 0,09	0,46 ± 0,08	0,23 ± 0,05	0,55 ± 0,06	0,18 ± 0,04
Estômago	2,67 ± 0,39	0,50 ± 0,23	2,70 ± 0,64	0,45 ± 0,18	2,87 ± 1,14	1,04 ± 0,29	1,55 ± 0,80	0,71 ± 0,12
Pâncreas	2,15 ± 0,35	0,37 ± 0,08	1,77 ± 0,53	0,28 ± 0,10	0,81 ± 0,37	0,25 ± 0,01	0,92 ± 0,15	0,38 ± 0,07
Olhos	1,34 ± 0,24	1,24 ± 0,10	1,71 ± 0,40	1,11 ± 0,19	0,89 ± 0,17	1,49 ± 1,05	0,56 ± 0,05	0,63 ± 0,19
Pele	0,51 ± 0,10	0,22 ± 0,09	0,74 ± 0,24	0,27 ± 0,14	0,25 ± 0,08	0,32 ± 0,13	0,33 ± 0,1	0,21 ± 0,14
Tumor	1,74 ± 0,24	1,22 ± 0,29	0,99 ± 0,19	0,79 ± 0,76	0,42 ± 0,06	0,27 ± 0,05	0,97 ± 0,15	0,81 ± 0,2
Excreção (% DI)	28,25 ± 2,32	41,18 ± 5,78	16,5 ± 12,6	37,3 ± 11,5	47,0 ± 2,9	50,3 ± 14,0	51,5 ± 3,0	58,2 ± 7,7

**Tabela 3.8.** Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) dos complexos Tc15-Tc17

Orgão	Tempo de sacrifício					
	Tc15		Tc16		Tc17	
	1 h	4 h	1 h	4 h	1 h	4 h
Sangue	0,68 ± 0,21	0,25 ± 0,05	0,87 ± 0,13	0,40 ± 0,05	0,68 ± 0,07	0,19 ± 0,02
Fígado	3,53 ± 0,80	1,36 ± 0,24	4,96 ± 0,40	3,66 ± 0,69	4,71 ± 0,23	3,25 ± 0,80
Intestino	22,92 ± 2,49	17,55 ± 4,07	20,59 ± 1,36	19,44 ± 1,38	13,36 ± 1,48	18,69 ± 1,10
Baço	0,54 ± 0,19	0,22 ± 0,05	1,29 ± 0,28	1,30 ± 0,41	0,95 ± 0,17	0,24 ± 0,04
Coração	0,43 ± 0,04	0,46 ± 0,31	0,53 ± 0,09	0,21 ± 0,02	1,09 ± 0,10	0,22 ± 0,04
Pulmões	0,86 ± 0,24	0,28 ± 0,09	0,83 ± 0,01	0,21 ± 0,08	1,48 ± 0,23	0,80 ± 0,07
Rins	1,64 ± 0,17	0,67 ± 0,23	2,39 ± 0,13	1,32 ± 0,34	4,49 ± 0,22	1,50 ± 0,15
Músculo	0,37 ± 0,05	0,05 ± 0,01	0,42 ± 0,07	0,10 ± 0,01	1,54 ± 0,17	0,33 ± 0,12
Fémur	0,34 ± 0,04	0,04 ± 0,02	0,39 ± 0,06	0,14 ± 0,01	0,98 ± 0,17	0,31 ± 0,19
Estômago	0,69 ± 0,37	0,26 ± 0,18	1,61 ± 0,66	0,75 ± 0,40	1,69 ± 0,17	1,53 ± 1,12
Pâncreas	1,46 ± 0,91	0,17 ± 0,09	0,50 ± 0,15	0,17 ± 0,03	2,49 ± 0,43	0,77 ± 0,08
Olhos	1,38 ± 0,30	0,82 ± 0,56	1,54 ± 0,15	1,41 ± 0,27	0,87 ± 0,10	0,71 ± 0,06
Pele	0,32 ± 0,07	0,35 ± 0,26	0,54 ± 0,27	0,22 ± 0,15	1,05 ± 0,18	0,36 ± 0,07
Tumor	1,44 ± 0,32	0,89 ± 0,38	2,17 ± 0,42	1,69 ± 0,35	1,90 ± 0,14	1,68 ± 0,53
Excreção (% DI)	33,70 ± 2,48	51,10 ± 4,62	31,6 ± 11,1	56,9 ± 7,2	32,0 ± 12,7	54,3 ± 1,7

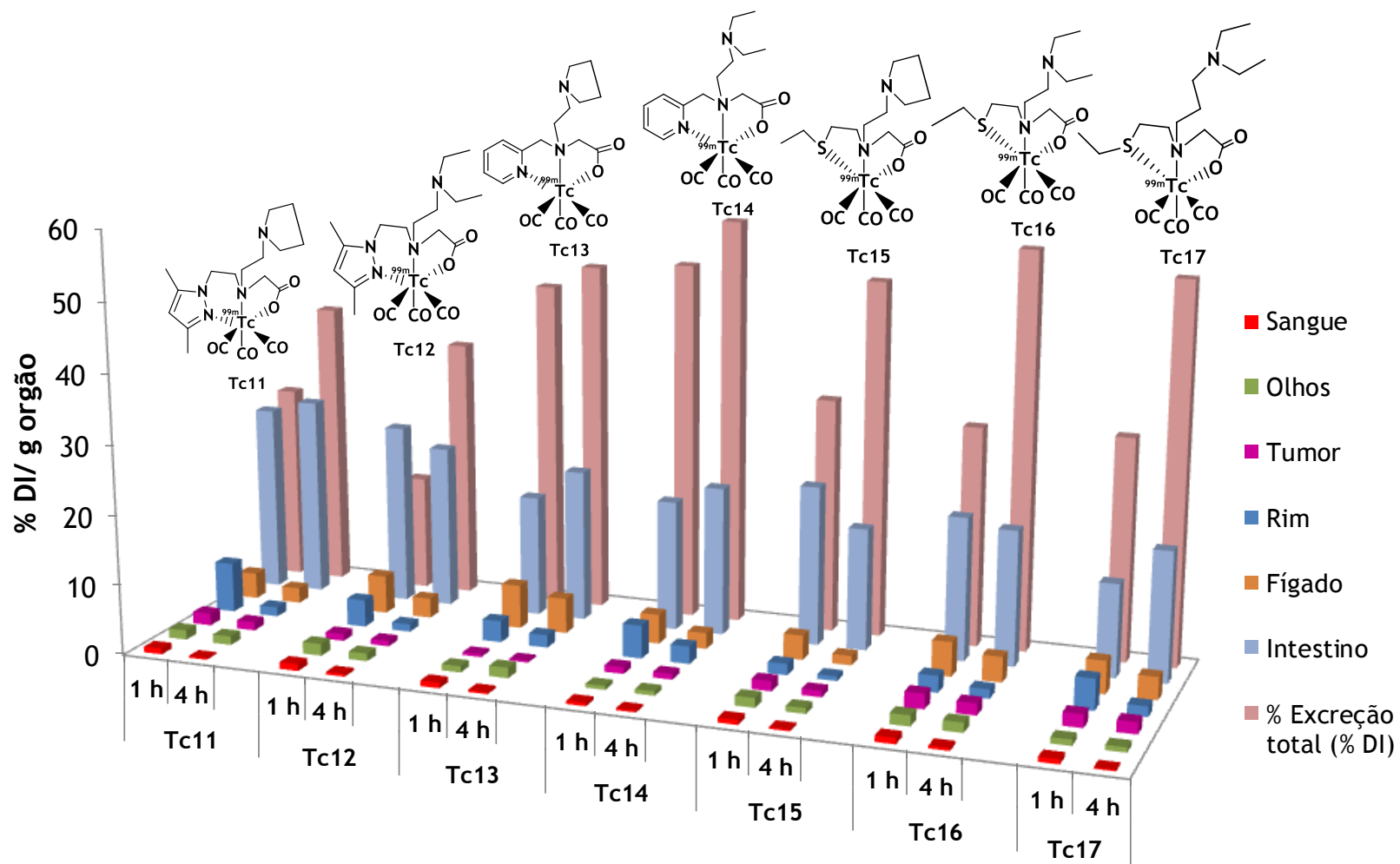


Figura 3.34. Resultados de biodistribuição (% DI/g órgão) e excreção total (% DI) para os principais órgãos/tecidos dos complexos Tc11-Tc17

Os complexos Tc11-Tc17 apresentam uma depuração sanguínea relativamente rápida, não tendo sido encontrada uma fixação preferencial em nenhum órgão ou tecido, excepto no intestino e em menor grau no fígado e nos rins. A fixação nestes órgãos relaciona-se com o facto destes compostos serem eliminados essencialmente por via hepatobiliar, com uma pequena contribuição renal. A taxa de excreção encontrada para os complexos Tc11-Tc17 é moderada a elevada e vai aumentando com o tempo (37,3-58,2% DI ao fim de 4 h p.i.). A actividade detectada ao nível do estômago (entre 0,26-1,53% às 4 h p.i.) pode ser considerada baixa, o que indica que estes compostos não sofrem processos de reoxidação a  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ .

Relativamente à fixação tumoral, os complexos Tc11-Tc17 apresentam uma fixação baixa a moderada, variando entre 0,42-2,17% % DI/g à 1 h p.i. e entre 0,27-1,89 % (% DI/g) às 4 h p.i.. Os complexos com ligandos doadores (S,N,O), Tc15-Tc17, são aqueles que apresentam maiores valores de fixação tumoral (1,44-2,17%, % DI/g, à 1 h p.i.). Essa fixação é superior para os complexos Tc16 e Tc17, os quais apresentam um perfil de biodistribuição relativamente semelhante.

As razões tumor/músculo e tumor/sangue calculadas para os complexos Tc15-Tc17 são apresentadas na figura 3.35. Os complexos Tc15 e Tc16 são os que apresentam as razões tumor/músculo mais favoráveis. O complexo Tc17 por sua vez é o que apresenta o maior valor da razão tumor/sangue às 4 h.

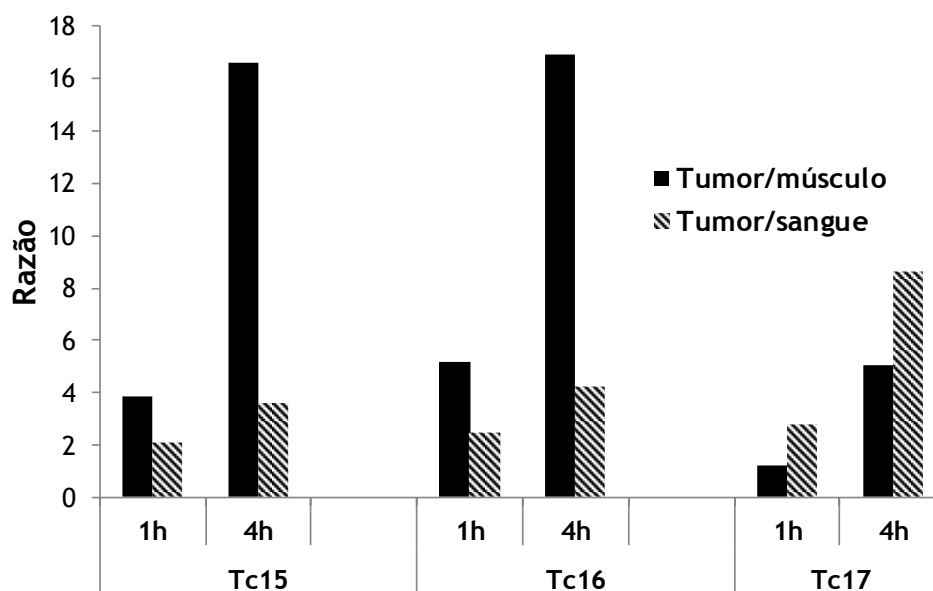
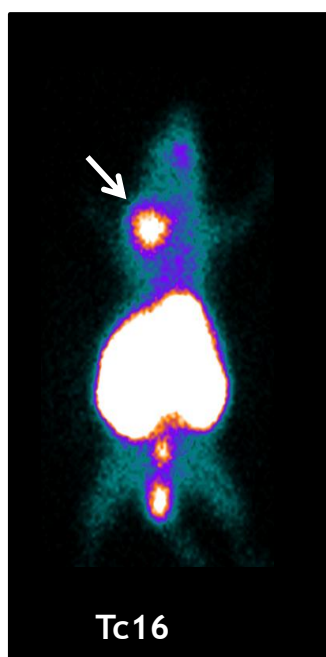


Figura 3.35. Razões tumor/sangue e tumor/músculo para os complexos Tc15-Tc17

Foram ainda realizados estudos de estabilidade *in vivo* através da análise por HPLC de amostras de sangue e urina, retirados de animais (1 h p.i.) aos quais foram administrados os complexos Tc11-Tc17. Para todos os complexos não foi observada a

presença de metabolitos no sangue ou na urina, correspondendo a actividade eluída quase exclusivamente aos complexos Tc11-Tc17.

Devido aos valores de captação tumoral mais elevados e às razões tumor/sangue e tumor/músculo relativamente favoráveis, escolheu-se o complexo Tc16 para obter imagens de ratinhos inoculados com melanoma murino. Após administração do complexo foram obtidas imagens estáticas na câmara gama, apresentando-se na figura 3.36 a imagem obtida à 1 h p.i..



**Figura 3.36.** Imagem de um ratinho C57BL/6 inoculado com células B16-F1 e com o complexo Tc16, 1 h p.i., em câmara gama (a seta indica o local do tumor)

Como se pode verificar pela imagem obtida, o complexo Tc16 permitiu detectar claramente o tumor, apresentando uma captação tumoral selectiva face aos tecidos são circundantes. No entanto, observa-se uma acumulação apreciável de radioactividade na zona abdominal, devido à retenção nos órgãos envolvidos na excreção do complexo, em particular no intestino.

### 3.4. Conclusões

---

A primeira parte do capítulo incidiu sobre a síntese de um novo ligando doador (S,N,O) [(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>COOH] (L<sup>10</sup>H) tendo-se estudado a sua capacidade de coordenação face à unidade *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M= Re, <sup>99m</sup>Tc), que permitiu sintetizar e caracterizar com sucesso os complexos **Re10** e **Tc10**. O estudo do composto **Re10** por RMN demonstrou a presença de um equilíbrio em solução, devido à presença de dois diastereoisómeros como consequência da inversão piramidal do enxofre. A caracterização por difracção de raios-X de **Re10** confirmou que o ligando coordena ao centro metálico de forma tridentada, através dos átomos de S, N e O, não se tendo observado a presença dos dois isómeros detectados em solução. Estudos de estabilidade *in vitro* de **Tc10** mostraram que o complexo tem uma elevada estabilidade em condições fisiológicas e face a processos de transquelatação com cisteína e histidina. O complexo **Tc10** apresentou um comportamento biológico relativamente favorável em ratinhos saudáveis, observando-se uma elevada estabilidade *in vivo*, uma depuração sanguínea rápida e uma excreção também relativamente rápida. Este comportamento favorável fez com que se avançasse com a funcionalização do respectivo ligando estabilizador com aminas terciárias contendo os grupos N-dietilo e N-pirrolidina, com o objectivo de obter complexos tricarbonilo de <sup>99m</sup>Tc(I) úteis para concepção de sondas radioactivas para detecção do melanoma melanótico e respectivas metástases.

Na segunda parte deste capítulo descreveu-se a síntese de uma família de complexos neutros de Re/<sup>99m</sup>Tc(I) estabilizados por ligandos contendo os sistemas de átomos doadores (N<sub>pz</sub>,N,O), (N<sub>py</sub>,N,O) e (S,N,O) e funcionalizados com os grupos N-pirrolidina e N-dietilo. A funcionalização com estes grupos foi efectuada através de amina central dos ligandos, utilizando um espaçador etilénico (L<sup>11</sup>H-L<sup>16</sup>H) ou propilénico (L<sup>17</sup>H). Os complexos de Re obtidos (**Re11-Re17**) foram caracterizados pelas técnicas usuais em química (IV, RMN, ESI-MS, análise elementar) que confirmaram a sua estrutura. Os complexos congéneres de <sup>99m</sup>Tc (**Tc11-Tc17**) foram sintetizados com elevado rendimento. Verificou-se que os complexos **Tc11-Tc17** apresentam tendencialmente um carácter mais lipofílico do que os complexos descritos no capítulo 2 (**Tc2-Tc10**). Tal indica que a estratégia delineada em termos de escolha dos ligandos bifuncionais funcionou, se exceptuarmos os ligandos do tipo piridina-aminocarboxílicos. Surpreendentemente, o complexo **Tc17** apresentou um carácter hidrofílico a pH 7,4, ao contrário de **Tc16** que é moderadamente lipofílico. A diferença estrutural entre estes complexos reside na presença de um grupo metilénico adicional no espaçador do complexo **Tc17** que deveria promover o aumento da lipofilia, ao contrário do que foi observado. Estes resultados são justificados

pelo maior valor de  $pK_a$  do complexo **Tc17** que leva à sua ionização a pH fisiológico, com consequente diminuição da lipofilia. Os complexos **Tc11-Tc17** apresentam uma afinidade moderada a elevada para a melanina que varia segundo a ordem **Tc11-Tc12 > Tc13-Tc14 > Tc15-Tc17**. Esta tendência parece indicar que a presença dos anéis aromáticos (pirazolo ou piridina) é um factor importante na ligação dos compostos à melanina, uma vez que os complexos estabilizados pelos ligandos do tipo (S,N,O) são aqueles que apresentam menor afinidade para a melanina.

Estudos de captação celular em células B16-F1 mostraram que os complexos **Tc11**, **Tc12** e **Tc16**, todos com carácter lipofílico, são aqueles que apresentam os maiores valores de captação que variaram entre 14,86% e 21,02% por milhão de células, após 4 h de incubação. Em células amelanóticas do melanoma humano A375 todos os complexos apresentaram valores desprezáveis de captação celular, com excepção do complexo **Tc11** que apresentou uma captação moderada. O composto **Tc16** apresentou uma captação celular considerável nas células B16-F1 apesar de ser o composto com menor afinidade *in vitro* para a melanina. Por esta razão, colocou-se a hipótese de que a captação e retenção celular observada para os compostos pudesse estar relacionada com um mecanismo diferente da ligação à melanina intracelular. Uma alternativa seria o envolvimento de receptores  $\sigma$ , uma vez que é conhecido que complexos similares apresentam afinidade para este tipo de receptores.<sup>96,108,109,198</sup> Assim, foram efectuados estudos de competição com o haloperidol, um fármaco com afinidade para os receptores  $\sigma$ , usando as células B16-F1 e A375. Os resultados obtidos nos ensaios competitivos sugerem que o envolvimento dos receptores  $\sigma$  é mais provável para o complexo **Tc11**. No entanto, não é de excluir mesmo para este composto a contribuição da ligação à melanina, como invocado por outros autores para benzamidas radioiodadas com afinidade para receptores  $\sigma$ .<sup>109</sup>

Estudos de biodistribuição em ratinhos C57BL/6 com melanoma induzido mostraram que os complexos **Tc15-Tc17**, estabilizados com os ligandos doadores (S,N,O), foram os que apresentaram os maiores valores de fixação tumoral, com relações tumor/sangue e tumor/músculo relativamente favoráveis. No entanto, devido à sua excreção hepatobiliar, estes complexos apresentaram uma indesejada acumulação de radioactividade no trato gastrointestinal. O complexo **Tc16** foi escolhido para obter imagens em câmara gama de ratinhos com tumor induzido, verificando-se uma acumulação significativa de radioactividade no tumor com um elevado contraste comparativamente aos tecidos circundantes. As razões que justificam a maior acumulação tumoral destes complexos não são claras. Atendendo a que **Tc15-Tc17** apresentam apenas uma afinidade moderada para a melanina, uma maior interacção com este pigmento não deve ser o factor que potencia a sua maior captação tumoral. Por si só, a lipofilia também não poderá justificar os

resultados encontrados, uma vez que Tc17 foi o complexo que apresentou o carácter mais hidrofílico a pH fisiológico. Provavelmente, a diferente topologia de Tc15-Tc17 resultante da ausência dos grupos coordenantes N-heterocíclicos presentes nas estruturas dos restantes complexos, poderá facilitar a sua passagem da corrente sanguínea para os tecidos tumorais. Uma vez no interior das células tumorais, a sua retenção poderá ser devida à interacção com a melanina pois apresentam alguma afinidade para este pigmento, apesar de não ser muito elevada.



# Capítulo 4

---

Complexos de Tc(I)/Re(I) contendo  
derivados do trifenilfosfônio



## 4. Complexos de Tc(I)/Re(I) contendo derivados do trifenilfosfónio

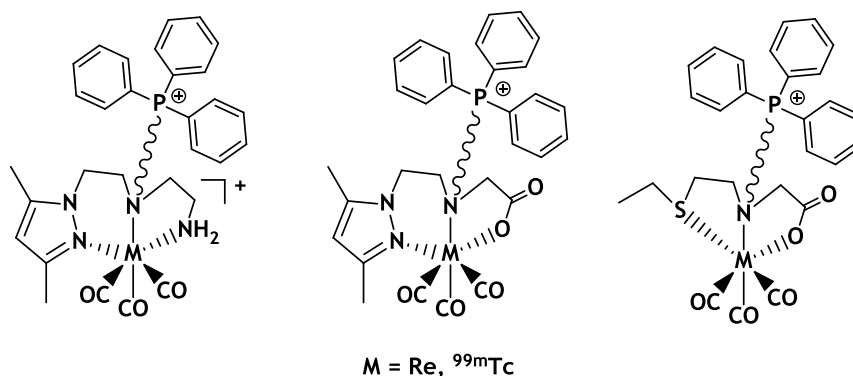
### 4.1. Introdução

Como referido no capítulo introdutório as alterações a nível bioquímico e molecular das mitocôndrias das células tumorais têm tornado estes organelos alvos importantes na detecção precoce do cancro.<sup>139,140,146,202</sup> Em particular, o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) é mais negativo nas células tumorais comparativamente às células epiteliais normais. Esta diferença motivou o estudo de diferentes derivados de sais de trifenilfosfónio como sondas radioactivas para detecção tumoral pelas técnicas de imagiologia nuclear (PET ou SPECT).<sup>136,156,159,161,163-169,171</sup> A natureza lipofílica destes compostos torna-os capazes de atravessar a membrana mitocondrial por difusão e a sua carga positiva permite a acumulação mitocondrial, devido ao valor negativo de  $\Delta\psi_m$ .<sup>156,203</sup>

Até à data, a maior parte da investigação desenvolvida nesta área envolveu derivados de sais de trifenilfosfónio marcados com emissores de positrão ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ), tendo em vista obter novos agentes com interesse para detecção tumoral por PET.<sup>159,161,163-169</sup> Os estudos com emissores  $\gamma$  relevantes para SPECT, nomeadamente com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , são em número muito mais limitado.<sup>171</sup> No entanto, a obtenção de derivados de trifenilfosfónio marcados com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  com capacidade para se acumularem selectivamente nas mitocôndrias de células tumorais poderá ter grande impacto ao nível da oncologia nuclear, tendo em conta a importância deste organelo no metabolismo tumoral e as características muito favoráveis do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  para imagiologia por SPECT.

Neste capítulo descreve-se a síntese, caracterização e a avaliação biológica *in vitro* de complexos contendo a unidade *fac*- $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$  ( $\text{M} = \text{Re}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) e funcionalizados com sais de trifenilfosfónio, com o objectivo de verificar o seu interesse para conceber novas sondas radioactivas para alveijamento de mitocôndrias de células tumorais. Decidimos explorar complexos de Re e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  com carga global +1, estabilizados por ligandos bifuncionais do tipo pirazolo-aminocarboxílico (doadores N,N,O) e derivados da cisteamina (doadores S,N,O) (Figura 4.1). Ao considerar estes ligandos, tivemos em conta que podem conduzir a complexos de Re(I)/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (I) com carácter lipofílico e com capacidade de se acumular em células tumorais, como visto no capítulo anterior. Os estudos descritos neste capítulo incluíram ainda complexos tricarbonilo de Re(I)/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (I) estabilizados com ligandos bifuncionais derivados do pirazolo-diamina (N,N,N) que, após funcionalização com

os sais de trifenilfosfônio e coordenação ao metal (Re,  $^{99m}\text{Tc}$ ), originam compostos com carga global +2 (Figura 4.1). Desta forma, pretendeu-se avaliar o efeito da carga (+ 1 vs +2) na captação mitocondrial de complexos relacionados estruturalmente. Teoricamente, segundo a equação de Nerst, a presença de uma carga +1 pode levar a uma acumulação cerca de 10x superior nas mitocôndrias das células tumorais face às das células normais. Se essa carga for +2 a acumulação mitocondrial poderá ser 100x superior nas células tumorais, o que pode proporcionar um aumento da selectividade tumoral.<sup>203</sup>



**Figura 4.1.** Estrutura geral dos complexos descritos no capítulo 4

Neste capítulo começa-se por descrever a síntese de uma nova família de ligandos tridentados doadores (N,N,N), (N,N,O) e (S,N,O) conjugados com o catião trifenilfosfônio através da amina central, utilizando espaçadores alifáticos ou aromáticos. Seguidamente, será descrita a síntese e caracterização dos respectivos complexos tricarbonilo de  $^{99m}\text{Tc(I)}/\text{Re(I)}$ , bem como os resultados da avaliação biológica *in vitro* dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ . Essa avaliação biológica envolveu estudos de captação em diferentes células tumorais e em mitocôndrias isoladas, bem como o estudo do efeito do potencial mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) na captação celular dos complexos.

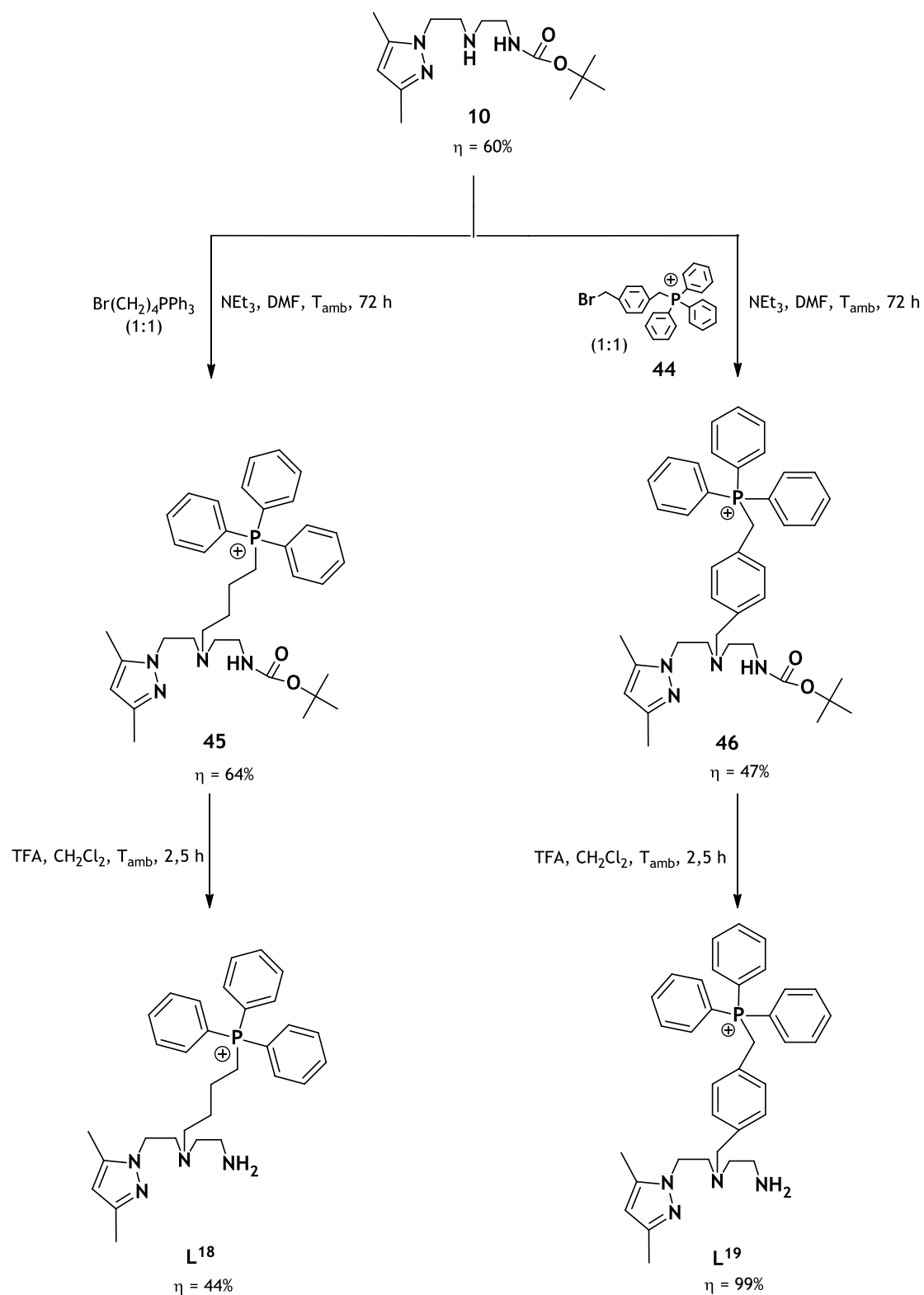
## 4.2. Síntese e caracterização de complexos de tricarbonilo de Re(I)/<sup>99m</sup>Tc com ligandos tridentados (N,N,N) (N,N,O) e (S,N,O) contendo derivados de trifenilfosfónio

---

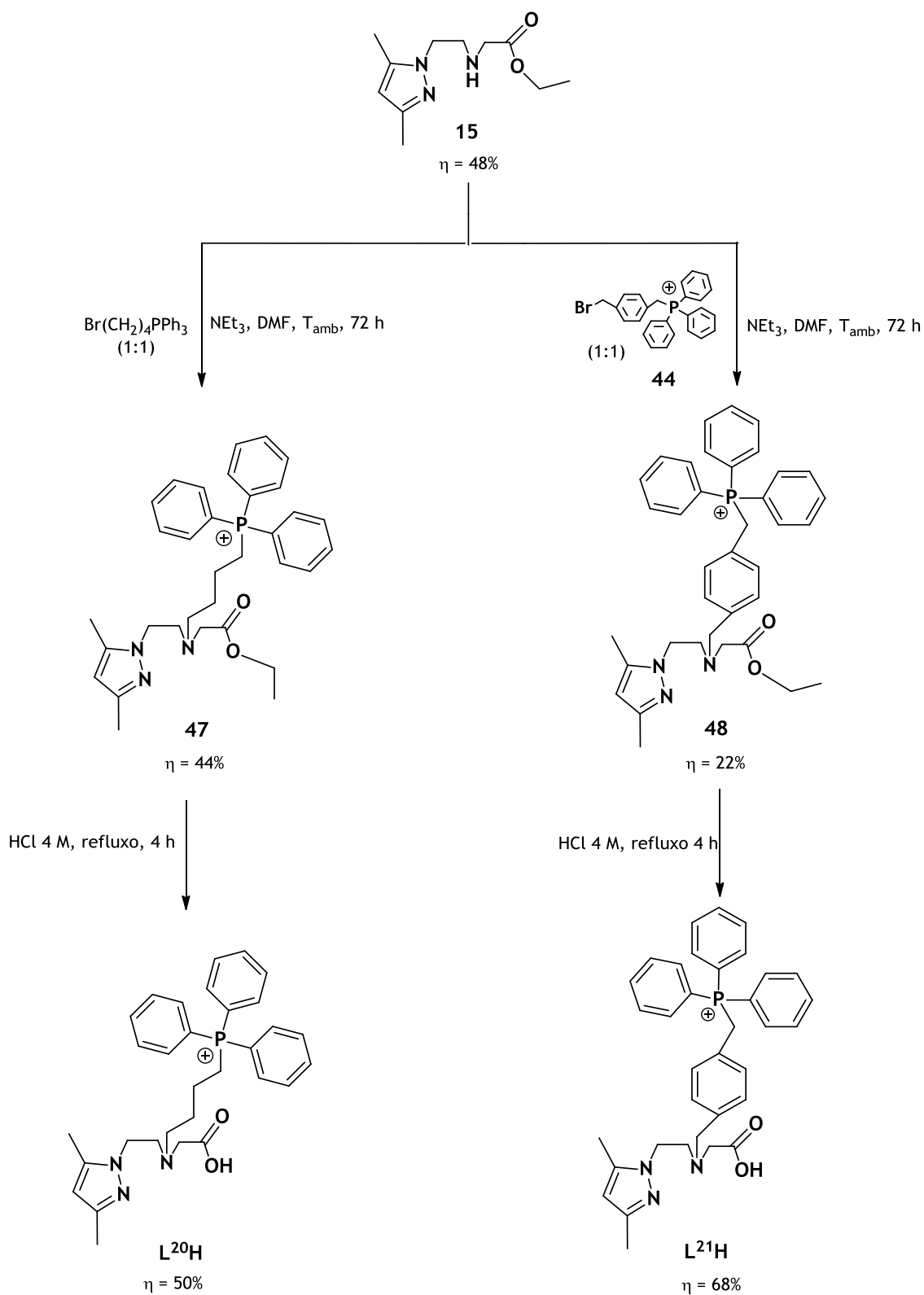
### 4.2.1. Síntese e caracterização dos ligandos funcionalizados e dos respectivos complexos de rénio

Os derivados de trifenilfosfónio foram ligados à estrutura das diferentes classes de ligandos através da amina central e utilizando espaçadores butilénicos e do tipo *p*-xileno. Ao utilizar diferentes espaçadores, esperava-se que os respectivos complexos de Re/<sup>99m</sup>Tc apresentassem uma lipofilia variável que poderia condicionar a sua capacidade de se acumularem nas mitocôndrias. A síntese dos ligandos resultantes (L<sup>18</sup>-L<sup>23</sup>H) foi efectuada utilizando uma metodologia semelhante que se baseou na N-alquilação de derivados bromados de trifenilfosfónio, como indicado nos esquemas 4.1-4.3

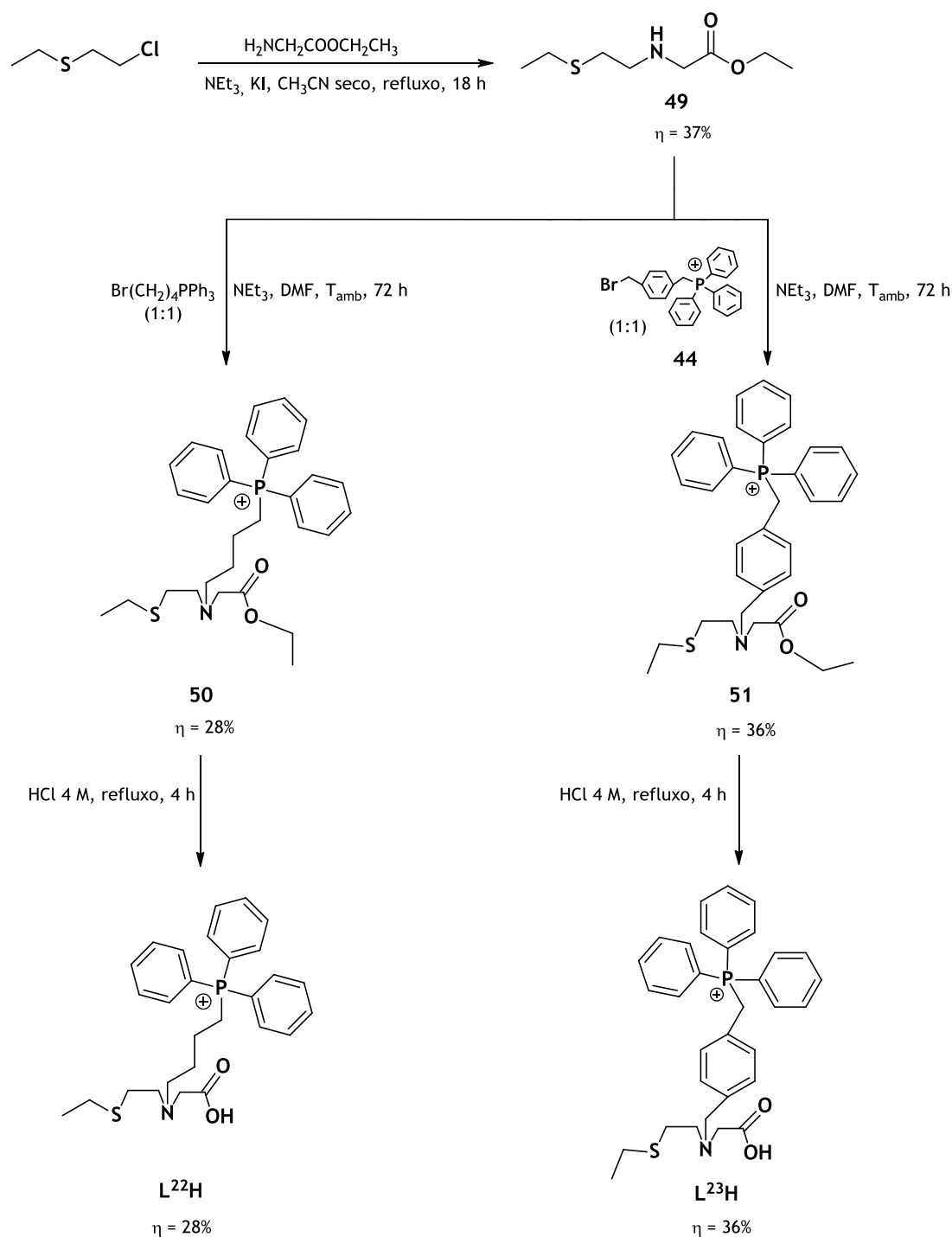
A síntese de L<sup>18</sup>-L<sup>23</sup>H foi iniciada com as reacções dos compostos **10**, **15** e **49**, contendo as funções amina ou ácido carboxílico terminais devidamente protegidas, com 4-bromobutiltrifenilfosfónio e (4-bromometil)benzil)trifenilfosfónio. Estas reacções originaram compostos do tipo pirazolo-diamina (**45** e **46**) (esquema 4.1), do tipo pirazolo-aminocarboxílico (**47** e **48**) (esquema 4.2) e derivados da cisteamina (**50** e **51**) (esquema 4.3) que apresentam, respectivamente, espaçadores butilénicos e do tipo *p*-xileno para ligar os farmacóforos. A remoção dos grupos protectores (BOC no caso de **45** e **46**; éster etílico no caso de **47**, **48**, **50** e **51**) permitiu obter os ligandos finais L<sup>18</sup>-L<sup>23</sup>H. A remoção dos grupos BOC foi efectuada com excesso de TFA (esquema 4.1), como descrito ao longo desta tese para outros compostos contendo o mesmo grupo protector, tendo conduzido a L<sup>18</sup> e L<sup>19</sup>. Para hidrolisar os grupos éster etílico, explorou-se inicialmente a hidrólise básica com NaOH, como atrás descrito para outros compostos contendo este grupo protector. A hidrólise alcalina levou à oxidação do grupo trifenilfosfónio formando-se derivados do óxido de trifenilfosfina, como confirmado por ESI-MS e por RMN de <sup>31</sup>P. O processo de oxidação foi evitado quando se procedeu à hidrólise ácida de **47**, **48**, **50** e **51** (esquemas 4.2 e 4.3) que conduziu aos ligandos finais L<sup>20</sup>H-L<sup>23</sup>H. Após desprotecção, L<sup>18</sup>-L<sup>23</sup>H foram recuperados pela simples evaporação do solvente (L<sup>19</sup>), através da purificação com cartuchos Sep-Pak C18 (L<sup>20</sup>H, L<sup>21</sup>H e L<sup>23</sup>H) ou por purificação por HPLC (L<sup>18</sup>, L<sup>22</sup>H).



**Esquema 4.1.** Síntese dos ligandos derivados do pirazolo-diamina (N,N,N) L<sup>18</sup> e L<sup>19</sup>



**Esquema 4.2.** Síntese dos ligandos derivados do pirazolo-aminocarboxílico (N,N,O) L<sup>20</sup>H e L<sup>21</sup>H

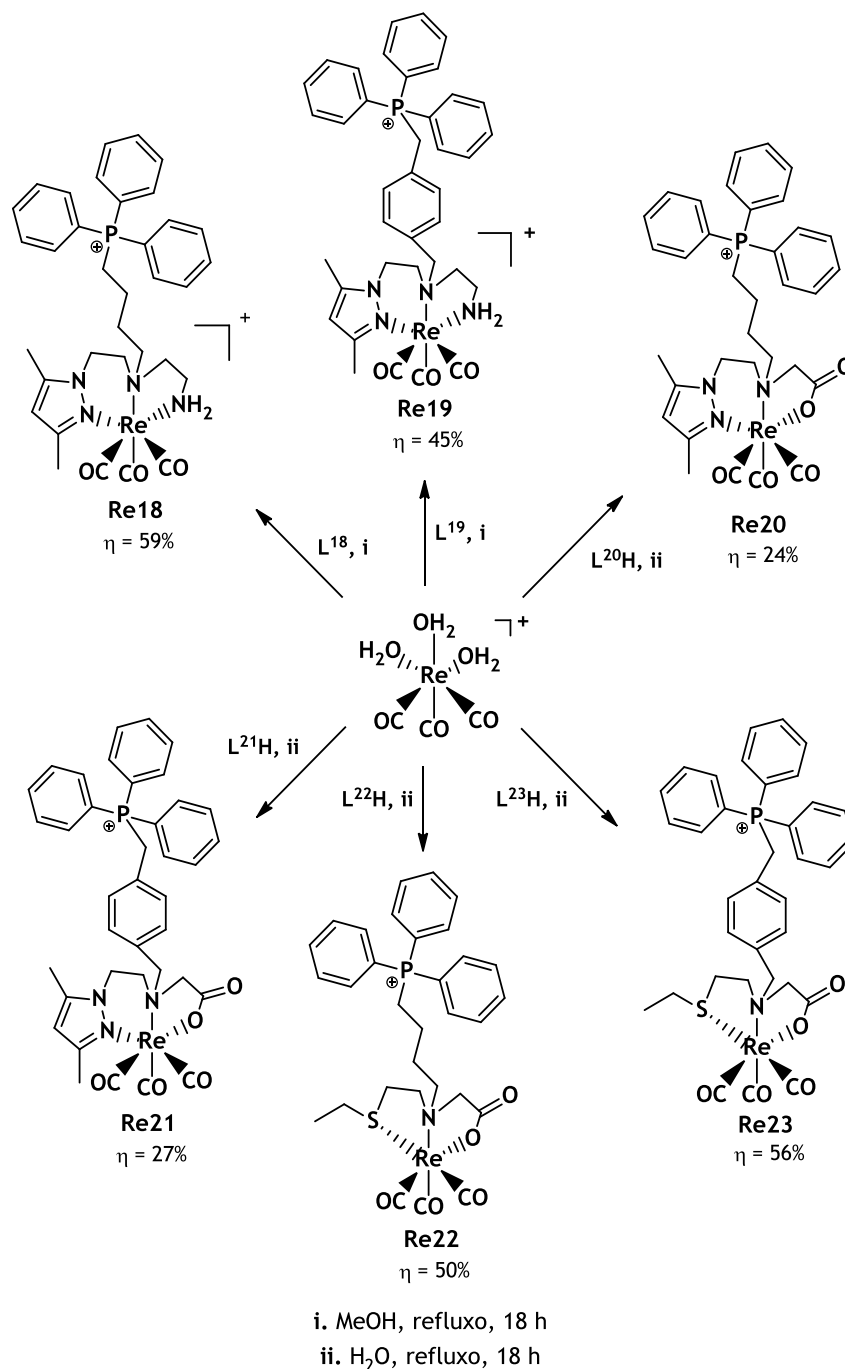


**Esquema 4.3.** Síntese dos ligandos derivados da cisteamina (S,N,O)  $\text{L}^{22}\text{H}$  e  $\text{L}^{23}\text{H}$

A caracterização de  $\text{L}^{18}$ - $\text{L}^{23}\text{H}$  envolveu RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  e estudos 2-D), IV, análise elementar e ESI-MS. Os dados espectroscópicos obtidos são consistentes com as formulações propostas, como se pode constatar pela análise dos dados apresentados no capítulo 6 (Parte Experimental), sendo similares aos atrás discutidos para os compostos

congêneres funcionalizados com derivados de benzamidas ou seus fragmentos, se exceptuarmos as diferenças devidas à presença de diferentes farmacóforos.

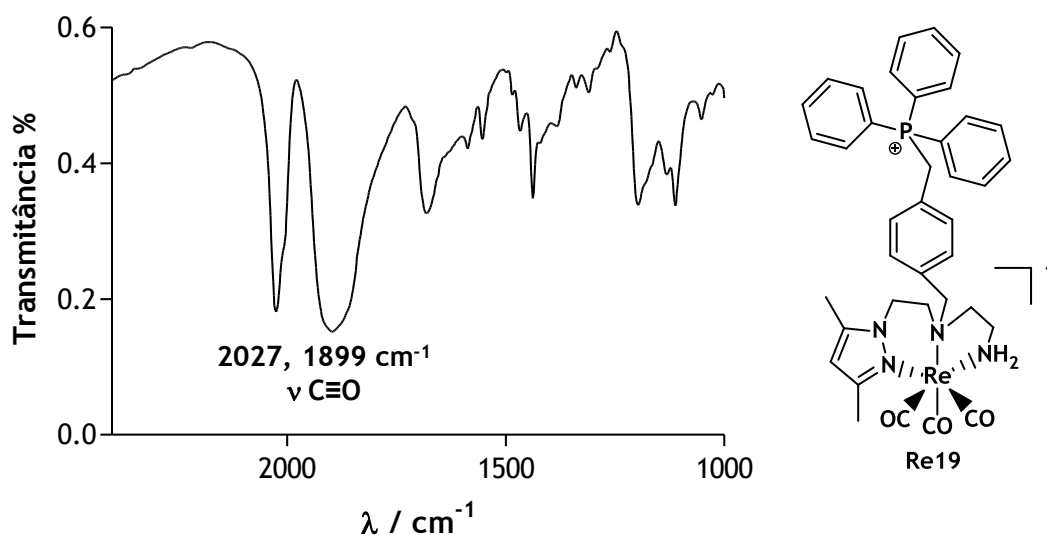
As reacções de  $fac\text{-}[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$  com os ligandos funcionalizados  $\text{L}^{18}\text{-L}^{23}\text{H}$  conduziram à formação dos complexos  $fac\text{-}[\text{Re}(\kappa^3\text{-L})(\text{CO})_3]$  ( $\text{L}=\text{L}^{18}\text{-L}^{23}$ ) (**Re18-Re23**) (esquema 4.4). A análise por HPLC das misturas reaccionais permitiu verificar que **Re18-Re23** eram as espécies maioritárias. Os complexos **Re18-Re23** foram purificados por lavagens com solventes orgânicos e água (**Re18**) ou por HPLC (**Re19-Re23**), tendo sido isolados com rendimentos baixos a moderados (24-59%).



**Esquema 4.4.** Síntese dos complexos de Re(I) (**Re18-Re23**)

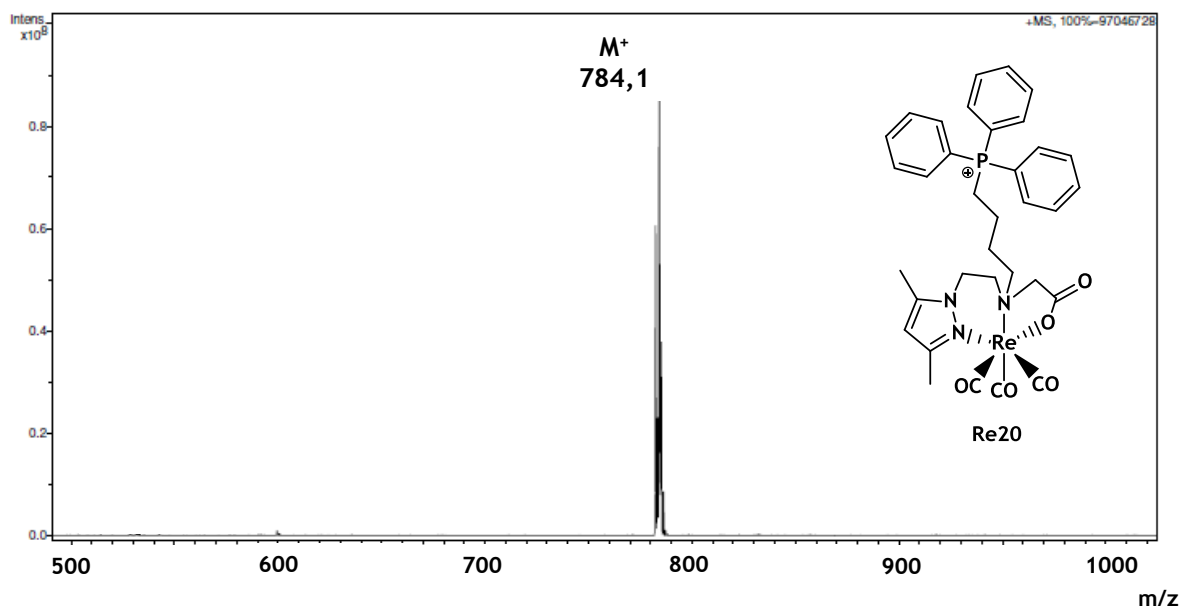
Os complexos **Re18-Re23** são estáveis à hidrólise e à oxidação e são solúveis na maioria dos solventes orgânicos, mas insolúveis em água. A sua caracterização química envolveu a espectroscopia de IV, RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  e estudos 2D (g-COSY e g-HSQC)) e ainda ESI/MS e análise elementar.

Tal como observado para os complexos de rénio descritos nos capítulos anteriores, a característica mais significativa dos espectros IV de **Re18-Re23** é a presença de bandas atribuídas às vibrações de extensão  $\nu(\text{C}\equiv\text{O})$  que aparecem entre  $1896\text{-}2027\text{ cm}^{-1}$ , confirmando a presença da unidade *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ . Para os complexos **Re20-Re23** os espectros de IV incluem ainda uma banda  $\nu(\text{C}=\text{O})$  entre  $1646\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ , desviada em relação aos ligandos livres ( $1583\text{-}1587\text{ cm}^{-1}$ ), o que é consistente com a coordenação do carboxilato ao metal.<sup>185</sup> A título de exemplo apresenta-se na figura 4.2 o espectro de IV para o complexo **Re19**.



**Figura 4.2.** Espectro de IV do complexo **Re19** em pastilhas de KBr

A análise por espectrometria de massa dos complexos **Re18-Re23** revelou a presença de picos com os valores de  $m/z$  correspondentes aos iões moleculares esperados, como exemplificado com o espectro do complexo **Re20** que se apresenta na figura 4.3.



**Figura 4.3.** Espectro de ESI-MS do complexo **Re20** (modo positivo)

Os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  dos complexos **Re18-Re23** apresentaram um único sinal com desvios químicos na gama 24,05-24,64 ppm, o que confirmou que durante a formação dos complexos não ocorreu oxidação dos grupos trifenilfosfônio. Estes valores estão de acordo com os valores encontrados na literatura para compostos semelhantes,<sup>167</sup> sendo comparáveis aos valores encontrados para os respectivos ligandos livres (23,76-25,15 ppm).

Ao contrário dos complexos **Re22-Re23**, estabilizados pelos ligandos derivados da cisteamina e doadores (S,N,O), os complexos **Re18-Re21** apresentaram espectros de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  semelhantes entre si. De um modo geral, nestes espectros as diferentes ressonâncias foram facilmente atribuídas. Como exemplo representativo, apresentam-se nas figuras 4.4 e 4.5, respectivamente, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do complexo **Re19**, incluindo a atribuição das diferentes ressonâncias que foi efectuada com base em experiências bidimensionais [ $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ] g-COSY e [ $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ] g-HSQC (Figuras 4.6 e 4.7, respectivamente).

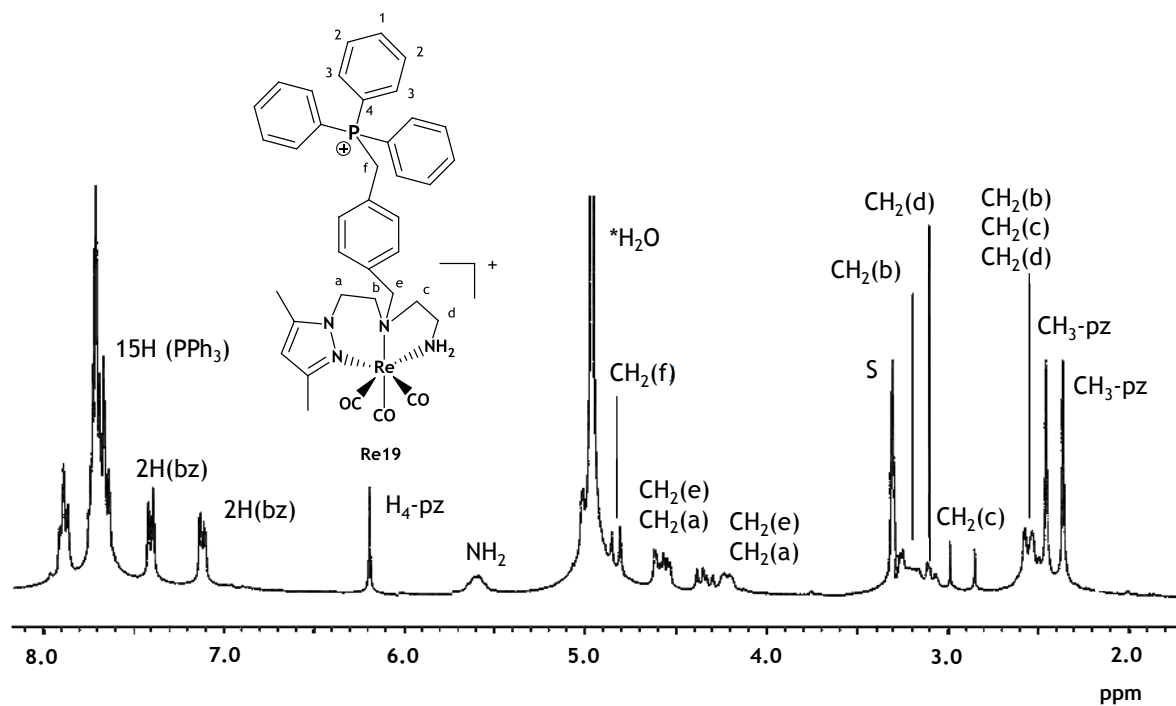


Figura 4.4. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo Re19 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente;  $^*\text{H}_2\text{O}$  - água residual)

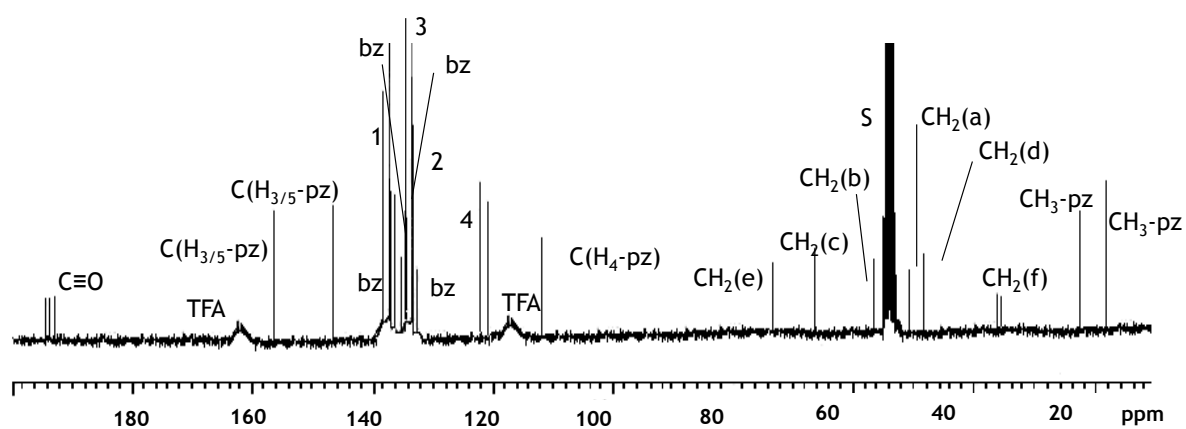


Figura 4.5. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo Re19 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente)

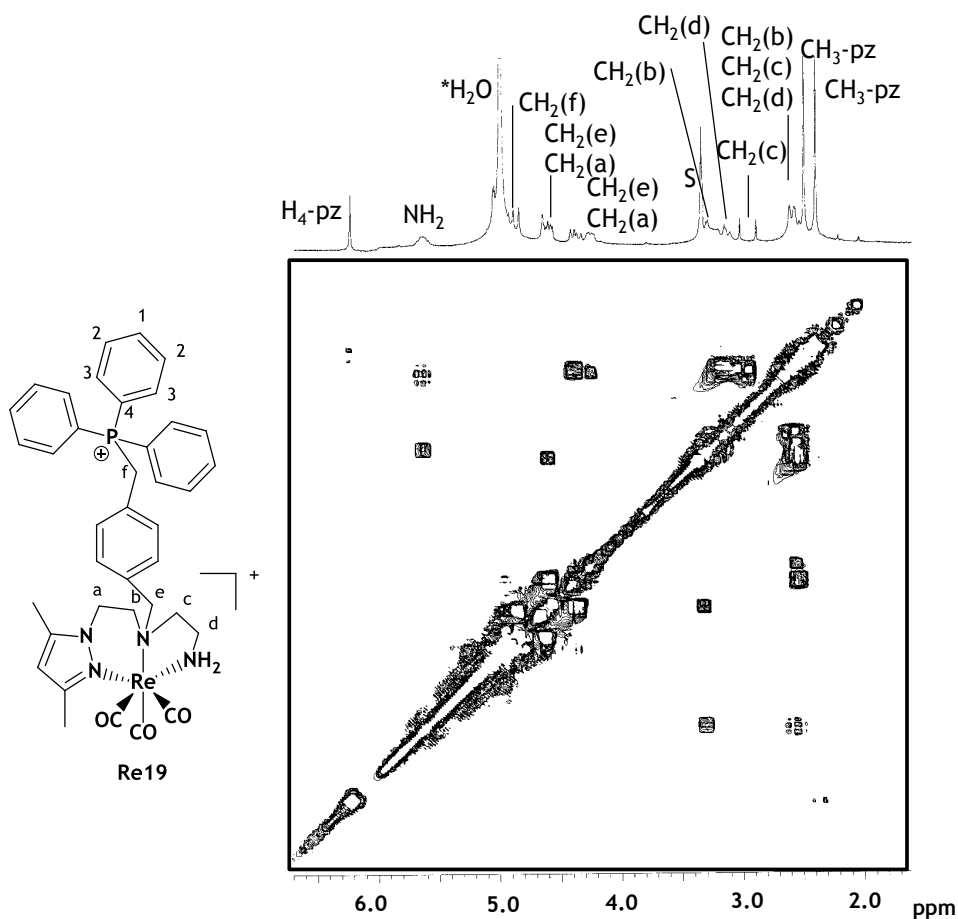


Figura 4.6. Espectro de RMN [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ] g-COSY do complexo Re19 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S-solvente,  $^*\text{H}_2\text{O}$  - água residual)

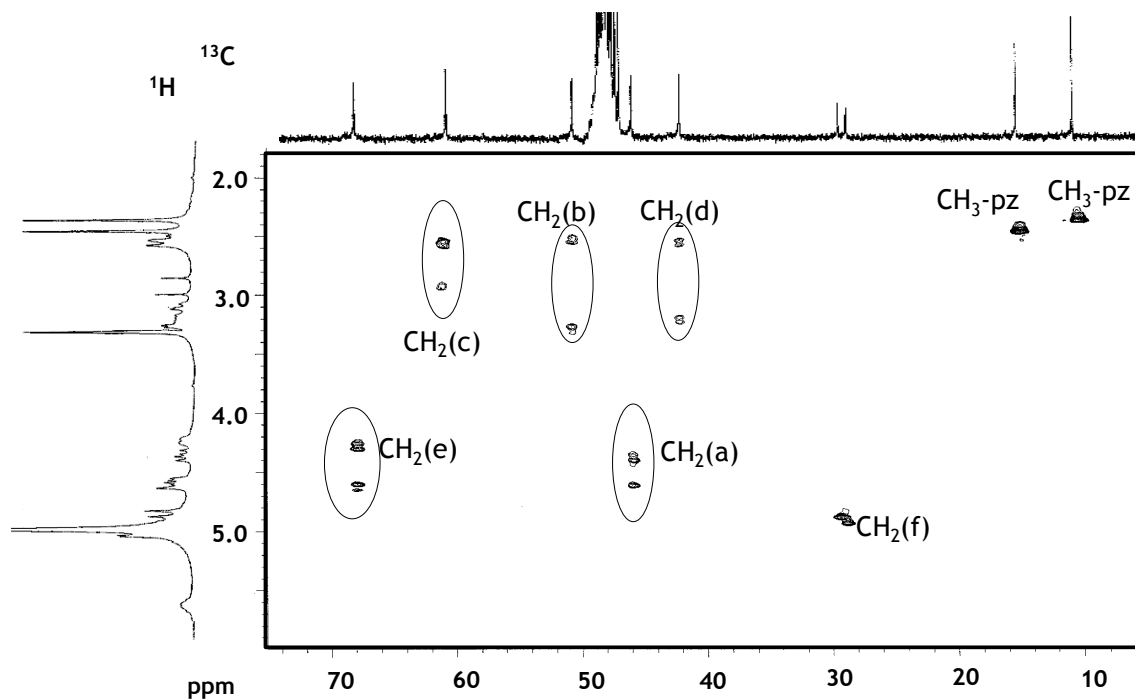


Figura 4.7. Espectro de RMN [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ] g-HSQC do complexo Re19 em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , na zona dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos **Re18-Re21** apresentam em comum a presença de uma série de multipletos devido aos prótons  $\text{CH}_2$  diastereotópicos das cadeias alifáticas  $3,5\text{-Me}_2\text{pz}(\text{CH}_2)_2\text{NR}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  (**Re18-Re19**) e  $3,5\text{-Me}_2\text{pz}(\text{CH}_2)_2\text{NRCH}_2\text{COO}$  (**Re20-Re21**) que ligam os diferentes átomos coordenantes. Em geral, os perfis e padrões de desdobramento destes espectros são muito semelhantes aos descritos nos capítulos anteriores para complexos congêneres, o que é consistente com a coordenação tridentada das unidades quelantes (N,N,N) e (N,N,O) ao centro metálico *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ . Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  destes complexos apresentam ainda sinais na zona aromática, entre 7,63 a 7,94 ppm, que confirmam a presença dos grupos trifenilfosfônio.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos para **Re18-Re21** apresentam as ressonâncias esperadas, tendo em conta as estruturas dos diferentes complexos. É de referir que os sinais dos átomos de carbono dos grupos fenilo ligados directamente ao fósforo surgem como dupletos, devido ao acoplamento *spin-spin* com o fósforo. Este efeito estende-se ainda aos grupos  $\text{CH}_2$  e benzilo (**Re19** e **Re21**) dos espaçadores, que se encontram mais próximos do fósforo.

Tal como os restantes complexos descritos nesta tese estabilizados por ligandos doadores (S,N,O) derivados da cisteamina, os complexos **Re22-Re23** também apresentam um comportamento dinâmico em solução. Tal pode ser constatado pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do complexo **Re23**, traçados para as temperaturas de 20 e 60 °C, que se apresentam a título de exemplo nas figuras 4.8 e 4.9, respectivamente. Como discutido atrás para os complexos congêneres, este comportamento resulta do equilíbrio entre dois diastereoisómeros devido à inversão piramidal do enxofre. Atendendo à complexidade dos espectros de  $^1\text{H}$ , a presença de ressonâncias atribuíveis a duas espécies em equilíbrio foi mais facilmente identificável nos espectros de  $^{13}\text{C}$ , como exemplificado para **Re23** na figura 4.9.

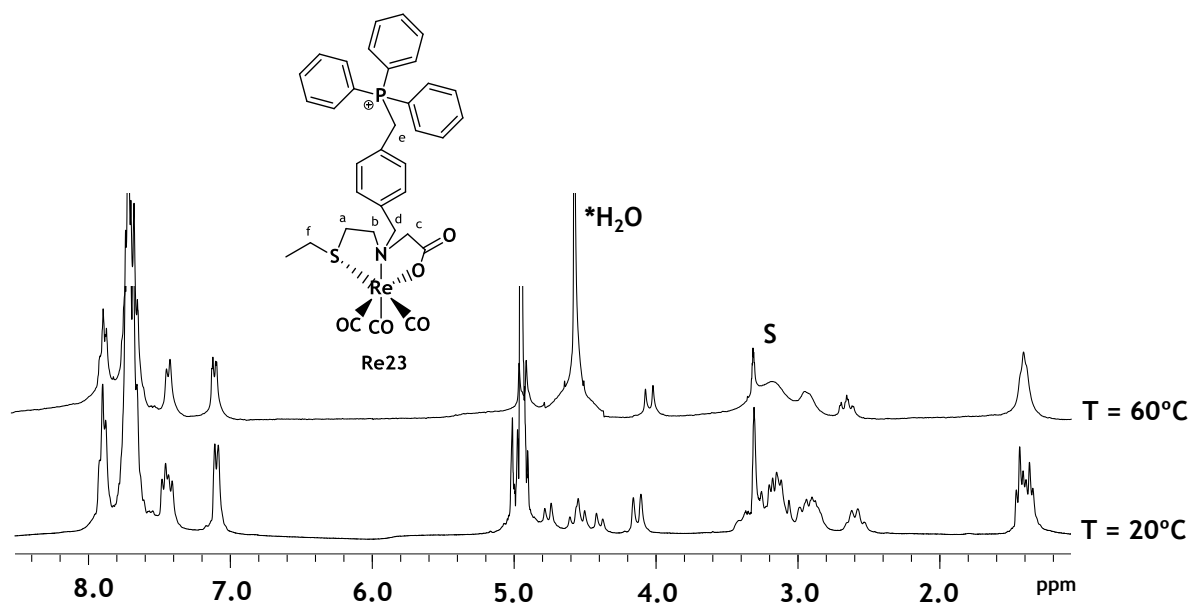


Figura 4.8. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo Re23 a 20 e a 60 °C em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente;  $^*\text{H}_2\text{O}$  - água residual)

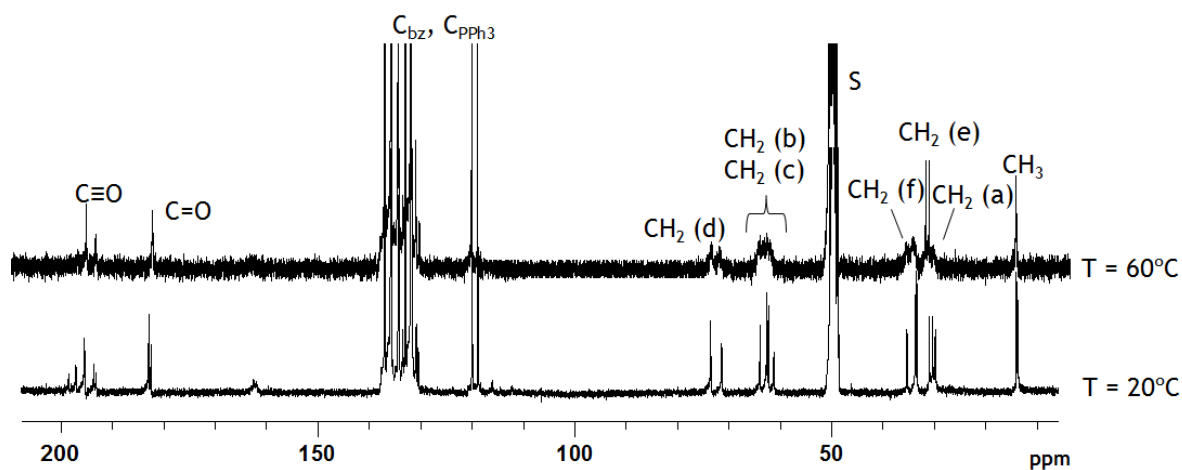


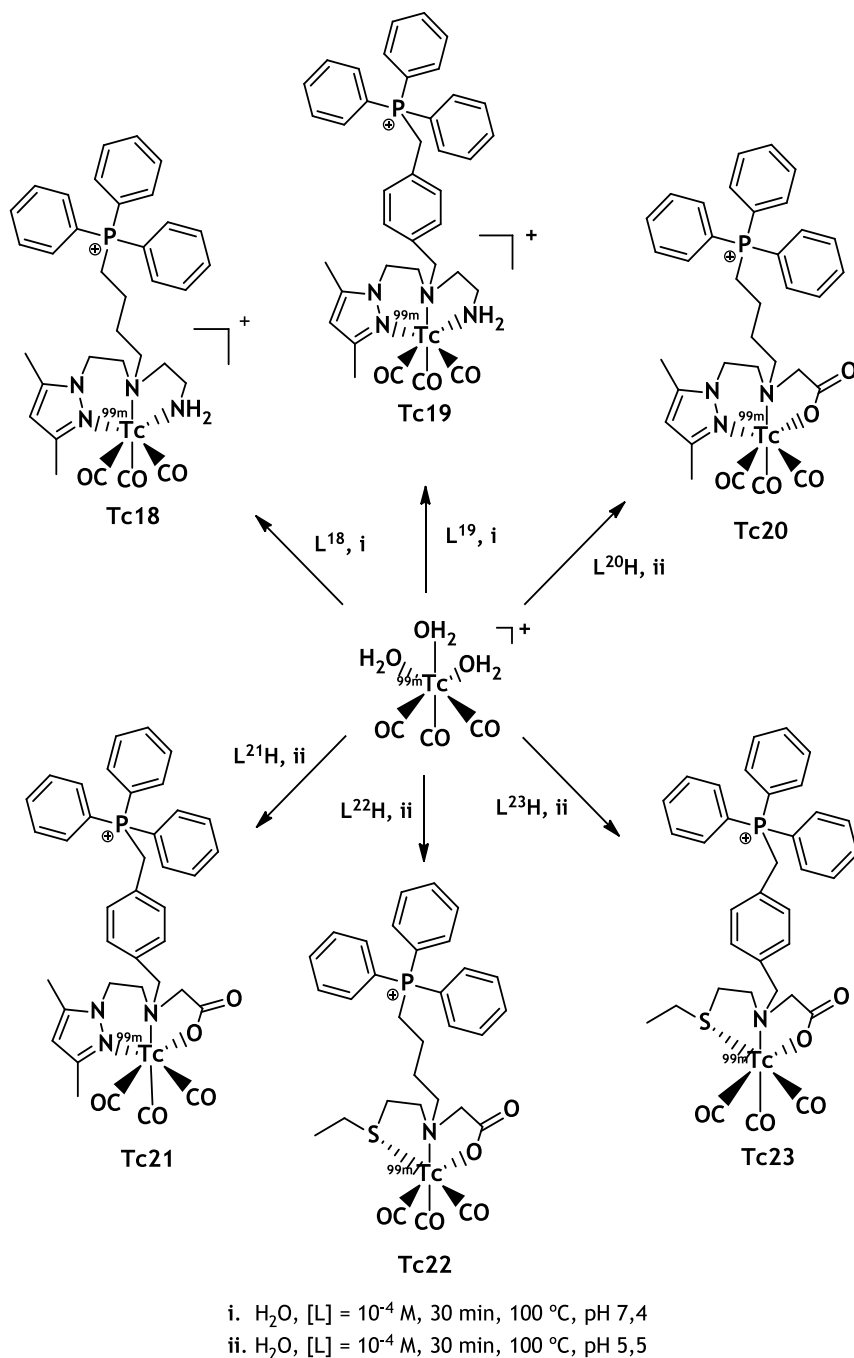
Figura 4.9. Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo Re23 a 20 e a 60 °C em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (S - solvente)

#### 4.2.2. Síntese, caracterização e avaliação biológica dos complexos $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\kappa^3\text{-L})(\text{CO})_3]$ ( $\text{L}=\text{L}^{18}\text{-L}^{23}$ )

##### 4.2.2.1. Síntese e caracterização

A reacção do precursor  $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  com os ligandos bifuncionais  $\text{L}^{18}\text{-L}^{23}\text{H}$  conduziu à obtenção dos complexos  $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\kappa^3\text{-L})(\text{CO})_3]$  ( $\text{L}=\text{L}^{18}\text{-L}^{23}$ ) (Tc18-Tc23), como indicado no esquema 4.5. A síntese de Tc18-Tc23 foi efectuada utilizando condições

reacionais idênticas às usadas para sintetizar os complexos congêneres atrás descritos, estabilizados por ligandos bifuncionais doadores (N,N,N), (N,N,O) ou (S,N,O).



**Esquema 4.5.** Síntese dos complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  funcionalizados com o catião trifenilfosfônio (Tc18-Tc23)

Os complexos Tc18-Tc23 foram obtidos com elevado rendimento ( $\geq 95\%$ ), com exceção de Tc19 que foi sintetizado com um rendimento moderado (70%). No caso de Tc19, procedeu-se à sua purificação por HPLC antes da realização dos estudos biológicos.

A caracterização de Tc18-Tc23 foi efectuada por HPLC, por comparação com os tempos de retenção dos complexos de Re análogos (figura 4.10 e tabela 4.1).

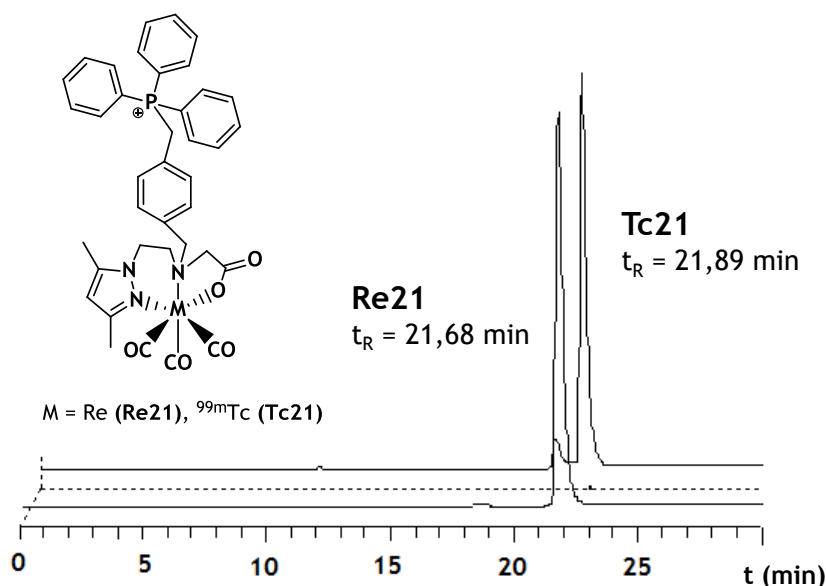


Figura 4.10. Cromatogramas de HPLC do complex Re21 (detecção UV) e Tc21 (detecção  $\gamma$ )

Tabela 4.1. Tempos de retenção ( $t_R$ ) e valores de  $\log D_{o/w}$  (pH 7,4) para os complexos Tc18-Tc23

Complexo	$t_R$ (min)	$\log D_{o/w}$ (pH 7,4)
Tc18	21,18 (21,08) <sup>a</sup>	-0,93 $\pm$ 0,07
Tc19	20,67 (20,49) <sup>a</sup>	-0,07 $\pm$ 0,05
Tc20	21,78 (21,60) <sup>a</sup>	0,59 $\pm$ 0,05
Tc21	21,89 (21,68) <sup>a</sup>	0,74 $\pm$ 0,01
Tc22	21,78 (21,48) <sup>a</sup>	0,55 $\pm$ 0,02
Tc23	21,63 (21,43) <sup>a</sup>	0,79 $\pm$ 0,03

<sup>a</sup> os valores indicados entre parêntesis referem-se aos complexos de Re

Como se pode verificar pelos valores de  $\log D_{o/w}$  (pH 7,4) apresentados na tabela 4.1, os complexos Tc18 e Tc19 têm um carácter hidrofílico enquanto Tc20-Tc23 são moderadamente lipofílicos. A substituição do espaçador butilénico (Tc18, Tc20 e Tc22) pelo derivado do *p*-xileno (Tc19, Tc21 e Tc23) levou a um aumento da lipofilia dos complexos.

A avaliação da estabilidade de Tc18-Tc23 em condições fisiológicas (PBS, pH 7,4; 37 °C) mostrou que estes complexos não sofrem qualquer tipo de degradação, pelo menos durante um período de 24 h.

## 4.2.2.2. Estudos de captação celular em células tumorais

Os estudos de captação celular foram inicialmente realizados nas seguintes linhas celulares: MCF-7 (carcinoma da mama humano), PC-3 (carcinoma da próstata humano) e B16-F1 (células epiteliais do melanoma de ratinho). Na figura 4.11 encontram-se representados os resultados obtidos para os complexos Tc18-Tc23 nas diferentes linhas celulares. Antes da realização dos estudos de captação celular, avaliou-se a estabilidade *in vitro* dos complexos no meio de cultura. Após 4 h de incubação a 37 °C, a análise por ITLC-SG do meio de cultura contendo os complexos Tc18-Tc23 mostrou que estes não sofreram qualquer decomposição.

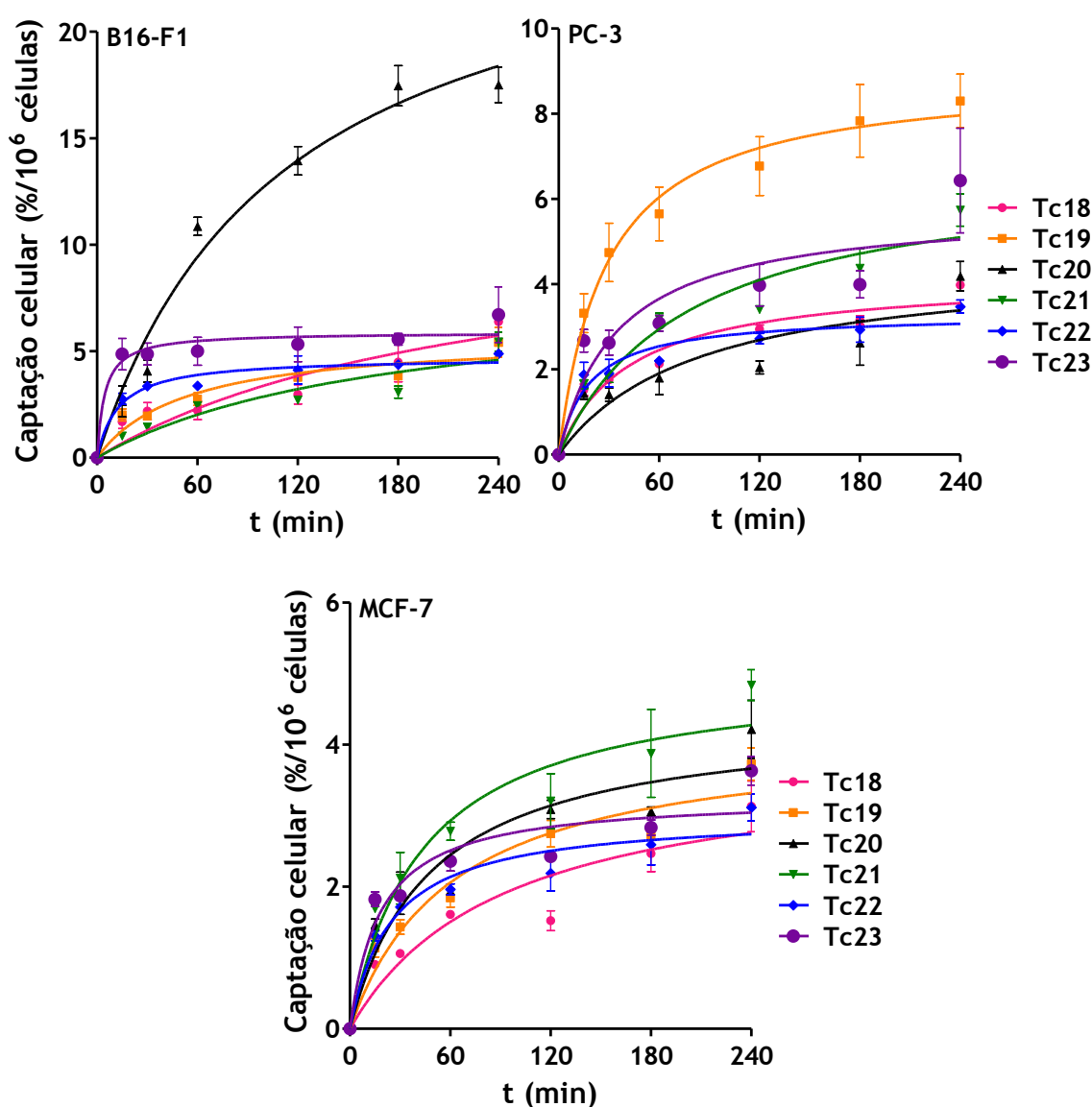
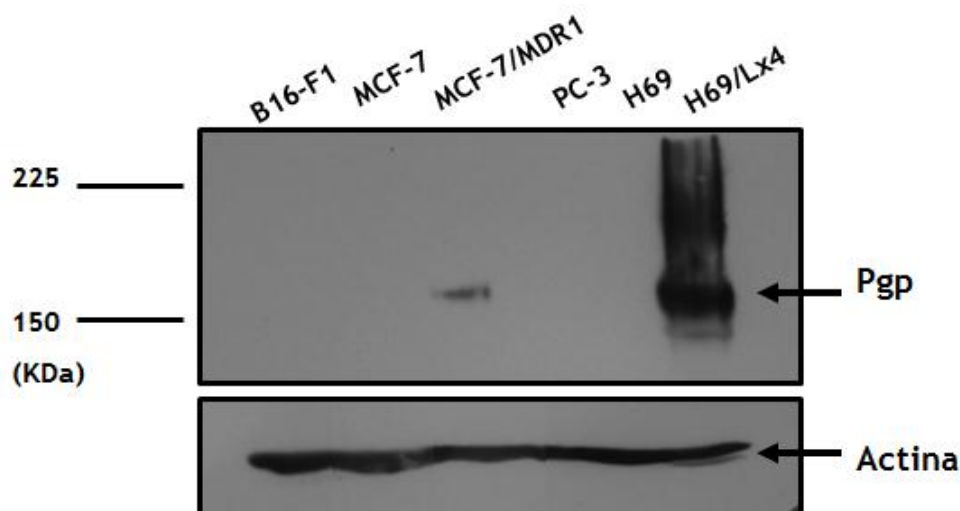


Figura 4.11. Captação celular por milhão de células dos complexos Tc18-Tc23 pelas células B16-F1, PC-3 e MCF-7 ao fim de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h

Os complexos **Tc18-Tc23** apresentaram uma captação baixa a moderada nas linhas celulares B16-F1, PC-3 e MCF-7 com valores entre 4,89-17,51%, 3,47-8,30% e 3,12-4,84% de captação celular por milhão de células, respectivamente. Os maiores valores de captação foram obtidos para o complexo **Tc20** nas células B16-F1 (17,51%  $\pm$  4,83, após 4 h de incubação) e para o complexo **Tc19** nas células PC-3 (8,30%  $\pm$  0,63, após 4 h de incubação). Tendencialmente, os complexos **Tc18-Tc23** apresentam uma captação celular inferior à do catião lipofílico  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi, se exceptuarmos **Tc19** e **Tc20** nas duas linhas celulares acima mencionadas. Nas linhas celulares B16-F1, PC-3 e MCF-7, o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi apresenta, respectivamente, valores de captação celular de 6,28, 9,00 e 6,39% por milhão de células às 3 h após incubação, de acordo com estudos realizados previamente no grupo GCR do ITN.<sup>153,204-206</sup>

Como referido no capítulo introdutório, o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi é um radiofármaco que se acumula nas mitocôndrias de determinadas células tumorais. Uma das desvantagens associadas à utilização do  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi para detecção tumoral está relacionada com o facto de este radiofármaco sofrer a acção da proteína Pgp que promove o seu efluxo das células tumorais, diminuindo a sua eficácia.<sup>207-210</sup> Tendo em conta as características físico-químicas dos complexos **Tc18-Tc23** considerámos relevante avaliar se a presença da Pgp interferiria na sua captação e acumulação celular. Assim, o estudo de captação celular foi alargado a outras linhas celulares nomeadamente às células H69 (tumor pulmonar de pequenas células de origem humana), e ainda a duas linhas celulares modificadas para expressarem a Pgp: *MCF-7/MDR1* obtidas a partir das células MCF-7 e ainda H69-LX4 obtidas a partir das H69.

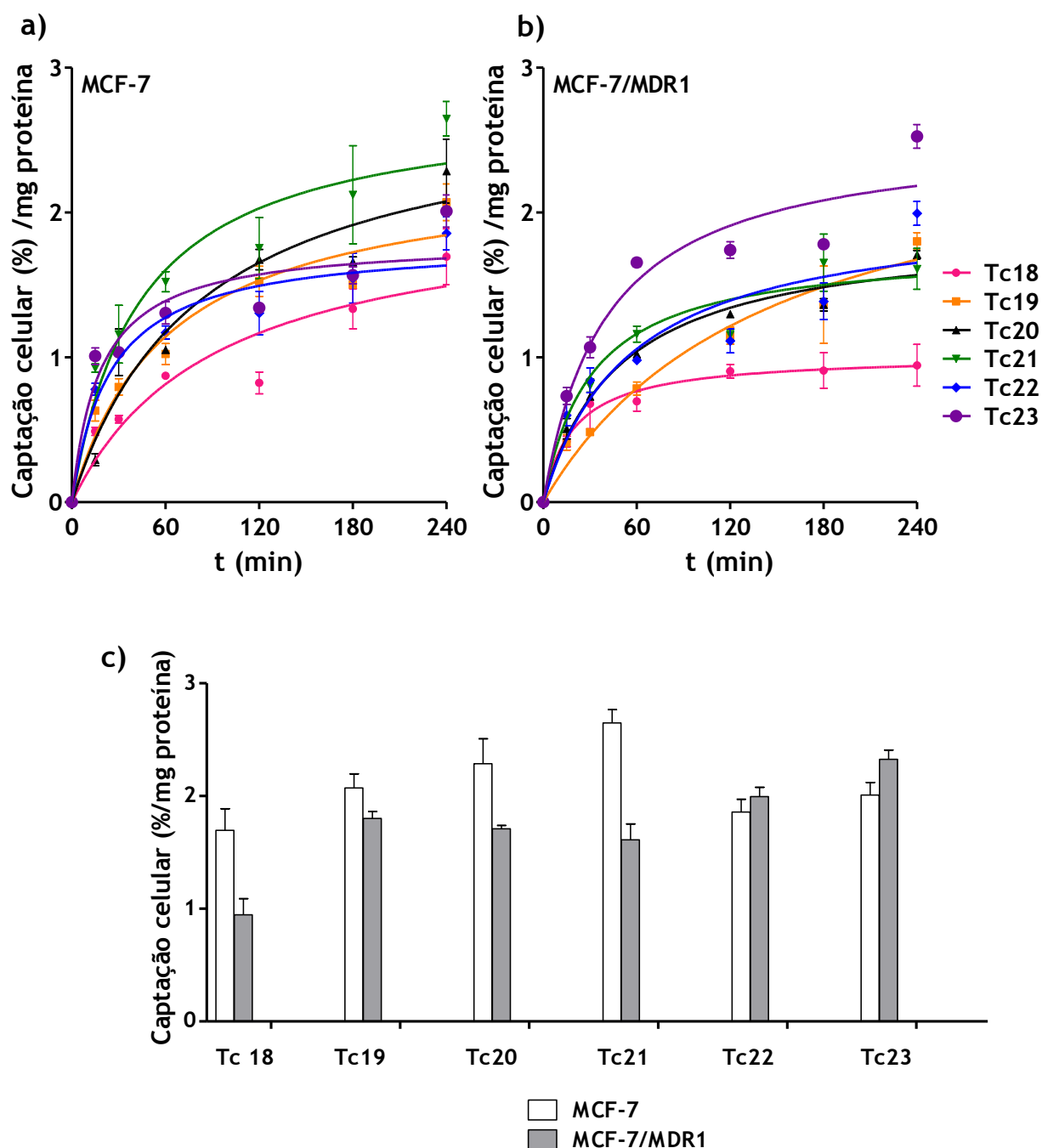
Através de técnica de *western blot* e utilizando anticorpos específicos para a Pgp (figura 4.12), verificou-se que nas linhas celulares B16-F1, PC-3, H69 e MCF-7 não havia expressão da Pgp, ao contrário das células *MCF-7/MDR1* e H69-Lx4 em que esta proteína se encontra expressa.<sup>204</sup> Nas amostras correspondentes a estas linhas celulares, observa-se a presença de uma banda entre 150 e 225 kDa, de acordo com o peso molecular da Pgp (170 kDa).



**Figura 4.12.** Western blot de extractos proteicos de várias linhas celulares com um anticorpo para a Pgp. A actina foi utilizada como controlo interno

A avaliação do efeito da Pgp na captação celular foi efectuada através de estudos em células MCF-7/MDR1 e H69-Lx4, mediante comparação com os valores de captação obtidos para as células parentais MCF-7 e H69. Este estudo foi efectuada para os complexos Tc18-Tc23 na linha celular MCF-7/MDR1 e apenas para os complexos Tc18, Tc20 e Tc21 na linha celular H69/Lx4, como será discutido a seguir.

No caso das células MCF-7/MDR1 e MCF-7 foi realizada a quantificação proteica dos lisados celulares de modo a poder comparar os resultados, uma vez que se verificou que estas linhas celulares apresentam ritmos de crescimento distintos. Os resultados obtidos, expressos por mg de proteína, encontram-se representados na figura 4.13. Para os complexos Tc18 ( $1,70\% \pm 0,19$  MCF-7;  $0,94\% \pm 0,14$  MCF-7/MDR1, 4 h após incubação), Tc20 ( $2,29\% \pm 0,22$  MCF-7;  $1,71\% \pm 0,03$  MCF-7/MDR1, 4 h após incubação) e Tc21 ( $2,65\% \pm 0,12$  MCF-7;  $1,61\% \pm 0,15$  MCF-7/MDR1, 4 h após incubação) verifica-se uma diminuição da captação celular nas células MCF-7/MDR1 quando comparado com os valores obtidos para as células MCF-7 (figura 4.13c). Para os restantes complexos não se verificaram diferenças significativas.



**Figura 4.13.** Captação celular por mg de proteína dos complexos Tc18-Tc23: a) nas células MCF-7 e b) nas células MCF-7/MDR1, em função do tempo de incubação; c) nas células MCF-7 e MCF-7/MDR1, após 4 h de incubação

De forma a confirmar se efectivamente os complexos Tc18, Tc20 e Tc21 sofriam o efeito de efluxo mediado pela Pgp foram efectuados estudos complementares com estes compostos em células H69 e H69/Lx4. Estas células, ao contrário das células MCF-7 e MCF-7/MDR1, encontram-se em suspensão e não em placa. Os resultados obtidos para as células H69 e H69/Lx4, encontram-se representados na figura 4.14.

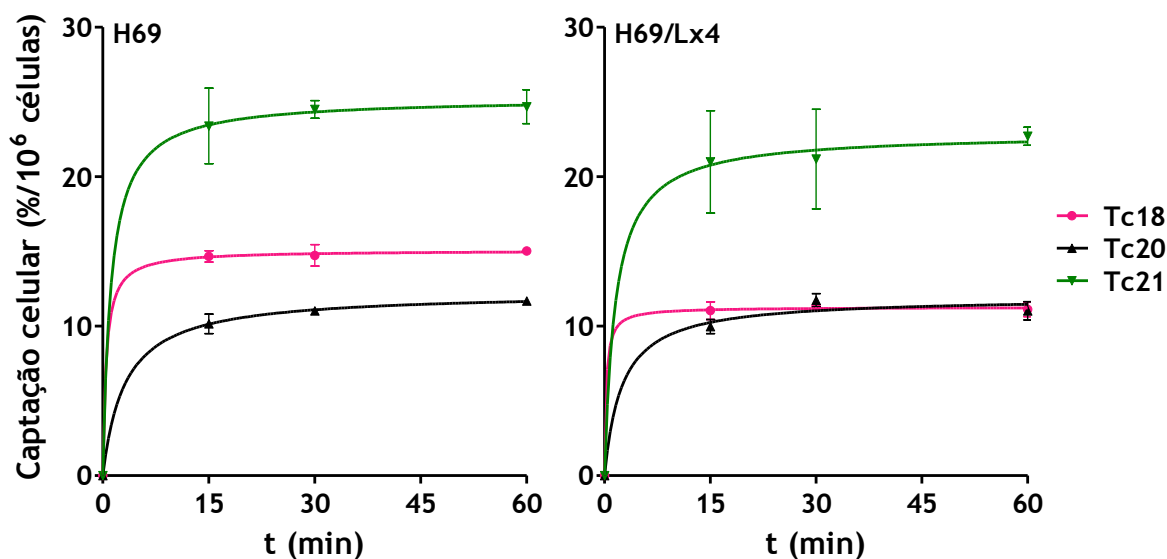
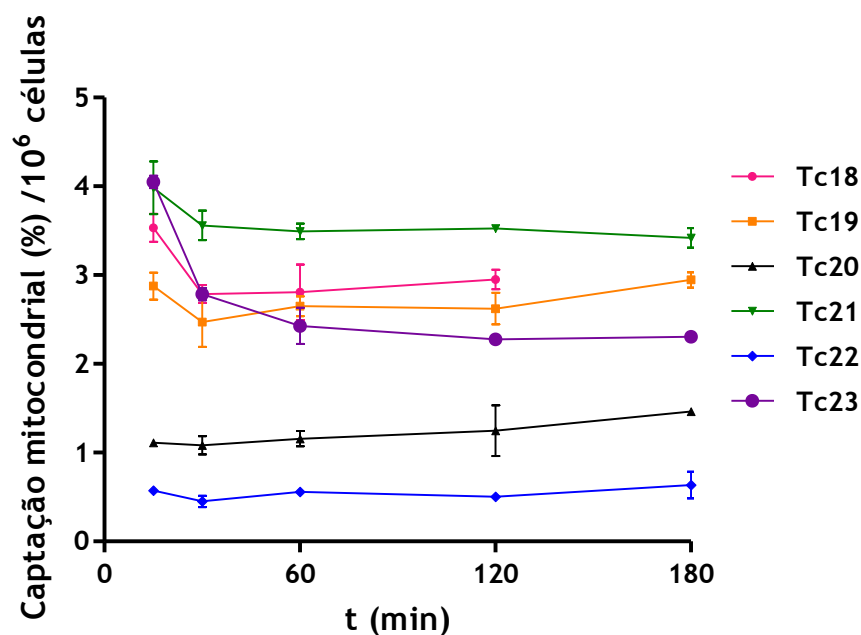


Figura 4.14. Captação celular por milhão de células dos complexos Tc18, Tc20 e Tc21 pelas células H69 e H69/Lx4 ao fim de 15 min, 30 min e 1 h a 37 °C

A diferença principal na captação celular do par H69 e H69/Lx4 foi observada para o complexo Tc18, com uma captação de  $14,68\% \pm 0,37$  e de  $11,04\% \pm 0,47$ , após 4 h de incubação, respectivamente. Os restantes complexos apresentaram valores semelhantes, com uma ligeira diminuição de captação celular nas células H69/Lx4 para o complexo Tc21. Estes resultados sugerem que, ao contrário dos restantes complexos, Tc18 parece sofrer um processo de efluxo do interior da célula mediado pela Pgp. No entanto, o efluxo de Tc18 é bastante menor do que observado para o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi. De facto, estudos de captação celular com o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi demonstraram um decréscimo acentuado nos valores de captação nas células que expressam a Pgp (MCF7/MDR1 e H69/Lx4) em relação às linhas celulares parentais (MCF-7 e H69), com valores de 6,39 e < 1% para o par MCF-7 e MCF-7/MDR1 e de 28,98 e 2,6% para o par H69 e H69/Lx4.<sup>153,204,205,211</sup>

#### 4.2.2.3. Estudos de captação em mitocôndrias isoladas

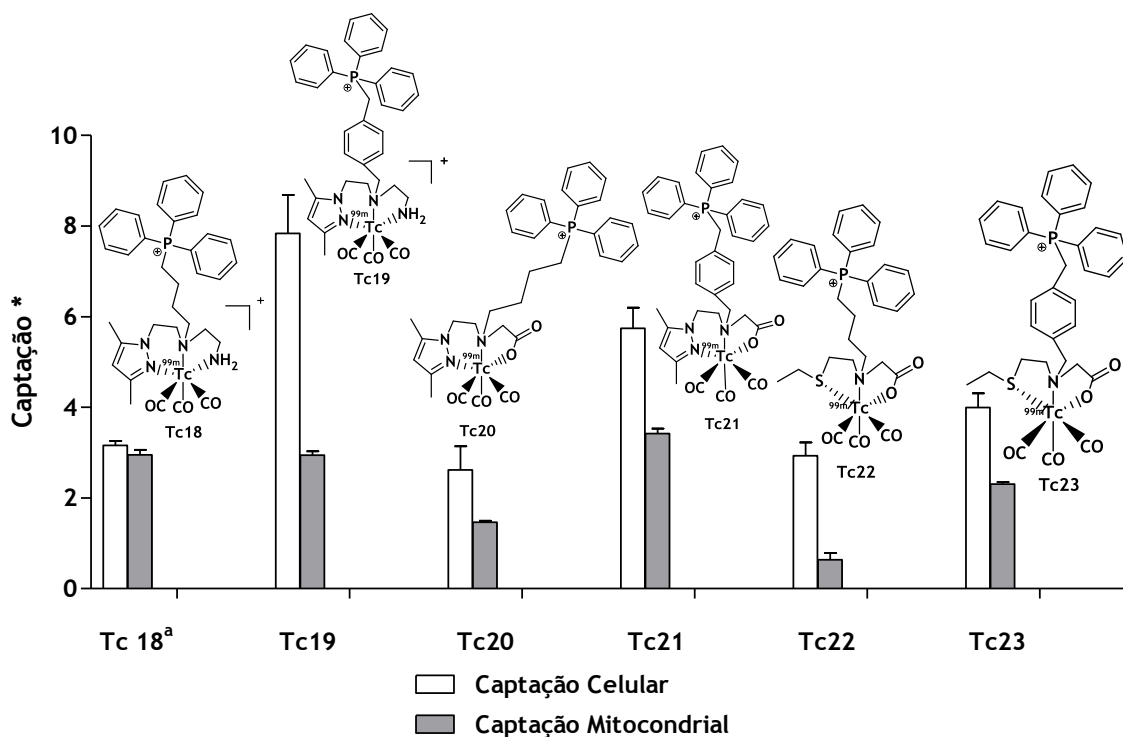
Com o fim de avaliar a ligação dos complexos Tc18-Tc23 às mitocôndrias, foram efectuados estudos de captação mitocondrial em mitocôndrias isoladas. As mitocôndrias foram isoladas a partir de células PC-3, utilizando um *kit* de isolamento de mitocôndrias da Thermo Scientific™. Após o isolamento, os complexos Tc18-Tc23 foram incubados com a suspensão mitocondrial e os resultados obtidos encontram-se representados na figura 4.15.



**Figura 4.15.** Captação mitocondrial por milhão de células dos complexos Tc18-Tc23 em mitocôndrias isoladas ao fim de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h e 3 h a 37 °C

A captação mitocondrial dos complexos Tc18-Tc23 apresenta valores que oscilam entre 0,63-3,42% ao fim de 3 h de incubação. Os valores mais baixos de captação mitocondrial foram encontrados para os complexos Tc20 e Tc22, que apresentam em comum a presença do espaçador butilénico e carga +1. Por sua vez, os complexos congéneres Tc21 e Tc23, contendo um derivado do *p*-xileno como espaçador e com carácter mais lipofílico, apresentam uma captação mitocondrial superior. Este efeito não é contudo verificado para os complexos dicatiónicos Tc18 e Tc19 que, apesar de apresentarem diferentes espaçadores e diferentes lipofilias, têm captções mitocondriais semelhantes. Para estes complexos, a carga +2 parece ser o factor decisivo na acumulação mitocondrial, ao contrário dos complexos Tc20-Tc23 que apresentam uma carga inferior, +1, e cuja acumulação mitocondrial parece ser mais influenciada pela lipofilia.

Comparando os valores obtidos para as mitocôndrias com os valores de captação celular nas células PC-3 (figura 4.16), conclui-se que de uma maneira geral os complexos Tc18-Tc23 apresentam uma captação mitocondrial inferior à captação celular. No entanto, com excepção dos complexos Tc19 e Tc22, os resultados obtidos indicam que acumulação mitocondrial é provavelmente a principal responsável pela captação celular verificada para os complexos Tc18-Tc23 (e.g. Tc21, 3,42 e 5,74% de captação mitocondrial e celular, respectivamente, às 3 h após incubação).



**Figura 4.16.** Comparação da captação celular e da captação mitocondrial dos complexos Tc18-Tc23 em células PC-3, após 3 h de incubação (\* expressa em percentagem da actividade total adicionada por milhão de células) (<sup>a</sup> para Tc18 o tempo de incubação foi de 2 h)

#### 4.2.2.4. Efeito do potencial da membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial na captação celular

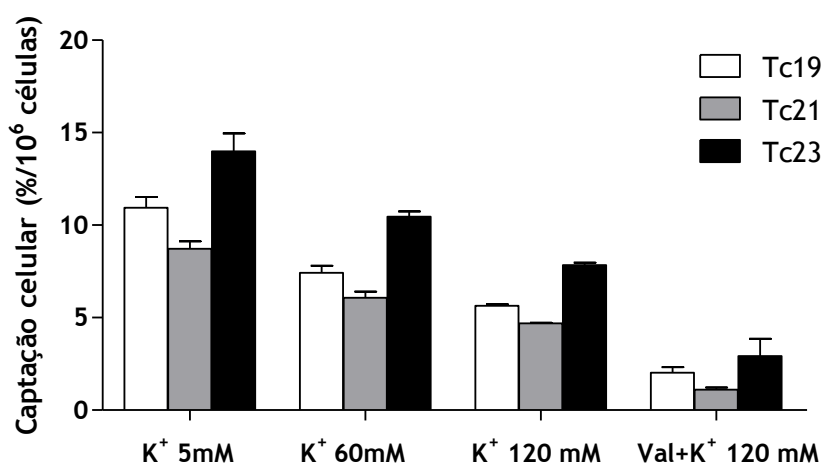
Como referido anteriormente, é esperado que os derivados do catião trifenilfosfónio se possam acumular selectivamente nas mitocôndrias de células tumorais, uma vez que apresentam valores de  $\Delta\psi_m$  mais negativos do que as mitocôndrias das células normais. Este efeito é ainda potenciado pela presença de um potencial da membrana plasmática ( $\Delta\psi_p$ ) que leva a uma acumulação das espécies catiónicas no citoplasma aumentando a disponibilidade destas para a captação mitocondrial. Nas células animais, o  $\Delta\psi_p$  é gerado fundamentalmente pelo movimento dos iões de  $K^+$  do interior para o exterior da célula através dos canais de  $K^+$ , tal como demonstrado para inúmeras linhas celulares, incluindo células tumorais do pulmão e da mama.<sup>212,213</sup>

Avaliou-se o efeito do  $\Delta\psi_p$  e do  $\Delta\psi_m$  na captação e acumulação celular dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23 nas células PC-3. Foram escolhidos estes complexos pois foram os que apresentaram os valores de captação celular e mitocondrial mais elevados entre os complexos estudados. O efeito do  $\Delta\psi_p$  e do  $\Delta\psi_m$  foi avaliado a partir de condições

experimentais distintas que provocam uma alteração ou mesmo colapso do  $\Delta\psi_m$  e do  $\Delta\psi_p$ . Para tal, foram utilizados iónoforos (moléculas solúveis em lípidos, que permitem transportar iões através da bicamada lipídica da membrana celular) ou soluções tampão com diferentes concentrações de  $K^+$ .

A diminuição gradual do  $\Delta\psi_p$  foi conseguida através da variação da concentração de  $K^+$  no meio extracelular. O aumento da concentração de  $K^+$  no meio extracelular de 5 mM para concentrações próximas de 120 mM, leva ao estabelecimento de um equilíbrio entre as concentrações de  $K^+$  no interior e no exterior da célula, e consequentemente à despolarização da membrana. Nestas condições os catiões lipofílicos não são pré-concentrados no citoplasma e a acumulação ou retenção celular relaciona-se unicamente com o  $\Delta\psi_m$ .<sup>214</sup>

Os estudos de captação celular, nestas condições, foram efectuados através da incubação das células com os complexos Tc19, Tc21 e Tc23 em soluções tampão com concentrações crescentes de  $K^+$  (5 mM, 60 mM e 120 mM) durante 4 h. Para a concentração 120 mM de  $K^+$ , o estudo foi também efectuado na presença de valinomicina (figura 4.17). A valinomicina é um iónoforo de  $K^+$ , que aumenta a permeabilidade da membrana ao  $K^+$ . Para concentrações elevadas de  $K^+$  no meio extracelular o  $\Delta\psi_p$  deve ser próximo de zero. Desta forma, a adição da valinomicina não altera o  $\Delta\psi_p$ , mas leva sim ao colapso do  $\Delta\psi_m$  devido ao desacoplamento da cadeia de electrões da fosforilação oxidativa.<sup>138,143,144,166,215-219</sup>



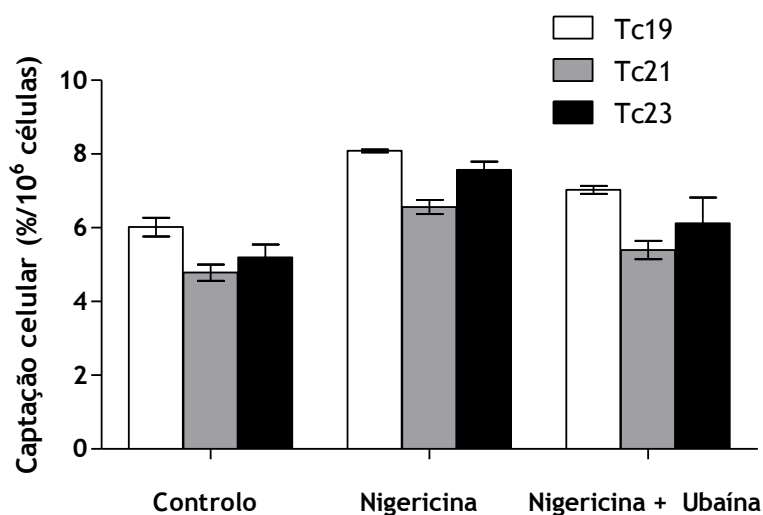
**Figura 4.17.** Captação celular por milhão de células dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23 em células PC-3, na presença de soluções tampão com diferentes concentrações de  $K^+$  e ainda na presença da valinomicina (Val), ao fim de 4 h

O aumento da concentração de  $K^+$  de 5 mM para 120 mM no meio extracelular levou a uma redução de cerca de metade na captação celular dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23 (10,94 e 5,64% (Tc19), 8,72 e 4,69% (Tc21) 13,99 e 7,85% (Tc23) para concentrações de  $K^+$

de 5 e 120 mM, respectivamente) demonstrando a importância do  $\Delta\psi_p$  na captação celular destes complexos. A redução entre 60-75% verificada para todos os complexos após a adição da valinomicina sugere que o  $\Delta\psi_m$  é também um factor importante na captação celular destes complexos.

De forma a investigar mais profundamente as contribuições do  $\Delta\psi_p$  e do  $\Delta\psi_m$  na captação celular dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23 foram efectuados estudos de captação celular em meio de cultura com os iónoforos nigericina e ubaína (figura 4.18) e ainda com o CCCP (Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona) (figura 4.19).

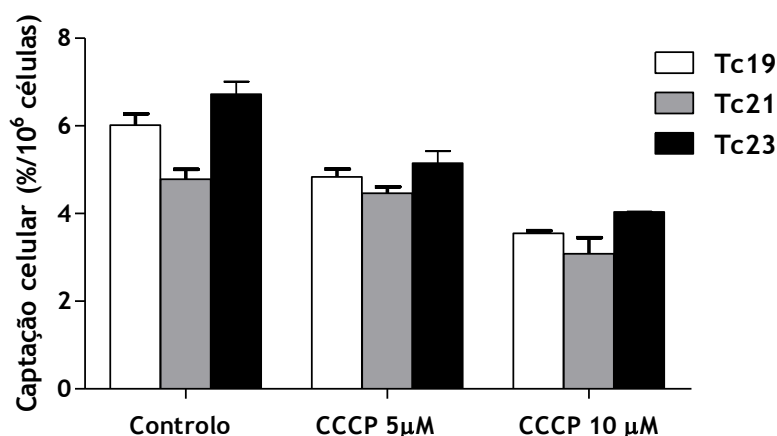
A nigericina é um iónoforo que medeia a substituição electricamente neutra do  $K^+$  por  $H^+$ , levando ao colapso do gradiente de pH ao longo da membrana mitocondrial interna e causando a hiperpolarização da mesma. Este ionóforo causa também como efeito secundário a hiperpolarização da membrana plasmática.<sup>220</sup> A fim de eliminar a hiperpolarização da membrana plasmática utilizou-se o iónoforo ubaína, que actua como inibidor do mecanismo de transporte activo associado à  $Na^+/K^+$  ATPase ou bomba  $Na^+/K^+$ , aumentando a concentração intracelular de  $Na^+$  e conseqüentemente modificando a permeabilidade da membrana plasmática a iões.<sup>144,221</sup> A adição da nigericina e da ubaína foi feita após a incubação das células PC-3 com os complexos Tc19, Tc21 e Tc23 durante 4 h. Findo este tempo os iónoforos foram adicionados e incubados durante 15 min (figura 4.18).



**Figura 4.18.** Captação celular por milhão de células dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23 pelas células PC-3 ao fim de 4 h, após incubação adicional (15 min) com nigericina ou com nigericina e ubaína

A adição da nigericina induziu um aumento na captação celular entre 30 a 40% para todos os complexos. Este resultado reflecte provavelmente os efeitos combinados da hiperpolarização mitocondrial e da hiperpolarização da membrana plasmática. Na presença de nigericina, a adição da ubaína, que elimina apenas a hiperpolarização da membrana plasmática, levou a uma diminuição da captação celular. Contudo, os valores obtidos ainda foram superiores aos encontrados quando a captação celular foi estudada sem a presença de iónoforos (7,03 vs 6,02 % (Tc19), 5,39 vs 4,78% (Tc21), 6,12 vs 5,19 % (Tc23)). Este comportamento reflecte certamente a contribuição do potencial da membrana mitocondrial interna para a captação celular dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23. Estudos de captação celular efectuados apenas na presença da ubaína demonstraram que este iónoforo não afecta a captação celular dos complexos, o que indica a ausência de mecanismo de transporte activo na captação destes complexos.

O CCCP é um inibidor da fosforilação oxidativa, desacoplando o gradiente de prótons ao longo da membrana mitocondrial interna, tendo como consequência o colapso do  $\Delta\psi_m$ .<sup>222</sup> A adição do CCCP foi feita após a incubação das células PC-3 com os complexos Tc19, Tc21 e Tc23 durante 4 h. O CCCP foi adicionado em duas concentrações diferentes, 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , e a captação celular foi determinada 15 min após adição deste inibidor. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 4.19.



**Figura 4.19.** Captação celular por milhão de células dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23 pelas células PC-3 ao fim de 4 h, após incubação adicional (15 min) com diferentes concentrações de CCCP

A adição de CCCP numa concentração de 10  $\mu\text{M}$  levou a uma diminuição da captação celular na ordem dos 40% (6,02 e 3,55% (Tc19), 4,78 e 3,08% (Tc21), 6,72 e 4,03% (Tc23) na situação controlo e na presença de 10  $\mu\text{M}$  de CCCP, respectivamente) para todos os complexos, o que é consistente com a contribuição do  $\Delta\psi_m$  na captação celular dos complexos Tc19, Tc21 e Tc23.

Em resumo, os estudos efectuados na presença dos diferentes ionofóros mostraram que a captação celular dos complexos **Tc19**, **Tc21** e **Tc23** é influenciada por alterações dos valores de  $\Delta\psi_p$  e  $\Delta\psi_m$ , verificando-se um forte contributo do  $\Delta\psi_m$  na captação e retenção celulares destes complexos.

### 4.3. Conclusões

Neste capítulo foram descritos seis novos complexos de  $\text{Re}/^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$  estabilizados por ligandos funcionalizados com o catião trifenilfosfónio e contendo os sistemas de átomos doadores (N,N,N) (**L<sup>18</sup>-L<sup>19</sup>**), (N,N,O) (**L<sup>20</sup>-L<sup>21</sup>**) e (S,N,O) (**L<sup>22</sup>-L<sup>23</sup>**). A introdução do catião trifenilfosfónio foi feita através da amina central utilizando um espaçador butilénico (**L<sup>18</sup>**, **L<sup>20</sup>H** e **L<sup>22</sup>H**) ou um espaçador derivado do *p*-xileno (**L<sup>19</sup>**, **L<sup>21</sup>H** e **L<sup>23</sup>H**). Os complexos de Re(I) (**Re18-Re23**) foram caracterizados pelas técnicas usuais em química (IV, RMN, ESI/MS, análise elementar) que permitiram confirmar a sua estrutura. Os complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (**Tc18-Tc23**) foram sintetizados com elevado rendimento e caracterizados por comparação do perfil cromatográfico de HPLC com os complexos de rénio congéneres.

Estudos *in vitro* mostraram que alguns dos complexos apresentam uma captação moderada nas linhas celulares tumorais B16-F1, PC-3 e MCF-7. A comparação da captação celular dos complexos em células MCF7 e células MCF-7/*MDR1*, bem como no par de células H69 e H69/Lx4, indicaram que **Tc18** é aquele que apresenta uma maior tendência para sofrer a acção de efluxo mediada pela Pgp. Contudo, esse efluxo é muito menos pronunciado do que o apresentado pelo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi nas mesmas linhas celulares.

Estudos em mitocôndrias isoladas permitiram concluir que a captação mitocondrial dos complexos com carga +1 (**Tc20-Tc23**) é fortemente condicionada pela lipofilia dos complexos, sendo essa captação superior para os complexos **Tc21** e **Tc23** que contêm um espaçador derivado do *p*-xileno e apresentam um carácter mais lipofílico. Pelo contrário, no caso dos complexos dicatiónicos, **Tc18** e **Tc19**, a captação mitocondrial é pouco afectada pela diferença de lipofilia, sugerindo que a carga +2 é o factor mais condicionante da sua captação mitocondrial.

Para os complexos que apresentaram os maiores valores de captação celular e mitocondrial (**Tc19**, **Tc21** e **Tc23**) foram realizados estudos de captação celular com alteração do  $\Delta\psi_p$  e do  $\Delta\psi_m$  através da utilização de diferentes ionoforos (nigericina, ubaína e valinomicina), de soluções tampão com diferentes concentrações de  $\text{K}^+$  e ainda do CCCP, um inibidor da fosforilação oxidativa. A captação celular destes complexos foi afectada pelas alterações do  $\Delta\psi_p$  e do  $\Delta\psi_m$  em células PC-3. Este comportamento, associado ao valor moderado da sua captação mitocondrial e celular, sugere que estes compostos são

relevantes para a concepção de sondas radioactivas para alveamento da mitocôndria e consequentemente, para detecção tumoral.



# Capítulo 5

---

Conclusões e Perspectivas



## 5. Conclusões e Perspectivas

---

Como referido no capítulo introdutório, o principal objectivo deste trabalho era a obtenção de dados químicos, radioquímicos e biológicos para complexos organometálicos de Re(I) e  $^{99m}\text{Tc(I)}$  funcionalizados com derivados de benzamidas ou com sais de trifenilfosfónio, para avaliar o seu interesse na concepção de sondas radioactivas para visualização de tecidos neoplásicos, nomeadamente do melanoma melanótico. Esperava-se que os complexos funcionalizados com os derivados de benzamidas se ligassem à melanina depositada intracelularmente em células do melanoma, enquanto os complexos funcionalizados com os sais de trifenisfosfónio se deveriam acumular selectivamente nas mitocôndrias de células tumorais. Tanto a melanina como as mitocôndrias são alvos intracelulares, o que exigia que os complexos fossem capazes de atravessar a membrana celular de modo a atingir os respectivos alvos. A capacidade de atravessar a membrana celular é condicionada por um conjunto de factores, como a lipofilia, topologia, massa molecular e carga dos compostos. De modo a otimizar estas características físico-químicas, foram explorados ligandos bifuncionais doadores (S,H,N), (N,N,N), (N,N,O) e (S,N,O) que deveriam estabilizar eficientemente a unidade  $fac\text{-}[M(\text{CO})_3]^+$  e proporcionar uma funcionalização versátil com as pequenas moléculas.

A primeira parte do trabalho incidiu sobre a síntese de complexos tricarbonilo de Re(I) e  $^{99m}\text{Tc(I)}$  funcionalizados com derivados de benzamidas. Esperava-se que estes compostos tivessem afinidade para a melanina e fossem úteis para a concepção de sondas radioactivas para detecção *in vivo* do melanoma melanótico e respectivas metástases. Inicialmente, pretendiam-se explorar ligandos bifuncionais contendo anéis de pirazolilo como função coordenante comum: i) boratos de bis(azolilo) mistos contendo grupos pirazolilo e mercaptoimidazolilo (doadores S,H,N); ii) pirazolo-diamina (doadores N,N,N); iii) pirazolo-aminocarboxílico (doadores S,N,O).

Ao contrário dos outros tipos de ligandos, os boratos de bis(azolilo) mistos ainda não tinham sido explorados no desenvolvimento de radiofármacos específicos de  $^{99m}\text{Tc}$ , com base na aproximação tricarbonilo. Por essa razão, procedeu-se ao estudo de complexos modelo de Re/ $^{99m}\text{Tc}$  com boratos de bis(azolilo) mistos. Ao realizar este estudo pretendia-se verificar se esta classe de complexos apresentava os requisitos necessários para prosseguir com a sua funcionalização subsequente com os derivados de benzamidas, ou seja que apresentassem elevada estabilidade *in vitro* e *in vivo* e um perfil de biodistribuição favorável. Os complexos modelo de Re foram obtidos por reacção de *fac*-

[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)<sub>2</sub>B(tim<sup>Me</sup>)}(CO)<sub>3</sub>] (1), já descrito na literatura, com os pirazolos adequados. Dessa forma, evitou-se inicialmente a síntese dos boratos de bis(azolilo) mistos que pode ser uma tarefa relativamente exigente. As reacções de 1 com os diferentes pirazolos permitiram obter com sucesso os complexos *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(pz)}(CO)<sub>3</sub>] (2), *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>pz)}(CO)<sub>3</sub>] (**Re1**) e *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -HB(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>-4-EtOOCCH<sub>2</sub>pz)}(CO)<sub>3</sub>] (4). Estudou-se a possibilidade de sintetizar um destes complexos, **Re1**, por reacção do precursor *fac*-[Re(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> com o composto Na[H<sub>2</sub>B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>pz)] (L<sup>1</sup>), o que foi conseguido com sucesso. Estes compostos representam os primeiros exemplos de complexos de Re estabilizados por boratos de bis(azolilo) mistos. A sua caracterização por RMN multinuclear e por difracção de raios-X confirmou que os ligandos actuam como tridentados (S,H,N). Sintetizou-se com rendimento elevado o complexo de <sup>99m</sup>Tc congénere de **Re1**, *fac*-[<sup>99m</sup>Tc{( $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>pz)}(CO)<sub>3</sub>] (**Tc1**), tendo-se procedido ao estudo da sua estabilidade *in vitro* e *in vivo* e ao estudo da sua biodistribuição em ratinhos saudáveis. **Tc1** apresentou uma reduzida estabilidade face a processos de transquelatação com cisteína e histidina. Os estudos de biodistribuição mostraram que **Tc1** apresenta uma taxa de excreção muito lenta, sofrendo uma acumulação acentuada no trato gastrointestinal. Estas características pouco favoráveis fizeram com que não se prosseguisse com a funcionalização deste tipo de compostos com derivados de benzamidas ou seus fragmentos.

Tendo em conta os resultados obtidos para os boratos de bis(azolilo), a funcionalização com os derivados de benzamidas foi apenas efectuada para os ligandos do tipo pirazolo-diamina e do tipo pirazolo-aminocarboxílico. Essa funcionalização foi efectuada através da amina central do ligando ou da posição 4 do anel de pirazolo, mediante formação de ligações amida entre grupos ácido carboxílico presentes nas estruturas dos ligandos e funções amins terminais dos derivados das benzamidas. Os ligandos bifuncionais resultantes, L<sup>2</sup>-L<sup>9</sup>H, permitiram obter complexos de Re/<sup>99m</sup>Tc do tipo tipo *fac*-[M( $\kappa^3$ -L)(CO)<sub>3</sub>]<sup>o/+</sup> (M = Re, **Re2-Re9**; M = <sup>99m</sup>Tc, **Tc2-Tc9**) estabilizados por ligandos tridentados doadores (N,N,N) (L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup>, L<sup>6</sup>, L<sup>7</sup>) ou doadores (N,N,O) (L<sup>4</sup>, L<sup>5</sup>, L<sup>8</sup>, L<sup>9</sup>). Os complexos **Re2-Re9** foram caracterizados pelas técnicas usuais em química (IV, RMN, ESI-MS, análise elementar) e utilizados como compostos modelo para identificação dos complexos congéneres de <sup>99m</sup>Tc (**Tc2-Tc9**). A determinação da lipofilia para **Tc2-Tc9** mostrou que estes complexos apresentam um carácter hidrofílico, com excepção de **Tc5**. **Tc2-Tc9** apresentam uma elevada afinidade *in vitro* para a melanina. A interacção com este pigmento parece envolver predominantemente interacções electrostáticas no caso dos complexos catiónicos, enquanto na ligação dos complexos neutros parecem predominar as

interacções hidrofóbicas. Estudos *in vitro* de captação celular com a linha celular B16-F1 do melanoma melanótico murino mostraram que **Tc2-Tc9** apresentam uma captação relativamente baixa. Estudos de biodistribuição em ratinhos com melanoma induzido mostraram que os complexos apresentam uma baixa fixação tumoral, o que está de acordo com os resultados obtidos *in vitro* com células B16-F1. Atendendo à elevada afinidade para a melanina que foi encontrada para o conjunto dos complexos testados, estes resultados reflectem certamente a incapacidade dos complexos atravessarem a membrana celular. Este comportamento é provavelmente justificado pelo facto de estarmos em presença de complexos hidrofílicos, se exceptuarmos **Tc5**.

Perante os resultados obtidos para os complexos **Tc2-Tc9**, tentámos obter complexos com propriedades *in vitro* e *in vivo* mais promissoras para concepção de sondas radioactivas para detecção *in vivo* do melanoma melanótico. Para atingir esse objectivo, focámo-nos em complexos neutros, com carácter mais lipofílico e com peso molecular mais reduzido. Para obter complexos com estas características utilizámos ligandos bifuncionais do tipo pirazolo-aminocarboxílico (doadores (N<sub>pz</sub>,N,O)) ou do tipo piridina-aminocarboxílico (doadores (N<sub>py</sub>,N,O)) e ligandos bifuncionais derivados da cisteamina (doadores (S,N,O)). Estes ligandos foram funcionalizados com os grupos N-dietilo e N-pirrolidina que se encontram presentes em muitos dos derivados de benzamidas com afinidade para o melanoma que se encontram descritos na literatura. Esperava-se que a unidade *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> estabilizada pelos diferentes sistemas de átomos doadores substituísse a porção aromática das benzamidas, proporcionando aos complexos a lipofilia pretendida.

Os compostos derivados da cisteamina correspondiam a uma nova classe de ligandos cuja capacidade de coordenação face à unidade *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M=Re, <sup>99m</sup>Tc) ainda não tinha sido avaliada. Assim, sintetizou-se o ligando base (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>COOH) (**L<sup>10</sup>H**), sem conter os farmacóforos, e estudou-se a possibilidade de sintetizar os respectivos complexos tricarbonilo de Re(I) e <sup>99m</sup>Tc(I). A caracterização do complexo de rénio resultante (**Re10**) por difracção de raios-X confirmou que o ligando coordena ao centro metálico de forma tridentada, através dos átomos de S, N e O. **Re10** tem um comportamento dinâmico em solução, de acordo com estudos de RMN de temperatura variável. Este comportamento dinâmico resulta muito provavelmente da ocorrência de um equilíbrio entre dois isómeros, devido à inversão piramidal do enxofre. O complexo congénere de <sup>99m</sup>Tc, **Tc10**, apresentou uma grande estabilidade *in vitro* em condições fisiológicas e face a processos de transquelatação com cisteína e histidina. O perfil de biodistribuição de **Tc10** em ratinhos saudáveis pode ser considerado favorável, com uma eficiente depuração sanguínea, uma rápida excreção e sem formação de metabolitos. Estas

características foram consideradas encorajadoras e levaram-nos a prosseguir com a funcionalização de  $L^{10}H$  com os grupos N-dietilo e N-pirrolidina. Essa funcionalização foi também efectuada para ligandos do tipo pirazolo-aminocarboxílico e do tipo piridina-aminocarboxílico, como previsto inicialmente. A funcionalização das diferentes classes de compostos permitiu obter os ligandos bifuncionais ( $L^{11}H-L^{12}H$ ) (doadores  $N_{pz},N,O$ ) ( $L^{13}H-L^{14}H$ ) (doadores  $N_{py},N,O$ ) e ( $L^{15}H-L^{17}H$ ) (doadores  $S,N,O$ ). Estes ligandos foram utilizados para obter complexos de Re (**Re11-Re17**) que foram utilizados para a identificação química dos complexos congéneres de  $^{99m}Tc$  (**Tc11-Tc17**). A natureza do ligando estabilizador influencia fortemente a lipofilia destes complexos, tendo-se verificado que os ligandos doadores ( $N_{py},N,O$ ) formam complexos hidrofílicos (**Tc13** e **Tc14**). Se exceptuarmos **Tc17**, os ligandos doadores ( $N_{pz},N,O$ ) e doadores ( $S,N,O$ ) originam complexos com carácter lipofílico. O carácter hidrofílico de **Tc17** não era esperado, uma vez que a única diferença face a **Tc16** é a presença de um espaçador propilénico em vez de um espaçador etilénico para ligar o grupo N-dietilo à estrutura dos ligandos. Este comportamento reflecte os diferentes graus de ionização de **Tc16** e **Tc17** a pH fisiológico, devido aos diferentes valores de  $pK_a$  apresentados pelos complexos, não resultando de eventuais diferenças estruturais relacionadas com modos de coordenação diferentes dos ligandos.

A afinidade *in vitro* para a melanina dos complexos **Tc11-Tc17** pode ser considerada moderada a elevada, tendo variado segundo a ordem (**Tc11-Tc12**) > (**Tc13-Tc14**) > (**Tc15-Tc17**). Estes dados sugerem que a presença dos anéis aromáticos (pirazolo e piridina) parece ser importante na ligação à melanina, devido provavelmente ao estabelecimento de processos de transferência de carga entre esses grupos aromáticos e os grupos índole da melanina. Estudos de captação em células B16-F1 demonstraram valores baixos a moderados para os complexos **Tc11-Tc17**. Os complexos que apresentaram a maior captação celular foram **Tc11** e **Tc12**, estabilizados por ligandos doadores ( $N_{pz},N,O$ ), e **Tc16** estabilizado por um ligando doador ( $S,N,O$ ). De forma a avaliar a importância da presença da melanina na captação celular dos complexos foram efectuados estudos utilizando a linha celular A375 que corresponde a células amelanóticas de melanoma humano. Nesta linha celular, todos os complexos apresentaram valores de captação celular desprezáveis, com excepção de **Tc11**. Estes resultados sugerem que a presença da melanina potencia a captação e retenção celulares dos complexos. No entanto, o facto do composto **Tc16** apresentar uma captação celular considerável nas células B16-F1, apesar de ser o composto com menor afinidade *in vitro* para a melanina, levou-nos a estudar a possibilidade da captação celular dos complexos envolver a interacção com receptores  $\sigma$ , uma vez que é conhecido que complexos similares apresentam afinidade para este tipo de

receptores.<sup>96,108,109,198</sup> Para esclarecer este aspecto, foram efectuados estudos de captação celular de alguns dos complexos nas células B16-F1 e A375 em presença de haloperidol, um fármaco com afinidade reconhecida para estes receptores. Estes ensaios competitivos foram efectuados apenas para os complexos que apresentaram os maiores valores de captação celular nas duas linhas celulares utilizadas: **Tc11**, **Tc12** e **Tc16** nas células B16-F1; **Tc11** nas células A375. Para **Tc11** verificou-se uma diminuição significativa dos valores de captação celular para concentrações baixas de haloperidol, em particular nas células A375. Estes resultados sugerem que a retenção celular de **Tc11** pode envolver interacção com os receptores  $\sigma$ . No caso dos complexos **Tc12** e **Tc16** a sua captação celular nas células B16-F1 foi afectada de modo menos significativo quando comparado com **Tc11**, o que parece indicar um menor envolvimento dos receptores  $\sigma$  na captação celular de **Tc12** e **Tc16**.

Estudos de biodistribuição de **Tc11-Tc17** em ratinhos com tumor melanótico, induzido com células B16-F1, mostraram que **Tc15-Tc17** foram os complexos que apresentaram os maiores valores absolutos de fixação tumoral. Atendendo a que **Tc15-Tc17** apresentam apenas uma afinidade moderada para a melanina, uma maior interacção com este pigmento não deve ser o factor que leva a uma maior captação tumoral. Por si só, a lipofilia também não poderá justificar os resultados encontrados, uma vez que **Tc17** apresentou a pH fisiológico o carácter mais hidrofílico de entre todos os complexos estudados. Provavelmente, os valores superiores de captação tumoral observados para **Tc15-Tc17** reflectem a diferente topologia destes complexos, resultante da ausência dos grupos coordenantes N-heterocíclicos, que lhes poderá facilitar a entrada nas células. Uma vez no interior das células tumorais, a sua retenção poderá ser devida à interacção com a melanina pois apresentam afinidade para este pigmento, ainda que moderada. **Tc16** foi o complexo que apresentou a maior captação tumoral com razões tumor/sangue e tumor/músculo, relativamente favoráveis. Através da aquisição de imagens estáticas em câmara gama, **Tc16** permitiu visualizar um melanoma murino em ratinhos C57BL/6 inoculados com células B16-F1, com uma captação tumoral selectiva face aos tecidos são circundantes. No entanto, **Tc16** apresentou uma fixação elevada no fígado e intestino, devido à sua excreção ser essencialmente hepatobiliar, o que é desvantajoso especialmente para visualizar tumores que se localizem na zona abdominal. Para ultrapassar estes inconvenientes, poder-se-ão introduzir modificações estruturais no composto que diminuam a fixação hepática e aumentem a taxa de excreção. Tal poderá envolver, por exemplo, a funcionalização com diferentes funções éteres, introduzidas preferencialmente através do átomo de enxofre do ligando doadores (S,N,O). Esta estratégia já foi utilizada com sucesso para otimizar a farmacocinética de complexos

lipofílicos de  $^{99m}\text{Tc}$ , em particular no âmbito do desenvolvimento de radiofármacos para perfusão do miocárdio. Como exemplo, pode referir-se o trabalho desenvolvido no grupo GCR do ITN com complexos tricarbonilo de  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  estabilizados com ligandos tris(pirazolilo)metano, em que a introdução de funções éter nas diferentes posições do anel de pirazolo permitiu minimizar a retenção hepática dos complexos.<sup>223,224</sup>

A segunda parte do trabalho incidiu sobre a síntese, caracterização e a avaliação biológica de catiões lipofílicos de Re e  $^{99m}\text{Tc}$  funcionalizados com derivados do trifenilfosfónio e estabilizados por ligandos do tipo pirazolo-aminocarboxílico (N,N,O), do tipo cisteamina (S,N,O) e do tipo pirazolo-diamina (N,N,N). Esperava-se que estes compostos se acumulassem selectivamente nas mitocôndrias das células tumorais. Contrariamente aos derivados das benzamidas, os catiões lipofílicos não são específicos para um determinado tipo de tumor, podendo ser vistos como traçadores “universais” para detecção tumoral. Utilizaram-se ligandos bifuncionais que deveriam conduzir a complexos monocatiónicos ou a complexos com carga +2. Teoricamente, segundo a equação de Nersnt, os complexos com uma carga divalente podem apresentar uma captação mais selectiva nas mitocôndrias das células tumorais, comparativamente a complexos monocatiónicos, o que justificou o estudo de complexos com diferentes cargas.

Os sais de trifenilfosfónio foram introduzidos na estrutura dos diferentes tipos de compostos através da amina central, utilizando um espaçador butilénico ou um espaçador do tipo *p*-xileno, tendo sido assim sintetizados ligandos bifuncionais do tipo pirazolo-diamina ( $\text{L}^{18}\text{-L}^{19}$ ), do tipo pirazolo-aminocarboxílico (N,N,O) ( $\text{L}^{20}\text{H-L}^{21}\text{H}$ ) e ligandos bifuncionais derivados da cisteamina ( $\text{L}^{22}\text{H-L}^{23}\text{H}$ ). A reacção do precursor  $fac\text{-}[M(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  ( $M = \text{Re}, ^{99m}\text{Tc}$ ) com  $\text{L}^{18}\text{-L}^{23}\text{H}$  resultou na síntese de novos complexos de Re(I) (**Re18-Re23**) e de  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  (**Tc18-Tc23**). Os complexos **Tc18** e **Tc19**, estabilizados por ligandos do tipo pirazolo-diamina, apresentam carga +2 e são hidrofílicos, enquanto os restantes apresentam carga +1 e são lipofílicos. Procedeu-se à avaliação biológica *in vitro* dos complexos **Tc18-Tc23**, com o objectivo de avaliar se apresentavam capacidade para se acumular nas mitocôndrias de células tumorais e verificar se essa acumulação era condicionada pelo valor do potencial mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) e pela expressão da proteína Pgp.

Inicialmente procedeu-se ao estudo da captação celular dos complexos **Tc18-Tc23** em células B16-F1 (melanoma murino), PC-3 (carcinoma da próstata humano) e MCF-7 (cancro da mama humano). Os complexos apresentaram valores de captação baixos a moderados, não tendo sido observadas diferenças significativas entre as diferentes linhas celulares. Em seguida, avaliou-se se a presença da Pgp interferiria na captação e acumulação celular destes complexos, uma vez que a Pgp é uma proteína que promove

activamente a saída do  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi do interior da célula diminuindo a eficácia deste radiofármaco na detecção de tumores. Para avaliar esse efeito, procedeu-se à comparação da captação celular em células que expressam a Pgp (MCF-7/*MDR1* e H69/Lx4) e nas respectivas células parentais (MCF-7 e H69). Dos complexos testados, **Tc18** foi aquele que sofreu de forma mais pronunciada o efluxo mediado pela Pgp. No entanto, mesmo para **Tc18** o efluxo observado é bastante inferior ao descrito para o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi nas mesmas linhas celulares.

De forma a avaliar a afinidade dos complexos **Tc18-Tc23** para as mitocôndrias foram realizados estudos de captação em mitocôndrias isoladas. Para os complexos de carga +1 (**Tc20-Tc23**) a lipofilia parece ter uma influência importante na captação mitocondrial, verificando-se que os complexos mais lipofílicos (**Tc21** e **Tc23**) apresentam maior captação mitocondrial do que os complexos menos lipofílicos (**Tc20** e **Tc22**). Esta tendência não é verificada, no entanto, para os complexos com carga +2 (**Tc18** e **Tc19**) que apresentam valores semelhantes para a captação mitocondrial, apesar de apresentarem diferentes valores de lipofilia. É de salientar que **Tc18** e **Tc19** foram dos complexos que apresentaram maiores valores de captação em mitocôndrias isoladas de células PC-3. Na mesma linha celular, **Tc19** foi o complexo que apresentou o maior valor de captação celular enquanto **Tc18** apresentou o menor valor. O resultado da captação mitocondrial destes complexos pode ser explicado com base no carácter dicatiónico dos complexos e no valor negativo do  $\Delta\psi_m$ . Provavelmente, a lipofilia condiciona a captação celular observada para **Tc18** e **Tc19**. **Tc18**, sendo mais hidrofílico, apresenta mais dificuldade em atravessar a membrana plasmática e encontra-se menos disponível para ligação às mitocôndrias ao nível intracelular, ao contrário do observado nos ensaios efectuados com mitocôndrias isoladas.

Para os complexos que apresentaram os maiores valores de captação celular e mitocondrial (**Tc19**, **Tc21** e **Tc23**) avaliou-se o efeito de alterações nos valores de  $\Delta\psi_p$  e  $\Delta\psi_m$  na captação celular dos compostos. Essas alterações foram conseguidas através da utilização de diferentes iónoforos (nigericina, ubaína, valinomicina e CCCP) ou de tampões com diferentes concentrações de  $\text{K}^+$ . A captação celular dos complexos foi afectada pela alteração dos valores de  $\Delta\psi_p$  e  $\Delta\psi_m$ , verificando-se uma redução dessa captação ao induzir-se a despolarização das membranas plasmática e mitocondrial, e um aumento quando se induziu uma hiperpolarização das mesmas. Estes resultados sugerem que estes catiões lipofílicos se acumulam nas células e nas mitocôndrias de células tumorais por difusão, a favor do gradiente electroquímico e em função das diferenças de potencial de membrana. Estes resultados indicam que os complexos estudados apresentam interesse para serem explorados na concepção de sondas radioactivas dirigidas às mitocôndrias, tendo em vista a

detecção *in vivo* de tecidos tumorais. Para confirmar esse potencial, é necessário efectuarem-se estudos de biodistribuição em modelos animais com tumor induzido, o que não foi realizado por limitações de tempo. Estes estudos permitirão avaliar se os compostos apresentam uma fixação selectiva em tecidos neoplásicos comparativamente a órgãos que apresentam um elevado número de mitocôndrias, como é o caso do coração e fígado, o que é essencial para que possam ter interesse para a detecção *in vivo* de tumores.

Em suma, as características únicas e a versatilidade química dos precursores *fac*- $[M(H_2O)_3(CO)_3]^+$  (M = Re,  $^{99m}Tc$ ) permitiu-nos explorar ligandos tridentados com características diversas, doadores (S,H,N), (N,N,N), (N,N,O) e (S,N,O), de modo a modelar propriedades como a lipofilia, topologia, peso molecular e carga, que podem ser determinantes da capacidade dos complexos atravessarem a membrana plasmática para poderem interagir com alvos intracelulares. Apesar de não ter sido possível racionalizar completamente o efeito destes factores conseguiu-se melhorar de forma sistemática as propriedades biológicas dos complexos funcionalizados com derivados de benzamidas e com sais de trifenilfosfónio, dirigidos, respectivamente, à melanina e às mitocôndrias. São de salientar os resultados obtidos para os complexos de  $^{99m}Tc$  com os ligandos bifuncionais derivados da cisteamina e doadores (S,N,O), que correspondem a uma nova classe de ligandos que não se encontrava ainda descrita. Estes complexos apresentaram uma grande estabilidade *in vitro* e *in vivo* e mostraram, em geral, uma maior captação tumoral nos estudos de biodistribuição em ratinhos com tumor induzido. Estes resultados deixam antever que esta nova classe de ligandos poderá ser útil para obter complexos tricarbonilo de Re(I)/ $^{99m}Tc$ (I) funcionalizados com outro tipo de pequenas moléculas, nomeadamente inibidores ou substratos de enzimas, que devam ligar-se a outros alvos intracelulares relevantes para visualização de tecidos neoplásicos pelas técnicas de imagiologia nuclear.

# Capítulo 6

---

Parte Experimental



## 6. Parte Experimental

---

### 6.1. Solventes e reagentes

Todos os reagentes químicos e solventes utilizados eram de qualidade pró-análise e foram usados sem qualquer purificação adicional, excepto quando indicado. Os compostos sensíveis ao ar ou à humidade foram manuseados em atmosfera de N<sub>2</sub>, recorrendo a técnicas de linha de vácuo/azoto e de Schlenk e utilizando solventes secos e destilados. Os solventes foram secos e destilados de acordo com os procedimentos descritos na literatura,<sup>225</sup> como indicado a seguir de forma resumida:

- n-Hexano, tetrahydrofurano (THF) e tolueno destilados de Na/benzofenona;
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>CN destilados de hidreto de cálcio;
- MeOH e EtOH destilados na presença de magnésio metálico e de iodo molecular;
- Trietilamina (NEt<sub>3</sub>) destilada de peneiros moleculares 4Å

Os solventes destilados foram mantidos sob azoto e guardados sob peneiros moleculares 4Å (3Å no caso do CH<sub>3</sub>CN).

### 6.2. Técnicas de purificação e caracterização

#### Análise Elementar C,H,N e S

As análises C,H,N e S foram efectuadas num analisador automático EA 110 CE Instruments. As análises foram efectuadas pelo Sr. António Soares (ITN) e pela Vânia Sousa (ITN).

#### Cromatografia em Camada Fina (TLC)

As reacções de síntese química foram monitorizadas por TLC em tiras de sílica-gel 0,25 mm, em suporte de alumínio (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). Os cromatogramas foram revelados com radiação UV com comprimento de onda de 254 nm ou com iodo.

A análise dos compostos radioactivos foi efectuada utilizando tiras de sílica-gel 0,25 mm, Polygram® Sil G da Macherey-Nagel. A detecção da radioactividade ao longo das tiras fez-se com um detector Berthold LB 2723 equipado com um cristal de cintilação NaI(Tl).

### **Cromatografia em Coluna**

A cromatografia em coluna foi utilizada para isolar e purificar alguns dos compostos sintetizados. Para realizar as cromatografias em coluna, foi utilizado sílica-gel 60 com granulometria 70-230 mesh (*Merck*) em colunas de vidro de dimensões variadas. As colunas foram cheias com uma mistura de sílica-gel e eluente que foi escolhido de acordo com o composto a purificar. Após aplicação da amostra no topo da coluna, a eluição foi efectuada por acção da gravidade e os compostos recolhidos em fracções de volume adequado. As fracções recolhidas foram analisadas por TLC, de modo a identificar aquelas que continham o produto pretendido.

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

A análise dos diferentes compostos descritos, foi efectuada num sistema de HPLC constituído por uma bomba Perkin-Elmer LC 200 e com dois detectores em série: um detector UV (Shimadzu LC 290) e um detector de radiação  $\gamma$  (Berthold LB-507A). Todos os solventes utilizados eram de qualidade HPLC e foram desarejados com hélio antes da sua utilização. A água foi bidestilada em aparelho de quartzo e filtrada em filtros milipore 0,22  $\mu\text{m}$ . As condições experimentais foram seleccionadas de acordo com as características dos compostos a analisar e/ou purificar e serão referidas sempre que oportuno para cada um dos compostos em particular. Os perfis cromatográficos, UV-Vis e radioactivo, foram obtidos por detecção de absorvância a 254 nm (ou 220 nm) e por detecção da radiação  $\gamma$ , respectivamente.

### **Medição da Actividade das Soluções Radioactivas**

A actividade das soluções de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foi medida numa câmara de ionização (*Aloka, Curiemeter IGC-3*, Tokyo, Japan). As amostras com menor actividade foram medidas num contador gama (Berthold, LB2111, Germany).

### **Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{11}\text{B}$  e  $^{31}\text{P}$  foram efectuados em  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  ou em  $\text{CD}_3\text{CN}$ , registados num espectrómetro Varian Unity 300 MHz e apresentados em ppm. Os desvios químicos dos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram referenciados com as ressonâncias residuais do solvente relativamente ao tetrametilsilano,  $\text{SiMe}_4$  (TMS). Os desvios químicos dos espectros de RMN de  $^{11}\text{B}$  foram referenciados com uma solução externa de  $\text{NaBH}_4$  e os desvios químicos dos espectros de  $^{31}\text{P}$  com uma solução externa de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

### **Espectroscopia de Infra Vermelho (IV)**

Os espectros de IV foram obtidos num espectrómetro Bruker, Tensor 27, para amostras preparadas em pastilhas de KBr.

### **Cristalografia de Raios-X de Cristal Único**

Os cristais foram obtidos por evaporação lenta de soluções concentradas dos compostos em CH<sub>3</sub>CN ou por recristalização de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/n-hexano. Os dados cristalográficos foram adquiridos num difractómetro com um detector de área Bruker AXS APEX CCD, usando radiação monocromática de molibdénio ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ). As dimensões da célula unitária foram obtidas usando software Bruker SMART. As reflexões foram refinadas utilizando programas Bruker SAINT<sup>226</sup> e as correcções de absorção foram aplicadas utilizando o SADABS.<sup>227</sup> As estruturas foram resolvidas utilizando métodos directos com o SIR97<sup>228</sup> e refinadas utilizando os programas SHELXL-97.<sup>229</sup> Todos os programas pertencem ao pacote de software WINGX<sup>230</sup>. Com excepção dos átomos de hidrogénio, todos os átomos foram refinados anisotropicamente. Os átomos de hidrogénio ligados ao boro foram localizados no mapa de densidade electrónica residual e foram refinados isotropicamente. Os restantes átomos de hidrogénios foram inseridos em posições calculadas. A representação gráfica das estruturas foi efectuada com os programas ORTEP-3.<sup>231</sup> A resolução e o refinamento das estruturas foram efectuados pela Doutora Isabel Cordeiro dos Santos (ITN).

### **Espectrometria de Massa (MS)**

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro ESI/QITMS Bruker HCT, com ionização por electrospray pelo Doutor Joaquim Marçalo (ITN). Os espectros de massa de alta resolução (HR-MS) foram obtidos num espectrómetro ApexQe FTICR Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA) com ionização por electrospray e foram realizados na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pelo Doutor Pedro Vaz e Doutor Paulo Madeira.

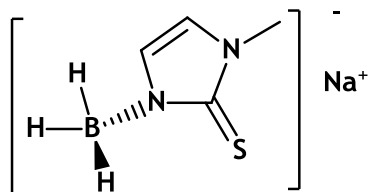
### **Medição de pH**

O pH das soluções tampão foi medido recorrendo a um micro-eléctrodo 200 mm U402-M3-S7/200. O eléctrodo foi calibrado na escala de pH utilizando soluções tampão padrão.

### 6.3. Síntese e caracterização dos ligandos

#### 6.3.1. Síntese e caracterização dos compostos intermediários

##### 6.3.1.1. $\text{Na}[\text{H}_3\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})], 5^{47}$



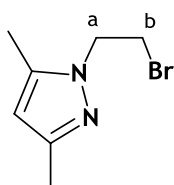
A uma suspensão de  $\text{NaBH}_4$  (1,99 g; 52,60 mmol) em THF seco (100 mL), a 50 °C, adicionou-se, gota a gota sob  $\text{N}_2$ , de forma lenta, uma solução de 2-mercapto-1-metilimidazolo (3,00 g; 26,30 mmol) em THF seco (50 mL). Após a adição, a mistura foi deixada a reagir à temperatura de 50 °C durante

3 h e durante a noite à temperatura ambiente. No dia seguinte a solução foi filtrada sob vácuo e o sobrenadante foi evaporado. O composto foi purificado por recristalizações sucessivas em THF/n-hexano, com um aumento progressivo da quantidade de n-hexano. Rendimento: 34% (1,33 g; 8,90 mmol).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  3,43 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-N}$ ); 6,61 (1H, d,  $J_{\text{H-H}} = 2.1$  Hz, CH); 6,64 (1H, d,  $J_{\text{H-H}} = 2.1$  Hz, CH).

**RMN  $^{11}\text{B}$**  (96,169 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta_{\text{B}}$  19,0 (q,  $J_{\text{B-H}}=91$  Hz).

##### 6.3.1.2. N-(2-Bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo, $8^{232}$

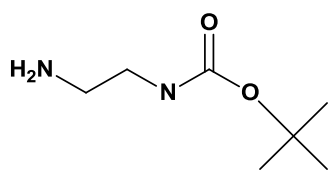


A uma solução de 3,5-dimetilpirazolo (5,00 g; 52,00 mmol) em 1,2-dibromoetano (44,81 mL; 520,0 mmol) foi adicionada uma solução aquosa de  $\text{NaOH}$  40% (15,60 mL; 156,0 mmol) e ainda brometo de tetrabutílamónio (TBAB) (0,43 g; 1,30 mmol). A mistura resultante foi

refluxada durante 1 h. Após arrefecimento à temperatura ambiente, procedeu-se à separação das fases. A fase orgânica foi seca com  $\text{MgSO}_4$  e evaporada a pressão reduzida. O produto foi posteriormente purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: acetato de etilo). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 2,98 g (14,60 mmol; 28%).

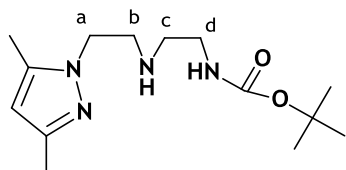
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  2,10 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,25 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 3,67 (2H, t,  $\text{CH}_2$  (b)); 4,30 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (a)); 5,78 (1H, s, H(4)-pz).

$R_f$  (sílica-gel, acetato de etilo) = 0,80.

6.3.1.3. 2-aminoetilcarbamato de terc-butilo, **9**<sup>233</sup>

A uma solução de dicarbonato de di-terc-butilo (15,00 g; 69,00 mmol) em dioxano (90 mL) foi adicionada, durante 2,5 h, gota a gota e a 0 °C, uma solução de 1,2-diaminoetano (37 mL, 552,0 mmol) em dioxano (100 mL). A reacção foi deixada à temperatura ambiente em agitação constante durante 22 h, sob N<sub>2</sub>. Seguidamente evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. Após remoção do solvente extraiu-se o resíduo com H<sub>2</sub>O, filtrou-se e desprezou-se o sólido (produto bis-substituído). Extraiu-se a solução aquosa com CHCl<sub>3</sub>, filtrou-se a fase orgânica, secou-se com MgSO<sub>4</sub> e evaporou-se, obtendo-se um óleo amarelo pálido. Rendimento: 10,69 g (66,75 mmol, 96%).

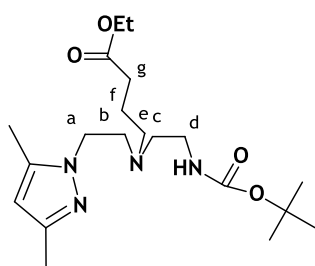
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,18 (2H, bs, NH<sub>2</sub>); 1,36 (9H, s, 3-CH<sub>3</sub> (BOC)); 2,70 (2H, t, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 3,09 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NHBOC); 5,04 (1H, bs, NH).

6.3.1.4. 2-(2-(3,5-dimetilpirazolil)etilamino)etilcarbamato de terc-butilo, **10**<sup>51</sup>

A uma solução de **9** (5,64 g; 27,60 mmol) em CH<sub>3</sub>CN seco (130 mL) adicionou-se **8** (6,63 g; 41,40 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5,72 g; 41,40 mmol) e KI (229 mg; 1,38 mmol). Deixou-se esta mistura em refluxo durante a noite. No dia seguinte evaporou-se o solvente e o produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95/5). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo amarelo pálido. Rendimento: 4,70 g (16,50 mmol; 60%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,33 (9H, s, 3-CH<sub>3</sub> (BOC)); 1,78 (1H, bs, NH); 2,10 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2,12 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2,61 (2H, t, CH<sub>2</sub>(c)); 2,89 (2H, t, CH<sub>2</sub>(b)); 3,09 (2H, t, CH<sub>2</sub>(d)); 3,94 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 5,17 (1H, bs, NH); 5,68 (1H, s, H(4)-pz).

R<sub>f</sub> (sílica-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95:5) = 0,32.

6.3.1.5. 3-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)amino)propanoato de etilo, **11**<sup>51</sup>

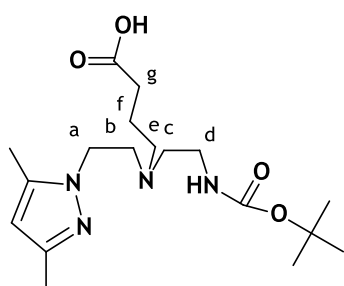
O composto **11** foi sintetizado como atrás descrito para **10**, a partir de 2,50 g de **10** (8,77 mmol) e 2,50 mL de 4-bromobutirato de etilo (17,50 mmol) com refluxo da mistura durante 48 h. Após arrefecimento à temperatura ambiente filtrou-se com celite, a fim de remover o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, e o produto foi

purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: acetato de etilo/n-hexano, com gradiente de 50/50 a 100/0). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 2,41 g (6,08 mmol; 69%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,22 (3H, t, CH<sub>3</sub>-éster); 1,41 (9H, s, 3-CH<sub>3</sub> (BOC)); 1,59 (2H, t, CH<sub>2</sub>(f)); 2,13 (2H, m, CH<sub>2</sub> (e)); 2,18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,20 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,47 (4H, m, CH<sub>2</sub> (b) + CH<sub>2</sub> (c)); 2,75 (2H, t, CH<sub>2</sub> (d)); 3,06 (2H, m, CH<sub>2</sub> (g)); 3,95 (2H, t, CH<sub>2</sub> (a)); 4,12 (2H, q, CH<sub>2</sub>-éster); 5,30 (1H, bs, NH); 5,73 (1H, s, H(4)-pz).

*R<sub>f</sub>* (sílica-gel, Ac.Etilo/n-hexano, 75:25) = 0,28.

### 6.3.1.6. Ácido 3-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)amino)propanóico, 12<sup>51</sup>



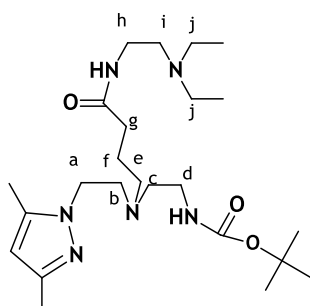
Uma solução de NaOH (2,43 g; 60,80 mmol) em H<sub>2</sub>O (60 mL) foi adicionada a uma solução de 11 (2,41 g; 6,08 mmol) em THF (60 mL) e a mistura foi refluxada durante a noite. A mistura reaccional foi neutralizada com HCl 1 M em banho de gelo. Seguidamente os solventes foram evaporados e o resíduo seco foi extraído com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. O solvente foi removido sob

vácuo e o produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, com gradiente de 90/10 a 50/50). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 1,45 g (3,90 mmol; 64%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,40 (9H, s, 3-CH<sub>3</sub> (BOC)); 1,77 (2H, t, CH<sub>2</sub> (f)); 2,20 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,22 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,52 (6H, m, CH<sub>2</sub>(b) + CH<sub>2</sub> (c) + CH<sub>2</sub> (e)); 2,79 (2H, t, CH<sub>2</sub> (d)); 3,01 (2H, m, CH<sub>2</sub> (g)); 4,07 (2H, t, CH<sub>2</sub> (a)); 4,74 (1H, bs, NH); 5,82 (1H, s, H(4)-pz).

*R<sub>f</sub>* (sílica-gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90:10) = 0,31.

### 6.3.1.7. (2-(((4-(N-(2-dietilamino)etilamino)carbamoil)butil)(2-(3,5-dimetilpirazolil))amino)etilcarbamato de terc-butilo, 13



A uma solução de 12 (200 mg; 0,54 mmol) em CH<sub>3</sub>CN seco (15 mL) adicionou-se 2-aminoetildietilamina (76 μL; 0,54 mmol), HBTU (hexafluoro-fosfato de o-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetrametil-urónio) (206 mg; 0,54 mmol) e NEt<sub>3</sub> (228 μL; 1,62 mmol). A mistura reaccional foi deixada em refluxo durante 72

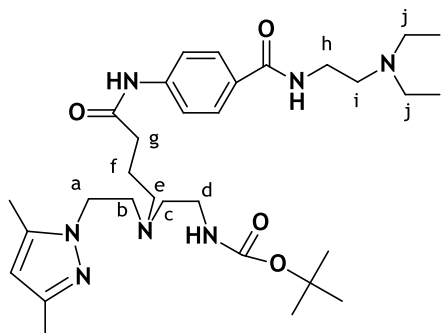
h. Seguidamente evaporou-se o solvente e o composto final foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: MeOH/NH<sub>4</sub>OH, com gradiente de 100/0 a 98/2). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo castanho. Rendimento: 312 mg (0,54 mmol; 98%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 0,97 (6H, t, 2 CH<sub>3</sub>); 1,39 (9H, s, 3-CH<sub>3</sub> (BOC)); 1,66 (2H, t, CH<sub>2</sub> (f)); 2,07 (2H, t, CH<sub>2</sub> (e)); 2,17 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,19 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,47 (8H, m, 4 CH<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub> (b) + CH<sub>2</sub> (c) + CH<sub>2</sub> (d) + CH<sub>2</sub> (i))); 2,67 (2H, t, CH<sub>2</sub> (g)); 2,95 (4H, q, 2 CH<sub>2</sub> (j)); 3,25 (2H, t, CH<sub>2</sub> (h)); 3,95 (2H, t, CH<sub>2</sub> (a)); 5,17 (1H, bs, NH-BOC); 5,75 (1H, s, H(4)-pz); 6,96 (1H, bs, NH).

**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 11,02 (CH<sub>3</sub>-pz); 11,45 (CH<sub>3</sub>-pz); 13,31 (CH<sub>3</sub>); 23,17 (CH<sub>2</sub>); 28,42 (CH<sub>3</sub>-BOC); 33,25 (CH<sub>2</sub>); 36,81 (CH<sub>2</sub>); 38,40 (CH<sub>2</sub>); 46,57 (CH<sub>2</sub>); 46,89 (CH<sub>2</sub>); 51,63 (CH<sub>2</sub>); 53,04 (CH<sub>2</sub>); 53,13 (CH<sub>2</sub>); 53,66 (CH<sub>2</sub>); 78,77 (C<sub>quaternário</sub>-BOC); 105,03 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 138,67 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 147,05 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 156,12 (C=O, BOC); 173,11 (C=O).

*R<sub>f</sub>* (sílica-gel, MeOH) = 0,28.

#### 6.3.1.8. 2-((4-(4-(2-dietilamino)etilcarbamoil)fenilcarbamoil)butil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etilo)amino)etilcarbamato de terc-butilo, 14

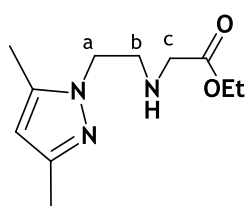


O composto 14 foi sintetizado como atrás descrito para 13, a partir de 120 mg de 12 (0,54 mmol) e 89 mg de procanamida hidrocloreto (0,33 mmol), com refluxo da mistura reaccional durante 24 h. O composto final foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, com gradiente de 10/90 a 0/100) e obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 41 mg (0,07 mmol; 13%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 1,34 (15H, m, 2 CH<sub>3</sub>+BOC); 2,08 (2H, t, CH<sub>2</sub>); 2,13 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,28 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,62 (2H, t, CH<sub>2</sub>); 3,33 (12H, m, 6 CH<sub>2</sub>); 3,76 (4H, t, 2CH<sub>2</sub>); 4,41 (2H, t, CH<sub>2</sub>); 5,89 (1H, s, H(4)-pz); 7,67 (2H, d, aromáticos); 7,83 (2H, d, aromáticos).

*R<sub>f</sub>* (sílica-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 100/7/1) = 0,50.

#### 6.3.1.9. 2-(2-(3,5-dimetilpirazolil)etilamino)etanoato de etilo, 15



O composto 15 foi sintetizado e purificado como atrás descrito para 10, a partir de 2,80 g de 8 (13,70 mmol), 2,88 g de glicinato de etilo (20,60 mmol) e com refluxo da mistura reaccional durante 3 dias. O

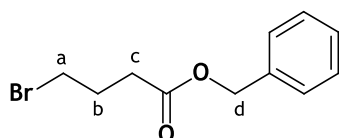
produto resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, com gradiente de 95/5 a 85/15) e obtido sob a forma de um óleo castanho. Rendimento: 1,48 g (6,60 mmol; 48%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,20 (3H, t, CH<sub>3</sub>(Et)); 2,15 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,96 (2H, t, CH<sub>2</sub>(b)); 3,31 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 4,00 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 4,10 (2H, q, CH<sub>2</sub>(Et)); 5,72 (1H, s, H(4-pz)).

**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 11,05 (CH<sub>3</sub>-éster); 13,47 (CH<sub>3</sub>-pz); 14,16 (CH<sub>3</sub>-pz); 48,41 (CH<sub>2</sub>(c)); 49,00 (CH<sub>2</sub>(b)); 50,74 (CH<sub>2</sub>(a)); 60,73 (CH<sub>2</sub>(éster)); 104,95 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 139,09 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 147,56 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 172,15 (C=O).

*R<sub>f</sub>* (sílica-gel, eluente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 90:10) = 0,44.

#### 6.3.1.10. 4-Bromobutirato de benzilo, **16**<sup>234</sup>



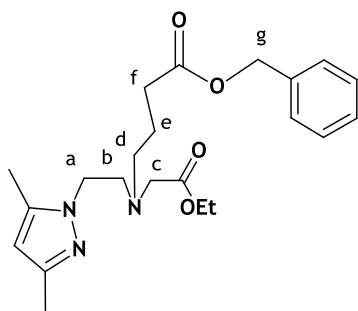
A uma solução de álcool benzílico (1,40 mL; 13,45 mmol) e NEt<sub>3</sub> (2,51 mL; 17,94 mmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (30 mL), adicionou-se, gota a gota e sob N<sub>2</sub>, uma solução de cloreto de 4-bromobutilo (1,04 mL; 8,97 mmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (12 mL).

A mistura reaccional foi deixada durante 4 h em agitação a 0 °C. Posteriormente adicionaram-se 150 mL de H<sub>2</sub>O e as fases foram separadas. A fase orgânica foi recolhida e seca com MgSO<sub>4</sub>. Após filtração, evaporou-se o solvente na linha de vácuo, obtendo-se um óleo transparente. Rendimento: 2,01 g (7,80 mmol; 87%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 2,22 (2H, q, CH<sub>2</sub>(b)); 2,55 (2H, t, CH<sub>2</sub>(c)); 3,45 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 5,13 (2H, s, CH<sub>2</sub>(d)); 7,35 (5H, s, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

*R<sub>f</sub>* (sílica-gel, eluente: Acetato de Etilo/n-hexano, 50:50) = 0,80.

#### 6.3.1.11. 4-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)(2-(etoxicarbonil)etil)amino)butanoato de benzilo, **17**



A uma solução de **16** (700 mg; 3,11 mmol) em CH<sub>3</sub>CN seco (20 mL) adicionou-se NEt<sub>3</sub> (871 µL; 6,22 mmol), KI (47 mg; 0,31 mmol) e ainda uma solução de **15** (800 mg; 3,11 mmol) em CH<sub>3</sub>CN seco (5 mL), gota a gota e sob N<sub>2</sub>. A mistura reaccional foi deixada a refluxar durante 3 dias. Após arrefecimento à temperatura ambiente a mistura foi concentrada em linha de vácuo. Seguidamente adicionou-se

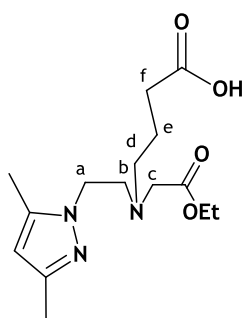
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Separou-se a fase orgânica, secou-se com MgSO<sub>4</sub> e concentrou-se na linha de

vazio. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , com gradiente de 95/5 a 80/20). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 422 mg (1,05 mmol; 34%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,24 (3H, t,  $\text{CH}_3$ (éster)); 1,70 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (e)); 2,17 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,18 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,28 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (f)); 2,62 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (d)); 2,99 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (b)); 3,32 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (c)); 3,97 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (a)); 4,13 (2H, q,  $\text{CH}_2$ (éster)); 5,10 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (g)); 5,72 (1H, s,  $\text{H}_4$ -pz); 7,34 (5H, s,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 90:10) = 0,96.

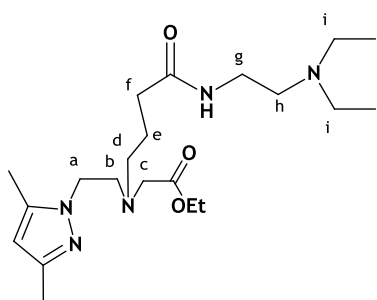
### 6.3.1.12. Ácido 4-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)(2-(etoxicarbonil)etil)amino)butanóico, 18



A uma solução de **17** (422 mg; 1,05 mmol) em etanol seco (40 mL) foi adicionado Pd/C a 10% (500 mg). A suspensão resultante foi deixada em agitação moderada durante 20 h, à temperatura ambiente e sob  $\text{H}_2$ . Seguidamente a solução foi filtrada com celite. O sobrenadante foi evaporado, obtendo-se um óleo transparente. Rendimento: 257 mg (0,83 mmol; 79%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,22 (3H, t,  $\text{CH}_3$ (éster)); 1,72 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (e)); 2,17 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,20 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,35 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (f)); 2,68 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (d)); 2,99 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (b)); 3,24 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (c)); 3,73 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (a)); 4,10 (2H, q,  $\text{CH}_2$ (éster)); 5,75 (1H, s,  $\text{H}_4$ -pz).

### 6.3.1.13. 2-((4-(N-((2-dietilamino)etilamino)carbamoil)butil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)etanoato de etilo, 19



O composto **19** foi sintetizado como atrás descrito para **13**, a partir de 128 mg de **18** (0,41 mmol) e 64  $\mu\text{L}$  de 2-aminoetildietilamina (0,45 mmol) com refluxo da mistura reaccional durante 2 dias. O composto **19** foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , com gradiente de 100/0 a 98/2) e obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 70 mg (0,17 mmol; 42%).

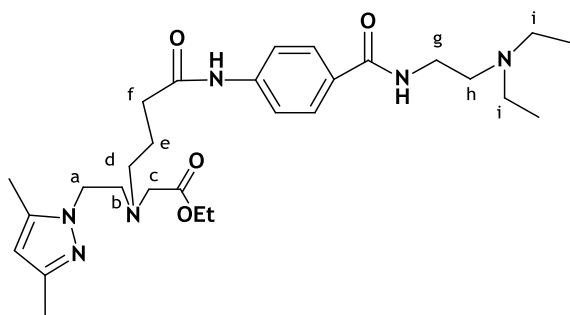
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,06 (6H, t, 2 $\text{CH}_3$ ); 1,18 (3H, t,  $\text{CH}_3$ (éster)); 1,65 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (e)); 2,11 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,13 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (d)); 2,17 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,53 (2H, t,

CH<sub>2</sub>(f)); 2,69 (6H, m, CH<sub>2</sub>(b) + 2 CH<sub>2</sub>(i)); 2,93 (2H, t, CH<sub>2</sub>(h)); 3,23 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 3,35 (2H, m, CH<sub>2</sub>(g)); 3,96 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 4,06 (2H, q, CH<sub>2</sub>(éster)); 5,68 (1H, s, H<sub>4-pz</sub>); 7,26 (1H, bs, NH).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>c</sub> 10,21 (CH<sub>3</sub>-éster); 10,92 (2 CH<sub>3</sub>); 13,27 (CH<sub>3</sub>-pz); 14,09 (CH<sub>3</sub>-pz); 23,56 (CH<sub>2</sub>); 33,31 (CH<sub>2</sub>); 35,95 (CH<sub>2</sub>); 46,81 (CH<sub>2</sub>); 47,39 (CH<sub>2</sub>); 51,51 (CH<sub>2</sub>); 53,78 (CH<sub>2</sub>); 53,96 (CH<sub>2</sub>); 55,11 (CH<sub>2</sub>); 60,17 (CH<sub>2</sub>); 104,66 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 138,98 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 147,06 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 171,27 (C=O); 173,32 (C=O).

R<sub>f</sub> (sílica-gel, MeOH) = 0,29.

### 6.3.1.14. 2-((4-(4-(2-(dietilamino)etilcarbamoil)fenilcarbamoil)butil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)acetato de etilo, 20



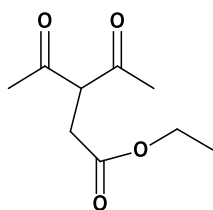
O composto **20** foi sintetizado como atrás descrito para **13**, a partir de 450 mg de **18** (14,5 mmol) e 435 mg de procanamida (435 mg; 15,0 mmol), com refluxo da mistura reaccional durante 3 dias. O composto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH,

80/18/2) e obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 107 mg (0,20 mmol; 14%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,00 (6H, t, 2CH<sub>3</sub>); 1,20 (3H, t, CH<sub>3</sub>(éster)); 1,77 (2H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 2,15 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,19 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,31 (2H, m, CH<sub>2</sub>(d)); 2,57 (8H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(f)+2CH<sub>2</sub>(i)); 2,93 (2H, t, CH<sub>2</sub>(h)); 3,21 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 3,43 (2H, m, CH<sub>2</sub>(g)); 3,97 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 4,09 (2H, q, CH<sub>2</sub>(éster)); 5,78 (1H, s, H<sub>4-pz</sub>); 6,93 (1H, bs, NH); 7,69 (4H, s, CH-aromáticos); 9,84 (1H, bs, NH).

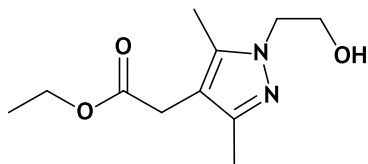
RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>c</sub> 11,32 (CH<sub>3</sub>-éster); 12,13 (2 CH<sub>3</sub>); 13,54 (CH<sub>3</sub>-pz); 14,50 (CH<sub>3</sub>-pz); 24,05 (CH<sub>2</sub>); 34,69 (CH<sub>2</sub>); 37,54 (CH<sub>2</sub>); 47,10 (CH<sub>2</sub>); 47,52 (CH<sub>2</sub>); 51,77 (CH<sub>2</sub>); 52,96 (CH<sub>2</sub>); 54,17 (CH<sub>2</sub>); 55,10 (CH<sub>2</sub>); 60,85 (CH<sub>2</sub>); 104,59 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 119,17 (C<sub>aromático</sub>); 128,14 (C<sub>aromático</sub>); 129,63 (C<sub>aromático</sub>); 139,20 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 142,20 (C<sub>aromático</sub>); 147,41 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 167,20 (C=O); 171,90 (C=O); 173,19 (C=O).

R<sub>f</sub> (sílica-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (70/28/2)) = 0,80.

6.3.1.15. 3-acetil-4-oxopentanoato de etilo, 21<sup>235</sup>

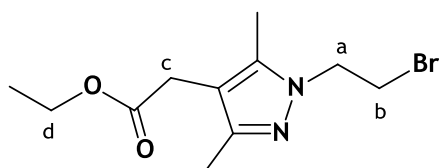
A uma suspensão de NaH (4,85 g; 202 mmol) em THF seco (200 mL) adicionou-se 2,4-pentadiona (acaH) destilada (19 mL; 182 mmol), gota a gota e a 0 °C. Após adição, a mistura foi deixada em agitação a 0 °C durante 1h. Seguidamente adicionou-se bromoacetato de etilo (21,20 mL; 191,00 mmol) de forma lenta, mantendo a temperatura a 0 °C. A mistura reaccional foi mantida a esta temperatura durante 3 h e, em seguida, deixada durante a noite à temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se HCl 2 M (1000 mL) e extraiu-se com éter dietílico. A fase orgânica foi separada, seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e evaporada a pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo. Rendimento: 26,63 g (143 mmol; 79%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,22 (6H, m, 2 CH<sub>3</sub> (Et), forma *ceto* + *enol*); 2,13 (3H, s, CH<sub>3</sub>-C=O forma *enol*); 2,15 (3H, s, CH<sub>3</sub>-C=O, forma *enol*); 2,24 (6 H, s, 2 CH<sub>3</sub>-C=O forma *ceto*); 2,84 (2H, d, CH<sub>2</sub>COOEt, forma *enol*); 3,22 (2H, s, CH<sub>2</sub>COOEt, forma *ceto*); 4,12 (4H, m, COOCH<sub>2</sub>, forma *enol* + *ceto*).

6.3.1.16. 2-(N-(2-hidroxi-etil)-3,5-dimetilpirazolil)etanoato de etilo, 22<sup>50</sup>

A uma solução de 21 (3,00 g; 16,1 mmol) em etanol absoluto (20 mL), mantida a 0°C, adicionou-se, gota a gota, uma solução de 2-hidroxi-etilhidrazina (1,09 mL; 16,1 mmol) em etanol absoluto (30 mL). A mistura reaccional foi deixada a agitar, à temperatura ambiente, durante a noite. Findo este tempo, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, obtendo-se um sólido de cor laranja. Rendimento: 2,50 g (11,70 mmol; 72%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,22 (3H, t, CH<sub>3</sub> (Et)); 2,16 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,17 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 3,35 (2H, s, pz-CH<sub>2</sub>-COO); 4,03 (6H, m, CH<sub>2</sub>-pz + CH<sub>2</sub>-OH + CH<sub>2</sub> (Et)).

6.3.1.17. 2-(N-(2-Bromoetil)-3,5-dimetilpirazolil)acetato de etilo, 23<sup>50</sup>

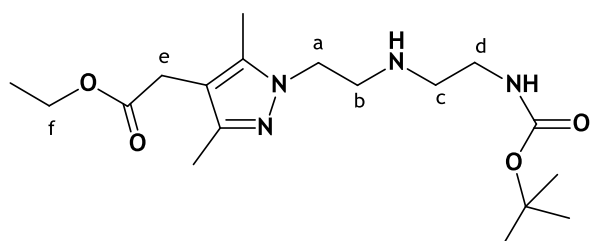
A uma solução de 22 (7,50 g; 35 mmol) em tolueno (150 mL) adicionou-se PBr<sub>3</sub> (6,58 mL; 70 mmol). A mistura foi deixada em refluxo durante a noite. No dia seguinte, após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente foi evaporado tendo-se adicionado CHCl<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O ao resíduo obtido. A fase

orgânica foi separada, seca com  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e evaporada a pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo. Rendimento: 5,57 g (19,02 mmol; 55%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,21 (3H, t,  $\text{CH}_3$  (Et)); 2,17 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,21 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 3,30 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (c)); 3,67 (2H, q,  $\text{CH}_2$ (d)); 4,10 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (b)); 4,33 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (a)).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  9,60 ( $\text{CH}_3$ ); 11,72 ( $\text{CH}_3$ -pz); 13,99 ( $\text{CH}_3$ -pz); 29,56 ( $\text{CH}_2$ ); 30,10 ( $\text{CH}_2$ ); 49,62 ( $\text{CH}_2$ ); 60,54 ( $\text{CH}_2$ ); 109,08 ( $\text{C}_4$ -pz); 137,41 ( $\text{C}_{3/5}$ -pz); 147,20 ( $\text{C}_{3/5}$ -pz); 171,25 (C=O).

### 6.3.1.18. 2-(2-(N-(2-(2-(terc-butoxicarbonilamina)etilamina)etil)-3,5-dimetilpirazolil)acetato de etilo, 24



O composto **24** foi sintetizado como atrás descrito para **10**, a partir de 2,77 g de **23** (9,60 mmol) e 2,31 g de **9** (14,4 mmol). O composto final foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel

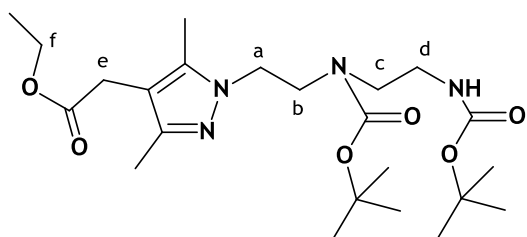
(eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 90/10) e obtido sob a forma de um óleo amarelo pálido. Rendimento: 650 mg (1,75 mmol; 12%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,20 (3H, t,  $\text{CH}_3$ -éster); 1,39 (9H, s, 3- $\text{CH}_3$  (BOC)); 2,14 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,16 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,36 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (b)); 2,70 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (d)); 2,98 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (c)); 3,16 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (e)); 4,00 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (a)); 4,05 (2H, q,  $\text{CH}_2$ -éster); 5,17 (1H, bs, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  8,93 ( $\text{CH}_3$ ); 11,07 ( $\text{CH}_3$ -pz); 13,42 ( $\text{CH}_3$ -pz); 27,65 ( $\text{CH}_3$ -BOC); 28,93 ( $\text{CH}_2$ ); 39,23 ( $\text{CH}_2$ ); 47,52 ( $\text{CH}_2$ ); 47,86 ( $\text{CH}_2$ ); 59,93 ( $\text{CH}_2$ ); 76,38 ( $\text{CH}_2$ ); 78,38 (C-BOC); 108,36 ( $\text{C}_4$ -pz); 136,65 ( $\text{C}_{3/5}$ -pz); 145,82 ( $\text{C}_{3/5}$ -pz); 155,48 (C=O; BOC); 170,80 (C=O).

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 90:10) = 0,38.

### 6.3.1.19. 2-(2-((N-(2-(2-(terc-butoxicarbonil)etil(terc-butoxicarbonilamino)etilamina))) -3,5-dimetilpirazolil)acetato de etilo, 25



A uma solução de **24** (650 mg; 1,75 mmol) em THF seco (25 mL), mantida a 0 °C, adicionou-se lentamente e sob  $\text{N}_2$ , uma solução de dicarbonato de di-terc-butilo (382 mg; 1,75 mmol) em THF seco (25 mL). A mistura

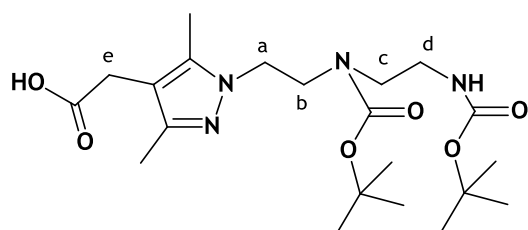
resultante foi deixada em agitação à temperatura ambiente, durante a noite. No dia

seguinte o solvente foi evaporado, tendo-se adicionado  $\text{CHCl}_3$  e uma solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ao resíduo obtido. A fase orgânica foi separada, seca com  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e evaporada a pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo. Rendimento: 820 mg (1,75 mmol; 99%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,21 (3H, t,  $\text{CH}_3$ -éster); 1,39 (18H, m,  $(3\text{-CH}_3)_2$  (2 BOC)); 2,16 (3H, m,  $2\text{CH}_3$ -pz); 3,00 (4H, m,  $\text{CH}_2(\text{b}) + \text{CH}_2(\text{d})$ ); 3,29 (2H, s,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 3,50 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 4,07 (4H, m,  $\text{CH}_2(\text{a}) + \text{CH}_2$ -éster); 4,80 (1H, bs, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  8,81 ( $\text{CH}_3$ ); 11,22 ( $\text{CH}_3$ -pz); 13,60 ( $\text{CH}_3$ -pz); 26,72 ( $\text{CH}_3$ -BOC); 27,81 ( $\text{CH}_3$ -BOC); 29,15 ( $\text{CH}_2$ ); 38,73 ( $\text{CH}_2$ ); 46,23 ( $\text{CH}_2$ ); 47,62 ( $\text{CH}_2$ ); 59,98 ( $\text{CH}_2$ ); 78,13 (C-BOC); 84,38 ( $\text{CH}_2$ ); 108,62 ( $\text{C}_4$ -pz); 137,22 ( $\text{C}_{3/5}$ -pz); 146,12 ( $\text{C}_{3/5}$ -pz); 154,79 (C=O; BOC); 155,53 (C=O; BOC); 170,79 (C=O).

### 6.3.1.20. Ácido 2-(2-((N-(2-(2-(terc-butoxicarbonil)etil(terc-butoxicarbonilamino)etilamina)))-3,5-dimetilpirazolil)acético, 26



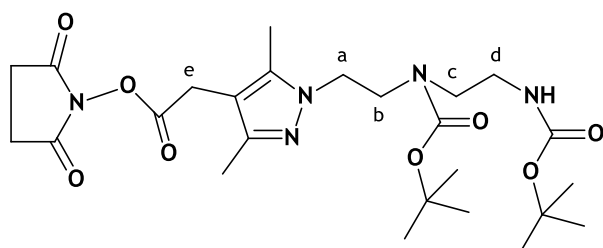
O composto **26** foi sintetizado como atrás descrito para **12**, a partir de 830 mg de **25** (1,75 mmol). Após evaporação do solvente, o composto foi recuperado por extracção com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , a fim de remover os sais. Rendimento:

749 mg (1,69 mmol; 97%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,37 (18H, m,  $(3\text{-CH}_3)_2$  (2 BOC)); 2,11 (3H, m,  $2\text{CH}_3$ -pz); 2,97 (4H, m,  $\text{CH}_2(\text{b}) + \text{CH}_2(\text{d})$ ); 3,29 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 3,47 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 4,09 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  9,14 ( $\text{CH}_3$ -pz); 10,53 ( $\text{CH}_3$ -pz); 28,09 ( $\text{CH}_3$ -BOC); 29,13 ( $\text{CH}_3$ -BOC); 29,44 ( $\text{CH}_2$ ); 39,16 ( $\text{CH}_2$ ); 45,63 ( $\text{CH}_2$ ); 47,78 ( $\text{CH}_2$ ); 77,43 ( $\text{CH}_2$ ); 80,03 (C-BOC); 109,69 ( $\text{C}_4$ -pz); 137,45 ( $\text{C}_{3/5}$ -pz); 147,55 ( $\text{C}_{3/5}$ -pz); 155,27 (C=O; BOC); 155,98 (C=O; BOC); 1740,44 (C=O).

### 6.3.1.21. 2-(1-(2-((terc-butoxicarbonil)(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)acetato de 2,5-dioxopirrolidina, 27



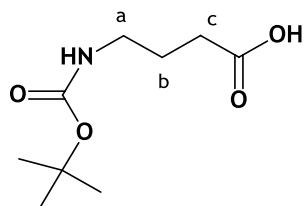
A uma solução de **26** (400 mg; 0,90 mmol) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (15 mL), mantida a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , adicionou-se, sob  $\text{N}_2$ , N-hidroxissuccinimida (115 mg; 0,99 mmol). A solução foi deixada a agitar a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 min.

Seguidamente a esta temperatura foi adicionada EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (190 mg; 0,99 mmol). A mistura resultante foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 72 h. Ao fim deste tempo, adicionou-se H<sub>2</sub>O à mistura reaccional. A fase orgânica foi separada, seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e evaporada a pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo. Rendimento: 478 mg (0,83 mmol; 93%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,37 (18H, m, (3-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 BOC)); 2,13 (3H, m, 2CH<sub>3</sub>-pz); 2,77 (4H, s, 2-CH<sub>2</sub>(NHS)) 2,85 (4H, m, CH<sub>2</sub>(b) + CH<sub>2</sub>(d)); 3,48 (2H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 3,60 (2H, m, CH<sub>2</sub>(c)); 4,09 (2H, m, CH<sub>2</sub>(a)).

**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 9,10 (CH<sub>3</sub>-pz); 11,41 (CH<sub>3</sub>-pz); 25,25 (CH<sub>2</sub>-NHS); 26,21 (CH<sub>2</sub>); 28,00 (CH<sub>3</sub>-BOC); 28,09 (CH<sub>3</sub>-BOC); 39,03 (CH<sub>2</sub>); 46,64 (CH<sub>2</sub>); 47,79 (CH<sub>2</sub>); 78,69 (CH<sub>2</sub>); 79,92 (C-BOC); 106,48 (C<sub>4</sub>-pz); 138,17 (C<sub>3/5</sub>-pz); 146,75 (C<sub>3/5</sub>-pz); 155,09 (C=O, BOC); 155,51 (C=O, BOC); 166,27 (C=O, NHS); 168,88 (C=O).

#### 6.3.1.22. Ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino)butanóico, **28**<sup>236</sup>

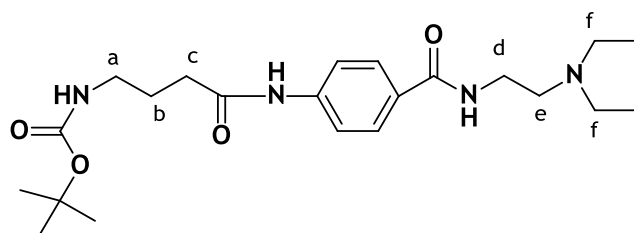


A uma solução aquosa de ácido 4-aminobutírico (1,00 g; 9,70 mmol) em NaHCO<sub>3</sub> 1 M (23 mL) foi adicionada, gota a gota e a 0 °C, uma solução de dicarbonato de di-terc-butilo (2,117 g; 9,70 mmol) em dioxano (23 mL). A mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte o pH foi

ajustado a 2-3 com HCl 2 M mantendo a mistura reaccional a 0 °C. Seguidamente extraiu-se a mistura com acetato de etilo. A fase orgânica foi separada, seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e evaporada a pressão reduzida, obtendo-se um óleo transparente. Rendimento: 2,250 g (7,94 mmol; 82%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,44 (9H, s, 3-CH<sub>3</sub>(BOC)); 1,83 (2H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 2,41 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 3,19 (2H, t, CH<sub>2</sub>(c)); 4,70 (1H, bs, NH).

#### 6.3.1.23. 4-(4-(2-(dietilamino)etilcarbamoil)fenilcarbamoil)butilcarbamoilato de terc-butilo, **29**

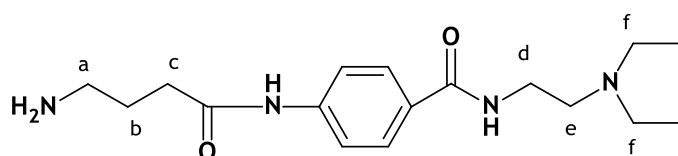


O composto **29** foi sintetizado como atrás descrito para **13**, a partir de 2,00 g de **28** (7,06 mmol) e 1,44 g de pronacamida (5,30 mmol). A mistura foi deixada a refluxar durante 48 h. O

composto final foi obtido após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: MeOH, 100%) e obtido sob a forma de um óleo amarelo pálido. Rendimento: 1,114 g (2,68 mmol; 50%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  0,97 (3H, t,  $2\text{CH}_3$ ); 1,38 (9H, s,  $3\text{CH}_3(\text{BOC})$ ); 1,80 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 2,34 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 2,50 (4H, q,  $2\text{CH}_2(\text{f})$ ); 2,58 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 3,14 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 3,42 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 5,12 (1H, bs, NH); 7,06 (1H, bs, NH); 7,66 (4H, m,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ).  
 $R_f$  (sílica-gel, MeOH) = 0,30.

#### 6.3.1.24. 4-(4-(aminobutanoiloxiamino)-N-(2-dietilamino)etil)benzamida, 30

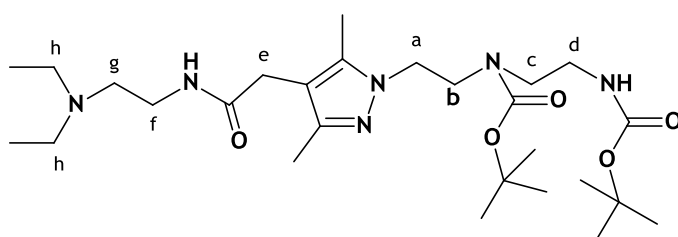


A uma solução de **29** (1,114 mg; 2,68 mmol) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) adicionou-se TFA (5 mL; 65 mmol). A mistura reaccional foi deixada a agitar

durante a noite à temperatura ambiente. Seguidamente o solvente foi evaporado sob vácuo, obtendo-se um óleo amarelo. Rendimento: 773 mg (2,41 mmol; 90%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,26 (3H, t,  $2\text{CH}_3$ ); 1,95 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 2,50 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 2,96 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 3,24 (4H, q,  $2\text{CH}_2(\text{f})$ ); 3,32 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 3,68 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 7,62 (2H, m,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ); 7,75 (2H, m,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ).

#### 6.3.1.25. N-(2-(terc-butoxicarbonil))((2-(4-(((2-(diethylamino)etil)carbamoil)metil)-3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)etil)carbamato de terc-butilo, 31

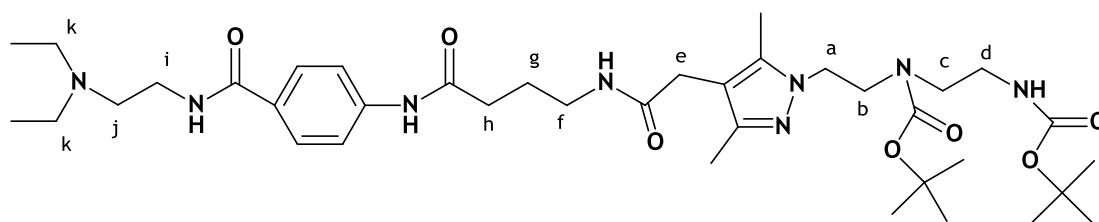


A uma solução de **27** (400 mg; 0,67 mmol) em DMF seca (25 mL) adicionou-se 2-aminoetildietilamina (103  $\mu\text{L}$ ; 0,73 mmol) e diisopropiletilenodiamina (DIPEA)

(183  $\mu\text{L}$ ; 1,05 mmol). A mistura resultante foi deixada a agitar durante cerca de 24 h à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, procedeu-se à evaporação a pressão reduzida do solvente. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 88/10/2). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo amarelo pálido. Rendimento: 340 mg (0,62 mmol; 91%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  0,86 (6H, m,  $2\text{CH}_3$ ); 1,34 (18H, m,  $(3\text{-CH}_3)_2$  (2 BOC)); 2,10 (6H, m,  $2\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,51 (8H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})+\text{CH}_2(\text{d})+\text{CH}_2(\text{g})+\text{CH}_2(\text{f})$ ); 3,24 (6H, m,  $(\text{CH}_2(\text{e})+2\text{CH}_2(\text{h}))$ ); 3,49 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 4,09 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ).

**6.3.1.26. N-(2-((terc-butoxicarbonil)(2-(4-(((3-((4-((2-dietilamino)etil)fenil)carbamoil)propil)carbamoil)metil)-3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)etil)carbamato de terc-butilo, 32**



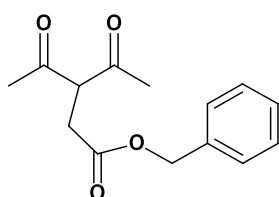
O composto **32** foi sintetizado como atrás descrito para **31**, a partir de 333 mg de **27** (0,58 mmol) e 186 mg de **31** (0,58 mmol). O produto resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 80/18/2) e obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 70 mg (0,094 mmol; 16%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  0,97 (6H, t,  $2\text{CH}_3$ ); 1,25 (9H, s, 3  $\text{CH}_3$  (BOC)); 1,39 (9H, s, 3  $\text{CH}_3$  (BOC)); 1,78 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 2,05 (3H, s,  $2\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,11 (3H, s,  $2\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,29 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 2,51 (4H, q, 2  $\text{CH}_2(\text{k})$ ); 2,58 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ); 3,39 (12H, m, 6- $\text{CH}_2$ ); 4,09 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 6,61 (1H, bs, NH); 6,83 (1H, bs, NH); 6,97 (1H, bs, NH); 7,69 (4H, s,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ); 9,87 (1H, bs, NH-BOC).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  9,12 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 9,87 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 11,85 ( $\text{CH}_3$ ); 21,14 ( $\text{CH}_2$ ); 28,39 ( $\text{CH}_3\text{-BOC}$ ); 28,79 ( $\text{CH}_3\text{-BOC}$ ); 31,57 ( $\text{CH}_2$ ); 34,91 ( $\text{CH}_2$ ); 37,47 ( $\text{CH}_2$ ); 38,47 ( $\text{CH}_2$ ); 39,62 ( $\text{CH}_2$ ); 47,04 ( $\text{CH}_2$ ); 48,09 ( $\text{CH}_2$ ); 51,56 ( $\text{CH}_2$ ); 77,56 ( $\text{CH}_2$ ); 79,28 ( $\text{C}_{\text{central-BOC}}$ ); 79,94 ( $\text{C}_{\text{central-BOC}}$ ); 109,98 ( $\text{C}(\text{H}_4\text{-pz})$ ); 119,32 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 128,00 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 129,74 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 138,11 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 141,87 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5\text{-pz}}$ )); 146,50 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5\text{-pz}}$ )); 155,79 ( $\text{C}=\text{O}$ , BOC); 156,44 ( $\text{C}=\text{O}$ , BOC); 167,09 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 171,79 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 173,11 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 80/18/2) = 0,64.

**6.3.1.27. 3-acetil-4-oxopentanoato de benzilo, 33**

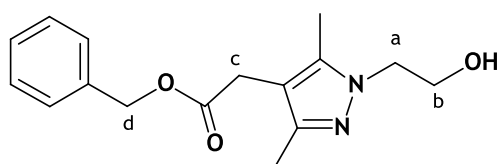


O composto **33** foi sintetizado e purificado como atrás descrito para **21**, a partir de 7,50 mL de acacH (72 mmol) e 11,36 mL de bromoacetato de benzilo (72 mmol). Rendimento: 16,000 g (65 mmol; 90%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  2,11 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C=O}$  forma *enol*); 2,14 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C=O}$ , forma *enol*); 2,23 (6 H, s, 2  $\text{CH}_3\text{-C=O}$  forma *ceto*); 2,91 (2H, d,  $\text{CH}_2\text{COOEt}$ , forma *enol*); 3,28 (2H, d,  $\text{CH}_2\text{COOEt}$ , forma *ceto*); 5,09 (4H, m,  $\text{COOCH}_2$ , forma *enol* + *ceto*); 7,32 (10H, m, benzilo, forma *ceto+enol*).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  23,08 ( $\text{CH}_3\text{-enol}$ ); 25,91 ( $\text{CH}_3\text{-enol}$ ); 29,39 ( $\text{CH}_3\text{-ceto}$ ); 32,24 ( $\text{CH}_2\text{-ceto}$ ); 36,58 ( $\text{CH}_2\text{-enol}$ ); 62,76 ( $\text{CH-ceto}$ ); 66,59 ( $\text{CH}_2\text{-Bz-ceto+enol}$ ); 104,02 ( $\text{C-enol}$ ); 127,99-128,38 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 170,62 ( $\text{C=O}$ , *enol*); 170,83 ( $\text{C=O}$ , *ceto*); 191,71 ( $\text{C=O}$ , *enol*); 202,29 ( $\text{C=O}$ , *ceto*).

### 6.3.1.28. 2-(N-(2-hidroxietyl)-3,5-dimetilpirazolil)etanoato de benzilo, 34

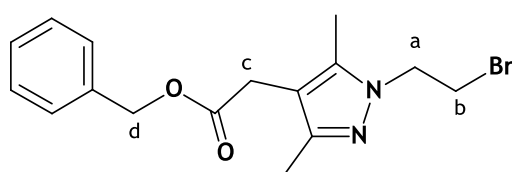


O composto **34** foi sintetizado e purificado como atrás descrito para **22**, a partir de 9,00 g de **33** (36 mmol) e 2,46 mL de 2-hidroxiethylhidrazina (36 mmol). Rendimento: 5,000 g (36 mmol; 98%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  2,17 (6H, s, 2  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 3,37 (2H, s,  $\text{CH}_2$  (c)); 3,92 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (a)); 4,01 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (b)); 5,09 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (d)); 7,31 (5H, m, benzilo).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  9,61 ( $\text{CH}_3$ ); 11,73 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 29,55 ( $\text{CH}_2$ ); 50,04 ( $\text{CH}_2$ ); 61,51 ( $\text{CH}_2$ ); 66,53 ( $\text{CH}_2$ ); 108,75 ( $\text{C}_4\text{-pz}$ ); 126,86-128,48 ( $\text{C}_{\text{aromáticos}}$ ); 137,77 ( $\text{C}_{3/5}\text{-pz}$ ); 146,74 ( $\text{C}_{3/5}\text{-pz}$ ); 171,38 ( $\text{C=O}$ ).

### 6.3.1.29. 2-(N-(2-bromoetyl)-3,5-dimetilpirazolil)etanoato de benzilo, 35



A uma solução de **34** (9,527 g; 36 mmol) em THF seco (70 mL) adicionou-se  $\text{CBr}_4$  (21,89 g; 66 mmol) e uma solução de trifenilfosfina (19,04 g; 73 mmol) em THF seco (70 mL) a 0 °C e sob  $\text{N}_2$ .

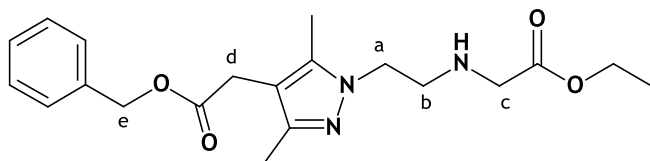
Após adição dos reagentes, a mistura reaccional resultante foi mantida à temperatura ambiente e deixada em agitação durante a noite. No dia seguinte, após evaporação do solvente, o resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 95/5). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo transparente. Rendimento: 3,24 g (10,50 mmol; 30%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  2,15 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,18 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 3,37 (2H, s,  $\text{CH}_2$  (c)); 3,63 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (b)); 4,29 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (a)); 5,08 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (d)); 7,31 (5H, m, benzilo).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_c$  9,99 ( $\text{CH}_3$ ); 10,18 ( $\text{CH}_3$ -pz); 29,81 ( $\text{CH}_2$ ); 29,94 ( $\text{CH}_2$ ); 49,44 ( $\text{CH}_2$ ); 67,03 ( $\text{CH}_2$ ); 111,19 ( $\text{C}_4$ -pz); 128,18-131,99 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 135,01 ( $\text{C}_{3/5}$ -pz); 145,33 ( $\text{C}_{3/5}$ -pz); 169,34 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5)) = 0,78.

### 6.3.1.30. 2-(N-(2-(2-etoxicarboniletilamino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)etanoato de benzilo, 36



O composto **36** foi sintetizado como atrás descrito para **17**, a partir de 1,63 g de **35** (5,25 mmol) e 1,10 g de glicinato de etilo (7,88 mmol), com

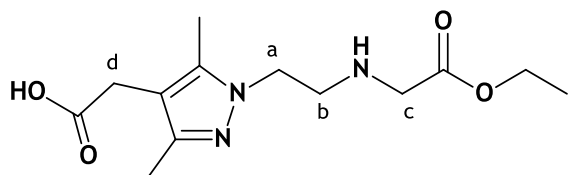
refluxo da mistura reaccional durante a noite. O produto final foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 95/5), obtendo-se um óleo amarelo. Rendimento: 900 mg (2,42 mmol; 46%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_H$  1,26 (3H, t,  $\text{CH}_3$ -éster); 2,18 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,19 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 3,02 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (b)); 3,38 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (d)); 3,39 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (c)); 4,07 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (a)); 4,16 (2H, q,  $\text{CH}_2$ (éster)); 5,12 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (e)); 7,34 (5H, m, benzilo).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_c$  10,03 ( $\text{CH}_3$ ); 12,15 ( $\text{CH}_3$ ); 14,45 ( $\text{CH}_3$ ); 30,07 ( $\text{CH}_2$ ); 49,01 ( $\text{CH}_2$ ); 49,22 ( $\text{CH}_2$ ); 51,02 ( $\text{CH}_2$ ); 61,03 ( $\text{CH}_2$ ); 66,76 ( $\text{CH}_2$ ); 109,13 ( $\text{C}$ -( $\text{H}_4$ -pz)); 128,35 ( $\text{C}$ -benzilo); 128,47 ( $\text{C}$ -benzilo); 129,00 ( $\text{C}$ -benzilo); 136,14 ( $\text{C}$ -benzilo); 137,60 ( $\text{C}$ -( $\text{H}_{3/5}$ -pz)); 146,96 ( $\text{C}$ -( $\text{H}_{3/5}$ -pz)); 171,64 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 172,43 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 95:5) = 0,38.

### 6.3.1.31. Ácido 2-(N-(2-(2-etoxicarboniletilamino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)acético, 37

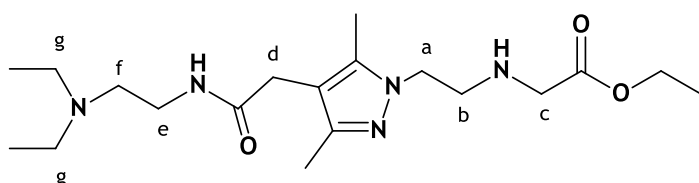


O composto **37** foi sintetizado e purificado como atrás descrito para **18**, a partir de 900 mg de **36** (2,42 mmol). Rendimento: 630 mg (2,22 mmol; 92%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_H$  1,24 (3H, t,  $\text{CH}_3$ -éster); 2,03 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,13 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 3,24 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (c)); 3,28 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (b)); 3,79 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (d)); 4,14 (2H, q,  $\text{CH}_2$ (éster)); 4,22 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (a)).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_c$  9,54 ( $\text{CH}_3$ ); 11,84 ( $\text{CH}_3$ ); 14,41 ( $\text{CH}_3$ ); 30,53 ( $\text{CH}_2$ ); 45,67 ( $\text{CH}_2$ ); 48,83 ( $\text{CH}_2$ ); 53,28 ( $\text{CH}_2$ ); 63,19 ( $\text{CH}_2$ ); 112,27 ( $\text{C}$ -( $\text{H}_4$ -pz)); 139,68 ( $\text{C}$ -( $\text{H}_{3/5}$ -pz)); 148,74 ( $\text{C}$ -( $\text{H}_{3/5}$ -pz)); 169,41 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 176,58 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

### 6.3.1.32. Acetato de 2-(2-(4-(2-(2dietilamino)etilamino)2-oxoetil)-3,5-dimetipirazol)etilanimino) etilo, 38



O composto **38** foi sintetizado como atrás descrito para **13**, a partir de 238 mg de **37** (0,84 mmol) e 130  $\mu$ L de 2-

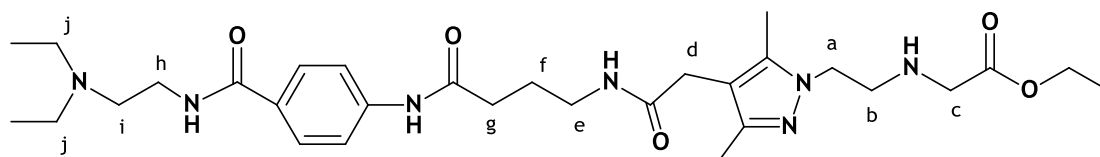
aminoetildietilamina (0,92 mmol) com refluxo da mistura reaccional durante a noite. O composto final foi obtido após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 80/18/2) e obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 108 mg (0,28 mmol; 34%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  0,79 (6H, t, 2  $\text{CH}_3$ ); 1,16 (3H, t,  $\text{CH}_3$ -éster); 2,06 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,09 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,35 (6H, m,  $\text{CH}_2(\text{f}) + 2 \text{CH}_2(\text{g})$ ); 2,92 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 3,12 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 3,19 (2H, s,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 3,29 (2H, s,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 4,01 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 4,08 (2H, q,  $\text{CH}_2(\text{éster})$ ); 6,16 (1H, s, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  9,85 ( $\text{CH}_3$ ); 12,12 ( $\text{CH}_3$ ); 14,39 ( $\text{CH}_3$ ); 31,86 ( $\text{CH}_2$ ); 37,06 ( $\text{CH}_2$ ); 46,84 ( $\text{CH}_2$ ); 48,96 ( $\text{CH}_2$ ); 49,15 ( $\text{CH}_2$ ); 50,89 ( $\text{CH}_2$ ); 51,47 ( $\text{CH}_2$ ); 60,97 ( $\text{CH}_2$ ); 109,95 (C-( $\text{H}_{4\text{-pz}}$ )); 137,64 (C-( $\text{H}_{3/5\text{-pz}}$ )); 146,96 (C-( $\text{H}_{3/5\text{-pz}}$ )); 170,97 (C=O); 172,36 (C=O).

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (85/13/2)) = 0,53.

### 6.3.1.33. 2-(2-(4-(2-(4-(4-(2-dietilamino)etilcarbamoil)fenil)carbamoil)butil)-3,5-dimetipirazolil)etilanimino)etanoato de etilo, 39

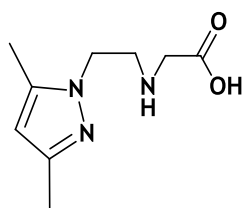


O composto **39** foi sintetizado como atrás descrito para **13**, a partir de 450 mg de **37** (1,60 mmol) e 509 mg de **30** (1,60 mmol), com refluxo da mistura reaccional durante 48 h. O composto final foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , com gradiente de 90/8/2 0/98/2) e obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 100 mg (0,17 mmol; 10%).

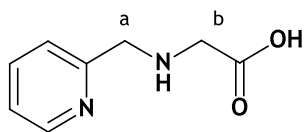
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,16 (9H, t, 2- $\text{CH}_3$ + $\text{CH}_3(\text{éster})$ ); 1,78 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 2,11 (3H, s, 2 $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,14 (3H, s, 2 $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,32 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 2,94 (8H, m, 4  $\text{CH}_2$ ); 3,31 (4H, m, 2- $\text{CH}_2$ ); 3,61 (4H, m, 2- $\text{CH}_2$ ); 4,09 (4H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})+\text{CH}_2(\text{éster})$ ); 7,71 (4H, m,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ).

**ESI/MS (+)** (m/z): 586,3 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , calculada para  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_7\text{O}_5 = 586,3$ .

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (85/13/2)) = 0,63.

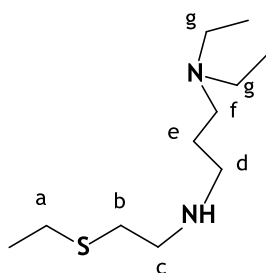
6.3.1.34. Ácido 2-(2-(3,5-dimetilpirazol)etilamino)acético, 40<sup>55</sup>

A uma solução de **8** (0,745 g; 3,7 mmol) em etanol (20 mL) foi adicionada uma solução de glicina (1,400 g; 18,5 mmol) em H<sub>2</sub>O (15 mL) e o pH foi ajustado a 10 com NaOH 5 M. A mistura foi deixada a refluxar durante 4 dias, mantendo o pH entre 8-10 através da adição de NaOH 5 M ao longo do tempo. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente foi removido sob vácuo e o produto purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: MeOH/NH<sub>4</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>, com gradiente de 10/2/88 a 98/2/0). O produto foi obtido sob a forma de um sólido branco. Rendimento: 400 mg (2,1 mmol; 56%).  
**RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 2,11 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,25 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 3,45 (2H, t, CH<sub>2</sub>-NH); 3,57 (2H, s, CH<sub>2</sub>-COO); 4,37 (2H, t, CH<sub>2</sub>-pz); 5,84 (1H, s, H4-pz).  
*R<sub>f</sub>* (sílica-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/ NH<sub>4</sub>OH, 78/20/2) = 0,47.

6.3.1.35. Ácido 2-((2-piridina)metilamino)acético, 41<sup>237</sup>

A uma solução de 2-picolilamina (2,23 mL; 21,6 mmol) em H<sub>2</sub>O (25 mL), mantida a 0 °C, foi adicionada uma solução de ácido bromoacético (1,00 g; 7,20 mmol) em H<sub>2</sub>O (25 mL), gota a gota. Seguidamente foi adicionado NaOH 8 M (3,6 mL; 28,8 mmol), gota a gota. A mistura foi deixada a agitar durante a noite à temperatura ambiente. No dia seguinte o pH foi ajustado a 5-6 e o solvente foi evaporado. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, com gradiente de 70/28/2 a 0/96/4). O produto foi obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 1,300 g (7,2 mmol; 98%).  
**RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 3,66 (2H, s, CH<sub>2</sub>(b)); 4,43 (2H, s, CH<sub>2</sub>(a)); 7,42 (1H, m, H<sub>py</sub>); 7,50 (1H, m, H<sub>py</sub>); 7,87 (1H, m, H<sub>py</sub>); 8,62 (1H, m, H<sub>py</sub>).  
**RMN** <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 50,31 (CH<sub>2</sub>(a)); 51,62 (CH<sub>2</sub>(b)); 124,35 (C<sub>py</sub>); 124,92 (C<sub>py</sub>); 138,72 (C<sub>py</sub>); 150,51 (C<sub>py</sub>); 152,98 (C<sub>py</sub>); 171,4 (C=O).  
**ESI/MS (+) (m/z):** 167,1 [M+H]<sup>+</sup>, calculada para C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 167,1.  
*R<sub>f</sub>* (sílica-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (70/28/2)) = 0,14.

## 6.3.1.36. N,N-dietil-N-3-((2-(etiltio)etil)amino)propilamina, 42



O composto 42 foi sintetizado como atrás descrito para 10, a partir de 467  $\mu\text{L}$  de 2-cloroetil-etilsulfano (4,02 mmol) e 634  $\mu\text{L}$  de N,N-dietilpropano-1,3-diamina (4,02 mmol), com refluxo da mistura reaccional durante a noite. 42 foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 85/13/2). O produto foi obtido sob a forma

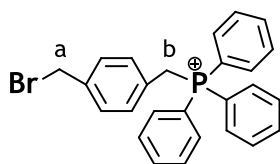
de um óleo amarelo. Rendimento: 348 mg (1,59 mmol; 40%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  0,93 (6H, t, 2- $\text{CH}_3$ ); 1,17 (3H, t,  $\text{CH}_3$ -S); 1,57 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (e)); 2,47 (8H, m, 4-  $\text{CH}_2$  (2  $\text{CH}_2$ (g)+ $\text{CH}_2$ (f)+ $\text{CH}_2$ (d)); 2,59 (4H, m, 2- $\text{CH}_2$ ( $\text{CH}_2$ (b)+ $\text{CH}_2$ (a)); 2,71 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (c)).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  11,77 ( $\text{CH}_3$ ); 15,03 ( $\text{CH}_3$ -enxofre); 25,92 ( $\text{CH}_2$ (a)); 27,30 ( $\text{CH}_2$ (e)); 31,95 ( $\text{CH}_2$ (b)); 46,97 ( $\text{CH}_2$ (d)); 48,55 ( $\text{CH}_2$ (g)); 48,76 ( $\text{CH}_2$ (f)); 51,28 ( $\text{CH}_2$ (c)).

**ESI/MS (+) (m/z)**: 219,0 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{S}$  = 219,2.

$R_f$  (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (85/13/2)) = 0,78.

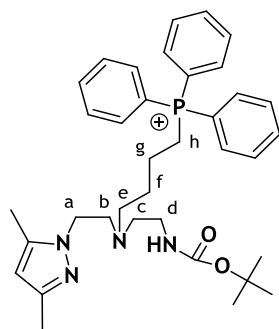
6.3.1.37. Brometo de (4-(bromometil)benzil)trifenilfosfônio, 44<sup>168</sup>

A uma solução de  $\alpha, \alpha$ -dibromometil-*p*-xileno (1,005 g; 3,81 mmol) em 12 mL de tolueno adicionou-se, a 100  $^{\circ}\text{C}$ , uma solução de trifenilfosfina (1,000 g; 3,81 mmol) em 10 mL de tolueno, gota a gota. A mistura reaccional foi deixada durante a noite em agitação

constante à temperatura de 100  $^{\circ}\text{C}$ . Ao fim deste tempo e após arrefecimento à temperatura ambiente, ocorreu a precipitação de um sólido branco que foi recuperado por filtração. Após lavagem com tolueno e éter dietílico, este sólido foi seco sob vácuo. Rendimento: 1,996 g (3,80 mmol; 99%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  4,34 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (a)); 5,43 (2H, d,  $\text{CH}_2$ (b)); 7,09 (4H, s,  $\text{H}_{\text{benzilo}}$ ); 7,55-7,74 (15H, m,  $\text{H}_{\text{PPH}_3}$ ).

**6.3.1.38. Brometo de (4-((2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)butil)trifenilfosfônio, 45**



A uma solução de **10** (668 mg; 2,34 mmol) em DMF seca (25 mL), adicionou-se brometo de (4-bromobutil)trifenilfosfônio (934 mg; 1,95 mmol) e NEt<sub>3</sub> (546 µL; 3,90 mmol). A mistura reaccional foi deixada à temperatura ambiente durante 72 h. Após remoção do solvente sob vácuo, adicionou-se CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. A fase orgânica foi separada e concentrada sob vácuo. Seguidamente o composto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95/5). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 850 mg (1,25 mmol; 64%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,23 (9H, s, BOC); 1,44 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 1,61 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 1,96 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,03 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,35 (4H, m, 2 CH<sub>2</sub>); 2,64 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 2,86 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 3,52 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 3,79 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 5,15 (1H, s, H<sub>4-pz</sub>); 7,55-7,73 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 11,04 (CH<sub>3</sub>-pz); 13,07 (CH<sub>3</sub>-pz); 20,00 (d, J<sub>P-C</sub> = 13 Hz, CH<sub>2</sub>); 22,82 (d, J<sub>P-C</sub> = 46 Hz, CH<sub>2</sub>); 26,70 (d, J<sub>P-C</sub> = 18 Hz, CH<sub>2</sub>); 28,07 (CH<sub>3</sub>-BOC); 38,14 (CH<sub>2</sub>); 44,33 (CH<sub>2</sub>); 46,77 (CH<sub>2</sub>); 53,25 (CH<sub>2</sub>); 54,15 (CH<sub>2</sub>); 78,31 (C<sub>quat</sub>-BOC); 104,35 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 117,51 (d, J<sub>P-C</sub> = 85 Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 130,18 (d, J<sub>P-C</sub> = 12 Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 133,26 (d, J<sub>P-C</sub> = 9,8 Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 135,34 (d, J<sub>P-C</sub> = 3,7 Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 138,82 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 146,62 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 155,80 (C=O).

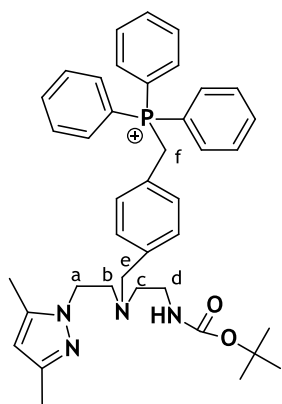
**RMN <sup>31</sup>P** (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>P</sub> 23,88.

**Análise Elementar:** C, 63,58; H, 6,86; N, 8,35; C<sub>36</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>PBr requer C, 63,60; H, 7,12; N, 8,25.

**ESI/MS (+) (m/z):** 599,4 [M]<sup>+</sup> calculada para C<sub>36</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>P = 599,4.

**R<sub>f</sub>** (sílica-gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (90/10)) = 0,42.

### 6.3.1.39. Brometo de 4-(((2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)metil)benzil)trifenilfosfônio, 46



O composto **46** foi sintetizado e purificado como atrás descrito para **45**, a partir de 709 mg de **10** (2,49 mmol) e 1,310 g de **44** (2,49 mmol). Rendimento: 858 mg (1,18 mmol; 47%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,21 (9H, s, BOC); 1,82 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 1,97 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,35 (2H, t, CH<sub>2</sub>(d)); 2,52 (2H, t, CH<sub>2</sub>(c)); 2,91 (2H, t, CH<sub>2</sub>(b)); 3,32 (2H, s, CH<sub>2</sub>(e)); 3,75 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 5,02 (2H, d, CH<sub>2</sub>(f)); 5,42 (1H, bs, NH); 5,51 (1H, s, H<sub>4-pz</sub>); 6,67-6,77 (4H, m, H<sub>benzilo</sub>); 7,43-7,61 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 10,48 (CH<sub>3</sub>-pz); 12,95 (CH<sub>3</sub>-pz); 28,01 (CH<sub>3</sub>-BOC); 30,03 (d, J<sub>P-C</sub> = 47 Hz, CH<sub>2</sub>); 37,94 (CH<sub>2</sub>); 46,15 (CH<sub>2</sub>); 52,71 (CH<sub>2</sub>); 53,18 (CH<sub>2</sub>); 57,62 (CH<sub>2</sub>); 78,23 (C<sub>quaternário</sub>-BOC); 104,52 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 117,12 (d, J<sub>P-C</sub> = 86 Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 125,10 (d, J<sub>P-C</sub> = 8,3 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 128,60 (d, J<sub>P-C</sub> = 2,3 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 129,73 (d, J<sub>P-C</sub> = 12 Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 130,73 (d, J<sub>P-C</sub> = 5 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 133,74 (d, J<sub>P-C</sub> = 10 Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 134,61 (d, J<sub>P-C</sub> = 2,3 Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 138,28 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 139,03 (d, J<sub>P-C</sub> = 3,8 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 146,54 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 155,76 (C=O).

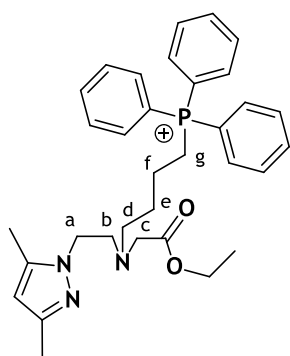
**RMN <sup>31</sup>P** (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>P</sub> 23,67.

**Análise Elementar:** C, 65,92; H, 5,78; N, 7,57; C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>PBr requer C, 66,00; H, 6,65; N, 7,70.

**ESI/MS (+) (m/z):** 647,4 [M]<sup>+</sup> calculada para C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>P = 647,4.

**R<sub>f</sub>** (sílica-gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (90/10)) = 0,56.

### 6.3.1.40. Brometo de 4-((2-(3,5-dimetilpirazol)etil)(2-etoxi-2-oxoetil)amino)butil)trifenilfosfônio, 47



O composto **47** foi sintetizado e purificado como atrás descrito para **45**, a partir de 957 mg de **15** (4,25 mmol) e 2,032 g de brometo de (4-bromobutil)trifenilfosfônio (4,25 mmol). Rendimento: 1,149 g (1,85 mmol; 44%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,09 (3H, t, CH<sub>3</sub>(éster)); 1,53 (2H, m, CH<sub>2</sub>(f)); 1,66 (2H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 1,99 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,00 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,50 (2H, t, CH<sub>2</sub>(d)); 2,78 (2H, t, CH<sub>2</sub>(b)); 3,12 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 3,58 (2H, m, CH<sub>2</sub>(g)); 3,83 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 3,95 (2H, q,

CH<sub>2</sub>(éster)); 5,49 (1H, s, H<sub>4-pz</sub>); 7,56-7,75 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_c$  12,87 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 15,16 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 15,93 ( $\text{CH}_3$ ); 21,64 (d,  $J_{\text{P-C}} = 4,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 23,69 (d,  $J_{\text{P-C}} = 50$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 29,34 (d,  $J_{\text{P-C}} = 17$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 48,82 ( $\text{CH}_2$ ); 55,10 ( $\text{CH}_2$ ); 55,35 ( $\text{CH}_2$ ); 57,22 ( $\text{CH}_2$ ); 62,14 ( $\text{CH}_2$ ); 79,43 ( $\text{CH}_2$ ); 106,44 ( $\text{C}(\text{H}_4\text{-pz})$ ); 119,93 (d,  $J_{\text{P-C}} = 86$  Hz,  $\text{PPh}_3(4)$ ); 132,22 (d,  $J_{\text{P-C}} = 15$  Hz,  $\text{PPh}_3(2)$ ); 135,38 (d,  $J_{\text{P-C}} = 9,8$  Hz,  $\text{PPh}_3(3)$ ); 136,76 (d,  $J_{\text{P-C}} = 2,3$  Hz,  $\text{PPh}_3(1)$ ); 140,92 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 148,83 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 173,10 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

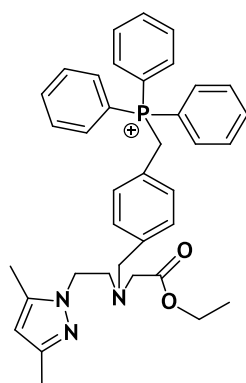
**RMN  $^{31}\text{P}$**  (121,336 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_p$  23,89.

**Análise Elementar:** C, 63,58; H, 5,97; N, 6,89;  $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_2\text{PBr}$  requer C, 63,65; H, 6,64; N, 6,75.

**ESI/MS (+) (m/z):** 542,3  $[\text{M}]^+$  calculada para  $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_2\text{P} = 542,3$ .

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (90/10)) = 0,47.

### 6.3.1.41. Brometo de (4-(((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)(2-etoxi-2-oxoetil)amino)metil)benzil)trifenilfosfônio, 48



O composto **48** foi sintetizado e purificado como atrás descrito para **45**, a partir de 815 mg de **15** (3,62 mmol) e 1,901 g de **44** (3,62 mmol). Rendimento: 524 mg (0,80 mmol; 22%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_H$  1,05 (3H, t,  $\text{CH}_3$ (éster)); 1,96 (6H, s, 2  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,82 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (b)); 3,03 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (c)); 3,52 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (d)); 3,77 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (a)); 3,91 (2H, q,  $\text{CH}_2$ (éster)); 5,07 (2H, d,  $\text{CH}_2$ (f)); 5,55 (1H, bs, NH); 5,51 (1H, s,  $\text{H}_{4\text{-pz}}$ ); 6,82 (4H, s,  $\text{H}_{\text{benzilo}}$ ); 7,42-7,62 (15H, m,  $\text{PPh}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_c$  11,23 ( $\text{CH}_3$ (éster)); 13,69 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 14,43 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 30,64 (d,  $J_{\text{P-C}} = 47$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 47,57 ( $\text{CH}_2$ ); 53,84 ( $\text{CH}_2$ ); 54,60 ( $\text{CH}_2$ ); 58,24 ( $\text{CH}_2$ ); 60,51 ( $\text{CH}_2$ ); 105,05 ( $\text{C}(\text{H}_4\text{-pz})$ ); 117,75 (d,  $J_{\text{P-C}} = 86$  Hz,  $\text{PPh}_3(4)$ ); 126,10 (d,  $J_{\text{P-C}} = 8,3$  Hz,  $\text{C}_{\text{benzilo}}$ ); 129,37 (d,  $J_{\text{P-C}} = 3,0$  Hz,  $\text{C}_{\text{benzilo}}$ ); 130,33 (d,  $J_{\text{P-C}} = 19$  Hz,  $\text{PPh}_3(2)$ ); 131,53 (d,  $J_{\text{P-C}} = 6,0$  Hz,  $\text{C}_{\text{benzilo}}$ ); 134,38 (d,  $J_{\text{P-C}} = 9,3$  Hz,  $\text{PPh}_3(3)$ ); 135,25 (d,  $J_{\text{P-C}} = 3,0$  Hz,  $\text{PPh}_3(1)$ ); 139,20 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 139,43 (d,  $J_{\text{P-C}} = 3,8$  Hz,  $\text{C}_{\text{benzilo}}$ ); 147,35 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 171,26 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

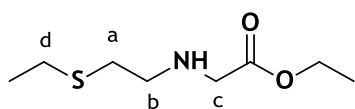
**RMN  $^{31}\text{P}$**  (121,336 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_p$  24,21.

**Análise Elementar:** C, 66,15; H, 5,89; N, 6,59;  $\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_2\text{PBr}$  requer C, 66,25; H, 6,17; N, 6,27.

**ESI/MS (+) (m/z):** 590,3  $[\text{M}]^+$  calculada para  $\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_2\text{P} = 590,3$ .

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (90/10)) = 0,46.

## 6.3.1.42. (2-(2-(etiltio)etilamino)etanoato de etilo, 49



O composto **49** foi sintetizado como atrás referido para **10**, a partir de 3,00 mL de (2-cloroetil)etilsulfano (25,8 mmol) e 3,60 g de 2-aminoacetato de etilo (25,8 mmol), com refluxo

da mistura reaccional durante a noite. O composto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 97/3) e obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 1,847 g (9,66 mmol; 37%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,13 (6H, m, CH<sub>3</sub>(éster)+CH<sub>3</sub>); 2,44 (2H, q, CH<sub>2</sub>(d)); 2,53 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 2,67 (2H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 3,30 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 4,06 (2H, q, CH<sub>2</sub>(éster)).

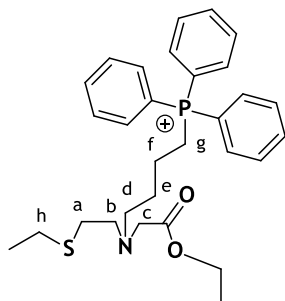
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 13,95 (CH<sub>3</sub>); 14,50 (CH<sub>3</sub>); 25,34 (CH<sub>2</sub>); 31,52 (CH<sub>2</sub>); 47,87 (CH<sub>2</sub>); 50,35 (CH<sub>2</sub>); 60,42 (CH<sub>2</sub>); 171,95 (C=O).

**Análise Elementar:** C, 50,15; H, 9,29; N, 7,27; S, 16,59, C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>S requer C, 50,23; H, 8,96; N, 7,33; S, 16,76.

**ESI/MS (+) (m/z):** 192,0 [M+H]<sup>+</sup> calculada para C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub>S= 192,1.

**R<sub>f</sub>** (sílica-gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (90/10)) = 0,88.

## 6.3.1.43. Brometo de 4-((2-etoxi-2-oxoetil)(2-etiltio)etilamino)butiltrifenilfosfônio, 50



O composto **50** foi sintetizado e purificado como atrás descrito para **45**, a partir de 784 mg de **49** (4,10 mmol) e 1,961 g de brometo de (4-bromobutil)trifenilfosfônio (4,10 mmol). Rendimento: 697 mg (1,18 mmol; 28%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,10 (6H, m, CH<sub>3</sub>(éster)+CH<sub>3</sub>); 1,68 (4H, m, CH<sub>2</sub>(e)+CH<sub>2</sub>(f)); 2,35 (2H, q, CH<sub>2</sub>(h)); 2,40 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 2,57 (4H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(d)); 3,21 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 3,72 (2H, m,

CH<sub>2</sub>(g)); 4,00 (2H, q, CH<sub>2</sub>(éster)); 7,62-7,78 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 14,04 (CH<sub>3</sub>); 14,64 (CH<sub>3</sub>); 19,79 (d, J<sub>P-C</sub>= 9 Hz, CH<sub>2</sub>); 21,65 (d, J<sub>P-C</sub>= 50 Hz, CH<sub>2</sub>); 25,94 (CH<sub>2</sub>); 26,88 (d, J<sub>P-C</sub>= 17 Hz, CH<sub>2</sub>); 29,34 (CH<sub>2</sub>); 52,31 (CH<sub>2</sub>); 53,32 (CH<sub>2</sub>); 54,63 (CH<sub>2</sub>); 60,24 (CH<sub>2</sub>); 118,15 (d, J<sub>P-C</sub>= 84 Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 130,21 (d, J<sub>P-C</sub>= 11 Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 133,51 (d, J<sub>P-C</sub>= 9,8 Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 134,85 (d, J<sub>P-C</sub>= 5,3 Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 171,10 (C=O).

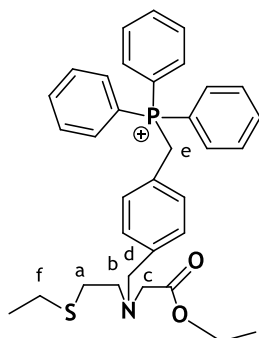
**RMN <sup>31</sup>P** (121,336 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>P</sub> 25,37.

**Análise Elementar:** C, 61,15; H, 6,95; N, 2,45; S, 5,38; C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>2</sub>PSBr requer, C, 61,21; H, 6,68; N, 2,38; S, 5,44.

**ESI/MS (+) (m/z):** 508,3 [M]<sup>+</sup> calculada para C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>2</sub>PS= 508,2.

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (90/10)) = 0,42.

**6.3.1.44. Brometo de (4-(((2-etoxi-2-oxoetil)(2-etiltio)etil)amino)metil)benzil)butil)trifenilfosfônio, 51**



O composto **51** foi sintetizado e purificado como atrás descrito para **45**, a partir de 559 mg de **49** (2,91 mmol) e 1,53 g de **44** (2,91 mmol). Rendimento: 662 mg (1,04 mmol; 36%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,05 (6H, m,  $\text{CH}_3$ (éster)+ $\text{CH}_3$ ); 2,31 (2H, q,  $\text{CH}_2$ (f)); 2,40 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (a)); 2,69 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (b)); 3,13 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (c)); 3,95 (2H, q,  $\text{CH}_2$ (éster)); 5,08 (2H, d,  $\text{CH}_2$ (e)); 6,83 (2H, m,  $\text{H}_{\text{benzilo}}$ ); 6,94 (2H, m,  $\text{H}_{\text{benzilo}}$ ); 7,44-7,64 (15H, m,  $\text{PPh}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  13,90 ( $\text{CH}_3$ (éster)); 14,46 ( $\text{CH}_3$ ); 25,69 ( $\text{CH}_2$ ); 29,25 ( $\text{CH}_2$ ); 30,09 (d,  $J_{\text{P-C}} = 47$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 53,25 ( $\text{CH}_2$ ); 53,69 ( $\text{CH}_2$ ); 57,15 ( $\text{CH}_2$ ); 59,97 ( $\text{CH}_2$ ); 117,17 (d,  $J_{\text{P-C}} = 86$  Hz,  $\text{PPh}_3$ (4)); 125,43 (d,  $J_{\text{P-C}} = 9,1$  Hz,  $\text{C}_{\text{benzilo}}$ ); 128,91 (d,  $J_{\text{P-C}} = 3,0$  Hz,  $\text{C}_{\text{benzilo}}$ ); 129,82 (d,  $J_{\text{P-C}} = 13$  Hz,  $\text{PPh}_3$ (2)); 130,93 (d,  $J_{\text{P-C}} = 6,1$  Hz,  $\text{C}_{\text{benzilo}}$ ); 133,86 (d,  $J_{\text{P-C}} = 9,8$  Hz,  $\text{PPh}_3$ (3)); 134,71 (d,  $J_{\text{P-C}} = 2,3$  Hz,  $\text{PPh}_3$ (1)); 138,93 (d,  $J_{\text{P-C}} = 3,8$  Hz,  $\text{C}_{\text{benzilo}}$ ); 170,72 (C=O).

**RMN  $^{31}\text{P}$**  (121,336 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{P}}$  22,92.

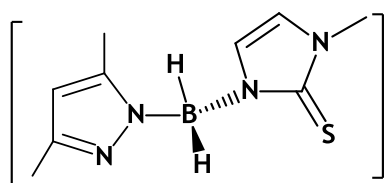
**Análise Elementar:** C, 64,14; H, 6,18; N, 2,20; S, 4,95;  $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{NO}_2\text{PSBr}$  requer: C, 64,19; H, 6,87; N, 2,33; S, 5,10.

**ESI/MS (+) (m/z):** 556,2  $[\text{M}]^+$  calculada para  $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{NO}_2\text{PS} = 556,2$ .

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (90/10)) = 0,51.

### 6.3.2. Síntese e Caracterização dos Ligandos Finais

#### 6.3.2.1. $\text{Na}[\text{H}_2\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{pz})]$ , $\text{L}^1$



- A uma solução de  $\text{Na}[\text{H}_3\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})]$  (200 mg; 1,33 mmol) em THF seco (9 mL) adicionou-se uma solução de 3,5-dimetilpirazolo (128 mg; 1,33 mmol) em THF seco (9 mL), gota a gota e sob  $\text{N}_2$ . A mistura reaccional foi deixada em refluxo durante 24 h. Após remoção do solvente sob vácuo, o composto foi purificado por recristalizações sucessivas em THF/n-hexano, com um aumento progressivo da quantidade de n-hexano. Rendimento: 39% (127 mg; 0,52 mmol).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  2,08 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,21 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 3,41 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-im}$ ); 5,60 (1H, s,  $\text{H}_4\text{-pz}$ ); 6,68 (1H, d,  $J_{\text{H-H}} = 1,9$  Hz, CH); 6,76 (1H, d,  $J_{\text{H-H}} = 2,1$  Hz, CH).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  12,34 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 12,78 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 34,24 ( $\text{CH}_3\text{-tim}$ ); 104,17 ( $\text{C}(\text{H}_4\text{-pz})$ ); 117,64 ( $\text{C}_{\text{tim}}$ ); 123,08 ( $\text{C}_{\text{tim}}$ ); 143,75 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 145,98 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 162,63 ( $\text{C}=\text{S}$ ).

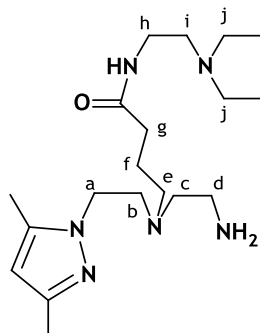
RMN  $^{11}\text{B}$  (96,169 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta_{\text{B}}$  30,2 (t,  $J_{\text{B-H}} = 60$  Hz).

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 2270, 2328 (B-H).

ESI/MS (-) (m/z): 221,1 [ $\text{M}$ ] $^-$  calculada para  $\text{BN}_4\text{C}_9\text{H}_{14}\text{S} = 221,1$  [M].

Análise Elementar: C 44,21; H 6,25; N 22,75,  $\text{NaBN}_4\text{C}_9\text{H}_{14}\text{S}$ , requer C 44,29; H 5,78; N 22,95.

#### 6.3.2.2. 4-(2-aminoetil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)-N-(2-dietilamino)etil)butanamida, $\text{L}^2$



A uma solução de **13** (156 mg; 0,27 mmol) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) adicionou-se TFA (600  $\mu\text{L}$ ; 6,68 mmol). A mistura reaccional foi deixada a agitar 4 h à temperatura ambiente. Seguidamente o solvente foi evaporado sob vácuo e o composto pretendido foi purificado por HPLC, usando uma coluna preparativa Waters  $\mu$  Bondapak C18 (150  $\times$  19 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 220 nm (sistema de eluentes: A - TFA 0,1%; B - MeOH; 0-3 min, 100% A; 3-3,1 min, 100%-75% A; 3,1-9 min, 75% A; 9-9,1 min 75%-66% A; 9,1-20 min, 66%-0% A; 20-25 min, 0% A; 25-25,1 min, 0%-100% A; 25,1-30 min, 100% A ( $t_{\text{R}} = 14,45$  min)). Após purificação,  $\text{L}^2$  foi obtido sob a forma de um óleo transparente. Rendimento: 98 mg (0,270 mmol; 98%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,36 (6H, t, 2  $\text{CH}_3$ ); 1,99 (2H, m,  $\text{CH}_2$  (f)); 2,25 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,35 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,41 (2H, t,  $\text{CH}_2$  (e)); 3,21 (2H, t,  $\text{CH}_2$  (g)); 3,32 (10H, m,  $\text{CH}_2$  (c) +  $\text{CH}_2$  (d) +  $\text{CH}_2$  (i) + 2  $\text{CH}_2$  (j)); 3,46 (2H, m,  $\text{CH}_2$  (b)); 3,57 (2H, t,  $\text{CH}_2$  (h)); 4,43 (2H, t,  $\text{CH}_2$  (a)); 6,00 (1H, s, H(4)-pz).

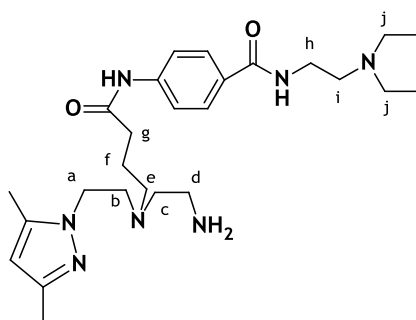
**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  8,97 ( $\text{CH}_3$ ); 10,72 ( $\text{CH}_3$ -pz); 13,08 ( $\text{CH}_3$ -pz); 21,24 ( $\text{CH}_2$  (f)); 33,20 ( $\text{CH}_2$  (g)); 35,57 ( $\text{CH}_2$  (h)); 36,32 ( $\text{CH}_2$  (c)); 44,37 ( $\text{CH}_2$  (a)); 49,58 ( $\text{CH}_2$  (d)); 51,36 ( $\text{CH}_2$  (j)); 52,16 ( $\text{CH}_2$  (i)); 53,95 ( $\text{CH}_2$  (b)); 54,84 ( $\text{CH}_2$  (e)); 107,01 (C( $\text{H}_4$ -pz)); 117,72 ( $\text{C}_{\text{TFA}}$ ), 142,45 (C( $\text{H}_{3/5}$ -pz)), 149,45 (C $_{3/5}$ -pz), 162,61 ( $\text{C}_{\text{TFA}}$ ), 176,22 (C=O).

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1702 (C $\equiv$ O).

**Análise Elementar** C, 39,62; H, 5,00; N, 10,27;  $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O} \cdot 4 \text{CF}_3\text{COOH}$  requer C 39,42; H, 5,15; N, 10,22.

**HR ESI-MS (m/z)**: 367,32606  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O} = 367,31799$ .

### 6.3.2.3. 4-(4-(2-aminoetil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etilo)amino)butanamida)-N-(2-dietilamino)etil)benzamida, $\text{L}^3$



O ligando  $\text{L}^3$  foi sintetizado como atrás descrito para  $\text{L}^2$ , a partir de 41 mg de **14** (0,07 mmol) e 105  $\mu\text{L}$  de TFA (1,28 mmol). Após remoção do solvente,  $\text{L}^3$  foi obtido sob a forma de um óleo transparente. Rendimento: 31 mg (0,052 mmol; 73%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,34 (6H, t, 2  $\text{CH}_3$ ); 2,02 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (f)); 2,15 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,29 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -

pz); 2,56 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (e)); 3,33 (14H, m,  $\text{CH}_2$ (b) +  $\text{CH}_2$ (c) +  $\text{CH}_2$ (d) +  $\text{CH}_2$ (g) +  $\text{CH}_2$ (j) + 2 $\text{CH}_2$ (i)); 3,74 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (h)); 4,39 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (a)); 5,91 (1H, s, H(4)-pz); 7,67 (2H, d, aromáticos); 7,83 (2H, d, aromáticos).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 9,13 ( $\text{CH}_3$ ); 10,92 ( $\text{CH}_3$ ); 13,11 ( $\text{CH}_3$ ); 23,90 ( $\text{CH}_2$ ); 34,88 ( $\text{CH}_2$ ); 36,33 ( $\text{CH}_2$ ); 38,85 ( $\text{CH}_2$ ); 47,40 ( $\text{CH}_2$ ); 52,13 ( $\text{CH}_2$ ); 52,81 ( $\text{CH}_2$ ); 54,12 ( $\text{CH}_2$ ); 54,20 ( $\text{CH}_2$ ); 60,31 ( $\text{CH}_2$ ); 106,34 (C( $\text{H}_4$ -pz)); 112,40 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 115,97 ( $\text{C}_{\text{TFA}}$ ); 116,31 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 120,23 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 129,40 (C $_{3/5}$ -pz); 141,10 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 143,75 (C $_{3/5}$ -pz); 165,33 ( $\text{C}_{\text{TFA}}$ ); 170,66 (C=O); 174,67 (C=O).

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1635, 1688 (C=O).

**Análise Elementar**: C, 42,98; H, 4,14; N, 10,39 para  $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_2 \cdot 4 \text{CF}_3\text{COOH}$  requer C, 43,36; H, 5,03; N, 10,41.

**HR ESI-MS (m/z)**: 486,35510  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculada para  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_2 = 486,36922$ .



CH<sub>2</sub>(g)); 4,28 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 5,83 (1H, s, H<sub>4-pz</sub>); 6,93 (1H, bs, NH); 7,69 (2H, d, CH-aromáticos); 7,83 (2H, d, CH-aromáticos).

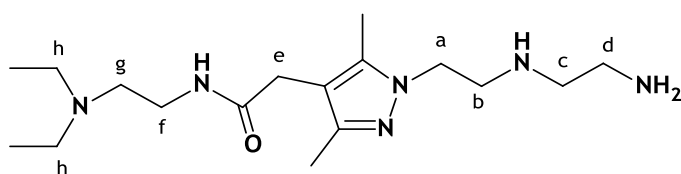
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>c</sub> 9,06 (2 CH<sub>3</sub>); 10,64 (CH<sub>3</sub>-pz); 13,19 (CH<sub>3</sub>-pz); 21,25 (CH<sub>2</sub>(e)); 34,35 (CH<sub>2</sub>(d)); 36,15 (CH<sub>2</sub>(g)); 43,88 (CH<sub>2</sub>(a)); 48,94 (CH<sub>2</sub>(i)); 52,65 (CH<sub>2</sub>(b)); 54,81 (CH<sub>2</sub>(f)); 55,96 (CH<sub>2</sub>(h)); 57,54 (CH<sub>2</sub>(c)); 106,49 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 120,17 (C<sub>aromático</sub>); 129,29 (C<sub>aromático</sub>); 129,33 (C<sub>aromático</sub>); 141,73 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 143,42 (C<sub>aromático</sub>); 149,69 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 170,24 (C=O); 170,93 (C=O); 173,14 (C=O).

**IV KBr**, ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1544, 1632, 1685 (C=O).

**HR ESI-MS** (m/z): 501,23801 [M+H]<sup>+</sup> calculada para C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> = 501,315655.

R<sub>f</sub> (silica-gel, MeOH/NH<sub>4</sub>OH (99/1)) = 0,56.

### 6.3.2.6. 2-(N-(2-((2-aminoetil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazolil)-N-(2-(dietilamino)etil)acetamida, L<sup>6</sup>



O ligando L<sup>6</sup> foi obtido como atrás descrito para L<sup>2</sup>, a partir de 177 mg de **28** (0,33 mmol) e 634 μL de TFA (8,23 mmol). Após remoção do

solvente, L<sup>6</sup> foi obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 107 mg (0,23 mmol; 73%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 1,30 (6H, t, 2CH<sub>3</sub>); 2,15 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,23 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 3,23 (6H, m, CH<sub>2</sub>(g) + 2CH<sub>2</sub>(h)); 3,43 (6H, m, CH<sub>2</sub>(c)+CH<sub>2</sub>(d)+CH<sub>2</sub>(e)); 3,55 (4H, m, CH<sub>2</sub>(f)+CH<sub>2</sub>(b)); 4,38 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)).

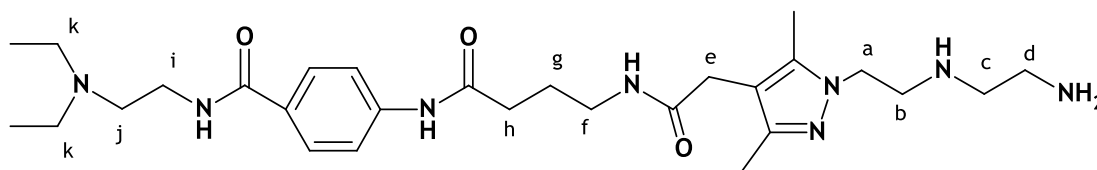
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>c</sub> 9,12 (CH<sub>3</sub>); 9,39 (CH<sub>3</sub>-pz); 11,83 (CH<sub>3</sub>-pz); 31,09 (CH<sub>2</sub> (e)); 35,87 (CH<sub>2</sub> (f)); 36,79 (CH<sub>2</sub> (b)); 44,95 (CH<sub>2</sub> (a)); 45,73 (CH<sub>2</sub> (d)); 48,72 (CH<sub>2</sub> (c)); 49,85 (CH<sub>2</sub> (h)); 52,34 (CH<sub>2</sub> (g)); 111,59 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 115,34 (C<sub>TFA</sub>); 140,48 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 149,29 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 162,92 (C<sub>TFA</sub>); 175,23 (C=O).

**IV KBr**, ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1710 (C=O).

**Análise Elementar**: C 50,77; H 7,01; N 18,56; C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O.CF<sub>3</sub>COOH, requer C 50,43; H 7,80; N 18,57.

**HR ESI-MS** (m/z): 339,29361 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O = 339,28669.

**6.3.2.7. 4-(4-(2-(1-(2-((2-aminoetil)amino)etil)-3,5-dimetilpirazol)etilcarbamoil)butilcarbamoil)-N-(2-dietilamino)etil)benzamida, L<sup>7</sup>**



O ligando L<sup>7</sup> foi sintetizado como atrás descrito para L<sup>2</sup>, a partir de 234 mg de **32** (0,44 mmol) e 5 mL de TFA. Após remoção do solvente, L<sup>7</sup> foi obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 230 mg (0,35 mmol; 80%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 1,27 (6H, t, 2CH<sub>3</sub>); 1,81 (2H, m, CH<sub>2</sub>(g)); 2,09 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,16 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,36 (2H, m, CH<sub>2</sub>(h)); 3,25 (14H, m, CH<sub>2</sub>(b) + CH<sub>2</sub>(c) + CH<sub>2</sub>(d) + CH<sub>2</sub>(e) + CH<sub>2</sub>(j) + 2 CH<sub>2</sub>(k)); 3,49 (2H, m, CH<sub>2</sub>(f)); 3,68 (2H, m, CH<sub>2</sub>(i)); 4,34 (2H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 7,63 (2H, d, H<sub>aromáticos</sub>); 7,75 (2H, d, H<sub>aromáticos</sub>).

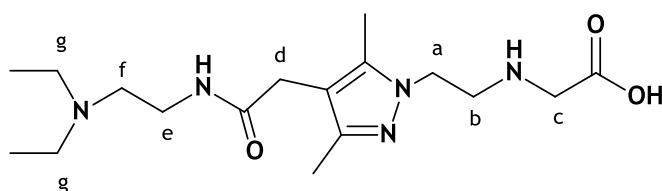
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 7,92 (CH<sub>3</sub>); 8,21 (CH<sub>3</sub>-pz); 10,49 (CH<sub>3</sub>-pz); 25,15 (CH<sub>2</sub>); 29,95 (CH<sub>2</sub>); 34,06 (CH<sub>2</sub>); 35,20 (CH<sub>2</sub>); 35,62 (CH<sub>2</sub>); 38,93 (CH<sub>2</sub>); 43,83 (CH<sub>2</sub>); 44,58 (CH<sub>2</sub>); 46,97 (CH<sub>2</sub>); 51,80 (CH<sub>2</sub>); 53,92 (CH<sub>2</sub>); 109,16 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 114,37 (C<sub>TFA</sub>); 119,14 (C<sub>aromático</sub>); 120,48 (C<sub>aromático</sub>); 128,14 (C<sub>aromático</sub>); 141,87 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 142,51 (C<sub>aromático</sub>); 148,02 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 160,35 (C<sub>TFA</sub>); 169,53 (C=O); 171,25 (C=O); 172,89 (C=O).

IV KBr, ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1646, 1699 (C=O).

**Análise Elementar:** C, 54,75; H, 7,64; N, 17,65; C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>.CF<sub>3</sub>COOH, requer C 54,87; H 7,21; N 17,06.

**HR ESI-MS (m/z):** 543,39389 [M+H]<sup>+</sup>, calculada para C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub> = 543,37656.

**6.3.2.8. Ácido 2-(2-(4-(2-(2-dietilamino)etilcarbamoil)etil)-3,5-dimetilpirazolil)etil)acético, L<sup>8</sup>H**



O ligando L<sup>8</sup>H foi sintetizado como atrás descrito para L<sup>4</sup>H, a partir de 108 mg de **38** (0,28 mmol). O composto foi purificado por extração com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, tendo sido obtido sob a forma de um óleo amarelo após evaporação do solvente. Rendimento: 108 mg (0,28 mmol; 98%).

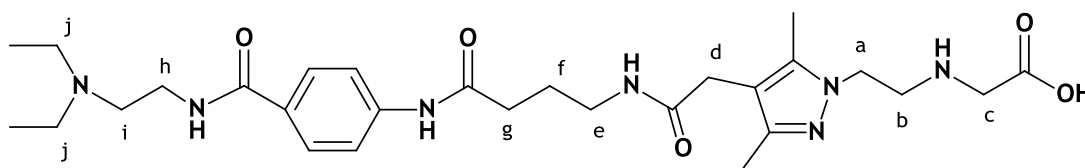
**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 1,31 (6H, t, 2 CH<sub>3</sub>); 2,13 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2,24 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 3,22 (6H, m, CH<sub>2</sub>(f) + 2 CH<sub>2</sub>(g)); 3,38 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 3,47 (2H, t, CH<sub>2</sub>(e)); 3,55 (2H, s, CH<sub>2</sub>(d)); 3,59 (2H, t, CH<sub>2</sub>(b)); 4,37 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{c}}$  8,11 ( $\text{CH}_3$ ); 8,51 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 10,80 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 30,32 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 34,79 ( $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 44,37 ( $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 47,04 ( $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 48,01 ( $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 49,38 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 51,40 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 110,27 ( $\text{C-(H}_4\text{-pz)}$ ); 139,20 ( $\text{C-(H}_{3/5}\text{-pz)}$ ); 148,10 ( $\text{C-(H}_{3/5}\text{-pz)}$ ); 169,85 ( $\text{C=O}$ ); 173,66 ( $\text{C=O}$ ).

**IV KBr**,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1590, 1664 ( $\text{C=O}$ ).

**HR ESI-MS** ( $m/z$ ): 354,24885 [ $\text{M+H}$ ] $^+$ , calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_3 = 354,24884$ .

### 6.3.2.9. Ácido 2-(2-(4-(2-(4-(4-(2-(2-dietilamino)etil)carbamoil)fenil)carbamoil)butilcarbamoil)etil-3,5-dimetipirazolil)etilanimo)acético, $\text{L}^9\text{H}$



O ligando  $\text{L}^9\text{H}$  foi sintetizado como atrás descrito para  $\text{L}^4\text{H}$ , a partir de 100 mg de **39** (0,17 mmol).  $\text{L}^9\text{H}$  foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , com gradiente de 75/13/2 a 0/98/2). Após purificação,  $\text{L}^9\text{H}$  foi obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 40 mg (0,072 mmol; 42%).

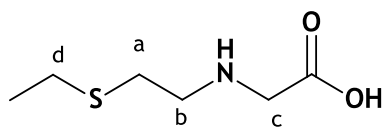
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,35 (6H, t,  $2\text{CH}_3$ ); 1,88 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 2,13 (3H, s,  $2\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,22 (3H, s,  $2\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,44 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 2,42 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 3,32 (12H, m, 6  $\text{CH}_2$ ); 3,64 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 3,78 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 4,33 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 7,68 (2H, d,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ); 7,84 (2H, d,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{c}}$  8,02 ( $\text{CH}_3$ ); 8,33 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 10,76 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 25,04 ( $\text{CH}_2$ ); 30,27 ( $\text{CH}_2$ ); 34,16 ( $\text{CH}_2$ ); 35,23 ( $\text{CH}_2$ ); 38,99 ( $\text{CH}_2$ ); 44,01 ( $\text{CH}_2$ ); 47,08 ( $\text{CH}_2$ ); 47,90 ( $\text{CH}_2$ ); 48,41 ( $\text{CH}_2$ ); 51,73 ( $\text{CH}_2$ ); 110,74 ( $\text{C-(H}_4\text{-pz)}$ ); 119,21 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 128,31 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 139,00 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 139,47 ( $\text{C(H}_{3/5}\text{-pz)}$ ); 142,45 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 147,98 ( $\text{C(H}_{3/5}\text{-pz)}$ ); 169,37 ( $\text{C=O}$ ); 169,67 ( $\text{C=O}$ ); 172,80 ( $\text{C=O}$ ); 173,00 ( $\text{C=O}$ ).

**IV KBr**,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1586, 1652, 1687 ( $\text{C=O}$ ).

**ESI/MS (+)** ( $m/z$ ): 558,2 [ $\text{M+H}$ ] $^+$ , calculada para  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_5 = 558,3$ .

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (75/13/2)) = 0,42.

6.3.2.10. Ácido 2-(2-(etiltio)etilamino)acético, L<sup>10</sup>H

A uma solução de 2-(etiltio)etanamina (600  $\mu$ L; 5,40 mmol) em H<sub>2</sub>O (12 mL), mantida a 0 °C, foi adicionada, gota a gota, uma solução de ácido bromoacético (250 mg; 1,80 mmol) em H<sub>2</sub>O (12 mL). Seguidamente foi adicionado NaOH 8 M (900  $\mu$ L; 7,20 mmol), gota a gota. A mistura foi deixada a agitar durante a noite à temperatura ambiente. No dia seguinte o pH foi ajustado a 5-6 e o solvente foi evaporado. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, com gradiente de 70/28/2 a 0/98/2). L<sup>10</sup>H foi obtido sob a forma de um óleo amarelo, após evaporação do solvente das fracções recolhidas. Rendimento: 200 mg (1,11 mmol; 63%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_{\text{H}}$  1,26 (3H, t, CH<sub>3</sub>); 2,60 (2H, q, CH<sub>2</sub>(d)); 2,85 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 3,25 (2H, t, CH<sub>2</sub>(b)); 3,55 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)).

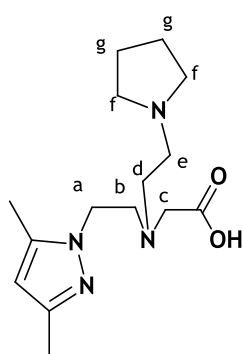
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_{\text{C}}$  15,13 (CH<sub>3</sub>); 26,39 (CH<sub>2</sub>(d)); 28,21 (CH<sub>2</sub>(a)); 47,84 (CH<sub>2</sub>(b)); 50,60 (CH<sub>2</sub>(c)); 171,15 (C=O).

**IV KBr**,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1582 (C=O).

**Análise Elementar**: C 40,00; H 8,38; N 15,02; S 17,82; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>SNH<sub>4</sub> requer C 39,98; H 8,95; N 15,54; S 17,78.

**ESI/MS (+) (m/z)**: 164,1 [M+H]<sup>+</sup>, calculada para C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>S= 164,1.

**R<sub>f</sub>** (sílica-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (70/28/2)) = 0,28.

6.3.2.11. Ácido 2-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)(2-pirrolidina)etil)aminoacético, L<sup>11</sup>H

A uma solução de **40** (480 mg; 2,40 mmol) em H<sub>2</sub>O (6 mL) foi adicionada uma solução de 1-(2-cloroetil)pirrolidina (414 mg; 2,40 mmol) em THF (9 mL). O pH desta solução foi ajustado a pH 12-13 através da adição de NaOH 5 M. Seguidamente a mistura reaccional foi deixada a refluxar durante a noite. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente foi removido sob vácuo e o produto pretendido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 78/20/2). L<sup>11</sup>H foi obtido sob a forma de um óleo amarelo após evaporação do solvente das fracções recolhidas. Rendimento: 120 mg (0,41 mmol; 17%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_{\text{H}}$  2,00 (4H, t, 2-CH<sub>2</sub>(g)); 2,17 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,24 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,82 (2H, t, CH<sub>2</sub>(e)); 3,07 (4H, m, 2 CH<sub>2</sub>(f)); 3,12 (2H, m, CH<sub>2</sub>(d)); 3,28 (2H, t, CH<sub>2</sub>(b)); 3,35 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 4,01 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 5,84 (1H, s, H(4-pz)).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{c}}$  9,28 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 12,13 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 22,80 ( $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 46,34 ( $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 52,70 ( $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 53,48 ( $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 53,57 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 56,00 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 57,39 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 105,00 ( $\text{C}(\text{H}_4\text{-pz})$ ); 141,20 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 147,85 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 178,79 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

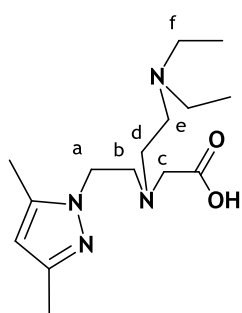
IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1584 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

**Análise Elementar:** C 57,79; H 9,07; N 22,42,  $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2\text{NH}_4$  requer C 57,85; H 9,39; N 22,49.

**ESI/MS (+) (m/z):** 295,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_2 = 295,2$ .

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 70/28/2) = 0,58.

### 6.3.2.12. Ácido 2-((2-(dietilamino)etil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)acético, $\text{L}^{12}\text{H}$



O ligando  $\text{L}^{12}\text{H}$  foi sintetizado como atrás descrito para  $\text{L}^{11}\text{H}$ , a partir de 150 mg de **40** (3,60 mmol) e 132 mg de 2-cloro-N,N-dietiletanamina (0,76 mmol).  $\text{L}^{12}\text{H}$  foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 78/20/2). Após purificação,  $\text{L}^{12}\text{H}$  foi obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 85 mg (0,27 mmol; 36%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,19 (6H, t, 2- $\text{CH}_3$ ); 2,17 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,22 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,72 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 2,87 (6H, m, 2 $\text{CH}_2(\text{f})$  +  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 3,02 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 3,19 (2H, s,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 4,02 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 5,83 (1H, s, H(4-pz)).

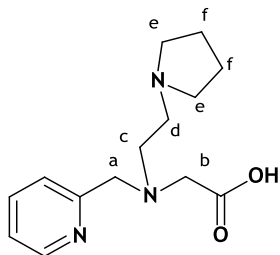
**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{c}}$  8,08 (2  $\text{CH}_3$ ); 10,95 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 13,29 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 46,94 ( $\text{CH}_2\text{-a}$ ); 48,73 ( $\text{CH}_2\text{-f}$ ); 49,87 ( $\text{CH}_2\text{-e}$ ); 53,41 ( $\text{CH}_2\text{-d}$ ); 54,27 ( $\text{CH}_2\text{-b}$ ); 58,40 ( $\text{CH}_2\text{-c}$ ); 106,09 ( $\text{C}(\text{H}_4\text{-pz})$ ); 142,37 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 149,08 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 179,65 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1579( $\text{C}=\text{O}$ ).

**Análise Elementar:** C 57,59; H 9,47; N 22,42,  $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_2\text{NH}_4$  requer C 57,48; H 9,97; N 22,34.

**ESI/MS (+) (m/z):** 297,0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_2 = 297,2$ .

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 78/20/2) = 0,61.

6.3.2.13. Ácido 2-((piridina-2-metil)((2-pirrolidina)etil)amino)acético, L<sup>13</sup>H

O ligando L<sup>13</sup>H foi sintetizado como atrás descrito para L<sup>11</sup>H, a partir de 600 mg de 41 (3,60 mmol) e 612 mg de 1-(2-cloroetil)pirrolidina (3,60 mmol). L<sup>13</sup>H foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 70/28/2). Após purificação, L<sup>13</sup>H foi obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 142 mg (0,54 mmol;

15%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 2,10 (4H, m, 2-CH<sub>2</sub>(f)); 2,99 (2H, t, CH<sub>2</sub>(d)); 3,20 (2H, s, CH<sub>2</sub>(b)); 3,26 (2H, t, CH<sub>2</sub>(c)); 3,33 (4H, m, 2 CH<sub>2</sub>(e)); 3,95 (2H, s, CH<sub>2</sub>(a)); 7,33 (1H, t, H<sub>py</sub>); 7,56 (1H, d, H<sub>py</sub>); 7,83 (1H, t, H<sub>py</sub>); 8,50 (1H, d, H<sub>py</sub>).

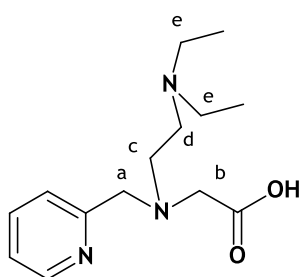
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 22,83 (CH<sub>2</sub>(f)); 51,65 (CH<sub>2</sub>(d)); 53,15 (CH<sub>2</sub>(c)); 53,32 (CH<sub>2</sub>(e)); 58,12 (CH<sub>2</sub>(b)); 61,08 (CH<sub>2</sub>(a)); 122,93 (C<sub>py</sub>); 123,84 (C<sub>py</sub>); 137,76 (C<sub>py</sub>); 148,72 (C<sub>py</sub>); 158,80 (C<sub>py</sub>); 178,36 (C=O).

**IV KBr**, u<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1595(C=O).

**Análise Elementar**: C 59,91; H 8,97; N 19,71, C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>NH<sub>4</sub> requer C 59,98; H 8,63; N 19,98.

**ESI/MS (+) (m/z)**: 263,1 [M+H]<sup>+</sup>, calculada para C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> = 263,1.

**R<sub>f</sub>** (sílica-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (70/28/2)) = 0,43.

6.3.2.14. Ácido 2-((2-(dietilamino)etil)(piridina-2-metil)amino)acético, L<sup>14</sup>H

O ligando L<sup>14</sup>H foi sintetizado como atrás descrito para L<sup>11</sup>H, a partir de 500 mg de 41 (3,01 mmol) e 518 mg de 2-cloro-N,N-dietiletanamina (3,01 mmol). L<sup>14</sup>H foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 70/28/2). Após purificação, L<sup>14</sup>H foi obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 200 mg (0,71

mmol; 24%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 1,33 (6H, t, 2-CH<sub>3</sub>); 2,98 (2H, t, CH<sub>2</sub>(d)); 3,15 (4H, q, 2 CH<sub>2</sub>(e)); 3,20 (2H, s, CH<sub>2</sub>(b)); 3,22 (2H, m, CH<sub>2</sub>(c)); 3,97 (2H, s, CH<sub>2</sub>(a)); 7,34 (1H, t, H<sub>py</sub>); 7,54 (1H, d, H<sub>py</sub>); 7,84 (1H, t, H<sub>py</sub>); 8,53 (1H, d, H<sub>py</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 7,93 (CH<sub>3</sub>); 46,92 (CH<sub>2</sub>(d)); 50,94 (CH<sub>2</sub>(e)); 52,11 (CH<sub>2</sub>(c)); 58,11 (CH<sub>2</sub>(b)); 60,38 (CH<sub>2</sub>(a)); 122,98 (C<sub>py</sub>); 123,59 (C<sub>py</sub>); 137,83 (C<sub>py</sub>); 148,75 (C<sub>py</sub>); 158,50 (C<sub>py</sub>); 178,45 (C=O).

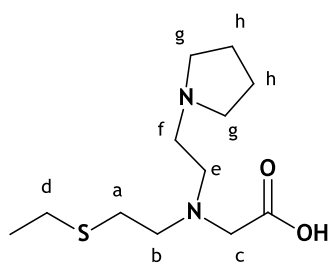
IV KBr,  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1594(C=O).

**Análise Elementar:** C 59,27; H 9,04; N 19,84,  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{NH}_4$  requer C 59,49; H 9,29; N 19,85.

**ESI/MS (+) (m/z):** 266,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2 = 266,2$ .

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (70/28/2)) = 0,56.

### 6.3.2.15. Ácido 2-((2-(etiltio)etil)(2-(pirrolidina)etil)amino) acético, $\text{L}^{15}\text{H}$



O ligando  $\text{L}^{15}\text{H}$  foi sintetizado como atrás descrito para  $\text{L}^{11}\text{H}$ , a partir de 579 mg de  $\text{L}^{10}\text{H}$  (3,50 mmol) e 595 mg de 1-(2-cloroetil)pirrolidina (3,50 mmol).  $\text{L}^{15}\text{H}$  foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 70/28/2). Após purificação,  $\text{L}^{15}\text{H}$  foi obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 145 mg

(0,56 mmol; 16%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,23 (3H, t,  $\text{CH}_3$ ); 2,09 (4H, m,  $2\text{CH}_2$  (h)); 2,60 (2H, q,  $\text{CH}_2$ (d)); 2,63 (2H, t,  $\text{CH}_2$ (b)); 2,85 (4H, m,  $2\text{-CH}_2$ (g)); 3,18 (2H, s,  $\text{CH}_2$ (c)); 3,19 (2H, m,  $\text{CH}_2$ (f)); 3,33 (4H, m,  $\text{CH}_2$ (a) +  $\text{CH}_2$ (e)).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  13,35 ( $\text{CH}_3$ ); 21,92 ( $\text{CH}_2$ (h)); 24,96 ( $\text{CH}_2$ (d)); 28,55 ( $\text{CH}_2$ (a)); 51,02 ( $\text{CH}_2$ (g)); 52,38 ( $\text{CH}_2$ (f)); 52,50 ( $\text{CH}_2$ (e)); 56,00 ( $\text{CH}_2$ (b)); 57,05 ( $\text{CH}_2$ (c)); 178,02 (C=O).

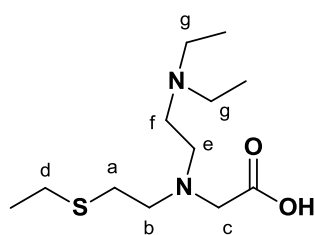
IV KBr,  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1587 (C=O).

**Análise Elementar:** C 51,94; H 9,16; N 14,86; S 11,85;  $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{SNH}_4$  requer C 51,95; H 9,81; N 15,15; S 11,56.

**ESI/MS (+) (m/z):** 261,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} = 261,2$ .

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (70/28/2)) = 0,80.

### 6.3.2.16. Ácido 2-((2-dietilamino)etil)(2-(etiltio)etil)amino)acético, $\text{L}^{16}\text{H}$



O ligando  $\text{L}^{16}\text{H}$  foi sintetizado como atrás descrito para  $\text{L}^{11}\text{H}$ , a partir de 250 mg de  $\text{L}^{10}\text{H}$  (1,50 mmol) e 258 mg de 2-cloro-N,N-dietiletanamina (1,50 mmol).  $\text{L}^{16}\text{H}$  foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 80/18/2). Após purificação,  $\text{L}^{16}\text{H}$  foi obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 140 mg (0,51 mmol; 34%)

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,21 (3H, t,  $\text{CH}_3$ ); 1,28 (6H, t, 2  $\text{CH}_3$ ); 2,55 (2H, q,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 2,65 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 2,81 (4H, m, 2- $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 3,06 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 3,10 (6H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$  +  $\text{CH}_2(\text{c})$  +  $\text{CH}_2(\text{e})$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  8,98 ( $\text{CH}_3$ ); 15,30 ( $\text{CH}_3$ ); 27,02 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 29,99 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 48,25 ( $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 52,25 ( $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 53,52 ( $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 56,71 ( $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 58,45 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 179,95 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

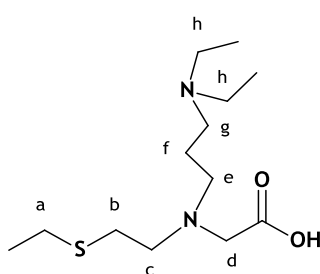
IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1578 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

**Análise Elementar:** C 51,63; H 10,03; N 14,85; S 11,55;  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2\text{SNH}_4$  requer C 51,58; H 10,46; N 15,04; S 11,47.

**ESI/MS (+) (m/z):** 263,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} = 263,2$ .

$R_f$  (sílica-gel,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (80/18/2)) = 0,77.

### 6.3.2.17. Ácido 2-((3-(dietilamino)propil)(2-(etiltio)etil)amino)acético, $\text{L}^{17}\text{H}$



A uma solução de 42 (348 mg; 1,59 mmol) em  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL) foi adicionada, gota a gota e a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , uma solução de ácido bromoacético (221 mg; 1,59 mmol) em  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL). Seguidamente foi adicionada, a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , uma solução de  $\text{NaOH}$  8 M (800  $\mu\text{L}$ ). A mistura reaccional resultante foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, o pH

foi ajustado a 5. Removeu-se o solvente sob vácuo e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 80/18/2). Após remoção do solvente das fracções recolhidas,  $\text{L}^{17}\text{H}$  foi obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 109 mg (0,37 mmol; 23%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,21 (3H, t,  $\text{CH}_3\text{-S}$ ); 1,27 (6H, t, 2- $\text{CH}_3$ ); 1,88 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 2,55 (4H, m, 2-  $\text{CH}_2(\text{CH}_2(\text{d})+\text{CH}_2(\text{g}))$ ); 2,61 (4H, s, 2- $\text{CH}_2(\text{h})$ ); 3,07 (2H, s,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 3,23 (6H, m, 3- $\text{CH}_2(\text{CH}_2(\text{a})+\text{CH}_2(\text{c})+\text{CH}_2(\text{e}))$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  8,43 ( $\text{CH}_3$ ); 15,28 ( $\text{CH}_3\text{-enxofre}$ ); 21,59 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 27,07 ( $\text{CH}_2(\text{h})$ ); 29,32 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 46,96 ( $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 51,61 ( $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 52,25 ( $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 54,49 ( $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 59,00 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 179,26 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

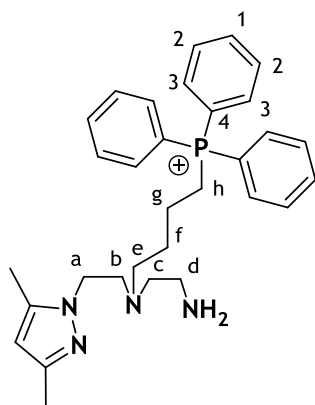
IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1581 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

**Análise Elementar:** C 53,36; H 10,28; N 14,24; S 10,82;  $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{SNH}_4$  requer C 53,21; H 10,65; N 14,32; S 10,92.

**ESI/MS (+) (m/z):** 277,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} = 277,2$ .

$R_f$  (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (80/18/2)) = 0,52.

**6.3.2.18. (4-((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)amino)butil)trifenilfosfônio, L<sup>18</sup>**



O ligando L<sup>18</sup> foi sintetizado como atrás descrito para L<sup>2</sup>, a partir de 850 mg de **45** (1,25 mmol) e 1,62 mL de TFA. L<sup>18</sup> foi purificado por HPLC usando uma coluna preparativa Waters  $\mu$  Bondapak (19 x 150 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-3 min, 75% A; 3-23 min, 75%-50% A; 23-33 min, 50%; 33-43 min 50-0% A; 43-58 min 0% A ( $t_R = 16,35$  min)). Após purificação, L<sup>18</sup> foi obtido sob a forma de um óleo amarelo e formulado como um sal de trifluoroacetato. Rendimento: 458

mg (0,55 mmol; 44%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  1,62 (4H, m, CH<sub>2</sub>(f) + CH<sub>2</sub>(g)); 2,11 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,21 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,51 (2H, t, CH<sub>2</sub>(e)); 2,80 (2H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 2,83 (2H, t, CH<sub>2</sub>(c)); 2,95 (2H, t, CH<sub>2</sub>(d)); 3,37 (2H, m, CH<sub>2</sub>(h)); 4,03 (2H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 5,79 (1H, s, H<sub>4-pz</sub>); 7,72-7,92 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

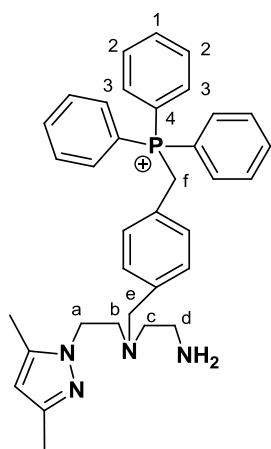
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  10,94 (CH<sub>3</sub>-pz); 13,21 (CH<sub>3</sub>-pz); 21,27 (d,  $J_{P-C} = 12$  Hz, CH<sub>2</sub>(g)); 22,56 (d,  $J_{P-C} = 51$  Hz, CH<sub>2</sub>(h)); 28,70 (d,  $J_{P-C} = 17$  Hz, CH<sub>2</sub>(f)); 38,58 (CH<sub>2</sub>(d)); 47,32 (CH<sub>2</sub>(a)); 51,94 (CH<sub>2</sub>(b)); 54,15 (CH<sub>2</sub>(c)); 54,37 (CH<sub>2</sub>(e)); 106,15 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 115,54 (C<sub>TFA</sub>); 119,87 (d,  $J_{P-C} = 87$  Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 131,55 (d,  $J_{P-C} = 13$  Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 134,81 (d,  $J_{P-C} = 10$  Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 136,28 (d,  $J_{P-C} = 3,4$  Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 141,27 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 148,49 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 161,50 (C<sub>TFA</sub>).

**RMN <sup>31</sup>P** (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_P$  24,67.

**Análise Elementar:** C 52,81; H 5,70; N 6,93, C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. 2CF<sub>3</sub>COOH requer C 52,86; H 5,04; N 6,66.

**ESI/MS (+) (m/z):** 499,4 [M]<sup>+</sup>, calculada para C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>P= 499,3.

**6.3.2.19. (4-(((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetilpirazol)etil)amino)metil)benzil)trifenilfosfônio, L<sup>19</sup>**



O ligando L<sup>19</sup> foi sintetizado como atrás descrito para L<sup>2</sup>, a partir de 858 mg de 46 (1,18 mmol) e 3,00 mL de TFA. Após evaporação do solvente, o composto foi obtido sob a forma de um óleo amarelo e formulado como um sal de trifluoroacetato. Rendimento: 1,157 g (1,17 mmol; 99%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 2,25 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,28 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 3,30 (6H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(c)+CH<sub>2</sub>(d)); 4,18 (2H, t, CH<sub>2</sub>(e)); 4,55 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 4,86 (2H, d, CH<sub>2</sub>(f)); 6,16 (1H, s, H<sub>4-pz</sub>); 7,02-7,34 (4H, m, H<sub>benzilo</sub>); 7,57-7,86 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

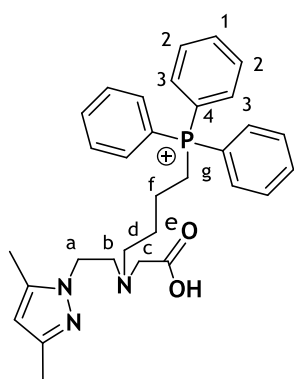
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 10,91 (CH<sub>3</sub>-pz); 11,57 (CH<sub>3</sub>-pz); 30,79 (d, J<sub>P-C</sub> = 49 Hz, CH<sub>2</sub>(f)); 36,57 (CH<sub>2</sub>(d)); 45,14 (CH<sub>2</sub>(a)); 51,53 (CH<sub>2</sub>(b)); 52,80 (CH<sub>2</sub>(c)); 57,62 (CH<sub>2</sub>(e)); 108,57 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 118,51 (d, J<sub>P-C</sub> = 87 Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 118,59 (C<sub>TFA</sub>); 129,72 (d, J<sub>P-C</sub> = 8,3 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 131,32 (d, J<sub>P-C</sub> = 13 Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 132,03 (d, J<sub>P-C</sub> = 2,3 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 132,78 (d, J<sub>P-C</sub> = 10 Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 134,61 (d, J<sub>P-C</sub> = 5 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 135,15 (d, J<sub>P-C</sub> = 2,3 Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 136,20 (d, J<sub>P-C</sub> = 3,8 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 136,49 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 148,01 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 161,14 (C<sub>TFA</sub>).

**RMN <sup>31</sup>P** (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>P</sub> 23,76.

**Análise Elementar:** C 55,91; H 5,52; N 5,47; C<sub>42</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>PF<sub>3</sub>·2CF<sub>3</sub>COOH requer C 55,87; H 5,10; N 5,67.

**ESI/MS (+) (m/z):** 647,4 [M]<sup>+</sup>, calculada para C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>P = 647,4.

**6.3.2.20. (4-((carboximetil)(2-(3,5-dimetilpirazol)etil)amino)butil)trifenilfosfônio, L<sup>20</sup>H**



mmol; 50%).

Ao composto 47 (323 mg; 0,52 mmol) foi adicionada uma solução de HCl 4 M (12 mL). A mistura foi deixada a refluxar durante 4 h. Após arrefecimento à temperatura ambiente a solução foi neutralizada com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e o solvente foi evaporado na linha de vazio. L<sup>20</sup>H foi separado dos sais através de um cartucho C18 Cartridge Sep-Pak. Após evaporação do solvente, L<sup>20</sup>H foi obtido sob a forma de um óleo amarelo e formulado na forma de zwitterião. Rendimento: 158 mg (0,26

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 1,66 (4H, m, CH<sub>2</sub>(e)+CH<sub>2</sub>(f)); 2,10 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,62 (2H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 2,85 (2H, t, CH<sub>2</sub>(d)); 3,13 (2H, c, CH<sub>2</sub>(c)); 3,51 (2H, m, CH<sub>2</sub>(g)); 4,02 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 5,67 (1H, s, H<sub>4</sub>-pz); 7,74-7,91 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 11,19 (CH<sub>3</sub>-pz); 13,33 (CH<sub>3</sub>-pz); 21,12 (d, J<sub>P-C</sub>= 4,5 Hz, CH<sub>2</sub>(e)); 22,24 (d, J<sub>P-C</sub>= 51 Hz, CH<sub>2</sub>(g)); 28,73 (d, J<sub>P-C</sub>= 17 Hz, CH<sub>2</sub>(f)); 47,60 (CH<sub>2</sub>(a)); 54,49 (CH<sub>2</sub>(b)); 54,97 (CH<sub>2</sub>(d)); 59,93 (CH<sub>2</sub>(c)); 105,76 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 120,00 (d, J<sub>P-C</sub>= 87 Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 131,50 (d, J<sub>P-C</sub>= 12 Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 134,85 (d, J<sub>P-C</sub>= 10 Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 136,13 (d, J<sub>P-C</sub>= 3,0 Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 141,28 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 148,30 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 178,86 (C=O).

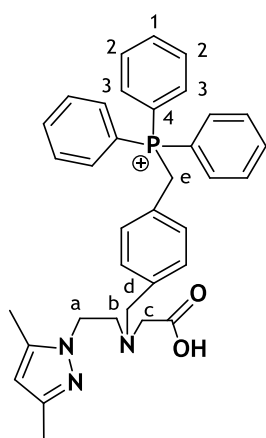
**RMN <sup>31</sup>P** (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>P</sub> 25,15.

IV KBr, ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1583 (C=O).

**Análise Elementar:** C 72,36; H 8,05; N 6,91, C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>P requer C 72,49; H 7,06; N 8,18.

**ESI/MS (+)** (m/z): 514,3 [M]<sup>+</sup>, calculada para C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>P= 514,3.

### 6.3.2.21. (4-(((carboximetil)(2-(3,5-dimetilpirazol)etil)amino)metil)benzil)trifenilfosfônio, L<sup>21</sup>H



O ligando L<sup>21</sup>H foi sintetizado e purificado como atrás descrito para L<sup>20</sup>H, a partir de 432 mg de **48** (0,66 mmol). Após purificação, L<sup>20</sup>H foi obtido sob a forma de um óleo amarelo e formulado como um zwitterião. Rendimento: 302 mg (0,45 mmol; 68%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 2,05 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 3,18 (2H, t, CH<sub>2</sub>(b)); 3,42 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 3,98 (2H, s, CH<sub>2</sub>(d)); 4,55 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 4,96 (2H, d, CH<sub>2</sub>(e)); 5,77 (1H, s, H<sub>4</sub>-pz); 6,97 (2H, m, H<sub>benzil</sub>); 7,22 (2H, m, H<sub>benzil</sub>); 7,61-7,91 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

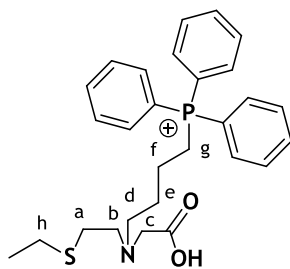
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 10,93 (CH<sub>3</sub>-pz); 13,28 (CH<sub>3</sub>-pz); 30,33 (d, J<sub>P-C</sub>= 47 Hz, CH<sub>2</sub>(e)); 45,84 (CH<sub>2</sub>(a)); 54,80 (CH<sub>2</sub>(b)); 56,58 (CH<sub>2</sub>(c)); 59,34 (CH<sub>2</sub>(d)); 106,17 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 119,11 (d, J<sub>P-C</sub>= 86 Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 128,72 (d, J<sub>P-C</sub>= 8,8 Hz, C<sub>benzil</sub>); 131,35 (d, J<sub>P-C</sub>= 18 Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 132,35 (d, J<sub>P-C</sub>= 3,3 Hz, C<sub>benzil</sub>); 132,78 (d, J<sub>P-C</sub>= 9,0 Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 134,52 (d, J<sub>P-C</sub>= 6,0 Hz, C<sub>benzil</sub>); 135,41 (d, J<sub>P-C</sub>= 14 Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 136,45 (d, J<sub>P-C</sub>= 3,2 Hz, C<sub>benzil</sub>); 141,49 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 148,90 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 174,19 (C=O).

**RMN <sup>31</sup>P** (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>P</sub> 23,79.

IV KBr, ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1586 (C=O).

**Análise Elementar:** C 74,52; H 6,25; N 7,37, C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>P requer C 74,71; H 6,63; N 7,47.

**ESI/MS (+)** (m/z): 562,3 [M]<sup>+</sup>, calculada para C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>P = 562,3.

6.3.2.22. (4-((carboximetil)(2-(etiltio)etil)amino)butil)trifenilfosfônio, L<sup>22</sup>H

O ligando L<sup>22</sup>H foi sintetizado como atrás descrito para L<sup>20</sup>H, a partir de 697 mg de **50** (1,25 mmol). L<sup>22</sup>H foi purificado por HPLC, usando uma coluna preparativa Waters  $\mu$  Bondapak (19 x 150 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-3 min, 75% A; 3-28 min, 75%-55% A; 28-31 min, 55% A; 31-31,1 min 55%-0% A; 31,1-35 min, 0% A ( $t_R$  = 18,47 min)). Após purificação, L<sup>22</sup>H foi obtido sob a forma de óleo transparente e formulado como um zwitterião. Rendimento: 354 mg (0,043 mmol; 34%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  1,24 (3H, t, CH<sub>3</sub>); 1,79 (2H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 2,02 (2H, m, CH<sub>2</sub>(f)); 2,60 (2H, q, CH<sub>2</sub>(h)); 2,88 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 3,29 (2H, m, CH<sub>2</sub>(d)); 3,44 (4H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(g)); 4,13 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 7,73-7,92 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

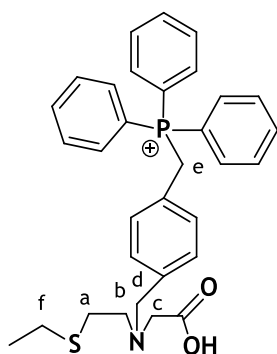
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  14,93 (CH<sub>3</sub>); 20,70 (d,  $J_{P-C}$  = 8,5 Hz, CH<sub>2</sub>(g)); 22,33 (d,  $J_{P-C}$  = 54 Hz, CH<sub>2</sub>(f)); 25,69 (d,  $J_{P-C}$  = 18 Hz, CH<sub>2</sub>(e)); 25,90 (CH<sub>2</sub>(a)); 26,41 (CH<sub>2</sub>(h)); 54,67 (CH<sub>2</sub>(d)); 54,81 (CH<sub>2</sub>(b)); 55,27 (CH<sub>2</sub>(c)); 115,47 (C<sub>TFA</sub>); 119,49 (d,  $J_{P-C}$  = 87 Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 131,57 (d,  $J_{P-C}$  = 13 Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 134,77 (d,  $J_{P-C}$  = 11 Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 136,34 (d,  $J_{P-C}$  = 5,0 Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 162,61 (C<sub>TFA</sub>); 168,75 (C=O).

**RMN <sup>31</sup>P** (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_P$  24,67.

IV KBr,  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 1587 (C=O).

**Análise Elementar:** C 49,64; H 5,01; N 1,80; S 3,76 C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub>PSF<sub>3</sub>.2 CF<sub>3</sub>COOH requer C 49,68; H 4,54; N 1,71; S 3,89 .

**ESI/MS (+) (m/z):** 480,2 [M]<sup>+</sup>, calculada para C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>2</sub>PS = 480,2.

6.3.2.23. (4-(((carboximetil)(2-etiltio)etil)amino)metil)benzil)butil)trifenilfosfônio, L<sup>23</sup>H

O ligando L<sup>23</sup>H foi sintetizado e purificado como atrás descrito para L<sup>20</sup>H, a partir de 581 mg de **51** (0,58 mmol). Após purificação, L<sup>23</sup>H foi obtido sob a forma de óleo amarelo e formulado como um zwitterião. Rendimento: 300 mg (0,57 mmol; 99%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  1,16 (3H, t, CH<sub>3</sub>); 2,44 (2H, q, CH<sub>2</sub>(f)); 2,59 (2H, t, CH<sub>2</sub>(a)); 2,73 (2H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 3,07 (2H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 3,70 (2H, m, CH<sub>2</sub>(d)); 4,90 (2H, d, CH<sub>2</sub>(e)); 6,89 (2H, m, H<sub>benzilo</sub>); 7,25 (2H, m, H<sub>benzilo</sub>); 7,61-7,91 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  15,37 (CH<sub>3</sub>); 26,64 (CH<sub>2</sub>(a)); 29,58 (d, CH<sub>2</sub>(f)); 53,32 (CH<sub>2</sub>(b)); 58,50 (CH<sub>2</sub>(c)); 58,89 (CH<sub>2</sub>(d)); 79,48 (CH<sub>2</sub>(e)); 119,03 (d,  $J_{P-C}$  = 86 Hz, PPh<sub>3</sub>(4));

127,06 (d,  $J_{P-C} = 8$  Hz,  $C_{\text{benzilo}}$ ); 131,10 (d,  $J_{P-C} = 3,0$  Hz,  $C_{\text{benzilo}}$ ); 131,31 (d,  $J_{P-C} = 12$  Hz,  $PPh_3(2)$ ); 131,86 (d,  $J_{P-C} = 9,0$  Hz,  $PPh_3(3)$ ); 135,30 (d,  $J_{P-C} = 6,3$  Hz,  $C_{\text{benzilo}}$ ); 136,39 (d,  $J_{P-C} = 2,2$  Hz,  $PPh_3(1)$ ); 141,48 (d,  $J_{P-C} = 4,5$  Hz,  $C_{\text{benzilo}}$ ); 178,49 (C=O).

RMN  $^{31}P$  (121,336 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta_P$  23,78.

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/cm^{-1}$ : 1583 (C=O).

Análise Elementar: C 72,66; H 6,25; N 6,91; S 5,91  $C_{32}H_{34}NO_2SP$  requer C 72,84; H 6,49; N 2,65; S 6,08.

ESI/MS (+) (m/z): 528,2  $[M]^+$ , calculada para  $C_{32}H_{35}NO_2SP = 528,2$ .

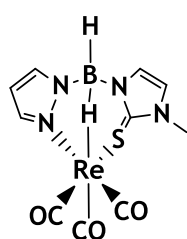
## 6.4. Síntese e caracterização dos complexos de Rénio

### 6.4.1. Síntese dos materiais de partida

Os compostos de partida *fac*- $[Re\{\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})_2\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})\}(\text{CO})_3]$  (1),<sup>47</sup> e *fac*- $[Re(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]Br^{238}$  foram preparados de acordo com os métodos descritos na literatura.

### 6.4.2. Síntese e caracterização dos complexos 2-4 e Re1

#### 6.4.2.1. *fac*- $[Re\{\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(\text{pz})\}(\text{CO})_3]$ , 2



A uma solução de 1 (55 mg; 0,139 mmol) em THF (20 mL) adicionou-se pirazolo (9,5 mg; 0,139 mmol). A mistura reaccional resultante foi deixada à temperatura de refluxo durante a noite. Após arrefecimento à temperatura ambiente e evaporação do solvente, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $CH_2Cl_2/n$ -hexano, 45/55). O complexo 2 foi obtido sob a forma de um sólido branco, após evaporação do solvente das fracções recolhidas. Rendimento: 57 mg (0,12 mmol; 89%)

RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta_H$  -3,97 (1H, br,  $J_{B-H}=75$  Hz, B-H...Re); 3,53 (3H, s,  $CH_3-N$ ); 6,10 (1H, t,  $H_4\text{-pz}$ ); 6,82 (1H, d,  $J_{H-H} = 1,8$  Hz, CH); 6,86 (1H, d,  $J_{H-H} = 2,4$  Hz, CH); 7,13 (1H, d,  $J_{H-H} = 2,4$  Hz,  $H_{3/5}\text{-pz}$ ); 7,40 (1H, d,  $J_{H-H} = 1,5$  Hz,  $H_{3/5}\text{-pz}$ ).

RMN  $^{13}C$  (75,373 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta_C$  34,43 ( $CH_3\text{-tim}$ ); 107,40 ( $C(H_4\text{-pz})$ ); 121,41 ( $C_{\text{tim}}$ ); 122,31 ( $C_{\text{tim}}$ ); 135,66 ( $C(H_{3/5}\text{-pz})$ ); 140,60 ( $C(H_{3/5}\text{-pz})$ ); 163,90 (C=S); 192,03 (C=O); 193,05 (C=O); 193,93 (C=O).

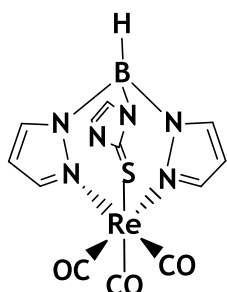
RMN  $^{11}B$  (96,169 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta_B$  26,22 (m).

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/cm^{-1}$ : 1909, 1933, 2026 (C=O); 2478 (B-H).

Análise Elementar: C 25,89; H 2,23; N 12,07,  $ReBC_{10}N_4H_{10}SO_3$ , requer C 25,86; H 2,17; N 12,16.

$R_f$  (silica-gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{n-hexano}$  (50/50)) = 0,40.

#### 6.4.2.2. *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -HB(tim<sup>Me</sup>)(pz)<sub>2</sub>}(CO)<sub>3</sub>], 3



A uma solução de **2** (15 mg; 0,032 mmol) em tolueno (20 mL) adicionou-se pirazolo (2,5 mg; 0,037 mmol). A mistura reaccional resultante foi deixada à temperatura de refluxo durante a noite. Após arrefecimento à temperatura ambiente e evaporação do solvente, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{n-hexano}$ , 45/55). O complexo **4** foi obtido sob a forma de um sólido branco, após evaporação do solvente das fracções recolhidas. Rendimento: 11 mg (0,02 mmol; 64%).

**RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_H$  3,48 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-N}$ ); 2,13 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,24 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 6,27 (2H, t,  $\text{H}_4\text{-pz}$ ); 6,63 (1H, d,  $J_{\text{H-H}} = 2,1$  Hz, CH); 6,85 (1H, d,  $J_{\text{H-H}} = 1,8$  Hz, CH); 7,59 (2H, d,  $J_{\text{H-H}} = 2,4$  Hz,  $\text{H}_{3/5}\text{-pz}$ ); 7,90 (2H, d,  $J_{\text{H-H}} = 2,1$  Hz,  $\text{H}_{3/5}\text{-pz}$ ).

**RMN** <sup>13</sup>C (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_C$  9,03 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 11,45 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 34,50 ( $\text{CH}_3\text{-tim}$ ); 106,51 ( $\text{C}(\text{H}_4\text{-pz})$ ); 119,40 ( $\text{C}_{\text{tim}}$ ); 123,12 ( $\text{C}_{\text{tim}}$ ); 137,12 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 146,46 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 155,25 ( $\text{C}=\text{S}$ ); 192,36 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 195,24 ( $\text{C}=\text{O}$ ).

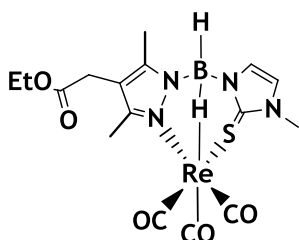
**RMN** <sup>11</sup>B (96,169 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_B$  35,05 (d,  $J_{\text{H-H}} = 120$  Hz).

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1912, 1933, 2019 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 2490 (B-H).

**Análise Elementar**: C 28,17; H 2,83; N 15,64,  $\text{ReBC}_{13}\text{N}_6\text{H}_{12}\text{SO}_3$ , requer C 29,50; H 2,28; N 15,88.

$R_f$  (silica-gel,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{n-hexano}$  (50/50)) = 0,35.

#### 6.4.2.3. *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>-4-EtOOCCH<sub>3</sub>pz)}(CO)<sub>3</sub>], 4



O complexo **4** foi sintetizado como atrás descrito para o complexo **2**, a partir de 80 mg de **1** (0,201 mmol) e 40 mg de 2-(3,5-dimetilpirazolil)acetato de etilo (0,219 mmol). **4** foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , com gradiente de 90/10 a 25/75). Após purificação, o complexo **4**

foi obtido sob a forma de um sólido branco. Rendimento: 70 mg (0,121 mmol; 60%).

**RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_H$  -4,20 (2H, br, B-H...Re); 1,21 (3H, t,  $\text{CH}_3$ ); 2,00 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,12 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 3,25 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ); 3,53 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-N}$ ); 4,08 (2H, q,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ); 6,10 (1H, t,  $\text{H}_4\text{-pz}$ ); 6,78 (1H, d, CH); 6,85 (1H, d, CH).

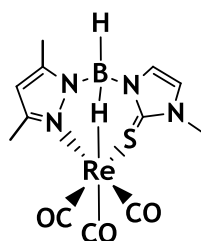
RMN  $^{13}\text{C}$  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  8,43 ( $\text{CH}_3$ ); 11,36 ( $\text{CH}_3$ ); 14,11 ( $\text{CH}_3$ ); 29,42 ( $\text{CH}_2$ ); 34,36 ( $\text{CH}_3$ -tim); 60,86 ( $\text{CH}_2$ -O); 109,75 ( $\text{C}(\text{H}_4$ -pz); 121,33 ( $\text{C}_{\text{tim}}$ ); 122,11 ( $\text{C}_{\text{tim}}$ ); 143,58 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}$ -pz)); 147,90 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}$ -pz)); 164,07 ( $\text{C}=\text{S}$ ); 171,03 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 191,82 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 193,80 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 194,15 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ).

RMN  $^{11}\text{B}$  (96,169 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{B}}$  25,04 (m).

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1909, 1933, 2026 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 2478 (B-H).

Análise Elementar: C 33,63; H 4,03; N 9,54,  $\text{ReBC}_{16}\text{N}_4\text{H}_{20}\text{SO}_5$ , requer C 33,63; H 3,49, N 9,70.

#### 6.4.2.4. *fac*- $[\text{Re}\{\kappa^3\text{-H}(\mu\text{-H})\text{B}(\text{tim}^{\text{Me}})(3,5\text{-Me}_2\text{-pz})\}(\text{CO})_3]$ , Re1



Por reacção do complexo 1 com 3,5-Me<sub>2</sub>pZH

O complexo Re1 foi sintetizado e purificado como atrás descrito para o complexo 2, a partir de 75 mg de 1 (0,188 mmol) e 18 mg de 3,5-dimetilpirazolo (0,188 mmol). Após purificação, o complexo Re1 foi obtido como um sólido branco. Rendimento: 71 mg (0,141 mmol; 75%).

Por reacção do precursor *fac*- $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  com L<sup>1</sup>

A uma solução de L<sup>1</sup> (36 mg; 0,120 mmol) em H<sub>2</sub>O (7 mL) adicionou-se  $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$  (60 mg; 0,120 mmol). A mistura reaccional resultante foi deixada em agitação constante à temperatura ambiente durante 3 h. Findo este tempo verificou-se a formação de um precipitado amarelo que foi recuperado por filtração e lavado com H<sub>2</sub>O. O sólido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /n-hexano, 50/50). Após evaporação das fracções recolhidas, o complexo Re1 foi obtido sob a forma de um sólido branco. Rendimento: 30 mg (0,061 mmol; 51%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  -4,19 (1H, m, B-H...Re); 2,03 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 2,08 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -pz); 3,50 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -N); 5,72 (1H, s,  $\text{H}_4$ -pz); 6,97 (1H, d,  $J_{\text{H-H}} = 2,4$  Hz, CH); 7,10 (1H, d,  $J_{\text{H-H}} = 1,8$  Hz, CH).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  9,87 ( $\text{CH}_3$ -pz); 13,00 ( $\text{CH}_3$ -pz); 34,41 ( $\text{CH}_3$ -tim); 105,70 ( $\text{C}(\text{H}_4$ -pz); 121,37 ( $\text{C}_{\text{tim}}$ ); 122,06 ( $\text{C}_{\text{tim}}$ ); 145,12 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}$ -pz)); 149,11 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}$ -pz)); 164,08 ( $\text{C}=\text{S}$ ); 191,93 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 193,82 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 194,25 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ).

RMN  $^{11}\text{B}$  (96,169 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{B}}$  27,5 (q,  $J_{\text{B-H}}=77$  Hz).

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1891, 1932, 2026 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 2468 (B-H).

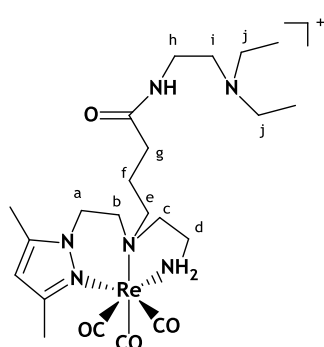
Análise Elementar: C 29,28; H 3,01; N 11,49; S 3,05,  $\text{ReBC}_{12}\text{N}_4\text{H}_{14}\text{SO}_3$ , requer C 29,33; H 2,87; N, 11,40; S 6,52.

HPLC:  $t_{\text{R}}=24,40$  min.

### 6.4.3. Síntese e caracterização dos complexos Re2-Re23

Os complexos de **Re2-Re23** foram obtidos fazendo reagir o complexo *fac*-[Re(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]Br com os respectivos ligandos, na razão molar 1:1. Após reacção à temperatura de refluxo, em MeOH (**Re2-Re19**) ou H<sub>2</sub>O (**Re21-Re23**), as reacções foram controladas por HPLC e o solvente foi evaporado sob vácuo, originando os complexos cuja purificação e caracterização se apresenta seguidamente.

#### 6.4.3.1. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>2</sup>)](CF<sub>3</sub>COO), Re2



**Re2** foi purificado por recristalização a frio a partir de uma mistura de MeOH/éter dietílico, tendo sido obtido sob a forma de um sólido branco. Rendimento: 36 mg (0,05 mmol; 45%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 1,34 (6H, t, 2 CH<sub>3</sub>); 2,05 (1H, m, CH<sub>2</sub> (f)); 2,20 (1H, m, CH<sub>2</sub> (f)); 2,37 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,41 (2H, t, CH<sub>2</sub> (e)); 2,44 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,58 (1H, m, CH<sub>2</sub> (d)); 2,72 (1H, m, CH<sub>2</sub> (b)); 2,90 (2H, m, CH<sub>2</sub> (c)); 3,17 (1H, m, CH<sub>2</sub> (d)); 3,31 (8H, m, 2 CH<sub>2</sub> (j) + CH<sub>2</sub> (i)); 3,41 (1H, m, CH<sub>2</sub> (g)); 3,60 (3H, m, CH<sub>2</sub> (h) + CH<sub>2</sub> (b)); 3,72 (1H, m, CH<sub>2</sub> (g)); 4,10 (1H, bs, NH<sub>2</sub>); 4,21 (1H, m, CH<sub>2</sub> (a)); 4,56 (1H, m, CH<sub>2</sub> (a)); 5,54 (1H, bs, NH); 6,19 (1H, s, H<sub>4</sub>-pz).

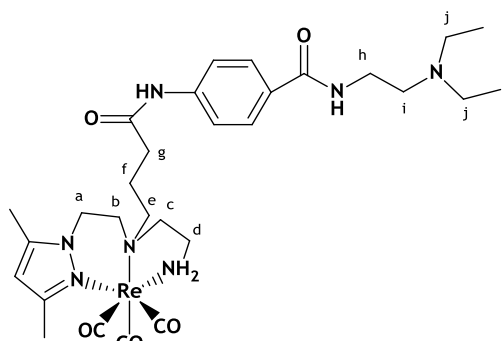
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 9,23 (2CH<sub>3</sub>); 11,62 (CH<sub>3</sub>-pz); 16,10 (CH<sub>3</sub>-pz); 21,01 (CH<sub>2</sub>(f)); 33,33 (CH<sub>2</sub>(g)); 35,77 (CH<sub>2</sub>(h)); 43,72 (CH<sub>2</sub>(d)); 48,97 (CH<sub>2</sub>(a)); 49,83 (CH<sub>2</sub>(b)); 52,57 (CH<sub>2</sub>(j)); 53,88 (CH<sub>2</sub>(i)); 62,55 (CH<sub>2</sub>(c)); 67,30 (CH<sub>2</sub>(e)); 116,87 (C<sub>TFA</sub>); 145,36 (C<sub>3/5</sub>-pz); 155,10 (C<sub>3/5</sub>-pz); 165,35 (C<sub>TFA</sub>); 175,90 (C=O); 193,72 (C≡O); 194,90 (C≡O); 195,27 (C≡O).

**IV** (KBr), ν<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1735 (C=O); 1931 (C≡O); 2028 (C≡O).

**Análise Elementar:** C, 31,66; H, 2,91; N 6,39; ReC<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>F<sub>3</sub>O<sub>6</sub>. 5CF<sub>3</sub>COOH requer C, 31,71; H, 3,37; N, 6,53.

**HR ESI-MS (m/z):** 638,27338 [M]<sup>+</sup>, calculada para ReC<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> = 638,25072.

**HPLC:** t<sub>R</sub> = 17,10 min.

6.4.3.2. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>3</sup>)](CF<sub>3</sub>COO), Re3

Re3 foi purificado por lavagens com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e n-hexano, tendo sido obtido sob a forma de um sólido branco. Rendimento: 249 mg (0,33 mmol; 67%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 1,34 (6H, t, CH<sub>3</sub>); 2,12 (2H, m, CH<sub>2</sub>(f)); 2,37 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,53 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,67 (3H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(e)); 2,76 (1H, m, CH<sub>2</sub>(d)); 2,89 (2H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(c)); 3,19 (1H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 3,39 (4H, q, 2CH<sub>2</sub>(j)); 3,54 (2H, m, CH<sub>2</sub>(i)); 3,67-3,75 (5H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(g)+CH<sub>2</sub>(h)); 3,92 (1H, m, NH); 4,22 (1H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 4,54 (1H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 5,53 (1H, m, NH); 6,20 (1H, s, H<sub>4</sub>-pz); 7,71-7,87 (4H, m, Aromático).

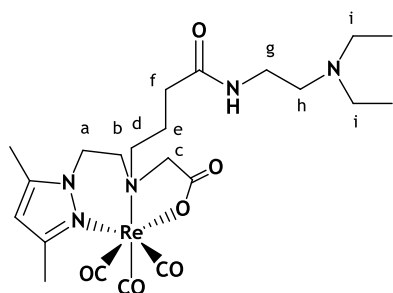
RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 9,10 (CH<sub>3</sub>); 11,53 (CH<sub>3</sub>); 13,16 (CH<sub>3</sub>); 20,82 (CH<sub>2</sub>); 34,21 (CH<sub>2</sub>); 36,43 (CH<sub>2</sub>); 43,70 (CH<sub>2</sub>); 46,96 (CH<sub>2</sub>); 49,10 (CH<sub>2</sub>); 53,05 (CH<sub>2</sub>); 53,80 (CH<sub>2</sub>); 62,43 (CH<sub>2</sub>); 67,22 (CH<sub>2</sub>); 109,29 (C<sub>4</sub>-pz); 116,3 (C<sub>aromático</sub>); 120,04 (C<sub>TFA</sub>); 120,36 (C<sub>aromático</sub>); 129,40 (C<sub>aromático</sub>); 143,65 (C<sub>3/5</sub>-pz); 145,33 (C<sub>aromático</sub>); 155,13 (C<sub>3/5</sub>-pz); 165,78 (C<sub>TFA</sub>); 170,62 (C=O); 174,6 (C=O); 190,72 (C≡O); 193,67 (C≡O); 195,32 (C≡O).

IV KBr; ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1667, 1701 (C=O), 1942, 2017 (C≡O).

Análise Elementar: C, 41,7 5; H, 5,07; N 10,55; ReC<sub>31</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>F.CF<sub>3</sub>COOH requer C 41,86; H 4,90; N 10,35.

ESI/MS (+) (m/z): 378,5 [M]<sup>2+</sup>, calculada para ReC<sub>29</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub> = 757,3.

HPLC: t<sub>R</sub>=18,50 min.

6.4.3.3. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>4</sup>)], Re4

Re4 foi purificado por lavagens com H<sub>2</sub>O, tendo sido obtido sob a forma de um sólido branco. Rendimento: 60 mg (0,078 mmol; 71%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 1,37 (6H, t, 2CH<sub>3</sub>); 2,08 (2H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 2,36 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,48 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,56 (1H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 3,43 (6H, m, CH<sub>2</sub>(h) + 2CH<sub>2</sub>(i)); 3,53 (5H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(f)+CH<sub>2</sub>(g)); 3,71 (1H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 3,73 (1H, s, CH<sub>2</sub>(c)); 4,30 (1H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 4,48 (1H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 6,16 (1H, s, H<sub>4</sub>-pz).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 9,27 (2 CH<sub>3</sub>); 11,46 (CH<sub>3</sub>-pz); 15,86 (CH<sub>3</sub>-pz); 20,51 (CH<sub>2</sub>(e)); 33,19 (CH<sub>2</sub>(f)); 35,80 (CH<sub>2</sub>(g)); 46,80 (CH<sub>2</sub>(a)); 48,15 (CH<sub>2</sub>(i)); 52,66 (CH<sub>2</sub>(h));

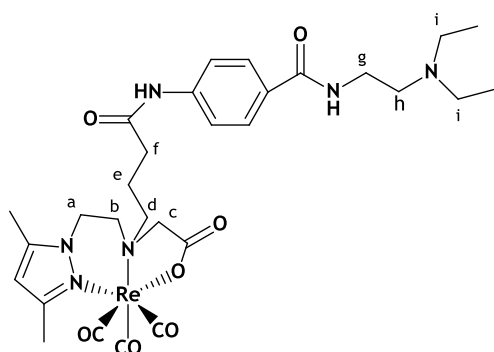
56,64 (CH<sub>2</sub>(b)); 63,80 (CH<sub>2</sub>(c)); 66,31 (CH<sub>2</sub>(d)); 108,79 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 145,13 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 155,17 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 175,89 (C=O); 181,65 (C=O); 195,24 (C≡O); 196,40 (C≡O); 196,97 (C≡O).

IV KBr,  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1629, 1645 (C≡O); 1971, 2020 (C≡O).

HR ESI-MS (m/z): 652,21636 [M+H]<sup>+</sup>, calculada para ReC<sub>22</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> = 652,21637.

HPLC:  $t_R$  = 19,03 min.

#### 6.4.3.4. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>5</sup>)], Re5



Re5 foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 80/18/2), tendo sido obtido sob a forma de um sólido branco. Rendimento: 45 mg (0,072 mmol; 65%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  1,30 (6H, t, 2CH<sub>3</sub>); 2,23 (2H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 2,33 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,46 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,53 (3H, m, CH<sub>2</sub>(d) + CH(b)); 3,24 (2H, m, CH<sub>2</sub>(h)); 3,34 (4H, m, CH<sub>2</sub>(i)); 3,42 (1H, m,

CH<sub>2</sub>(c)); 3,52 (3H, m, CH<sub>2</sub>(b) + CH<sub>2</sub>(f)); 3,65 (1H, m, CH<sub>2</sub>(c)); 3,73 (2H, m, CH<sub>2</sub>(g)); 4,27 (1H, m, CH(a)); 4,49 (1H, m, CH(a)); 6,13 (1H, s, H<sub>4</sub>-pz); 7,72 (2H, d, C<sub>aromáticos</sub>); 7,85 (2H, d, C<sub>aromáticos</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_c$  9,23 (2 CH<sub>3</sub>); 11,38 (CH<sub>3</sub>-pz); 15,84 (CH<sub>3</sub>-pz); 20,44 (CH<sub>2</sub>(e)); 34,27 (CH<sub>2</sub>(d)); 36,46 (CH<sub>2</sub>(g)); 46,76 (CH<sub>2</sub>(a)); 49,11 (CH<sub>2</sub>(i)); 53,06 (CH<sub>2</sub>(b)); 56,56 (CH<sub>2</sub>(f)); 63,80 (CH<sub>2</sub>(h)); 66,29 (CH<sub>2</sub>(c)); 108,79 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 120,36 (C<sub>aromático</sub>); 129,33 (C<sub>aromático</sub>); 129,48 (C<sub>aromático</sub>); 143,6 (C<sub>aromático</sub>); 143,60 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 145,12 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 170,59 (C=O); 173,05 (C=O); 181,69 (C=O); 195,23 (C≡O); 196,27 (C≡O); 196,94 (C≡O).

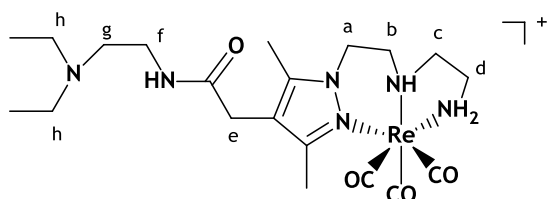
IV KBr,  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1653 (C=O); 1909, 2024 (C≡O).

HR ESI-MS (m/z): 771,25395 [M+H]<sup>+</sup>, calculada para ReC<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> = 771,25397.

HPLC:  $t_R$  = 20,07 min.

$R_f$  (sílica-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (80/18/2)) = 0,73.

#### 6.4.3.5. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>6</sup>)](CF<sub>3</sub>COO), Re6



Re6 foi purificado por HPLC utilizando uma coluna preparativa Waters  $\mu$  Bondapak C18 (150 × 19 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 254 nm (eluentes: A - TFA 0,1%; B - MeOH; 0-3 min, 100% A; 3-3,1 min, 100%-75%

A; 3,1-4 min, 75% A; 4-7 min 75%-25% A; 7-21 min, 25% A; 21-21,1 min, 25%-0% A; 21,1-26 min, 0% A; 26-26,1 min 0-100% A; 26,1-30 min, 100% A ( $t_R = 24,3$  min)). Após purificação, **Re6** foi obtido sob a forma de um óleo transparente. Rendimento: 12 mg (0,02 mmol; 20%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,28 (6H, t, 2  $\text{CH}_3$ ); 2,31 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,39 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,55 (3H, m,  $\text{CH}_2(\text{b}) + \text{CH}_2(\text{c}) + \text{CH}_2(\text{d})$ ); 2,87 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{c}) + \text{CH}_2(\text{d})$ ); 3,24 (6H, m,  $\text{CH}_2(\text{g}) + 2 \text{CH}_2(\text{h})$ ); 3,46 (2H, s,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 3,58 (2H, m,  $2\text{CH}_2(\text{f})$ ); 3,89 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 4,11 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 4,51 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 5,44 (1H, bs, NH); 6,94 (1H, bs, NH).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  7,92 ( $\text{CH}_3$ ); 9,13 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 13,27 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 29,82 ( $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 34,69 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 41,97 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 46,98 ( $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 47,55 ( $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 48,80 ( $\text{CH}_2(\text{h})$ ); 51,00 ( $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 54,69 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 112,39 (C-( $\text{H}_4\text{-pz}$ )); 142,68 (C-( $\text{H}_{3/5}\text{-pz}$ )); 152,44 (C-( $\text{H}_{3/5}\text{-pz}$ )); 173,0 (C=O); 195,77 (C $\equiv$ O); 197,00 (C $\equiv$ O); 197,80 (C $\equiv$ O).

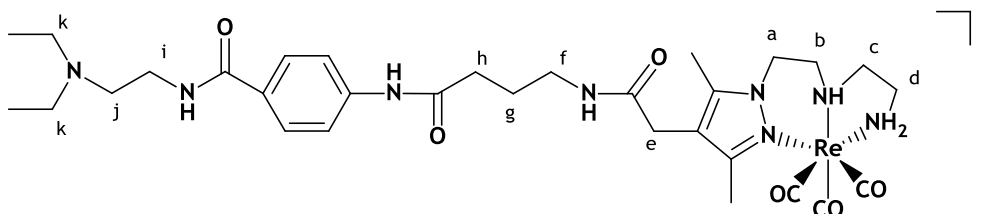
IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1696 (C=O); 1923, 2026 (C $\equiv$ O).

**Análise Elementar:** C 32,84; H 3,92; N 8,84,  $\text{ReC}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{F}_3\text{O}_6 \cdot 2 \text{CF}_3\text{COOH}$ , requer C, 32,88; H, 3,82; N, 8,85.

**HR ESI-MS** (m/z): 609,24015  $[\text{M}]^+$ , calculada para  $\text{ReC}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_4 = 609,21941$ .

**HPLC:**  $t_R=16,53$  min.

#### 6.4.3.6. *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L}^7)](\text{CF}_3\text{COO})$ , **Re7**



**Re7** foi purificado por lavagens com uma mistura n-hexano/éter dietílico, tendo sido obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 150 mg (0,08 mmol; 42%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,21 (6H, t, 2 $\text{CH}_3$ ); 1,81 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 2,16 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,25 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,32 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{h})$ ); 2,42 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{c}) + \text{CH}_2(\text{d})$ ); 2,74 (3H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})+\text{CH}_2(\text{c})+\text{CH}_2(\text{d})$ ); 3,26 (10H, m,  $\text{CH}_2(\text{e}) + \text{CH}_2(\text{f}) + \text{CH}_2(\text{j}) + 2 \text{CH}_2(\text{k})$ ); 3,64 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{i})$ ); 3,98 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 3,97 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 4,41 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 7,59 (2H, d,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ); 7,71 (2H, d,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  8,03 ( $\text{CH}_3$ ); 9,22 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 13,33 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 25,16 ( $\text{CH}_2$ ); 30,13 ( $\text{CH}_2$ ); 34,15 ( $\text{CH}_2$ ); 35,19 ( $\text{CH}_2$ ); 38,95 ( $\text{CH}_2$ ); 42,09 ( $\text{CH}_2$ ); 47,05 ( $\text{CH}_2$ ); 47,90 ( $\text{CH}_2$ ); 48,80 ( $\text{CH}_2$ ); 51,85 ( $\text{CH}_2$ ); 54,70 ( $\text{CH}_2$ ); 112,85 (C-( $\text{H}_4\text{-pz}$ )); 115,07 ( $\text{C}_{\text{TFA}}$ ); 119,11 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 128,11 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 128,29 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 142,52 (C( $\text{H}_{3/5}\text{-pz}$ )); 142,57 ( $\text{C}_{\text{aromático}}$ ); 152,32 (C( $\text{H}_{3/5}\text{-pz}$ )); 160,23 ( $\text{C}_{\text{TFA}}$ ); 169,46 (C=O); 171,85 (C=O); 172,88 (C=O); 192,97 (C $\equiv$ O); 193,44 (C $\equiv$ O); 194,17 (C $\equiv$ O).

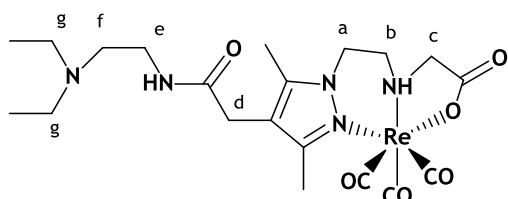
IV KBr,  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1677, 1694 (C=O); 1923, 2032 (C≡O).

Análise Elementar: C 34,50; H 3,50; N 7,48;  $\text{ReC}_{33}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{F}_3\text{O}_8 \cdot 4 \text{CF}_3\text{COOH}$ , requer C 34,52; H 3,44; N 7,49.

HR ESI-MS (m/z): 813,34603  $[\text{M}]^+$ , calculada para  $\text{ReC}_{31}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{O}_6 = 813,30936$ .

HPLC:  $t_R = 18,10$  min.

#### 6.4.3.7. *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L}^8)]$ , Re8



Re8 foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 75/23/2), tendo sido obtido sob a forma de um sólido amarelo. Rendimento: 18 mg (0,029 mmol; 24%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,28 (6H, t, 2  $\text{CH}_3$ ); 2,32 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,39 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 2,45 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 3,20 (6H, m,  $\text{CH}_2(\text{f}) + 2 \text{CH}_2(\text{g})$ ); 3,35 (2H, s,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 3,45 (2H, s,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 3,57 (2H, t,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 3,66 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 4,17 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 4,47 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ).

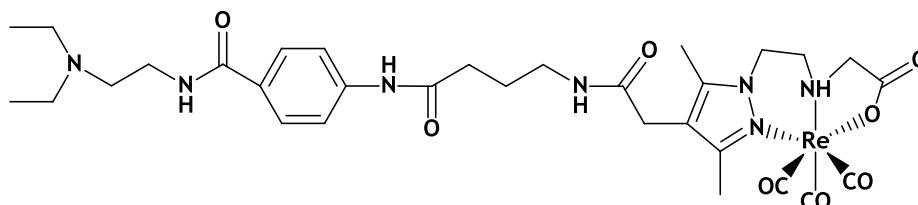
RMN  $^{13}\text{C}$  (75,373 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  10,18 ( $\text{CH}_3$ ); 11,11 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 13,19 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 31,24 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 36,30 ( $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 47,47 ( $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 49,40 ( $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 50,45 ( $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 52,61 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 56,24 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 113,24 (C- $\text{H}_4\text{-pz}$ ); 143,62 (C- $\text{H}_{3/5}\text{-pz}$ ); 153,70 (C- $\text{H}_{3/5}\text{-pz}$ ); 174,18 (C=O); 182,82 (C=O); 195,33 (C≡O); 195,88 (C≡O); 196,35 (C≡O).

IV KBr,  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1665, 1670 (C=O); 1919, 2023 (C≡O).

HR ESI-MS (m/z): 624,18313  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{ReC}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_6 = 624,18311$ .

HPLC:  $t_R = 18,18$  min.

#### 6.4.3.8. *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L}^9)]$ , Re9



Re9 foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 80/18/2) e obtido sob a forma de sólido amarelo. Rendimento: 26 mg (0,034 mmol; 56%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,17 (6H, t, 2  $\text{CH}_3$ ); 1,87 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 2,26 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,35 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 2,41 (3H, s, 2 $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,89 (6H, m, 3  $\text{CH}_2$ ); 3,33 (6H, m, 3  $\text{CH}_2$ ); 3,61

(4H, m, 2-CH<sub>2</sub>); 4,11 (1H, m, CH(a)); 4,48 (1H, m, CH(a)); 7,67 (2H, d, H<sub>aromáticos</sub>); 7,80 (2H, d, H<sub>aromáticos</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>c</sub> 8,97 (CH<sub>3</sub>); 9,42 (CH<sub>3</sub>-pz); 12,76 (CH<sub>3</sub>-pz); 25,13 (CH<sub>2</sub>); 30,17 (CH<sub>2</sub>); 34,03 (CH<sub>2</sub>); 36,32 (CH<sub>2</sub>); 38,93 (CH<sub>2</sub>); 47,37 (CH<sub>2</sub>); 49,09 (CH<sub>2</sub>); 50,93 (CH<sub>2</sub>); 51,57 (CH<sub>2</sub>); 55,08 (CH<sub>2</sub>); 112,48 (C-(H<sub>4</sub>-pz)); 119,11 (C<sub>aromático</sub>); 128,09 (C<sub>aromático</sub>); 128,81 (C<sub>aromático</sub>); 142,30 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 142,40 (C<sub>aromático</sub>); 152,46 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 168,83 (C=O); 171,83 (C=O); 172,80 (C=O); 181,65 (C=O); 191,65 (C≡O); 194,20 (C≡O); 195,18 (C≡O).

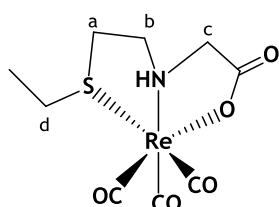
IV KBr, ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1648, 1677, 1692 (C=O); 1945, 2019 (C≡O).

HR ESI-MS (m/z): 827,27782 [M+H]<sup>+</sup>, calculada para ReC<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub> = 827,27686.

HPLC: t<sub>R</sub>=19,18 min.

R<sub>f</sub> (silica-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (80/18/2)) = 0,73.

#### 6.4.3.9. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>10</sup>)], Re10



Re10 foi purificado por HPLC, usando uma coluna preparativa Waters μ Bondapak C18 (150 × 19 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-5 min, 75% A; 5-30 min, 75%-50% A; 30-30,1 min, 50%-0% A; 30,1-38 min 0% A), tendo sido obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 28 mg (0,043 mmol; 25%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T=20 °C δ<sub>H</sub> 1,39 (3H, t, CH<sub>3</sub>); 2,31, 2,46 (1H, br, CH<sub>2</sub>(a)); 2,90-3,06 (4H, m, CH<sub>2</sub>(a)+CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(d)); 3,28-3,46 (2H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(c)); 3,64-3,71 (1H, m, CH<sub>2</sub>(c)); 7,18, 7,37 (1H, br, NH); T=60 °C δ<sub>H</sub> 1,40 (3H, t, CH<sub>3</sub>); 2,44 (1H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 2,97 (4H, m, CH<sub>2</sub>(a)+CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(d)); 3,36-3,41 (2H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(c)); 3,72 (1H, m, CH<sub>2</sub>(c)); 7,25 (1H, br, NH).

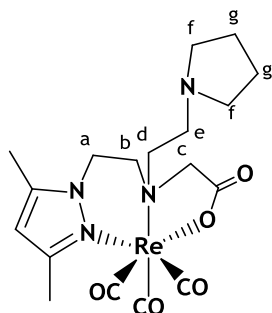
RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T= 20 °C δ<sub>c</sub> 13,56 (CH<sub>3</sub>); 30,65, 31,05 (CH<sub>2</sub>(a)); 33,00, 33,74 (CH<sub>2</sub>(d)); 54,68, 55,30 (CH<sub>2</sub>(c)); 56,16, 56,84 (CH<sub>2</sub>(b)); 116,35 (C<sub>TFA</sub>); 164,01 (C<sub>TFA</sub>); 184,02 (C=O); 192,66, 194,89, 196,04 (C≡O); T= 60 °C δ<sub>c</sub> 13,47 (CH<sub>3</sub>); 30,91 (br, CH<sub>2</sub>(a)+CH<sub>2</sub>(d)); 55,06 (CH<sub>2</sub>(c)); 56,39 (CH<sub>2</sub>(b)); 183,62 (C=O); 192,61, 195,87 (C≡O).

IV KBr, ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1637(C=O); 1876, 1910, 2027 (C≡O).

Análise Elementar: C 23,41; H 3,06; N 2,29; S 5,00; ReC<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>5</sub>S.2 CF<sub>3</sub>COOH requer C 23,64; H 2,14; N 2,12; S 4,85.

ESI/MS (+) (m/z): 433,9 [M+H]<sup>+</sup> calculada para ReC<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>5</sub>S = 434,0.

HPLC: t<sub>R</sub>=18,37 min.

6.4.3.10. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>11</sup>)], Re11

**Re11** foi purificado por HPLC, usando uma coluna preparativa Waters  $\mu$  Bondapak C18 (150  $\times$  19 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-5 min, 75% A; 5-30 min, 75%-50% A; 30-30,1 min, 50%-0% A; 30,1-38 min 0% A ( $t_R$  = 22,65 min)), tendo sido obtido sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 83 mg (0,11 mmol; 79%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  2,03 (4H, t, 2CH<sub>2</sub>(g)); 2,33 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,48 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,59 (2H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 3,35 (1H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 3,47 (4H, m, 2 CH<sub>2</sub>(f)); 3,53 (1H, m, CH<sub>2</sub>(c)); 3,74 (2H, m, CH<sub>2</sub>(d)); 3,82 (1H, m, CH<sub>2</sub>(c)); 3,90 (1H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 4,35 (2H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 6,16 (1H, s, H<sub>4</sub>-pz).

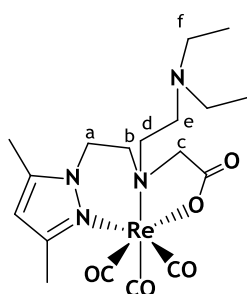
**RMN <sup>13</sup>C** (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  9,34 (CH<sub>3</sub>-pz); 13,97 (CH<sub>3</sub>-pz); 22,01 (CH<sub>2</sub>(g)); 44,53 (CH<sub>2</sub>(a)); 48,15 (CH<sub>2</sub>(e)); 53,76 (CH<sub>2</sub>(f)); 55,20 (CH<sub>2</sub>(d)); 58,83 (CH<sub>2</sub>(b)); 61,48 (CH<sub>2</sub>(c)); 106,93 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 116,27 (C<sub>TFA</sub>); 143,37 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 153,44 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 160,14 (C<sub>TFA</sub>); 178,86 (C=O); 192,85 (C $\equiv$ O); 193,87 (C $\equiv$ O); 194,48 (C $\equiv$ O).

**IV KBr**,  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 1677 (C=O); 1901, 2026 (C $\equiv$ O).

**Análise Elementar**: C 33,26; H 3,45; N 7,37, ReC<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>.2 CF<sub>3</sub>COOH requer C 33,38; H 3,44; N 7,08.

**ESI/MS (+)** (m/z): 565,2 [M+H]<sup>+</sup> calculada para ReC<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> = 565,1.

**HPLC**:  $t_R$ =17,56 min.

6.4.3.11. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>12</sup>)], Re12

**Re12** foi purificado por HPLC, usando uma coluna preparativa Waters  $\mu$  Bondapak C18 (150  $\times$  19 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-3 min, 100% A; 3-3.1 min, 100%-75% A; 3.1-9 min, 75% A; 9-9.1 min 75%-66% A; 9.1-20 min, 66%-0% A; 20-25 min, 0% A; 25-25.1 min, 0%-100% A; 25.1-30 min, 100% A ( $t_R$ = 22,98 min)), tendo sido obtido na forma de óleo amarelo. Rendimento: 42 mg (0,062 mmol; 61%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  1,37 (6H, t, 2-CH<sub>3</sub>); 2,33 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,48 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,64 (2H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 3,45 (1H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 3,48 (4H, m, 2 CH<sub>2</sub>(f)); 3,58 (3H, m, CH<sub>2</sub>(d) + CH<sub>2</sub>(c)); 3,84 (2H, m, CH<sub>2</sub>(d)+ CH<sub>2</sub>(c)); 4,36 (2H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 6,16 (1H, s, H<sub>4</sub>-pz).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_c$  9,18 (2  $\text{CH}_3$ ); 11,35 ( $\text{CH}_3$ -pz); 15,95 ( $\text{CH}_3$ -pz); 46,52 ( $\text{CH(a)}$ ); 46,97 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 51,17 ( $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 57,49 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 60,27 ( $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 63,47 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 108,99 ( $\text{C(H}_4\text{-pz)}$ ); 115,47 ( $\text{C}_{\text{TFA}}$ ); 145,36 ( $\text{C(H}_{3/5}\text{-pz)}$ ); 155,50 ( $\text{C(H}_{3/5}\text{-pz)}$ ); 160,14 ( $\text{C}_{\text{TFA}}$ ); 180,77 ( $\text{C=O}$ ); 195,58 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 196,61 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 197,35 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ).

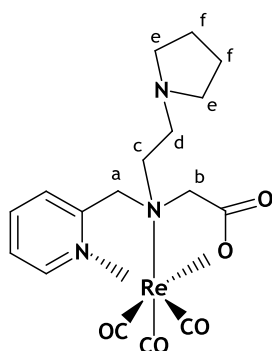
**IV KBr**,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1675( $\text{C=O}$ ); 1934, 2024 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ).

**Análise Elementar**: C 35,16; H 4,45; N 8,37,  $\text{ReC}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$  requer C 35,24; H 4,15; N 8,24.

**ESI/MS (+) (m/z)**: 566,9  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{ReC}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5 = 567,2$ .

**HPLC**:  $t_{\text{R}}=18,82$  min.

#### 6.4.3.12. *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L}^{13})]$ , Re13



**Re13** foi purificado por HPLC, usando uma coluna preparativa Waters  $\mu$  Bondapak C18 (150  $\times$  19 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-5 min, 75% A; 5-30 min, 75%-50% A; 30-30,1 min, 50%-0% A; 30,1-38 min 0% A ( $t_{\text{R}}= 15,12$  min)), tendo sido obtido na forma de um óleo amarelo. Rendimento: 55 mg (0,063 mmol; 39%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  2,13 (4H, m, 2- $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 3,57 (1H, d,  $\text{CH}_2$  (b)); 3,90 (6H, m, 2- $\text{CH}_2(\text{e})+\text{CH}_2(\text{d})$ ); 4,03 (3H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})+\text{CH}_2(\text{c})$ ); 4,65 (1H, d,  $\text{CH}_2$  (a)); 4,80 (1H, d,  $\text{CH}_2$  (a)); 7,58 (1H, t,  $\text{H}_{\text{py}}$ ); 7,72 (1H, d,  $\text{H}_{\text{py}}$ ); 8,15 (1H, t,  $\text{H}_{\text{py}}$ ); 8,83 (1H, d,  $\text{H}_{\text{py}}$ ).

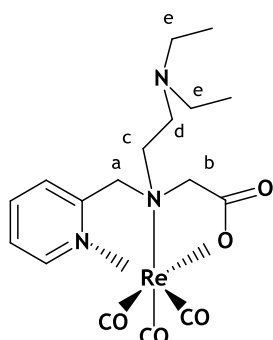
**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_c$  22,01 ( $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 48,83 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 53,82 ( $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 59,53 ( $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 62,55 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 67,12 ( $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 115,34 ( $\text{C}_{\text{TFA}}$ ); 123,19 ( $\text{C}_{\text{py}}$ ); 125,30 ( $\text{C}_{\text{py}}$ ); 139,94 ( $\text{C}_{\text{py}}$ ); 151,60 ( $\text{C}_{\text{py}}$ ); 157,92 ( $\text{C}_{\text{py}}$ ); 160,02 ( $\text{C}_{\text{TFA}}$ ); 180,38 ( $\text{C=O}$ ); 194,85 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 195,49 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 195,71 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ).

**IV KBr**,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1679( $\text{C=O}$ ); 1906, 2029 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ).

**Análise Elementar**: C 31,53; H 4,89; N 2,91,  $\text{ReC}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5 \cdot 3 \text{CF}_3\text{COOH}$  requer C 31,55; H 2,76; N 4,80.

**ESI/MS (+) (m/z)**: 534,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{ReC}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5 = 534,1$ .

**HPLC**:  $t_{\text{R}}=15,40$  min.

6.4.3.13. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>14</sup>)], Re14

Re14 foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 70/28/2) tendo sido obtido na forma de sólido amarelo. Rendimento: 50 mg (0,091 mmol; 55%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>H</sub> 1,10 (6H, t, 2-CH<sub>3</sub>); 2,68 (4H, m, 2 CH<sub>2</sub>(e)); 2,94 (2H, m, CH<sub>2</sub>(d)); 3,49 (1H, d, CH<sub>2</sub>(b)); 3,70 (2H, m, CH<sub>2</sub>(c)); 4,03 (1H, d, CH<sub>2</sub>(b)); 4,60 (1H, d, CH<sub>2</sub>(a)); 4,76 (1H, d, CH<sub>2</sub>(a)); 7,53 (1H, t, H<sub>py</sub>); 7,69 (1H, d, H<sub>py</sub>); 8,08 (1H, t, H<sub>py</sub>); 8,80 (1H,

d, H<sub>py</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 11,69 (CH<sub>3</sub>); 48,12 (CH<sub>2</sub>(e)); 50,17 (CH<sub>2</sub>(d)); 62,09 (CH<sub>2</sub>(c)); 68,05 (CH<sub>2</sub>(b)); 69,64 (CH<sub>2</sub>(a)); 125,00 (C<sub>py</sub>); 127,00 (C<sub>py</sub>); 141,69 (C<sub>py</sub>); 153,55 (C<sub>py</sub>); 160,72 (C<sub>py</sub>); 183,17 (C=O); 195,63 (C≡O); 196,39 (C≡O); 196,61 (C≡O).

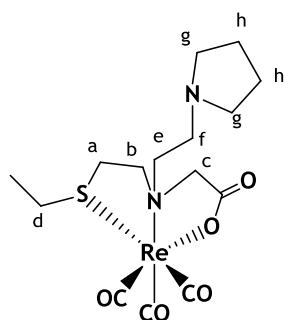
IV KBr, ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 1652(C=O); 1876, 2019 (C≡O).

Análise Elementar: C 38,52; H 4,34; N 7,62, ReC<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> requer C 38,20; H 4,15; N 7,86.

ESI/MS (+) (m/z): 536,0 [M+H]<sup>+</sup>, calculada para ReC<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> = 536,0.

HPLC: t<sub>R</sub>=16,35 min.

R<sub>f</sub> (sílica-gel, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH (70/28/2)) = 0,72.

6.4.3.14. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>15</sup>)], Re15

Re15 foi purificado por HPLC, usando uma coluna preparativa Waters μ Bondapak C18 (150 × 19 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-5 min, 75% A; 5-30 min, 75%-50% A; 30-30,1 min, 50%-0% A; 30,1-38 min 0% A (t<sub>R</sub> = 16,75 min)), tendo sido obtido na forma de um óleo amarelo. Rendimento: 76 mg (0,100 mmol; 59%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T=20 °C δ<sub>H</sub> 1,34-1,45 (3H, m, CH<sub>3</sub>); 2,11 (4H, m, CH<sub>2</sub>); 2,58-4,04 (16H, m).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T=20 °C δ<sub>C</sub> 12,10, 12,24 (CH<sub>3</sub>); 22,84, 28,71, 31,87, 32,27, 33,71, 49,63, 54,37, 54,64, 60,21, 60,82, 61,86, 63,49 (CH<sub>2</sub>); 114,31 (C<sub>TFA</sub>); 160,39 (C<sub>TFA</sub>); 180,72, 180,96 (C=O); 191,45, 191,80, 193,61, 195,22 (C≡O); T=60 °C δ<sub>C</sub> 11,28 (CH<sub>3</sub>); 21,99 (CH<sub>2</sub>); 28,98 (br, CH<sub>2</sub>); 31,68, 31,99, 33,19 (br, CH<sub>2</sub>); 48,98 (CH<sub>2</sub>); 53,84 (CH<sub>2</sub>); 59,49 (CH<sub>2</sub>); 61,35, 62,45 (br, CH<sub>2</sub>); 63,40 (br, CH<sub>2</sub>); 114,27 (C<sub>TFA</sub>); 160,34 (C<sub>TFA</sub>); 180,67 (C=O); 190,76, 193,57 (C≡O).

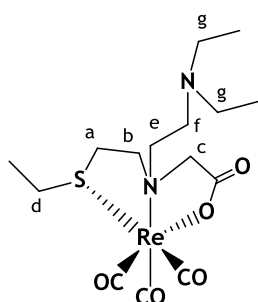
IV KBr,  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1677(C=O); 1906, 2031 (C≡O).

Análise Elementar: C 30,32; H 4,34; N 4,05; S 4,43;  $\text{ReC}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5\text{S} \cdot 2 \text{CF}_3\text{COOH}$  requer C 30,12; H 3,33; N 3,70; S 4,23.

ESI/MS (+) (m/z): 531,2 [M+H]<sup>+</sup>, calculada para  $\text{ReC}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S} = 531,1$ .

HPLC:  $t_R=16,85$  min.

#### 6.4.3.15. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>16</sup>)], Re16



**Re16** foi purificado por HPLC, usando uma coluna preparativa Waters  $\mu$  Bondapak C18 (150 × 19 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 254 nm (eluente: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-5 min, 75% A; 5-30 min, 75%-50% A; 30-30,1 min, 50%-0% A; 30,1-38 min 0% A ( $t_R=18,10$  min)), tendo sido obtido na forma de um óleo amarelo. Rendimento: 35 mg (0,054 mmol; 26%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T=20 °C  $\delta_H$  1,31-1,47 (9H, m, CH<sub>3</sub>); 2,66 (1H,m); 2,95 (1H, m); 3,14-4,02 (14H, m).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T=20 °C  $\delta_C$  9,05, 13,29, 13,44 (CH<sub>3</sub>); 29,88, 32,99, 33,35, 34,81, 48,92, 49,37, 61,28, 61,59, 61,82, 61,95, 63,03, 63,72 (CH<sub>2</sub>); 117,52 (C<sub>TFA</sub>); 161,72 (C<sub>TFA</sub>); 181,84, 182,17 (C=O); 192,65, 193,00, 194,74, 196,47 (C≡O); T=60 °C  $\delta_C$  9,13, 13,33 (CH<sub>3</sub>); 29,96, 30,86 (br, CH<sub>2</sub>); 33,58, 34,75 (br, CH<sub>2</sub>); 49,15 (CH<sub>2</sub>); 49,51 (CH<sub>2</sub>); 61,58 (CH<sub>2</sub>); 62,35 (br, CH<sub>2</sub>); 63,52 (br, CH<sub>2</sub>); 119,34 (C<sub>TFA</sub>); 162,34 (C<sub>TFA</sub>); 181,54 (C=O); 192,78, 194,47 (C≡O).

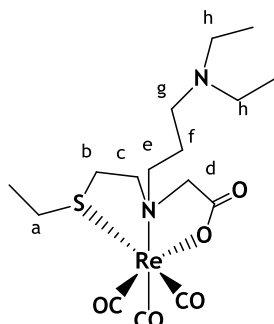
IV KBr,  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1687(C=O); 1866, 2037 (C≡O).

Análise Elementar: C 31,63; H 5,03; N 4,30; S, 4,27;  $\text{ReC}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5\text{S} \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$  requer C 31,62; H 4,06; N 4,34; S 4,97.

ESI/MS (+) (m/z): 533,0 [M+H]<sup>+</sup>, calculada para  $\text{ReC}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S} = 533,1$ .

HPLC:  $t_R=17,77$  min.

#### 6.4.3.16. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>17</sup>)], Re17



**Re17** foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/ NH<sub>4</sub>OH, 75/23/2), tendo sido obtido na forma de um óleo amarelo. Rendimento: 42 mg (0,08 mmol; 45%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T = 20 °C  $\delta_H$  1,15 (6H, m, CH<sub>3</sub>); 1,40 (3H, m, CH<sub>3</sub>); 1,70 (2H, m); 2,12 (2H, m); 2,65 (1H, m); 2,94 (2H, t); 3,08-3,97 (11H, m).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): T=20 °C  $\delta_c$  11,43, 13,23, 13,44 ( $\text{CH}_3$ ); 22,87, 23,17, 29,57, 32,93, 33,43, 35,04, 47,90, 50,70, 50,76, 61,28, 61,39, 62,32, 63,43, 67,33, 69,23 ( $\text{CH}_2$ ); 182,70, 182,98 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 193,14, 193,42, 195,28, 197,01 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ) T = 60 °C  $\delta_c$  11,64 ( $\text{CH}_3$ ); 13,29 ( $\text{CH}_3$ ); 23,23 ( $\text{CH}_2$ ); 29,51 (br,  $\text{CH}_2$ ); 33,15, 33,76, 34,97 (br,  $\text{CH}_2$ ); 48,08 ( $\text{CH}_2$ ); 51,16 ( $\text{CH}_2$ ); 61,52 ( $\text{CH}_2$ ); 63,16 (br,  $\text{CH}_2$ ); 68,90, 69,34 (br,  $\text{CH}_2$ ); 182,46 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 193,26, 195,11 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ )

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1656( $\text{C}=\text{O}$ ); 1880, 1935, 2027 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ).

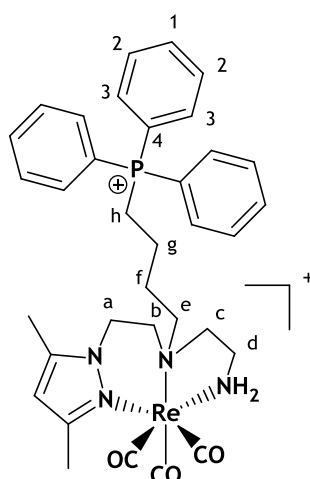
**Análise Elementar:** C 34,99; H 4,66; N 4,98; S 5,99;  $\text{ReC}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$  requer C 35,22; H 4,99; N 5,13; S 5,88.

**ESI/MS (+) (m/z):** 547,0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculada para  $\text{ReC}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$  = 547,1.

**HPLC:**  $t_R=17,88$  min.

$R_f$  (eluente:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (75/23/2)) = 0,82.

#### 6.4.3.17. *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L}^{18})]\text{Br}_2$ , Re18



Re18 foi purificado por lavagens com água e n-hexano, tendo sido obtido na forma de um sólido branco. Rendimento: 38 mg (0,041 mmol; 59%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_H$  1,77 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 2,03 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 2,27 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 2,37 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,43 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,66 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 2,74 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 2,86 (2H, m,  $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 3,16 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 3,44 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 3,62 (4H, m,  $\text{CH}_2(\text{b})+\text{CH}_2(\text{c})+\text{CH}_2(\text{h})$ ); 4,04 (2H, m,  $\text{NH}_2$ ); 4,22 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 4,52 (1H, m,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 5,46 (1H, m,  $\text{NH}_2$ ); 6,19 (1H, s,  $\text{H}_4\text{-pz}$ ); 7,74-7,93 (15H, m,  $\text{PPh}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75,373 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_c$  11,63 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 16,05 ( $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 21,17 ( $\text{CH}_2(\text{g})$ ); 22,81 (d,  $J_{\text{P-C}} = 52$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{h})$ ); 26,48 (d,  $J_{\text{P-C}} = 17$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{f})$ ); 43,66 ( $\text{CH}_2(\text{d})$ ); 48,45 ( $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 54,09 ( $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 62,67 ( $\text{CH}_2(\text{e})$ ); 67,04 ( $\text{CH}_2(\text{c})$ ); 109,16 ( $\text{C}(\text{H}_4\text{-pz})$ ); 119,65 (d,  $J_{\text{P-C}} = 81$  Hz,  $\text{PPh}_3(4)$ ); 131,55 (d,  $J_{\text{P-C}} = 12$  Hz,  $\text{PPh}_3(2)$ ); 134,87 (d,  $J_{\text{P-C}} = 10$  Hz,  $\text{PPh}_3(3)$ ); 136,29 (d,  $J_{\text{P-C}} = 3,0$  Hz,  $\text{PPh}_3(1)$ ); 145,29 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 155,00 ( $\text{C}(\text{H}_{3/5}\text{-pz})$ ); 193,66 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 194,73 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ); 195,15 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ).

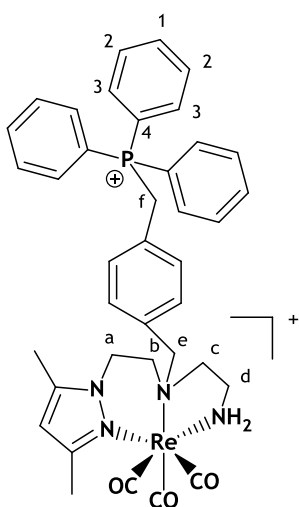
**RMN  $^{31}\text{P}$**  (121,336 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_P$  24,64

IV KBr,  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1897, 2025 ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ).

**Análise Elementar:** C 43,79; H 4,45; N 6,37,  $\text{ReC}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_3\text{PBr}_2$  requer C 43,93; H 4,34, N 6,03.

**ESI/MS (+) (m/z):** 385,2  $[\text{M}]^{2+}$ , calculada para  $\text{ReC}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_3\text{P}$  = 770,3.

**HPLC:**  $t_R=21,08$  min.

6.4.3.18. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>19</sup>)](CF<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, Re19

Re19 foi purificado por HPLC usando uma coluna preparativa Waters  $\mu$  Bondapak C18 (150  $\times$  19 mm) com um fluxo de 5,0 mL/min e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-3 min, 75% A; 3-28 min, 75%-50% A; 28-33 min, 50%; 33-48 min 50-0% A; 48-58 min 0% A ( $t_R$  = 27,35 min)), tendo sido obtido na forma de um óleo amarelo. Rendimento: 62 mg (0,054 mmol; 45%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  2,36 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,45 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,52 (3H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(c)+CH<sub>2</sub>(d)); 2,90 (1H, d, CH<sub>2</sub>(b)); 3,02 (2H, m, CH<sub>2</sub>(c)+CH<sub>2</sub>(d)); 4,23 (1H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 4,35 (1H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 4,53 (1H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 4,61 (1H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 4,80

(2H, d, CH<sub>2</sub>(f)); 5,61 (2H, bs, NH<sub>2</sub>); 6,19 (1H, s, H<sub>4-pz</sub>); 7,12 (2H, d, H<sub>benzilo</sub>); 7,41 (2H, d, H<sub>benzilo</sub>); 7,67-7,92 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  11,54 (CH<sub>3</sub>-pz); 16,17 (CH<sub>3</sub>-pz); 30,15 (d,  $J_{P-C}$  = 48 Hz, CH<sub>2</sub>(f)); 43,28 (CH<sub>2</sub>(d)); 47,17 (CH<sub>2</sub>(a)); 51,90 (CH<sub>2</sub>(b)); 62,13 (CH<sub>2</sub>(c)); 69,47 (CH<sub>2</sub>(e)); 109,09 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 118,97 (d,  $J_{P-C}$  = 87 Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 118,53 (C<sub>TFA</sub>); 130,63 (d,  $J_{P-C}$  = 8,3 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 131,43 (d,  $J_{P-C}$  = 13 Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 132,59 (d,  $J_{P-C}$  = 5,3 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 133,35 (d,  $J_{P-C}$  = 10 Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 134,58 (d,  $J_{P-C}$  = 3,0 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 135,34 (d,  $J_{P-C}$  = 2,3 Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 136,57 (d,  $J_{P-C}$  = 3,8 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 145,62 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 155,50 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 161,70 (C<sub>TFA</sub>); 193,72 (C $\equiv$ O); 194,60 (C $\equiv$ O); 195,21 (C $\equiv$ O).

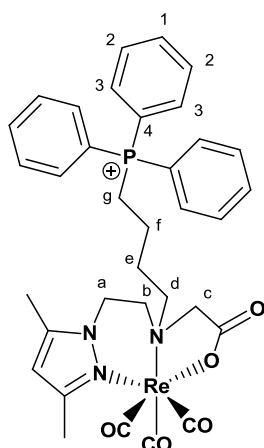
RMN <sup>31</sup>P (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_P$  24,05.

IV KBr,  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 1899, 2027 (C $\equiv$ O).

Análise Elementar: C 45,66; H 3,05; N 4,77, ReC<sub>42</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>PF<sub>6</sub>.CF<sub>3</sub>COOH requer C 45,64; H 3,57; N 4,84

ESI/MS (+) (m/z): 409,1 [M]<sup>2+</sup>, calculada para ReC<sub>38</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>P = 818,3.

HPLC:  $t_R$ =20,49 min.

6.4.3.19. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>20</sup>)](CF<sub>3</sub>COO), Re20

Re20 foi purificado por HPLC usando uma coluna semi-preparativa (EP 250/8 Nucleosil 100-7-C18, Macherey Nagel) e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-3 min, 75% A; 3-3,1 min, 75%-50% A; 3,1-9,0 min, 50%; 9,0-9,1 min 50-35% A; 9,1-30 min 35-0% A; 30-35 min 0% A ( $t_R=20,04$  min)), tendo sido obtido na forma de um óleo transparente. Rendimento: 30 mg (0,024 mmol; 24%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  1,76 (2H, m, CH<sub>2</sub>(f)); 2,01 (2H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 2,32 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,44 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,56 (1H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 3,23 (1H, d, CH<sub>2</sub>(c)); 3,45 (5H, m, CH<sub>2</sub>(b)+CH<sub>2</sub>(d)+CH<sub>2</sub>(g));

3,64 (1H, d, CH<sub>2</sub>(c)); 4,34 (2H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 6,13 (1H, s, H<sub>4</sub>-pz); 7,73-7,93 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  11,34 (CH<sub>3</sub>-pz); 15,72 (CH<sub>3</sub>-pz); 21,05 (d,  $J_{P-C}= 3,0$  Hz, CH<sub>2</sub>(f)); 22,75 (d,  $J_{P-C}= 52$  Hz, CH<sub>2</sub>(g)); 26,28 (d,  $J_{P-C}= 17$  Hz, CH<sub>2</sub>(e)); 46,74 (CH<sub>2</sub>(a)); 56,84 (CH<sub>2</sub>(b)); 63,86 (CH<sub>2</sub>(c)); 66,34 (CH<sub>2</sub>(d)); 108,89 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 115,37 (C<sub>TFA</sub>); 119,67 (d,  $J_{P-C}= 87$  Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 131,62 (d,  $J_{P-C}= 12$  Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 134,84 (d,  $J_{P-C}= 11$  Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 136,42 (d,  $J_{P-C}= 3,0$  Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 145,07 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 155,22 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 161,37 (C<sub>TFA</sub>); 181,54 (C=O); 195,09 (C≡O); 196,38 (C≡O); 196,85 (C≡O).

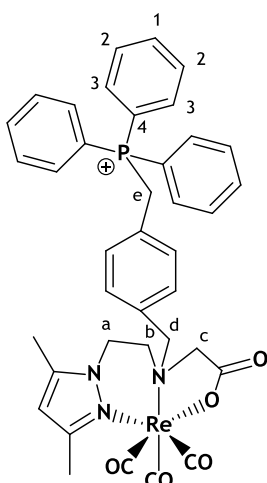
RMN <sup>31</sup>P (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_P$  24,56.

IV KBr,  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 1646 (C=O); 1981, 2022 (C≡O).

Análise Elementar: C 40,89; H 2,94; N 3,55, ReC<sub>36</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>PF<sub>3</sub>·3CF<sub>3</sub>COOH requer C 40,72; H 3,17; N 3,39.

ESI/MS (+) (m/z): 784,1 [M]<sup>+</sup>, calculada para ReC<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P = 784,2.

HPLC:  $t_R=21,60$  min.

6.4.3.20. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>21</sup>)](CF<sub>3</sub>COO), Re21

Re21 foi purificado por HPLC usando uma coluna semi-preparativa (EP 250/8 Nucleosil 100-7-C18, Macherey Nagel) e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-3 min, 75% A; 3-3,1 min, 75%-50% A; 3,1-9,0 min, 50% A; 9,0-9,1 min 50-35% A; 9,1-30 min 35-0% A; 30-35 min 0% A ( $t_R=21,69$  min)), tendo sido obtido na forma de um óleo transparente. Rendimento: 30 mg (0,026 mmol; 27%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  2,25 (1H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 2,31 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,48 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 3,04 (1H, d, CH<sub>2</sub>(c)); 3,25 (1H, m, CH<sub>2</sub>(b)); 3,94 (1H, d, CH<sub>2</sub>(c)); 4,41 (2H, m, CH<sub>2</sub>(a)); 4,62 (2H, m,

CH<sub>2</sub>(d)); 4,97 (1H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 6,13 (1H, s, H<sub>4-pz</sub>); 7,15 (2H, d, H<sub>benzilo</sub>); 7,48 (2H, d, H<sub>benzilo</sub>); 7,63-7,92 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  10,20 (CH<sub>3</sub>-pz); 14,87 (CH<sub>3</sub>-pz); 29,02 (d,  $J_{P-C}$  = 48 Hz, CH<sub>2</sub>(e)); 45,05 (CH<sub>2</sub>(a)); 55,19 (CH<sub>2</sub>(b)); 62,73 (CH<sub>2</sub>(c)); 67,68 (CH<sub>2</sub>(d)); 107,61 (C(H<sub>4</sub>-pz)); 117,86 (d,  $J_{P-C}$  = 87 Hz, PPh<sub>3</sub>(4)); 119,03 (C<sub>TFA</sub>); 128,83 (d,  $J_{P-C}$  = 12 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 130,30 (d,  $J_{P-C}$  = 14 Hz, PPh<sub>3</sub>(2)); 131,43 (d,  $J_{P-C}$  = 4,5 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 131,92 (d,  $J_{P-C}$  = 10 Hz, PPh<sub>3</sub>(3)); 133,10 (d,  $J_{P-C}$  = 5,8 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 134,19 (d,  $J_{P-C}$  = 10 Hz, PPh<sub>3</sub>(1)); 135,43 (d,  $J_{P-C}$  = 2,2 Hz, C<sub>benzilo</sub>); 144,16 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 154,35 (C(H<sub>3/5</sub>-pz)); 160,70 (C<sub>TFA</sub>); 180,00 (C=O); 193,90 (C≡O); 194,89 (C≡O); 195,63 (C≡O).

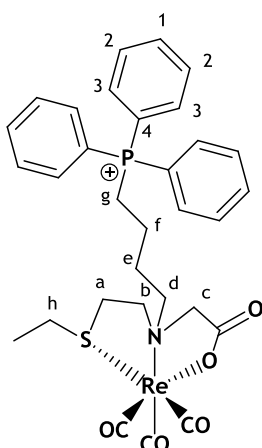
RMN <sup>31</sup>P (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_P$  24,14.

IV KBr,  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 1647 (C=O); 1904, 2020 (C≡O).

Análise Elementar: C 45,16; H 3,56; N 3,37, ReC<sub>40</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>PF<sub>3</sub>.2CF<sub>3</sub>COOH requer C 45,06; H 3,27; N 3,58.

ESI/MS (+) (m/z): 832,2 [M]<sup>+</sup>, calculada para ReC<sub>38</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P = 832,2.

HPLC:  $t_R=21,68$  min.

6.4.3.21. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>22</sup>)](CF<sub>3</sub>COO), Re22

Re22 foi purificado por HPLC usando uma coluna semi-preparativa (EP 250/8 Nucleosil 100-7-C18, Macherey Nagel) e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-3 min, 75% A; 3-8 min, 75%-50% A; 8-13 min, 50% A; 13-23 min 50-0% A; 23-31 min 0% A ( $t_R=23,54$  min)), tendo sido obtido na forma de um óleo transparente. Rendimento: 50 mg (0,026 mmol; 50%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T = 20 °C  $\delta_H$  1,38 (3H, m, CH<sub>3</sub>); 1,74 (2H, m, CH<sub>2</sub>(e)); 2,00 (2H, m, CH<sub>2</sub>(f)); 2,64 (1H, m); 3,03-3,75 (11H, m); 7,73-7,88 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T = 20 °C  $\delta_c$  13,21, 13,39 (CH<sub>3</sub>); 20,95, 21,00 (CH<sub>2</sub>(f)); 22,26, 22,94 (CH<sub>2</sub>(g)); 26,57, 26,80, 27,12 (CH<sub>2</sub>(e)); 29,55, 32,91 (CH<sub>2</sub>(a)); 33,44, 34,99 (CH<sub>2</sub>(h)); 61,14 (CH<sub>2</sub>(d)); 62,16, 63,28 (CH<sub>2</sub>(c)); 68,04, 69,97 (CH<sub>2</sub>(b)); 115,47 (C<sub>TFA</sub>); 119,63 (d, PPh<sub>3</sub>(4)); 131,60 (d, PPh<sub>3</sub>(2)); 134,82 (d, PPh<sub>3</sub>(3)); 136,39 (d, PPh<sub>3</sub>(1)); 162,61 (C<sub>TFA</sub>); 182,59, 182,86 (C=O); 193,21, 193,34, 195,17, 196,84 (C≡O); T = 60 °C  $\delta_c$  13,27 (CH<sub>3</sub>); 21,19 (d, CH<sub>2</sub>(f)); 23,49 (d, CH<sub>2</sub>(g)); 27,06 (d, CH<sub>2</sub>(e)); 29,64, 32,91 (br, CH<sub>2</sub>(a)); 33,20, 33,81 (CH<sub>2</sub>(h)); 61,35 (br, CH<sub>2</sub>(d)); 62,67 (br, CH<sub>2</sub>(b)); 67,90, 68,88 (br, CH<sub>2</sub>(c)); 115,47 (C<sub>TFA</sub>); 119,65 (d, PPh<sub>3</sub>(4)); 131,60 (d, PPh<sub>3</sub>(2)); 134,77 (d, PPh<sub>3</sub>(3)); 136,40 (d, PPh<sub>3</sub>(1)); 161,93 (C<sub>TFA</sub>); 182,23 (C=O); 193,21, 194,96 (C≡O).

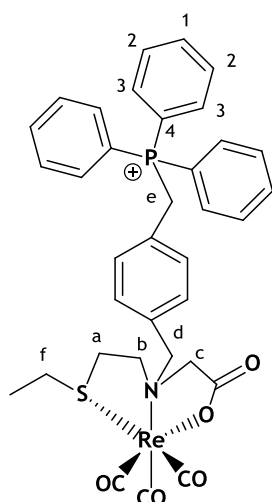
RMN <sup>31</sup>P (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_p$  24,60.

IV KBr,  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 1649 (C=O); 1898, 2026 (C≡O).

Análise Elementar: C 43,16; H 3,45; N 1,37; S 3,11, ReC<sub>33</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>7</sub>PSF<sub>3</sub>.CF<sub>3</sub>COOH requer C 43,03; H 3,61; N 1,43; S 3,28.

ESI/MS (+) (m/z): 750,2 [M]<sup>+</sup>, calculada para ReC<sub>31</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>5</sub>PS = 750,1.

HPLC:  $t_R=21,48$  min.

6.4.3.22. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>23</sup>)](CF<sub>3</sub>COO), Re23

Re23 foi purificado por HPLC usando uma coluna semi-preparativa (EP 250/8 Nucleosil 100-7-C18, Macherey Nagel) e detecção UV 254 nm (eluentes: A - solução aquosa 0,1% TFA, B- MeOH; método: 0-3 min, 75% A; 3-8 min, 75%-50% A; 8-13 min, 50% A; 13-23 min 50-0% A; 23-31 min 0% A ( $t_R=24,48$  min)), tendo sido obtido na forma de um óleo transparente. Rendimento: 75 mg (0,073 mmol; 56%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T = 20 °C  $\delta_H$  1,38 (3H, m, CH<sub>3</sub>); 2,57 (1H, m); 2,87-3,36 (6H, m); 4,10-5,04 (5H, m); 7,09 (2H, m, H<sub>benzilo</sub>); 7,43 (2H, m, H<sub>benzilo</sub>); 7,65-7,92 (15H, m, PPh<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75,373 MHz, CD<sub>3</sub>OD): T = 20 °C  $\delta_C$  13,18, 13,47 (CH<sub>3</sub>); 29,28, 29,80, 30,44, 32,90, 33,19, 34,79 (CH<sub>2</sub>(a), CH<sub>2</sub>(e), CH<sub>2</sub>(f));

60,72, 61,79, 62,14, 63,45 (CH<sub>2</sub>(b), CH<sub>2</sub>(c)); 70,91, 73,06 (CH<sub>2</sub>(d)); 115,65 (C<sub>TFA</sub>); 118,99 (d, PPh<sub>3</sub>(4)); 130,47 (d, C<sub>benzilo</sub>); 131,42 (d, PPh<sub>3</sub>(2)); 132,59 (d, C<sub>benzilo</sub>); 133,06 (d, C<sub>benzilo</sub>); 133,84 (d, C<sub>benzilo</sub>); 135,35 (d, PPh<sub>3</sub>(3)); 136,56 (d, PPh<sub>3</sub>(1)); 162,15 (C<sub>TFA</sub>); 182,14 e 182,58 (C=O); 193,29, 193,29, 195,09, 196,74, 198,18 (C≡O); T = 60 °C  $\delta_C$  13,29 (CH<sub>3</sub>); 29,74 (br, CH<sub>2</sub>(a)); 30,63 (d, CH<sub>2</sub>(e)); 32,39, 33,38 (br, CH<sub>2</sub>(f)); 61,91, 63,03, 64,89 (br, CH<sub>2</sub>(b), CH<sub>2</sub>(c)); 71,06, 72,87 (br, CH<sub>2</sub>(d)); 115,65 (C<sub>TFA</sub>); 119,07 (d, PPh<sub>3</sub>(4)); 130,55 (d, C<sub>benzilo</sub>); 131,44 (d, PPh<sub>3</sub>(2)); 132,57 (d, C<sub>benzilo</sub>); 133,06 (d, C<sub>benzilo</sub>); 133,96 (d, C<sub>benzilo</sub>); 135,31 (d, PPh<sub>3</sub>(3)); 136,57 (d, PPh<sub>3</sub>(1)); 162,15 (C<sub>TFA</sub>); 181,95 (C=O); 193,08, 194,91, 196,59 (C≡O).

RMN <sup>31</sup>P (121,336 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_P$  24,13.

IV KBr,  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 1650 (C=O); 1896, 2027 (C≡O).

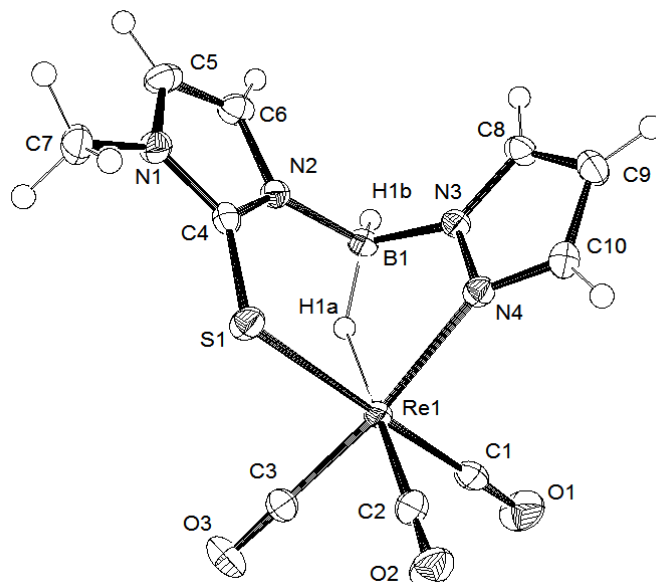
Análise Elementar: C 45,94; H 3,92; N 1,67; S 2,97, ReC<sub>37</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>7</sub>SPF<sub>3</sub>.CF<sub>3</sub>COOH requer C 45,70; H 3,44; N 1,37; S 3,13.

ESI/MS (+) (m/z): 798,2 [M]<sup>+</sup>, calculada para ReC<sub>35</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>5</sub>SP = 798,2.

HPLC:  $t_R=21,43$  min.

### 6.4.4. Caracterização estrutural dos complexos de Re por difracção de Raios-X

#### 6.4.4.1. *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(pz)}](CO)<sub>3</sub>], 2



**Figura 6.1.** Diagrama ORTEP de 2; os elipsóides vibracionais foram desenhados com uma probabilidade de 40%

**Tabela 6.1.** Dados Cristalográficos para o complexo 2

Fórmula	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> BN <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ReS	
Massa Molar	463,29 g mol <sup>-1</sup>	
Temperatura	150(2) K	
Comprimento de Onda	0,71073 Å	
Sistema Cristalográfico	Monoclínico	
Grupo Espacial	P21/c	
Dimensões da Célula Unitária	a = 7,0608(1) Å	α = 90°
	b = 13,8156(2) Å	β = 95,956(1)°
	c = 14,4289(2) Å	γ = 90°
Volume	1399,93(3) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
ρ(calculada)	2,198 g cm <sup>-3</sup>	
Coefficiente de Absorção μ (Mo Kα)	8,839 mm <sup>-1</sup>	
θ <sub>max</sub>	25,7°	
Reflexões totais / Reflexões únicas	10658/2850 [R(int)=0,0220]	
Tamanho dos cristais	0,28 x 0,18 x 0,16 mm	
F(000)	872	
GOF	1,025	
Ajuste final [ $\chi^2$ ]	R1 = 0,0146, wR2 = 0,0333	
Ajuste final (todos os dados)	R1 = 0,0170, wR2 = 0,0339	

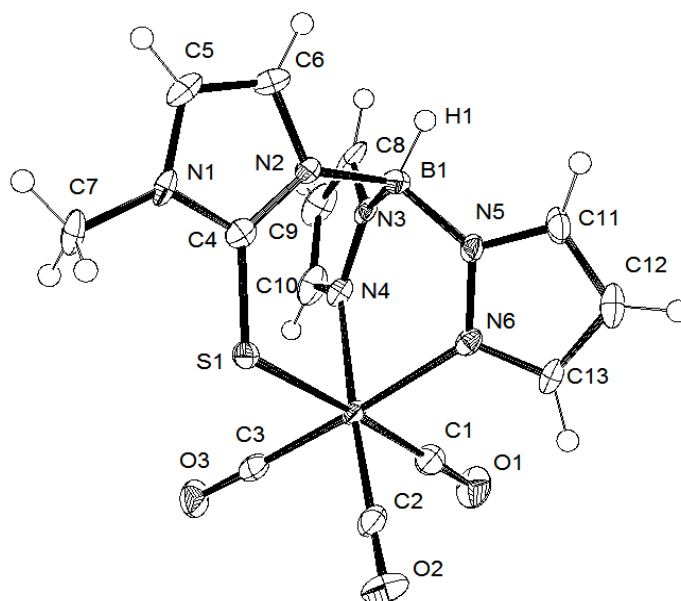
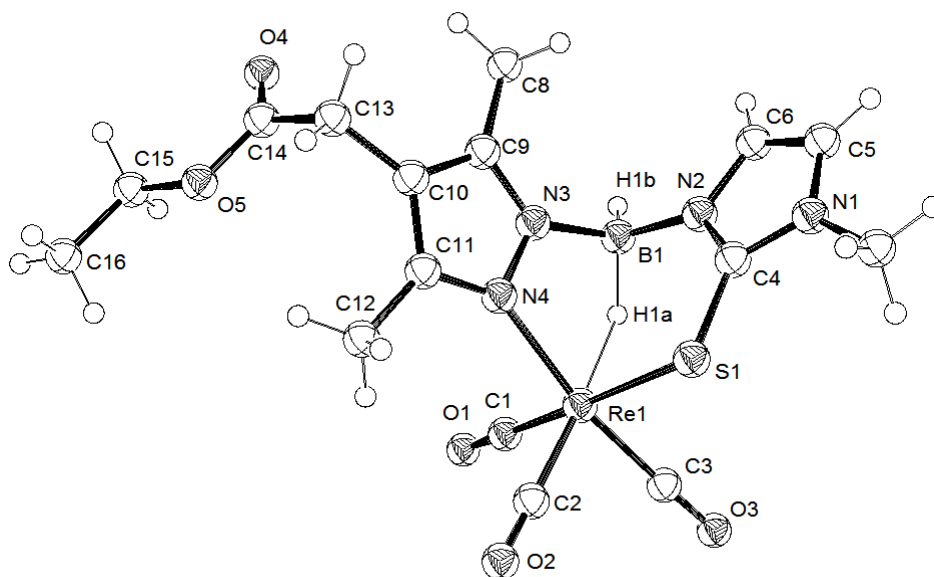
6.4.4.2. *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -HB(tim<sup>Me</sup>)(pz)<sub>2</sub>}(CO)<sub>3</sub>], 3

Figura 6.2. Diagrama ORTEP de 3. Os elipsóides vibracionais foram desenhados com uma probabilidade de 40%

Tabela 6.2. Dados Cristalográficos para o complexo 3

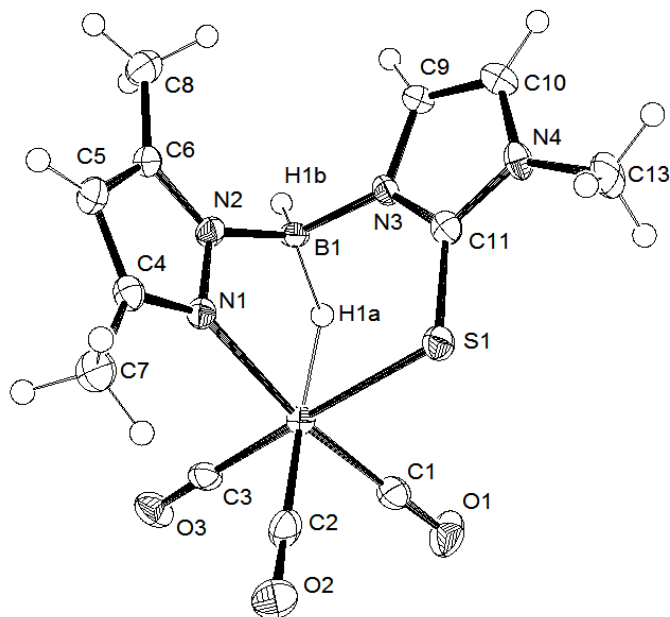
Fórmula	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> BN <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ReS
Massa Molar	539,36 g mol <sup>-1</sup>
Temperatura	150(2) K
Comprimento de Onda	0,71069 Å
Sistema Cristalográfico	Monoclínico
Grupo Espacial	P21/n
Dimensões da Célula Unitária	a = 8,3300(2) Å      α = 90° b = 15,7288(2) Å    β = 91,2430(10)° c = 12,8497(3) Å    γ = 90°
Volume	1683,18(6) Å <sup>3</sup>
Z	4
ρ(calculada)	2,089 g cm <sup>-3</sup>
Coeficiente de Absorção μ (Mo Kα)	7,370 mm <sup>-1</sup>
θ <sub>max</sub>	25,0°
Reflexões totais / Reflexões únicas	10320/2825 [R(int)=0,0362]
Tamanho dos cristais	0,30 x 0,22 x 0,18 mm
F(000)	1008
GOF	1,063
Ajuste final [ <i>I</i> >2σ( <i>I</i> )]	R1 = 0,0189, wR2 = 0,0449
Ajuste final (todos os dados)	R1 = 0,0211, wR2 = 0,0458

6.4.4.3. *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>-4-EtOOCCH<sub>3</sub>pz)}(CO)<sub>3</sub>], 4

**Figura 6.3.** Diagrama ORTEP de 4. Os elipsóides vibracionais foram desenhados com uma probabilidade de 40%

**Tabela 6.3.** Dados Cristalográficos para o complexo 4

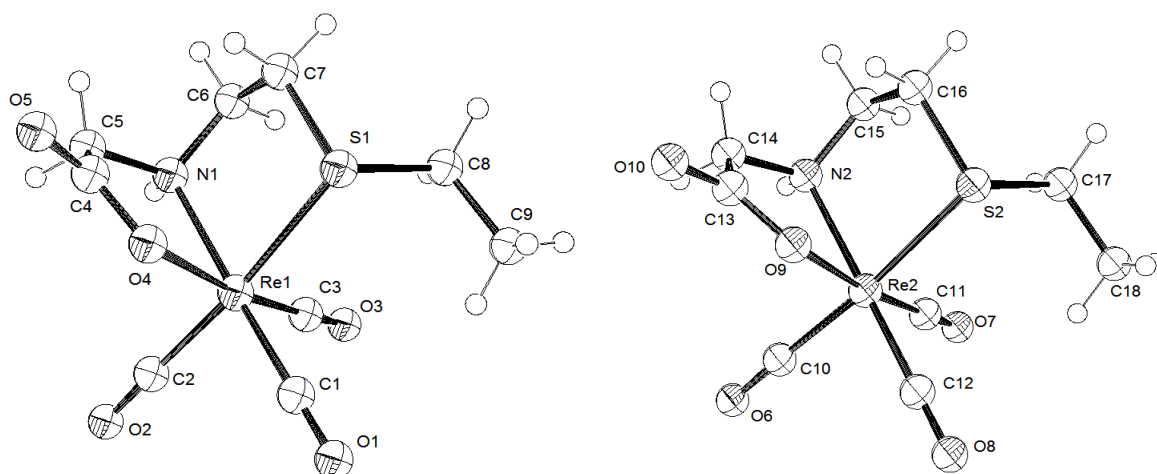
Fórmula	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> BN <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ReS
Massa Molar	579,43 g mol <sup>-1</sup>
Temperatura	150(2) K
Comprimento de Onda	0,71073 Å
Sistema Cristalográfico	Triclínico
Grupo Espacial	P $\bar{1}$
Dimensões da Célula Unitária	a = 7,1432(3) Å $\alpha$ = 106,6540(10) <sup>o</sup> b = 11,8530(5) Å $\beta$ = 91,5020(10) <sup>o</sup> c = 12,5983(6) Å $\gamma$ = 95,9390(10) <sup>o</sup>
Volume	1014,70(8) Å <sup>3</sup>
Z	2
$\rho$ (calculada)	1,896 g cm <sup>-3</sup>
Coefficiente de Absorção $\mu$ (Mo K $\alpha$ )	6,127 mm <sup>-1</sup>
$\theta_{max}$	25,7 <sup>o</sup>
Reflexões totais / Reflexões únicas	6485/3822 [R(int)=0,0253]
Tamanho dos cristais	0,30 x 0,20 x 0,16 mm
F(000)	562
GOF	1,015
Ajuste final [ $ I  > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0,0222, wR2 = 0,0536
Ajuste final (todos os dados)	R1 = 0,0243, wR2 = 0,0544

6.4.4.4. *fac*-[Re{ $\kappa^3$ -H( $\mu$ -H)B(tim<sup>Me</sup>)(3,5-Me<sub>2</sub>-pz)}(CO)<sub>3</sub>], Re1

**Figura 6.4.** Diagrama ORTEP de Re1. Os elipsóides vibracionais foram desenhados com uma probabilidade de 40%

**Tabela 6.4.** Dados Cristalográficos para o complexo Re1

Fórmula	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> BN <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ReS	
Massa Molar	491,34 g mol <sup>-1</sup>	
Temperatura	150(2) K	
Comprimento de Onda	0,71073 Å	
Sistema Cristalográfico	Monoclínico	
Grupo Espacial	P21/c	
Dimensões da Célula Unitária	a = 9,6289(4) Å	α = 90°
	b = 16,2380(5) Å	β = 114,1940(10)°
	c = 11,2107(4) Å	γ = 90°
Volume	1598,87(10) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
ρ(calculada)	2,041 g cm <sup>-3</sup>	
Coefficiente de Absorção μ (Mo Kα)	7,746 mm <sup>-1</sup>	
θ <sub>max</sub>	25,7°	
Reflexões totais / Reflexões únicas	9475/3017 [R(int)=0,0328]	
Tamanho dos cristais	0,18 x 0,14 x 0,10 mm	
F(000)	936	
GOF	1,066	
Ajuste final [I>2σ(I)]	R1 = 0,0204, wR2 = 0,0449	
Ajuste final (todos os dados)	R1 = 0,0244, wR2 = 0,0461	

6.4.4.5. *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(k<sup>3</sup>-L<sup>10</sup>)], Re10

**Figura 6.5.** Diagrama ORTEP de Re10. Os elipsóides vibracionais foram desenhados com uma probabilidade de 40%

**Tabela 6.5.** Dados Cristalográficos para o complexo Re10

Fórmula	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>5</sub> ReS
Massa Molar	432,36 g mol <sup>-1</sup>
Temperatura	150(2) K
Comprimento de Onda	0,71073 Å
Sistema Cristalográfico	Triclinico
Grupo Espacial	P $\bar{1}$
Dimensões da Célula Unitária	a = 9,9662(2) Å      α = 98,9870(10)° b = 11,8823(2) Å      β = 111,4410(10)° c = 12,9285(2) Å      γ = 108,2200(10)°
Volume	1288,70(4) Å <sup>3</sup>
Z	1
ρ(calculada)	2,252 g cm <sup>-3</sup>
Coeficiente de Absorção μ (Mo Kα)	9,601 mm <sup>-1</sup>
θ <sub>max</sub>	25,0°
Reflexões totais / Reflexões únicas	11391/4511 [R(int)=0,0256]
Tamanho dos cristais	0,20 x 0,12 x 0,10 mm
F(000)	826
GOF	1,071
Ajuste final [I>2σ(I)]	R1 = 0,0243, wR2 = 0,0547
Ajuste final (todos os dados)	R1 = 0,0274, wR2 = 0,0
	559

## 6.5. Síntese e caracterização dos complexos de $^{99m}\text{Tc}$

### 6.5.1. Condições de manipulação de compostos radioactivos

Todas as manipulações de compostos radioactivos foram efectuadas de acordo com as regras de protecção e segurança radiológica, na presença de aparelhos de detecção de radiação e em laboratórios com sistemas de ventilação apropriada e com pressão negativa relativamente ao exterior. Todos os frascos contendo soluções radioactivas foram mantidos dentro de contentores de chumbo, de espessura adequada, tendo em consideração a sua actividade. A dose de radiação absorvida no decorrer da experimentação foi medida periodicamente por leitura de detectores de radiação individuais de peito e extremidades.

### 6.5.2. Síntese do precursor $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

O  $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$  foi obtido por eluição de um gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (Mallinckrodt-Ultra-TechneKow® FM ou ELUMATIC III®) com uma solução de  $\text{NaCl}$  0,9 %. A actividade do eluído (~ 20 mCi, ~ 5 mL) foi medida numa câmara de ionização (Aloka, Curimeter IGC-3, Tokyo, Japan). Para a síntese do precursor  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  utilizou-se um kit Isolink® (Covidien, Petten, Holanda) que se encontra sob a forma liofilizada, com a seguinte composição: 4,5 mg de boranocarbonato de sódio; 2,85 mg de tetraborato de sódio.10  $\text{H}_2\text{O}$ ; 8,5 mg de tartarato de sódio.2  $\text{H}_2\text{O}$  e 7,15 mg de carbonato de sódio. A este *kit* adicionou-se, sob  $\text{N}_2$ , cerca de 2 mL do eluído  $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$  e aqueceu-se durante 20 min a 100 °C. Após arrefecimento à temperatura ambiente acertou-se o pH para o valor desejado com uma solução de  $\text{HCl}$  1 M. O controlo de pureza radioquímica do precursor foi efectuado por HPLC de fase reversa, utilizando uma coluna analítica (EC 250/4 Nucleosil 100-10-C18, Macherey Nagel), com um fluxo de 1,0 mL/min e detecção  $\gamma$  (eluentes: A - solução aquosa TFA (0,1%); B - MeOH; método: 0-3 min, 100% A; 3-3,1 min, 100%-75% A; 3,1-9 min, 75% A; 9-9,1 min 75%-66% A; 9,1-20 min, 66%-0% A; 20-25 min, 0% A; 25-25,1 min, 0%-100% A; 25,1-30 min, 100% A).

### 6.5.3. Síntese e caracterização dos complexos de $^{99m}\text{Tc}$ , Tc1-Tc23

Método Geral: Num frasco, previamente purgado com azoto e selado com tampa de borracha e cápsula de alumínio, adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de ligando ( $4,4 \times 10^{-3}$  M) e 400  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ , obtendo-se uma solução com uma concentração final de ligando de  $10^{-4}$  M. A mistura reaccional foi incubada à temperatura

ambiente ou a 100 °C durante 30 min a pH 5,5 ou 7,4. A pureza radioquímica dos complexos foi determinada por HPLC de fase reversa, utilizando as condições descritas na secção 6.5.2 para o controlo da pureza radioquímica do precursor. Os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foram caracterizados por comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção dos complexos análogos de Re. Com excepção do complexo Tc1 ( $\eta=89\%$ ) e Tc19 ( $\eta=70\%$ ) os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  Tc1-Tc23 foram obtidos com elevados rendimentos ( $\geq 95\%$ ). Os complexos Tc1 e Tc19 foram purificados previamente antes da realização dos estudos biológicos *in vitro* e *in vivo*. A purificação foi efectuada por HPLC utilizando uma coluna semi-preparativa (EP 250/8 Nucleosil 100-7-C18, Macherey Nagel) e detecção  $\gamma$ . Os métodos de purificação utilizados para cada um dos complexos descrevem-se seguidamente: Tc1 (eluentes: A- solução aquosa de TFA (0,1%); B - MeOH; método: 0-4 min, 75% A; 4-25 min, 75%-30% A; 25-35 min, 30% A; 35-45 min 30-0% A; 45-60 min, 0% A ( $t_R= 47,05$  min)); Tc19 (eluentes: A- solução aquosa de TFA (0,1%); B - MeOH; método: 0-3 min, 75% A; 3-15 min, 75%-50% A; 15-25 min, 50% A; 25-45 min 50-0% A; 45-50 min, 0% A ( $t_R= 29,54$  min)).

Na Tabela 6.6 indicam-se as condições experimentais utilizadas na síntese dos complexos (Tc1-Tc23), bem como os respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ) e valores de  $\log D_{o/w}$  a pH 7,4.

**Tabela 6.6.** Condições Experimentais usadas na preparação dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ ; tempos de retenção ( $t_R$ ) e valores de  $\log D_{o/w}$  para os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$

Complexo	T ( °C)	pH	$t_R$ (min)	Log $D_{o/w}$ (pH 7,4)
Tc1	20	7,4	22,52	$1,78 \pm 0,04$
Tc2	100	7,4	17,88	$-0,38 \pm 0,04$
Tc3	100	7,4	18,50	$-0,29 \pm 0,08$
Tc4	100	5,5	19,40	$-0,16 \pm 0,03$
Tc5	100	5,5	20,32	$1,02 \pm 0,02$
Tc6	100	7,4	17,07	$-1,64 \pm 0,01$
Tc7	100	7,4	18,52	$-1,24 \pm 0,05$
Tc8	100	7,4	18,48	$-0,93 \pm 0,01$
Tc9	100	7,4	19,52	$-0,31 \pm 0,01$
Tc10	100	7,4	18,53	$0,36 \pm 0,03$
Tc11	100	5,5	17,76	$1,10 \pm 0,03$
Tc12	100	5,5	18,85	$0,87 \pm 0,03$
Tc13	100	5,5	15,50	$-0,02 \pm 0,03$

Tc14	100	5,5	16,40	0,00 ± 0,01
Tc15	100	5,5	16,83	1,12 ± 0,06
Tc16	100	5,5	17,78	0,53 ± 0,01
Tc17	100	5,5	17,90	-0,72 ± 0,02
Tc18	100	7,4	21,18	-0,93 ± 0,07
Tc19	100	7,4	20,67	-0,07 ± 0,05
Tc20	100	5,5	21,78	0,59 ± 0,05
Tc21	100	5,5	21,89	0,74 ± 0,01
Tc22	100	5,5	21,78	0,55 ± 0,02
Tc23	100	5,5	21,63	0,79 ± 0,03

### 6.6. Determinação da lipofilia dos complexos de $^{99m}\text{Tc}$

A lipofilia dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foi avaliada por determinação do coeficiente de distribuição ( $D_{o/w}$ ) no sistema bifásico n-octanol(o)/PBS 0,1 M(w), a pH = 7,4, utilizando a técnica de extracções sucessivas.<sup>182</sup> Para a determinação do log  $D_{o/w}$  a diferentes pH, utilizaram-se soluções de PBS (0,1 M) a pH 2,7 e pH 10,6, obtidas a partir da solução de PBS a pH 7,4 por adição de HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M.

A tubos de centrífuga contendo 1 mL de PBS 0,1 M adicionou-se 1 mL de n-octanol, agitando-se de seguida em vórtex durante 1 min. Seguidamente adicionou-se 25-100  $\mu\text{L}$  da solução do complexo radioactivo em estudo, agitou-se novamente em vórtex durante 1 min e centrifugou-se a 3000 rpm (CR4 11, Jouan) durante 10 min para obter uma separação eficiente entre a fase orgânica e a fase aquosa. Após centrifugação separaram-se as duas fases e retiraram-se alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  (3 replicados) de cada uma das fases, medindo-se a sua actividade num contador de radiação  $\gamma$ . Para efectuar a segunda extracção retiraram-se 500  $\mu\text{L}$  da fase com maior radioactividade (complexos hidrofílicos - fase aquosa; complexos lipofílicos - fase orgânica), e adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  da fase oposta (PBS ou n-octanol). De seguida procedeu-se como descrito para a primeira extracção. O coeficiente de distribuição (log  $D_{o/w}$ ) foi calculado por aplicação da seguinte expressão:

$$\log (D_{o/w}) = \log (C1/C2)$$

em que:

C1 - actividade na fase orgânica (cpm)

C2 - actividade na fase aquosa (cpm)

### 6.7. Determinação dos $pK_a$

A determinação dos valores de  $pK_a$  foi efectuada de acordo com protocolos descritos na literatura, com pequenas adaptações.<sup>193,194,196</sup>

As experiências foram realizadas utilizando HPLC de fase reversa com as seguintes condições experimentais: coluna analítica (PRP-1, 250x4,1 mm, 10  $\mu$ M), com um fluxo de 1,0 mL/min (eluente: A - tampão fosfato 0,1 M a diferentes pH; B -  $CH_3CN$ ; método: isocrático, 60% A). A determinação do  $pK_{HPLC}$  envolveu o uso de soluções de tampão fosfato com valores de pH entre 2-10, preparadas a partir de uma solução tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4. O pH final da solução tampão foi ajustado através da adição de soluções de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M, até ao pH pretendido. O pH final dos diferentes eluentes foi medido e este valor foi utilizado nos cálculos posteriores. A detecção dos complexos de  $^{99m}Tc$  foi feita através da detecção  $\gamma$  e os complexos de Re foram detectados por UV a 254 nm. Para cada valor de pH foram realizados 3 replicados. O tempo morto da coluna ( $t_0$ ) foi determinado a partir da injeção de soluções de NaCl (detecção UV) que nas condições cromatográficas utilizadas não é retido ao atravessar a coluna. Após tratamento matemático adequado (ver 3.3.3.2) obtiveram-se os valores de  $pK_{HPLC}$  que, por comparação com a 2,4,6-colidina, permitiram obter os valores de  $pK_a$ .

### 6.8. Estudo da carga dos complexos de $^{99m}Tc$

A carga dos complexos de  $^{99m}Tc$  foi avaliada por electroforese em tiras de papel (Whatman 3MM) como suporte. A electroforese foi efectuada por aplicação de um potencial constante de 300 V, durante 1 h, usando uma solução tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) como electrólito. Para determinar a migração dos complexos analisou-se a distribuição da radioactividade nas tiras utilizando um detector Berthold LB 505.

### 6.9. Estabilidade *in vitro*

#### Estabilidade em condições fisiológicas (PBS, pH 7,4; 37 °C)

As soluções dos complexos de  $^{99m}Tc$  em PBS 0,1 M (pH 7,4) foram incubadas a 37 °C e analisadas por HPLC ao fim de 24 h.

#### Ensaio de competição com a cisteína e histidina

Em frascos purgados com  $N_2$  foram adicionados 900  $\mu$ L de soluções preparadas de fresco de cisteína ( $1,11 \times 10^{-2}$  M) e histidina ( $1,11 \times 10^{-2}$  M) em PBS (pH=7,4), a alíquotas de

100 µL dos complexos Tc1 e Tc10. As misturas foram incubadas a 37 °C e foram analisadas por HPLC a diferentes intervalos de tempo (1 h, 2 h, 4 h, 6 h).

### Estabilidade em meio de cultura das células

Os estudos de estabilidade em meio de cultura das células foram efectuados adicionando 10-100 µL da solução dos complexos de <sup>99m</sup>Tc a um tubo contendo o meio de cultura. A solução resultante foi incubada a 37 °C durante 4 h. Ao fim deste tempo, retiraram-se alíquotas, que foram analisadas por ITLC - SG usando HCl 1 M/MeOH (5:95) como eluente e quantificando-se a distribuição da radioactividade ao longo das tiras com o detector Berthold LB 505. Neste sistema os complexos de <sup>99m</sup>Tc estudados apresentam um  $R_f$  entre 0,7 e 0,85.

### 6.10. Ensaio de ligação à melanina

Os ensaios de ligação à melanina foram efectuados através da incubação dos complexos de <sup>99m</sup>Tc com a melanina sintética (*Sigma-Aldrich*, Madrid, Espanha), adaptando a metodologia descrita na literatura para moléculas radioiodadas.<sup>102,104,107</sup> Os complexos de <sup>99m</sup>Tc foram previamente purificados por HPLC, a fim de remover o ligando livre, utilizando uma coluna analítica nas condições experimentais descritas anteriormente na secção 6.5.3. Alíquotas de 25-100 µL das preparações radioactivas (0,7-1,2 MBq) contendo os complexos em estudo, foram adicionadas a uma suspensão de melanina (0,5 mg/10 mL) em água destilada. A mistura foi incubada à temperatura ambiente, com agitação constante durante 1 h. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 30000 g (Centrífuga J2-21M, Beckman) durante 10 min. Foram retiradas alíquotas de 100-500 µL do sobrenadante e a actividade foi medida no contador gama. Paralelamente foram preparados tubos controlo contendo os diferentes complexos mas sem a melanina. A diferença entre a actividade das alíquotas dos sobrenadantes dos tubos teste (com melanina) e os tubos controlo (sem a melanina) permitiu o cálculo da percentagem de complexo radioactivo que se ligou à melanina.

$$\% \text{ Ligação à melanina} = \left( 1 - \frac{\text{Actividade medida no sobrenadante (cpm)}}{\text{Actividade tubo controlo sem melanina (cpm)}} \right) \times 100$$

A avaliação do efeito da força iónica e da presença de n-propanol na ligação dos complexos à melanina foi realizada de acordo com os protocolos descritos na literatura.<sup>120</sup>

Na avaliação do efeito da força iónica, os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foram incubados com a melanina sintética usando o procedimento descrito atrás. Ao fim de 1 h e após centrifugação retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 10 mL de uma solução de NaCl 0,016 M. Voltou-se a centrifugar durante 10 min a 30000 g e retirou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em 10 mL de uma solução de NaCl 2 M e centrifugou-se a 30000 g durante 10 min. Foram retiradas alíquotas dos diferentes sobrenadantes e mediu-se a sua actividade no contador gama, calculando-se os valores de ligação à melanina como atrás referido.

No estudo do efeito da presença do n-propanol os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foram incubados durante 1 h com a melanina sintética numa mistura de água contendo 33% de n-propanol. Para determinar a percentagem de ligação à melanina seguiu-se o procedimento atrás descrito.

## 6.11. Estudos de captação celular

### 6.11.1. Linhas celulares

As linhas celulares utilizadas neste trabalho foram:

- a) Linha celular de melanoma de rato produtora de melanina, B16-F1, obtida da *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Londres, Reino Unido);
- b) Linhas celulares humanas de adenocarcinoma da mama, MCF-7, de próstata, PC-3 e de melanoma amelanótico A375, adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC, Barcelona, Espanha);
- c) Linha celular humana de adenocarcinoma da mama com sobreexpressão da Pgp, MCF-7/MDR1, cedida gentilmente pelo Professor David Piwnicka-Worms, da *Washington University School of Medicine*, St Louis, Missouri, EUA;<sup>211</sup>
- d) Linhas celulares humanas de tumores pulmonares de pequenas células (SLCL), H69 e H69Lx4 (variante resistente que sobreexpressa a Pgp), adquiridas na *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Londres, Reino Unido).

### 6.11.2. Cultura e manutenção de linhas celulares

As linhas celulares B16-F1, MCF-7, MCF-7/*MDR1* e A375 foram cultivadas em meio de cultura DMEM GlutaMax1 (*Invitrogen*, Reino Unido), enquanto as linhas celulares PC-3, H69 e H69/Lx4 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Invitrogen*). Os meios foram suplementados com 10% FBS (*Invitrogen*) inactivado pelo calor e com 1% de solução de antibióticos Penicilina (100 U/mL)/Estreptomicina (10 µg/mL) (*Invitrogen*). As linhas celulares MCF-7/*MDR1* e H69/Lx4 foram ainda cultivadas na presença de 1 mg/mL de geneticina (*Invitrogen*) e 0,4 µg/mL de doxorrubicina (*Sigma-Aldrich*) respectivamente.

As linhas celulares foram mantidas numa incubadora em atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C (*Heraeus*, Alemanha). Os meios de cultura foram mudados em condições de assepsia, todos os dias ou de 2 em 2 dias, consoante a linha celular.

Para as linhas celulares aderentes (B16-F1, A375, PC-3, MCF-7 e MCF-7/*MDR1*), em cada fase de crescimento (P0, P1, P2,...), o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS a pH 7,2. Em seguida incubou-se as células com 1 mL de tripsina-EDTA (*Invitrogen*) até que as células se destacassem do frasco, adicionando-se depois 3 mL de meio cultura para inactivar a acção da tripsina. As células foram transferidas para outro frasco de cultura adicionando-se mais meio ou utilizadas para os ensaios de captação celular.

Para as linhas celulares em suspensão, H69 e H69/Lx4, transferiram-se as células dos frascos de cultura para tubos de plástico e centrifugaram-se durante 5 min a 850 g (centrífuga 5804R *Eppendorf*, Alemanha). Seguidamente removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento celular em meio de cultura novo e transferiram-se para novos frascos de cultura.

### 6.11.3. Estudos de captação celular

As células utilizadas nos ensaios encontravam-se em fase de crescimento logarítmico. Após tripsinização a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com o corante azul de tripano. A 30 µL de suspensão celular adicionou-se igual volume de azul de tripano 0,4 % (*Sigma-Aldrich*). A suspensão corada foi colocada num hemocitómetro (câmara de Neubauer) e observada num microscópio óptico. Apenas as células não viáveis, cuja membrana se encontra danificada coram de azul. As células viáveis permanecem não coradas. A viabilidade é dada em percentagem do número de células viáveis em relação ao número total de células.

Após contagem e determinação da viabilidade celular, foram preparadas suspensões celulares nos respectivos meios de cultura com uma concentração de aproximadamente  $4 \times 10^5$  células/mL, no caso das células aderentes. As suspensões foram de seguida repartidas por placas de 24 poços (0,5 mL/poço) e incubadas durante 24 h em estufa com atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, antes da realização dos ensaios de captação celular.

Para as células H69 e H69-Lx4, foram preparadas suspensões celulares nos respectivos meios de cultura com uma concentração de aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/mL. As suspensões foram de seguida incubadas durante 1 h em estufa com atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, antes da realização dos ensaios de captação celular.

Os estudos de captação dos complexos radioactivos foram realizados após remoção do meio de cultura seguida de incubação dos complexos em estudo, diluídos nos respectivos meios de cultura (25 kBq/mL) com as linhas celulares B16-F1, MCF-7, MCF-7/MDR1 e PC-3 durante 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h a 37 °C sob atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 2x 500 µL de tampão PBS, mantido em gelo, sendo depois lisadas com 500 µL de NaOH 1 M. Os lisados celulares foram recolhidos e a sua actividade medida em contador gama. Para cada tempo de incubação foram realizados quatro replicados (quatro poços).

Os estudos de captação total nas células H69 e H69/Lx4 foram realizados após remoção do meio de cultura seguido da incubação dos complexos em estudo, diluídos nos respectivos meios de cultura (0,2 MBq/mL) durante 15 min, 30 min e 1 h, com agitação constante a 37 °C (banho termostaticado). Após o período de incubação recolheram-se amostras de 200 µL (em triplicado) para tubos de microcentrífuga contendo 500 µL de PBS mantido em gelo. As amostras foram centrifugadas (Centrífuga 5417R Eppendorf) durante 3 min à velocidade de 9400 g. Desprezou-se o sobrenadante e voltou-se a lavar o precipitado com 500 µL de PBS mantido em gelo, e as amostras foram novamente centrifugadas (10 min, 9400 g). A actividade dos sedimentos celulares foi medida em contador gama.

A % de captação celular foi calculada segundo a expressão seguinte:

$$\% \text{ Captação celular} = \frac{\text{Actividade medida no sedimento/lisado celular (cpm)}}{\text{Actividade total (cpm)}} \times 100$$

Com os dados experimentais traçaram-se curvas de % captação (por milhão de células) vs tempo de incubação. Estes estudos foram efectuados em colaboração com a Doutora Lurdes Gano e a Doutora Filipa Mendes (ITN).

#### 6.11.4. Estudos de competição com o haloperidol

Os estudos de competição com o haloperidol foram realizados de acordo com protocolos descritos na literatura, com pequenas adaptações.<sup>104,109</sup> As células foram incubadas simultaneamente com diferentes concentrações de haloperidol ( $10^{-14}$  a  $10^{-4}$  M) e com soluções contendo os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  durante 4 h a 37 °C sob atmosfera húmida de 5%  $\text{CO}_2$ . Ao fim de 4 h seguiu-se o procedimento descrito na secção 6.11.3 para a captação celular. Com os dados experimentais traçaram-se curvas de % captação dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  (por milhão de células) vs tempo de incubação, na presença de diferentes concentrações de haloperidol.

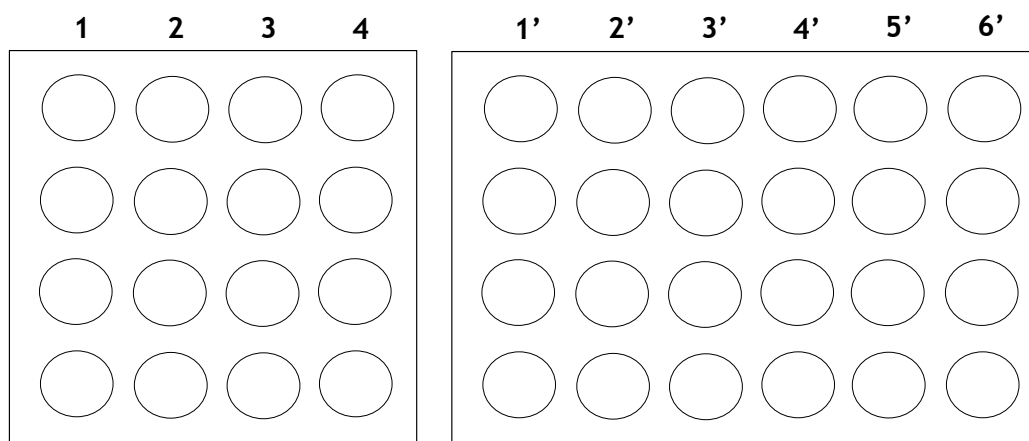
#### 6.11.5. Estudos de alteração do potencial da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial

Estes ensaios foram realizados na linha celular PC-3, de acordo com protocolos anteriormente descritos na literatura.<sup>144,166,216,217</sup> Foram efectuados estudos de captação celular em soluções tampão com diferentes concentrações de  $\text{K}^+$  (5, 60, 120 mM). Considerou-se como normal uma concentração extracelular (i.e. no meio de cultura) de  $\text{K}^+$  de 5 mM.<sup>239,240</sup> Para esta concentração de  $\text{K}^+$  (5mM) utilizou-se uma solução tampão com a seguinte composição (mM): NaCl (145), KCl (5,4),  $\text{CaCl}_2$  (1,2),  $\text{MgSO}_4$  (0,8),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,8), dextrose (5,6), HEPES (5) e 1% de soro bovino fetal (v/v) com um pH final de 7,4. As soluções de 60 e 120 mM de  $\text{K}^+$  foram preparadas por substituição do NaCl por aspartato- $\text{K}^+$  na concentração desejada de modo a evitar a intumescência citosólica e mitocondrial.<sup>216</sup> Para estas soluções a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  foi ainda diminuída para 0,1 mM e o  $\text{Cl}^-$  foi mantido a uma concentração de 20 mM. As soluções *stock* de valinomicina, nigericina, ubaína, CCCP foram preparadas em DMSO.

Os estudos de captação foram realizados após remoção do meio de cultura seguido de incubação das células com os complexos em estudo (figura 5.1). Os primeiros poços da placa foram utilizadas para incubação dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  com as soluções tampão de diferentes concentrações de  $\text{K}^+$  (5, 60, 120 mM) (poços 1-3) num volume total de 500  $\mu\text{L}$ . No poço seguinte (poços 4) adicionou-se a valinomicina (5  $\mu\text{L}$ , de modo a percentagem de DMSO não exceder 1%) juntamente com 500  $\mu\text{L}$  do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  na solução tampão com a concentração de  $\text{K}^+$  de 120 mM. Ao fim de 4 h seguiu-se o procedimento descrito na secção 5.11.3.

A valinomicina, a nigericina, a ubaína e o CCCP foram adicionados após a incubação das células com os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  em meio de cultura, durante 4 h (poços 1'-6'). Findo

este tempo foram adicionadas 5  $\mu\text{L}$  de soluções (de modo a percentagem de DMSO não exceder 1%) de valinomicina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), nigericina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ubaína (100  $\mu\text{M}$ ), CCCP (5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ), procedendo-se à incubação a 37 °C durante mais 15 min (figura 6.6). Após este período de incubação, o meio foi removido e seguiu-se o procedimento descrito na secção 5.11.3.



**Figura 6.6.** Esquema das condições experimentais utilizadas nos estudos de alteração dos potenciais de membrana plasmático e mitocondrial. Na 1ª placa adicionaram-se os complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  nas respectivas soluções durante 4 h: 1 - Solução tampão  $\text{K}^+$  5 mM; 2 - Solução tampão  $\text{K}^+$  60 mM; 3 - Solução tampão  $\text{K}^+$  120 mM; 4 - Solução tampão  $\text{K}^+$  120 mM + valinomicina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Na 2ª placa os complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foram adicionados em meio de cultura durante 4 h. As soluções de nigericina, ubaína, CCP foram adicionadas ao fim deste tempo e incubadas durante mais 15 min: 1' - meio cultura; 2' - meio cultura + nigericina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 3' - meio cultura + ubaína (100  $\mu\text{M}$ ); 4' - meio cultura + nigericina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + ubaína (100  $\mu\text{M}$ ); 5' - meio cultura + CCCP (5  $\mu\text{M}$ ); 6' - meio cultura + CCCP (10  $\mu\text{M}$ )

## 6.12. Testes de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados através do teste MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) que permitiu avaliar a viabilidade celular após a exposição aos compostos em estudo. O MTT apresenta uma estrutura molecular em forma de anel e é clivado por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, dando origem aos cristais de formazan de coloração violeta. As células que se mantêm viáveis reduzem o MTT a formazan, durante a respiração celular. A detecção da quantidade de formazan formado é uma indicação da integridade das mitocôndrias, e é directamente proporcional ao número de células viáveis.

As linhas celulares B16-F1 e A375 foram cultivadas em placas de 96 poços (cerca de  $50 \times 10^5$  células/poço) durante a noite para garantir a sua adesão. Após este período adicionaram-se soluções de diferentes concentrações de haloperidol ( $10^{-14}$  a  $10^{-4}$  M)

dissolvidos em etanol (para uma percentagem máxima de etanol de 2%), durante 4 h. Após este tempo de incubação, retirou-se o meio de cultura e posteriormente adicionou-se uma solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura; 200  $\mu$ L), durante 3 h a 37 °C e em 5% CO<sub>2</sub>. Após esta incubação, a solução de MTT foi aspirada e adicionou-se 200  $\mu$ L de DMSO, para dissolver os cristais de formazan formados. A absorvância das soluções foi medida a 570 nm num espectrofotómetro de placas Power Wave Xs, Bio-Tek. Para cada estudo utilizaram-se pelo menos 6 replicados e os resultados foram repetidos pelo menos duas vezes. A presença de um máximo de 2% de etanol não causou diminuição detectável da viabilidade celular e assim, os resultados foram expressos como percentagem das células viáveis em relação ao controlo (células incubadas em meio de cultura). Estes estudos foram efectuados em colaboração com a Doutora Lurdes Gano e a Doutora Filipa Mendes (ITN).

### 6.13. Estudos de captação em mitocôndrias isoladas

#### 6.13.1. Isolamento de mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas a partir de células PC-3 em cultura utilizando um kit comercial de isolamento de mitocôndrias (*Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells*, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA)), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, após centrifugação (Centrífuga 5804R, Eppendorf) de uma suspensão celular com 10-15x10<sup>6</sup> células durante 2 min a 850 g obteve-se um *pellet* de células, que foi ressuspenso em 450  $\mu$ L do Reagente A suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (*Roche*, Basileia, Suíça) e transferido para um tubo de microcentrífuga. A solução foi agitada em vórtex a uma velocidade média durante 5 s e incubada em gelo durante exactamente 2 min. Findo este tempo adicionou-se 20  $\mu$ L do Reagente B e agitou-se em vórtex à velocidade máxima durante 5 s. O tubo foi seguidamente incubado em gelo durante 5 min, agitando em vórtex a cada min à velocidade máxima. Adicionou-se 450  $\mu$ L do Reagente C suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (*Roche*) e inverteu-se o tubo várias vezes. O tubo foi centrifugado a 700 g (Centrífuga 5417R, Eppendorf) durante 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado novamente a 12000 g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado (fracção citosólica) e o *pellet* obtido corresponde à fracção mitocondrial. Lavou-se o *pellet* novamente com 300  $\mu$ L do Reagente C e centrifugou-se a 12000 g durante 5 min. O *pellet* contendo as mitocôndrias isoladas foi mantido em gelo antes de ser utilizado nos estudos de captação mitocondrial. Estes estudos foram efectuados em colaboração com a Doutora Filipa Mendes (ITN).

### 6.13.2. Estudos de captação mitocondrial

O *pellet* de mitocôndrias isolado a partir de aproximadamente  $10\text{-}15 \times 10^6$  células foi ressuspendido em 2 mL de meio de cultura. A suspensão mitocondrial foi incubada com os complexos em estudo durante 15 min, 30 min, 1 h, 2 h e 3 h em agitação constante à temperatura de 37 °C. Após o período de incubação recolheu-se amostras de 200  $\mu\text{L}$  (em duplicado) para tubos de microcentrífuga contendo 500  $\mu\text{L}$  de PBS mantido em gelo. As amostras foram centrifugadas durante 3 min à velocidade de 9400 g (Centrífuga 5417R, Eppendorf). Desprezou-se o sobrenadante e voltou-se a lavar o precipitado com 500  $\mu\text{L}$  de PBS frio, e as amostras foram novamente centrifugadas (10 min, 9400 g). A actividade dos sedimentos celulares foi medida em contador gama. A % da captação mitocondrial foi calculada como descrito na secção 5.11.3 para a captação celular. Com os dados experimentais traçaram-se curvas de % captação (por milhão de células) vs tempo de incubação. Estes estudos foram efectuados em colaboração com a Doutora Filipa Mendes (ITN).

### 6.14. Quantificação proteica

A quantificação proteica de alíquotas dos lisados celulares foi determinada utilizando o Kit DC “Protein Assay” (*Biorad*, Hercules, California, EUA), baseado no método de Lowry modificado. Como padrão para curva de calibração foi utilizada a albumina de soro bovina ultrapura (*Biorad*). Estes estudos foram efectuados com a colaboração da Doutora Filipa Mendes (ITN).

### 6.15. Western blot

As experiências de *western blot* foram realizadas com o objectivo de avaliar os níveis de expressão dos receptores sigma-1 ( $\sigma_1$ ) e dos níveis da expressão da proteína Pgp. Para a avaliação da expressão dos receptores  $\sigma_1$  utilizaram-se extractos das linhas celulares B16-F1, A375, PC-3 e MCF-7 que foram obtidos após a lise das células utilizando o reagente “Cell Lytic-MT Extraction” (*Sigma-Aldrich*) suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (*Roche*). Após 15 min em gelo, os lisados foram centrifugados a 14000 g durante 10 min a 4 °C, e o *pellet* resultante foi descartado. A quantificação das proteínas totais no sobrenadante foi efectuada utilizando o Kit DC “Protein Assay” (*Biorad*). Alíquotas de extractos proteicos (30  $\mu\text{g}$ ) de cada amostra foram sujeitas a electroforese num gel de 10% de SDS-poliacrilamida e transferidos electroforeticamente

para uma membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi incubada com uma solução de PBS suplementado com 0,1 % (v/v) Tween20 (PBS-T) contendo 5% de leite magro em pó para bloquear os locais não específicos de ligação aos anticorpos (Ac). Findo este tempo a membrana foi incubada com Ac primários específicos para o  $\sigma_1$  (1:200, Ac policlonal de cabra, L-20, *Abcam*, Cambridge, Reino Unido) e para a actina (1:8000, Ac monoclonal de rato, AC-40, *Sigma-Aldrich*) durante a noite a 4 °C. No dia seguinte as membranas foram lavadas com PBS-T e incubadas durante 1 h com os Ac secundários conjugados com a enzima peroxidase de rabanete (HRP) (1:1500, IgG-HRP de burro, *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, California, EUA para  $\sigma_1$ ; 1:3000, IgG-HRP de cabra, *Biorad* para a actina). Por último as membranas foram incubadas com o *kit* “SuperSignal WetsPico Substrate” (*Thermo Scientific*) de acordo com as especificações do produto, para detecção do sinal em chapas radiográficas.

No estudo de avaliação dos níveis da expressão da Pgp o procedimento utilizado foi semelhante ao atrás descrito com algumas alterações, nomeadamente: os extractos celulares utilizados foram obtidos a partir das células B16-F1, PC-3, MCF-7, MCF-7/*MDR1*, H69 e H69/Lx4. O gel de electroforese utilizado foi um gel de 7% SDS-poliacrilamida. O Ac primário específico para a Pgp correspondia a um Ac monoclonal de rato (1:350, C219, *Abcam*) e o Ac secundário a um Ac IgG-HRP de cabra (1:3000, *Biorad*). Estes estudos foram efectuados em colaboração com a Doutora Filipa Mendes (ITN).

#### **6.16. Biodistribuição e estabilidade *in vivo***

Todas as experiências *in vivo* foram realizadas de acordo com as normas portuguesas de manipulação de animais. Os animais foram mantidos em salas de temperatura e humidade controlada num horário 12 h luz/ 12 h escuridão e em dieta normal *ad libitum*. As condições experimentais de realização dos ensaios biológicos satisfaziam as orientações técnicas relativas ao alojamento e cuidados a prestar a pequenos roedores, aprovadas na Portaria 1131/ 97 para aplicação dos Decretos-Lei nº 129/ 92 de 6 de Julho e 197/96 de 16 de Outubro, que transpõem para a ordem jurídica interna a Directiva comunitária nº 86/609/CEE a qual estabelece as normas mínimas relativas à protecção de animais para fins experimentais e outros fins científicos.

### 6.16.1. Estudos de biodistribuição em animais saudáveis

A biodistribuição dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foi estudada em ratinhos fêmea CD-1 (estirpe *outbred* Charles River), sendo o peso de cada animal aproximadamente de 20-25 g. Os animais foram injectados intravenosamente na veia da cauda com 100  $\mu\text{L}$  (2,5 - 12,5 MBq) da preparação radioactiva. Os ratinhos foram sacrificados por deslocamento cervical 1 e 4 h após a administração. A dose radioactiva administrada e a radioactividade no animal sacrificado foram medidas numa câmara de ionização (Aloka, Curiemeter IGC-3, Tokyo, Japan). Foi assumido que a diferença de radioactividade no animal após injeção e no momento de sacrifício era devida à excreção. Os órgãos principais foram então removidos, pesados e contados num contador gama. A acumulação de radioactividade nos tecidos foi calculada e expressa em percentagem da dose injectada por grama de órgão (% DI/g de órgão). Amostras de sangue e urina foram recolhidas para avaliação da estabilidade *in vivo*. Estes estudos foram efectuados em colaboração com a Doutora Lurdes Gano e Elisabete Correia (ITN).

### 6.16.2. Estudos de biodistribuição em animais com tumores induzidos

#### 6.16.2.1. Inoculação de ratinhos com células do melanoma

Os estudos de biodistribuição dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foram efectuados em ratinhos fêmeas C57BL/6 (Charles River, 8 - 10 semanas,  $n = 4$ ) nos quais foi induzido o tumor a partir das células de melanoma murino B16-F1. Os animais foram inoculados no dorso com  $1 \times 10^6$  células em 100  $\mu\text{L}$  PBS, injectadas sub-cutaneamente. Tumores de 0,2 a 1,2 g desenvolveram-se após 10 a 12 dias de inoculação.

#### 6.16.2.2. Ensaios de biodistribuição

Os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foram injectados (50 - 200  $\mu\text{Ci}$  em  $\sim 100 \mu\text{L}$  de PBS) na zona retroorbital de ratinhos previamente anestesiados com isofluorano. Após 1 e 4 h os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e a fixação no tumor e órgãos de interesse foi determinada de acordo com o protocolo descrito na secção 6.16.1. Estes estudos foram efectuados pela Doutora Lurdes Gano, pela Doutora Paula Raposinho e Elisabete Correia (ITN).

### 6.16.2.3. Obtenção de imagens em câmara gama

Para obtenção de imagens ratinhos com tumor induzido foram injectados com o complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  (29 MBq) e sacrificados ao fim de 1 h. Foram adquiridas um conjunto de imagens estáticas (256×256 matrix, Zoom 2, 2 min) colocando os animais numa câmara gama (GE 400AC; Maxicamera, Milwaukie, EUA) acoplada com um colimador de alta resolução paralelo e controlado por um computador com o programa GENIE Acquisition. Estes estudos foram efectuados no IBILI (Coimbra) pela Doutora Filomena Botelho e Mestre Margarida Abrantes.

### 6.16.3. Estabilidade *in vivo*

A estabilidade *in vivo* dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foi avaliada através da análise por HPLC da urina e do soro de ratinhos aos quais foram administradas preparações destes complexos. Os animais foram sacrificados após 1 h de injeção, de acordo com os procedimentos atrás descritos. A urina foi recolhida no momento do sacrifício e centrifugada (CR4 11, Jouan) durante 10 min a 2000 rpm, e o sobrenadante foi analisado por HPLC. O sangue recolhido dos ratinhos foi imediatamente centrifugado durante 10 min, a 3000 rpm e a 4 °C. O soro foi separado e alíquotas de 75 µL de soro foram tratadas com 150 µL de etanol frio para precipitar as proteínas. As amostras foram novamente centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e analisado por HPLC.

# **Referências Bibliográficas**

---



## Referências Bibliográficas

---

1. Kowalsky, RJ and Falen, S, *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy & Nuclear Medicine*, 2004, APha Publications.
2. Clarke, MJ and Sadler, PJ, *Metallopharmaceuticals II: Diagnosis and Therapy (Topics in Biological Inorganic Chemistry)*, 1999, Springer.
3. Torres, R; Årstad, E and Blower, P, *Nuclear imaging of molecular processes in cancer*, Targeted Oncology, **2009**, 4 (3), p. 183-197
4. Dilworth, J and Parrott, S, *The biomedical chemistry of technetium and rhenium*, Chemical Society Reviews, **1998**, 27 (1), p. 43-55
5. <http://www.healthtalk.com/coloncancer/diseasebasics06.cfm>. Acedido a 10 de Janeiro de 2007];
6. Saha, GB, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 2003, New York, Springer-Verlag Inc.
7. Liu, S, *The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals*, Chemical Society Reviews, **2004**, 33 (7), p. 445-461
8. [http://en.wikipedia.org/wiki/Radioactive\\_decay](http://en.wikipedia.org/wiki/Radioactive_decay). Acedido a 3 de Setembro de 2011];
9. Welch, MJ and Redvanly, CS, *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*, 2002, New York, Wiley.
10. Volkert, WA and Hoffman, TJ, *Therapeutic Radiopharmaceuticals*, Chemical Reviews, **1999**, 99 (9), p. 2269-2292
11. Ercan, MT and Caglar, M, *Therapeutic radiopharmaceuticals*, Current Pharmaceutical Design, **2000**, 6 (11), p. 1085-1121
12. Ferro-Flores, G; de Murphy, CA and Melendez-Alafort, L, *Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy*, Current Pharmaceutical Analysis, **2006**, 2 (4), p. 339-352
13. Bartholomal, MD; Louie, AS; Valliant, JF and Zubieta, J, *Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era*, Chemical Reviews, **2010**, 110 (5), p. 2903-2920
14. Wadsak, W and Mitterhauser, M, *Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT*, European Journal of Radiology, **2010**, 73 (3), p. 461-469
15. Zeglis, BM and Lewis, JS, *A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography*, Dalton Transactions, **2011**, 40 (23), p. 6168-6195
16. Bhattacharyya, S and Dixit, M, *Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals*, Dalton Transactions, **2011**, 40 (23), p. 6112-6128
17. Pimlott, SL and Sutherland, A, *Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease*, Chemical Society Reviews, **2011**, 40 (1), p. 149-162
18. Liu, S and Edwards, DS, *<sup>99m</sup>Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals*, Chemical Reviews, **1999**, 99 (9), p. 2235-2268
19. Storr, T; Thompson, KH and Orvig, C, *Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry*, Chemical Society Reviews, **2006**, 35 (6), p. 534-544
20. Alberto, R; McCleverty, JA and Meyer, TJ, *Technetium*, in *Comprehensive Coordination Chemistry II*, 2003, Pergamon, Oxford, p. 127-270
21. Oliveira, R; Santos, D; Ferreira, D; Coelho, P and Veiga, F, *Preparações Radiofarmacêuticas e suas aplicações*, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, **2006**, 42, p. 151-165

22. Abram, U and Alberto, R, *Technetium and Rhenium - Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications*, Journal of Brazilian Chemical Society, **2006**, p. 1486-1500
23. Correia, JDG; Paulo, A; Raposinho, PD and Santos, I, *Radiometallated peptides for molecular imaging and targeted therapy*, Dalton Transactions, **2011**, 40 (23), p. 6144-6167
24. Cyr, JE; Pearson, DA; Manchanda, R; De Rosch, MA; Rutkowski, JV; Nelson, CA; Moyer, BR; Lister-James, J and Dean, RT, *Characterization and radiolabeling chemistry of Tc 99m depreotide: A somatostatin receptor binding tumor imaging agent*, Journal of Nuclear Medicine, **1999**, 40 (5), p. 321
25. Taillefer, R; Nicodemus, CF; Lister-James, J and Dean, RT, *Tc-99m apcitide (Acutect (TM)): Sensitivity and specificity for imaging acute deep vein thrombosis*, Journal of Nuclear Medicine, **1999**, 40 (5), p. 40
26. Francesconi, LC; Zheng, Y; Bartis, J; Blumenstein, M; Costello, C and De Rosch, MA, *Preparation and Characterization of [<sup>99</sup>TcO] Apcitide: A Technetium Labeled Peptide*, Inorganic Chemistry, **2004**, 43 (9), p. 2867-2875
27. Wegener, WA; Petrelli, N; Serafini, A and Goldenberg, DM, *Safety and Efficacy of Arcitumomab Imaging in Colorectal Cancer After Repeated Administration*, Journal of Nuclear Medicine, **2000**, 41 (6), p. 1016-1020
28. Banerjee, SR; Maresca, KP; Francesconi, L; Valliant, J; Babich, JW and Zubieta, J, *New directions in the coordination chemistry of 99mTc: a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design*, Nuclear Medicine and Biology, **2005**, 32 (1), p. 1-20
29. Mendez-Rojas, MA; Kharisov, BI and Tsivadze, AY, *Recent advances on technetium complexes: coordination chemistry and medical applications*, Journal of Coordination Chemistry, **2006**, 59 (1), p. 1-63
30. Shi, J; Jia, B; Liu, Z; Yang, Z; Yu, Z; Chen, K; Chen, X; Liu, S and Wang, F, *<sup>99m</sup>Tc-Labeled Bombesin(7-14)NH<sub>2</sub> with Favorable Properties for SPECT Imaging of Colon Cancer*, Bioconjugate Chemistry, **2008**, 19 (6), p. 1170-1178
31. Faintuch, BL; Santos, R; Souza, A; Hoffman, TJ; Greeley, M and Smith, CJ, *Tc-99m-HYNIC-Bombesin (7-14)NH<sub>2</sub>: Radiochemical evaluation with co-ligands EDDA (EDDA = ethylenediamine-N,N'-diacetic acid), tricine, and nicotinic acid*, Synthesis and Reactivity in Inorganic Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry, **2005**, 35 (1), p. 43-51
32. Edwards, DS; Liu, S; Barrett, JA; Harris, AR; Looby, RJ; Ziegler, MC; Heminway, SJ and Carroll, TR, *New and Versatile Ternary Ligand System for Technetium Radiopharmaceuticals: Water Soluble Phosphines and Tricine as Coligands in Labeling a Hydrazinonicotinamide-Modified Cyclic Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonist with <sup>99m</sup>Tc*, Bioconjugate Chemistry, **1997**, 8 (2), p. 146-154
33. Jurisson, SS and Lydon, JD, *Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals*, Chemical Reviews, **1999**, 99 (9), p. 2205-2218
34. Schibli, R and Schubiger, A, *Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals*, European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, **2002**, 29 (11), p. 1529-1542
35. Weiner, RE and Thakur, ML, *Radiolabeled Peptides in Oncology: Role in Diagnosis and Treatment*, BioDrugs, **2005**, 19 (3), p. 145-163
36. Mease, RC and Lambert, C, *Newer methods of labeling diagnostic agents with Tc-99m*, Seminars in Nuclear Medicine, **2001**, 31 (4), p. 278-285
37. Alberto, R, *The particular role of radiopharmacy within bioorganometallic chemistry*, Journal of Organometallic Chemistry, **2007**, 692 (6), p. 1179-1186
38. Hom, RK and Katzenellenbogen, JA, *Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: Recent developments and encouraging results*, Nuclear Medicine and Biology, **1997**, 24 (6), p. 485-498

39. Miessler, G and Tarr, D, *Inorganic Chemistry*, 2nd Edition ed, 1999, New York, Prentice Hall.
40. Dias, AR, *Ligação Química*, 2006, Lisboa, IST Press.
41. Alberto, R; Schibli, R; Egli, A; Schubiger, AP; Abram, U and Kaden, TA, A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of  $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  from  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$  in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand, *Journal of the American Chemical Society*, **1998**, 120 (31), p. 7987-7988
42. Alberto, R; Ortner, K; Wheatley, N; Schibli, R and Schubiger, AP, Synthesis and Properties of Boranocarbonate: A Convenient in Situ CO Source for the Aqueous Preparation of  $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ , *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, 123 (13), p. 3135-3136
43. Malone, LJ and Manley, MR, Hydrolysis of carbon monoxide borane, *Inorganic Chemistry*, **1967**, 6 (12), p. 2260-2262
44. Malone, LJ and Parry, RW, The preparation and properties of the boranocarbonates, *Inorganic Chemistry*, **1967**, 6 (4), p. 817-822
45. Schibli, R; La Bella, R; Alberto, R; Garcia-Garayoa, E; Ortner, K; Abram, U and Schubiger, PA, Influence of the Denticity of Ligand Systems on the in Vitro and in Vivo Behavior of  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -Tricarbonyl Complexes: A Hint for the Future Functionalization of Biomolecules, *Bioconjugate Chemistry*, **2000**, 11 (3), p. 345-351
46. Garcia, R; Paulo, An; Domingos, Ân; Santos, I; Ortner, K and Alberto, R, Re and Tc Complexes Containing B-H Agostic Interactions as Building Blocks for the Design of Radiopharmaceuticals, *Journal of the American Chemical Society*, **2000**, 122 (45), p. 11240-11241
47. Maria, L; Paulo, An; Santos, IC; Santos, I; Kurz, P; Spingler, B and Alberto, R, Very Small and Soft Scorpionates: Water Stable Technetium Tricarbonyl Complexes Combining a Bis-agostic ( $\kappa^3\text{-H, H, S}$ ) Binding Motif with Pendant and Integrated Bioactive Molecules, *Journal of the American Chemical Society*, **2006**, 128 (45), p. 14590-14598
48. Garcia, R; Paulo, A; Domingos, Â and Santos, I, Rhenium(I) organometallic complexes with novel bis(mercaptoimidazolyl)borates and with hydrotris(mercaptoimidazolyl)borate: chemical and structural studies, *Journal of Organometallic Chemistry*, **2001**, 632 (1-2), p. 41-48
49. Banerjee, SR; Levalada, MK; Lazarova, N; Wei, L; Valliant, JF; Stephenson, KA; Babich, JW; Maresca, KP and Zubieta, J, Bifunctional Single Amino Acid Chelates for Labeling of Biomolecules with the  $\{\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$  and  $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^+$  Cores. Crystal and Molecular Structures of  $[\text{ReBr}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{N})]$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3\{\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2\}_2\text{NH}\}\text{Br}$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3\{\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2\}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}\}\text{Br}$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3\{\text{X}(\text{Y})\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\}\text{Br}$  ( $\text{X} = \text{Y} = 2\text{-pyridylmethyl}$ ;  $\text{X} = 2\text{-pyridylmethyl}$ ,  $\text{Y} = 2\text{-(1-methylimidazolyl)methyl}$ ;  $\text{X} = \text{Y} = 2\text{-(1-methylimidazolyl)methyl}$ ),  $[\text{ReBr}(\text{CO})_3\{\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2\}\text{NH}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})\}\text{Br}$ , and  $[\text{Re}(\text{CO})_3\{\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2\}\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})(\text{CH}_2\text{CO}_2)\}\text{Br}$ , *Inorganic Chemistry*, **2002**, 41 (24), p. 6417-6425
50. Vitor, RF; Alves, S; Correia, JDG; Paulo, A and Santos, I, Rhenium(I)- and technetium(I) tricarbonyl complexes anchored by bifunctional pyrazole-diamine and pyrazole-dithioether chelators, *Journal of Organometallic Chemistry*, **2004**, 689 (25), p. 4764-4774
51. Alves, S; Paulo, A; Correia, JDG; Gano, L; Smith, CJ; Hoffman, TJ and Santos, I, Pyrazolyl Derivatives as Bifunctional Chelators for Labeling Tumor-Seeking Peptides with the  $\text{fac-}[M(\text{CO})_3]^+$  Moiety ( $M = ^{99m}\text{Tc}, \text{Re}$ ): Synthesis, Characterization, and Biological Behavior, *Bioconjugate Chemistry*, **2005**, 16 (2), p. 438-449
52. Alves, S; Correia, JDG; Santos, I; Veerendra, B; Sieckman, GL; Hoffman, TJ; Rold, TL; Figueroa, SD; Retzlöff, L; McCrate, J; Prasanphanich, A and Smith, CJ, Pyrazolyl conjugates of bombesin: a new tridentate ligand framework for the stabilization of  $\text{fac-}[M(\text{CO})_3]^+$  moiety, *Nuclear Medicine and Biology*, **2006**, 33 (5), p. 625-634

53. Garcia, R; Gano, L; Maria, L; Paulo, A; Santos, I and Spies, H, *Synthesis and biological evaluation of tricarbonyl Re(I) and Tc(I) complexes anchored by poly(azolyl)borates: application on the design of radiopharmaceuticals for the targeting of 5-HT<sub>1A</sub> receptors*, Journal of Biological Inorganic Chemistry, **2006**, 11 (6), p. 769-782
54. Moura, C; Fernandes, C; Gano, L; Paulo, A; Santos, IC; Santos, I and Calhorda, MJ, *Influence of the ligand donor atoms on the in vitro stability of rhenium(I) and technetium (I)-99m complexes with pyrazole-containing chelators: Experimental and DFT studies*, Journal of Organometallic Chemistry, **2009**, 694 (6), p. 950-958
55. Fernandes, C; Santos, IC; Santos, I; Pietzsch, H-J; Kunstler, J-U; Kraus, W; Rey, A; Margaritis, N; Bourkoula, A; Chiotellis, A; Paravatou-Petsotas, M and Pirmettis, I, *Rhenium and technetium complexes bearing quinazoline derivatives: progress towards a <sup>99m</sup>Tc biomarker for EGFR-TK imaging*, Dalton Transactions, **2008**, (24), p. 3215-3225
56. Alberto, R, *The Chemistry of Technetium-Water Complexes within the Manganese Triad: Challenges and Perspectives*, European Journal of Inorganic Chemistry, **2009**, 2009 (1), p. 21-31
57. Häfliger, P; Agorastos, N; Spingler, B; Georgiev, O; Viola, G and Alberto, R, *Induction of DNA-Double-Strand Breaks by Auger Electrons from <sup>99m</sup>Tc Complexes with DNA-Binding Ligands*, ChemBioChem, **2005**, 6 (2), p. 414-421
58. Stichelberger, A; Waibel, R; Dumas, C; Schubiger, PA and Schibli, R, *Versatile synthetic approach to new bifunctional chelating agents tailor made for labeling with the fac-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> core (M = Tc, <sup>99m</sup>Tc, Re): synthesis, in vitro, and in vivo behavior of the model complex [M(APPA)(CO)<sub>3</sub>] (appa = [(5-amino-pentyl)-pyridin-2-yl-methyl-amino]-acetic acid)*, Nuclear Medicine and Biology, **2003**, 30 (5), p. 465-470
59. Alves, S; Correia, JoDG; Gano, L; Rold, TL; Prasanphanich, A; Haubner, R; Rupprich, M; Alberto, R; Decristoforo, C; Santos, I and Smith, CJ, *In Vitro and In Vivo Evaluation of a Novel <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>-Pyrazolyl Conjugate of cyclo-(Arg-Gly-Asp-d-Tyr-Lys)*, Bioconjugate Chemistry, **2007**, 18 (2), p. 530-537
60. Alves, S; Paulo, A; Correia, JDG; Domingos, A and Santos, I, *Coordination capabilities of pyrazolyl containing ligands towards the fac-[Re(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> moiety*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, **2002**, (24), p. 4714-4719
61. Garcia, R; Xing, Y-H; Paulo, A; Domingos, A and Santos, I, *Rhenium(I) tricarbonyl complexes with mercaptoimidazolylborate ligands bearing piperazine fragments*, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, **2002**, (22), p. 4236-4241
62. Pietzsch, HJ; Gupta, A; Reisgys, M; Drews, A; Seifert, S; Syhre, R; Spies, H; Alberto, R; Abram, U; Schubiger, PA and Johannsen, B, *Chemical and Biological Characterization of Technetium(I) and Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes with Dithioether Ligands Serving as Linkers for Coupling the Tc(CO)<sub>3</sub> and Re(CO)<sub>3</sub> Moieties to Biologically Active Molecules*, Bioconjugate Chemistry, **2000**, 11 (3), p. 414-424
63. Santos, I; Paulo, A and Correia, JDG, *Re and Tc Complexes Anchored by Phosphines and Scorpionates for Radiopharmaceutical Applications*, in Contrast Agents III, S. Berlin, Editor 2005, Heidelberg, p. 45-84
64. Correia, JDG; Domingos, A; Santos, I; Alberto, R and Ortner, K, *Re Tricarbonyl Complexes with Ligands Containing P,N,N and P,N,O Donor Atom Sets: Synthesis and Structural Characterization*, Inorganic Chemistry, **2001**, 40 (20), p. 5147-5151
65. Palma, E; Correia, JDG; Domingos, Â; Santos, I; Alberto, R and Spies, H, *Rhenium and technetium tricarbonyl complexes anchored by 5-HT<sub>1A</sub> receptor-binding ligands containing P,O/N donor atom sets*, Journal of Organometallic Chemistry, **2004**, 689 (25), p. 4811-4819
66. Petrig, J; Schibli, R; Dumas, C; Alberto, R and Schubiger, PA, *Derivatization of Glucose and 2-Deoxyglucose for Transition Metal Complexation: Substitution Reactions with Organometallic <sup>99m</sup>Tc and Re Precursors and Fundamental NMR Investigations*, Chemistry - A European Journal, **2001**, 7 (9), p. 1868-1873

67. Gray-Schopfer, V; Wellbrock, C and Marais, R, *Melanoma biology and new targeted therapy*, Nature, **2007**, 445 (7130), p. 851-857
68. Dancey, AL; Mahon, BS and Rayatt, SS, *A review of diagnostic imaging in melanoma*, Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS, **2008**, 61 (11), p. 1275-1283
69. Ren, G; Pan, Y and Cheng, Z, *Molecular Probes for Malignant Melanoma Imaging*, Current Pharmaceutical Biotechnology, **2010**, 11 (6), p. 590-602
70. Ings, RMJ, *The Melanin binding of Drugs and its Implications*, Drug Metabolism Reviews, **1984**, 15 (5-6), p. 1183-1212
71. Simon, JD; Peles, D; Wakamatsu, K and Ito, S, *Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function*, Pigment Cell & Melanoma Research, **2009**, 22 (5), p. 563-579
72. Lana, AMA; Wen, D-R and Cochran, AJ, *The morphology, immunophenotype and distribution of paracortical dendritic leucocytes in lymph nodes regional to cutaneous melanoma*, Melanoma Research, **2001**, 11 (4), p. 401-410
73. Pizzichetta, MA; Talamini, R; Stanganelli, I; Puddu, P; Bono, R; Argenziano, G; Veronesi, A; Trevisan, G; Rabinovitz, H and Soyer, HP, *Amelanotic/hypomelanotic melanoma: clinical and dermoscopic features*, British Journal of Dermatology, **2004**, 150 (6), p. 1117-1124
74. Lodish, H; Berk, A; Zipursky, SL; Matsudaira, P; Baltimore, D and Darnell, J, *Molecular Cell Biology*, 4th Edition ed, 2000, New York, W. H. Freeman.
75. <http://www.patient.co.uk/health/Cancer-What-are-Cancer-and-Tumours?.htm>. Acedido a 3 de Setembro de 2011];
76. Choi, EA and Gershenwald, JE, *Imaging Studies in Patients with Melanoma*, Surgical Oncology Clinics of North America, **2007**, 16 (2), p. 403-430
77. Kato, K; Kubota, T; Ikeda, M; Tadokoro, M; Abe, S; Nakano, S; Nishino, M; Kobayashi, H and Ishigaki, T, *Low efficacy of F-18-FDG PET for detection of uveal malignant melanoma compared with I-123-IMP SPECT*, Journal of Nuclear Medicine, **2006**, 47 (3), p. 404-409
78. Mansour, AA; Kelley, MC; Hatmaker, AR; Holt, GE and Schwartz, HS, *Verification of Musculoskeletal FDG-PET-CT Findings Performed for Melanoma Staging*, Annals of Surgical Oncology, **2010**, 17 (4), p. 1144-1151
79. Veit-Haibach, P; Vogt, F; Jablonka, R; Kuehl, H; Bockisch, A; Beyer, T; Dahmen, G; Rosenbaum, S and Antoch, G, *Diagnostic accuracy of contrast-enhanced FDG-PET/CT in primary staging of cutaneous malignant melanoma*, European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, **2009**, 36 (6), p. 910-918
80. Campoli, MR; Chang, CC; Kageshita, T; Wang, X; McCarthy, JB and Ferrone, S, *Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): A melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MSCP) with biological and clinical significance*, Critical Reviews in Immunology, **2004**, 24 (4), p. 267-296
81. Raposinho, PD; Correia, JDG; Alves, S; Botelho, MF; Santos, AC and Santos, I, *A Tc-99m(CO)(3)-labeled pyrazolyl-alpha-melanocyte-stimulating hormone analog conjugate for melanoma targeting*, Nuclear Medicine and Biology, **2008**, 35 (1), p. 91-99
82. Raposinho, PD; Correia, JDG; Oliveira, MC and Santos, I, *Melanocortin-1 receptor-targeting with radiolabeled cyclic  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone analogs for melanoma imaging*, Peptide Science, **2010**, 94 (6), p. 820-829
83. Watts, KP; Fairchild, RG; Slatkin, DN; Greenberg, D; Packer, S; Atkins, HL and Hannon, SJ, *Melanin Content of Hamster Tissues, Human-Tissues, and Various Melanomas*, Cancer Research, **1981**, 41 (2), p. 467-472
84. Dencker, L; Larsson, B; Olander, K; Ullberg, S and Yokota, M, *False precursors of melanin as selective melanoma seekers*, Br J Cancer, **1979**, 39 (4), p. 449-452

85. Coderre, JA; Packer, S; Fairchild, RG; Greenberg, D; Laster, B; Micca, P and Fand, I, *Iodothiouracil as a Melanoma Localizing Agent*, Journal of Nuclear Medicine, **1986**, 27 (7), p. 1157-1164
86. Dadachova, E and Casadevall, A, *Update: Renaissance of Targeting Molecules for Melanoma*, Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, **2006**, 21 (6), p. 545-552
87. Dadachova, E; Revskaya, E; Sesay, MA; Damania, H; Boucher, R; Sellers, RS; Howell, RC; Burns, L; Thornton, GB; Natarajan, A; Mirick, GR; DeNardo, SJ; DeNardo, GL and Casadevall, A, *Pre-clinical evaluation and efficacy studies of a melanin-binding IgM antibody labeled with <sup>188</sup>Re against experimental human metastatic melanoma in nude mice*, Cancer Biology & Therapy, **2008**, 7 (7), p. 1116-1127
88. Dadachova, E; Nosanchuk, JD; Shi, L; Schweitzer, AD; Frenkel, A; Nosanchuk, JS and Casadevall, A, *Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2004**, 101 (41), p. 14865-14870
89. Howell, RC; Revskaya, E; Pazo, V; Nosanchuk, JD; Casadevall, A and Dadachova, E, *Phage Display Library Derived Peptides that Bind to Human Tumor Melanin as Potential Vehicles for Targeted Radionuclide Therapy of Metastatic Melanoma*, Bioconjugate Chemistry, **2007**, 18 (6), p. 1739-1748
90. Revskaya, E; Jongco, AM; Sellers, RS; Howell, RC; Koba, W; Guimaraes, AJ; Nosanchuk, JD; Casadevall, A and Dadachova, E, *Radioimmunotherapy of Experimental Human Metastatic Melanoma with Melanin-Binding Antibodies and in Combination with Dacarbazine*, Clinical Cancer Research, **2009**, 15 (7), p. 2373-2379
91. Brandau, W; Niehoff, T; Pulawski, P; Jonas, M; Dutschka, K; Sciuk, J; Coenen, HH and Schober, O, *Structure distribution relationship of iodine-123-iodobenzamides as tracers for the detection of melanotic melanoma*, Journal of Nuclear Medicine, **1996**, 37 (11), p. 1865-1871
92. Oltmanns, D; Eisenhut, M; Mier, W and Haberkorn, U, *Benzamides as Melanotropic Carriers for Radioisotopes, Metals, Cytotoxic Agents and as Enzyme Inhibitors*, Current Medicinal Chemistry, **2009**, 16 (17), p. 2086-2094
93. Cachin, F; Chezal, JM; Miot-Noirault, E; Moins, N; Auzeloux, P; Vidal, A; Bonnet-Duquennoy, M; Boisgard, S; Filaire, M; Mestas, D; Kelly, A; Merlin, C; Redini, F; D'Incan, M; Madelmont, JC; Veyre, A and Maublant, J, *Nouveaux traceurs TEMP : exemple des traceurs des protéoglycanes et de la mélanine*, Médecine Nucléaire, **2009**, 33 (3), p. 161-167
94. Moreau, M; Parry, D and Michelot, J, *Synthèse, étude chez le rat, de composés radioiodés utilisables pour l'exploration du système nerveux central*, European Journal of Medicinal Chemistry, **1986**, 21, p. 423-431
95. Michelot, JM; Moreau, MFC; Labarre, PG; Madelmont, JC; Veyre, AJ; Papon, JM; Parry, DF; Bonafous, JF; Boire, JYP; Desplanches, GG; Bertrand, SJ and Meyniel, G, *Synthesis and Evaluation of new I-125 Radiopharmaceuticals as Potential Tracers for Malignant-Melanoma*, Journal of Nuclear Medicine, **1991**, 32 (8), p. 1573-1580
96. John, CS; Bowen, WD; Saga, T; Kinuya, S; Vilner, BJ; Baumgold, J; Paik, CH; Reba, RC; Neumann, RD; Varma, VM and McAfee, JG, *A Malignant-Melanoma Imaging Agent - Synthesis, Characterization, in-vitro Binding and Biodistribution of Iodine-125-(2-Piperidinylaminoethyl)4-Iodobenzamide*, Journal of Nuclear Medicine, **1993**, 34 (12), p. 2169-2175
97. Maffioli, L; Mascheroni, L; Mongioj, V; Gasparini, M; Baldini, MT; Seregini, E; Castellani, MR; Cascinelli, N and Buraggi, GL, *Scintigraphic detection of Melanoma Metastases with a Radiolabeled Benzamide ([Iodine-123]-(S)-Ibzm)*, Journal of Nuclear Medicine, **1994**, 35 (11), p. 1741-1747

98. Michelot, JM; Moreau, MFC; Veyre, AJ; Bonafous, JF; Bacin, FJ; Madelmont, JC; Bussiere, F; Souteyrand, PA; Mauclaire, LP; Chossat, FM; Papon, JM; Labarre, PG; Kauffmann, P and Plagne, RJ, *Phase-II Scintigraphic Clinical-Trial of Malignant-Melanoma and Metastases with Iodine-123-N-(2-Diethylaminoethyl 4-Iodobenzamide)*, Journal of Nuclear Medicine, **1993**, 34 (8), p. 1260-1266
99. Moreau, MF; Michelot, J; Papon, J; Bayle, M; Labarre, P; Madelmont, JC; Parry, D; Boire, JY; Moins, N; Seguin, H; Veyre, A and Mauclaire, L, *Synthesis, Radiolabeling, and Preliminary Evaluation in Mice of Some (N-Diethylaminoethyl)-4-Iodobenzamide Derivatives as Melanoma Imaging Agents*, Nuclear Medicine and Biology, **1995**, 22 (6), p. 737-747
100. Larisch, R; Schulte, KW; Vosberg, H; Ruzicka, T and Muller-Gartner, HW, *Differential accumulation of iodine-123-iodobenzamide in melanotic and amelanotic melanoma metastases in vivo*, Journal of Nuclear Medicine, **1998**, 39 (6), p. 996-1001
101. Mohammed, A; Nicholl, C; Titsch, U and Eisenhut, M, *Radioiodinated N-(alkylaminoalkyl)-substituted 4-methoxy-, 4-hydroxy-, and 4-aminobenzamides: Biological investigations for the improvement of melanoma-imaging agents*, Nuclear Medicine and Biology, **1997**, 24 (5), p. 373-380
102. Chezal, JM; Papon, J; Labarre, P; Lartigue, C; Galmier, MJ; Decombat, C; Chavignon, O; Maublant, J; Teulade, JC; Madelmont, JC and Moins, N, *Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma*, Journal of Medicinal Chemistry, **2008**, 51 (11), p. 3133-3144
103. Labarre, P; Papon, J; Rose, AH; Guerquin-Kern, JL; Morandeau, L; Wu, TD; Moreau, MF; Bayle, M; Chezal, JM; Croisy, A; Madelmont, JC; Turner, H and Moins, N, *Melanoma affinity in mice and immunosuppressed sheep of [I-125]N-(4-dipropylaminobutyl)-4-iodobenzamide, a new targeting agent*, Nuclear Medicine and Biology, **2008**, 35 (7), p. 783-791
104. Mansard, S; Papon, J; Moreau, MF; Miot-Noirault, E; Labarre, P; Bayle, M; Veyre, A; Madelmont, JC and Moins, N, *Uptake in melanoma cells of N-(2-diethylaminoethyl)-2-iodobenzamide (BZA(2)), an imaging agent for melanoma staging: relation to pigmentation*, Nuclear Medicine and Biology, **2005**, 32 (5), p. 451-458
105. Moins, N; D'Incan, M; Bonafous, J; Bacin, F; Labarre, P; Moreau, MF; Mestas, D; Noirault, E; Chossat, F; Berthommier, E; Papon, J; Bayle, M; Souteyrand, P; Madelmont, JC and Veyre, A, *I-123-N-(2-diethylaminoethyl)-2-iodobenzamide: a potential imaging agent for cutaneous melanoma staging*, European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, **2002**, 29 (11), p. 1478-1484
106. Moins, N; Papon, J; Seguin, H; Gardette, D; Moreau, MF; Labarre, P; Bayle, M; Michelot, J; Gramain, JC; Madelmont, JC and Veyre, A, *Synthesis, characterization and comparative biodistribution study of a new series of p-iodine-125 benzamides as potential melanoma imaging agents*, Nuclear Medicine and Biology, **2001**, 28 (7), p. 799-808
107. Moreau, MF; Papon, J; Labarre, P; Moins, N; Borel, M; Bayle, M; Bouchon, B and Madelmont, JC, *Synthesis, in vitro binding and biodistribution in B16 melanoma-bearing mice of new iodine-125 spermidine benzamide derivatives*, Nuclear Medicine and Biology, **2005**, 32 (4), p. 377-384
108. Pham, TQ; Berghofer, P; Liu, X; Greguric, I; Dikic, B; Ballantyne, P; Matmer, F; Nguyen, V; Loc'h, C and Katsifis, A, *Preparation and biologic evaluation of a novel radioiodinated benzylpiperazine, I-123-MEL037, for malignant melanoma*, Journal of Nuclear Medicine, **2007**, 48 (8), p. 1348-1356
109. Pham, TQ; Greguric, I; Liu, X; Berghofer, P; Ballantyne, P; Chapman, J; Mattner, F; Dikic, B; Jackson, T; Loc'h, C and Katsifis, A, *Synthesis and evaluation of novel radioiodinated benzamides for malignant melanoma*, Journal of Medicinal Chemistry, **2007**, 50 (15), p. 3561-3572

110. Maisoniai, Al; Kuhnast, B; Papon, J; Boisgard, Rl; Bayle, M; Vidal, Al; Auzeloux, P; Rbah, L; Bonnet-Duquennoy, M; Miot-Noirault, E; Galmier, M-Jp; Borel, Ml; Askienazy, S; Dollel, Fdr; Tavitian, B; Madelmont, J-C; Moins, N and Chezal, J-M, *Single Photon Emission Computed Tomography/Positron Emission Tomography Imaging and Targeted Radionuclide Therapy of Melanoma: New Multimodal Fluorinated and Iodinated Radiotracers*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 54 (8), p. 2745-2766
111. Joyal, JL; Barrett, JA; Marquis, JC; Chen, J; Hillier, SM; Maresca, KP; Boyd, M; Gage, K; Nimmagadda, S; Kronauge, JF; Friebe, M; Dinkelborg, L; Stubbs, JB; Stabin, MG; Mairs, R; Pomper, MG and Babich, JW, *Preclinical Evaluation of an <sup>131</sup>I-Labeled Benzamide for Targeted Radiotherapy of Metastatic Melanoma*, *Cancer Research*, **2010**, 70 (10), p. 4045-4053
112. Aydar, E; Palmer, CP and Djamgoz, MBA, *Sigma Receptors and Cancer: Possible Involvement of Ion Channels*, *Cancer Res*, **2004**, 64 (15), p. 5029-5035
113. Guitart, X; Codony, X and Monroy, X, *Sigma receptors: biology and therapeutic potential*, *Psychopharmacology*, **2004**, 174 (3), p. 301-319
114. Hashimoto, K and Ishiwata, K, *Sigma Receptor Ligands: Possible Application as Therapeutic Drugs and as Radiopharmaceuticals*, in *Current Pharmaceutical Design*. 2006, Bentham Science Publishers Ltd. p. 3857-3876
115. Nicholl, C; Mohammed, A and Eisenhut, M, *Dialkylaminoalkyl-4-iodobenzamides: Influence of specific activity and substituents on melanoma uptake and biodistribution*, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **1995**, 37, p. 277-279
116. Eisenhut, M; Hull, WE; Mohammed, A; Mier, W; Lay, D; Just, W; Gorgas, K; Lehmann, WD and Haberkorn, U, *Radioiodinated N-(2-diethylaminoethyl)benzamide derivatives with high melanoma uptake: Structure-affinity relationships, metabolic fate, and intracellular localization*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2000**, 43 (21), p. 3913-3922
117. Dittmann, H; Coenen, HH; Zölzer, F; Dutschka, K; Brandau, W and Streffer, C, *In vitro studies on the cellular uptake of melanoma imaging aminoalkyl-iodobenzamide derivatives (ABA)*, *Nuclear Medicine and Biology*, **1999**, 26 (1), p. 51-56
118. Chehade, F; de Labriolle-Vaylet, C; Moins, N; Moreau, MF; Papon, J; Labarre, P; Galle, P; Veyre, A and Hindie, E, *Secondary ion mass spectrometry as a tool for investigating radiopharmaceutical distribution at the cellular level: The example of I-BZA and C-14-I-BZA*, *Journal of Nuclear Medicine*, **2005**, 46 (10), p. 1701-1706
119. Guerquin-Kern JL, HF, Madelmont JC, Labarre P, Papon J, Croisy A., *Ultra-structural cell distribution of the melanoma marker iodobenzamide: improved potentiality of SIMS imaging in life sciences.*, *Biomed Eng Online*, **2004** 3,p. 10
120. Labarre, P; Papon, J; Moreau, MF; Moins, N; Bayle, M; Veyre, A and Madelmont, JC, *Melanin affinity of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide, an effective melanoma imaging agent*, *Melanoma Research*, **2002**, 12 (2), p. 115-121
121. Joyal, J; Hillier, S; Marquis, J; Chen, J; Friebe, M; Barrett, J; Kronauge, J and Babich, J, *Molecular targeting of melanoma with radiolabeled benzamides*, *J Nucl Med Meeting Abstracts*, **2008**, 49, p. 16
122. Garg, S; Kothari, K; Thopate, SR; Doke, AK and Garg, PK, *Design, Synthesis, and Preliminary in Vitro and in Vivo Evaluation of N-(2-diethylaminoethyl)-4-[F-18]fluorobenzamide ([F-18]-DAFBA): A Novel Potential PET Probe to Image Melanoma Tumors*, *Bioconjugate Chemistry*, **2009**, 20 (3), p. 583-590
123. Denoyer, D; Greguric, I; Roselt, P; Neels, OC; Aide, N; Taylor, SR; Katsifis, A; Dorow, DS and Hicks, RJ, *High-Contrast PET of Melanoma Using <sup>18</sup>F-MEL050, a Selective Probe for Melanin with Predominantly Renal Clearance*, *J Nucl Med*, **2010**, 51 (3), p. 441-447
124. Ren, G; Miao, Z; Liu, H; Jiang, L; Limpa-Amara, N; Mahmood, A; Gambhir, SS and Cheng, Z, *Melanin-Targeted Preclinical PET Imaging of Melanoma Metastasis*, *J Nucl Med*, **2009**, 50 (10), p. 1692-1699

125. Denoyer, D; Potdevin, T; Roselt, P; Neels, OC; Kirby, L; Greguric, I; Katsifis, A; Dorow, DS and Hicks, RJ, *Improved Detection of Regional Melanoma Metastasis Using  $^{18}\text{F}$ -6-Fluoro-N-[2-(Diethylamino)Ethyl] Pyridine-3-Carboxamide, a Melanin-Specific PET Probe, by Perilesional Administration*, Journal of Nuclear Medicine, **2011**, 52 (1), p. 115-122
126. Auzeloux, P; Moreau, MF; Papon, J; Bayle, M; Borel, M; Pasqualini, R and Madelmont, JC, *Technetium-99m radiolabelling of an N-amino-alkyl-benzamide nitrido- and oxotechnetium bis(aminoethanethiol) derivative synthesis and biological results. Potential melanoma tracer agents*, Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals, **1999**, 42 (6), p. 567-579
127. Auzeloux, P; Papon, J; Azim, EM; Borel, M; Pasqualini, R; Veyre, A and Madelmont, JC, *A potential melanoma tracer: Synthesis, radiolabeling, and biodistribution in mice of a new nitridotechnetium bis(aminothiol) derivative pharmacomodulated by a N-(diethylaminoethyl)benzamide*, Journal of Medicinal Chemistry, **2000**, 43 (2), p. 190-198
128. Auzeloux, P; Papon, J; Masnada, T; Borel, M; Moreau, MF; Veyre, A; Pasqualini, R and Madelmont, JC, *Synthesis and biodistribution of technetium-99m-labelled N-(diethylaminoethyl)benzamide via a bis(dithiocarbamate) nitridotechnetium(V) complex*, Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals, **1999**, 42 (4), p. 325-335
129. Auzeloux, P; Papon, J; Pasqualini, R and Madelmont, JC, *Synthesis and biodistribution of a new oxo-technetium-99m bis(aminothiol) complex as a potential melanoma tracer*, Journal of Medicinal Chemistry, **2001**, 44 (7), p. 1116-1121
130. Friebe, M; Mahmood, A; Bolzati, C; Drews, A; Johannsen, B; Eisenhut, M; Kraemer, D; Davison, A and Jones, AG, *[Tc-99m]oxotechnetium(V) complexes of amine-amide-dithiol chelates with dialkylaminoalkyl substituents as potential diagnostic probes for malignant melanoma*, Journal of Medicinal Chemistry, **2001**, 44 (19), p. 3132-3140
131. Eisenhut, M; Mohammed, A; Mier, W; Schonsiegel, F; Friebe, M; Mahmood, A; Jones, AG and Haberkorn, U, *Melanoma uptake of Tc-99m complexes containing the N-(2-diethylaminoethyl)benzamide structural element*, Journal of Medicinal Chemistry, **2002**, 45 (26), p. 5802-5805
132. Cheng, Z; Mahmood, A; Li, H; Davison, A and Jones, AG, *[ $^{99\text{m}}\text{TcOAAADT}]-(\text{CH}_2)_2-\text{NEt}_2$ : A Potential Small-Molecule Single-Photon Emission Computed Tomography Probe for Imaging Metastatic Melanoma*, Cancer Res, **2005**, 65 (12), p. 4979-4986
133. Friebe, M; Mahmood, A; Spies, H; Berger, R; Johannsen, B; Mohammed, A; Eisenhut, M; Bolzati, C; Davison, A and Jones, AG, *'3+1' mixed-ligand oxotechnetium(V) complexes with affinity for melanoma: Synthesis and evaluation in vitro and in vivo*, Journal of Medicinal Chemistry, **2000**, 43 (14), p. 2745-2752
134. Rey, A; Pirmettis, I; M., P; Giglio, J; Leon, E; Schreiber, F; Paolino, A; Fernandez, R; Manta, E; Chabalgoity, J and Leon, A, *Oxotechnetium and Oxorhenium 3+1 Mixed Ligand Complexes as Potential Melanoma Targeting Agents*, World Journal of Nuclear Medicine, **2005**, 4 (2), p. 111-119
135. Peindy N'Dongo, HW; Raposinho, PD; Fernandes, C; Santos, I; Can, D; Schmutz, P; Spingler, B and Alberto, R, *Preparation and biological evaluation of cyclopentadienyl-based  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -complexes [(Cp-R) $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] mimicking benzamides for malignant melanoma targeting*, Nuclear Medicine and Biology, **2010**, 37, p. 255-264
136. Pathania, D; Millard, M and Neamati, N, *Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism*, Advanced Drug Delivery Reviews, **2009**, 61 (14), p. 1250-1275
137. César and Sezar, *Biologia e Biologia*, E. Saraiva, Vol, 2010,
138. Nelson, D and Cox, M, *Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd Ed*, 2000, New York, EUA, Worth Publishers.

139. Duchen, MR, *Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology*, Molecular Aspects of Medicine, **2004**, 25 (4), p. 365-451
140. Kroemer, G; Dallaporta, B and Resche-Rigon, M, *The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis*, Annual Review of Physiology, **1998**, 60 (1), p. 619-642
141. Johnson, LV; Walsh, ML and Chen, LB, *Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123*, Proceedings of the National Academy of Sciences, **1980**, 77 (2), p. 990-994
142. Summerhayes, IC; Lampidis, TJ; Bernal, SD; Nadakavukaren, JJ; Nadakavukaren, KK; Shepherd, EL and Chen, LB, *Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells*, Proceedings of the National Academy of Sciences, **1982**, 79 (17), p. 5292-5296
143. Modica-Napolitano, JS and Aprille, JR, *Basis for the Selective Cytotoxicity of Rhodamine 123*, Cancer Research, **1987**, 47 (16), p. 4361-4365
144. Davis, S; Weiss, MJ; Wong, JR; Lampidis, TJ and Chen, LB, *Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells*, Journal of Biological Chemistry, **1985**, 260 (25), p. 13844-13850
145. Dairkee, SH and Hackett, AJ, *Differential retention of rhodamine 123 by breast carcinoma and normal human mammary tissue*, Breast Cancer Research and Treatment, **1991**, 18 (1), p. 57-61
146. Modica-Napolitano, JS and Singh, K, *Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer*, Expert Reviews in Molecular Medicine, **2002**, 4 (09), p. 1-19
147. Lichtshtein, D; Kaback, HR and Blume, AJ, *Use of a lipophilic cation for determination of membrane potential in neuroblastoma-glioma hybrid cell suspensions*, Proceedings of the National Academy of Sciences, **1979**, 76 (2), p. 650-654
148. Hockings, PD and Rogers, PJ, *The measurement of transmembrane electrical potential with lipophilic cations*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, **1996**, 1282 (1), p. 101-106
149. Huang, S-G, *Development of a High Throughput Screening Assay for Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells*, Journal of Biomolecular Screening, **2002**, 7 (4), p. 383-389
150. Modica-Napolitano, JS and Aprille, JR, *Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells*, Advanced Drug Delivery Reviews, **2001**, 49 (1-2), p. 63-70
151. Gommans, GMM; van der Zant, FM; van Dongen, A; Boer, RO; Teule, GJJ and de Waard, JWD, *<sup>99m</sup>Tc-sestamibi scintimammography in non-palpable breast lesions found on screening X-ray mammography*, European Journal of Surgical Oncology (EJSO), **2007**, 33 (1), p. 23-27
152. Usmani, S; Khan, HA; Niaz, K; Uz-Zaman, M; Niyaz, K; Javed, A; al Mohannadi, S; al Huda, FA and Kamal, S, *Tc-99m-methoxy isobutyl isonitrile scintimammography: imaging postexcision biopsy for residual and multifocal breast tumor*, Nuclear Medicine Communications, **2008**, 29 (9), p. 826-829 810.1097/MNM.1090b1013e328302cce328306
153. Mendes, F; Paulo, A and Santos, I, *Metalloprobes for functional monitoring of tumour multidrug resistance by nuclear imaging*, Dalton Transactions, **2011**, 40 (20), p. 5377-5393
154. Fuster, D; Vinolas, N; Mallafré, C; Pavia, J; Martín, F and Pons, F, *Tetrofosmin as predictor of tumour response*, Quarterly Journal of Nuclear Medicine, **2003**, 47 (1), p. 58-62
155. Mohan, HK and Miles, KA, *Cost-Effectiveness of <sup>99m</sup>Tc-Sestamibi in Predicting Response to Chemotherapy in Patients with Lung Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis*, Journal of Nuclear Medicine, **2009**, 50 (3), p. 376-381

156. Ross, M; Kelso, G; Blaikie, F; James, A; Cochemé, H; Filipovska, A; Da Ros, T; Hurd, T; Smith, R and Murphy, M, *Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology*, Biochemistry (Moscow), **2005**, 70 (2), p. 222-230
157. Zhou, Y and Liu, S, *<sup>64</sup>Cu-Labeled Phosphonium Cations as PET Radiotracers for Tumor Imaging*, Bioconjugate Chemistry, **2011**, p. null-null
158. Min, J-J; Biswal, S; Deroose, C and Gambhir, SS, *Tetraphenylphosphonium as a Novel Molecular Probe for Imaging Tumors*, Journal of Nuclear Medicine, **2004**, 45 (4), p. 636-643
159. Madar, I; Weiss, L and Izbicki, G, *Preferential Accumulation of <sup>3</sup>H-Tetraphenylphosphonium in Non-Small Cell Lung Carcinoma in Mice: Comparison with <sup>99m</sup>Tc-MIBI*, Journal of Nuclear Medicine, **2002**, 43 (2), p. 234-238
160. Steichen, JD; Weiss, MJ; Elmaleh, DR and Martuza, RL, *Enhanced in vitro uptake and retention of 3H-tetraphenylphosphonium by nervous system tumor cells*, Journal of Neurosurgery, **1991**, 74 (1), p. 116-122
161. Krause, BJ; Szabo, Z; Becker, LC; Dannals, RF; Scheffel, U; Seki, C; Ravert, HT; Dipaola, AF, Jr. and Wagner, HN, Jr., *Myocardial perfusion with [<sup>11</sup>C]methyl triphenyl phosphonium: measurements of the extraction fraction and myocardial uptake*, J Nucl Biol Med, **1994**, 38 (3), p. 521-526
162. Madar, I; Anderson, JH; Szabo, Z; Scheffel, U; Kao, P-F; Ravert, HT and Dannals, RF, *Enhanced Uptake of [<sup>11</sup>C]TPMP in Canine Brain Tumor: A PET Study*, Journal of Nuclear Medicine, **1999**, 40 (7), p. 1180-1185
163. Madar, I; Ravert, HT; Du, Y; Hilton, J; Volokh, L; Dannals, RF; Frost, JJ and Hare, JM, *Characterization of Uptake of the New PET Imaging Compound <sup>18</sup>F-Fluorobenzyl Triphenyl Phosphonium in Dog Myocardium*, Journal of Nuclear Medicine, **2006**, 47 (8), p. 1359-1366
164. Shoup, T; Elmaleh, D; Brownell, A-L; Zhu, A; Guerrero, J and Fischman, A, *Evaluation of (4-[<sup>18</sup>F]Fluorophenyl)triphenylphosphonium Ion. A Potential Myocardial Blood Flow Agent for PET*, Molecular Imaging and Biology, **2010**, 13 (3), p. 511-517
165. Ravert, HT; Madar, I and Dannals, RF, *Radiosynthesis of 3-[<sup>18</sup>F]fluoropropyl and 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzyl triarylphosphonium ions*, Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, **2004**, 47 (8), p. 469-476
166. Madar, I; Ravert, H; Nelkin, B; Abro, M; Pomper, M; Dannals, R and Frost, J, *Characterization of membrane potential-dependent uptake of the novel PET tracer <sup>18</sup>F-fluorobenzyl triphenylphosphonium cation*, European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, **2007**, 34 (12), p. 2057-2065
167. Yang, C-T; Li, Y and Liu, S, *Synthesis and Structural Characterization of Complexes of a DO<sub>3</sub>A-Conjugated Triphenylphosphonium Cation with Diagnostically Important Metal Ions*, Inorganic Chemistry, **2007**, 46 (21), p. 8988-8997
168. Wang, J; Yang, C-T; Kim, Y-S; Sreerama, SG; Cao, Q; Li, Z-B; He, Z; Chen, X and Liu, S, *<sup>64</sup>Cu-Labeled Triphenylphosphonium and Triphenylarsonium Cations as Highly Tumor-Selective Imaging Agents*, Journal of Medicinal Chemistry, **2007**, 50 (21), p. 5057-5069
169. Kim, Y-S; Yang, C-T; Wang, J; Wang, L; Li, Z-B; Chen, X and Liu, S, *Effects of Targeting Moiety, Linker, Bifunctional Chelator, and Molecular Charge on Biological Properties of <sup>64</sup>Cu-Labeled Triphenylphosphonium Cations*, Journal of Medicinal Chemistry, **2008**, 51 (10), p. 2971-2984
170. Yang, C-T; Kim, Y-S; Wang, J; Wang, L; Shi, J; Li, Z-B; Chen, X; Fan, M; Li, J-J and Liu, S, *<sup>64</sup>Cu-Labeled 2-(Diphenylphosphoryl)ethyldiphenylphosphonium Cations as Highly Selective Tumor Imaging Agents: Effects of Linkers and Chelates on Radiotracer Biodistribution Characteristics*, Bioconjugate Chemistry, **2008**, 19 (10), p. 2008-2022
171. Li, Z; Lopez, M; Hardy, M; McAllister, DM; Kalyanaraman, B and Zhao, M, *A <sup>99m</sup>Tc-Labeled Triphenylphosphonium Derivative for the Early Detection of Breast Tumors*, Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, **2009**, 24 (5), p. 579-587

172. Brandau, W; Kirchner, B; Bartenstein, P; Sciuk, J; Kamanabrou, D and Schober, O, *N-(2-Diethylaminoethyl)-4-[I-123]iodobenzamide as a Tracer for the Detection of Malignant-Melanoma - Simple Synthesis, Improved Labeling Technique and 1st Clinical-Results*, European Journal of Nuclear Medicine, **1993**, 20 (3), p. 238-243
173. Decristoforo, C; Santos, I; Pietzsch, HJ; Kuenstler, JU; Duatti, A; Smith, CJ; Rey, A; Alberto, R; Von Guggenberg, E and Haubner, R, *Comparison of in vitro and in vivo properties of [Tc-99m]cRGD peptides labeled using different novel Tc-cores*, Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, **2007**, 51 (1), p. 33-41
174. Garcia, R; Paulo, A and Santos, I, *Rhenium and technetium complexes with anionic or neutral scorpionates: An overview of their relevance in biomedical applications*, Inorganica Chimica Acta, **2009**, 362 (12), p. 4315-4327
175. Marques, Nm; Sella, A and Takats, J, *Chemistry of the Lanthanides Using Pyrazolylborate Ligands*, Chemical Reviews, **2002**, 102 (6), p. 2137-2160
176. Pettinari, C, *Scorpionates II: Chelating Borate Ligands*, 2008, London, Imperial College Press.
177. Trofimenko, S, *Boron-Pyrazole Chemistry*, Journal of the American Chemical Society, **1966**, 88 (8), p. 1842-1844
178. Trofimenko, S, *Scorpionates: The Coordination Chemistry of Polypyrazolylborate Ligands*, 1999, London, Imperial College Press.
179. Spicer, MD and Reglinski, J, *Soft Scorpionate Ligands Based on Imidazole-2-thione Donors*, European Journal of Inorganic Chemistry, **2009**, 2009, p. 1553-1574
180. Videira, M; Maria, L; Paulo, An; Santos, IC; Santos, I; Vaz, PD and Calhorda, MJ, *Mixed-Ligand Rhenium Tricarbonyl Complexes Anchored on a ( $\kappa^2$ -H,S) Trihydro(mercaptoimidazolyl)borate: A Missing Binding Motif for Soft Scorpionates*, Organometallics, **2008**, 27 (6), p. 1334-1337
181. Graham, LA; Fout, AR; Kuehne, KR; White, JL; Mookherji, B; Marks, FM; Yap, GPA; Zakharov, LN; Rheingold, AL and Rabinovich, D, *Manganese(I) poly(mercaptoimidazolyl)borate complexes: spectroscopic and structural characterization of MnH-B interactions in solution and in the solid state*, Dalton Transactions, **2005**, (1), p. 171-180
182. Troutner, DE; Volkert, WA; Hoffman, TJ and Holmes, RA, *A neutral lipophilic complex of  $^{99m}\text{Tc}$  with a multidentate amine oxime*, The International Journal of Applied Radiation and Isotopes, **1984**, 35 (6), p. 467-470
183. Razzak, MA; Naguib, M and El-Garhy, M, *Fate of Sodium Pertechnetate-Technetium- $^{99m}\text{Tc}$* , Journal of Nuclear Medicine, **1967**, 8 (1), p. 50-59
184. Oliveira, BL; Correia, JDG; Raposinho, PD; Santos, I; Ferreira, A; Cordeiro, C and Freire, AP, *Re and  $^{99m}\text{Tc}$  organometallic complexes containing pendant l-arginine derivatives as potential probes of inducible nitric oxide synthase*, Dalton Transactions, **2009**, (1), p. 152-162
185. Nugent, WA and Mayer, JM, *Metal-Ligand Multiple Bonds*, 1988, New York, J. Wiley & Sons.
186. Alberto, R; Schibli, R; Waibel, R; Abram, U and Schubiger, AP, *Basic aqueous chemistry of  $[M(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  ( $M=\text{Re}, \text{Tc}$ ) directed towards radiopharmaceutical application*, Coordination Chemistry Reviews, **1999**, 190-192, p. 901-919
187. Salignac, B; Grundler, PV; Cayemittes, S; Frey, U; Scopelliti, R; Merbach, A; Hedinger, R; Hegetschweiler, K; Alberto, R; Prinz, U; Raabe, G; Kolle, U and Hall, S, *Reactivity of the Organometallic  $\text{fac}-[(\text{CO})_3\text{Re}^I(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  Aquaion. Kinetic and Thermodynamic Properties of  $\text{H}_2\text{O}$  Substitution*, Inorganic Chemistry, **2003**, 42 (11), p. 3516-3526
188. He, H; Lipowska, M; Xu, X; Taylor, AT; Carlone, M and Marzilli, LG, *Re(CO) $_3$  Complexes Synthesized via an Improved Preparation of Aqueous  $\text{fac}-[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  as an Aid in Assessing  $^{99m}\text{Tc}$  Imaging Agents. Structural Characterization and Solution Behavior of Complexes with Thioether-Bearing Amino Acids as Tridentate Ligands*, Inorganic Chemistry, **2005**, 44 (15), p. 5437-5446

189. Schaefer, T; Kunkel, JP; Schurko, RW and Bernard, GM, *A Precise Analysis of the H-1 Nuclear-Magnetic-Resonance Spectrum of 2-Phenyl-1,3-Dithiane - Ring Pucker, Signs of Long-Range J(H,H), Internal Rotational Barrier, And Van-Der-Waals Shifts*, Canadian Journal of Chemistry-*Revue Canadienne De Chimie*, **1994**, 72 (7), p. 1722-1727
190. Ōae, S and Doi, JT, *Organic sulfur chemistry: structure and mechanism*, 1991, CRC Press.
191. Alberto, R; Schibli, R; Egli, A; Schubiger, AP; Abram, U and Kaden, TA, *A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of  $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  from  $[^{99m}\text{TcO}_4^-]$  in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand*, Journal of the American Chemical Society, **1998**, 120 (31), p. 7987-7988
192. Horvath, C; Melander, W and Molnar, I, *Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases*, Analytical Chemistry, **1977**, 49 (1), p. 142-154
193. Johannsen, B; Scheunemann, M; Spies, H; Brust, P; Wober, J; Syhre, R and Pietzsch, HJ, *Technetium(v) and rhenium(v) complexes for 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor binding: Structure-affinity considerations*, Nuclear Medicine and Biology, **1996**, 23 (4), p. 429-438
194. Stylli, C and Theobald, AE, *Determination of ionisation constants of radiopharmaceuticals in mixed solvents by HPLC*, Int J Rad Appl Instrum A, **1987**, 38 (9), p. 701-708
195. Van de Waterbeemd, H and Testa, B, *The parametrization of lipophilicity and other structural properties in drug design*, in *Advanced in Drug Research*, 1987, Academic Press Limited, 85
196. Angelov, T; Vlasenko, A and Tashkov, W, *HPLC determination of pKa of parabens and investigation on their lipophilicity parameters*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **2008**, 31 (2), p. 188-197
197. Clarke, K and Rothwell, K, *377. A kinetic study of the effect of substituents on the rate of formation of alkylpyridinium halides in nitromethane solution*, Journal of the Chemical Society (Resumed), **1960**, p. 1885-1895
198. Lee Collier, T; Waterhouse, RN and Kassiou, M, *Imaging Sigma Receptors: Applications in Drug Development*, Current Pharmaceutical Design, **2007**, 13, p. 51-72
199. Vilner, BJ; John, CS and Bowen, WD, *Sigma-1 and Sigma-2 Receptors Are Expressed in a Wide Variety of Human and Rodent Tumor Cell Lines*, Cancer Res, **1995**, 55 (2), p. 408-413
200. Wang, B; Rouzier, R; Albarracin, CT; Sahin, A; Wagner, P; Yang, Y; Smith, TL; Bernstam, FM; Marcelo, AC; Hortobagyi, GN and Pusztai, L, *Expression of sigma 1 receptor in human breast cancer*, Breast Cancer Research and Treatment, **2004**, 87 (3), p. 205-214
201. Megalizzi, V; Mathieu, V; Mijatovic, T; Gailly, P; Debeir, O; De Neve, N; Van Damme, M; Bontempi, G; Haibe-Kains, B; Decaestecker, C; Kondo, Y; Kiss, R and Lefranc, F, *4-IBP, a sigma(1) receptor agonist, decreases the migration of human cancer cells, including glioblastoma cells, in vitro and sensitizes them in vitro and in vivo to cytotoxic insults of proapoptotic and proautophagic drugs*, Neoplasia, **2007**, 9 (5), p. 358-369
202. Mannella, CA, *The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, **2006**, 1762 (2), p. 140-147
203. Ross, MF; Daros, T; Blaikie, FH; Prime, TA; Porteous, CM; Severina, II; Skulachev, VP; Kjaergaard, HG; Smith, RAJ and Murphy, MP, *Accumulation of lipophilic dicationic probes by mitochondria and cells*, Biochem J, **2006**, 400 (1), p. 199-208
204. Gano, L; Mendes, F; Cunha, S; Fernandes, C; Paulo, A and Santos, I, *Biological Evaluation of novel  $^{99m}\text{Tc}(I)$  cationic complexes as probes for tumoral detection*, Q J Nucl Med Mol Imaging **2010**, 54 (2S1), p. 10-11

205. Cunha, S; Gano, L; Paulo, A and Santos, I, *Avaliação Biológica de Complexos Catiônicos De  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  para Detecção Tumoral*, in *XII Congresso Nacional de Medicina Nuclear*. 2009: Mealhada
206. Cunha, S; Gano, L; Fernandes, C; Paulo, A and Santos, I,  *$^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  cationic complexes for tumoral detection*, *Nuclear Medicine and Biology*, **2010**, 37 (6), p. 709-710
207. Hassan, IM; Sahweil, A; Constantinides, C; Mahmoud, A; Nair, M; Omar, YT and Abdel-Dayem, HM, *Uptake and Kinetics of Tc-99m Hexakis 2-Methoxy Isobutyl Isonitrile in Benign and Malignant Lesions in the Lungs*, *Clinical Nuclear Medicine*, **1989**, 14 (5), p. 333-340
208. Kostakoglu, L; Ruacan, S; Ergun, EL; Sayek, I; Elahi, N and Bekdik, CF, *Influence of the Heterogeneity of P-Glycoprotein Expression on Technetium-99m-MIBI Uptake in Breast Cancer*, *Journal of Nuclear Medicine*, **1998**, 39 (6), p. 1021-1026
209. Caner, B; KitapÄŖi, M; Aras, Tl; ErbenĖi, Gn; UÄŖur, Äm and Bekdik, C, *Increased Accumulation of Hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile)Technetium(I) in Osteosarcoma and Its Metastatic Lymph Nodes*, *Journal of Nuclear Medicine*, **1991**, 32 (10), p. 1977-1978
210. Schillaci, O; Spanu, A and Madeddu, G, *[Tc-99m]sestamibi and [Tc-99m]tetrofosmin in oncology: SPET and fusion imaging in lung cancer, malignant lymphomas and brain tumors*, *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2005**, 49 (2), p. 133-144
211. Luker, GD; Flagg, TP; Sha, Q; Luker, KE; Pica, CM; Nichols, CG and Piwnica-Worms, D, *MDR1 P-glycoprotein Reduces Influx of Substrates without Affecting Membrane Potential*, *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, 276 (52), p. 49053-49060
212. Pancrazio, JJ; Tabbara, IA and Kim, Yl, *Voltage-Activated  $\text{K}^+$  Conductance and Cell-Proliferation in Small-Cell Lung-Cancer*, *Anticancer Research*, **1993**, 13 (4), p. 1231-1234
213. Wonderlin, WF; Woodfork, KA and Strobl, JS, *Changes in Membrane-Potential During the Progression of MCF-7 Human Mammary-Tumor Cells Through The Cell-Cycle*, *Journal of Cellular Physiology*, **1995**, 165 (1), p. 177-185
214. Freedman, JC and Laris, PC, *Electrophysiology of cells and organelles: studies with optical potentiometric indicators*, *Int Rev Cytol Suppl*, **1981**, 12, p. 177-246
215. Bussolati, O; Laris, PC; Longo, N; Dall'Asta, V; Franchi-Gazzola, R; Guidotti, GG and Gazzola, GC, *Effect of extracellular potassium on amino acid transport and membrane potential in fetal human fibroblasts*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1986**, 854 (2), p. 240-250
216. Chiu, ML; Kronauge, JF and Piwnica-Worms, D, *Effect of Mitochondrial and Plasma Membrane Potentials on Accumulation of Hexakis (2-Methoxyisobutylisonitrile)Technetium(I) in Cultured Mouse Fibroblasts*, *Journal of Nuclear Medicine*, **1990**, 31 (10), p. 1646-1653
217. Piwnica-Worms, D; Kronauge, J and Chiu, M, *Uptake and retention of hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium(I) in cultured chick myocardial cells. Mitochondrial and plasma membrane potential dependence*, *Circulation*, **1990**, 82 (5), p. 1826-1838
218. Johnson, LV; Walsh, ML; Bockus, BJ and Chen, LB, *Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy*, *The Journal of Cell Biology*, **1981**, 88 (3), p. 526-535
219. Safiulina, D; Veksler, V; Zharkovsky, A and Kaasik, A, *Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: Physiological role in neurones*, *Journal of Cellular Physiology*, **2006**, 206 (2), p. 347-353
220. Reed, PW, *Ionophores*, *Methods Enzymol*, **1979**, 55, p. 435-454
221. Kim, D and Smith, TW, *Effects of amiloride and ouabain on contractile state, Ca and Na fluxes, and Na content in cultured chick heart cells*, *Mol Pharmacol*, **1986**, 29 (4), p. 363-371

222. Hanstein, WG, *Uncoupling of oxidative phosphorylation*, Biochim Biophys Acta, **1976**, 456 (2), p. 129-148
223. Maria, L; Cunha, S; Videira, M; Gano, L; Paulo, A; Santos, IC and Santos, I, *Rhenium and technetium tricarbonyl complexes anchored by pyrazole-based tripods: novel lead structures for the design of myocardial imaging agents*, Dalton Transactions, **2007**, (28), p. 3010-3019
224. Maria, L; Fernandes, C; Garcia, R; Gano, L; Paulo, A; Santos, IC and Santos, I, *Tris(pyrazolyl)methane (99m)Tc tricarbonyl complexes for myocardial imaging*, Dalton Transactions, **2009**, (4), p. 603-606
225. Armarego, WLF and Perrin, DD, *Purification of Laboratory Chemicals (4th Edition)*, 1997, Elsevier.
226. Inc., BA, *Saint: Area-Detector Integration Software (Version7.23)*. 2004: Madison, WI
227. Inc., BA, *Sadabs: Area-Detector Absorption Correction*. 2004: Madison, WI
228. Altomare, A; Burla, MC; Camalli, M; Cascarano, GL; Giacovazzo, C; Guagliardi, A; Moliterni, AGG; Polidori, G and Spagna, R, *SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement*, Journal of Applied Crystallography, **1999**, 32 (1), p. 115-119
229. Sheldrick, GM, *Shelxl-97: Program for the Refinement of Crystal Structure*. 1997: University of Gottingen, Germany
230. Farrugia, L, *WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography*, Journal of Applied Crystallography, **1999**, 32 (4), p. 837-838
231. Farrugia, L, *ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI)*, Journal of Applied Crystallography, **1997**, 30 (5 Part 1), p. 565
232. López, P; Seipelt, CG; Merklings, P; Sturz, L; Álvarez, J; Dölle, A; Zeidler, MD; Cerdán, S and Ballesteros, P, *N-2-(Azol-1(2)-yl)ethyliminodiacetic acids: a novel series of Gd(III) chelators as T<sub>2</sub> relaxation agents for magnetic resonance imaging*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, **1999**, 7 (3), p. 517-527
233. Krapcho, AP and Kuell, CS, *Mono-Protected Diamines. N-tert-Butoxycarbonyl  $\alpha,\omega$ -Alkanediamines from  $\alpha,\omega$ -Alkanediamines*, Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry, **1990**, 20 (16), p. 2559 - 2564
234. Baba, A; Kawamura, N; Makino, H; Ohta, Y; Taketomi, S and Sohda, T, *Studies on Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: Synthesis of Novel Quinoline and Quinazoline Derivatives and Their Anti-inflammatory Effect1*, Journal of Medicinal Chemistry, **1996**, 39 (26), p. 5176-5182
235. Shrout, DP and Lightner, DA, *An Improved Procedure for Mono C-Alkylation of Pentane-2.4-Dione with  $\omega$ -Bromoacid Esters*, Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry, **1990**, 20 (13), p. 2075 - 2080
236. Moradell, S; Lorenzo, J; Rovira, A; van Zutphen, S; Avilés, FX; Moreno, V; de Llorens, R; Martinez, MA; Reedijk, J and Llobet, A, *Water-soluble platinum(II) complexes of diamine chelating ligands bearing amino-acid type substituents: the effect of the linked amino acid and the diamine chelate ring size on antitumor activity, and interactions with 5'-GMP and DNA*, Journal of Inorganic Biochemistry, **2004**, 98 (11), p. 1933-1946
237. Quitt, P; Hellerbach, J and Vogler, K, *Die Synthese optisch aktiver N-Monomethyl-Aminosäuren*, Helvetica Chimica Acta, **1963**, 46 (1), p. 327-333
238. Lazarova, N; James, S; Babich, J and Zubieta, J, *A convenient synthesis, chemical characterization and reactivity of [Re(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]Br: the crystal and molecular structure of [Re(CO)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>Br]*, Inorganic Chemistry Communications, **2004**, 7 (9), p. 1023-1026
239. Williams, JA, *Origin of transmembrane potentials in non-excitabile cells*, Journal of Theoretical Biology, **1970**, 28 (2), p. 287-296

240. Horres, CR; Aiton, JF and Lieberman, M, *Potassium permeability of embryonic avian heart cells in tissue culture*, American Journal of Physiology - Cell Physiology, **1979**, 236 (3), p. C163-C170