

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Novos Complexos Organometálicos de $\text{Re(I)}/^{99\text{m}}\text{Tc(I)}$
Contendo derivados da L-Arginina: Síntese,
Caracterização e Avaliação da Actividade Enzimática

Flávio Alberto da Silva Figueira

Mestrado em Química Inorgânica Biomédica
Aplicações em Diagnóstico e Terapia

2008

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Novos Complexos Organometálicos de $\text{Re(I)}/^{99\text{m}}\text{Tc(I)}$
Contendo derivados da L-Arginina: Síntese,
Caracterização e Avaliação da Actividade Enzimática

Flávio Alberto da Silva Figueira

Dissertação orientada pelo Doutor João Domingos Galamba
Correia

Mestrado em Química Inorgânica Biomédica
Aplicações em Diagnóstico e Terapia

2008

Esta tese foi realizada no âmbito do Mestrado em Química Inorgânica Biomédica – Aplicações em Diagnóstico e Terapia, organizado pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa em parceria com o Instituto Tecnológico e Nuclear.

Este Mestrado foi aprovado pela deliberação nº 723/2004 publicada no Diário da República, II série, nº123 de Maio de 2004.

O trabalho experimental foi realizado no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas da Unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas do Instituto Tecnológico e Nuclear, sob orientação do Doutor João Galamba Correia. Os estudos de actividade enzimática foram efectuados na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa sob a orientação do Dr. Carlos Cordeiro. O Trabalho foi financiado pela Fundação Para a Ciência e Tecnologia através do projecto POCI/SAU-FCF/58855/2004.

Agradecimentos

Ao Doutor João Galamba Correia agradeço a forma rigorosa como orientou esta tese de mestrado, os conhecimentos transmitidos, o entusiasmo e a total disponibilidade demonstrada.

Agradeço à Doutora Isabel Santos o dinamismo contagiante e pela forma como me acolheu no seu grupo de investigação.

À Doutora Lurdes Gano e à Mestre Célia Fernandes agradeço todo o apoio prestado na liofilização dos compostos e no uso do HPLC.

Ao Doutor Joaquim Marçalo agradeço a realização dos espectros de massa ESI-MS.

Aos meus colegas do Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas agradeço o bom ambiente de trabalho proporcionado, a ajuda e as novas amizades.

Por último, pelo exemplo de vida, bem como pelo apoio incondicional, agradeço aos meus pais pelo incentivo e toda a disponibilidade.

Resumo

Na sequência de estudos anteriormente realizados, o trabalho apresentado nesta tese pretendeu contribuir para a avaliação dos factores estruturais que poderiam afectar a afinidade de complexos do tipo *fac*-[M(CO)₃(k³-L)] (M = Re, ^{99m}Tc, L = conjugado contendo a unidade quelante pirazolo-diamina e análogos da L-arginina) para o óxido nítrico sintase induzido (iNOS), cuja sobre-expressão está associada a certas neoplasias. Para se atingir esse objectivo, introduziram-se algumas modificações estruturais que envolveram, por um lado, a conjugação do complexo à unidade bioactiva através de uma ligação amida entre o grupo amina livre do agente quelante e o α-COOH do aminoácido e, por outro, a introdução de cadeias espaçadoras de comprimento variável. Assim, sintetizaram-se dois novos compostos contendo a unidade quelante pirazolo-diamina e um braço propilo (**L1**) ou hexilo (**L2**) com um grupo amina terminal livre. Por conjugação de **L1** e **L2** ao substrato natural (L-arginina) e a um inibidor competitivo do NOS (N^o-nitro-L-arginina) obtiveram-se os novos conjugados bioactivos **C1** (*L1-L-arginina*), **C2** (*L2-L-arginina*), **C3** (*L1-N^o-nitro-L-arginina*) e **C4** (*L2-N^o-nitro-L-arginina*). Por reacção destes compostos com os precursores adequados, isolaram-se e caracterizaram-se os complexos organometálicos do tipo *fac*-[M(CO)₃(k³-L)] (L = **L1**, **Re1/Tc1**; L = **L2**, **Re2/Tc2**; L = **C1**, **Re3/Tc3**; L = **C2**, **Re4/Tc4**; L = **C3**, **Re5/Tc5**, L = **C4**, **Re6/Tc6**). A avaliação da actividade enzimática do iNOS na presença dos conjugados (**C1**, K_m = 55 μM; **C2**, K_m > 1200 μM; **C3**, K_i = 35 μM; **C4**, K_i = 137 μM) e dos complexos de rénio (**Re3**, K_m = 1093 μM; **Re4**, K_m > 2500 μM **Re5**, K_i = 103 μM; **Re6**, K_i = 118 μM) permitiu concluir que a conjugação da L-arginina (K_m = 6 μM) e da N^o-nitro-L-arginina (K_i = 3 μM) a **L1/L2** e a posterior coordenação dos conjugados resultantes (**C1** - **C4**) ao fragmento *fac*-[M(CO)₃]⁺ (**Re3** – **Re6**) conduziu a uma considerável perda de afinidade para o enzima. No entanto, a afinidade dos conjugados contendo inibidores (**C3** e **C4**) é menos afectada pela coordenação ao metal do que a dos conjugados contendo substratos (**C1** e **C2**). No caso do conjugado **C4** observou-se mesmo um ligeiro aumento da capacidade inibitória após metalação (**Re6**). A presença do braço hexilo em **C2**, **C4**, **Re4** e **Re6** conduziu a uma diminuição da afinidade destes compostos para o iNOS.

Abstract

Following previous studies, the work presented in this thesis aimed to contribute for the assessment of structural features that could affect the affinity of complexes of the type $fac-[M(CO)_3(k^3-L)]$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$, $L =$ conjugate containing a pyrazolyl-diamine chelating unit and L-arginine derivatives) for the induced nitric oxide synthase isoform (iNOS), whose overexpression is associated to certain neoplasies. To accomplish such goal, we have introduced structural changes that involved, on the one hand, the conjugation of the complex to the bioactive unit through an amide bond between the free amine group of the chelating agent and the α -COOH of the amino acid and, on the other hand, the introduction of spacers with variable lengths. Therefore, we synthesized two new compounds containing a pyrazolyl-diamine chelating unit and a propyl (**L1**) or hexyl (**L2**) arm with a free terminal amine group. By conjugation of **L1** and **L2** to the native substrate (L-arginine) and to a competitive inhibitor of NOS (N^ω -nitro-L-arginine), we obtained the new bioactive conjugates **C1** (*L1-L-arginine*), **C2** (*L2-L-arginine*), **C3** (*L1- N^ω -nitro-L-arginine*) e **C4** (*L2- N^ω -nitro-L-arginine*). By reacting these compounds with the adequate precursors, we isolated and characterized the organometallic complexes of the type $fac-[M(CO)_3(k^3-L)]$ ($L =$ **L1**, **Re1/Tc1**; $L =$ **L2**, **Re2/Tc2**; $L =$ **C1**, **Re3/Tc3**; $L =$ **C2**, **Re4/Tc4**; $L =$ **C3**, **Re5/Tc5**, $L =$ **C4**, **Re6/Tc6**). Evaluation of the enzymatic activity of iNOS in the presence of the conjugates (**C1**, $K_m = 55 \mu M$; **C2**, $K_m > 1200 \mu M$; **C3**, $K_i = 35 \mu M$; **C4**, $K_i = 137 \mu M$) and the rhenium complexes (**Re3**, $K_m = 1093 \mu M$; **Re4**, $K_m > 2500 \mu M$ **Re5**, $K_i = 103 \mu M$; **Re6**, $K_i = 118 \mu M$) allowed to conclude that the conjugation of L-arginine ($K_m = 6 \mu M$) and N^ω -nitro-L-arginine ($K_i = 3 \mu M$) to **L1/L2**, and the coordination of the resulting conjugates (**C1 - C4**) to the fragment $fac-[M(CO)_3]^+$ (**Re3 – Re6**) led to a considerable lost of affinity for the enzyme. However, the affinity of the inhibitor-containing conjugates (**C3** e **C4**) is less affected upon coordination to the metal than the affinity of the substrate-containing conjugates (**C1** e **C2**). In the case of conjugate **C4**, a slight increase in inhibitory capacity was observed after metallation (**Re6**). The presence of hexyl arms in **C2**, **C4**, **Re4** and **Re6** led to an affinity decrease for iNOS.

Palavras Chave

L-Arginina

Enzimas

Óxido nítrico sintase

Radiofármacos

Rénio (I)

Tecnécio-99m

Key words

L-Arginine

Enzymes

Nitric oxide synthase

Radiopharmaceuticals

Rhenium (I)

Technetium-99m

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Resumo	Error! Bookmark not defined.
Abstract	viii
Palavras Chave	ix
Key words	ix
Bifunctional chelators	Error! Bookmark not defined.
Índice Geral	xi
Lista de símbolos e abreviaturas	xvii
Preâmbulo	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Considerações gerais.	5
1.2. Radiofármacos de Tecnécio.	10
1.2.1. Considerações gerais sobre o Tecnécio.	10
1.2.2. Radiofármacos de primeira geração.	14
1.2.3. Radiofármacos de 2ª geração.	16
1.2.3.1. Novos complexos específicos de ^{99m} Tc.	17
1.3 Óxido nítrico sintase	22
1.3.1 Considerações gerais.....	22
1.3.2. Substratos e inibidores da NOS.	25
1.3.3. Compostos radioactivos para alveijamento in vivo do NOS	26
1.4. Objectivo do trabalho.	29
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	1
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
2.1 considerações gerais.	31
2.2 Síntese e caracterização dos ligandos bifuncionais L1 e L2.	32
2.3 Síntese e caracterização dos conjugados C1 - C4.	37
2.3.1. Síntese e caracterização dos aminoácidos protegidos BOC-N ^w -nitro-L-arginina e BOC-L-arginina.	37
2.3.2. Síntese e caracterização dos conjugados C1 e C2.	39
2.3.3. Síntese e caracterização dos conjugados C3 e C4.	48
2.4. Síntese e caracterização dos complexos fac-[Re(CO) ₃ (k ³ -L)] ⁺ (L = L1, L2, C1-	52
C4)	52
2.4.1. Complexos fac-[Re(CO) ₃ (k ³ -L1)] ⁺ (Re1) e fac-[Re(CO) ₃ (k ³ -L2)] ⁺ (Re2)	52

2.4.2. Complexos $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L})]^+$ (L = C1, Re3; C2, Re4; C3, Re5, C4, Re6).....	56
2.5. Síntese e caracterização dos complexos $\text{fac-}[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L})]^+$ (L = L1, L2, C1-C4).....	62
2.5.1 Estabilidade in vitro dos complexos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$	67
2.5.2 Avaliação da lipofilia dos complexos Tc3 – Tc6.	69
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	78
EXPERIMENTAL.....	73
3. PARTE EXPERIMENTAL	82
3.1. Condições gerais.	82
3.1.1. Solventes e Reagentes.	82
3.1.2. Técnicas de caracterização.....	82
3.1.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).	82
3.1.2.2. Espectrometria de massa (ESI-MS).	82
3.1.2.3. Espectroscopia de IV.....	83
3.1.3. Técnicas de purificação.	83
3.1.3.1. Cromatografia em camada fina.	83
3.1.3.2. Cromatografia em coluna.	83
3.1.3.3. Cromatografia de alta eficiência (HPLC).	83
3.2. Síntese dos ligandos bifuncionais L1 e L2.	86
3.2.1. Materiais de partida.....	86
3.2.2. Síntese dos ligandos bifuncionais L1 e L2 e dos complexos Re1 e Re2.	86
3.2.2.1. Síntese de 3-bromo-propilftalimida.....	86
3.2.2.2. Síntese de 3-bromo-hexilftalimida.	87
3.2.2.3. Síntese de tert-butil 2-((2-(3,5-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etil)(3-(1,3-dioxoisindolino-2-il)propil)amino)etilcarbamato.	87
3.2.2.4. Síntese de tert-butil 2-((2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)(6-(1,3-dioxoisindolino-2-il)hexil)amino)etilcarbamato.	88
3.2.2.5. Síntese de tert-butil 2-((3-aminopropil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)etilcarbamato (L1BOC).	89
3.2.2.6. Síntese de tert-butil 2-((6-aminohexil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)etilcarbamato (L2BOC)	90
3.2.2.7. Síntese de (2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)propano-1,3-diamina (L1)... ..	91
3.2.2.8. Síntese de (2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)hexano-1,6-diamina (L2).....	92
3.3. Síntese dos aminoácidos protegidos BOC-L-arginina e BOC-N ^ω -nitro-L-arginina e dos conjugados C1 - C4.....	93
3.3.1. Síntese dos dos aminoácidos BOC-L-arginina e BOC-N ^ω -nitro-L-arginina.	93
3.3.1.1. Síntese do ácido (L)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-5-guanidinopentanoico (BOC-L-arginina).....	93
3.3.1.2. Síntese do ácido (L)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-5-(3-nitroguanidino)pentanoico (BOC-N ^ω -nitro-L-arginina).	94
3.3.2. Síntese dos Conjugados C1 e C2.	95
3.3.2.1. Síntese do (L)-2-amino-N-(3-((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)propil)-5-guanidinopentanamida (C1).	95
3.3.2.2. Síntese do (L)-2-amino-N-(6-((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)hexil)-5-guanidinopentanamida (C2).	96

3.3.2.3. Síntese do (L)-2-amino-N-(3-((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)propil)-5-(3-nitroguanidino)pentanamida (C3).....	98
3.3.2.4. Síntese do (L)-2-amino-N-(6-((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)hexil)-5-(3-nitroguanidino)pentanamida (C4).....	99
3.4. Síntese dos complexos Re1 a Re6.	100
3.4.1. Síntese de <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (k ³ -L1)] ⁺ (Re1).....	100
3.4.2. Síntese de <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (k ³ -L2)] ⁺ (Re2).....	101
3.4.3. Síntese de <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (k ³ -C1)] ⁺ (Re3).	102
3.4.4. Síntese de <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (k ³ -C2)] ⁺ (Re4).	103
3.4.5. Síntese de <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (k ³ -C3)] ⁺ (Re5).	105
3.4.6. Síntese de <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (k ³ -C4)] ⁺ (Re6).	106
3.5. Síntese dos complexos de ^{99m} Tc 107	107
3.5.1. Preparação do precursor <i>fac</i> -[^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺	107
3.5.2 Preparação dos complexos Tc1 – Tc6.....	108
3.5.2 Determinação da lipofilia dos complexos.....	108
3.5.3. Estudos de estabilidade <i>in vitro</i>	109
3.5.3.1. Estabilidade em PBS.....	109
3.5.3.2. Estabilidade na presença de histidina.	109
3.6. Ensaios enzimáticos.....	110
3.6.1 - Considerações gerais.....	110
3.6.2 - Ensaios cinéticos realizados seguindo a formação do NO na presença de oxihemoglobina	110
3.6.2.1 – Preparação da oxihemoglobina.....	110
3.6.2.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos substratos L-arginina: validação do método de captura do NO pela oxihemoglobina.....	111
3.6.2.3 – Determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos substratos C1, C2, Re3 e Re4	111
3.6.2.4. Determinação das constantes de inibição para os compostos C3, C4, Re5 e Re6.	112

Índice de Figuras

Figura 1.1.1: Fotografia de uma câmara PET.....	8
Figura 1.2.1.1: Fotografia e representação esquemática dos componentes de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (eluente: solução estéril e apirogênea de NaCl 0,9%).....	11
Figura 1.2.1.2: Formação e decaimento radioactivo do $^{99\text{m}}\text{Tc}$	12
Figura 1.2.2.1: Exemplos de radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de 1ª geração em utilização clínica.....	15
Figura 1.2.3.1: Exemplo de radiofármaco específico em fase de ensaios clínicos – $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TRODAT.....	16
Figura 1.2.3.1.1: Fragmentos metálicos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ utilizados no desenvolvimento de radiofármacos específicos (BM = biomolécula).....	17
Figura 1.2.3.1.2: Exemplos de ligandos tetradentados do tipo diaminoditiol (DADT) e monoaminamonoamida (MAMA) utilizados para a estabilização da unidade $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}]^{3+}/\text{Tc(V)}$	18
Figura 1.2.3.1.3: Radiopéptido $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Apcitide (AcuTec®).....	19
Figura 1.2.3.1.4: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N-DBODC- Complexo bioespecífico contendo a unidade $[\text{TcN}]^{2+}/(\text{V})$ para visualização do miocárdio.....	19
Figura 1.2.3.1.5: Condições de preparação do precursor organometálico <i>fac</i> - $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ a partir de $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$	20
Figura 1.2.3.1.6: Exemplos de complexos organometálicos contendo a unidade <i>fac</i> - $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ (M = Re, $^{99\text{m}}\text{Tc}$) estabilizados por ligandos monodentados, bidentados e tridentados; R = Biomolécula.....	21
Figura 1.3.1.1: Biosíntese do NO por oxidação da L-arginina a L-citrulina, catalisada pelo óxido nítrico sintase (NO).....	22
Figura 1.3.3.1 - Complexo organometálico ReA inibidor do iNOS.....	28
Figura 2.1.1 - Complexos ReA e ReB inibidores do iNOS.....	31
Figura 2.2.1: Síntese dos ligandos L1 e L2 ; i: I/II , ftalimida de potássio, K_2CO_3 , ACN, refluxo, 6h; ii: III/IV , <i>tert</i> -butil (2- $\{[2-(3,5\text{-dimetil-1H-pirazol-1-il})\text{etil}]\text{-amino}\}$ etil)carbamato, K_2CO_3 , dioxano, refluxo, 12h; iii: V/VI , $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, MeOH, refluxo, 6h; iv: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (1:1), t.a., 3h.....	32
Figura 2.2.2: Espectro de ^1H -RMN do ligando L1 (D_2O).....	34
Figura 2.2.3: Espectro de ^1H -RMN do ligando L2 (D_2O).....	35
Figura 2.2.4: Espectro de ^{13}C -RMN dos compostos L1	36
Figura 2.2.5: Espectro de massa no modo positivo do composto L2 obtido através de ionização por electrospray.....	36

Figura 2.3.1.1: Síntese dos aminoácidos BOC-L-arginina e BOC-N^ω-nitro-L-arginina ; i: L-arginina/N ^ω -nitro-L-arginina, (BOC ₂)O, dioxano/(NaOH 1M), t.a., 5h.....	37
Figura 2.3.1.1: Espectros de ¹ H-RMN aminoácidos BOC-L-arginina e BOC-N^ω-nitro-L-arginina (D ₂ O).....	38
Figura 2.3.2.1: Conjugado C1	39
Figura 2.3.2.2: Síntese do composto C1 e C2 ; i: a) BOC-L-arginina-N ^ω -(PBF), DCC e HOBT em DMF, L1BOC/L2BOC em CH ₂ Cl ₂ , t.a., 18h; b) TFA/CH ₂ Cl ₂ (1:1), t.a., 3h; ii: a) BOC-L-arginina-N ^ω -(PBF), EDC e HOBT em DMF, L1BOC/L2BOC em CH ₂ Cl ₂ , t.a., 18h; b) TFA, CH ₂ Cl ₂ (1:1), t.a., 3h.....	41
Figura 2.3.2.3: Cromatogramas analíticos dos conjugados C1 e C2 (Método 1, Condições A).....	42
Figura 2.3.2.4: Espectros de ¹ H-RMN dos conjugados C1 e C2 , respectivamente (D ₂ O).....	43
Figura 2.3.2.5: Espectro de ¹³ C-RMN do conjugado C1 (D ₂ O).....	44
Figura 2.3.2.6: Espectro de ¹³ C-RMN do conjugado C2 (D ₂ O).....	45
Figura 2.3.2.7: Ampliação do espectro de ¹ H- ¹³ C HSQC do conjugado C2 e respectiva atribuições dos sinais (D ₂ O).....	46
Figura 2.3.2.8: Espectro de massa no modo positivo do composto C2 obtido por ionização por electrospray.....	47
Figura 2.3.3.1: Síntese dos compostos C3 e C4 . i: a) BOC-N ^ω -nitro-L-arginina, DCC e HOBT em DMF, L1BOC/L2BOC em CH ₂ Cl ₂ , t.a., 18h; b) TFA, CH ₂ Cl ₂ (1:1), t.a., 3h.....	48
Figura 2.3.3.2: Cromatogramas analíticos dos conjugados C3 e C4 . (Método 2, Condições A , λ = 220nm).....	49
Figura 2.3.3.3: Ampliação do espectro de ¹ H- ¹ H COSY do conjugado C3 com a respectiva atribuição dos sinais (D ₂ O).....	50
Figura 2.3.3.4: Espectro de ¹ H- ¹³ C HSQC do conjugado C3 com a respectiva atribuição dos sinais (D ₂ O).....	51
Figura 2.3.3.5: Zona ampliada do espectro de ¹ H- ¹³ C HSQC do conjugado C3 com a respectiva atribuição dos sinais (D ₂ O).....	51
Figura 2.4.1.1: Síntese dos complexos Re1 e Re2 , por reacção directa dos ligandos L1 e L2 com o precursor (Net ₄) ₂ [ReBr ₃ (CO) ₃] ; i: H ₂ O, refluxo, 18 h.....	52
Figura 2.4.1.2: Espectro de ¹ H-RMN do complexo modelo Re1 (D ₂ O).....	53
Figura 2.4.1.3: Espectro de ¹³ C-RMN do complexo modelo Re1 (D ₂ O).....	54
Figuras 2.4.1.4: Espectro de ¹ H-RMN do complexo modelo Re2 (D ₂ O).....	55
Figuras 2.4.1.5: Espectro de ¹³ C-RMN do complexo modelo Re2 (D ₂ O).....	56
Figura 2.4.2.1: Síntese dos complexos Re3 - Re6 ; i: H ₂ O, refluxo, 18 h.....	57
Figura 2.4.2.2: Espectros de ¹ H-RMN dos complexos Re3 e Re5 (D ₂ O).....	58

Figura 2.4.2.3: Espectro de ^1H - ^1H COSY do biocomplexo Re4 com as correlações mais importantes assinaladas (D_2O).....	59
Figura 2.4.2.4: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do biocomplexo Re4 com as correlações mais importantes assinaladas (D_2O).....	59
Figura 2.5.1: Síntese dos complexos organometálicos Tc1 – Tc6	62
Figura 2.5.2: Cromatograma de controlo analítico do precursor $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (Método 2, Condições A , detecção γ).....	63
Figura 2.5.3: Cromatogramas analíticos dos complexos Tc1 e Tc2 (Método 1, Condições A ; detecção γ).....	64
Figura 2.5.4: Cromatogramas analíticos dos complexos Tc3 a Tc6 (Método 2, Condições A ; detecção γ).....	65
Figura 2.5.5: Cromatogramas analíticos de RP-HPLC dos complexos Re5 (detecção UV 254 nm) e Tc5 (detecção γ). (Método 2, Condições A).....	66
Figura 2.5.1.1: Estrutura química da histidina.....	67
Figura 2.5.1.2: Cromatogramas de RP-HPLC dos complexos TC3 – Tc6 mantidos numa solução tampão PBS pH 7,4 a 37 °C ao fim de 24h (Método 2, Condições A ; detecção γ).....	68
Figura 2.5.1.3: Estabilidade dos complexos Tc3 - Tc6 incubados com excesso de histidina (tampão PBS pH 7,4, 37 °C) ao fim de 24h (Método 2, Condições A ; detecção γ).....	69
Figura 2.6.1. Método Directo de Eisenthal e Cornish-Bowden para determinação da constantes V_{max} e K_m	72
Figura 2.6.2: Representação gráfica da regressão hiperbólica (A) e do Método Directo (B), para a determinação dos parâmetros cinéticos K_m^{app} e V_{max} do iNOS na presença do inibidor C3 (0,50 μM).....	75

Índice de Tabelas

Tabela 1.1.1: Radionuclídeos com interesse em terapia.....	6
Tabela 1.1.2: Radionuclídeos emissores de positrões com interesse em diagnóstico.....	9
Tabela 1.1.3: Radionuclídeos emissores γ com interesse em diagnóstico.....	10
Tabela 2.5.1: Tempos de retenção obtidos por RP-HPLC para os complexos organometálicos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e Re	66
Tabela 2.5.2.1. Valores de lipofília ($\log P_{o/w}$) para os complexos Tc3 -Tc6 .	
Tabela 3.1.3.1: Sequência de eluição do Método 1	79

Tabela 3.1.3.2: Sequência de eluição do Método 2	80
Tabela 2.6.1: Valores de K_m do iNOs obtidos na presença dos substratos L-arginina, C1 , C2 , Re3 e Re4	73
Tabela 2.6.2: Valores de K_i do iNOS para os inibidores N ^ω -nitro-L-ArgOH, C3 , C4 , Re5 e Re6 ...	76

Lista de símbolos e abreviaturas

Arg – arginina

BM – molécula biologicamente activa

Boc – tert-butoxicarbonilo

d – dobleto

dd – dobleto de dobletos

DCC – diciclohexilcarbodiimida

DCU - N,N'-diciclohexilureia

DMSO - dimetilsulfóxido

DTPA – ácido dietilenotriamino penta acético

EDC – N-etil-N'-(3-dimetiletaminopropil)carbodiimida

ESI-MS – espectrometria de massa com ionização por electrospray/electrospray ionization mass spectrometry

F – forte

f – fraca

fac – facial

IV – infravermelho

m – multiplete

MAG₃ – mercaptoacetiltriglicina

Me – metilo

α-MSH – α melanocyte stimulating hormone

NHS – N-hidroxisuccinimida

PET – tomografia por emissão de positrão/positron emission tomography

pz – unidade pirazolo-diamina

RGD – sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp

RMN – ressonância magnética nuclear

s – singuleto

SPECT – tomografia de emissão de fotão único/single photon emission computed tomography

t – tripleto

t.a. – temperatura ambiente

TLC – cromatografia em camada fina

TFA – ácido trifluoroacético

$t_{1/2}$ – período de semi-desintegração

α – alfa

β - beta

γ - gama

δ – desvio químico

ν – frequência de vibração

Preâmbulo

A medicina moderna necessita progressivamente de métodos mais avançados de modo a obter um diagnóstico mais preciso dos estados em que as doenças se encontram. Por estas razões tem sido feito um enorme esforço no sentido de desenvolver novas técnicas de imagiologia.

Estas imagens podem ser obtidas por aplicação externa de radiação (Raios-X, Ultrasons, MRI) ou por administração de pequenas quantidades de compostos radioactivos cuja emissão é detectada por aparelhos como o PET ou SPECT. Nesta extensão todas as técnicas referidas podem se complementar e o método seleccionado irá depender do tipo de imagem pretendida e da disponibilidade do equipamento. Neste campo a medicina nuclear tem sido favorecida para a obtenção de imagens de funções biológicas.

Devido ao grande desenvolvimento da biologia molecular na última década e da consequente identificação e compreensão dos mecanismos moleculares que estão na base de muitas doenças, os fármacos mais recentemente introduzidos no mercado, e os que estão em fase de avaliação pré-clínica e clínica, pertencem à categoria dos fármacos específicos. De facto, a investigação em química farmacêutica tem sido direccionada no sentido do desenvolvimento de sondas específicas, contendo biomoléculas (anticorpos monoclonais, péptidos reguladores, agonistas ou antagonistas de receptores específicos, etc), capazes de reconhecer *in vivo* alvos moleculares (receptores celulares, proteínas, enzimas, hormonas, etc) sobre ou sub-expressos em diferentes estados patológicos. A elevada afinidade e especificidade conseguida para estes alvos moleculares *in vivo* poderá levar a um aumento da sensibilidade das técnicas de imagiologia nuclear, permitindo a detecção e visualização dos processos bioquímicos que antecedem as alterações morfológicas, e assim, permitir a detecção precoce de certas doenças, ou um tratamento mais dirigido.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução.

1.1. Considerações gerais.

O papel da medicina nuclear na oncologia tem sido fundamental para o diagnóstico cada vez mais precoce de diferentes neoplasias, contribuindo para uma diminuição da mortalidade e morbilidade associadas a esses estados patológicos.¹

A medicina nuclear é uma especialidade médica que tira partido das propriedades nucleares de alguns elementos incorporados em fármacos, genericamente designados por radiofármacos.²

Os radiofármacos são medicamentos sem acção farmacológica, que têm na sua composição um isótopo radioactivo (radionuclídeo), de um elemento metálico ou não metálico, utilizados no diagnóstico ou terapia de doenças.³

De uma maneira geral, podemos diferenciar os radionuclídeos, e a sua aplicabilidade em medicina nuclear, pela forma como se transformam noutros nuclídeos mais estáveis, isto é:

1. Pelo tipo e energia da radiação emitida durante o processo de decaimento (fotões γ , partículas α , β^- , β^+ ou electrões Auger).
2. Pela velocidade de decaimento radioactivo, que é normalmente expressa pelo período de semi-desintegração ($t_{1/2}$ - tempo necessário para que o número de átomos radioactivos existentes num dado instante se reduza a metade).

Os radiofármacos para radioterapia interna deverão conter um radionuclídeo emissor de partículas carregadas α , β^- ou electrões Auger. Devido à sua maior capacidade ionizante e menor poder de penetração em tecidos biológicos, estas

¹ Carlsson, J., Aronsson, E., Hietala, S., Stigbrand, T., Tennvall, J., *Radiotherapy and Oncology*, **2003**, 66, 107.

² a) Reichert, D. E., Lewis, J. S., Anderson, C. J., *Metal complexes as diagnostic tools*, Coord. Chem. Rev. **1999**, 184, 3; b) Volkert, W. A. Hoffman, *Therapeutic radiopharmaceuticals*, Chem. Rev., **1999**, 99, 2269.

³ a) Saha, Gopal B., *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 5th Edition, Springer **2004**; b) Liu, S., *The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals*, Chem. Soc. Rev., **2004**, 99, 2219.

partículas permitem a destruição celular selectiva de tecidos alvo e a minimização da irradiação não desejada de tecidos adjacentes. A selecção do radionuclídeo mais adequado envolve a análise de diferentes parâmetros tais como a dimensão do tumor, a farmacocinética do radiofármaco, a energia das partículas emitidas, o custo/disponibilidade do radionuclídeo e o seu período de semi-desintegração ($t_{1/2}$).^{2b}

Os radionuclídeos emissores β^- têm sido os mais explorados para aplicações terapêuticas, destacando-se o ^{90}Y , o ^{131}I e o ^{153}Sm , que são utilizados com frequência na prática clínica (Tabela 1.1.1).⁴

Tabela 1.1.1: Radionuclídeos com interesse em terapia.

Radionuclídeo	Tipo de emissão/ Radiação γ (%)	$T_{(1/2)}$	Energia Max β^- (KeV)	Capacidade de penetração nos tecidos.
^{186}Re	β^-, γ (9.4%)	89.2 h	(β): 1069	5 mm
^{166}Ho	β^-, γ (6.7%)	26.9 h	(β): 1853	10.2 mm
^{188}Re	β^-, γ (15.1%)	17.0 h	(β): 2120	11 mm
^{131}I	β^-, γ (81.2%)	8 dias	(β): 810	4 mm
^{89}Sr	β^-	52.7 dias	1463	3 mm
^{32}P	β^-	14.3 dias	1710	8.7 mm
^{90}Y	β^-	64.1 h	2280	12 mm
^{213}Bi	α	45.7 min	5869	50-80 μm
^{211}At	α	7.2 h	5870	60-80 μm

⁴ a) Julow, J., Lanyi, F., Hajda, M., Szeifert, G. T., Viola, A., Balint, K., Nyary, I., *Stereotactic intracavitary irradiation of cystic craniopharyngiomas with yttrium-90 isotope*, Prog. Neurol. Surg., **2007**, 20, 289; b) Giammarile, F., Moggetti T., Resche, I., *Bone pain palliation with strontium-89 in cancer patients with bone metastases*, J. Nucl. Med., **2001**, **45**, 78; c) Serafini, A., *Therapy of metastatic bone pain*. J. Nucl. Med., **2001**, **42**, 895; d) Gestein, J., Loussouarn, A., Bardies, M., *Two-step targeting of xenografted colon carcinoma using a bispecific antibody and ^{188}Re -labeled bivalent hapten: biodistribution and dosimetry studies*. J. Nucl. Med., **2001**, **42**, 146; e) Stutchbury, T., Al-Ejeh, F., Stillfried, G., Croucher, D., Andrews, J., Irving, D., Links, M., Ranson, M., *Preclinical evaluation of ^{213}Bi -labeled plasminogen activator inhibitor type 2 in an orthotopic murine xenogenic model of human breast carcinoma*, Mol. Cancer Ther., **2007**, 6, 203.

Da análise da **Tabela 1.1.1** é possível verificar que alguns dos radionuclídeos são também emissores de radiação γ , permitindo assim visualizar simultaneamente a distribuição *in vivo* do radiofármaco utilizado no tratamento.⁵

Alguns radionuclídeos emissores de partículas α (^{213}Bi e ^{211}At), têm também, sido propostos para terapia tumoral. Estes radionuclídeos distinguem-se pelo seu $t_{(1/2)}$ relativamente baixo e por emitirem radiação com elevado poder ionizante. Assim, devido ao facto de apresentarem uma transferência linear de energia mais elevada que as partículas β^- , as partículas α permitem uma destruição celular localizada mais eficaz. No entanto, para se diminuir a irradiação de tecidos não alvo, é necessário incorporar os radionuclídeos em radiofármacos com elevada especificidade molecular *in vivo*.⁶

A possibilidade de se utilizarem radiofármacos para terapia contendo radionuclídeos emissores de electrões auger (ex. ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{125}I) tem vindo a ser explorada nos últimos anos. No entanto, devido ao curto alcance deste tipo de partículas (< 1 diâmetro celular) é necessário ainda desenvolver compostos radioactivos que sejam capazes de se acumularem no núcleo das células de modo a alveijarem o DNA.⁷

Os radiofármacos para diagnóstico contêm radionuclídeos emissores de radiação γ ou de partículas β^+ (positrões) que após administração se distribuem pelo organismo e se fixam no órgão ou tecido alvo do paciente. A detecção externa da radiação emitida pelas técnicas nucleares de PET (tomografia de emissão de positrões)

⁵ Kassis, A. I., Adelstein, S. J., *Radiobiologic Principles in radionuclide therapy*, J. Nucl. Med., **2005**, 99, 4.

⁶ a) Geerlings, M. W., Kaspersen, F. M., Apostolidis, C., Hout, V. *The feasibility of ^{225}Ac as a source of alpha-particles in radioimmunotherapy*, Nucl. Med. Commun., **1993**, 14, 121; b) Stutchbury, T. K., Al-Ejeh, F., Stillfried, G. E., Croucher, D. R., Andrews, J., Irving, D., Links, M., Ranson, M., *Preclinical evaluation of ^{213}Bi -labeled plasminogen activator inhibitor type 2 in an orthotopic murine xenogenic model of human breast carcinoma*, Mol. Cancer Ther., **2007**, 6, 203.

⁷ a) Donoghue, A. Wheldon, T., *Targeted radiotherapy using Auger electron emitters*, Phys. Med. Biol., **1996**, **44**, 1973; b) Hafliger, P., Agorastos, N., Georgiev, O., Viola, G., Alberto, R., *Induction of DNA-binding ligands*, Chembiochem., 2005, 6, 414.

ou SPECT (tomografia computadorizada de emissão de fóton único) permite a obtenção de imagens que possibilitam o diagnóstico de diversas patologias.⁸

Na técnica de PET (**Figura 1.1.1**) administram-se radiofármacos que contenham radionuclídeos emissores β^+ (**Tabela 1.1.2**).⁹ Nesta técnica, a obtenção de imagem baseia-se na detecção simultânea de dois fótons γ anti-paralelos com energia de 511 KeV, resultantes da reacção de aniquilação entre o positrão e os electrões do meio. Devido à detecção simultânea dos dois fótons anti-paralelos por intermédio de detectores múltiplos dispostos de um modo circular, a resolução espacial e a sensibilidade da técnica PET (4 a 8 mm) são superiores às da técnica SPECT (7 a 10 mm). Ao contrário da técnica SPECT, não é necessário recorrer a colimadores, uma vez que os detectores circulares, detectam os fótons anti-paralelos revelando a posição exacta onde ocorreu a aniquilação.

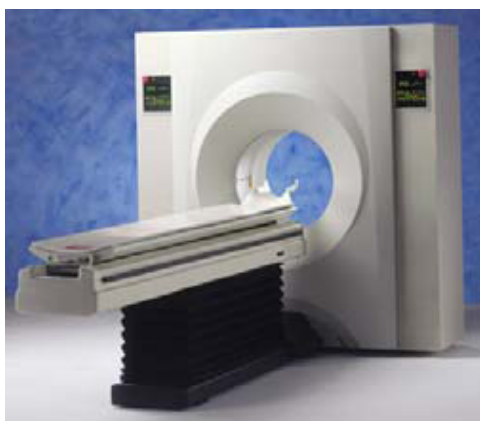


Figura 1.1.1: Fotografia de uma câmara PET.

⁸ Coleman, R., *Radionuclide Imaging in Cancer Medicine. Cancer Imaging. Cancer in Medicine*, American Cancer Society, **2003**.

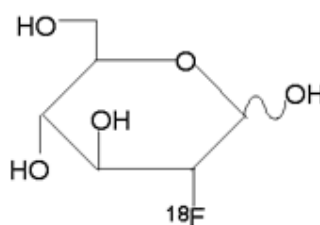
⁹ Schilyer, D. J., *PET tracers; Radiochemistry*, Ann. Acad. Med. Singapore, **2004**, 33. 146

Tabela 1.1.2: Radionuclídeos emissores de positrões com interesse em diagnóstico.

Radionuclídeos	Tipo de emissão	T _(1/2)	Energia Max (KeV)
¹⁸ F	Positrões	1.83 h	640
¹¹ C	Positrões	20.4 min	960
¹³ N	Positrões	9.96 min	1190
¹⁵ O	Positrões	2.07 min	1720

Uma das principais desvantagens associadas a esta técnica é o período de semi-desintegração curto dos isótopos mais frequentemente utilizados (2 – 110 min), o que obriga à instalação de um ciclotrão num local próximo da realização do exame. O aparecimento recente de geradores experimentais de radionuclídeos emissores de positrões possibilita a obtenção *in loco* dos mesmos e aumenta a possibilidade de utilização da técnica de PET.¹⁰

De todos os radionuclídeos com aplicação em PET o ¹⁸F tem sido o mais utilizado em imagiologia, sendo até o momento a ¹⁸FDG ([¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxiglucose) o radiofármaco de eleição em oncologia nuclear (**Figura 1.1.2**).¹¹

**Figura 1.1.2:** Estrutura da [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxiglucose (¹⁸FDG).

A técnica de SPECT utiliza radiofármacos que contêm radionuclídeos emissores γ , tais como aqueles descritos na **Tabela 1.1.3**.¹²

¹⁰ Saha, G. B., *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 4th Edn, Springer **1998**.

¹¹ Kirby, A. M., George Mikhaeel, N., *The role of FDG PET in the management of lymphoma: practical guidelines*, Nucl. Med. Commun., 28, **2007**, 355.

¹² a) Banerjee, S., Pillai, M. R., Ramamoorthy, N., *Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals*, Semin. Nucl. Med., 31, **2001**, 260–277; b) Ruth, T., Pate, B., Robertson, R., Porter, J., *Radionuclide production for biosciences*, Nucl. Med. Biol., 1989, 16, 323.

Tabela 1.1.3: Radionuclídeos emissores γ com interesse em diagnóstico.

Radionuclídeo	Tipo de emissão	$T_{(1/2)}$	Energia Max (KeV)
⁶⁷ Ga	γ	78.3 h	393
¹¹¹ In	γ	67.2 h	245
¹²³ I	γ	13.2 h	159
^{99m} Tc	γ	6.0 h	140

O equipamento utilizado na técnica de SPECT permite a detecção de fótons gama, com energias idealmente compreendidas entre 100 e 150 KeV. A imagem da distribuição da radiação é obtida à medida que a câmara gama, constituída por um cristal único de NaI(Ti), vai rodando em torno do paciente, permitindo a obtenção de imagens nos diversos planos anatómicos.¹³

O ^{99m}Tc é o radionuclídeo mais utilizado em imagiologia nuclear, fazendo parte da constituição de mais de 80% dos radiofármacos utilizados em técnicas nucleares de diagnóstico.¹⁴

1.2. Radiofármacos de Tecnécio.

1.2.1. Considerações gerais sobre o Tecnécio.

O Tecnécio é um elemento de transição-d (grupo VIIB da tabela periódica) inicialmente previsto por Mandeleev (Ekamanganésio), tendo sido isolado por Perrier e Segré em 1938 quando estudavam reacções de deuterões com molibedénio metálico num ciclotrão. Este elemento não natural apresenta 22 isótopos e 9 isótopos metaestáveis, com períodos de semi-desintegração que variam entre alguns segundos e vários milhões de anos.¹⁵

¹³ Coleman, R. E., *Radionuclide Imaging in Cancer Medicine.*, American Cancer Society, **2003**.

¹⁴ Dietlein, M., Pels, H., Schulz, H., Staak, O., Borchmann, P., Schomacker, K., Fischer, T., Eschner, W., Pogge von Strandmann, E., Schicha, H., Engert, A., Schnell, R., *Imaging of central nervous system lymphomas with iodine-123 labeled rituximab*, Eur. J. Haematol., **2005**, 348.

¹⁵ Yoshihava, K., *Recent studies on the nuclear chemistry of technetium.*, Top. Curr. Chem., **1996**, 2, 176.

De todos estes isótopos destaca-se o isótopo metaestável ^{99m}Tc que, devido às suas propriedades nucleares quase ideais para imagem, assumiu um papel inigualável na Medicina Nuclear. Deste conjunto de propriedades destacam-se o tempo de semi-desintegração de 6 h, que é suficientemente longo para permitir a síntese do radiofármaco, controlo de qualidade, administração ao paciente e a aquisição de imagem; e suficientemente curto para permitir a administração de actividades relativamente elevadas, sem que isso constitua uma dose de radiação significativa para o doente.

A emissão de radiação gama monoenergética de 140 KeV está próxima do valor óptimo para imagem com as câmaras gama em utilização rotineira na prática clínica. Além disso essa radiação atravessa facilmente os tecidos biológicos, permitindo a imagem de órgãos internos. A facilidade de obtenção a preço reduzido constitui ainda uma vantagem acrescida na utilização do ^{99m}Tc . De facto, este radionuclídeo é obtido nos centros de medicina nuclear a partir de um gerador comercial de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (**Figura 1.2.1.1**).¹⁶

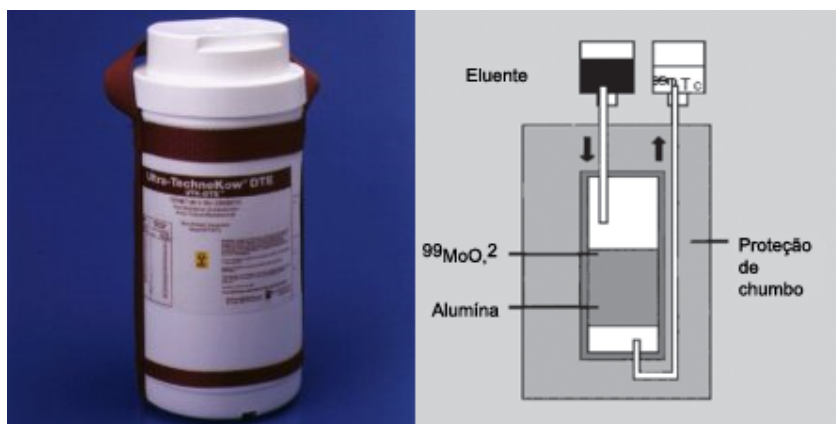


Figura 1.2.1.1: Fotografia e representação esquemática dos componentes de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (eluente: solução estéril e apirógena de NaCl 0,9%).

¹⁶ Dilworth, J. R., Parot, S. J., *The biomedical chemistry of technetium and rhenium*, Chem. Soc. Rev., 1998,27, 43.

O gerador evita a necessidade de existir no local um reator nuclear ou um acelerador de partículas e, por isso, torna o ^{99m}Tc um dos isótopos radioativos menos dispendiosos ao dispor da medicina nuclear.

Neste gerador, o ^{99}Mo , adsorvido a uma coluna de alumina sob a forma de anião $[\text{MoO}_4]^{2-}$, decai por emissão de partículas β^- (87,5%) com um período de semi-desintegração de 66 horas, dando origem ao radioisótopo metaestável ^{99m}Tc (**Figura 1.2.1.2**). Este radionuclídeo é eluído da coluna com uma solução estéril e apirogênea de NaCl 0,9% sob a forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$) em concentrações entre 10^{-9} e 10^{-12} M. O ^{99}Mo decai também simultaneamente (13%) para o estado fundamental ^{99}Tc por emissão β^- .

O ^{99m}Tc decai para ^{99}Tc por transição isomérica ($t_{1/2} = 6,02\text{h}$, $E_\gamma = 140\text{ KeV}$). O ^{99}Tc ($t_{1/2} = 2,02 \times 10^5$ anos, $E_\beta = 290\text{ KeV}$) decai por emissão de partículas β^- para ^{99}Ru estável.

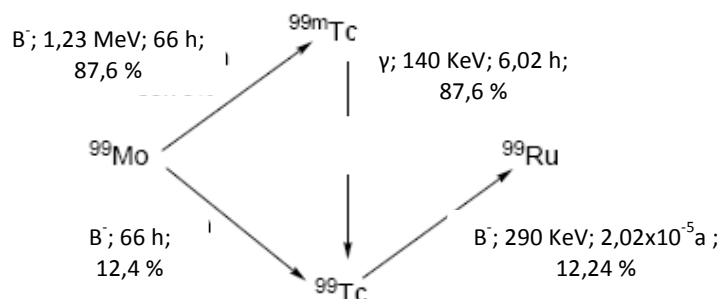


Figura 1.2.1.2: Formação e decaimento radioativo do ^{99m}Tc .

O Tecnécio apresenta vários estados de oxidação (-1 a +7), sendo possível isolar diferentes complexos com geometrias de coordenação variadas, estabilizados com ligandos com átomos doadores adequados ao estado de oxidação em causa.¹⁷

Quimicamente, o anião pertecnetato de sódio ($\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$) é uma espécie pouco reactiva, sendo necessário reduzir o $^{99m}\text{Tc(VII)}$ a estados de oxidação inferiores.

¹⁷ Liu, S., Edwards, D., Barrett, A., *^{99m}Tc -labeling of highly potent small peptides*, Bioconjug. Chem., 1997, 8, 621.

Desta forma, é possível obter complexos de coordenação com características úteis para aplicação em radiofarmácia, nomeadamente propriedades farmacocinéticas adequadas.¹⁸

O estado de oxidação final do metal depende não só das condições reacionais (ex. pH, temperatura, concentração de reagentes etc), como também da natureza do agente redutor e da natureza dos ligandos presentes. Um dos redutores mais utilizados para a preparação de compostos de $^{99m}\text{Tc(V)}$ tem sido o cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Podem ainda utilizar-se outros redutores, tais como o borohidreto de sódio (NaBH_4), o ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), as hidrazinas ou as fosfinas terciárias, dependendo do estado de oxidação final pretendido.¹⁹

Até a data, os estados de oxidação intermediários de $^{99m}\text{Tc(III)}$ e $^{99m}\text{Tc(V)}$ têm sido os mais explorados para a síntese de radiofármacos de ^{99m}Tc . Recentemente, os complexos de Tc(I) do tipo tricarbonilo têm assumido uma importância crescente na investigação e desenvolvimento de novos radiofármacos.²⁰

Uma vez que a concentração total de tecnécio eluído do gerador é extremamente baixa (10^{-9} e 10^{-12} M) não é possível a caracterização dos complexos de ^{99m}Tc pelos métodos convencionais utilizados em química. Assim, a identificação estrutural destes complexos faz-se recorrendo à síntese paralela dos compostos análogos de ^{99}Tc ou de Re natural. A utilização de ^{99}Tc para caracterização dos complexos de ^{99m}Tc tem como principal inconveniente o facto deste isótopo radioactivo ser emissor β^- , e de ter um período de semi-desintegração muito longo ($t_{1/2} = 2,14 \times 10^5$ anos). Por esta razão, utilizam-se normalmente os complexos de rénio como modelo para caracterizar os complexos de ^{99m}Tc .²¹ Neste caso, assume-se que as características físico-químicas deste elemento são semelhantes às do ^{99m}Tc . De facto, ambos os elementos pertencem ao grupo VIIB da Tabela Periódica e os seus raios

¹⁸ Liu, S., Edwards, D., *^{99m}Tc -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals*, Chem. Rev. **1999**, 99, 2235.

¹⁹ Sampson, C. B., *Textbook of radiopharmacy: theory and practice*, Gordon and Breach Science Publishers S.A. **1990**.

²⁰ Liu, S., *The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals*, Chem. Soc. Rev., **2004**, 33, 445.

²¹ Jurison, S., Lydon, J. D., *Potencial technetium small molecule radiopharmaceutical*, Chem. Rev., **1999**, 99, 2205.

atómicos são praticamente coincidentes (Re, 1,37 Å; Tc, 1,36 Å). A principal diferença prende-se com a maior dificuldade de redução dos complexos de Re e de estes serem cineticamente mais inertes do que os seus análogos de ^{99m}Tc .¹⁶

Em conclusão, durante o processo de desenvolvimento de novos radiofármacos de ^{99m}Tc , a caracterização estrutural dos complexos de ^{99m}Tc pode ser feita por comparação dos seu perfis cromatográficos (HPLC – detecção γ) com os dos complexos análogos de ^{99}Tc ou de Re natural (HPLC – detecção UV).

1.2.2. Radiofármacos de primeira geração.

Os primeiros radiofármacos introduzidos no mercado foram os denominados radiofármacos de primeira geração, também designados por agentes de perfusão. O seu comportamento biológico, nomeadamente a sua farmacocinética e selectividade, é determinado exclusivamente pelas propriedades químicas e físicas do complexo radioactivo, tais como o seu peso molecular, carga e lipofilia. A grande maioria dos radiofármacos de 1ª geração em uso clínico são baseados no fragmento metálico $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$, em que o metal está no estado de oxidação (V). O único agente de ^{99m}Tc de baixo estado de oxidação utilizado em clínica é o ^{99m}Tc -sestamibi, no qual o metal se encontra no estado de oxidação (I).²²

Na **Figura 1.2.2.1** apresentam-se alguns exemplos de radiofármacos de ^{99m}Tc de 1ª geração actualmente utilizados para o estudo ou visualização de diferentes órgãos.

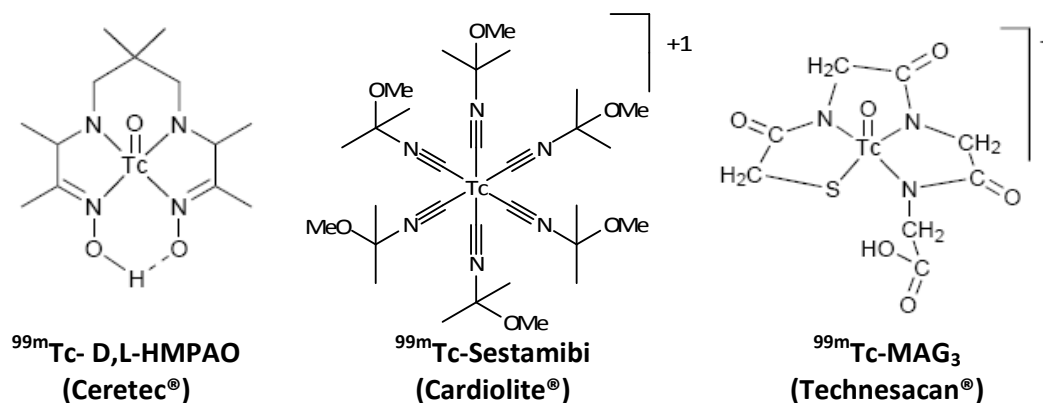


Figura 1.2.2.1: Exemplos de radiofármacos de ^{99m}Tc de 1ª geração em utilização clínica.

Devido ao facto de apresentar carga neutra e ser moderadamente lipofílico, o complexo radioactivo ^{99m}Tc -D,L-HMPAO atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, acumulando-se preferencialmente no cérebro devido à formação de uma espécie mais hidrofílica. Desta forma, é possível a realização de estudos de perfusão cerebral.²³

O composto ^{99m}Tc -Sestamibi é um excelente agente de perfusão do coração, uma vez que a sua natureza lipofílica e catiónica conduz a uma fixação preferencial no tecido do miocárdio.²⁴

O ^{99m}Tc MAG₃ é o complexo mais utilizado para estudos de avaliação da função renal. A estrutura deste complexo não é ainda conhecida mas estima-se que a presença do grupo carboxilato livre seja responsável pela secreção tubular activa deste composto.²⁵

²³ Leonard, J., Novotnik, D., Neirinck, R., *Technetium-99m-d,1-HM-PAO: A New Radiopharmaceutical for Imaging Regional Brain Perfusion Using SPECT—A Comparison with Iodine-123 HIPDM*, J. Nucl. Med., **1986**, 27, 1819.

²⁴ Holman, B., Jones, A., James, J., Davidson, A., Abrams, M., Kirschenbaum, S., Tube, S., English, J., *A New Tc-99m-Labeled Myocardial Imaging Agent, Hexakis(t-Butylisonitrile)-Technetium(I) [Tc-99m TBI]: Initial Experience in the Human*, J. Nucl. Med., **1984**, 25, 1350.

²⁵ Fritzberg, A., Kasina, S., Eshima, D., Johnson, D., *Synthesis and Biological Evaluation of Technetium-99m MAG₃ as a Hippuran Replacement*, J. Nucl. Med., **1986**, 27, 111.

1.2.3. Radiofármacos de 2ª geração.

Durante a última década, a investigação em química radiofarmacêutica direccionou-se essencialmente para o desenvolvimento dos chamados *radiofármacos específicos* ou *radiofármacos de 2ª geração*, com vista à visualização *in vivo* de estruturas moleculares a nível celular – *imagiologia molecular*.

Estes compostos contêm uma biomolécula – *unidade vectorizante* (ex. anticorpo monoclonal, péptido regulador, agonista ou antagonista de receptores específicos, etc) capaz de reconhecer *in vivo* determinados alvos moleculares associados a estados patológicos específicos. Assim, a farmacocinética destes compostos é influenciada não só pelas suas propriedades físico-químicas (peso molecular, carga e lipofília), como também pela afinidade e especificidade da biomolécula para o alvo molecular.²⁶

A título de exemplo, apresenta-se na **Figura 1.2.3.1** o composto radioactivo ^{99m}Tc -TRODAT que contém um análogo da cocaína, encontrando-se actualmente em ensaios clínicos de fase 1. Este complexo reconhece especificamente os transportadores da dopamina *in vivo*, permitindo fazer o diagnóstico da doença de Parkinson.²⁷

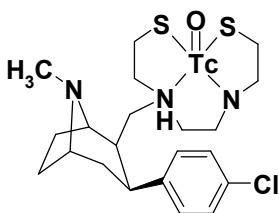


Figura 1.2.3.1: Exemplo de radiofármaco específico em fase de ensaios clínicos – ^{99m}Tc -TRODAT.

²⁶ a) Okarvi, S., *Peptide-based Radiopharmaceuticals: Future tools for diagnostic Imaging of cancers and other diseases*, Med. Res. Rev., **2004**, 3 357; b) Liu, S., *Ether and crown ether containing cationic ^{99m}Tc complexes usefull as radiopharmaceuticals for heart imaging*, Dalton Trans., **2007**, 1183; c) Larson, S., Divgi, C., Scott., A., *Overview of clinical radioimmunodetection of human tumors*, Cancer, **1994**, 73, 832.

²⁷ Kung, H., Kim, H., Kung, M., Meegala, K., Ploss, K., Lee, H., *[^{99m}Tc]TRODAT-1 : a novel technetium-99m complex as a dopamine transporter imaging agent*, Eur. J. Nucl. Med, **1996**, 23, 1527.

1.2.3.1. Novos complexos específicos de ^{99m}Tc .

Para que seja possível o desenvolvimento de novos complexos radioativos de ^{99m}Tc , potencialmente úteis como radiofármacos específicos, há que desenvolver agentes quelantes capazes de formar complexos de ^{99m}Tc com rendimentos elevados a baixas concentrações. Os complexos formados deverão ainda ser cineticamente inertes e termodinamicamente estáveis. Para além da estabilização eficaz do fragmento metálico, os agentes quelantes deverão ainda permitir a conjugação a biomoléculas (BM), sem lhes alterar significativamente as suas propriedades biológicas – *agentes quelantes bifuncionais*.^{17, 18, 20, 28}

Os fragmentos metálicos de Tc mais estudados no desenvolvimento de radiofármacos específicos e os respectivos estados de oxidação são descritos na **Figura 1.2.3.1.1**.

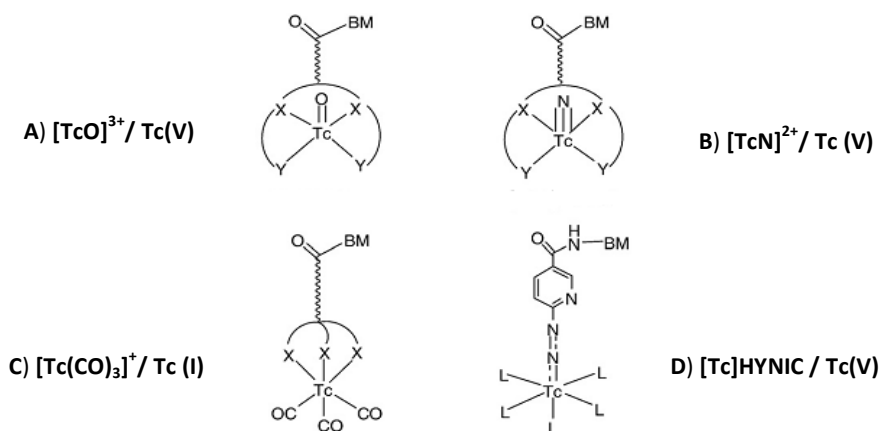


Figura 1.2.3.1.1: Fragmentos metálicos de ^{99m}Tc utilizados no desenvolvimento de radiofármacos específicos (BM = biomolécula).

A unidade de ^{99m}Tc que tem sido mais explorada até à data é a unidade $[\text{TcO}]^{3+}$ (**Figura 1.2.3.1.1, A**). Esta unidade apresenta uma enorme estabilidade em

²⁸ Tisato, F., Porchia, M., Bolzati, Refoso, A., Vittadini, A., The preparation of substitution-inert ^{99}Tc metal fragments: promising candidates for the design of new ^{99m}Tc radiopharmaceuticals, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, 42, 2034; b) Alberto, R., *New organometallic technetium complexes for radiopharmaceutical imaging*, *Top. Curr. Chem.*, **2005**, 252, 1.

solução aquosa quando estabilizado por agentes quelantes tetradentados que apresentam na sua constituição átomos doadores de S e N (**Figura 1.2.3.1.2.**).²⁹

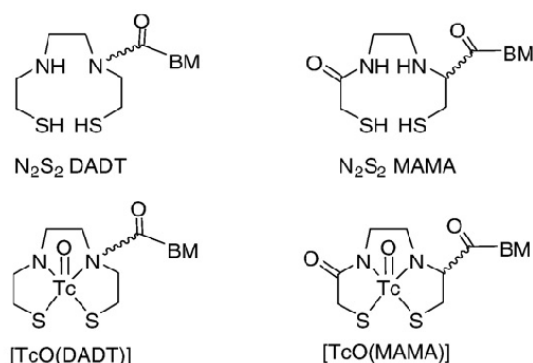


Figura 1.2.3.1.2: Exemplos de ligandos tetradentados do tipo diaminoditiol (DADT) e monoaminamonoamida (MAMA) utilizados para a estabilização da unidade [^{99m}TcO]³⁺/Tc(V).

Dos diferentes biocomplexos preparados com o fragmento [^{99m}TcO]³⁺ e estabilizados com agentes quelantes análogos aos apresentados anteriormente, destaca-se o radiofármaco ^{99m}Tc-Apcitide (AcuTec®) actualmente em uso clínico para localização de trombozes venosas agudas nas extremidades inferiores (**Figura 1.2.3.1.3.**).³⁰

²⁹ Klingensmith, W., Fritzberg, A., Spitzer, V., Johnson, D., Kuni, C., Williamson, R., Washer, G., Weil, R., *Clinical evaluation of Tc-99m N,N'-bis (mercaptoacetyl)-2,3-diaminopropanoate as a replacement for I-131 hippurate: concise communication*, J. Nucl. Med. **1984**, 25, 42; b) B. Johannsen, H. Spies, *Technetium(V) chemistry as relevant to nuclear medicine*, Topics. Curr. Chem., **1996**, 176, 77; c) Rao, T., Adhikesavalu, D., Camerman, A., Fritzberg, A., *Technetium(V) and rhenium(V) complexes of 2,3-bis(mercaptoacetamido)propanoate. Chelate ring stereochemistry and influence on chemical and biological properties*, J. Am. Chem. Soc., **1990**, 112 5798.

³⁰ Francesconi, L., Zheng, Y., Bartis, J., Blumenstein, M., Costello, C., Rosch, M. A., *Preparation and characterization of [99TcO] Apcitide : A technetium labelled peptide*, Inorg. Chem., **2004**, 43, 2867.

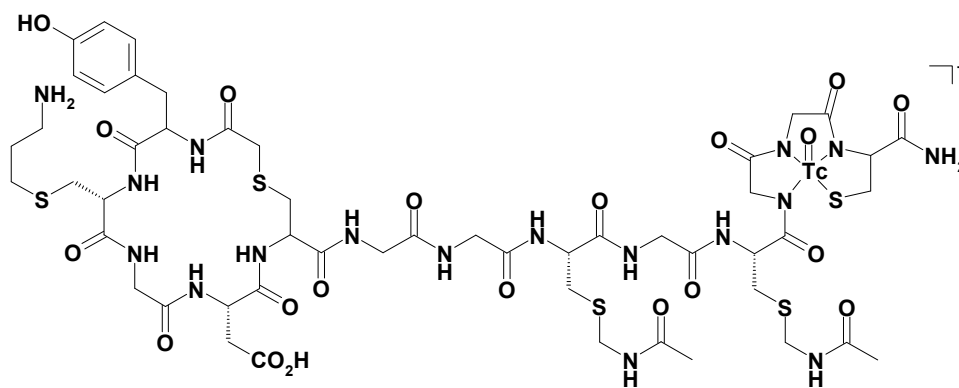


Figura 1.2.3.1.3: Radiopéptido ^{99m}Tc -Apcitide (AcuTec®).

Têm ainda sido desenvolvidos esforços para o desenvolvimento de novos complexos radioativos específicos com base nos fragmentos metálicos $[\text{Tc}]\text{-HYNIC}$ e $[\text{TcN}]^{2+}/(\text{V})$. Estas unidades são normalmente estabilizadas por ligandos contendo na sua constituição átomos doadores de P, N, O e S, formando complexos mistos. A título de exemplo, apresentamos na **Figura 1.2.3.1.4** o complexo ^{99m}Tc -N-DBODC que foi recentemente proposto como radiofármaco para visualização do miocárdio.³¹

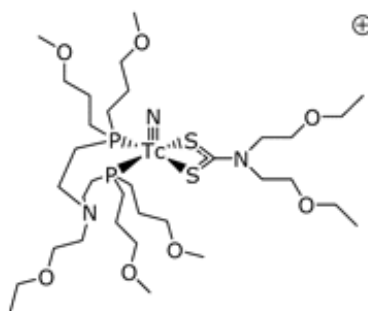


Figura 1.2.3.1.4: ^{99m}Tc -N-DBODC- Complexo bioespecífico contendo a unidade $[\text{TcN}]^{2+}/(\text{V})$ para visualização do miocárdio.

³¹ a) Boschi, A., Bolzati, C., Benini, E., Malago, E., Uccelli, L., Duatti, A., Piffanelli, A., Refosco, F., Tisato, F., *A novel approach to the high specific-activity labeling of small peptides with the technetium-99m fragment $[\text{TcN}]^{2+}$ (PNP=diphosphine ligand)*, Bioconjug. Chem., **2001**, 12, 1035 ; b) Abrams, M. J., Juweid, M., tenKate, C. I., Schwartz, D. A., Hauser, M. M., Gaul, F. E., Fuccello, A., Rubin, R. H., Strauss, H. W., Fischman, A. J., *Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats*, J. Nucl. Med., **1990**, 31, 2022; c) Cittanti, C., Uccelli, L., Pasquali, M., Boschi, A., Flammia, C., Bagatin, E., Casali, M., Stabin, M., Feggi, L., Giganti, M., Duatti, A., *Whole-Body Biodistribution and Radiation Dosimetry of the New Cardiac Tracer ^{99m}Tc -N-DBODC*, J. Nucl. Med., **2008**, 49, 11A-12A.

Recentemente, a introdução do precursor organometálico *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ na química radiofarmacêutica revelou-se bastante promissora para o desenvolvimento de novos radiofármacos específicos. A estabilidade cinética que a configuração d^6 do metal confere a esta unidade, dificultando a substituição parcial ou total dos ligandos de CO, constitui uma das principais vantagens associadas a esta unidade organometálica. De facto, este fragmento é notavelmente estável à oxidação numa vasta gama de pH em solução aquosa.

A primeira síntese do precursor *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (rendimento > 98%) foi efectuada por Alberto *et al.*, por redução directa do $\text{Na}[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ com borohidreto de sódio em solução aquosa (**Figura 1.2.3.1.4**, Via de síntese **A**).³²

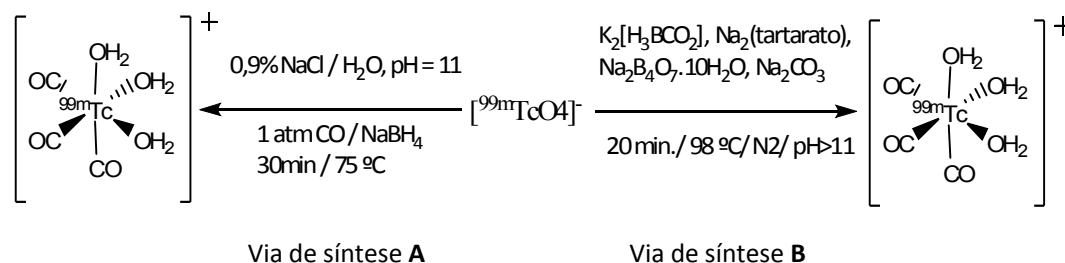


Figura 1.2.3.1.4: Condições de preparação do precursor organometálico *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ a partir de $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$.

Posteriormente, o mesmo autor, passou a utilizar o boranocarbonato de potássio ($\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$) como agente redutor ($\text{Tc(VII)} \Rightarrow \text{Tc(I)}$) e fonte de CO *in situ*. O precursor *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ assim obtido em rendimento quantitativo (**Figura 1.2.3.1.5**, via de síntese **B**).³³

A introdução do boranocarbonato de potássio possibilitou a formulação e desenvolvimento de um kit liofilizado - IsoLink[®] - para a preparação do precursor organometálico *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ para investigação, num único passo de forma

³² Alberto, R., Schibli, R., Egli, A., Schubiger, P. A., Abram, U., Kaden, T. A., *A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with bifunctional ligand*, J. Am. Chem. Soc., **1998**, 120, 7987.

³³ Alberto, R., Ortner, K., Wheatley, N., Schibli, R., Schubiger, P. A., *Synthesis and properties of boranocarbonate: a convenient in situ CO source for the aqueous preparation of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$* , J. A. Chem. Soc., **2001** 123, 3135.

quantitativa. Neste complexo, os três ligandos carbonilo fortemente ligadas ao metal labilizam as três moléculas de água situadas em posição *trans*, facilitando a sua substituição por ligandos de denticidade variável (mono, bi ou tridentados) e com diferentes combinações de átomos doadores. Desta forma, é possível obter um grande número de complexos com diferentes propriedades físico-químicas e biológicas. Na **Figura 1.2.3.1.6** apresentam-se exemplos de complexos organometálicos contendo a unidade $fac-[M(CO)_3]^+$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$) estabilizados por agentes quelantes bifuncionais de denticidade variável.³⁴

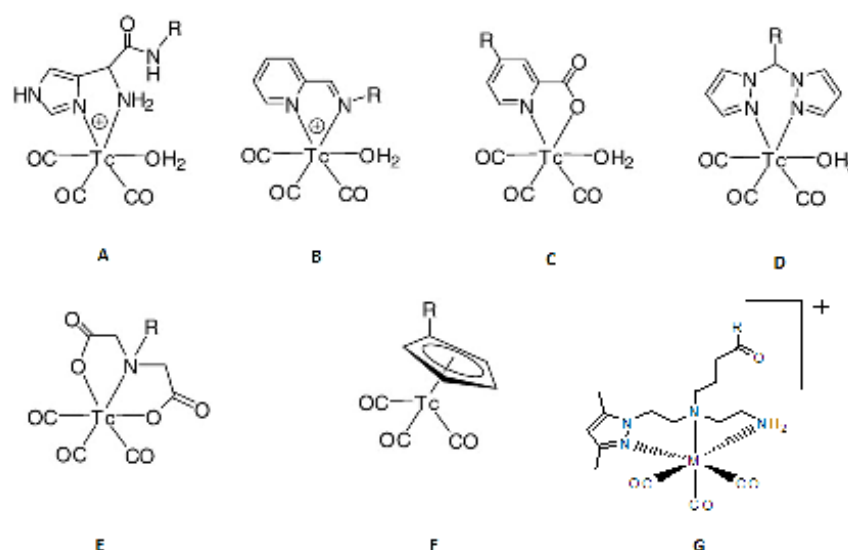


Figura 1.2.3.1.6: Exemplos de complexos organometálicos contendo a unidade $fac-[M(CO)_3]^+$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$) estabilizados por ligandos monodentados, bidentados e tridentados; R = Biomolécula.

³⁴ a) Stichelberger, A., Waibel, R., Dumas, C., Schubiger, P. A., Schibli, R., *Versatile synthetic approach to new bifunctional chelating agents tailor made for labeling with the $fac-[M(CO)_3]^+$ core ($M=Tc, {}^{99m}Tc, Re$): synthesis, in vitro, and in vivo behavior of the model complex $[M(APPA)(CO)_3]$ ($APPA=[(5-amino-pentyl)-pyridin-2-ylmethylamino]-acetic acid$), Nucl. Med. Biol., **2003**, 30, 465; b) Schibli, R., La Bella, R., Alberto, R., Garcia-Garayoa, E., Ortner, K., Abram, U., Schubiger, P. A., *Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of ${}^{99m}Tc(I)$ -tricarbonyl complexes: a hint for the future functionalization of biomolecules*, Bioconjug. Chem., **2000**, 11, 345; c) Alves, S., Paulo, A., Correia, J. D. G., Gano, L., Smith, C. J., Hoffman, T. J., Santos, I., *Pyrazolyl derivatives as bifunctional chelators for labelling tumor-seeking peptides with the $fac-[M(CO)_3]^+$ moiety ($M = {}^{99m}Tc, Re$): Synthesis, characterization, and biological behaviour*, Bioconjugate Chem., **2005**, 16, 438.*

1.3 Óxido nítrico sintase

1.3.1 Considerações gerais

O óxido nítrico (NO), gás neutro de natureza radicalar, é um mediador biológico inorgânico de reconhecida importância em mamíferos. Esta molécula simples desempenha um papel fundamental em diferentes processos fisiológicos, nomeadamente na vasodilatação, neurotransmissão, resposta imunitária, metabolismo do ferro e agregação plaquetária.³⁵

Devido à presença de um electrão desemparelhado, o NO reage rapidamente com outras espécies paramagnéticas (ex. radicais peroxo) ou com centros metálicos, o que lhe confere um período de semi-vida biológica relativamente curto: 0,1 s – 5 s. Assim, ao contrário da maioria dos outros mensageiros químicos, o NO não pode ser armazenada, pelo que é sintetizado relativamente perto do seu local de acção.³⁶

O óxido nítrico é sintetizado *in vivo* pelas células de mamíferos por uma família de enzimas designada por óxido nítrico sintase (NOS, EC 1.14.13.39), que catalisa a conversão do aminoácido L-arginina a L-citrulina com a formação de óxido nítrico (**Figura 1.3.1.1**).³⁷

³⁵ a) Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A., Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, **1991**, 43, 109; b) Palmer, R. M. J., Ferridge, A. G., Moncada, S., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* **1987**, 327, 524.

³⁶ Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., Tainer, J. A., *Structure of nitric synthase oxygenase dimer with pterin and substrate*, *Science*, **1999**, 279, 2121.

³⁷ a) Knowles, R. G., Moncada, S., *Nitric oxide synthases in mammals.*, *Biochem. J.*, **1994**, 298, 249; b) Marletta, M. A., *Nitric oxide synthase structure and mechanism*, *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 12231.

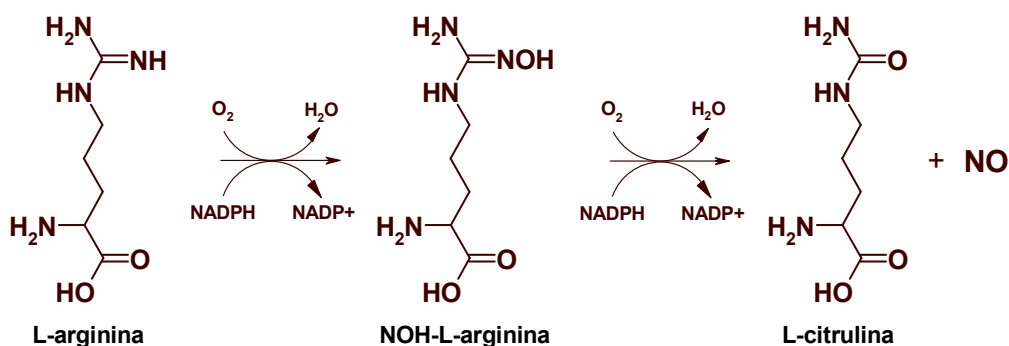


Figura 1.3.1.1: Biosíntese do NO por oxidação da L-arginina a L-citrulina, catalisada pelo óxido nítrico sintase (NO).

A biosíntese de NO ocorre em dois passos sequenciais de oxidação da L-arginina. O primeiro envolve a oxidação do azoto terminal da unidade guanidina da L-arginina, originando o intermediário N^G-hidroxi-L-arginina (NOH-L-arginina), que num segundo passo é oxidado a NO e a L-citrulina.

A família do óxido nítrico sintase (NOS) apresenta duas isoformas constitutivas controladas pelos níveis de Ca²⁺ circulante (NOS1, nNOS [NOS neuronal] e NOS3, eNOS [NOS endotelial]) e uma isoforma induzida (NOS2, iNOS [NOS induzida]) cuja expressão é independente da concentração de Ca²⁺.³⁸

O nNOS é constitutivamente expresso no sistema nervoso central e periférico. O NO produzido por esta isoforma tem um importante papel fisiológico como neurotransmissor e regulador do fluxo sanguíneo no cérebro. O eNOS está associado às células endoteliais vasculares e às plaquetas, estando o NO produzido por esta isoforma envolvido na regulação da pressão sanguínea, distribuição do fluxo sanguíneo para os órgãos e inibição da agregação e adesão plaquetárias. O iNOS não é expresso em condições normais, sendo a sua expressão induzida por lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e citocinas (ex. INF γ e IL-1 β) em macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, etc. Esta isoforma produz concentrações elevadas de NO (μ M) ao nível

³⁸ a) Li, H., Poulos, T. L., Structure-function studies on nitric oxide synthases, J. Inor. Biochem., **2005**, 99, 293; b) Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G., Nitric oxide synthases: structure function and inhibition, Biochem. J., **2001**, 357, 593.

local, que pode conduzir à destruição de microorganismos e, em certas condições, células tumorais.³⁹

O NOS é uma proteína dimérica em que os monómeros que a constituem têm uma massa molecular que varia entre os 135 kDa e os 164 kDa. Funcionalmente, o NOS apresenta um domínio redutase na parte C-terminal e um domínio oxigenase na parte N-terminal. No domínio redutase estão os sítios de ligação para o NADPH (fosfato de nicotinamida dinucleótido) e os cofactores FAD (flavina dinucleótido) e FMN (flavina mononucleótido), os quais transferem electrões para o grupo heme, localizado no domínio oxigenase, onde também se ligam o BH₄ (tetrahydrobiopterina) e o substrato L-arginina.⁴⁰

A desregulação da biosíntese de NO *in vivo* está associada a diferentes patologias. A excessiva produção de NO ao nível do sistema nervoso central pode provocar graves lesões neuronais e doenças neurodegenerativas.⁴¹ Concentrações elevadas de NO ao nível das células endoteliais podem ser observadas em situações de choque séptico. Por outro lado, a sub-produção de NO pelo endotélio vascular está relacionada, entre outros, com lesões que ocorrem após reperfusão de órgãos isquémicos e com fenómenos de hipertensão.⁴²

Na biologia tumoral, os efeitos do NO são complexos e ambíguos, por um lado favorecendo a angiogénese, crescimento e invasão tumoral, e por outro exercendo uma acção citotóxica que poderá conduzir à apoptose das células tumorais e consequentemente a uma regressão do tumor.⁴³

³⁹ Kerwin, J. F., Lancaster, J. R., Nitric oxide: A new paradigm for second messengers, *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 4343; Kotsonis, P., Matter, H., *Biology and chemistry of the inhibition of nitric oxide synthases by pteridines-derivatives as therapeutic agents*, *Med. Res. Rev.*, **2004**, 24, 662.

⁴⁰ a) Montellano, P., Nishida, C., Rodriguez-Crespo, I., Gerber, N., *Nitric Oxide Synthase Structure and Electron Transfer*, *Drug Metabolism And Disposition*, **1998**, 12, 1185; b) Kwon, N.S., Nathan, C.F., Stuehr, D.J., *Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages* *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 20496; c) Heinzel, B., John, M., Klatt, P., Bohme, E., Mayer, B., *Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase*, *Biochem. J.*, **1992**, 281, 627.

⁴¹ Dawson, V. L., Dawson T. M., *Nitric oxide neurotoxicity*, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **1996**, 10, 179.

⁴² Mombouli, J. V., Paul, M., *Endothelial dysfunction: From physiology to therapy*, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **1999**, 31, 61; b) Harrison, D. G., *Cellular and Molecular Mechanisms of Endothelial Cell Dysfunction*, *J. Clin. Invest.*, **1997**, 100, 2153.

⁴³ a) Fukumura, D., Kashiwagi, S., Jain, R., *The role of nitric oxide in tumour progression*, *Nature*, **2006**, 6, 521; b) Lala, P., *Significance of nitric oxide in carcinogenesis, tumor progression and cancer therapy*,

Apesar de vários estudos recentes terem demonstrado a expressão e a actividade das três isoformas do NOS em tumores humanos de diferentes tipos, o iNOS é a isoforma mais frequentemente sobre-expressa em tumores, nomeadamente nos cancros da mama, próstata, bexiga e cólon.⁴⁴

1.3.2. Substratos e inibidores da NOS.

Tal como referido anteriormente, existem estados patológicos que estão relacionados com a sub- ou sobre-expressão de uma ou mais isoformas do enzima NOS e, consequentemente, com baixas e elevadas concentrações locais de NO, respectivamente. Assim, a abordagem terapêutica a adoptar é diferente em cada uma dessas situações. Enquanto no caso da sub-produção de NO se utilizam compostos químicos doadores de NO *in vivo* (ex. nitritos e nitratos orgânicos, N-Nitrosaminas, N-hidroxiguanidinas, etc), no caso de uma sobre-produção localizada de NO utilizam-se preferencialmente inibidores selectivos para as diferentes isoformas do enzima.⁴⁵

A síntese e avaliação biológica de novos inibidores selectivos para cada uma das isoformas do NOS constitui actualmente um campo de intensa pesquisa. De referir que a maior parte das moléculas desenvolvidos até ao momento são análogos estruturais da L-arginina que actuam como inibidores reversíveis do NOS.⁴⁵

Até ao momento, o composto que revelou maior capacidade de inibição do enzima foi o N^ω-nitro-L-arginina. Contudo, este análogo revelou-se pouco selectivo para as diferentes isoformas (IC₅₀: 0,52 µM [nNOS], 7,6 µM [iNOS], 0,50 µM [eNOS]).

Canc. Metastasis Rev. **1998**, 17, 1; c) Cooke, J. P., Losordo, D. W., *Nitric oxide and angiogenesis*, Circulation, **2002**, 105, 2133; d) Alexandrova, R., Mileva, M., Zvetkova, E., Nitric oxide and cancer, Exp. Pathol. And Parasitol, **2001**, 4, 13.

⁴⁴ a) Vakkala, M., Kahlos, K., Lakari, Essi., Paakko, P., Kinnula, V., Soini, Y., *Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas*, Clinical Cancer Research, **2000**, 6, 2408; b) Crowell, J., Steele, V. E., Sigman, C. C., Fay, J., *Is inducible nitric oxide synthase a target for chemoprevention?*, Molecular Cancer Therapeutics, **2003**, 2, 815; c) Lechner, M., Lirk, P., Rieder, J., *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumour biology: the two sides of the same coin*, Sem. Cancer Biol., **2005**, 15, 277.

⁴⁵ a) Wang, P. G., Xian, M., Tang, X., Wu, X., Wen, Z., Gai, T., Janczuk, A., *Oxide donors: chemical activities and biological applications*, Chem. Rev., **2002**, 102, 1091; b) Salerno, L., Sorrenti, L., Giacomo, C., Romeo, G., Siracusa, M. A., *Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors*, Curr. Pharm. Des., **2002**, 8, 177; c) Moore, W., Webber, R. K., Fok, K. F., Jerome, G. M., Kornmeier, C. M., Tjoeng, F. S., Currie, M. G., *Inhibitors of human nitric oxide synthase isoforms with the carbamidine moiety as a common structural element*, Bioorg. Med. Chem., **1996**, 4, 1559.

A N^ω-propil-L-arginina é o análogo da L-Arginina conhecido com a maior selectividade para uma das isoformas (IC₅₀: 0,057 μM [nNOS], 180 μM [iNOS], 8,5 μM [eNOS]), apresentando uma selectividade 3000 vezes superior para o nNOS do que para iNOS.⁴⁵

46

Mais recentemente, foram descritos diferentes dipéptidos inibidores do NOS, dos quais se destaca o N^ω-nitro-L-arginina-L-Dbu-NH₂ (Dbu = ácido diaminobutírico) que apesar de na generalidade apresentar menor capacidade de inibição do enzima que a N^G-nitro-L-arginina, apresenta elevada selectividade para o nNOS (IC₅₀: 0,13 μM [nNOS], 25 μM [iNOS], 200 μM [eNOS]).⁴⁷

O composto N-(3-[aminometil]benzil)acetamidina (1400W) é o inibidor não derivado da L-arginina mais selectivo para o iNOS, sendo 7000 vezes mais selectivo para o iNOS do que para o eNOS (K_i: 2 μM [nNOS], 7 nM [iNOS], 50 μM [eNOS]). Este composto permitiu, em modelos animais, reduzir significativamente o crescimento de um adenocarcinoma mamário e do cólon com sobreexpressão elevada de iNOS.⁴⁸

1.3.3. Compostos radioactivos para alveijamento *in vivo* do NOS .

A visualização da actividade enzimática ao nível do sistema nervoso central ou dos órgãos periféricos usando técnicas nucleares de imagem (PET e SPECT) poderá ser útil não só para fins de diagnóstico, como também para a monitorização dos efeitos terapêuticos de fármacos conhecidos ou em desenvolvimento. A detecção dos sistemas enzimáticos *in vivo* com sondas radioactivas baseadas em substratos ou inibidores está dependente, não só da sua internalização selectiva ao nível das células alvo, como também da sua elevada afinidade para o enzima. A maior parte dos esforços de investigação têm sido dirigidos no sentido do desenvolvimento de sondas radioactivas contendo emissores β⁺ e inibidores ou substratos de diferentes enzimas

⁴⁶ Henry, Q. Z., Fast, W., Marletta, M. A., Martásek, P., Silverman, R. B., Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N^ω-Propyl-L-Arginine, *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 3869.

⁴⁷ Silverman, R. B., Roman, L. J., Martásek, P., Huang, H., *Synthesis and evaluation of peptidomimetics as selective inhibitors and active site probes of nitric oxide synthases*, *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 2938.

⁴⁸ Thomsen, L. L., Scott, J. M. J., Topley, P., Knowles, R., Keerie, A. J., Friend A. J., *Selective Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibits Tumor Growth in Vivo: Studies with 1400W, a Novel Inhibitor*, *Cancer Res*, **1997**, 57, 3300.

com vista à sua detecção/visualização *in vivo* pela técnica de PET (ex. acetilcolinesterase cerebral, ciclooxigenase e dopamina descarboxilase).⁴⁹

A visualização da expressão do NOS *in vivo* por uma técnica de imagiologia não invasiva, nomeadamente por PET ou SPECT, poderia ser particularmente útil no diagnóstico e terapia de certos estados patológicos associados a desregulação da biosíntese do NO. Assim, torna-se necessário sintetizar e caracterizar sondas radioactivas contendo radionuclídeos emissores γ (^{99m}Tc e ^{125}I) ou β^+ (^{11}C e ^{18}F) e inibidores ou substratos do NOS.

O composto radioactivo N^ω-nitro-L-arginina [^{11}C]metil éster revelou-se ineficaz na detecção do NOS devido à sua elevada instabilidade *in vivo*.⁵⁰ As tiofenoamidinas e o bissulfato de difenil-iodónio marcados com ^{11}C e ^{125}I , respectivamente, revelaram um baixo grau de especificidade *in vivo*. Até ao momento, os compostos S-[^{11}C]metil-isotioureia e S-(2-[^{18}F]fluoroetil)isotioureia, inibidores selectivos do iNOS, foram os únicos compostos que se revelaram promissores na detecção/visualização do iNOS num modelo de rato pré-tratado com LPS.⁵¹

Mais recentemente, o grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do Instituto Tecnológico e Nuclear introduziu uma família de bioconjugados contendo a unidade quelante pirazolo-diamina e análogos da L-arginina (substratos e inibidores do NOS).⁵²

Por reacção destes conjugados com a unidade organometálica *fac*-[M(CO)₃]⁺ (M = Re, ^{99m}Tc) obtiveram-se os complexos bioorganometálicos do tipo *fac*-[M(CO)₃(k³-L)] com bom rendimento. Após análise dos parâmetros cinéticos do iNOS (origem murina)

⁴⁹ a) Fowler, J. S., In *Radiopharmaceuticals: Chemistry and Pharmacology*, ed. A. D. Nunn, Marcel Dekker Inc, New York, **1992**, 267; (b) Kikuchi, T., Okamura, T., Fukushi, K., Takahashi, K., Toyohara, J., Okada, M., Zhang, M. R., Irie, T., Curr. Top. Med. Chem., **2007**, 7, 1790.

⁵⁰ Roeda, D., Crouzel, C., Brouillet E., Valette, H., *Synthesis and in vivo distribution of no-carrier-added N(ω)-Nitro-L-Arginine[^{11}C] Methyl Ester, a nitric oxide synthase inhibitor*, Nucl. Med. Biol., **1996**, 23, 509-512.

⁵¹ Zhang, J., McCarthy, T. J., Moore, W. M., Currie M. G., Welch, M. J., *Synthesis and evolution of two positron-labeled nitric oxide synthase inhibitors, S-[^{11}C]Methylisothiurea and S-(2-[^{18}F]Fluoroethyl)isothiurea, as potential positron emission tomography tracers* J. Med. Chem., **1996**, 39, 5110-5118).

⁵² Oliveira, B. L., Correia, J. D. G., Raposinho, P. D., Santos, I., Ferreira, A., Cordeiro, C., Freire, A. P., *Re and ^{99m}Tc organometallic complexes containing pendant L-arginine derivatives as potential probes of inducible nitric oxide synthase*, Dalton Trans., **2008**, DOI: 10.1039/b805986a.

na presença dos bioconjugados e dos complexos organometálicos de rénio conclui-se que a ligação dos derivados da L-arginina ao agente quelante bifuncional, e a posterior coordenação dos conjugados à unidade $fac-[Re(CO)_3]^+$, resulta numa diminuição da afinidade para o enzima. No entanto, a afinidade dos conjugados contendo inibidores do iNOS parece ser menos afectada pela coordenação ao metal do que a afinidade dos conjugados contendo substratos. De facto, foi até possível observar uma maior afinidade para o iNOS no caso do complexo **ReA** ($K_i = 84 \mu M$), quando comparado com o correspondente bioconjugado ($K_i = 178 \mu M$) não coordenado (**Figura 1.3.3.1**).

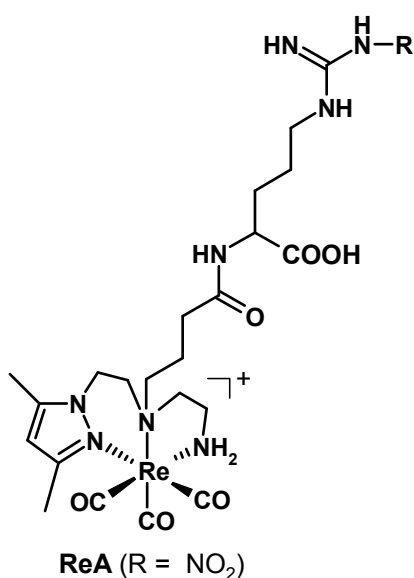


Figura 1.3.3.1 - Complexo organometálico **ReA** inibidor do iNOS.

Nos bioconjugados aqui descritos, a ligação do agente quelante bifuncional aos análogos da L-arginina é feita através de uma ligação amida entre o grupo ácido carboxílico do agente quelante e o grupo amina do aminoácido.

1.4. Objectivo do trabalho.

Na sequência do trabalho já desenvolvido no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do ITN, pretendeu-se fazer uma avaliação preliminar dos factores estruturais que poderiam potencialmente afectar a afinidade dos complexos organometálicos do tipo $fac-[M(CO)_3L]$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$; $L =$ análogo da L-arginina) para o óxido nítrico sintase induzido (iNOS). Assim, estudou-se a influência da natureza do grupo funcional do aminoácido (L-arginina e L-nitro^w-L-arginina) envolvido na ligação à unidade quelante e da distância entre esta unidade e o aminoácido. Desta forma, será possível começar a desenhar uma relação estrutura-actividade que contribuirá para o desenvolvimento de novos complexos contendo a unidade $fac-[{}^{99m}Tc(CO)_3]^+$ e análogos da L-arginina, potencialmente úteis para a avaliação da expressão *in vivo* do NOS.

Para se alcançar o objectivo proposto, o trabalho desenvolvido contemplou os seguintes passos:

- 1 - Síntese e caracterização de novos agentes quelantes bifuncionais (**LBF**) contendo a unidade pirazolo-diamina para estabilização do centro metálico $fac-[M(CO)_3]^+$ ($Re = {}^{99m}Tc, Re$) e um grupo amina livre para conjugação ao derivado aminoácido.
- 2 - Síntese e caracterização de bioconjugados do tipo **LBF-L-arginina** e **LBF-L-arginina-deriv.**
- 3 – Estudo das propriedades de coordenação dos agentes quelante bifuncionais **LBF** e dos bioconjugados face à unidade $fac-[M(CO)_3L]$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$).
- 4 – Determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS (origem murina) na presença dos bioconjugados e dos complexos organometálicos de rénio.
- 5 – Avaliação biológica em linhas celulares e em modelo animal dos complexos de Tc(I) preparados e caracterizados anteriormente.

s associados ao radionuclídeo, tais como o seu período de semi-desintegração ($t_{1/2}$), tipo/energia das partículas emitidas e respectivo custo/disponibilidade, como também a farmacocinética do radiofármaco e dimensão do tumor, entre outros.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 considerações gerais.

O Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do ITN descreveu recentemente os compostos **ReA** ($K_i = 84 \mu\text{M}$) e **ReB** ($K_i = 36 \mu\text{M}$), que constituem os primeiros exemplos conhecidos de complexos organometálicos de Re(I) capazes de inibir o iNOS (Figura 2.1.1.)⁵²

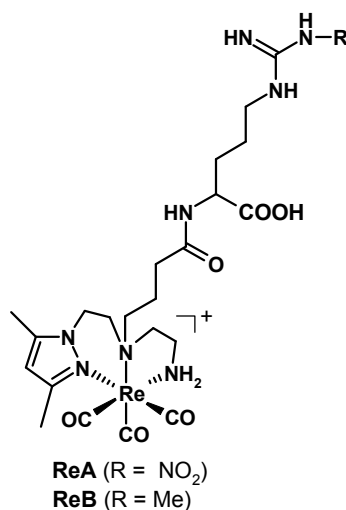


Figura 2.1.1 - Complexos **ReA** e **ReB** inibidores do iNOS.

Numa tentativa de se melhorar a afinidade deste tipo de complexos para o enzima estudado, tentando estabelecer-se uma relação estrutura-actividade, introduziram-se algumas alterações estruturais nos complexos já sintetizados mantendo-se a mesma unidade quelante pirazolo-diamina. As modificações introduzidas passaram por aumentar o tamanho da cadeia alquila que separa a unidade quelante do análogo da L-arginina e utilizar o grupo α -COOH do amino ácido para conjugação à unidade quelante.

Assim, no capítulo 2 são descritas as tarefas executadas de modo a alcançar o objectivo inicialmente proposto. Na secção 2.2 descreve-se a síntese e caracterização química dos novos agentes quelantes bifuncionais **L1** e **L2** contendo a unidade quelante pirazolo-diamina e um grupo amina livre para conjugação aos análogos da L-

arginina. Na secção 2.3 apresenta-se a síntese e a caracterização dos novos conjugados obtidos por reacção de **L1** e **L2** com L-arginina. (substrato do iNOS) e N^ω-nitro-L-arginina (inibidor do iNOS). Nas secções 2.4 e 2.5 descrevem-se as reacções dos precursores *fac*-[Re(CO)₃Br₃]₂⁻ e *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ com **L1/L2** e conjugados sintetizados, bem como a respectiva caracterização química (Re) e radioquímica (^{99m}Tc) dos complexos resultantes. Na secção 2.6 avaliou-se a cinética do iNOS (origem murina) na presença dos compostos anteriormente sintetizados.

2.2 Síntese e caracterização dos ligandos bifuncionais **L1** e **L2**.

Os compostos **L1** e **L2** contendo a unidade quelante tridentada pirazolo-diamina e uma cadeia alquílica de tamanho variável com um grupo amina livre foram sintetizados de acordo com o esquema reaccional apresentado na **Figura 2.2.1**.

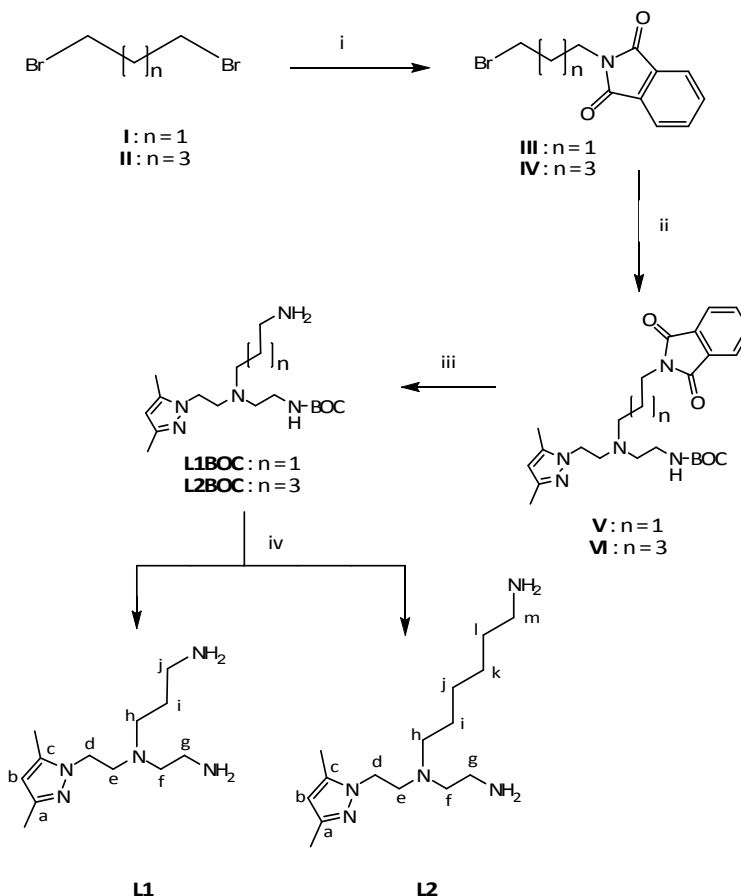


Figura 2.2.1: Síntese dos ligandos **L1** e **L2**; i: I/II, ftalimida de potássio, K₂CO₃, ACN, refluxo, 6h; ii: III/IV, *tert*-butil (2-[(2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)-amino]etil)carbamato, K₂CO₃, dioxano, refluxo, 12h; iii: V/VI, NH₂NH₂·H₂O, MeOH, refluxo, 6h; iv: CH₂Cl₂/TFA (1:1), t.a., 3h.

O grupo amina terminal permitirá a ligação a diferentes biomoléculas contendo ácidos carboxílicos livres, nomeadamente a aminoácidos, e a unidade quelante pirazolo-diamina permitirá a estabilização da unidade organometálica *fac*-[M(CO)₃]⁺ (M = Re ou ^{99m}Tc).

O primeiro passo sintético envolveu a preparação dos intermediários **III** e **IV** por reacção do 1,3-dibromopropano ou 1,6-dibromohexano com a bromoftalimida de potássio em acetonitrilo (ACN) sob refluxo, respectivamente. O intermediário **III** foi obtido sob a forma de um sólido branco por precipitação com metanol a -20 °C. Nas mesmas condições, o intermediário **IV** precipitou juntamente com o precursor de partida 1,6-dibromohexano ainda por reagir na mistura reaccional. Por esta razão, optou-se por purificar este intermediário por coluna de sílica gel.

A alquilação do composto *tert*-butil (2-([2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil]-amino)etil)carbamato com os intermediários **III** e **IV** nas condições reaccionais descritas na **Figura 2.2.1** conduziram à obtenção dos intermediários **V** e **VI**, respectivamente.

Após purificação, os compostos **V** e **VI** fizeram-se reagir com hidrazina monohidratada para desprotecção do grupo ftalimida, obtendo-se os intermediários **L1BOC** e **L2BOC** com grupos amina terminal livres. A desprotecção do grupo Boc com uma mistura ácido trifluoracético e diclorometano, (TFA/CH₂Cl₂ ; 1:1) à temperatura ambiente levou à obtenção dos compostos **L1** e **L2**. A evaporação do solvente das misturas reaccionais originou resíduos secos que foram extraídos com metanol. Após evaporação da solução metanólica, os óleos viscosos obtidos foram dissolvidos em H₂O e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC; **Método 1, Condições B**). Os compostos **L1** e **L2**, solúveis em solventes próticos (H₂O e CH₃OH) foram obtidos na forma de óleos viscosos transparentes com purezas químicas superiores a 95%.

A caracterização estrutural dos intermediários **III – VI**, **L1BOC**, **L2BOC**, **L1** e **L2** foi efectuada com sucesso, tendo-se baseado fundamentalmente na espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C. A título de exemplo, apresentam-se os espectros de ¹H-RMN (D₂O) de **L1** e **L2** na **Figura 2.2.2** e **Figura 2.2.3**, respectivamente.

O espectro de ^1H -RMN do ligando **L1** revelou a presença de um singuleto a δ 5,83 correspondente ao $\text{H}(4)\text{pz}$ e de dois singuletos a δ 2,11 e δ 2,01, integrando cada um deles para três prótons, relativos aos dois grupos metilo (CH_3pz) do anel pirazolo. Os sinais dos prótons alifáticos da unidade quelante pirazolo-diamina surgem como multipletos a δ 3,96 (H^d), 2,85 (H^e) e 2,76 (H^f e H^g). As ressonâncias dos prótons da cadeia espaçadora lateral surgem como dois quartetos e um quintuplo a δ 2,66 (H^h), δ 2,51 (H^j) e δ 1,61 (H^i), respectivamente.

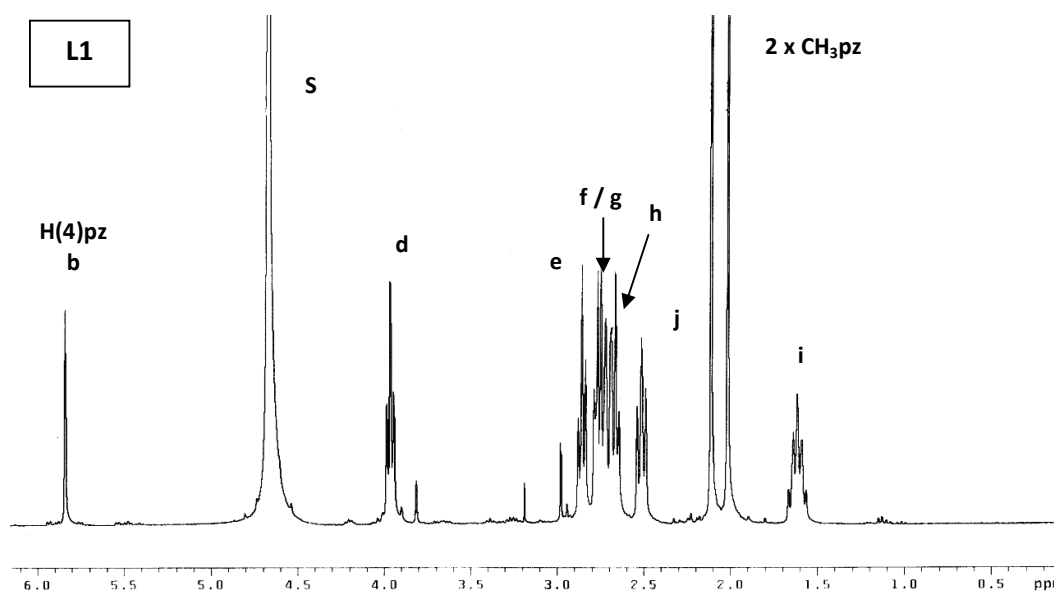


Figura 2.2.2: Espectro de ^1H -RMN do ligando **L1** (D_2O).

Os desvios químicos e multiplicidades dos sinais correspondentes aos prótons da unidade quelante pirazolo-diamina no espectro de ^1H -RMN de **L2** (**Figura 2.2.3**) são semelhantes aos do espectro do composto **L2**. Uma vez que a cadeia espaçadora possui mais carbonos, seria de prever que os sinais dos prótons correspondente a este acréscimo de carbonos surgissem a campo mais alto. É o caso dos sinais correspondentes aos prótons H^i e H^l que aparecem sob a forma de um multipletto a δ 1,52 e dos prótons H^j e H^k que aparecem sob a forma de um multipletto a δ 1,23.

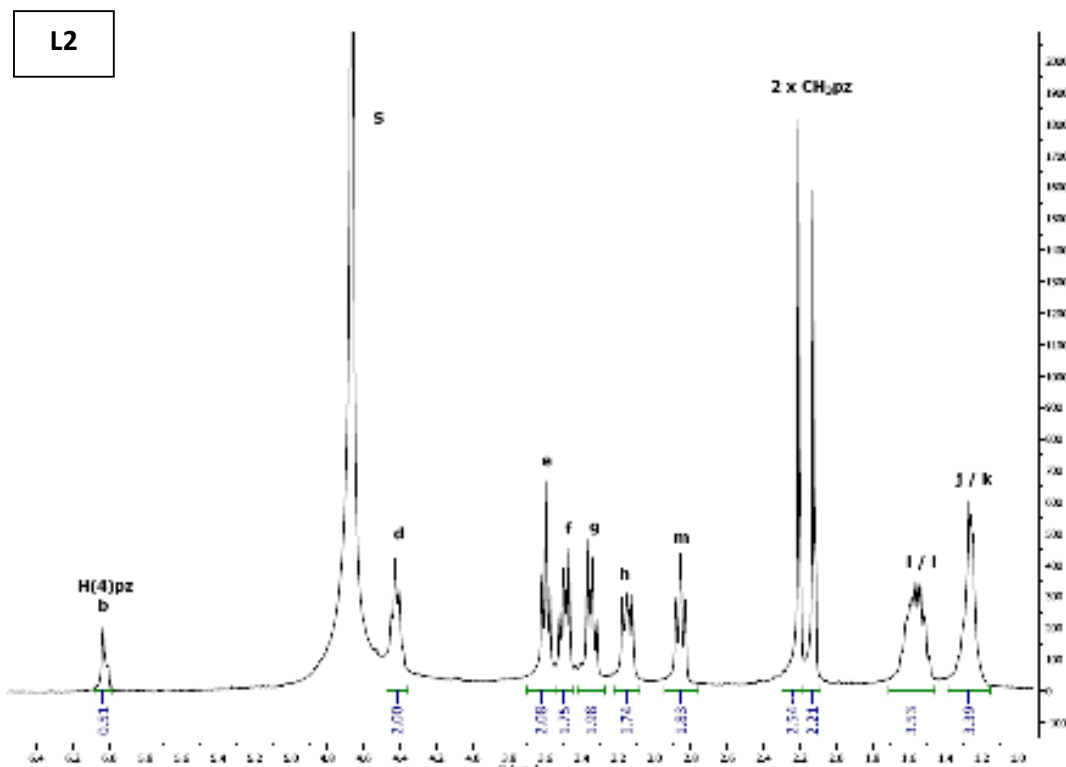


Figura 2.2.3: Espectro de ^1H -RMN do ligando **L2** (D_2O).

Tal como no caso dos espectros de ^1H -RMN, também os espectros de ^{13}C -RMN dos compostos **L1** e **L2** são muito semelhantes. Assim, a título de exemplo apresenta-se na **Figura 2.2.4** o espectro de ^{13}C -RMN do composto **L1** com as respectivas atribuições de sinais. Tal como esperado, os sinais correspondentes aos carbonos do anel pirazolo surgem a campo baixo a δ 151,2 (C^c), 144,1 (C^a) e 107,9 (C^b C(4)pz) e a campo alto a δ 14,4 e δ 12,5 (2 x CH_3Pz). A campo alto podem ainda identificar-se os picos correspondentes aos carbonos metilénicos alifáticos da molécula a 54,5 (C^e), 52,8 (C^f), 52,5 (C^d) 47,9 (C^h), 39,9 (C^j), 39,28 (C^g) e 26,2 (C^i).

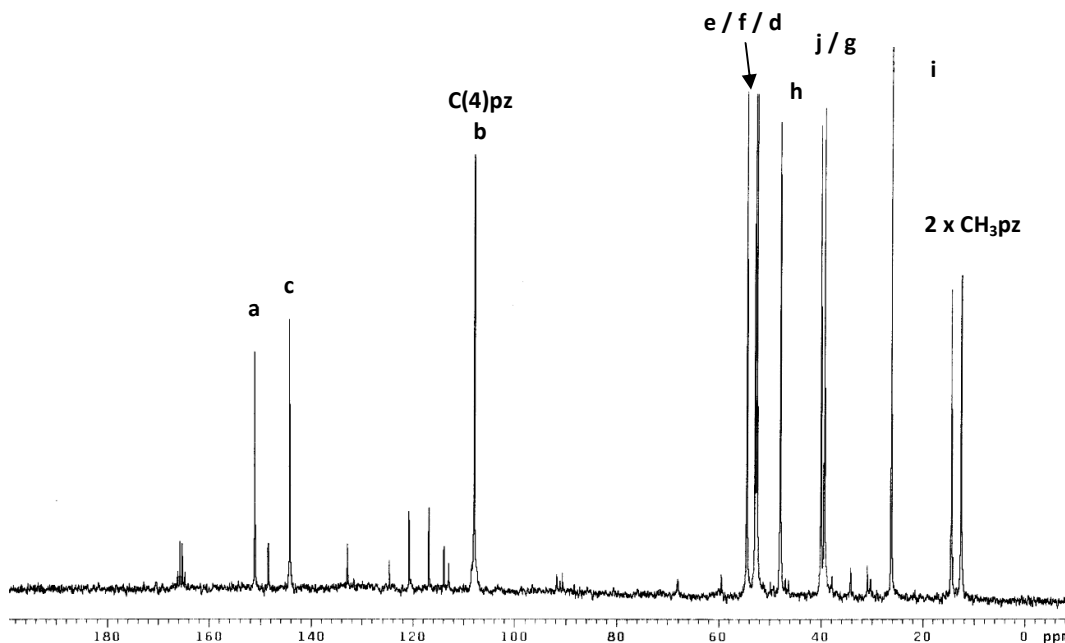


Figura 2.2.4: Espectro de ^{13}C -RMN do compostos **L1**.

Os compostos **L1** e **L2** foram ainda caracterizados por espectrometria de massa por ionização por electrospray (ESI-MS). Na **Figura 2.2.5** apresenta-se o espectro de massa obtido em modo positivo para o composto **L2**. O espectro apresenta um pico maioritário a $m/z = 292,1$ com carga +1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), correspondente ao ião molecular para este composto.

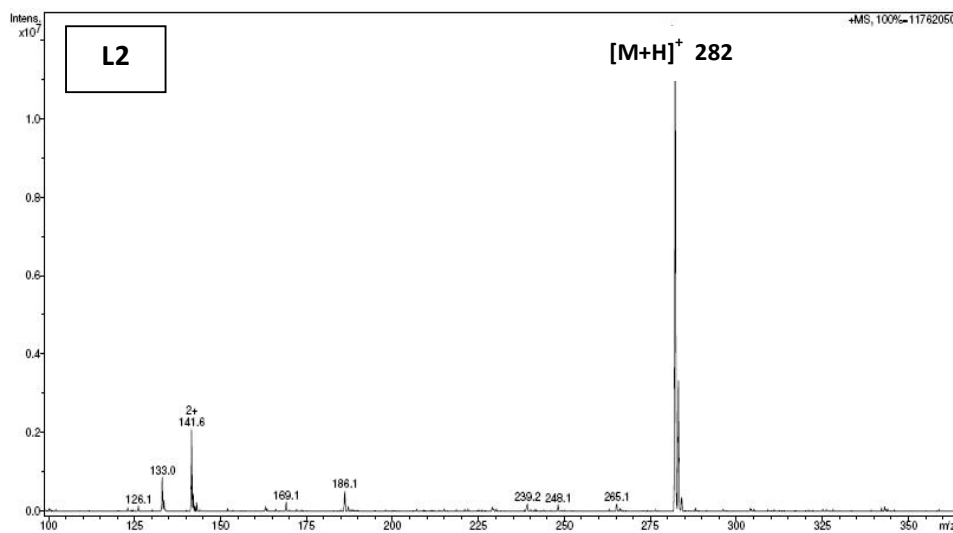


Figura 2.2.5: Espectro de massa no modo positivo do composto **L2** obtido através de ionização por electrospray.

2.3 Síntese e caracterização dos conjugados C1 - C4.

Nesta secção descrevem-se as reacções de protecção dos aminoácidos L-arginina e N^ω-nitro-L-arginina com o grupo BOC e a caracterização sumária dos respectivos derivados protegidos. Descreve-se ainda a síntese e a caracterização dos conjugados bioactivos contendo um substrato (L-arginina) ou um inibidor (N^ω-nitro-L-arginina) do NOS.

2.3.1. Síntese e caracterização dos aminoácidos protegidos BOC-N^ω-nitro-L-arginina e BOC-L-arginina.

Os aminoácidos protegidos **BOC-L-arginina** e **BOC-N^ω-nitro-L-arginina** foram preparados tal como descrito na **Figura 2.3.1.1**, utilizando-se um método já publicado na literatura.⁵³

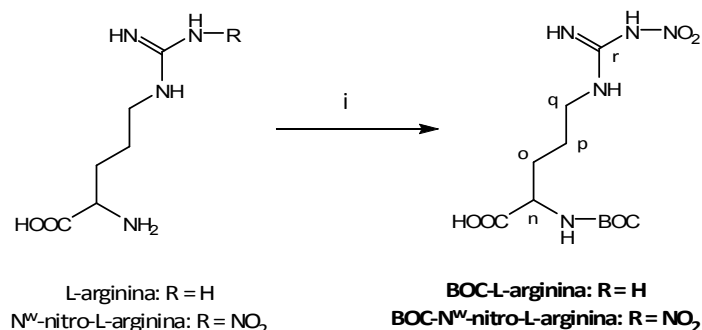


Figura 2.3.1.1: Síntese dos aminoácidos **BOC-L-arginina** e **BOC-N^ω-nitro-L-arginina**; i: L-arginina/N^ω-nitro-L-arginina, (BOC₂)O, dioxano/(NaOH 1M), t.a., 5h.

Por reacção dos aminoácidos L-arginina e N^ω-nitro-L-arginina com o di-*tert*-butil dicarbonato numa solução de (NaOH 1M)/Dioxano (1:1) foi possível obter os respectivos aminoácidos protegidos com BOC. Os compostos obtidos foram purificados por sucessivas lavagens com solventes orgânicos

Os espectros de ^1H -RMN dos aminoácidos protegidos são apresentados na **Figura 2.3.1.1**. A atribuição de sinais foi efectuada por comparação com os espectros dos respectivos aminoácidos não protegidos.

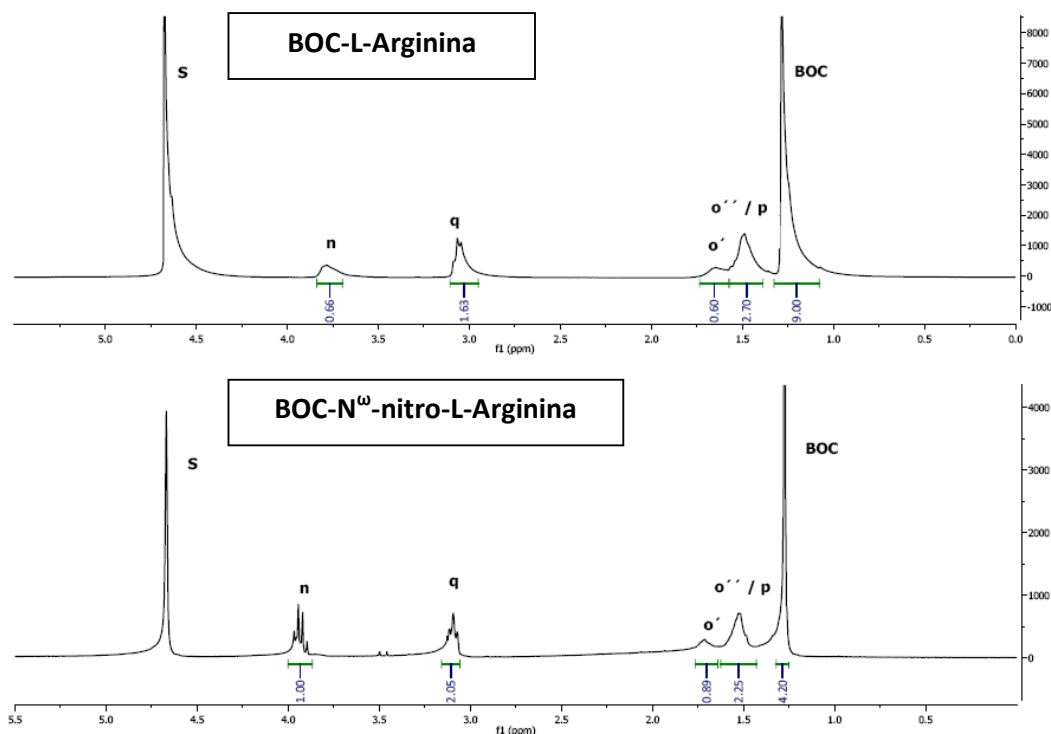


Figura 2.3.1.1: Espectros de ^1H -RMN aminoácidos **BOC-L-arginina** e **BOC-N $^{\omega}$ -nitro-L-arginina** (D_2O).

O espectro de ^1H -RMN da **BOC-L-arginina** revelou a presença de um multipeto largo a δ 3,79 atribuído ao sinal do protão H^{n} . O sinal dos protões H^{q} adjacentes ao grupo guanidina aparece como um multipeto a δ 3,06. A presença de um centro quiral na molécula, faz com que os protões adjacentes H^{o} se tornem magneticamente não equivalentes, dando origem, cada um deles, a um sinal independente. Um desses sinais aparece como um multipeto largo a δ 1,60 ($\text{H}^{\text{o}'}$), enquanto o outro sinal ($\text{H}^{\text{o}''}$) se encontra sobreposto com o sinal dos protões H^{p} , originando um multipeto que integra para 3 protões. Os protões dos grupos CH_3 pertencentes ao grupo protector BOC aparecem como um singuleto a δ 1,28.

Apesar dos desvios químicos dos sinais do espectro de ^1H -RMN da **BOC-N^ω-nitro-L-arginina** serem semelhantes aos da **BOC-L-arginina**, os sinais dos prótons **Hⁿ** (δ 3,83) e **H^q** (δ 3,11) apresentam-se ligeiramente desviados para campo mais baixo devido à presença de um grupo NO_2 na unidade guanidina.

A **BOC-L-arginina** e a **BOC-N^ω-nitro-L-arginina** foram ainda caracterizados por espectroscopia de ^{13}C -RMN, observando-se todos os carbonos correspondentes às moléculas.

2.3.2. Síntese e caracterização dos conjugados C1 e C2.

A primeira tentativa de síntese do conjugado **C1** (**Figura 2.3.2.1**) envolveu a activação prévia *in situ* do ácido carboxílico da **BOC-L-arginina** com N-hidroxisuccinimida (NHS) na presença de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), seguida de reacção com **L1BOC** em CH_2Cl_2 .

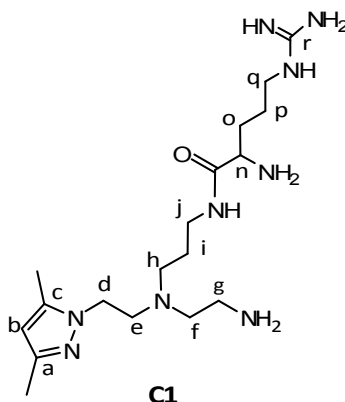


Figura 2.3.2.1: Conjugado **C1**.

No decorrer da reacção observa-se a formação de um sólido branco correspondente a N,N'-diciclohexilureia (DCU) que é depois eliminada por filtração no final da síntese (18h). Após hidrólise dos grupos protectores BOC com uma solução (TFA)/ CH_2Cl_2 (1:1), obteve-se uma mistura de compostos complexa que se tentou separar por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**, $\lambda = 220 \text{ nm}$) de modo a isolar-se o composto **C1**. A análise por ^1H -RMN das fracções recolhidas correspondentes aos picos mais intensos revelaram-se inconclusivas, não tendo sido possível identificar em nenhuma delas o composto pretendido.

Testaram-se ainda outras vias de síntese para a preparação do conjugado **C1**, utilizando-se outros agentes de activação do ácido carboxílico do aminoácido, nomeadamente misturas DCC ou EDC/HOBT e agentes mais reactivos como o HBTU. Os resultados obtidos após tentativa de separação por RP-HPLC das misturas complexas obtidas foram inconclusivos.

A síntese do conjugado **C1** e do composto análogo **C2** foi apenas possível utilizando-se o composto BOC-L-arginina- N^{ω} -(PBF) como precursor aminoácido (**Figura 2.3.2.2**). A utilização deste precursor confirmou que, possivelmente, a ausência de um grupo protector na posição N^{ω} do aminoácido possibilita reacções de polimerização entre os carboxilatos activados dos aminoácidos e os grupos amina das unidades guanidina em solução. Por esta razão, os produtos de reacção das vias sintéticas anteriormente descritas deveriam ser de natureza polimérica com número variado de monómeros.

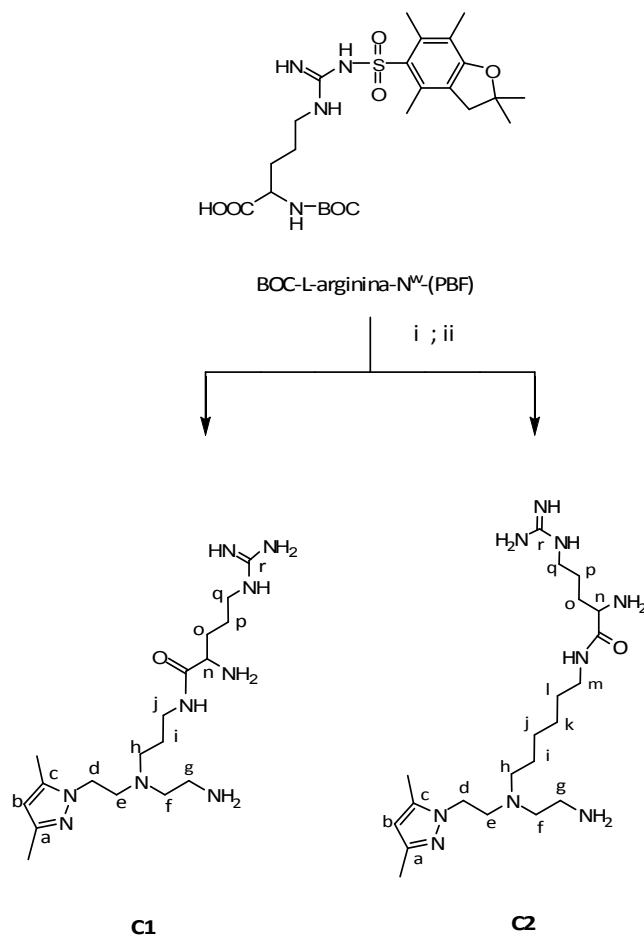


Figura 2.3.2.2: Síntese do composto **C1** e **C2**; i: a) BOC-L-arginina-N^ω-(PBF), DCC e HOBT em DMF, **L1BOC/L2BOC** em CH₂Cl₂, t.a., 18h; b) TFA/CH₂Cl₂ (1:1), t.a., 3h; ii: a) BOC-L-arginina-N^ω-(PBF), EDC e HOBT em DMF, **L1BOC/L2BOC** em CH₂Cl₂, t.a., 18h; b) TFA, CH₂Cl₂ (1:1), t.a., 3h.

Os conjugados **C1** e **C2** foram obtidos por reacção do aminoácido BOC-L-arginina-N^ω-(PBF) com DCC na presença de HOBT, seguido da adição dos compostos **L1BOC** ou **L2BOC**. Após 18 h de reacção à temperatura ambiente o solvente foi evaporado e o resíduo obtido lavado com acetato de etilo. O tratamento destes resíduos com uma mistura de TFA/CH₂Cl₂ (1:1), à temperatura ambiente, permitiu obter os compostos pretendidos com rendimentos moderados (**C1**: 66%; **C2**: 48%) após evaporação dos solventes e purificação por RP-HPLC semi-preparativo (**Método 1**, **Condições B**, λ = 220 nm). A análise dos compostos por RP-HPLC analítico (**Método 2**, **Condições A**, λ = 220 nm) revelou que a sua pureza era superior a 98% (**Figura 2.3.2.3**).

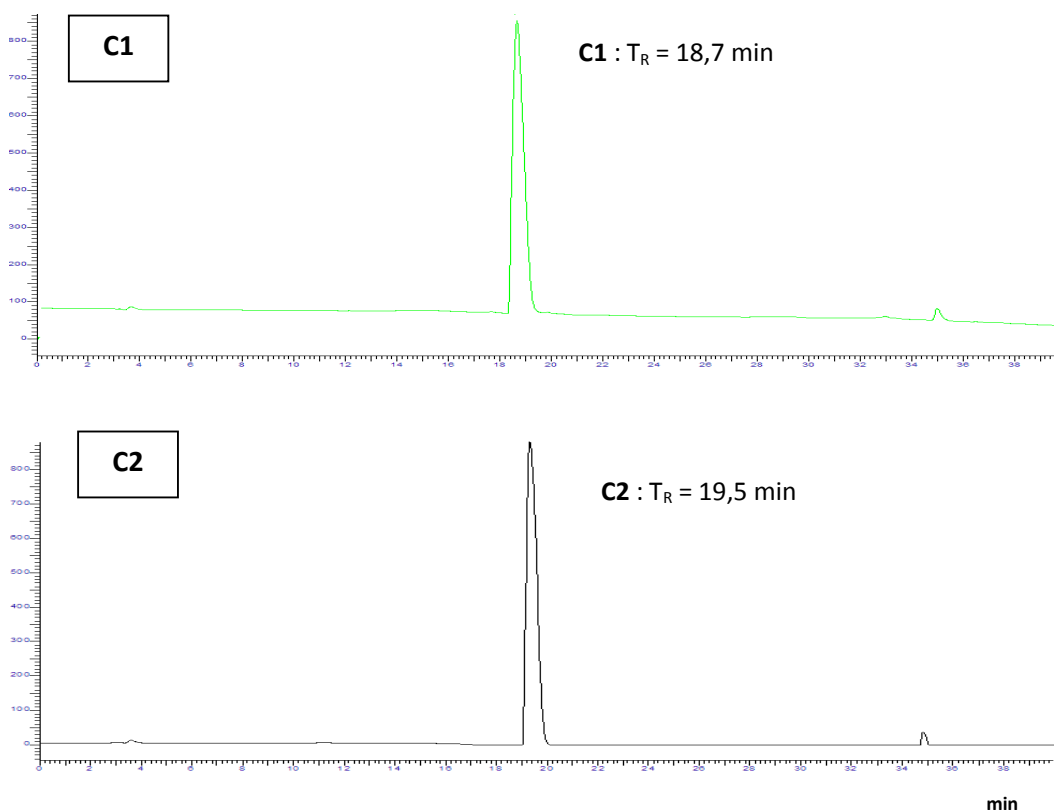


Figura 2.3.2.3: Cromatogramas analíticos dos conjugados **C1** e **C2** (Método 1, Condições A).

A caracterização estrutural dos conjugados **C1** e **C2** baseou-se na espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .

O espectro de ^1H -NMR (**Figura 2.3.2.4**) do conjugado **C1** apresenta três singletos característicos a δ 5,99, δ 2,19 e δ 2,10 atribuídos ao próton $\text{H}(4)\text{pz}$ (H^b) e aos grupos metilo 3 e 5 do anel pirazolo (CH_3pz), respectivamente. Observam-se ainda os sinais relativos aos prótons alifáticos correspondentes à unidade pirazolo-diamina a δ 4,37 (H^d), δ 3,49 (H^e), δ 3,39 (H^f) e 3,32 (H^g).

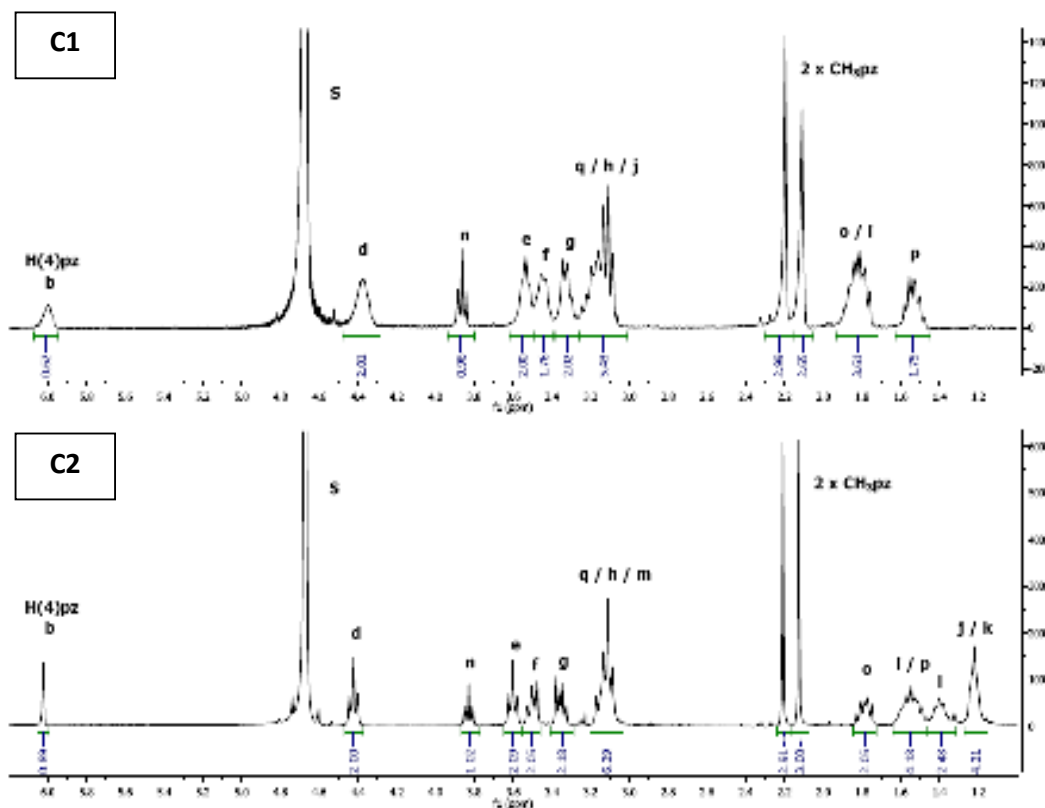


Figura 2.3.2.4: Espectros de ^1H -RMN dos conjugados **C1** e **C2**, respectivamente (D_2O).

Na unidade espaçadora, os sinais correspondentes aos prótons adjacentes à ligação amida encontram-se desviados para campo mais baixo (H^i : δ 1,81 e H^j δ 3,24–3,06) relativamente aos sinais dos mesmos prótons no espectro ^1H -RMN de **L1** (H^i : δ 1,61 e H^j : δ 2,51).

O tripleto a δ 3,86 (1H), correspondente ao próton α (H^n) do aminoácido L-arginina, encontra-se desviado para campo ligeiramente mais baixo relativamente ao mesmo sinal no espectro de ^1H -RMN da L-arginina (δ 3,80). De realçar ainda que os sinais dos prótons metilénicos H^o , H^p e H^q surgem sob a forma de multipletos a δ 1,81, δ 1,53 e δ 3,24 – 3,06, respectivamente.

A análise do espectro de ^1H -RMN (**Figura 2.3.2.4**) do conjugado **C2** permite concluir que os desvios químicos dos sinais correspondentes aos prótons da unidade quelante pirazolo-diamina e da L-arginina aparecem em zonas semelhantes aos do conjugado **C2**. A principal diferença do espectro de ^1H -RMN deste conjugado,

comparativamente a **C1**, está relacionada com o acréscimo de carbonos da cadeia espaçadora, que leva a um aumento do número de sinais de prótons alifáticos no espectro. Estes prótons encontram-se sob a forma de multipletos a δ 1,42-1,32 (**H^l**, 2H) e a δ 1,22 (**H^j** e **H^k**, 4H).

O espectro de ^{13}C -NMR do conjugado **C1** (Figura 2.3.2.5) apresenta a campo alto 12 sinais a valores de desvios químicos que variam entre δ 52,9 e δ 10,1, referentes aos carbonos CH_2 e CH_3 da molécula.

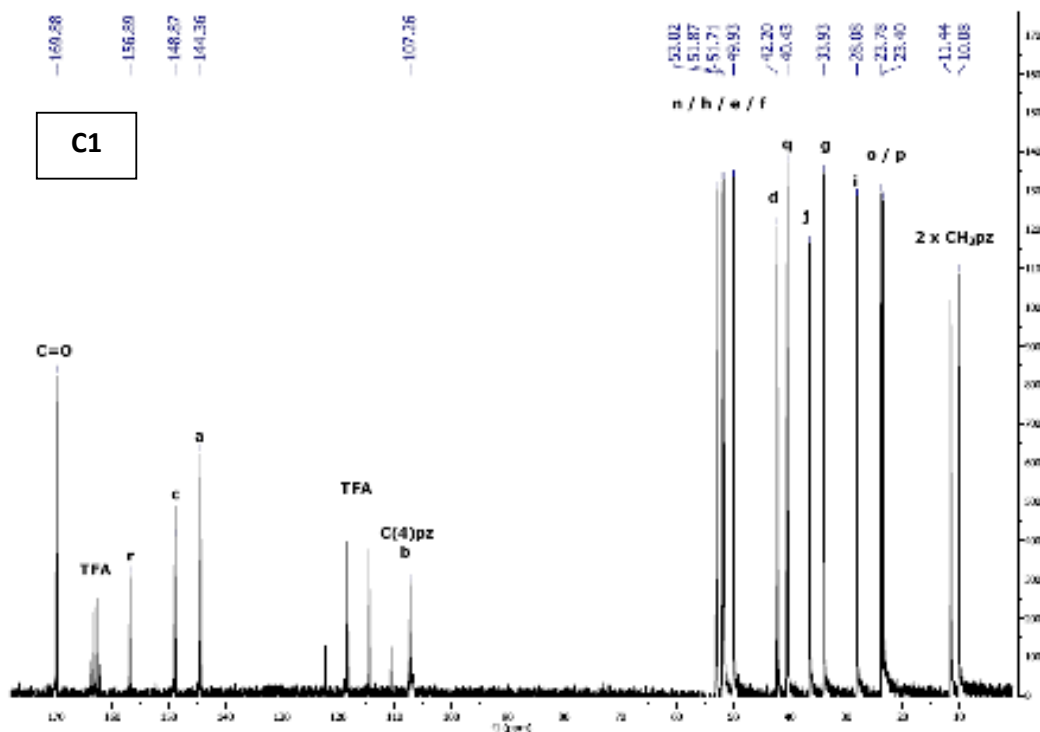


Figura 2.3.2.5: Espectro de ^{13}C -RMN do conjugado **C1** (D_2O).

Os sinais correspondentes à unidade pirazolo-diamina encontram-se a δ 33,9 (**C^g**), 42,2 (**C^d**), 49,9 (**C^f**) e 51,7 (**C^e**). Nesta zona encontram-se ainda os sinais correspondentes aos prótons alifáticos da L-arginina a δ 52,9 (**Cⁿ**), δ 40,4 (**C^q**) e δ 23,8 (**C^o**).

A campo baixo encontram-se os sinais correspondentes aos carbonos do anel pirazolo (**C^c**: δ 148,9; **C^a**: δ 144,4; **C^b**: δ 107,3) e ao grupo carbonilo da amida (**C=O**: δ 169.9). De referir ainda a presença de um sinal a δ 156,9 atribuído ao carbono do grupo guanidina (**C^r**). No espectro é ainda possível observar a presença de dois

quartetos a δ 116,4 e a δ 163,1 correspondentes aos aniões trifluoacetato em contra-íão.

Os desvios químicos observados no espectro de ^{13}C -RMN do conjugado **C2** (**Figura 2.3.2.6**) são semelhantes aos do espectro de ^{13}C -RMN do conjugado **C1**. Tal como seria de esperar é ainda possível observar os sinais correspondentes aos carbonos **C^k** (δ 23,7), **C^l** (δ 28,0) e **C^m** (δ 40,3), resultantes do aumento da cadeia alquílica.

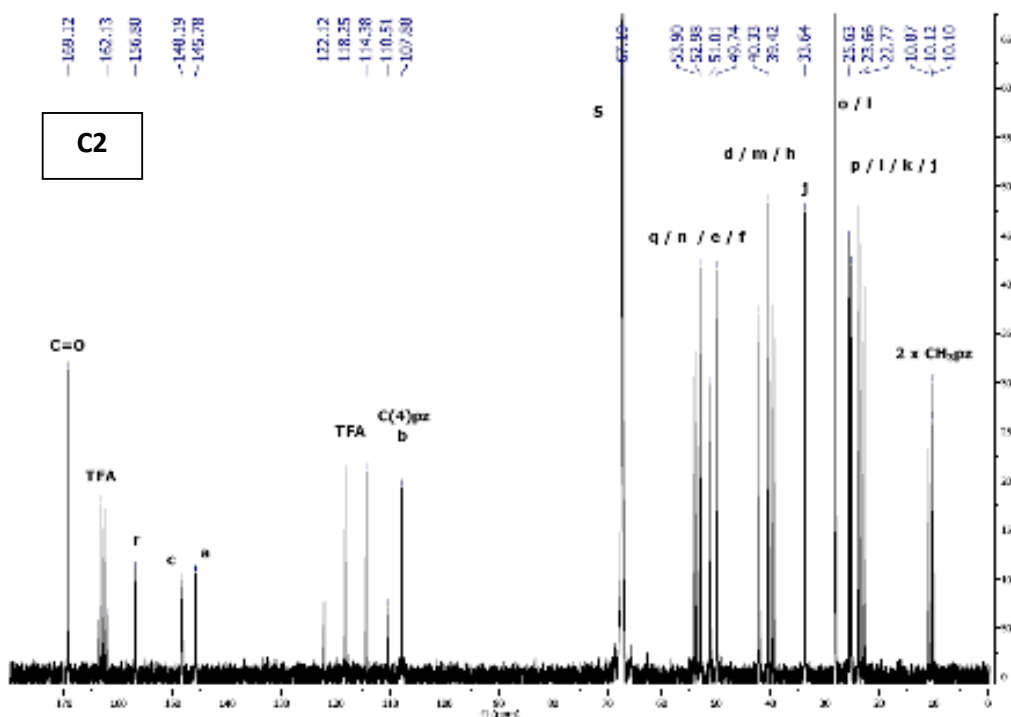


Figura 2.3.2.6: Espectro de ^{13}C -RMN do conjugado **C2** (D_2O).

A atribuição inequívoca de todos os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C dos conjugados **C1** e **C2**, em particular os do conjugado **C2**, foi efectuada através de experiências bidimensionais de ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HSQC. Esta última técnica foi particularmente útil na identificação dos sinais correspondentes aos carbonos **C^o** e **C^l** no conjugado **C2** que aparecem como um único sinal sobreposto a δ 28,0. Na **Figura 2.3.2.7** apresenta-se o espectro ^1H - ^{13}C HSQC bem como as respectivas correlações observadas.

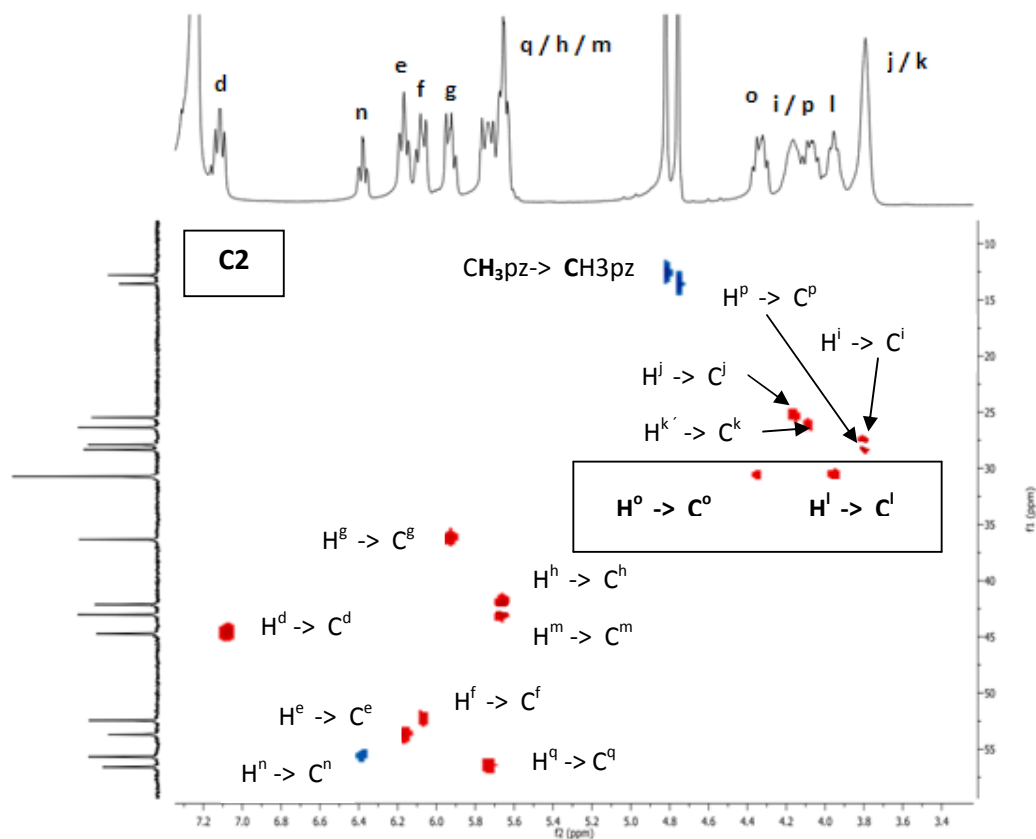


Figura 2.3.2.7: Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do conjugado **C2** e respectiva atribuições dos sinais (D_2O).

Os compostos **C1** e **C2** foram também caracterizados por ESI-MS. Na **Figura 2.2.8** apresenta-se o espectro de massa obtido em modo positivo para o composto **C2**. O espectro apresenta um pico maioritário a $m/z = 220$ com carga +2 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$), correspondente ao íon molecular para este composto.

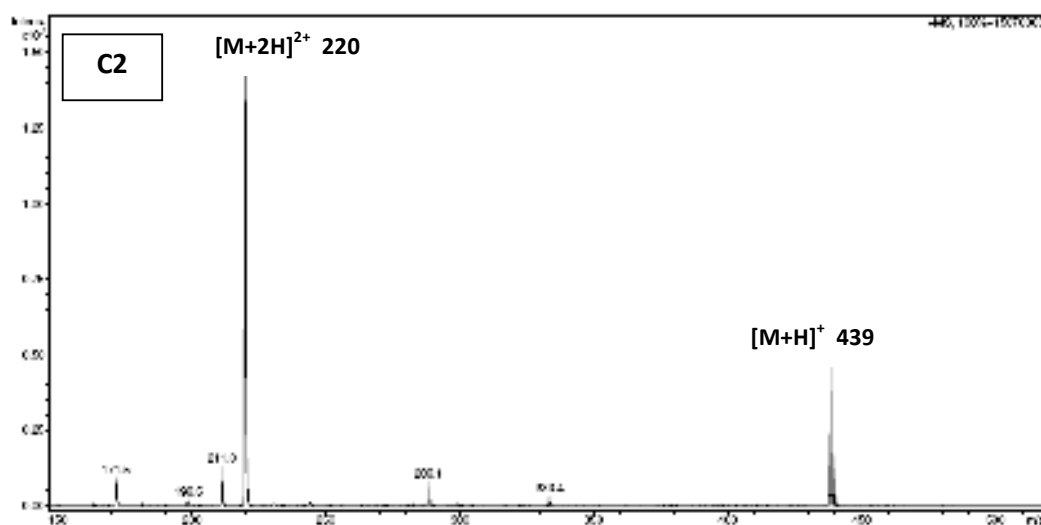


Figura 2.3.2.8: Espectro de massa no modo positivo do composto **C2** obtido por ionização por electrospray.

2.3.3. Síntese e caracterização dos conjugados C3 e C4.

Os conjugados **C3** e **C4** contendo um inibidor do NO foram preparados de acordo com o esquema reaccional apresentado na **Figura 2.3.3.1**.

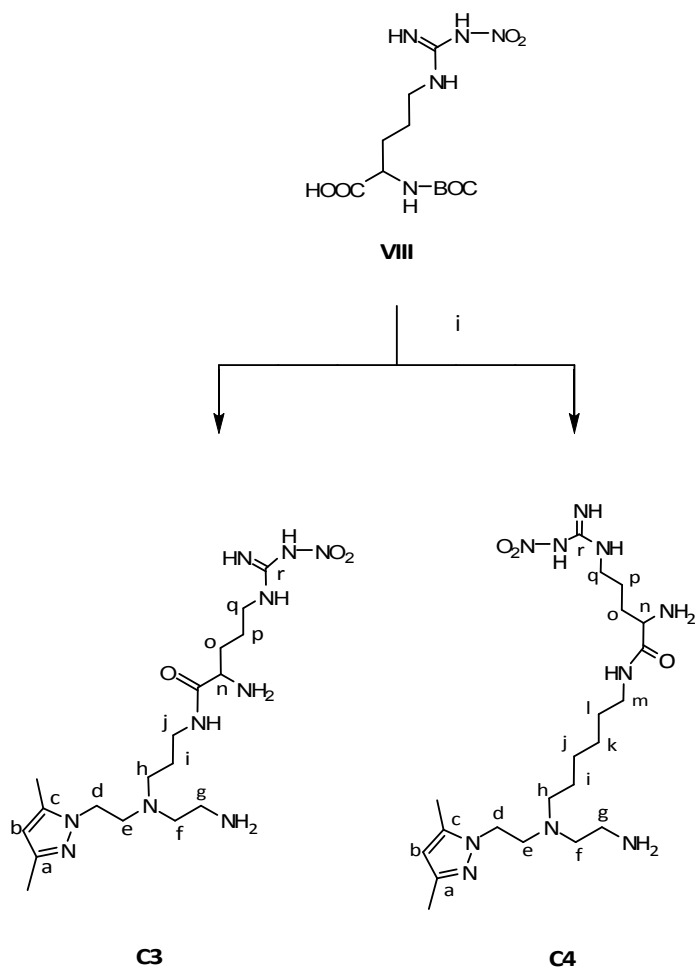


Figura 2.3.3.1: Síntese dos compostos **C3** e **C4**. i: a) BOC-N^ω-nitro-L-arginina, DCC e HOBT em DMF, **L1BOC/L2BOC** em CH₂Cl₂, t.a., 18h; b) TFA, CH₂Cl₂ (1:1), t.a., 3h.

A presença do grupo NO₂ na posição N^ω do aminoácido funcionou como grupo protector, o que permitiu a síntese destes conjugados pelo mesmo método utilizado para os conjugados **C1** e **C2**.

Os conjugados **C3** e **C4** foram obtidos com um grau de pureza superior a 95% após purificação por RP-HPLC. Na **Figura 2.3.3.2** apresentam-se os cromatogramas de controlo analítico (RP-HPLC) dos compostos.

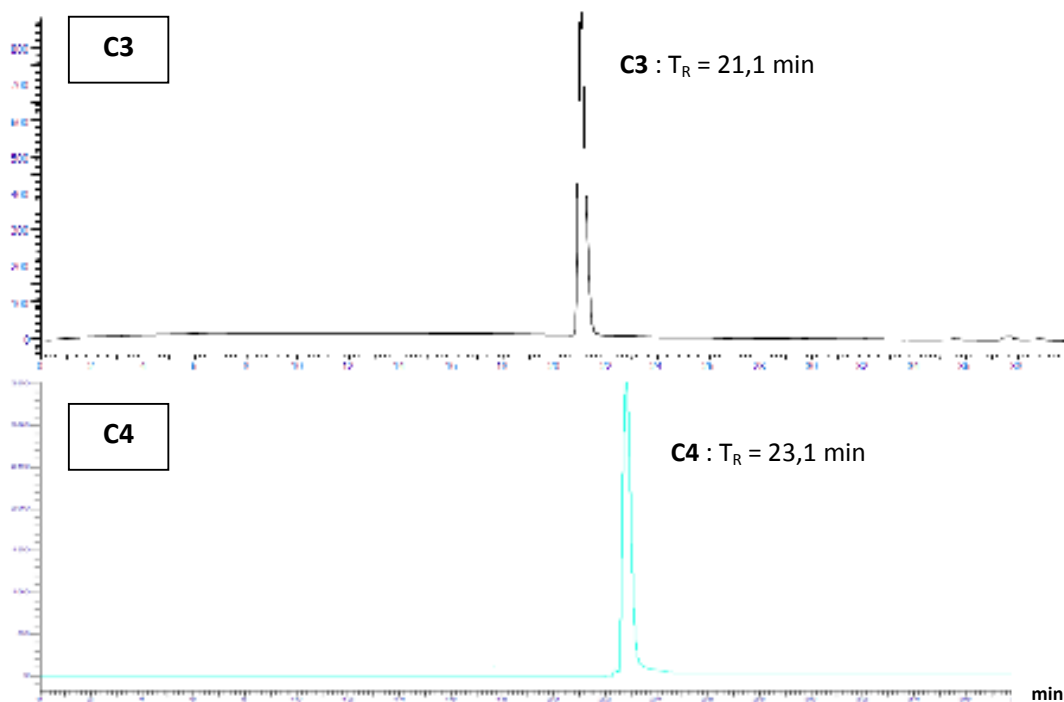


Figura 2.3.3.2: Cromatogramas analíticos dos conjugados **C3** e **C4**. (Método 2, Condições A, $\lambda = 220\text{nm}$).

A caracterização estrutural dos conjugados **C3** e **C4** foi efectuada por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . Tal como esperado, os espectros destes compostos caracterizam-se por apresentarem sinais com desvios químicos e multiplicidades semelhantes aos apresentados pelos espectros dos conjugados **C1** e **C2** já discutidos.

A atribuição dos sinais dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de **C3** e **C4** foi também efectuada com recurso a experiências bidimensionais de ^1H - ^1H -COSY e ^1H - ^{13}C -HSQC. Os dados espectroscópicos obtidos com estes estudos permitiram confirmar a presença de todos os sinais esperados para os conjugados. O espectro de ^1H - ^1H -COSY do conjugado **C3** com as correlações respectivas assinaladas é apresentado na **Figura 2.3.3.3**.

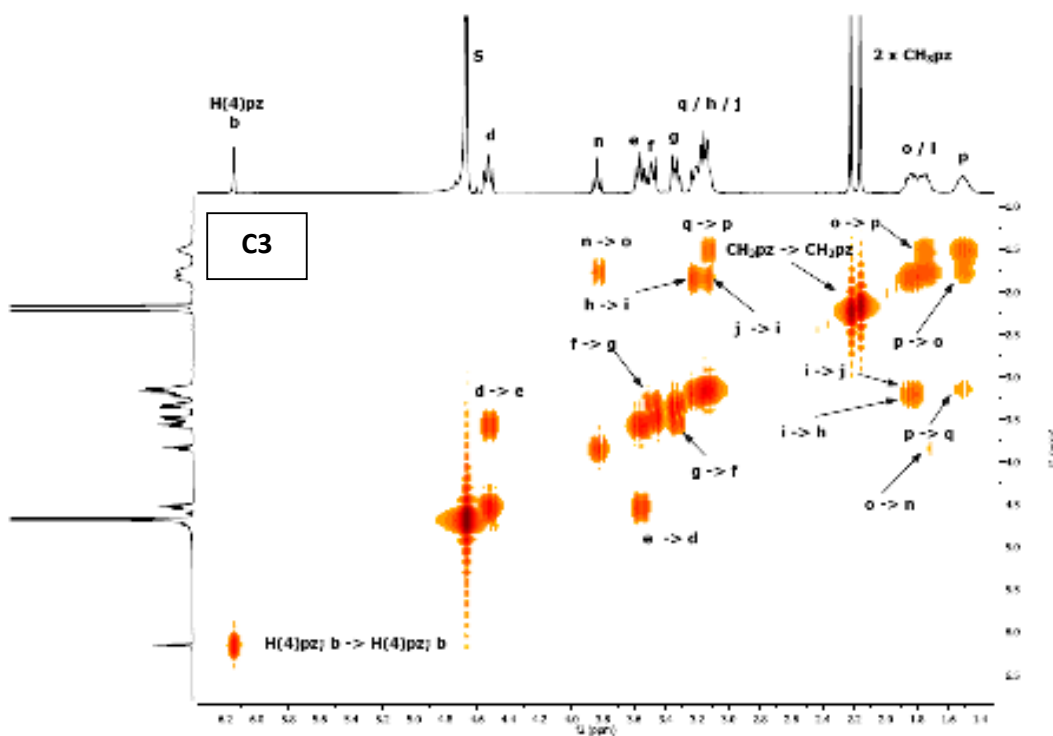


Figura 2.3.3.3: Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY do conjugado **C3** com a respectiva atribuição dos sinais (D_2O).

No espectro de ^1H - ^1H -COSY os sinais correspondentes aos prótons H^h e H^i estão inseridos num multipeto a δ 3,24-3,15 apresentando um acoplamento com H^j , cuja ressonância aparece como um multipeto a δ 1,75-1,79. O sinal dos prótons H^i encontra-se inserido num multipeto juntamente com os prótons H^o pertencentes à cadeia alifática do aminoácido, que por sua vez se correlacionam com os prótons H^p (δ 1,54-1,50) e H^n (δ 3,84). De referir ainda que os prótons relativos à unidade pirazolo-diamina se correlacionam entre si (H^d com H^e e H^f com H^g), possibilitando a atribuição completa dos sinais do espectro de ^1H -NMR desta unidade.

Nas **Figuras 2.3.3.4 e 2.3.3.5** (zona ampliada) apresenta-se o espectro de ^1H - ^{13}C -HSQC, bem como as respectivas correlações observadas. A análise deste espectro permitiu também confirmar que no conjugado **C3**, à semelhança do que se passava no conjugado **C2**, existe uma sobreposição dos sinais dos carbonos C^o e C^p num único sinal a δ 23,2.

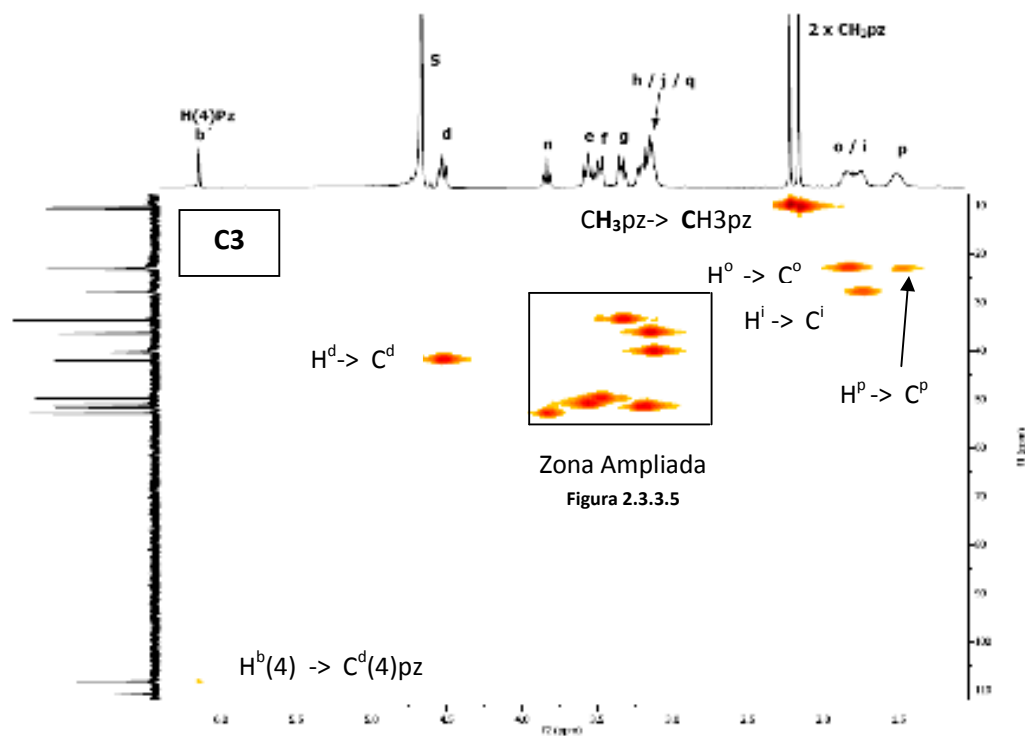


Figura 2.3.3.4: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do conjugado **C3** com a respectiva atribuição dos sinais (D_2O).

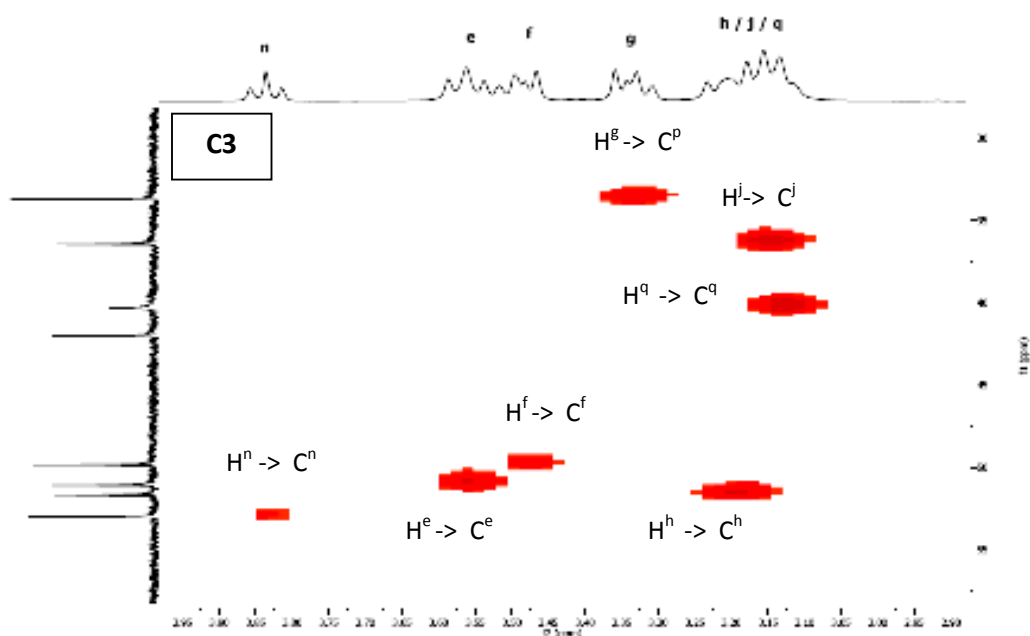


Figura 2.3.3.5: Zona ampliada do espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do conjugado **C3** com a respectiva atribuição dos sinais (D_2O).

Uma vez que no espectro de ^1H - ^{13}C -HSQC apenas se observam as correlações C-H a j^1 , os sinais do C=O da amida (δ 169,9), do carbono do grupo guanidina (C^f , δ 158,9) e do anel pirazolo (C^a , δ 148,2; C^c , 146,7; C^b , 108,2) foram atribuídos por RMN de ^{13}C .

De salientar ainda que a ressonância correspondente ao carbono do grupo guanidina C^f nos conjugados **C3** (δ 158,9) e **C4** (δ 158,7), quando comparados com os conjugados **C1** (δ 156,9) e **C2** (δ 156,8), se encontra desviada para campo baixo, o que está de acordo com a presença de um grupo NO_2 atrator de electrões, que tem um efeito desblindante.

2.4. Síntese e caracterização dos complexos $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L})]^+$ ($\text{L} = \text{L1}, \text{L2}, \text{C1-C4}$)

2.4.1. Complexos $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L1})]^+$ (**Re1**) e $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L2})]^+$ (**Re2**)

Os complexos modelo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L1})]^+$ (**Re1**) e $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L2})]^+$ (**Re2**) foram obtidos com rendimentos moderados por refluxo de soluções aquosas do precursor $(\text{Net}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ com quantidades estequiométricas dos respectivos ligandos **L1** e **L2** (Figura 2.4.1.1).

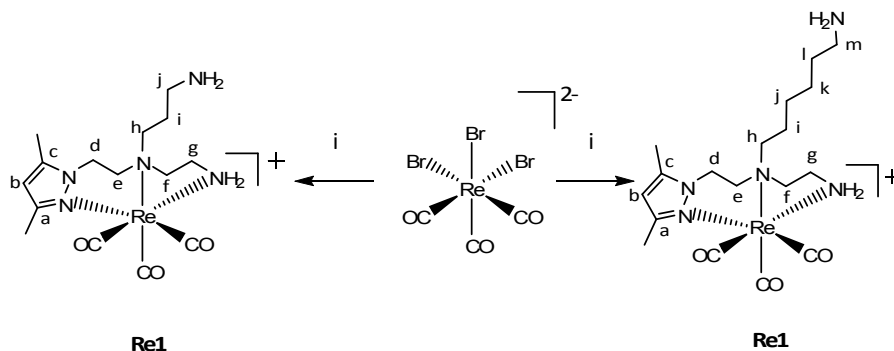


Figura 2.4.1.1: Síntese dos complexos **Re1** e **Re2**, por reacção directa dos ligandos **L1** e **L2** com o precursor $(\text{Net}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$; i: H_2O , refluxo, 18 h.

Os complexos **Re1** e **Re2** foram previamente purificados por lavagem dos resíduos obtidos após evaporação do solvente reaccional com CHCl_3 , de modo a remover o $[\text{Net}_4]\text{Br}$ formado. O resíduo obtido após este tratamento, foi dissolvido em H_2O , formando-se um sólido branco que foi eliminado após centrifugação. Após

filtração do sobrenadante (filtro millipore 0,2 μ m), os compostos foram isolados e purificados por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**, $\lambda = 254$ nm) de acordo com o procedimento descrito na secção experimental. Estes complexos modelo foram obtidos com elevada pureza química (> 97%, comprovado por RP-HPLC analítico; **Método 1, Condições A**, $\lambda = 254$ nm) na forma de óleos transparentes, solúveis em solventes próticos e insolúveis em solventes halogenados.

A sua caracterização foi realizada por espectroscopia de IV, RMN (^1H e ^{13}C) e por espectrometria de massa (ESI-MS). Os dados espectroscópicos de RMN, juntamente com a análise dos espectros de massa estão de acordo com as formulações propostas para todos os complexos.

No espectro de ^1H -RMN do complexo **Re1** (**Figura 2.4.1.2**) observam-se 3 singletos atribuídos ao H(4)pz (δ 6,07) e aos grupos metilo 3 e 5 do anel pirazolo (δ 2,30 e δ 2,19) pertencentes à unidade quelante pirazolo-diamina.

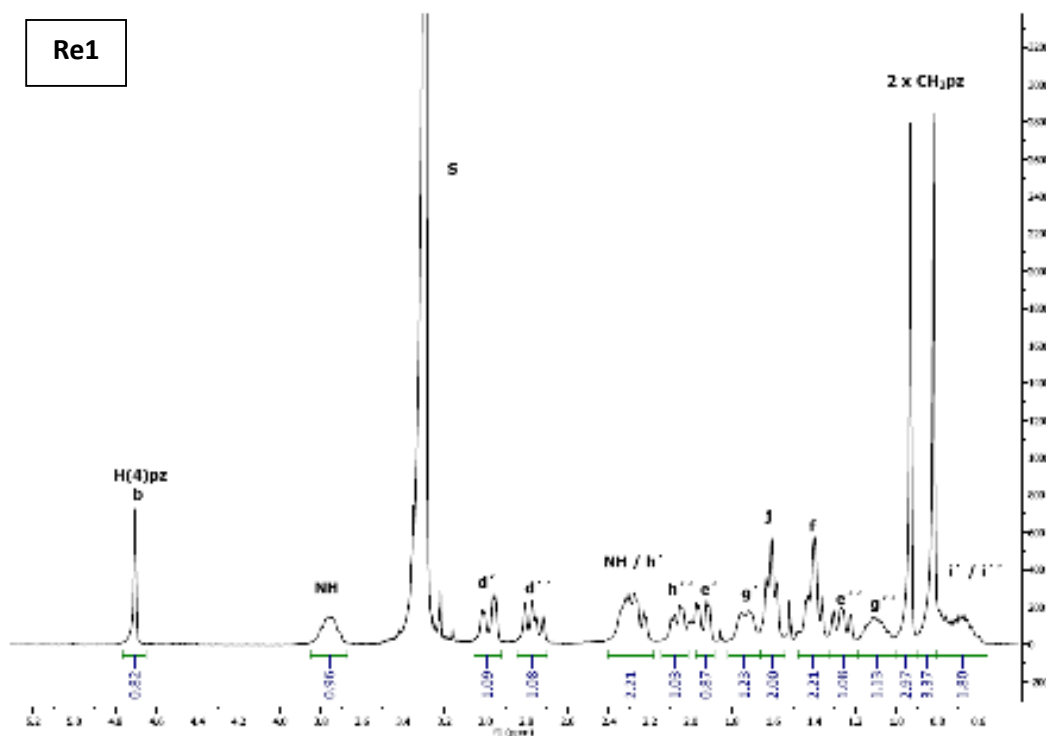


Figura 2.4.1.2: Espectro de ^1H -RMN do complexo modelo **Re1** (D_2O).

A presença de pares de multipletos ($H^{d'}/H^{d''}$, $H^{e'}/H^{e''}$, $H^{g'}/H^{g''}$, $H^{h'}/H^{h''}$ e $H^{i'}/H^{i''}$) integrando cada um deles para um próton, demonstra que a coordenação tridentada da unidade quelante pirazolo-diamina ao centro metálico $fac-[Re(CO)_3]^+$ foi bem sucedida. Esta coordenação, torna a maior parte dos prótons metilénicos do ligando bifuncional magneticamente não equivalentes, originando um padrão diastereotópico. Este perfil é consistente com a forma de coordenação tridentada, através dos átomos doadores N,N,N .

No espectro surgem dois sinais atribuídos aos prótons da amina primária NH_2 (δ 5,14 e δ 3,71-3,79) da unidade pirazolo-diamina, também diastereotópicos, e que estão correlacionados com os sinais dos prótons vicinais $H^{g'}$ e $H^{g''}$.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.4.1.3) do mesmo complexo foi ainda possível observar a campo alto 9 sinais atribuídos aos carbonos alifáticos do ligando a δ 65,7 (C^h), δ 63,9 (C^f), δ 55,4 (C^e), δ 49,7 (C^d), δ 44,9 (C^g), δ 39,9 (C^j), δ 25,2 (C^i), δ 18,0(CH_3pz) e δ 13,6 (CH_3pz).

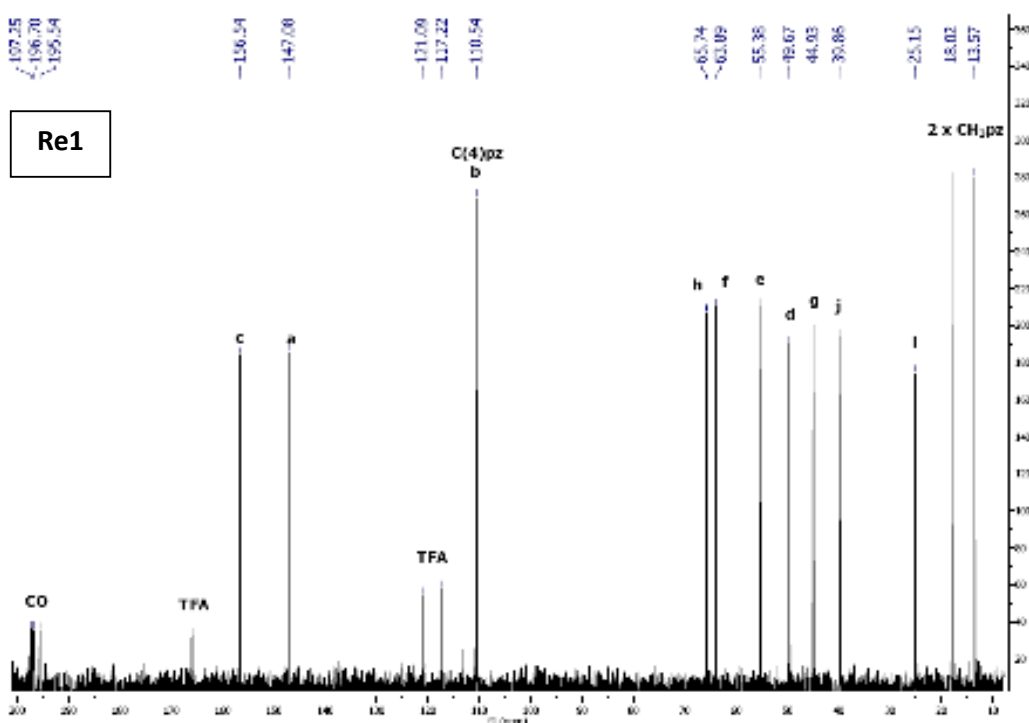
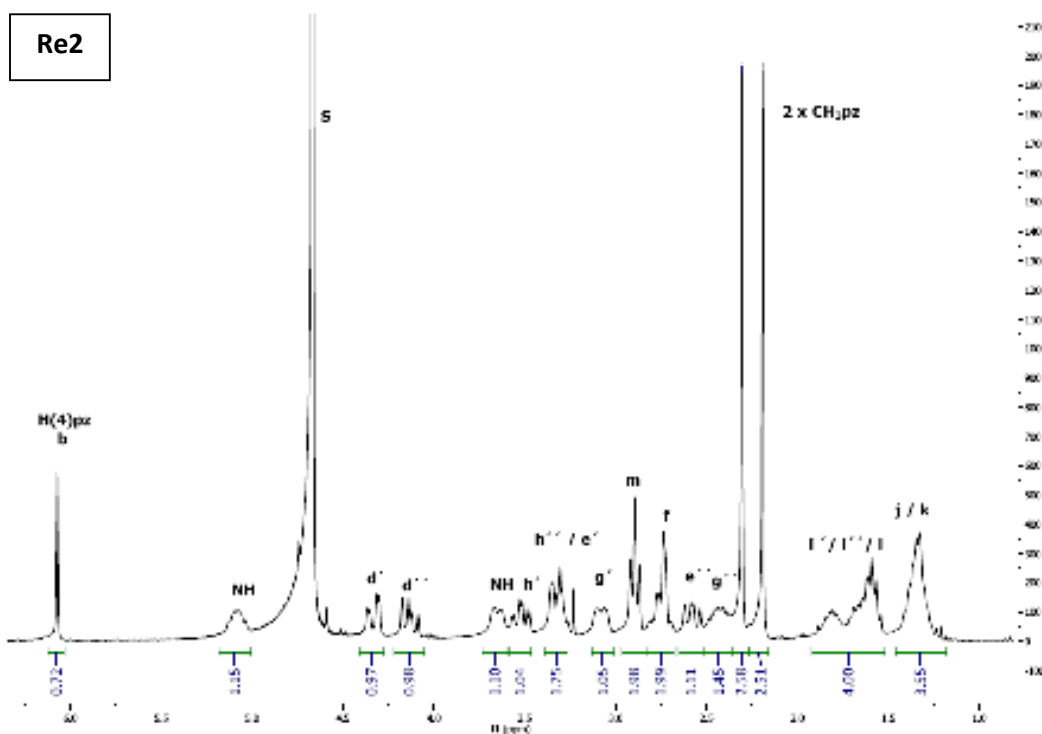


Figura 2.4.1.3: Espectro de ^{13}C -RMN do complexo modelo **Re1** (D_2O).

O sinal a δ 110,5 foi atribuído ao carbono $\text{CH}(4)\text{pz}$ (C^b) do anel pirazolo, bem como os dois sinais a δ 156,7 e 147,1 aos carbonos C^c e C^a da mesma unidade.

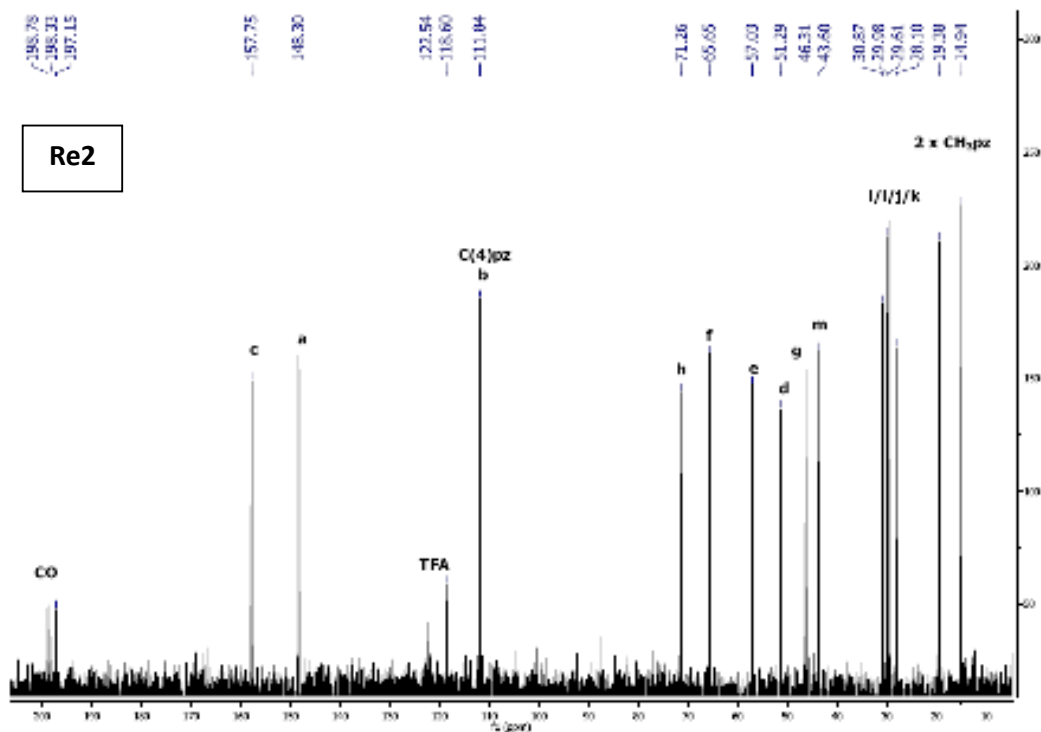
No espectro é ainda possível observar campo baixo os sinais dos 3 ligandos carbonilo coordenados ao rênio (δ 194,6, δ 194,0 e δ 192,9).

Tal como seria de esperar, o padrão dos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do complexo **Re2** (Figuras 2.4.1.4 e 2.4.1.5, respectivamente) é semelhante ao observado nos espectros correspondentes do complexo modelo **Re1**. Os desvios químicos dos sinais e a sua multiplicidade são praticamente sobreponíveis, tal como se pode observar nos espectros apresentados e nas atribuições de sinais efectuadas.



Figuras 2.4.1.4: Espectro de ^1H -RMN do complexo modelo **Re2** (D_2O).

No espectro de ^1H -RMN do complexo **Re2** é possível observar com mais detalhe a presença do par de protões diastereotópicos $\text{H}^i/\text{H}^{i'}$ (δ 1,89-1,59). Estes sinais eram difíceis de observar no espectro de ^1H do complexo anterior devido a uma sobreposição de um dos sinais com o sinal do metilo do anel pirazolo (CH_3Pz).



Figuras 2.4.1.5: Espectro de ^{13}C -RMN do complexo modelo **Re2** (D_2O).

O complexo **Re2** foi também caracterizados por espectroscopia de ^{13}C -RMN, observando-se todos os carbonos correspondentes a molécula. Por analogia ao espectro de ^{13}C -RMN do complexo anterior a campo alto encontram-se os carbonos alifáticos (C^{h} : δ 71,3, C^{f} : δ 65,7, C^{e} : δ 57,0, C^{d} : δ 51,3, C^{g} : δ 46,3, C^{m} : δ 43,6, C^{l} : δ 30,9, C^{i} : δ 29,9, C^{j} : δ 29,6, C^{k} : δ 28,1, CH_3pz : δ 19,4 e o CH_3pz : δ 14,9). Uma vez mais a campo baixo estão os respectivos sinais do anel pirazolo (C^{c} : δ 157,8, C^{a} : δ 148,3, C^{b} : δ 111,8) e os sinais correspondentes aos carbonilos da unidade metálica (CO : δ 198,8, δ 197,2, δ 192,9).

2.4.2. Complexos $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L})]^+$ ($\text{L} = \text{C1, Re3; C2, Re4; C3, Re5, C4, Re6}$)

Os complexos **Re3** – **Re6** foram obtidos pelo mesmo método de síntese dos complexos **Re1** e **Re2**, por refluxo de soluções aquosas do precursor $(\text{Net}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ com quantidades estequiométricas dos conjugados **C1** – **C4** (Figura 2.4.2.1.).

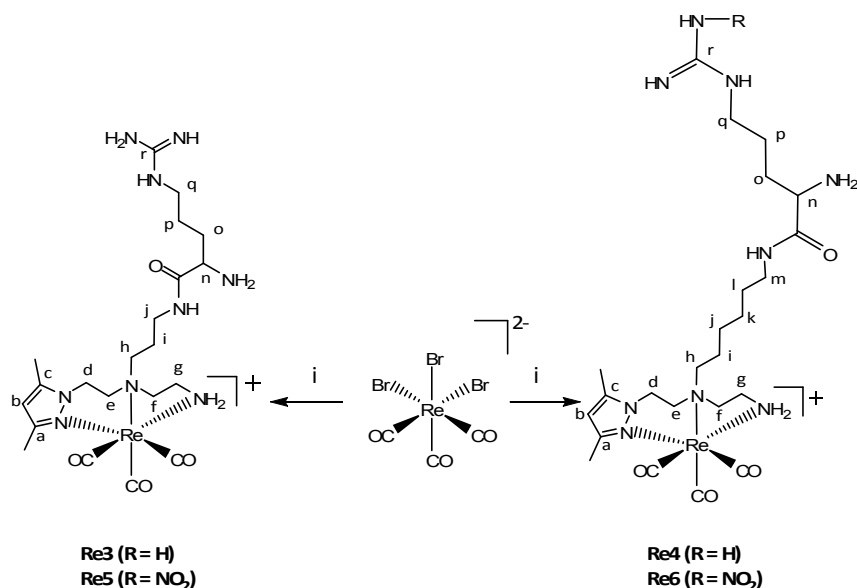


Figura 2.4.2.1: Síntese dos complexos **Re3 - Re6**; i: H₂O, refluxo, 18 h.

Os complexos **Re3 - Re6** foram também obtidos com pureza química elevada (> 95%) sob a forma de óleos transparentes solúveis em água e outros solventes apolares e pouco solúveis em solventes halogenados. A sua caracterização foi efectuada por espectrometria de massa (ESI-MS), espectroscopia de IV e RMN de ¹H e ¹³C. A atribuição dos sinais dos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN foi efectuada por intermédio de experiências bidimensionais de ¹H-¹H COSY e ¹H-¹³C HSQC obtidas para todos os complexos (**Re3 - Re6**)

Nos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN dos biocomplexos **Re3 - Re6**, para além dos sinais correspondentes ao ligando quelante, com desvios químicos e multiplicidades semelhantes aos já observados para os complexos modelo **Re1** e **Re2**, é ainda possível observar os sinais correspondentes à unidade bioactiva L-arginina e N^o-nitro-L-arginina. Os desvios químicos e multiplicidades dos sinais destas unidades bioactivas nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C são semelhantes aos encontrados nos respectivos conjugados livres (**C1** a **C4**). A semelhança nestes desvios confirma que apesar de os aminoácidos possuírem grupos potencialmente coordenantes à unidade *fac*-[Re(CO)₃]⁺, estes não estão envolvidos na ligação ao centro metálico.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos complexos análogos **Re3** - **Re6** são praticamente sobreponíveis, pelo que a título de exemplo se apresentam os espectros de ^1H -RMN dos complexos **Re3** e **Re5** com as respectivas atribuições de sinais (**Figura 2.4.2.2**).

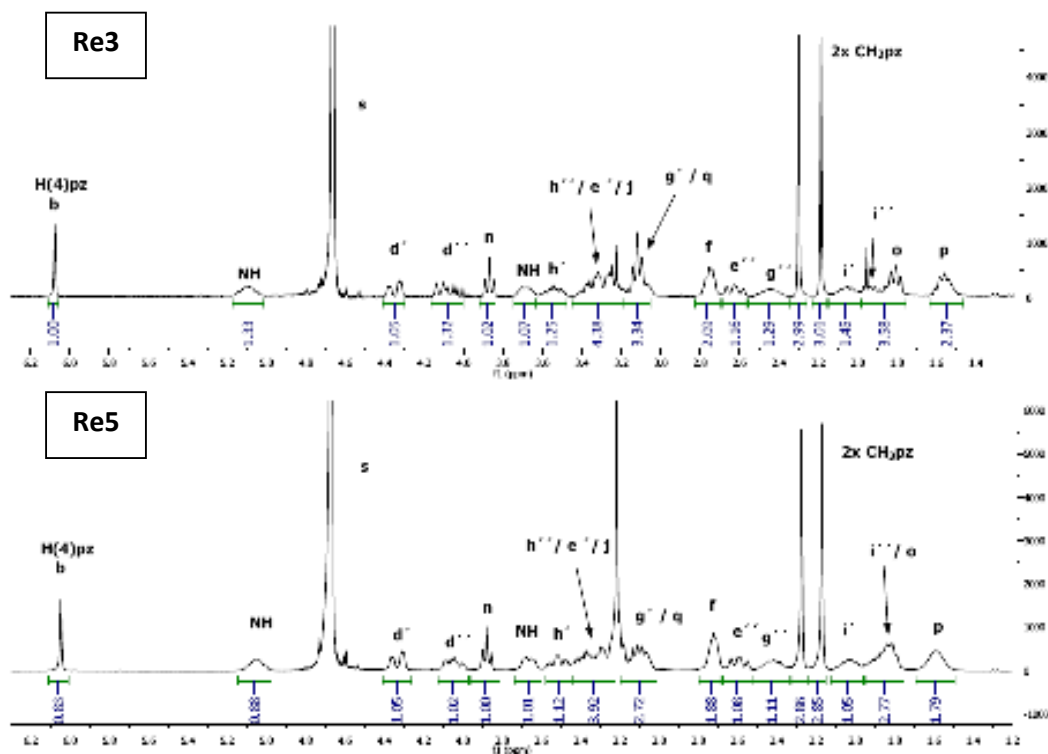


Figura 2.4.2.2: Espectros de ^1H -RMN dos complexos **Re3** e **Re5** (D_2O).

Nas **Figuras 2.4.2.3** e **2.4.2.4** apresentam-se ainda os espectros de ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HSQC para o complexo **Re4**, onde são apresentadas as correlações mais importantes.

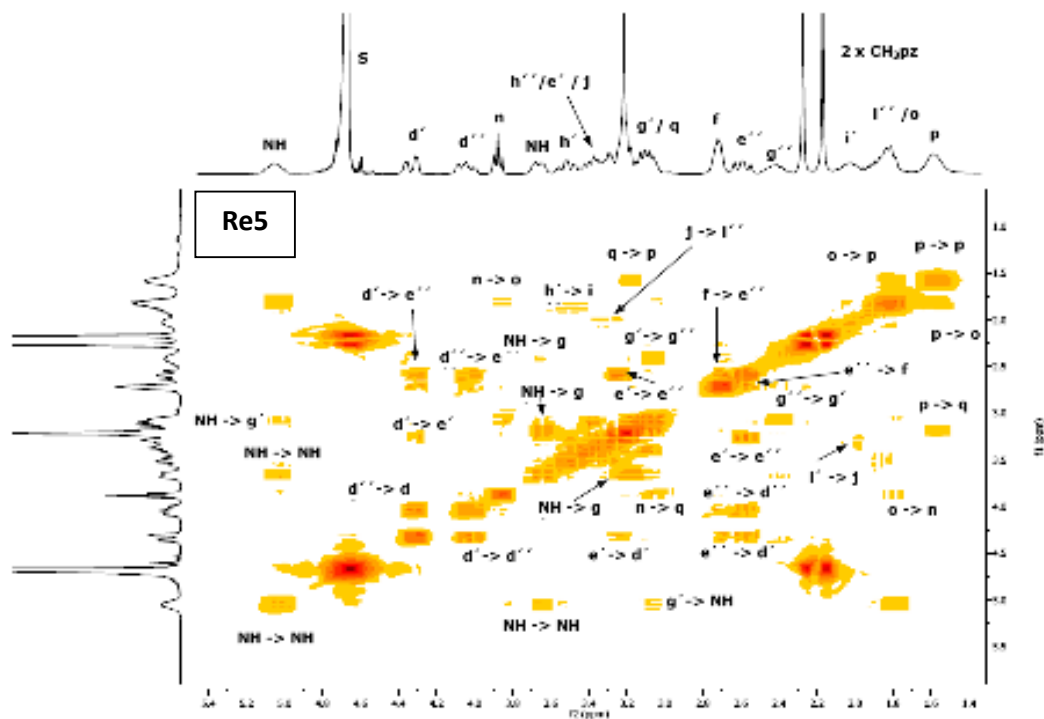


Figura 2.4.2.3: Espectro de ^1H - ^1H COSY do biocomplexo **Re4** com as correlações mais importantes assinaladas (D_2O).

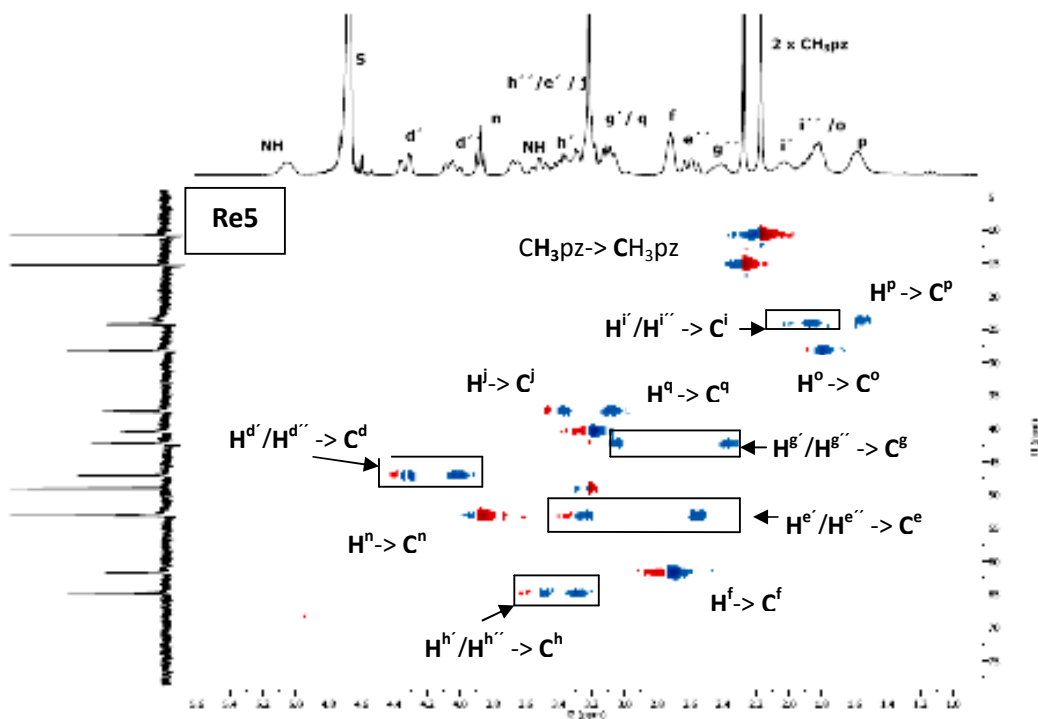


Figura 2.4.2.4: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do biocomplexo **Re4** com as correlações mais importantes assinaladas (D_2O).

O perfil genérico dos espectros de ^1H -RMN dos biocomplexos **Re3** - **Re6** revela a presença de três singuletos atribuídos ao H(4)pz ($\approx \delta$ 6,00) e aos grupos metilo do anel pirazolo ($\approx \delta$ 2,20 e δ 2,13). Apesar da complexidade dos espectros na zona de campo mais alto, resultante da sobreposição de vários sinais, é possível identificar a presença de pares de multipletos ($\text{H}^{\text{d'}}$ / $\text{H}^{\text{d''}}$, $\text{H}^{\text{e'}}$ / $\text{H}^{\text{e''}}$, $\text{H}^{\text{g'}}$ / $\text{H}^{\text{g''}}$, $\text{H}^{\text{h'}}$ / $\text{H}^{\text{h''}}$, $\text{H}^{\text{i'}}$ / $\text{H}^{\text{i''}}$), demonstrando que a coordenação tridentada da unidade quelante pirazolo-diamina através dos átomos doadores *N,N,N* ao centro metálico *fac*-[Re(CO)₃]⁺ foi bem sucedida. Esta coordenação, torna a maior parte dos prótons metilénicos do ligando bifuncional magneticamente não equivalentes, originando um padrão diastereotópico. Nos espectro surgem ainda dois sinais, atribuídos aos prótons da amina primária NH₂ coordenantes ($\approx \delta$ 5,05 e $\approx \delta$ 3,67) da unidade pirazolo-diamina, também diastereotópicos, e que estão correlacionados com os sinais dos prótons vicinais $\text{H}^{\text{g'}}$ ($\approx$ 3,08) e $\text{H}^{\text{g''}}$ ($\approx \delta$ 2,40). Os sinais correspondentes aos prótons do aminoácido apresentam multiplicidades e desvios químicos ($\text{H}^{\text{n}} \approx \delta$ 3,85; $\text{H}^{\text{q}} \approx \delta$ 3,09; $\text{H}^{\text{o}} \approx$ 1,80 δ ; $\text{H}^{\text{p}} \approx \delta$ 1,48) semelhantes aos encontrados para os conjugados livres.

Os espectros de RMN de ^{13}C dos complexos **Re3** - **Re6** apresentam a campo alto os sinais correspondentes aos carbonos alifáticos do ligando a $\approx \delta$ 66,7 (C^{h}), $\approx \delta$ 63,7 (C^{f}), $\approx \delta$ 55,4 (C^{e}), $\approx \delta$ 49,0 (C^{d}), $\approx \delta$ 44,1 (C^{g}), $\approx \delta$ 42,4 (C^{j}), $\approx \delta$ 26,2 (C^{i}), $\approx \delta$ 17,2 (CH_3pz), $\approx \delta$ 12,8 (CH_3pz), $\approx \delta$ 25,9 (C^{k} , **Re4** e **Re6**), $\approx \delta$ 23,8 (C^{l} , **Re4** e **Re6**) e $\approx \delta$ 40,5 (C^{m} , **Re4** e **Re6**).

Observam-se ainda os sinais correspondentes ao carbono C^{b} (4)pz ($\text{C}^{\text{b}} \approx \delta$ 110,3) do anel pirazolo, bem como os dois sinais dos carbonos C^{c} ($\approx \delta$ 156,1) e C^{a} ($\approx \delta$ 146,7) da mesma unidade. Nesta zona é ainda possível identificar o sinal correspondente ao carbonilo da ligação amida ($\approx \delta$ 172,1).

Os sinais correspondentes à unidade aminoácido aparecem a $\approx \delta$ 53,3 (C^{n}), $\approx \delta$ 28,2 (C^{o}), $\approx \delta$ 23,8 (C^{p}), $\approx \delta$ 39,6 (C^{q}) e $\approx \delta$ 156,9 (C^{r}).

Nos espectro é ainda possível observar campo baixo os sinais dos 3 ligandos carbonilo coordenados facialmente ao rénio ($\approx \delta$ 196,9 $\approx \delta$ 194,9 e $\approx \delta$ 194,7).

Relativamente à caracterização dos complexos por espectroscopia de IV, A característica mais importante a assinalar em todos os complexos organometálicos

sintetizados (**Re1 – Re6**) é a presença de duas bandas de intensidade muito forte entre 2100 - 1900 cm^{-1} , atribuídas à vibração de extensão dos ligandos CO da unidade *fac*-[Re(CO)₃]⁺. Estas bandas aparecem desviadas para frequências superiores relativamente ao precursor de partida (Net₄)₂[ReBr₃(CO)₃], o que é indicativo da coordenação dos conjugados ao centro metálico. É também possível identificar bandas fortes a $\approx$ xxxx cm^{-1} atribuídas à vibração de extensão C=O da função amida dos conjugados coordenados.

2.5. Síntese e caracterização dos complexos $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(k^3\text{-L})]^+$ ($L = \text{L1}, \text{L2}, \text{C1-C4}$).

Os complexos **Tc1** - **Tc2**, análogos dos complexos inactivos de rénio **Re1** – **Re6**, foram preparados em solução aquosa por reacção dos compostos **L1**, **L2** e **C1-C4** com o precursor organometálico $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ sob aquecimento a 100°C , durante 30 min (**Figura 2.5.1**). As concentrações finais de ligando na preparação radiofarmacêutica é $\approx 10^{-4}\text{ M}$.

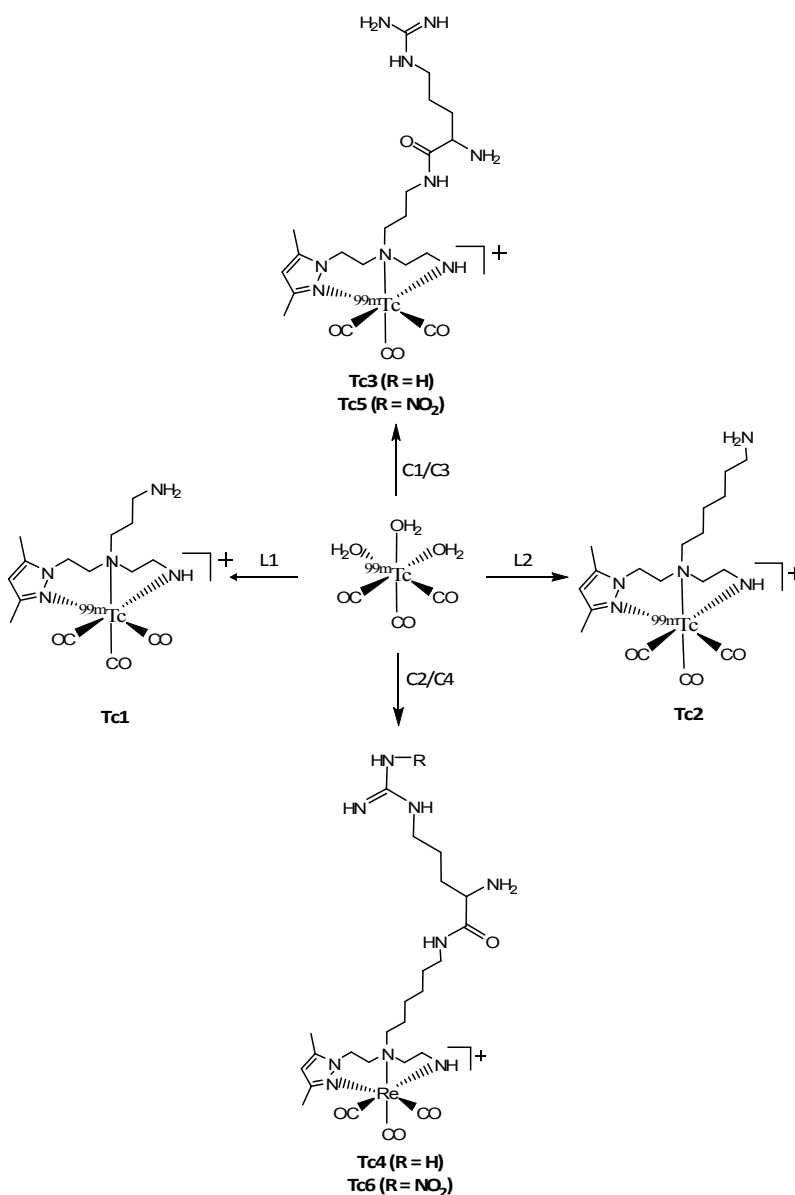


Figura 2.5.1: Síntese dos complexos organometálicos **Tc1** – **Tc6**.

O precursor $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ foi preparado com rendimento elevado (> 98%) por adição de uma solução de $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$, eluído de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, a um kit liofilizado disponível comercialmente (*Isolink*®), seguido de aquecimento a 100° C, durante 30 minutos. Após a reacção, o excesso de boranocarbonato de potássio ($\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$ – constituinte do Kit responsável pela redução do metal e libertação de CO *in situ*) é destruído por neutralização ($\text{pH} \approx 7,4$) com uma solução de HCl 1N, e a preparação é diluída com uma solução de soro fisiológico (NaCl 0,9%). A pureza radioquímica do precursor foi controlada por RP-HPLC analítico, antes da preparação dos complexos (**Figura 2.5.2**).

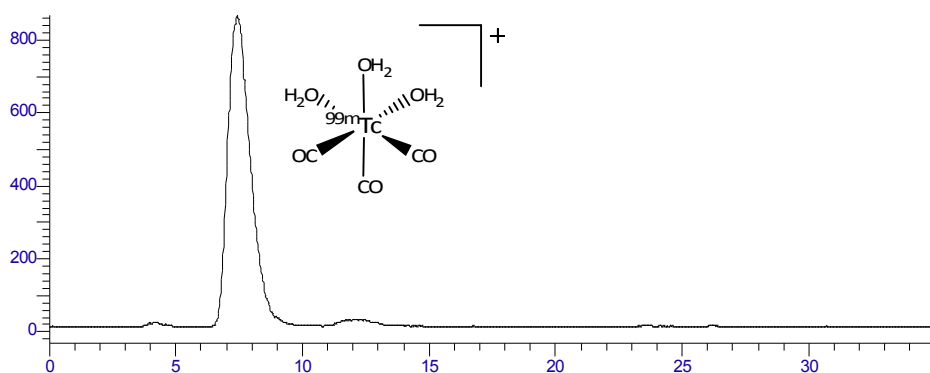


Figura 2.5.2: Cromatograma de controlo analítico do precursor $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (Método 2, Condições A, detecção γ).

Os rendimentos de reacção e a pureza radioquímica dos complexos preparados foram determinados por RP-HPLC. Os complexos modelo **Tc1** e **Tc2** foram obtidos com rendimentos elevados (> 95%) e elevada pureza radioquímica por reacção directa dos compostos **L1** e **L2** com o aquo-complexo $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (**Figura 2.5.3**).

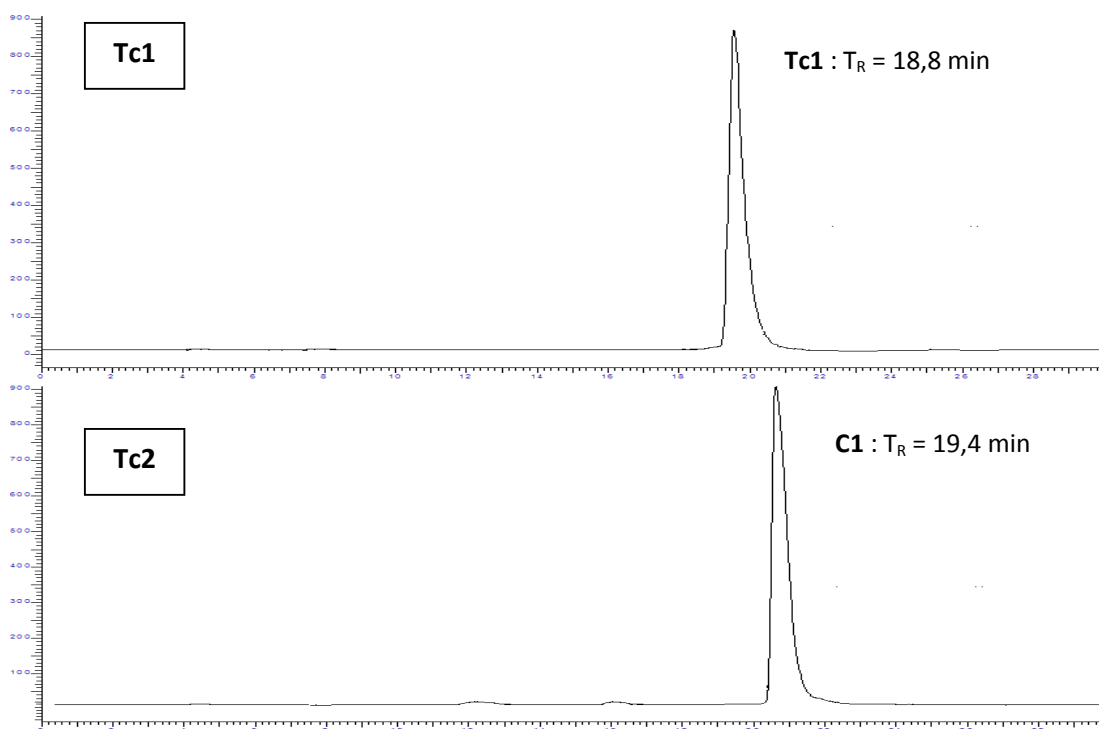


Figura 2.5.3: Cromatogramas analíticos dos complexos **Tc1** e **Tc2** (Método 1, Condições A; detecção γ).

Os cromatogramas de controlo analítico (RP-HPLC) dos complexos **Tc3** a **Tc 6** são apresentados na **Figura 2.5.4**.

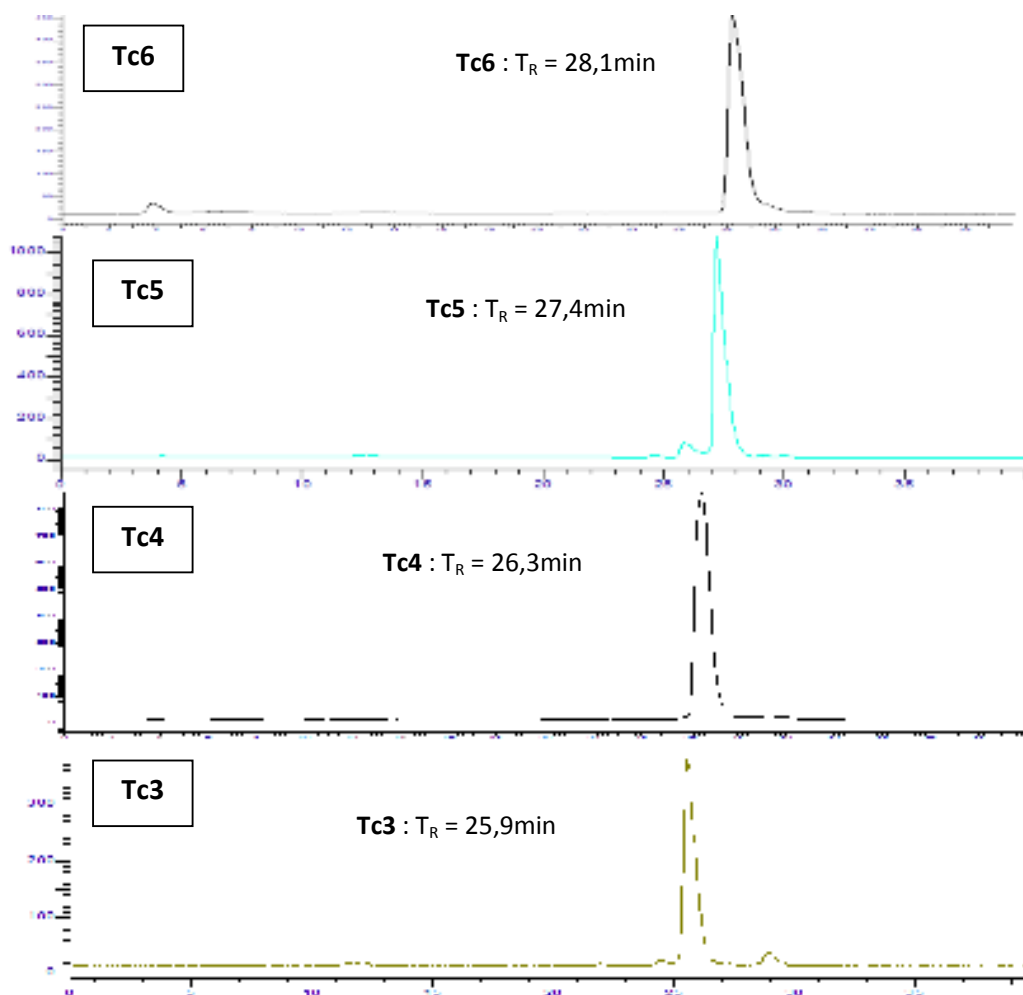


Figura 2.5.4: Cromatogramas analíticos dos complexos **Tc3** a **Tc6** (Método 2, Condições A; detecção γ).

Todos os complexos foram obtidos com rendimentos superiores a 93%, à excepção do complexo **Tc6** que foi obtido com um rendimento de 66%.

Uma vez que a caracterização dos complexos de ^{99m}Tc não pode ser efectuada pelos métodos usuais em química inorgânica devido às baixas concentrações dos complexos em solução, admite-se que os complexos de Rénio e de ^{99m}Tc sintetizados têm a mesma estrutura química se apresentarem um perfil cromatográfico semelhante quando analisados por RP-HPLC nas mesmas condições experimentais.

A caracterização estrutural dos complexos **Tc1** - **Tc6** efectuou-se por comparação dos seus tempos de retenção nos cromatogramas analíticos de RP-HPLC (detecção γ) com

os tempos de retenção dos compostos análogos de Rénio **Re1** - **Re6** no mesmo sistema analítico (**Tabela 2.5.1**).

Tabela 2.5.1: Tempos de retenção obtidos por RP-HPLC para os complexos organometálicos de ^{99m}Tc e Re.

Tempo de retenção - min	
Re	^{99m}Tc
Re1 - 18,2	Tc1 - 18,8
Re2 - 18,9	Tc2 - 19,4
Re3 - 25,1	Tc3 - 25,9
Re4 - 25,6	Tc4 - 26,3
Re5 - 26,7	Tc5 - 27,4
Re6 - 27,4	Tc6 - 28,1

Como se pode verificar, os valores dos tempos de retenção dos complexos de ^{99m}Tc e dos respectivos compostos análogos de Rénio são semelhantes. O ligeiro desfasamento observado entre os tempos de retenção deve-se à distância existente entre o detector de radiação γ gama utilizado para detectar os complexos de ^{99m}Tc e o detector UV (254 nm) utilizado para detectar os complexos de Re. A título de exemplo apresentam-se na **Figura 2.5.5** os cromatogramas dos complexos **Tc5** e respectivo análogo de Rénio (**Re5**).

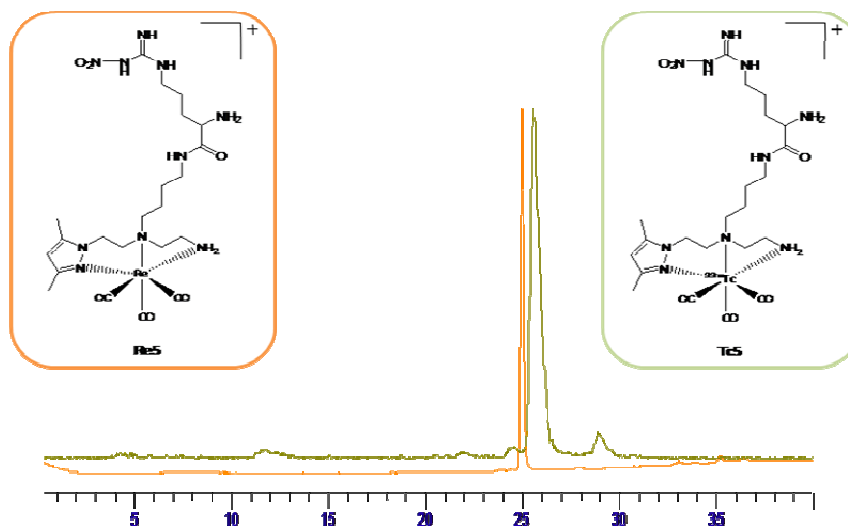


Figura 2.5.5: Cromatogramas analíticos de RP-HPLC dos complexos **Re5** (deteção UV 254 nm) e **Tc5** (deteção γ). (**Método 2, Condições A**).

2.5.1 Estabilidade *in vitro* dos complexos de ^{99m}Tc .

A determinação da estabilidade dos complexos *in vitro* é importante na medida em que permite prever a sua potencial instabilidade *in vivo*. Estes estudos permitem, por um lado, avaliar a possibilidade de reoxidação e/ou degradação dos complexos e, por outro, avaliar a potencial existência de fenómenos de trans-quelatação devido à presença de compostos com átomos doadores capazes de competir para a coordenação ao fragmento metálico. Neste último caso, os estudos de estabilidade são realizados na presença dos aminoácidos histidina ou a cisteína que fazem parte da constituição das proteínas circulantes e que possuem na sua estrutura grupos funcionais susceptíveis de coordenar à unidade $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$.

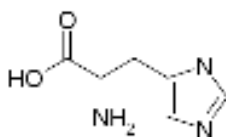


Figura 2.5.1.1: Estrutura química da histidina.

Os complexos **TC3** – **Tc6** foram mantidos numa solução tampão PBS pH 7,4 a 37 °C durante 24h. As soluções foram analisadas por RP-HPLC analítico ao fim de 2 h, 4 h e 24h. A análise dos resultados cromatográficos obtidos demonstrou que todos os complexos radioactivos são estáveis, não sendo observada degradação ou reoxidação significativa dos complexos (**Figura 2.5.1.2**).

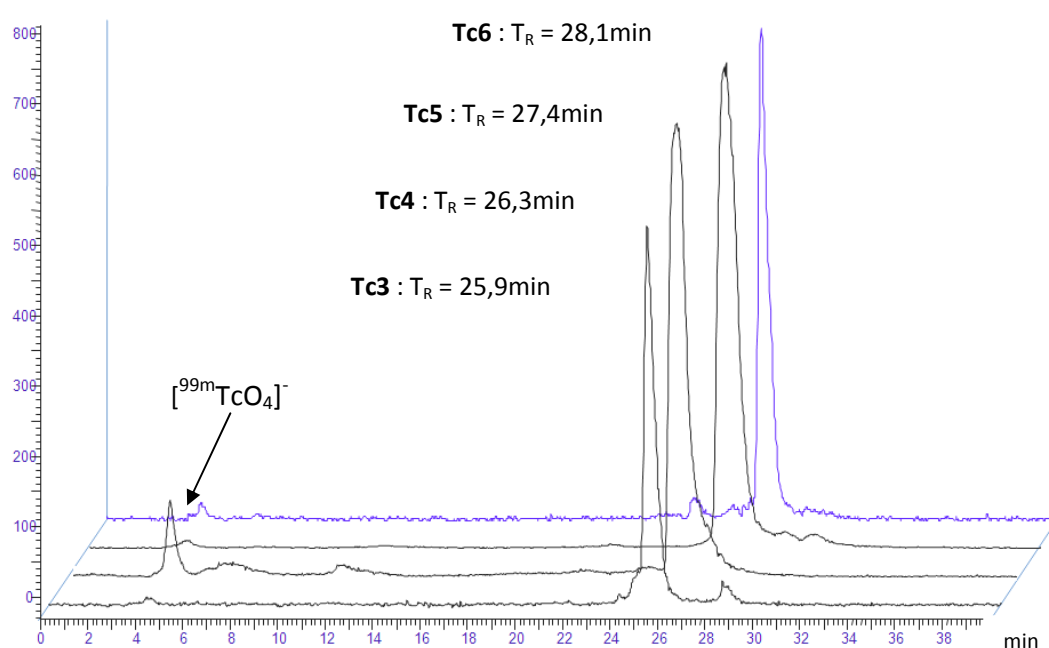


Figura 2.5.1.2: Cromatogramas de RP-HPLC dos complexos **TC3 – Tc6** mantidos numa solução tampão PBS pH 7,4 a 37 °C ao fim de 24h (**Método 2, Condições A**; detecção γ).

Os complexos foram ainda avaliados na presença de histidina. Para esse efeito, adicionou-se aos complexos, em condições fisiológicas (tampão PBS pH 7,4, 37 °C), um grande excesso de histidina (100:1). A estabilidade dos compostos foi monitorizada por RP-HPLC ao fim de 2h, 4h e 24 h (**Figura 2.5.1.3**). Verificou-se que os compostos **Tc3**, **Tc5** e **Tc6** permaneciam intactos ao longo do tempo. O complexo **Tc4** revelou ser o menos estável em histidina uma vez que se observou a formação de $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ associado a um processo de reoxidação e ao aparecimento de uma espécie mais hidrofílica com um tempo de retenção de 12,6 min.

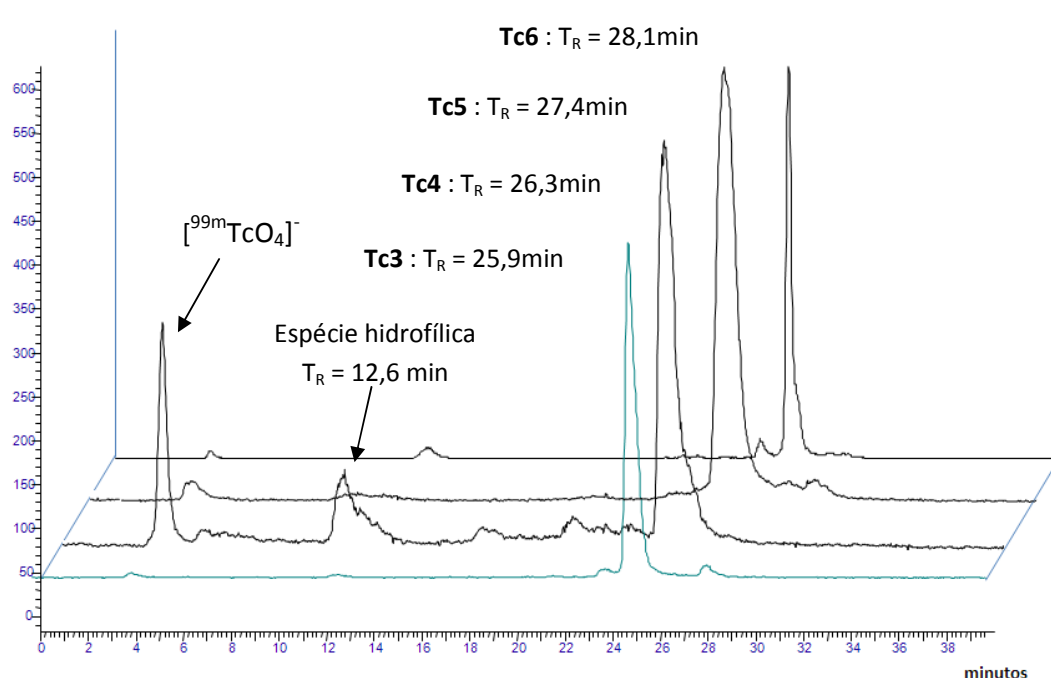


Figura 2.5.1.3: Estabilidade dos complexos **Tc3 - Tc6** incubados com excesso de histidina (tampão PBS pH 7,4, 37 °C) ao fim de 24h (**Método 2, Condições A**; detecção γ).

2.5.2 Avaliação da lipofilia dos complexos Tc3 – Tc6.

Um dos parâmetros mais frequentemente utilizados para quantificar a lipofilia de um composto é a determinação do seu coeficiente de partição n-octanol/água, expresso em termos de $\log P_{o/w}$. Este valor poder-nos-á dar uma ideia antecipada do perfil farmacocinético de um fármaco ou radiofármaco.

A lipofilia dos complexos **Tc3 – Tc6**, foi avaliada por determinação do coeficiente de partição no sistema n-octanol/solução tampão PBS (pH 7.4) de acordo com o procedimento experimental descrito na secção 3.5.2, capítulo 3. Os valores de $\log p_{o/w}$ são sumarizados na **Tabela 2.5.2.1**.

Tabela 2.5.2.1. Valores de lipofilia ($\log P_{o/w}$) para os complexos **Tc3** -**Tc6**.

Complexo	$\log P_{o/w}$
Tc3	-1,574
Tc4	-1,362
Tc5	-1,291
Tc6	-1,008

Os complexos apresentam valores de $\log P_{o/w}$ negativos, o que indica que genericamente apresentam carácter hidrofílico. Esta característica é mais acentuada nos complexos **Tc3** e **Tc4**, o que poderá estar relacionado com a presença do aminoácido L-arginina. Por outro lado, a presença do aminoácido N^o-nitro-L-arginina confere uma menor hidrofília aos complexos, tal como pode ser observado nos complexos **Tc5** e **Tc6**. De notar ainda que os complexos que contêm cadeias espaçadoras mais longas (**Tc4** e **Tc6**) apresentam um maior carácter lipofílico, quando comparados com os seus análogos de cadeia espaçadora mais curta **Tc3** e **Tc5**.

2.6 Ensaaios enzimáticos.

Os parâmetros cinéticos da reacção de produção de NO a partir da conversão da L-arginina a L-citrulina, numa reacção enzimática catalisada pelo NOS na presença de O₂ e NADPH, podem ser determinados seguindo espectrofotometricamente a formação de metahemoglobina (Fe³⁺), obtida por reacção do NO com a oxihemoglobina (Fe²⁺), cuja presença é detectada por um aumento de absorvância a 401 nm e 421 nm. O facto da oxihemoglobina apresentar uma maior afinidade para o NO do que para o O₂, minimizando-se a sua auto-oxidação, contribui decisivamente para a maior sensibilidade deste método.

Os valores de velocidade inicial (v_i), associados à conversão da L-arginina, a concentrações fixas diferentes, são obtidos por diferença entre o declive da curva associada à auto-oxidação da oxihemoglobina e o declive da curva após adição do enzima. O ajuste destas velocidades iniciais à equação de Michaelis-Menten - que

traduz o comportamento cinético da maioria dos enzimas conhecidos assumindo que a concentração do complexo enzima-substrato se mantém aproximadamente invariável no intervalo de tempo em que a velocidade inicial está a ser medida (estado-estacionário) - permite a obtenção dos parâmetros cinéticos K_m (constante de Michelis-Menten = concentração de substrato $[S]$ em que a velocidade de reacção é metade da velocidade máxima) e V_{max} (velocidade limite da reacção enzimática).

Os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m podem ser determinados por regressão não linear através de métodos numéricos que ajustam a hipérbole aos resultados experimentais da variação de v_i em função de $[S]$.

Alternativamente, é possível utilizar outros métodos para a obtenção destas constantes. Nesta tese, o método utilizado foi o método directo de Eisenthal Cornish-Bowden. Considerando um par de valores experimentais de v_{i1} (y_1) e $[S]_1$ (x_1), define-se uma recta que intersecta o eixo das abcissas em $[S]_1$ e o das ordenadas em v_{i1} . Um segundo (v_{i2} (y_2) e $[S]_2$ (x_2)) e um terceiro par (v_{i3} (y_3) e $[S]_3$ (x_2)) de valores experimentais definem mais duas rectas, cruzando-se todas estas rectas idealmente num único ponto que, extrapolado nos eixos dos x e y , define os valores de $-K_m$ e V_{max} , respectivamente (**Figura 2.6.1**).⁵⁴

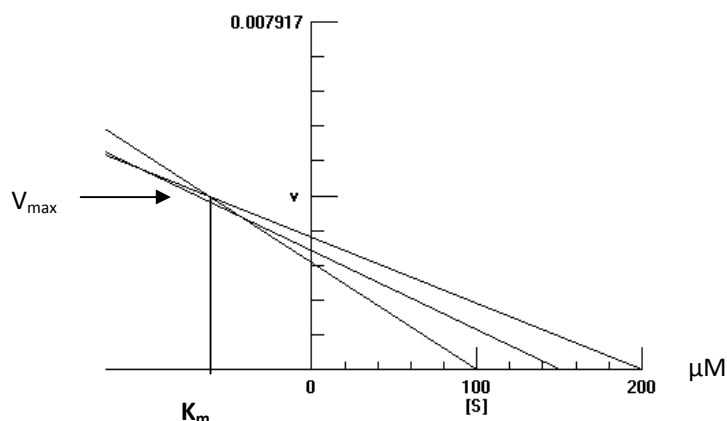


Figura 2.6.1. Método Directo de Eisenthal e Cornish-Bowden para determinação da constantes $V_{\max}$ e K_m . **INDICAR ONDE É O $V_{\max}$ e o K_m**

A vantagem inerente a este método linear é, ao contrários dos restantes métodos lineares, evitar a utilização de recíprocos (ex. Lineweaver-Burk, $1/v$ versus $1/[S]$) minimizando-se a influência dos erros experimentais na avaliação das constantes cinéticas.

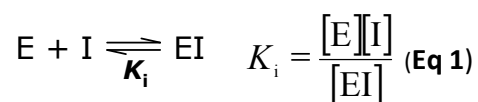
Os valores de K_m foram determinados através do método directo de Eisenthal Cornish-Bowden, recorrendo-se ao programa *Hyper32* (J. S. Easterby, University of Liverpool, UK; <http://www.liv.ac.uk/~jse/software.html>).⁵⁵ Os valores de K_m do iNOS na presença dos conjugados **C1** e **C2** e dos complexos **Re3** e **Re4**, avaliados como substratos da iNOS (origem murina), são apresentadas na **Tabela 2.6.1** e comparadas com os valores obtidos para o substrato natural L-arginina.

Tabela 2.6.1: Valores de K_m do iNOs obtidos na presença dos substratos L-arginina, **C1**, **C2**, **Re3** e **Re4**.

Composto	K_m μM
L-arginina	6
C1	55
C2	> 1200
Re3	1093
Re4	> 2500

Os resultados obtidos permitem concluir que a afinidade do aminoácido L-arginina para o iNOS é negativamente afectada pela sua ligação à unidade quelante pirazolo-diamina, como se pode concluir pelo aumento dos valores de K_m . O aumento da cadeia espaçadora entre a unidade quelante e o aminoácido no caso do composto **C2** levou a um aumento ainda mais considerável do valor de K_m do enzima. A metalação dos conjugados **C1** e **C2**, originando os complexos organometálicos **Re3** e **Re4** respectivamente, não teve qualquer efeito positivo na afinidade para o sítio activo do enzima.

A potência relativa de um inibidor (I) reversível de um enzima (E) é medida pela sua capacidade de ligação a um enzima alvo (EI), sendo quantificada pela constante de inibição (K_i , **Eq 1**).



O efeito inibitório dos compostos **C3**, **C4**, **Re5** e **Re6** na actividade enzimática do iNOS foi avaliado calculando-se os valores de K_i a partir da equação de Michaelis-Menten para um mecanismo de inibição competitiva (**Eq 2**).

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{\underbrace{K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})}_{K_m^{app}} + [S]} \quad (\text{Eq 2})$$

A metodologia utilizada no cálculo das constantes de inibição, através da determinação experimental dos valores de K_m^{app} (Constante de Michaelis-Menten aparente), é exemplificada para o conjugado **C3**. Numa primeira fase, determinaram-se as velocidades iniciais (v_i) da reacção enzimática a diferentes concentrações de L-arginina (15 μM , 30 μM e 50 μM) e a uma concentração fixa de inibidor (50 μM). O ajuste da equação de Michaelis-Menten às velocidades iniciais obtidas mostra que, tal como nos casos anteriores, o enzima apresenta um comportamento Michaeliano (Figura 2.6.2, **A**). O K_m^{app} do iNOS na presença de **C3** foi determinado pelo Método-Directo de Eisenthal e Cornish-Bowden (Figura 2.6.2, **B**).

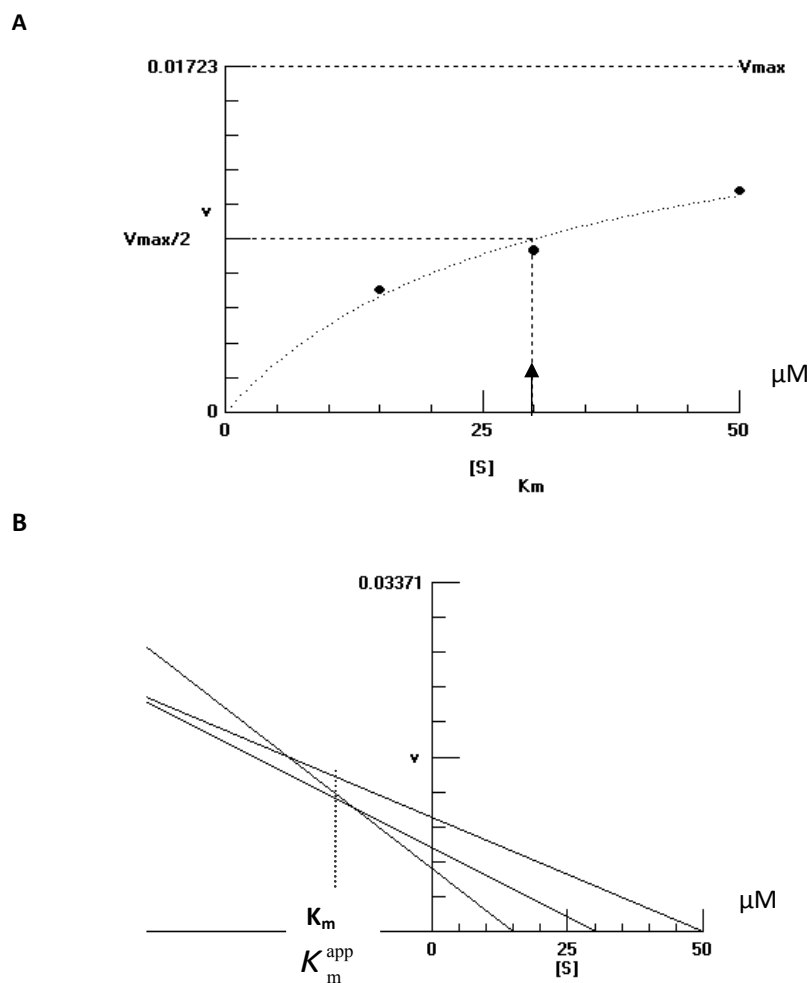


Figura 2.6.2: Representação gráfica da regressão hiperbólica (A) e do Método Directo (B), para a determinação dos parâmetros cinéticos K_m^{app} e V_{max} do iNOS na presença do inibidor C3 ($0,50 \mu\text{M}$).

A constante K_i para cada inibidor foi calculada a partir da Eq. 3, utilizando o valor de K_m obtido na ausência do inibidor calculado anteriormente ($6 \mu\text{M}$), a concentração de inibidor utilizada nos ensaios ($[I] = 50 \mu\text{M}$) e o K_m^{app} determinado experimentalmente na presença de cada um dos inibidores.

$$K_m^{app} = K_m(1 + \frac{[I]}{K_i}) \quad (\text{Eq 3})$$

Os valores de K_i do iNOS para os inibidores N^ω -nitro-L-ArgOH, **C3**, **C4**, **Re5** e **Re6** são apresentados na Tabela 2.6.2.

Tabela 2.6.2: Valores de K_i do iNOS para os inibidores N^ω -nitro-L-ArgOH, **C3**, **C4**, **Re5** e **Re6**.

Composto	K_i μM
N^ω-nitro-L-arginina	3
C3	35
C4	137
Re5	103
Re6	118

A ligação das biomoléculas à unidade quelante diminui a sua capacidade inibitória, uma vez que o K_i apresentado subiu. Uma vez mais o aumento da cadeia espaçadora não revelou o resultado desejado diminuindo ainda mais a afinidade da N^ω -NO₂-L-Arg para o enzima.

A coordenação de inibidores à unidade $fac\text{-}[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ através do ligando bifuncional leva igualmente a uma diminuição do poder inibitório para o complexo **Re5**, embora para o complexo **Re6** este efeito seja inverso quando comparado com o seu respectivo conjugado (**C4**). De facto, o poder inibitório neste caso aumentou ligeiramente após coordenação à unidade organometálica.

Estes resultados são semelhantes aos previamente descritos por B. Oliveira *et al* do Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do ITN. Nesse trabalho, foram descritos bioconjugados contendo a mesma unidade quelante (pirazolo-diamina) e um braço propilo acoplado à L-arginina (**B1**) e N^ω -nitro-L-arginina (**B2**) através de uma ligação amida formada entre o ácido carboxílico do ligando e o grupo $\alpha\text{-NH}_2$ do aminoácido. Os estudos de actividade enzimática realizados, revelaram que a introdução da L-arginina e da N^ω -nitro-L-arginina nos bioconjugados **B1** ($K_m = 57 \mu\text{M}$) e **B2** ($K_i = 178 \mu\text{M}$)

levou também a uma perda de afinidade para o iNOS. A metalação de **B1** conduziu a uma diminuição de afinidade do complexo resultante ($fac-[M(CO)_3(k^3\text{-B1})]^+$, $K_m = 245 \mu\text{M}$) para o enzima, tal como foi observado para **Re3** ($K_m = 1093 \mu\text{M}$). No caso da metalação de **B2**, o complexo resultante ($fac-[M(CO)_3(k^3\text{-B2})]^+$, $K_i = 84 \mu\text{M}$), apresenta uma maior afinidade para o enzima. Este valor é semelhante ao observado para o complexo **Re5** ($K_i = 103 \mu\text{M}$).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Numa primeira fase, sintetizaram-se e caracterizaram-se dois novos agentes quelantes bifuncionais contendo a unidade pirazolo-diamina (átomos doadores *N,N,N* para estabilização do fragmento metálico *fac*-[Re/^{99m}Tc(CO)₃]⁺) e um braço propilo (**L1**) ou hexilo (**L2**) com um grupo amina terminal livre para ligação a biomoléculas

Por conjugação de **L1** e **L2** à L-arginina (substrato do NOS) e N^ω-nitro-L-arginina (inibidor do iNOS), através de uma ligação amida entre o grupo amina livre dos ligandos e o α-COOH livre dos aminoácidos, sintetizaram-se os novos conjugados bioactivos **C1** (*L1-L-arginina*), **C2** (*L2-L-arginina*), **C3** (*L1-N^ω-nitro-L-arginina*) e **C4** (*L2-N^ω-nitro-L-arginina*). Os conjugados foram obtidos com rendimentos moderados e elevada pureza química (> 95%) após purificação por RP-HPLC semi-preparativo. A sua elevada solubilidade em solventes próticos, nomeadamente em água é uma característica relevante não só para aplicação em química radiofarmacêutica, como também para a realização de estudos enzimáticos.

Por reacção dos agentes quelantes bifuncionais modelo **L1/L2** e dos bioconjugados **C1 – C4** com o precursor [NEt₄]₂[ReBr₃(CO)₃] obtiveram-se os complexos organometálicos de Re(I) do tipo *fac*-[Re(CO)₃(k³-L)]⁺ (L = **L1**, **Re1**; **L2**, **Re2**; **C1** **Re3**; **C2** **Re4**; **C3**, **Re5**; **C4**, **Re6**), em que o ligando estabilizador actua como doador {k³-*N,N,N*}. O modo de coordenação foi inequivocamente confirmado por espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C, recorrendo-se a técnicas bidimensionais (¹H-¹H COSY e ¹H-¹³C HSQC). Desta forma, foi ainda possível verificar que as “unidades bioactivas” (*grupo guanidina e nitroguanidina*) dos conjugados coordenados se encontra disponível para interagir com o centro activo do enzima. A análise cromatográfica dos complexos **Re1-Re6** por RP-HPLC analítico demonstrou que todos os complexos apresentavam uma pureza química > 95 %.

Os complexos organometálicos radioactivos do tipo *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(k³-L)]⁺ (L = **L1**, **Tc1**; **L2**, **Tc2**; **C1** **Tc3**; **C2** **Tc4**; **C3**, **Tc5**; **C4**, **Tc6**), análogos dos complexos **Re1 – Re6**, foram preparados com bons rendimentos e pureza radioquímica elevada por reacção

de **L1/L2** e **C1 - C4** com o precursor $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. Os complexos **Tc1 - Tc6** foram estruturalmente identificados por comparação dos seus tempos de retenção nos cromatogramas de RP-HPLC com os dos correspondentes análogos “frios” **Re1 - Re6**.

Os estudos de estabilidade efectuados demonstraram que os complexos **Tc3 - Tc6** são estáveis em PBS pH 7,4 durante 24 h (37 °C). Todos os complexos testados, à excepção do complexo **Tc4**, são estáveis na presença de um excesso de histidina. A instabilidade demonstrada por **Tc4** está associada à formação do anião $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ e ao aparecimento de uma espécie mais hidrofílica.

O carácter lipofílico/hidrofílico dos complexos **Tc3 - Tc6**, avaliado por determinação do coeficiente de partição o/w, expresso em termos de $\log P_{o/w}$, permitiu concluir que os complexos apresentam um carácter hidrofílico acentuado. A presença do aminoácido N^o-nitro-L-arginina confere uma maior lipofilia aos complexos, tal como pôde ser observado nos complexos **Tc5** e **Tc6**. Os complexos com o braço hexilo (**Tc4** e **Tc6**) apresentam um maior carácter lipofílico, quando comparados com os seus análogos com o braço propilo (**Tc3** e **Tc5**).

Os parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos conjugados (**C1**, $K_m = 55 \mu\text{M}$; **C2**, $K_m > 1200 \mu\text{M}$; **C3**, $K_i = 35 \mu\text{M}$; **C4**, $K_i = 137 \mu\text{M}$) e dos complexos organometálicos de rénio (**Re3**, $K_m = 1093 \mu\text{M}$; **Re4**, $K_m > 2500 \mu\text{M}$; **Re5**, $K_i = 103 \mu\text{M}$; **Re6**, $K_i = 118 \mu\text{M}$) foram determinados pelo Método Directo de Eisenthal e Cornish-Bowden, recorrendo ao software *Hyper32*. A análise genérica dos dados obtidos nos estudos enzimáticos revelou que a conjugação dos aminoácidos (L-arginina, $K_m = 6 \mu\text{M}$; N^o-nitro-L-arginina, $K_i = 6 \mu\text{M}$) aos ligandos bifuncionais **L1** e **L2** conduziu a uma diminuição da sua afinidade para o enzima. A coordenação dos conjugados **C1 - C3** à unidade “ $\text{Re}(\text{CO})_3$ ” conduziu também a uma acentuada diminuição de afinidade para o enzima. De realçar que no caso do conjugado **C4** se assistiu a um ligeiro aumento da afinidade para o enzima apos metalação.

Estes resultados são semelhantes aos previamente descritos por B. Oliveira *et al* do Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do ITN. Nesse trabalho, foram descritos bioconjugados contendo a mesma unidade quelante (pirazolo-diamina) e um braço

propilo acoplado à L-arginina (**B1**) e N^ω-nitro-L-arginina (**B2**) através de uma ligação amida formada entre o ácido carboxílico do ligando e o grupo α-NH₂ do aminoácido. Os estudos de actividade enzimática realizados, revelaram que a introdução da L-arginina e da N^ω-nitro-L-arginina nos bioconjugados **B1** (K_m = 57 μM) e **B2** (K_i = 178 μM) levou também a uma perda de afinidade para o iNOS. A metalação de **B1** conduziu a uma diminuição de afinidade do complexo resultante (*fac*-[M(CO)₃(k³-**B1**)]⁺, K_m = 245 μM) para o enzima, tal como foi observado para **Re3** (K_m = 1093 μM). No caso da metalação de **B2**, o complexo resultante (*fac*-[M(CO)₃(k³-**B2**)]⁺, K_i = 84 μM), apresenta uma maior afinidade para o enzima. Este valor é semelhante ao observado para o complexo **Re5** (K_i = 103 μM).

Em conclusão, pode dizer-se que a conjugação da L-arginina (substrato do NOS) e da N^ω-nitro-L-arginina (inibidor do iNOS) ao agente quelante através de uma ligação amida envolvendo o grupo amina do agente quelante e o grupo α-COOH do aminoácido não melhorou a afinidade dos complexos organometálicos do tipo *fac*-[Re(CO)₃(k³-L)]⁺ (L = conjugado contendo a unidade quelante pirazolo-diamina e análogos da L-arginina) para o iNOS. Por outro lado, também o aumento do comprimento da cadeia espaçadora entre a unidade quelante e a unidade bioactiva aminoácido não conduziu a um aumento de afinidade para o enzima. De facto, a presença do braço hexilo em **C2**, **C4**, **Re4** e **Re6** conduziu a uma diminuição da afinidade destes compostos para o iNOS, comparativamente aos compostos análogos **C1**, **C3**, **Re3** e **Re4** que contêm uma cadeia propilo.

A melhoria da afinidade/selectividade para o iNOS deverá passar pelo desenvolvimento de biocomplexos do tipo *fac*-[M(CO)₃(k³-L)]⁺ (M = Re, ^{99m}Tc) contendo conjugados com a unidade quelante pirazolo-diamina ligados a compostos conhecidos com uma maior actividade inibitória para o iNOS. Um exemplo de um desses compostos poderá ser a N-(3-(aminometil)benzil)acetamida.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Condições gerais.

3.1.1. Solventes e Reagentes.

Os reagentes e solventes foram utilizados tal como adquiridos sem qualquer purificação adicional, excepto quando expressamente indicado. Sempre que foi necessário trabalhar em atmosfera inerte, utilizaram-se solventes secos de acordo com procedimentos da literatura.^[78]

3.1.2. Técnicas de caracterização.

3.1.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos num espectrómetro Varian Unity Inova-300, com uma frequência de ressonância de 300 MHz e à temperatura ambiente. Os solventes deuterados utilizados foram o CDCl_3 e a D_2O . Os desvios químicos dos sinais foram medidos utilizando como referência interna o desvio químico residual do solvente relativamente ao tetrametilsilano. Os desvios químicos dos sinais de ^{13}C em D_2O foram obtidos usando como referência externa uma solução de dioxano.

3.1.2.2. Espectrometria de massa (ESI-MS).

Os compostos sintetizados foram analisados por espectrometria de massa com ionização por electrospray num espectrómetro de massa ESI/QITMS Bruker HCT. Os espectros de massa (ESI-MS) foram realizados pelo Doutor Joaquim Marçalo da Unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas do ITN.

O equipamento QITMS foi adquirido com o apoio do Programa Nacional de Re-equipamento Científico (Contrato Rede/1503/REM/2005 - ITN) da Fundação para a

Ciência e a Tecnologia e é parte integrante da RNEM – Rede Nacional de Espectrometria de Massa.

3.1.2.3. Espectroscopia de IV.

Os espectros de IV foram obtidos num espectrómetro Perkin-Elmer 577. As amostras foram preparadas sob a forma de pastilhas de KBr.

3.1.3. *Técnicas de purificação.*

3.1.3.1. Cromatografia em camada fina.

A cromatografia em camada fina (TLC) foi utilizada para seguir as reacções de síntese química e para identificar os produtos da reacção. Foram usadas tiras de sílica-gel MERCK 60-F254 em suporte de alumínio com 0,2 mm de espessura. Estas placas foram reveladas com radiação UV (254 nm), com iodo ou com uma solução de ninidrina (3 % p/v numa solução de 5 % de ácido acético em metanol).

3.1.3.2. Cromatografia em coluna.

A cromatografia em coluna foi realizada utilizando sílica gel 70-230 mesh ASTM MERCK. Para este efeito foram utilizadas colunas de vidro com a dimensão apropriada à quantidade de amostra a purificar. O enchimento foi preparado com uma mistura de sílica gel e de eluente adequado para permitir a separação do composto pretendido. As fracções recolhidas, foram controladas por TLC, e concentradas recorrendo a um evaporador rotativo e à linha de vazio.

3.1.3.3. Cromatografia de alta eficiência (HPLC).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para efeitos de controlo analítico e purificação dos diferentes compostos sintetizados. As análises de

HPLC foram feitas num sistema Perkin-Elmer LC pump 200 (binário) acoplado a um detector UV/Vis (shimadzu SPD-10AV ou Perkin Helmer Lc 290) e a um detector radiométrico Berthold LB-507A.

Todos os solventes utilizados eram de qualidade HPLC. A água utilizada foi bidestilada em aparelho de quartzo. Todos os solventes foram filtrados por filtro Millipore de 0,22 µm e desarejados com hélio ou em banho de ultrassons.

Os gradientes de eluição utilizados na análise e purificação dos compostos por HPLC são descritos na tabelas seguintes:

Tabela 3.1.3.1: Sequência de eluição do **Método 1**.

Tempo	Solvente A	Solvente B
	TFA 0,1 % (%)	CH ₃ OH (%)
0 - 5	90	10
5 - 30	90 -> 0	10 -> 100
30 - 34	0	100
34 - 35	0 -> 90	100 -> 10
35 - 40	90	10

O **Método 1** foi utilizado essencialmente para a análise e purificação dos ligandos bifuncionais **L1** e **L2** e respectivos complexos de rénio (**Re1** e **Re2**) e ^{99m}Tc (**Tc1** e **Tc2**). A purificação dos conjugados (**C1** – **C4**) e complexos de rénio (**Re3** – **Re6**) foram também efectuadas por este método.

Tabela 3.1.3.2: Sequência de eluição do Método 2.

Tempo	Solvente A	Solvente B
	TFA 0,1 %	CH ₃ OH
	(%)	(%)
0 - 3	100	0
3 - 3,1	100 -> 75	0 -> 25
3,1 - 9	75	25
9 - 9,1	75 -> 66	25 -> 34
9,1 - 18	66 -> 0	34 -> 100
18 - 25	0	100
25 - 25,1	0 -> 100	100 -> 0
25,1 - 30	100	0

O **Método 2** foi utilizado para análise e caracterização dos conjugados (**C1 – C4**, e respectivos complexos de rénio (**Re3 – Re6**) e ^{99m}Tc (**Tc3 – Tc6**).

As condições cromatográficas para controlo analítico e purificação dos compostos sintetizados foram as seguintes:

- **Condições A**

Coluna: Analítica, EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 Macherey Nagel

Pré-coluna: EP 30/8 Nucleosil 100-7 C18, Macherey Nagel

Fluxo: 0,5 mL/min

Deteção Uv: 254 nm ou 220 nm

- **Condições B**

Coluna: Semi-preparativa, EP 250/8 Nucleosil 100-7 C18 Macherey Nagel

Pré-coluna: EP 30/8 Nucleosil 100-7 C18, Macherey Nagel

Fluxo: 2 mL/min

Detecção Uv: 254 nm ou 220 nm

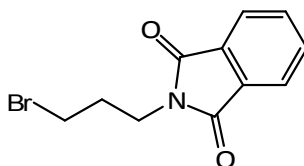
3.2. Síntese dos ligandos bifuncionais L1 e L2.

3.2.1. Materiais de partida.

Os precursores *tert*-butil (2-([2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil]-amino)etil)carbamato e $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$ foram sintetizados de acordo com os métodos descritos na literatura.⁵⁶

3.2.2. Síntese dos ligandos bifuncionais L1 e L2 e dos complexos Re1 e Re2.

3.2.2.1. Síntese de 3-bromo-propilftalimida.



III

Uma solução de ftalimida de potássio (4,19 g, 22,12 mmol) e dibromopropano (6,7 mL, 66,16 mmol; I) em acetonitrilo (100 mL) foi refluxada durante 6 horas. De seguida, eliminou-se por filtração o KBr que precipitou durante a reacção e evaporou-se o solvente. O composto obteve-se na forma de um pó branco, após recristalização de metanol metanol a -20 °C.⁵⁷

Rendimento: 57 % (3,40 g, 12,73 mmol).

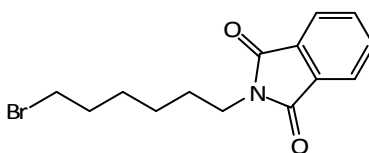
⁵⁶

⁵⁷

¹H-RMN (CDCl₃): δ(ppm) 7,74 (m, aromáticos/ftalimida, 2H), 7,64 (m, aromáticos/ftalimida, 2H), 3,64 (t, CH₂, 2H), 3,32 (t, CH₂, 2H), 1,83-1,74 (m, CH₂, 2H).

¹³C-RMN (CDCl₃): δ(ppm) 168,7 (C=O), 123,0-134,1 (aromáticos/ftalimida), 38,1 (CH₂), 33,9 (CH₂), 32,8 (CH₂).

3.2.2.2. Síntese de 3-bromo-hexilftalimida.



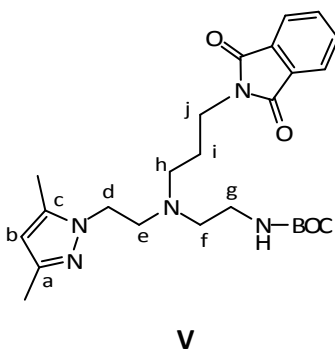
IV

Uma solução de ftalimida de potássio (3,09 g 16,02 mmol) e dibromohexano (7,4 mL, 49,15 mmol; II) em acetonitrilo (100 mL) foi refluxada durante 6 horas. De seguida, eliminou-se por filtração o KBr que precipitou durante a reacção e evaporou-se o solvente. O composto obteve-se na forma de um pó branco, após purificação por coluna em sílica gel (eluente: MeOH/CH₂Cl₂ 20/80).

Rendimento: 56 % (2,80 g, 9,02 mmol).

¹H-RMN (CDCl₃): δ(ppm) 7,81 (m, aromáticos/ftalimida, 2H), 7,68 (m, aromáticos/ftalimida, 2H), 3,66 (t, CH₂, 2H), 3,37 (t, CH₂, 2H), 1,84 (m, CH₂, 2H), 1,69-1,64 (m, CH₂, 2H), 1,48-1,34 (m, CH₂, 4H).

3.2.2.3. Síntese de tert-butil 2-((2-(3,5-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etil)(3-(1,3-dioxoisindolino-2-il)propil)amino)etilcarbamato.

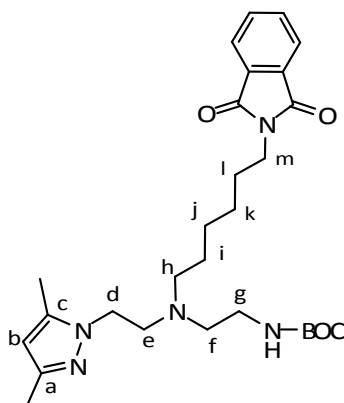


Uma suspensão de 3-bromo-propilftalimida (2,14 g, 8,05 mmol), *tert*-butil (2-[[2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil]-amino]etil)carbamato (1,11 g, 40,08 mmol) e K_2CO_3 (1,10 g, 8,0 mmol) em dioxano (35 mL) foi refluxada durante a noite. Após reacção, deixou-se arrefecer a mistura e filtrou-se. Evaporou-se o solvente até resíduo seco e purificou-se o composto por cromatografia em coluna de sílica-gel. Usou-se um gradiente de acetato de etilo/*n*-Hexano (85/15) e obteve-se o composto sob a forma de um óleo amarelado.^[44]

Rendimento: 79% (1,45 g, 31,03 mmol).

¹H-RMN (CDCl₃): δ(ppm) 7,85 (m, aromáticos/ftalimida, 2H), 7,72 (m, aromáticos/ftalimida, 2H) 5,74 (s, **H**(4)pz, 1H), 5,15 (s, NH-Boc, 1H), 3,96 (t, **CH**₂^d, 2H), 3,61 (t, **CH**₂^e, 2H), 3,05 (m, **CH**₂^f, 2H), 2,78 (t, **CH**₂^h, 2H), 2,46 (q, **CH**₂^g/**CH**₂ⁱ, 2H), 2,20 (s, **CH**₃pz, 3H), 2,15 (s, **CH**₃pz, 3H), 1,76-1,66 (m, **CH**₂^j, 2H), 1,39 (s, **CH**₃, 9H).

3.2.2.4. Síntese de *tert*-butil 2-((2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)(6-(1,3-dioxoisindolino-2-il)hexil)amino)etilcarbamate.



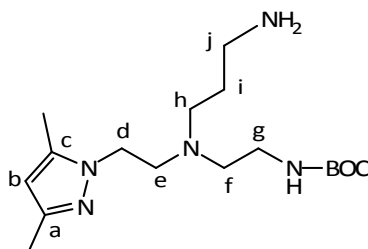
VI

Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.2.2.3., partindo do intermediário II (1,85 g, 3,51 mmol) e do *tert*-butil 2-([2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil]-amino)etil)carbamato (0,49 g, 1,70 mmol). O produto foi obtido na forma de um sólido branco após purificação por cromatografia em sílica gel (acetato de etilo/*n*-hexano; 70/30) e evaporação dos solventes.

Rendimento: 47% (0,45 g, 0,80 mmol).

¹H-RMN (CDCl₃): δ(ppm) 7,81 (m, aromáticos/ftalimida, 2H), 7,68 (m, aromáticos, 2H), 5,73 (s, **H^b**(4)pz, 1H), 5,04 (s, NH, 1H), 3,93 (t, **CH^d**₂, 2H), 3,64 (t, **CH^e**₂, 2H), 3,03 (m, **CH^f**₂, 2H), 2,75 (t, **CH^g**₂, 2H), 2,46 (t, **CH^h**₂, 2H), 2,38 (t, **CH^m**₂), 2,20 (s, **CH₃**pz, 3H), 2,17 (s, **CH₃**pz, 3H), 1,67-1,57 (m, **CHⁱ**₂, **CH^l**₂, 4H), 1,30-1,20 (m, **CH^j**₂, **CH^k**₂, 4H).

3.2.2.5. Síntese de *tert*-butil 2-((3-aminopropil)(2-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)etil)amino)etilcarbamato (L1BOC).



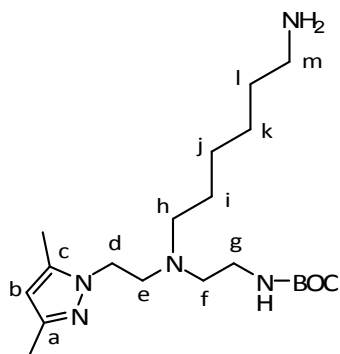
L1BOC

Uma suspensão de **III** (1,45 g 3,11 mmol) e hidrazina hidratada (3,01 mL, 63,20 mmol) em metanol (20 mL) seco foi refluxada durante 6 horas. Após este período, adicionou-se HCl 37%, precipitando um sólido branco. A mistura reaccional foi filtrada e o pH ajustado até 7 por adição de NaOH 1M. A fase aquosa foi extraída com CHCl₃ (3 x 30 mL), sendo a fase orgânica total obtida seca com MgSO₄ anidro. Após filtração e purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (MeOH/CHCl₃; 10/90) o solvente foi evaporado e o composto foi obtido sob a forma de um óleo amarelado.

Rendimento: 68% (1,12 g 2,11 mmol).

¹H-RMN (CDCl₃): δ(ppm) 5,75 (s, H^b(4)pz, 1H), 5,28 (s (largo), NH₂, 1H), 3,96 (t, CH^d₂, 2H), 3,07 (m, CH^e₂, 2H), 2,76 (t, CH^f₂, 2H), 2,60 (t, CH^g₂, 2H), 2,48 (m, CH^h₂/CHⁱ₂, 4H), 2,21 (s, CH₃pz, 3H), 2,19 (s, CH₃pz, 3H), 1,50-1,45 (m, CHⁱ₂, 2H), 1,42 (s, CH₃(BOC), 9H).

3.2.2.6. Síntese de tert-butil 2-((6-aminoheíl)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)etilcarbamato (L2BOC) .



L2BOC

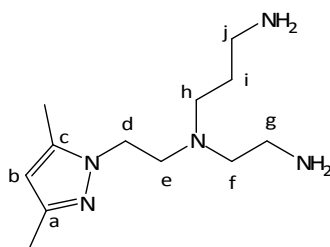
Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.2.2.5., partindo do intermediário **IV** (0,46 g, 0,81 mmol) e hidrazina hidratada (0,86 mL, 17,12 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo amarelado após purificação por coluna em sílica gel (MeOH/CHCl₃; 5/95) e evaporação dos solventes.

Rendimento: 90% (0,33 g, 0,83 mmol).

¹H-RMN (D₂O): δ(ppm) 5,70 (s, H^b(4)pz, 1H), 5,02 (s (largo), NH₂, 1H), 3,91 (t, CH^d₂, 2H), 3,00 (m, CH^e₂, 2H) 2,72 (t, CH^f₂, 2H), 2,62 (t, CH^g₂, 2H) 2,44 (t, CH^h₂, 2H), 2,35 (t, CH^m₂,

2H), 2,17 (s, CH₃pz, 3H), 2,15 (s, CH₃pz, 3H), 1,55 (m, CH₂ⁱ, 2H), 1,23 (m, CH₂^j/CH₂^k/CH₂^l, 6H).

3.2.2.7. Síntese de (2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)propano-1,3-diamina (L1).



L1

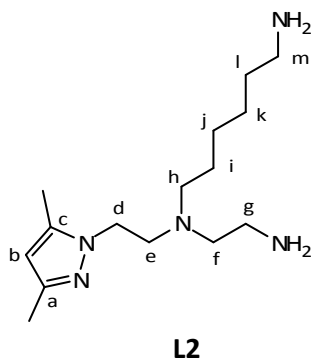
A uma solução de **L1BOC** (0,06 g, 0,22 mmol) em CH₂Cl₂ (1 mL) adicionou-se ácido trifluoroacético (1mL) e deixou-se reagir sob agitação, à temperatura ambiente, durante 3h. Após evaporação do solvente, obteve-se um óleo amarelado que foi dissolvido em H₂O. A água foi evaporada sob vácuo e o resíduo obtido foi extraído com metanol. Os sólidos formados foram eliminados por centrifugação e o sobrenadante evaporado. O óleo obtido foi redissolvido numa solução de H₂O, filtrado por um filtro Millipore de 0,22 µm e purificado por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição. Rendimento: 73 % (0,04 g, 0,17 mmol).

¹H-RMN (D₂O): δ(ppm) 5,83 (s, H^b(4)pz, 1H), 5,28 (s (largo), NH₂, 1H), 3,96 (t, CH₂^d, 2H), 2,85 (t, CH₂^e, 2H), 2,76 (m, H₂^f/H₂^g, 4H), 2,66 (m, CH₂^h, 2H), 2,51 (t, CH₂ⁱ, 2H), 2,11 (s, CH₃pz, 3H), 2,01 (s, CH₃pz, 3H), 1,61 (q, H₂^j, 2H).

¹³C-RMN (D₂O): δ(ppm) 151,2 (C^c), 144,1 (C^a), 107,9 (C^b(4)pz), 54,5 (C^e), 52,8 (C^f), 52,5 (C^d) 47,9 (C^h), 39,9 (C^j), 39,28 (C^g), 26,2 (Cⁱ), 14,4 (CH₃pz), 12,5 (CH₃pz).

HPLC (t_R): 16,8 min. (**Método 1, Condições A**, λ = 220 nm).

3.2.2.8. Síntese de (2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)hexano-1,6-diamina (L2).



Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.2.2.7., partindo do intermediário **L2BOC** (0,080 g, 0,20 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após purificação por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**).

Rendimento: 80% (0,050 g, 0,16 mmol).

HPLC (t_R): 18,2 min (**Método 1, Condições A**, $\lambda=220\text{nm}$).

^1H -RMN (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 6,03 (s, $\text{H}^b(4)\text{pz}$, 1H), 4,42 (t, CH^d_2 , 2H), 3,59 (t, CH^e_2 , 2H), 3,49 (m, CH^f_2 , 2H), 3,34 (m, CH^g_2 , 2H), 2,15 (m, CH^h_2 , 2H), 2,85 (t, CH^m_2), 2,20 (s, CH_3pz , 3H), 2,12 (s, CH_3pz , 3H), 1,54 (m, CH^i_2 , CH^l_2 , 4H), 1,23 (m, CH^j_2 , CH^k_2 , 4H).

^{13}C -RMN (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 150,3 (C^c), 144,2 (C^a), 107,1 ($\text{C}^b(4)\text{pz}$), 54,0 (C^e), 51,9 (C^f), 49,8 (C^d), 42,2 (C^m), 39,3 (C^h), 33,8 (C^g), 26,7 (C^l), 25,4 (C^i), 25,3 (C^k), 22,9 (C^j), 11,8 (CH_3pz), 10,2 (CH_3pz).

HPLC (t_R): 18,2 min. (**Método 1, Condições A**, $\lambda=220\text{nm}$).

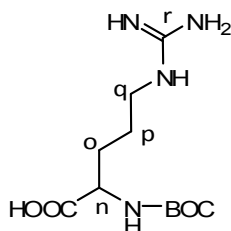
ESI-MS (+) (m/z): 141 [$\text{M} + \text{H}$] $^{2+}$, calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{N}_5 = 281$.

IV (KBr , cm^{-1}): 3420 F $\nu(\text{NH}_2)$; 1630 F $\delta(-\text{NH}_2)$; 1220 F $\nu(\text{C-N})$ 858 f; 812 f; 742 f.

3.3. Síntese dos aminoácidos protegidos BOC-L-arginina e BOC-N^ω-nitro-L-arginina e dos conjugados C1 - C4.

3.3.1. Síntese dos dos aminoácidos BOC-L-arginina e BOC-N^ω-nitro-L-arginina.

3.3.1.1. Síntese do ácido (L)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-5-guanidinopentanoico (BOC-L-arginina).



BOC-L-arginina

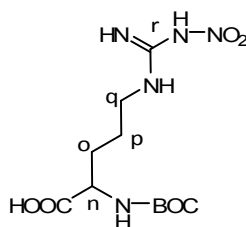
Num balão de fundo redondo dissolveu-se a L-arginina (0,51 g, 2,91 mmol) numa mistura de dioxano (2 mL) e de NaOH 1M (2 mL). Seguidamente, adicionou-se lentamente o (BOC₂)O (0,77 g, 3,5 mmol) a 0°C, e deixou-se reagir durante 5 h. Após filtração por celite, lavou-se a fase aquosa com éter dietílico (3 x 15 mL), levou-se a pH neutro com uma solução de NaOH 0,5 M e lavou-se novamente com CHCl₃ (3 x 15 mL). A evaporação da fase aquosa originou um sólido branco que foi redissolvido em *n*-butanol e novamente filtrado. O sobrenadante foi recolhido e após evaporação do solvente obteve-se o respectivo produto final.

Rendimento: 30 % (0,23 mg, 0,88 mmol).

¹H-RMN (D₂O): δ(ppm) 3,79 (s (largo), CHⁿ, 1H), 3,06 (m, CH^q₂, 2H), 1,60 (m, CH^o, 1H), 1,54-1,36 (m, CH^o/₂CH^f₂, 3H), 1,28 (s, CH₃(BOC), 3H).

¹³C-RMN (D₂O): δ(ppm) 178,9 (C=O), 158,7 (C=O (BOC)), 157,8 (C^r), 80,2 (C(CH₃), (BOC)), 56,1 (Cⁿ), 42,1 (C^q), 31,2 (C^o), 28,8 (C(CH₃) (BOC)), 26,3 (C^p).

3.3.1.2. Síntese do ácido (L)-2-(tert-butoxicarbonilamino)-5-(3-nitroguanidino)pentanoico (BOC-N^ω-nitro-L-arginina).



BOC-N^ω-nitro-L-arginina

Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.3.1.1., partindo do composto N^ω-nitro-L-arginina (1,86 g, 4,90 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após purificação por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**).

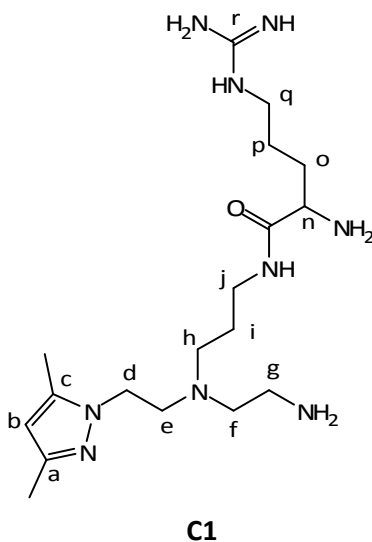
Rendimento: 87% (1,36 g, 4,72 mmol).

¹H-RMN (D₂O): δ(ppm) 3,83 (m (largo), CHⁿ, 1H), 3,11 (m, CH^q₂, 2H), 1,71-1,69 (m, CH^{o'}, 1H), 1,55-1,49 (m, CH^{o''}/CH^f₂, 3H), 1,27 (s, CH₃(BOC), 3H).

¹³C-RMN (D₂O): δ(ppm) 178,9 (C=O), 158,7 (C=O (BOC)), 157,8 (C^f), 80,2 (C(CH₃), (BOC)), 56,1 (Cⁿ), 42,1 (C^q), 31,2 (C^o), 28,8 (C(CH₃) (BOC)), 26,3 (C^p). **ISTO É IGUAL AO ANTERIOR NÃO É??**

3.3.2. Síntese dos Conjugados **C1** e **C2**.

3.3.2.1. Síntese do (L)-2-amino-N-(3-((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)propil)-5-guanidinopentanamida (**C1**).



Dissolveu-se o aminoácido protegido BOC-L-arginina(PBF) (51 mg , 0,10 mmol), HOBT (16,5 mg, 0,12 mmol) e diciclohexil carbodiimida (25 mg; 0,12 mmol) em 2 mL de DMF, à temperatura ambiente. Após 1 h de activação, colocou-se a mistura em banho de gelo e adicionou-se, gota-a-gota, uma solução de **L1BOC** (0,03 g ; 0,10 mmol) em CH₂Cl₂. De seguida adicionou-se DIPEA (0,03 mL, 0,20 mmol) e deixou-se a reacção sob agitação durante 18 horas à temperatura ambiente (controlo por TLC: MeOH/CH₂Cl₂/NH₄OH, 10:89:1). Terminou-se a reacção adicionando H₂O (4 mL) e removeu-se a ureia formada por filtração com celite. Após lavagem da fase aquosa com acetato de etilo (3x15 mL) e evaporação do solvente obteve-se um resíduo amarelado, que foi purificado por cromatografia de sílica gel (MeOH/CH₂Cl₂/NH₄OH ; 5:89:1).

Ao produto purificado adicionou-se, ácido trifluoroacético (TFA, 1 mL) e CH₂Cl₂ (1 mL) e deixou-se reagir sob agitação, à temperatura ambiente, durante 3h. Após evaporação do solvente obteve-se um óleo amarelado que foi dissolvido em H₂O. A água foi evaporada sob vácuo e o resíduo obtido foi extraído com metanol. Os sólidos formados foram eliminados por centrifugação e o sobrenadante evaporado. O óleo

obtido foi redissolvido em H₂O, filtrado por um filtro Millipore de 0,22 µm e purificado por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**, λ = 220nm). O produto foi obtido na forma de um óleo amarelado após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 66% (26 mg, 0,09 mmol)

¹H-RMN (D₂O): δ(ppm) 5,99 (s, H^b(4)pz, 1H), 4,37 (s (largo), CH^d₂, 2H), 3,86 (t, CHⁿ, 1H), 3,49 (m, CH^e₂, 2H), 3,39 (m, CH^f₂, 2H) 3,32 (t, CH^g₂, 2H), 3,24-3,06 (t, CH^q₂/CH^h₂/CHⁱ₂) 2,19 (s, CH₃pz, 3H), 2,10 (s, CH₃pz, 3H), 1,81 (m, CH^o₂/CHⁱ₂, 4H), 1,53 (m, CH^p₂, 2H).

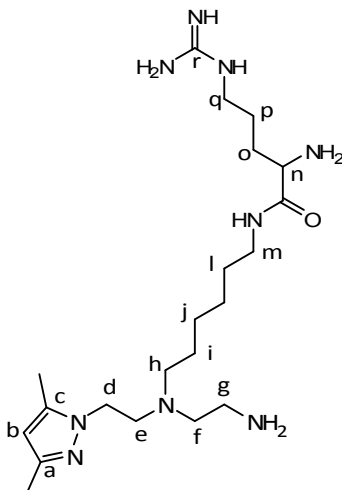
¹³C-RMN (D₂O): δ(ppm) 169,9 (C=O), 156,9 (C^r), 148,9 (C^c(3)pz), 144,4 (C^a(5)pz), 107,3 (C^b(4)pz), 52,9 (Cⁿ), 51,8 (C^h), 51,7 (C^e) 49,9 (C^f), 42,2 (C^d), 40,4 (C^q), 36,4 (C^j), 33,9 (C^g), 28,1 (Cⁱ), 23,8 (C^o), 23,4 (C^p), 11,5 (CH₃pz), 10,1(CH₃pz).

HPLC (t_R): 18,7 min. (**Método 2, Condições A**, λ = 220nm).

ESI-MS (+) (m/z): 199 [M + H]²⁺, calculada para C₁₈H₃₇N₉O = 395.

IV (KBr, cm⁻¹): 3445 M v(NH₂, NH); 1612 F v(C=O), δ(NH₂), δ(NH, amida), 1480 f v(CN, amida); 1220 e 1137 F v(C-N); 909 f, 836 f, 765 f.

3.3.2.2. Síntese do (L)-2-amino-N-(6-((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)hexil)-5-guanidinopentanamida (**C2**).



C2

Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.3.2.1., partindo do BOC-L-arginina(PBF) (0,15 g, 0,28 mmol) e do intermediário **L2BOC** (0,10 mg, 0,28 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após purificação por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**, $\lambda = 220\text{nm}$) e evaporação dos solventes.

Rendimento: 48% (0,06 g, 0,13 mmol).

^1H -RMN (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 6,02 (s, $\text{CH}^b(4)\text{pz}$, 1H), 4,42 (t, CH^d_2 , 2H), 3,83 (t, CH^n , 1H), 3,69 (t, CH^e_2 , 2H), 3,51 (m, CH^f_2 , 2H) 3,35 (m, $\text{CH}^{g'}/\text{CH}^{g''}$, 2H), 3,13 (m, $\text{CH}^a_2/\text{CH}^h_2/\text{CH}^m_2$, 6H), 2,21 (t, CH_3pz , 3H), 2,13 (s, CH_3pz , 3H), 1,78 (m, CH^o_2 , 2H) 1,55-1,49 (m, $\text{CH}^i_2/\text{CH}^p_2$, 4H), 1,42-1,32 (m, CH^l_2 , 2H), 1,22 (m, $\text{CH}^j_2/\text{CH}^k_2$, 4H).

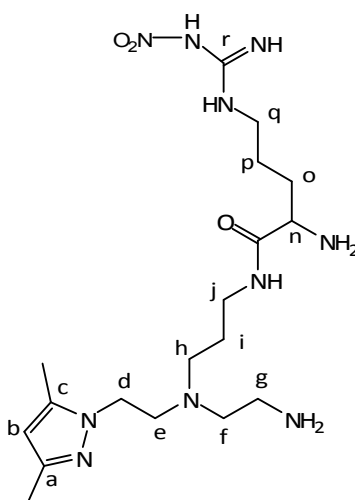
^{13}C -RMN (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 169,6 ($\text{C}=\text{O}$), 156,8 (C^r), 148,2 ($\text{C}^c(3/5)\text{pz}$), 145,8 ($\text{C}^a(3/5)\text{pz}$), 107,9 (C^b), 53,9 (C^q), 52,9 (C^n), 51,0 (C^e), 49,7 (C^f), 42,0 (C^d), 40,3 (C^m), 39,4 (C^h), 33,6 (C^g), 28,0 (C^o/C^l), 25,6 (C^p), 25,2 (C^i), 23,7 (C^k), 22,8 (C^j), 10,9 (CH_3pz), 10,1(CH_3pz).

HPLC (t_R): 19,5 min. (**Método 2, Condições A**, $\lambda = 220\text{nm}$).

ESI-MS (+) (m/z): 220 $[\text{M} + \text{H}]^{2+}$, 439 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O} = 438$.

IV (KBr, cm^{-1}): 3312 M $\nu(\text{NH}_2, \text{NH})$; 1671 F $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{NH}_2)$, $\delta(\text{NH}, \text{amida})$, 1421 f $\nu(\text{CN}, \text{amida})$; 1209 e 1190 F $\nu(\text{C-N})$; 898 f, 823 f, 748 f.

3.3.2.3. Síntese do (L)-2-amino-N-(3-((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)propil)-5-(3-nitroguanidino)pentanamida (**C3**).



C3

Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.3.2.1., partindo da BOC-Nw-nitro-L-arginina (0,12 g, 0,36 mmol) e de **L1BOC** (0,12 g, 0,36 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após purificação por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**, $\lambda = 220\text{nm}$) e evaporação dos solventes.

Rendimento: 87% (0,057 g, 0,11 mmol).

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 6,15 (s, $\text{H}^{\text{b}}(4)\text{pz}$, 1H), 4,53 (t, CH^{d}_2 , 2H), 3,84 (t, CH^{n} , 1H), 3,57 (t, CH^{e}_2 , 2H), 3,48 (m, CH^{f}_2 , 2H), 3,34 (m, CH^{g}_2 , 2H), 3,20 (t, $\text{CH}^{\text{q}}_2/\text{CH}^{\text{h}}_2/\text{CH}^{\text{j}}_2$), 2,22 (s, CH_3pz , 3H), 2,16 (s, CH_3pz , 3H), 1,77 (m, $\text{CH}^{\text{o}}_2/\text{CH}^{\text{i}}_2$, 4H), 1,54-1,50 (m, CH^{p}_2 , 2H).

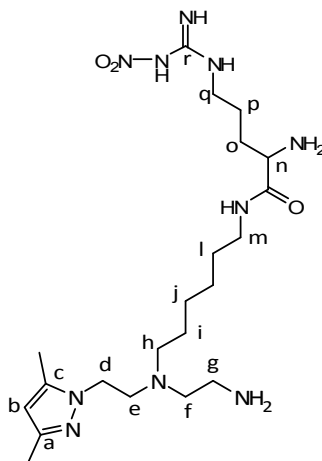
$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 169,9 ($\text{C}=\text{O}$), 158,9 (C^{r}), 148,2 ($\text{C}^{\text{c}}(3)\text{pz}$), 146,7 ($\text{C}^{\text{a}}(5)\text{pz}$), 108,2 ($\text{C}^{\text{b}}(4)\text{pz}$), 52,9 (C^{n}), 51,7 (C^{h}), 51,1 (C^{e}), 49,8 (C^{f}), 42,0 (C^{d}), 40,3 (C^{q}), 36,5 (C^{j}), 33,7 (C^{g}), 28,1 (C^{i}), 23,2 (C^{p} , C^{o}), 11,5 (CH_3pz), 10,1 (CH_3pz).

HPLC (t_{R}): 21,1 min. (**Método 2, Condições A**, $\lambda = 220\text{nm}$).

ESI-MS (+) (m/z): 441 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 221 $[\text{M} + \text{H}]^{2+}$, calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_{10}\text{O}_3 = 440$.

IV (KBr, cm^{-1}): 3405 M $\nu(\text{NH}_2, \text{NH})$; 1680 F $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{NH}_2)$, $\delta(\text{NH}, \text{amida})$ e $\nu(\text{NO}_2)$; 1427 M $\nu(\text{CN}, \text{amida})$; 1279 M $\nu(\text{NO}_2)$; 1203 e 1134 M $\nu(\text{C}-\text{N}, \text{aminas } 1^{\text{as}} \text{ e } 2^{\text{as}})$, 846 f, 800 f, 722.

3.3.2.4. Síntese do (L)-2-amino-N-(6-((2-aminoetil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino)hexil)-5-(3-nitroguanidino)pentanamida (**C4**).



C4

Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.3.2.1. partindo do BOC- N^{ω} -nitro-L-arginina (0,13 g, 0,39 mmol) e de **L2BOC** (0,15 g, 0,39 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após purificação por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**, $\lambda = 220\text{nm}$) e evaporação dos solventes.

Rendimento: 72% (0,120 g, 0,28 mmol).

^1H -RMN (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 6,16 (s, H^{b} (4)pz, 1H), 4,55 (t, CH^{d}_2 , 2H), 3,81 (t, CH^{n} , 1H), 3,59 (t, CH^{e}_2 , 2H), 3,53 (m, CH^{f}_2 , 2H) 3,35 (m, CH^{g}_2 , 2H), 3,21-3,13 (m, $\text{CH}^{\text{q}}_2/\text{CH}^{\text{h}}_2/\text{CH}^{\text{j}}_2$) 2,24 (s, CH_3pz , 3H), 2,18 (s, CH_3pz , 3H), 1,75 (m, $\text{CH}^{\text{o}}_2/\text{''}$, 2H), 1,54-1,50 (m, CH^{p}_2 , CH^{i}_2 , 4H) 1,34 (m, CH^{l}_2 , 2H), 1,17 (m, $\text{CH}^{\text{k}}_2/\text{CH}^{\text{m}}_2$, 4H).

^{13}C -RMN (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 169,2 ($\text{C}=\text{O}$), 158,7 (C^f), 147,9 ($\text{C}^c(3/5)\text{pz}$), 146,8 ($\text{C}^a(3/5)\text{pz}$), 108,4 (C^b), 53,9 (C^g), 53,0 (C^n), 50,8 (C^e), 49,7 (C^f), 42,0 (C^d), 40,3 (C^m), 39,5 (C^h), 33,7 (C^g), 28,1 (C^o/C^l), 25,8 (C^p), 25,3 (C^i), 23,3 (C^k), 22,8 (C^j), 10,6 (CH_3pz), 10,2 (CH_3pz).

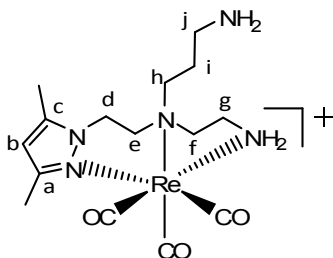
HPLC (t_R): 23,1 min. (**Método 2, Condições A**, $\lambda = 220\text{nm}$).

ESI-MS (+) (m/z): 242 $[\text{M} + \text{H}]^{2+}$, calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{N}_{10}\text{O}_3 = 482$.

IV (KBr , cm^{-1}): 3255 M $\nu(\text{NH}_2, \text{NH})$; 1654 F $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(\text{NH}_2)$, $\delta(\text{NH}, \text{amida})$ e $\nu(\text{NO}_2)$; 1396 M $\nu(\text{CN}, \text{amida})$; 1275 M $\nu(\text{NO}_2)$; 1203 e 1133 M $\nu(\text{C-N}, \text{aminas } 1^{\text{as}} \text{ e } 2^{\text{as}})$, 834 f, 801 f, 722.

3.4. Síntese dos complexos Re1 a Re6.

3.4.1. Síntese de $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L1})]^+$ (Re1).



Re1

O complexo **Re1** foi obtido por reação de uma solução aquosa do precursor $(\text{NEt}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ (0,03 g, 0,13 mmol) com o ligando **L1** (0,03 mg, 0,13 mmol), durante aproximadamente 18 horas sob atmosfera de azoto. O produto bruto foi purificado por RP-HPLC de acordo com os procedimentos anteriormente descritos (**Método 1, Condições B**, $\lambda = 254\text{nm}$). O produto foi obtido na forma de um óleo amarelado após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 76 % (0,053 g,).

^1H -RMN (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 6,07 (s, $\text{CH}^b(4)\text{pz}$, 1H), 5,14 (s (largo), NH , 1H), 4,35 (dd, $\text{CH}^{d'}$, 1H), 4,13 (dd, $\text{CH}^{d''}$, H), 3,71-3,59 (m, $\text{NH}/\text{CH}^{h'}$, 2H), 3,44 (dd, $\text{CH}^{h''}$, 2H), 3,32 (dd, $\text{CH}^{e'}$, 1H).

1H), 3,11 (m, CH^g, 1H), 2,98 (t, CH₂ⁱ, 2H), 2,77 (m, CH₂^f, 2H), 2,63 (dd, CH^{e''}, 1H), 2,53-2,41 (m, CH^{g''}, 1H), 2,30 (s, CH₃pz, 3H), 2,19 (s, CH₃pz, 3H) 2,09-2,00 (m, CH^{i'}/CH^{i''}, 2H).

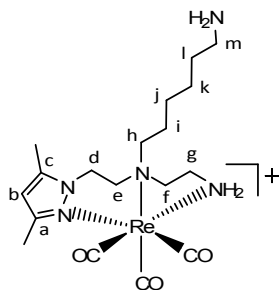
¹³C-RMN (D₂O): δ(ppm) 194,6, 194,0, 192,9 (C=O_{Re}); 156,1(C^r), 147,1 (C^a), 110,5 (C^b), 65,7 (C^h), 63,9 (C^f), 55,4 (C^e), 49,7 (C^d), 44,9 (C^g), 39,9 (C^j), 25,2 (Cⁱ), 18,0(CH₃pz), 13,6(CH₃pz).

HPLC (t_R): 18,2 min (Método 1, Condições A, λ = 254nm).

ESI-MS (+) (m/z): 510 [M + H]⁺, 255 [M + 2H]²⁺ calculada para C₁₅H₂₅N₁₀O₃Re = 509.

IV (KBr, cm⁻¹): 3360 M ν(NH₂); 2038, 1954 F (CO); 1686 M δ(NH₂), 1190 – 1105 M f ν(CN, amida); 824 f; 798 f; 710 f.

3.4.2. Síntese de fac-[Re(CO)₃(k³-L2)]⁺ (Re2).



Re2

Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.4.1 para o complexo **Re1**, partindo de (NEt₄)₂[ReBr₃(CO)₃] (30 mg, 0,13 mmol) (0,117 mg, 0,36 mmol) e do ligando **L2** (124 mg, 0,36 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após purificação por RP-HPLC (Método 1, Condições B, λ = 254nm) e evaporação dos solventes.

Rendimento: 76 % (53 mg, xxx mmol).

^1H -RMN (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 6,07 (s, $\text{CH}^{\text{b}}(4)\text{pz}$, 1H), 5,09 (s (largo), NH, 1H), 4,32 (dd, $\text{CH}^{\text{d'}}$, 1H), 4,13 (dd, $\text{CH}^{\text{d''}}$, 1H), 3,67-3,62 (m, NH, 2H), 3,57-3,47 (m, $\text{CH}^{\text{h'}}$, 1H), 3,35-3,28 (m, $\text{CH}^{\text{h''}}$ /CH $^{\text{e'}}$, 1H), 3,20-3,15 (m, $\text{CH}^{\text{g'}}$, 1H), 2,90 (t, CH^{m}_2 , 2H), 2,75 (m, CH^{f}_2 , 2H), 2,58 (dd, $\text{CH}^{\text{e''}}$, 1H), 2,49-2,37 (m, $\text{CH}^{\text{g''}}$, 1H), 2,30 (s, CH_3pz , 3H), 2,19 (s, CH_3pz , 3H), 1,89-1,59 (m, $\text{CH}^{\text{i'}}$ /CH $^{\text{i''}}$ /CH $^{\text{l}}$, 2H), 1,41-1,27 (m, CH^{j_2} /CH $^{\text{k}_2}$, 2H).

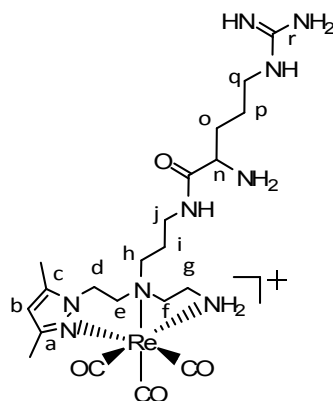
^{13}C -RMN (CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 198,8, 197,2, 192,9 (CO, Re), 157,8 (C^{c}), 148,3 (C^{a}), 111,8 (C^{b}), 71,3 (C^{h}), 65,7 (C^{f}), 57,0 (C^{e}), 51,3 (C^{d}), 46,3 (C^{g}), 43,6 (C^{m}), 30,9 (C^{l}), 29,9 (C^{i}), 29,6 (C^{j}), 28,1 (C^{k}), 19,4 (CH_3pz), 14,9 (CH_3pz).

HPLC (t_{R}): 18,9 min (**Método 1, Condições A**, $\lambda = 254\text{nm}$).

ESI-MS (+) (m/z): 276 [$\text{M} + 2\text{H}$] $^{2+}$, calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{N}_{10}\text{O}_3\text{Re} = 551$.

IV (KBr , cm^{-1}): IV (KBr , cm^{-1}): 3394 M $\nu(\text{NH}_2)$; 2106 – 1974 F (CO); 1686 M $\delta(\text{NH}_2)$, 1298 – 1105 M $\nu(\text{CN})$; 896 f; 778 f; 690 f.

3.4.3. Síntese de $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-C1})]^+$ (Re3).



Re3

Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.4. 1., partindo de $(\text{NEt}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ (30 mg, 0,13 mmol) (117 mg, 0,36 mmol) e do conjugado **C1** (0,124 g, 0,36 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo

transparente após purificação por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**, $\lambda = 254\text{nm}$) e evaporação dos solventes.

Rendimento: 76 % (53 mg, xxxx mmol).

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 6,08 (s, $\text{CH}^b(4)\text{pz}$, 1H), 5,10 (s (largo), NH, 1H), 4,35 (dd, $\text{CH}^{d'}$, 1H), 4,14-3,98 (m, $\text{CH}^{d''}$, H), 3,87 (t, CH^n , 1H), 3,71-3,66 (m, NH, 2H), 3,59-3,50 (m, $\text{CH}^{h'}$, 1H), 3,40-3,19 (m, $\text{CH}^{h''}/\text{CH}^{e'}/\text{CH}^j_2$, 4H), 3,11 (m, $\text{CH}^{g'}/\text{CH}^q_2$, 3H), 2,75 (m, CH^f_2 , 2H), 2,67-2,63 (m, $\text{CH}^{e''}$, 1H), 2,50-2,39 (m, $\text{CH}^{g''}$, 1H), 2,30 (s, CH_3pz , 3H), 2,19 (s, CH_3pz , 3H), 2,10-1,91 (m, CH^i , 1H), 1,86-1,75 (m, $\text{CH}^{i''}/\text{CH}^o_2$, 3H) 1,61-1,50 (m, CH^p_2 , 2H).

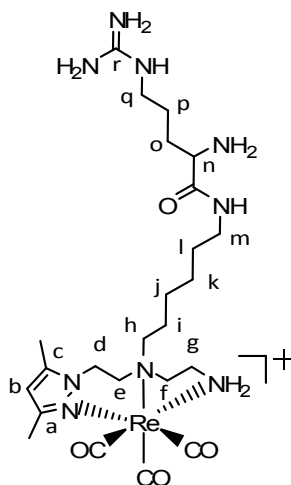
$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 196,1, 194,9, 194,7 (CO, Re), 171,6 (C=O), 164,7 (C^f), 155,7 ($\text{C}^c(3)\text{pz}$), 146,2 ($\text{C}^a(5)\text{pz}$), 109,8 ($\text{C}^b(4)\text{pz}$), 66,7 (C^h), 63,7 (C^f), 55,1 (C^n) 55,4 (C^e), 49,0 (C^d), 44,1 (C^g), 42,4 (C^j), 39,3 (C^q), 30,1 (C^o), 26,2 (C^i), 25,8 (C^p), 17,2 (CH_3pz), 12,8 (CH_3pz).

HPLC (t_R): 25,1 min (**Método 2, Condições A**, $\lambda = 254\text{nm}$).

ESI-MS (+) (m/z): 333 [$\text{M} + 2\text{H}$] $^{2+}$, calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{N}_9\text{O}_4\text{Re} = 665$.

IV (KBr, cm^{-1}): IV (KBr, cm^{-1}): 3276 M $\nu(\text{NH}_2 \text{ NH})$; 2026, 1915 F (CO); 1676 F (C=O), $\delta(\text{NH}_2)$, 1208 – 1135 M $\nu(\text{CN})$; 876 f; 758 f; 683 f.

3.4.4. Síntese de *fac*-[$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-C2})]^+$ (Re4).



Re4

Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.4.1. para o complexo **Re1**, partindo de (NEt₄)₂[ReBr₃(CO)₃] (30 mg, 0,13 mmol) (117 mg, 0,36 mmol) e do conjugado **C2** (124 mg, 0,36 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após purificação por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**, λ = 254nm) e evaporação dos solventes.

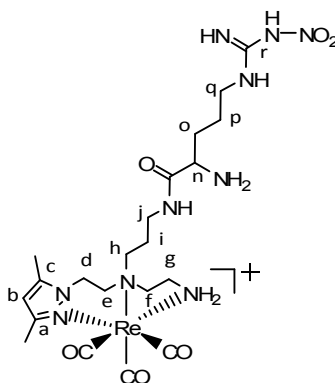
Rendimento: 76 % (53 mg, xxxx mmol).

¹H-RMN (D₂O): δ(ppm) 6,05 (s, CH^b(4)pz, 1H), 5,04 (s (largo), NH, 1H), 4,32 (dd, CH^{d'}, 1H), 4,08 (dd, CH^{d''}, H), 3,82 (t, CHⁿ, 1H), 3,61 (s (largo), NH, 2H), 3,50-3,40 (m, CH^{h'}, 1H), 3,30-3,18 (m, CH^{h''}/CH^m₂, 3H), 3,07 (m, CH^{e'}/CH^{g'}/CH^a₂, 3H), 2,70 (m, CH^f₂, 2H), 2,53 (m, CH^{e''}, 1H), 2,40 (m, CH^{g''}, 1H), 2,27 (s, CH₃pz, 3H), 2,16 (s, CH₃pz, 3H), 1,76 (m, CH^{o'}/CH^{o''}/CH^{i''}, 3H), 1,69-1,58 (m, CH^{i''}, 1H), 1,49 (m, CH^p₂/CH^l₂, 4H) 1,61-1,50 (m, CH^j₂/CH^k₂, 2H).

¹³C-RMN (D₂O): δ(ppm) 194,74, 194,4, 193,0 (CO, Re); 169,2 (C=O), 156,9 (**C^f**), 153,7 (**C^c**(3)pz), 144,2 (**C^a**(5)pz), 107,9 (**C^b**(4)pz), 67,6 (**C^h**), 61,9 (**C^f**) 53,3 (**C^e**), 53,3 (**Cⁿ**), 47,0 (**C^d**), 42,2 (**C^g**), 40,5 (**C^m**), 39,6 (**C^q**), 28,2 (**Cⁱ**), 28,2 (**C^o**), 25,9 (**C^j/C^k**), 24,4 (**Cⁱ**), 23,8 (**C^l**), 15,3 (**CH₃pz**), 10,9 (**CH₃pz**).

HPLC (t_R): 25,5 min (Método 2, Condições A, $\lambda = 254\text{nm}$).

3.4.5. Síntese de *fac*-[Re(CO)₃(k³-C3)]⁺ (Re5).



Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.4.1. para o complexo **Re1**, partindo de $(\text{NEt}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ (30 mg, 0,13 mmol) (117 mg, 0,36 mmol) e do conjugado **C3** (124 mg, 0,36 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após purificação por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**, $\lambda = 254\text{nm}$) e evaporação dos solventes.

¹H-RMN (D₂O): δ(ppm) 6,05 (s, CH^b(4)pz, 1H), 5,05 (s (largo), NH, 1H), 4,31 (dd, CH^{d'}, 1H), 4,04 (m, CH^{d''}, 1H), 3,88 (t, CHⁿ, 1H), 3,66 (m, NH, 2H), 3,52 (m, CH^{h'}, 1H), 3,45-3,28 (m, CH^{h''}/CH^{e'}/CHⁱ₂, 4H), 3,20-3,06 (m, CH^{g'}/CH^q₂, 3H), 2,72 (m, CH^f₂, 2H), 2,55 (m, CH^{e''}, 1H), 2,39 (m, CH^{g''}, 1H), 2,27 (s, CH₃pz, 3H), 2,17 (s, CH₃pz, 3H), 2,10 (m, CH^{i'}, 1H), 1,81 (m, CH^{i'}/CH^o₂, 3H), 1,59 (m, CH^p₂, 2H).

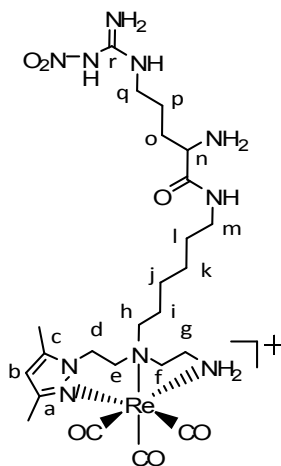
^{13}C -RMN (D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 197,2, 196,6, 195,2 (CO, Re), 172,1 (C=O), (C^r), 161,4 (C^r), 156,1 ($\text{C}^c(3)\text{pz}$), 146,7 ($\text{C}^a(5)\text{pz}$), 110,3 ($\text{C}^b(4)\text{pz}$), 67,1 (C^h), 64,2 (C^f) 55,5 (C^n) 55,4 (C^e), 49,5 (C^d), 44,6 (C^g), 39,8 (C^j), 39,7 (C^q), 30,7 (C^o), 26,7 (C^i), 26,5 (C^p), 17,7 (CH_3pz), 13,3 (CH_3pz).

HPLC (t_R): 26,7 min (**Método 2, Condições A**, $\lambda = 254\text{nm}$).

ESI-MS (+) (m/z): 355 [$\text{M} + 2\text{H}$] $^{2+}$, calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_4\text{Re} = 708$.

IV (KBr , cm^{-1}): IV (KBr , cm^{-1}): 3276 M $\nu(\text{NH}_2 \text{ NH})$; 2026, 1915 F ($\text{C}\equiv\text{O}$); 1676 F ($\text{C}=\text{O}$), $\delta(\text{NH}_2)$, 1208 – 1135 M $\nu(\text{CN})$; 876 f; 758 f; 683 f.

3.4.6. Síntese de $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(k^3\text{-C4})]^+$ (Re6).



Re6

Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em 3.4.1. para o complexo **Re1**, partindo de $(\text{NEt}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ (30 mg, 0,13 mmol) (117 mg, 0,36 mmol) e do conjugado **C4** (124 mg, 0,36 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após purificação por RP-HPLC (**Método 1, Condições B**, $\lambda = 254\text{nm}$) e evaporação dos solventes.

Rendimento: 76 % (53 mg, xxxx mmol).

$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$: $\delta(\text{ppm})$ 6,08 (s, $\text{CH}^b(4)\text{pz}$, 1H), 5,06 (s (largo), NH, 1H), 4,35 (dd, $\text{CH}^{d'}$, 1H), 4,12 (dd, $\text{CH}^{d''}$, H), 3,87 (t, CH^n , 1H), 3,66 (m, NH, 2H), 3,47 (m, $\text{CH}^{h'}$, 1H), 3,37-3,19 (m, $\text{CH}^{h''}/\text{CH}^m_2$, 3H), 3,01 (m, $\text{CH}^e/\text{CH}^{e'}/\text{CH}^a_2$, 3H), 2,75 (m, CH^f_2 , 2H), 2,66-2,55 (m, $\text{CH}^{e''}$, 1H), 2,47-2,38 (m, $\text{CH}^{b''}$, 1H), 2,31 (s, CH_3pz , 3H), 2,20 (s, CH_3pz , 3H), 1,87-1,79 (m, $\text{CH}^o_2/\text{CH}^{i'}$, 3H), 1,60 (m, $\text{H}^{i''}$, 1H), 1,45 (m, $\text{CH}^p_2/\text{CH}^l_2$, 4H) 1,29 (m, $\text{CH}^i_2/\text{CH}^k_2$, 2H).

$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$: $\delta(\text{ppm})$ 194,7, 194,4, 193,0 (C=O, Re), 169,2 (C=O), 156,9 (C^f), 153,7 ($\text{C}^c(3)\text{pz}$), 144,2 ($\text{C}^a(5)\text{pz}$), 107,9 ($\text{C}^b(4)\text{pz}$), 67,6 (C^h), 61,9 (C^f) 53,3 (C^e), 53,3 (C^n), 47,0 (C^d), 42,2 (C^g), 40,5 (C^m), 39,6 (C^q), 28,2 (C^l), 28,2 (C^o), 25,9 (C^j/C^k), 24,4 (C^l), 24,4 (C^i), 23,8 (C^p), 15,3 (CH_3pz), 10,9 (CH_3pz).

HPLC (t_R): 27,4 min (**Método 2, Condições A, λ = 254nm**).

ESI-MS (+) (m/z): 355 [$\text{M} + 2\text{H}$] $^{2+}$, calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_4\text{Re}$ = 708.

IV (KBr, cm^{-1}): IV (KBr, cm^{-1}): 3276 M $\nu(\text{NH}_2 \text{ NH})$; 2026, 1915 F (CO); 1676 F (C=O), $\delta(\text{NH}_2)$, 1208 – 1135 M $\nu(\text{CN})$; 876 f; 758 f; 683 f.

3.5. Síntese dos complexos de ^{99m}Tc

As manipulações das substâncias radioactivas (^{99m}Tc) foram efectuadas em condições de protecção e segurança radiológica, com luvas de protecção e barreira de chumbo com visor impregnado de sais de chumbo e numa *hotte* com extracção. Os frascos que continham produtos radioactivos foram colocados dentro de contentores de chumbo de espessura adequada. A exposição à dose de radiação durante todas as manipulações foi monitorizada por leitura de dosímetro (detector de radiação) individual de corpo e mãos.

3.5.1. Preparação do precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

Todas as sínteses foram efectuadas em atmosfera de azoto, utilizando frascos selados e acondicionados em contentores de chumbo de espessura adequada.

O $\text{Na}[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$ usado na preparação do precursor metálico foi obtido por eluição de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Ultra-TechneKow® FM ou ELUMATIC III®) com uma solução de NaCl 0,9%. Após eluição, a actividade foi medida numa câmara de ionização (Aloka, Curimeter IGC-3, Tokyo Japan).

O precursor $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ foi preparado usando um *Kit Isolink®* Mallinckrodt comercialmente disponível. Após adição de $\text{Na}[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$ (1,5 – 2 mL) ao *Kit Isolink®*, deixou-se reagir durante 30 minutos a 100°C. Após reacção e arrefecimento em banho de água, a solução foi neutralizada com 165 µL de HCl 1M, para eliminar o excesso de boranocarbonato, e diluída com solução de NaCl 0,9%. (2,5 mL). A determinação do rendimento de reacção e pureza radioquímica foi efectuada por RP-HPLC (Método 1).

3.5.2 Preparação dos complexos Tc1 – Tc6

Os complexos $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-L})]$ (L = **L1**, **Tc1**; L = **L2**, **Tc2**; L = **C1**, **Tc3**; L = **C2**, **Tc4**; L = **C3**, **Tc5**; L = **C4**, **Tc6**) foram preparados utilizando o seguinte procedimento geral:

A uma solução de ligando 10^{-3} M em H_2O (100 µl) acondicionada em frasco de vidro selado e sob atmosfera de N_2 , adicionou-se uma solução do precursor metálico $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (3-4 mCi, 900 µl). A solução resultante foi aquecida a 100 °C, durante 30 min. A caracterização radioquímica e o rendimento dos complexos formados foi efectuada por RP-HPLC utilizando os **Métodos 1 e 2, Condições A**).

3.5.2 Determinação da lipofilia dos complexos.

A lipofilia dos complexos **Tc3 – Tc6** foi avaliada por determinação do coeficiente de partição (*P*) no sistema bifásico n-octanol/PBS 0,1 M pH 7,4 de acordo com o seguinte procedimento experimental:

Num tubo de centrífuga (mínimo de dois ensaios em paralelo) com 1 mL de PBS adicionou-se 1 mL de *n*-octanol e agitou-se em vórtex durante 1 min. Adicionou-se 50 µL de uma solução do composto de ^{99m}Tc em estudo (**Tc3** - **Tc6**) e agitou-se novamente em vórtex durante 1 min. Centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 min. Separaram-se as duas fases e retiraram-se 3 alíquotas de 50 µL de uma delas para os tubos de centrífuga. A radioatividade contida em cada tubo foi medida num contador de radiação gama (Berthold, LB 2111, Germany). Após medição da radioatividade de ambas as fases o coeficiente de partição foi calculado da seguinte forma:

$$P_{o/w} = C_1/C_2$$

Onde **C₁** e **C₂** correspondem ao valor total de radioatividade nas fases orgânica e aquosa, respectivamente. Os resultados foram expressos na forma de **log P_{o/w}**.

3.5.3. Estudos de estabilidade in vitro.

3.5.3.1. Estabilidade em PBS.

As soluções dos complexos **Tc3** – **Tc4** (100 µL) foram diluídas em PBS 0,1 M pH 7,4 (900 µL) e mantidas em banho termostaticado a 37 °C. Ao fim de 2h, 4h e 24h retiraram-se alíquotas que foram analisadas por RP-HPLC.

3.5.3.2. Estabilidade na presença de histidina.

Alíquotas de 100 µL das soluções dos complexos de ^{99m}Tc foram adicionadas a 900 µL de uma solução 10⁻³ de histidina em PBS pH 7,4 (concentração final de ligando 10⁻⁵ M) acondicionada em frasco de vidro selado sob atmosfera de azoto. As amostras foram incubadas a 37°C e analisadas por RP-HPLC ao fim de 2h, 4h e 24 h.

3.6. Ensaaios enzimáticos.

3.6.1 - Considerações gerais

Os ensaios cinéticos foram realizados num espectrofotómetro Agilent Technologies 8453 UV-Vis, com suporte termostaticado e agitação magnética na cuvette (Quartz, percurso óptico = 0,5 cm). Todos os reagentes (oxihemoglobina, NADPH, H₄B e DTT; Sigma) utilizados nas determinações enzimáticas foram preparados em tampão HEPES 50 mM pH 7,4 e mantidos em gelo durante o ensaio.

O enzima iNOS (Sigma, recombinante de rato), fornecido em tampão HEPES 25 mM pH 7,4 contendo 10 % glicerol e 8 µM de tetrahidrobiopterina (340 µL, 50 U), foi dividido em alíquotas de 20 µL e guardado a - 80 °C. Para os ensaios enzimáticos, cada alíquota de enzima foi diluída em tampão HEPES 50 mM pH 7,4 (Sigma) até um volume final de 250 µL. As soluções dos aminoácidos L-arginina, N^ω-nitro-L-arginina, dos conjugados **C1** - **C4** e dos complexos de rénio **Re3** – **Re6** (10 mM) foram preparadas em H₂O.

3.6.2 - Ensaaios cinéticos realizados seguindo a formação do NO na presença de oxihemoglobina

3.6.2.1 – Preparação da oxihemoglobina

A oxihemoglobina (HbO₂) foi preparada por adição de uma solução de ditionito de sódio (concentração 10 X superior) a uma solução de 200 mg/mL (3,1 mM) de hemoglobina (Hb) de eritrócitos de bovino (Sigma) preparada em tampão HEPES 50 mM pH 7,4. Após 20 min de reacção a 4 °C, o excesso de ditionito de sódio foi eliminado por diálise da solução de HbO₂ utilizando uma membrana de celulose. A solução foi deixada a dialisar a 4 °C num recipiente contendo tampão HEPES 50 mM pH 7,4 numa proporção de 1:50 (v/v) (HbO₂:solução tampão). A solução tampão foi trocada três vezes, durante 24 horas. 10 µL da solução stock assim obtida foi diluída

em 590 μL de solução tampão (diluição utilizada nos ensaios enzimáticos) e a sua concentração calculada a partir do coeficiente de absorção molar a 415 nm ($\epsilon_{415} = 131 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $[\text{HbO}_2] = 6 \text{ }\mu\text{M}$). REFBRUNO

3.6.2.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos substratos L-arginina: validação do método de captura do NO pela oxihemoglobina.

Os ensaios enzimáticos foram efectuados num volume final de 0,6 mL de tampão HEPES (50 mM pH 7,4) contendo 6 μM HbO₂, 200 μM NADPH, 10 μM H₄B, 100 μM DTT e diferentes concentrações de L-arginina (5 μM , 20 μM , 35 μM , 50 μM , 150 μM e 250 μM). As soluções anteriores foram pré-incubadas a 37 °C durante 5 min. Após este tempo de incubação o ensaio foi iniciado, registando-se os valores de absorção a 401 e 421 nm durante ~ 3 min de modo a quantificar-se a autooxidação da HbO₂. A reacção enzimática foi iniciada com a adição do enzima (~ 0,3 U, 25 μL) e seguida durante mais ~ 12 min monitorizando-se o aumento da absorvância a 401 e 421 nm devido à oxidação da oxihemoglobina a metahemoglobina promovida pelo NO.

3.6.2.3 – Determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos substratos **C1, C2, Re3 e Re4**

Os ensaios cinéticos foram realizados em cuvetes de quartzo contendo 6 μM de oxihemoglobina, 200 μM NADPH, 10 μM H₄B, 100 μM DTT com diferentes concentrações dos substratos **C1, C2, Re3, Re4** (100 μM a 1500 μM ; 3 ensaios por composto), num volume total de 0,6 mL de tampão HEPES (50mM pH = 7,4). Fez-se um branco para cada cuvette. As soluções foram colocados no suporte do espectrofotómetro, sob agitação, e deixaram-se em pré-incubação a 37°C durante 5 min. Após este período, o ensaio foi iniciado, registando-se os valores de absorção a 401 e 421 nm durante 5 min de modo a quantificar a auto-oxidação da oxihemoglobina. A reacção enzimática teve lugar após a adição do enzima onde durante o restante tempo do ensaio monitorizou-se o aumento da absorvância a 401 e

421 nm devido a oxidação da oxihemoglobina a metahemoglobina, devido à presença do NO formado na reacção enzimática. As velocidades iniciais (v_i) para cada uma das concentrações dos substratos foram determinadas pela diferença de declives das rectas de auto-oxidação e das rectas de oxidação associadas ao NO formado.

3.2.6.4. Determinação das constantes de inibição para os compostos **C3**, **C4**, **Re5** e **Re6**.

Para o cálculo das constantes de inibição, determinaram-se previamente os valores de K_m^{app} (*Constante de Michaelis-Menten aparente*) da seguinte forma: os ensaios cinéticos foram realizados num volume final de 600 μ L de tampão HEPES (50 mM pH 7,4) contendo 6 μ M HbO₂, 200 μ M NADPH, 10 μ M H₄B, 100 μ M DTT, três concentrações diferentes de L-ArgOH (15 μ M, 30 μ M, 50 μ M) e uma concentração fixa do inibidor a avaliar (50 μ M). A reacção enzimática, seguida espectrofotometricamente a 401 e 421 nm durante $\sim$ 12 min, foi iniciada com a adição do iNOS ($\sim$ 0,3 U, 25 μ L) à solução anterior, previamente incubada a 37 °C durante $\sim$ 8 min (5 min de pré-incubação + 3 min para seguir a autooxidação).

