

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.

O Mestrado foi aprovado pela deliberação nº 723/2004 publicada no Diário da República, II série, nº 123 de 26 de Maio de 2004.

O trabalho experimental foi efectuado no Grupo de Química Inorgânica e Radiofarmacêutica, do Departamento de Química 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 orientação do Doutor Carlos Cordeiro. O trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, através da bolsa de investigação POCI/SAU-FCF/58855/2004.

Agradecimentos

Ao meu orientador Doutor João Galamba Correia agradeço a forma rigorosa como orientou esta tese de mestrado, os conhecimentos transmitidos, a simplicidade, a amizade e principalmente a total disponibilidade demonstrada.

À Doutora Isabel Rego dos Santos agradeço o entusiasmo e a dedicação com que lidera o Grupo de Química Inorgânica e Radiofarmacêutica do Instituto Tecnológico e Nuclear.

À Doutora Paula Raposinho agradeço o empenho na realização dos estudos de biodistribuição e internalização.

À Mestre Célia Fernandes agradeço a disponibilidade para resolver todos os problemas associados ao HPLC e o apoio prestado na liofilização dos compostos.

Ao Doutor Carlos Cordeiro, ao Professor António Ferreira e à Professora Ana Ponces Freire, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, agradeço por me terem recebido no Laboratório de Enzimologia, assim como a total disponibilidade no acompanhamento dos estudos efectuados.

Aos meus colegas do Grupo de QIR agradeço, sem particularizar, o óptimo ambiente de trabalho proporcionado, a amizade, a ajuda e o companheirismo.

A todos os meus amigos um especial agradecimento pelos bons momentos.

À Cristiana agradeço todo o amor, a amizade, o carinho, a paciência, a ajuda, o incentivo e, sobretudo, toda a compreensão.

Por último agradeço aos meus pais o apoio incondicional e o exemplo de vida.

Resumo

O óxido nítrico (NO), molécula fundamental na mediação de diferentes processos fisiológicos, é sintetizado *in vivo* pelo óxido nítrico sintase (NOS). O trabalho apresentado nesta tese teve como objectivo desenvolver novos complexos organometálicos de $^{99m}\text{Tc(I)}$, contendo substratos ou inibidores do NOS (derivados da L-Arginina), potencialmente úteis para a visualização da sobreexpressão da isoforma induzida (iNOS), associada a certos tumores. Para alcançar este objectivo, foram sintetizados novos conjugados contendo as unidades quelantes pirazolo-diamina ou cisteína funcionalizadas com os substratos L-ArgOMe (**1**)/OH (**2**) e os inibidores $\text{N}^{\omega}\text{-NO}_2\text{-L-ArgOMe}$ (**3**)/OH (**4**, **6**) e $\text{N}^{\omega}\text{-CH}_3\text{-L-ArgOH}$ (**5**) do NOS. Os conjugados, caracterizados pelas técnicas analíticas usuais em química, permitiram preparar complexos organometálicos do tipo *fac*- $[\text{M}(\text{k}^3\text{-L})(\text{CO})_3]^+$ ($\text{M} = \text{Re}$, ^{99m}Tc ; $\text{L} = \mathbf{1} - \mathbf{6}$). Os complexos hidrofílicos $^{99m}\text{Tc}\mathbf{2}$, $^{99m}\text{Tc}\mathbf{4}$, $^{99m}\text{Tc}\mathbf{5}$ e $^{99m}\text{Tc}\mathbf{6}$ foram obtidos com rendimentos > 90 % e elevada actividade específica. Os complexos $^{99m}\text{Tc}\mathbf{1}$ e $^{99m}\text{Tc}\mathbf{3}$, contendo L-ArgOMe e $\text{N}^{\omega}\text{-NO}_2\text{-L-ArgOMe}$, respectivamente, hidrolisam facilmente, levando à formação *in situ* dos correspondentes complexos $^{99m}\text{Tc}\mathbf{2}$ e $^{99m}\text{Tc}\mathbf{4}$. Os compostos análogos de rénio sintetizados (**Re1 - Re5**) permitiram a identificação dos respectivos complexos radioactivos por comparação dos seus tempos de retenção nos cromatogramas de RP-HPLC. A caracterização de **Re1 - Re5**, permitiu confirmar que o fragmento metálico tricarbonilo é estabilizado exclusivamente pela unidade quelante, não existindo qualquer interacção entre o metal e as unidades L-arginina.

Os conjugados **2** ($K_m = 57 \mu\text{M}$), **4** ($K_i = 178 \mu\text{M}$), **5** ($K_i = 18 \mu\text{M}$) e **6** ($K_i = 28 \mu\text{M}$) e os complexos organometálicos **Re1** ($K_m = 377 \mu\text{M}$), **Re2** ($K_m = 245 \mu\text{M}$), **Re3** ($K_i = 1094 \mu\text{M}$), **Re4** ($K_i = 84 \mu\text{M}$) e **Re5** ($K_i = 36 \mu\text{M}$) foram avaliados *in vitro* como substratos ou inibidores do iNOS, utilizando o método de captura do NO pela oxihemoglobina. Os resultados obtidos permitem concluir que a ligação dos derivados da L-Arginina ao agente quelante, e a posterior coordenação dos conjugados à unidade *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$, resulta numa diminuição da afinidade para o enzima. A afinidade dos conjugados contendo inibidores do iNOS parece ser menos afectada pela coordenação ao metal (**4** vs **Re4**, **5** vs **Re5**) do que a afinidade dos conjugados contendo substratos (**2** vs **Re2**). No caso do conjugado **4**, verificou-se mesmo um aumento do seu poder inibitório após coordenação à unidade *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$.

Estudos de internalização dos complexos $^{99m}\text{Tc}\mathbf{2}$, $^{99m}\text{Tc}\mathbf{4}$, $^{99m}\text{Tc}\mathbf{5}$ e $^{99m}\text{Tc}\mathbf{6}$ utilizando células de melanoma murino (B16F1), conhecidas por expressarem o iNOS, revelaram uma modesta internalização celular destes compostos.

A biodistribuição dos complexos $^{99m}\text{Tc}\mathbf{2}$ e $^{99m}\text{Tc}\mathbf{4}$, avaliada em murganhos com tumor induzido (melanoma B16F1), revelou uma eliminação relativamente rápida dos compostos quer pela via renal quer pela hepatobiliar. A fixação tumoral destes complexos não foi significativa.

Abstract

Nitric oxide (NO), a key signalling molecule that mediates several physiological processes, is synthesized *in vivo* by nitric oxide synthase (NOS). The work presented in this thesis aimed at developing new $^{99m}\text{Tc(I)}$ organometallic complexes containing substrates or inhibitors of NOS (L-Arginine derivatives) for probing overexpression of the inducible isoform (iNOS), associated to certain malignant tumors. To achieve this goal, we have synthesized new conjugates containing the pyrazole-diamine- or cysteine-based chelating units functionalized with the substrates L-ArgOMe (**1**)/OH (**2**) and the inhibitors $\text{N}^\omega\text{-NO}_2\text{-L-ArgOMe}$ (**3**)/OH (**4**, **6**) and $\text{N}^\omega\text{-CH}_3\text{-L-ArgOH}$ (**5**) of NOS. The conjugates, characterized by the usual analytical techniques, allowed the preparation of organometallic complexes of the type $\text{fac-}[\text{M}(\text{k}^3\text{-L})(\text{CO})_3]^+$ ($\text{M} = \text{Re}, ^{99m}\text{Tc}$; $\text{L} = \mathbf{1} - \mathbf{6}$). The hydrophilic complexes $^{99m}\text{Tc2}$, $^{99m}\text{Tc4}$, $^{99m}\text{Tc5}$ and $^{99m}\text{Tc6}$ were obtained in yields higher than 90 % with high specific activity. Complexes $^{99m}\text{Tc1}$ and $^{99m}\text{Tc3}$, containing L-ArgOMe and $\text{N}^\omega\text{-NO}_2\text{-L-ArgOMe}$, respectively, are prone to hydrolysis, yielding the corresponding complexes $^{99m}\text{Tc2}$ and $^{99m}\text{Tc4}$ *in situ*. The Re surrogates (**Re1** – **Re5**) allowed the macroscopic identification of the radioactive complexes by comparative RP-HPLC. The characterization of **Re1** – **Re5** confirmed that the metal-tricarbonyl fragment is stabilized exclusively by the tridentate chelating unit, without any unspecific interaction with the L-Arginine fragments.

The conjugates **2** ($K_m = 57 \mu\text{M}$), **4** ($K_i = 178 \mu\text{M}$), **5** ($K_i = 18 \mu\text{M}$) and **6** ($K_i = 28 \mu\text{M}$) and the organometallic complexes **Re1** ($K_m = 377 \mu\text{M}$), **Re2** ($K_m = 245 \mu\text{M}$), **Re3** ($K_i = 1094 \mu\text{M}$), **Re4** ($K_i = 84 \mu\text{M}$) and **Re5** ($K_i = 36 \mu\text{M}$) have been tested *in vitro* as substrates or inhibitors of iNOS, using the oxyhemoglobin NO capture assay. The coupling of the L-Arginine derivatives to the chelator, and the coordination of the resulting conjugates to the $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ core, decreased the affinity to the enzyme. The affinity of the conjugates containing inhibitors of iNOS seems to be less affected upon coordination to the metal (**4** vs **Re4**, **5** vs **Re5**) than the substrates containing conjugates (**2** vs **Re2**). The inhibition capacity of conjugate **4** is even improved after coordination to the $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ core.

Internalization studies of the complexes $^{99m}\text{Tc2}$, $^{99m}\text{Tc4}$, $^{99m}\text{Tc5}$ and $^{99m}\text{Tc6}$ using B16F1 murine melanoma cells, considered to express the iNOS, revealed a modest cellular uptake for those compounds.

Biodistribution studies of the complexes $^{99m}\text{Tc2}$ and $^{99m}\text{Tc4}$ on melanoma-bearing (B16F1) mice have shown that both complexes present a fast overall excretion, either by renal or hepatobiliary pathways. Both complexes have also shown a modest tumor uptake.

Palavras chaves

Radiofármacos específicos

Re/^{99m}Tc tricarbonilo

Ligandos bifuncionais

Pirazolo

Óxido Nítrico Sintase

Actividade enzimática

Key Words

Specific radiopharmaceuticals

Re/^{99m}Tc tricarbonyl

Bifunctional chelators

Pyrazole

Nitric Oxide Synthase

Enzymatic activity

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Palavras Chave/Key Word	ix
Índice Geral	xi
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xix
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xxi
PREÂMBULO	1
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 – RADIONUCLÍDEOS E SUAS APLICAÇÕES EM MEDICINA NUCLEAR	5
1.1.1 - Considerações gerais.....	5
1.1.2 - Importância do tecnécio-99m (^{99m} Tc)	9
1.1.2.1 - Considerações gerais sobre o tecnécio	9
1.1.2.2 - Radiofármacos de ^{99m} Tc	12
1.1.2.2.1 - Radiofármacos de 1ª geração ou agentes de perfusão.....	13
1.1.2.2.2 - Radiofármacos de 2ª geração ou específicos	15
1.1.2.3 - Novos complexos específicos de ^{99m} Tc – I & D.....	18
1.1.2.4 - Complexos específicos de ^{99m} Tc contendo a unidade <i>fac</i> -[^{99m} Tc(CO) ₃] ⁺	21
1.1.2.4.1 - Vantagens da unidade <i>fac</i> -[^{99m} Tc(CO) ₃] ⁺	21
1.1.2.4.2 - Síntese do precursor <i>fac</i> -[^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺	22
1.1.2.4.3 - Ligandos para estabilização da unidade <i>fac</i> -[M(CO) ₃] ⁺ (M = Re,	
^{99m} Tc)	23
1.2 – SISTEMA ÓXIDO NÍTRICO – ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NO - NOS)	27
1.2.1 - Considerações gerais.....	27
1.2.2 - Mecanismo de biosíntese do óxido nítrico	30
1.2.3 - Estrutura molecular do domínio oxigenase do enzima NOS.....	32
1.2.4 - Mecanismos de acção do NO <i>in vivo</i>	34
1.2.5 - Substratos e inibidores do NOS.....	35
1.2.6 - Óxido nítrico e cancro	38
1.2.7 - Compostos radioactivos potencialmente úteis na detecção <i>in vivo</i> do NOS	39

1.3 – OBJECTIVO DO TRABALHO	41
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
2.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	45
2.2 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE CONJUGADOS CONTENDO A L-ARGOH E DERIVADOS	47
2.2.1 – Conjugados contendo a unidade quelante pirazolo-diamina e a L-ArgOMe (1) e L-ArgOH (2).....	47
2.2.1.1 – Síntese dos conjugados 1 e 2	47
2.2.1.2 – Caracterização dos conjugados 1 e 2	51
2.2.2 – Conjugados contendo a unidade quelante pirazolo-diamina e a N ^o -NO ₂ -L-ArgOMe (3), N ^o -NO ₂ -L-ArgOH (4) e N ^o -CH ₃ -L-ArgOH (5).....	56
2.2.2.1 – Síntese dos conjugados 3 – 5	56
2.2.2.2 – Caracterização dos conjugados 3 – 5	59
2.2.3 – Conjugado contendo a unidade quelante cisteína e a N ^o -NO ₂ -L-ArgOH (6).....	65
2.2.3.1 – Síntese do conjugado 6	65
2.2.3.2 – Caracterização do conjugado 6	66
2.3 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS <i>fac</i>-[Re(k³-L)(CO)₃]⁺ (L = 1 - 5)	68
2.4 – SÍNTESE RADIOQUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS <i>fac</i>-[^{99m}Tc(k³-L)(CO)₃]⁺ (L = 1 - 6)	83
2.4.1 – Avaliação da lipofilia dos complexos ^{99m} Tc 2 , ^{99m} Tc 4 , ^{99m} Tc 5 e ^{99m} Tc 6	89
2.5 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS	90
2.5.1 – Considerações gerais	90
2.5.2 – Avaliação da actividade enzimática do iNOS na presença dos conjugados 2 , 4 - 6 e dos complexos Re1 - Re5	92
2.5.2.1 – Avaliação da actividade enzimática do iNOS na presença dos substratos 2 , Re1 e Re2	92
2.5.2.2 – Avaliação da cinética de inibição do iNOS na presença dos inibidores 4 - 6 e Re3 - Re5	96
2.6 – ESTUDOS DE AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	100
2.6.1 - Estudos <i>in vitro</i> com células de melanoma murino B16F1.....	100
2.6.2 – Farmacocinética dos complexos ^{99m} Tc 2 e ^{99m} Tc 4 em murganhos com tumores e sua estabilidade <i>in vivo</i>	101
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	109

3. PARTE EXPERIMENTAL	115
3.1 – SOLVENTES E REAGENTES	115
3.2 - TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	115
3.3 – MATERIAIS DE PARTIDA	118
3.4 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS CONJUGADOS 1 - 6 E DOS COMPLEXOS	
Re1 – Re5	118
3.4.1 – Conjugados 1 – 6 e compostos intermediários	118
3.4.1.1 – 4-[(2-(tert-butoxicarbonilamino)etil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino]butanoato 2,5-dioxopirrolidino-1-il (II)	118
3.4.1.2 – Pentanoato 2-[(4-{[2-(tert-butoxicarbonilamino)etil][2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(carbamimidamido) de metilo (III)	119
3.4.1.3 – Pentanoato 2-[(4-{[2-amino-etil][2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(carbamimidamido) de metilo (1)	120
3.4.1.4 – Ácido 2-[(4-{[2-(tert-butoxicarbonilamino)etil] [2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(carbamimidamido) pentanóico (IV)	122
3.4.1.5 – Ácido 2-[(4-{[2-amino-etil] [2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(carbamimidamido) pentanóico (2)	123
3.4.1.6 – Pentanoato 2-[(4-{[2-(tert-butoxicarbonilamino)etil][2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(nitrocarbamimidamido) de metilo (V)	124
3.4.1.7 – Pentanoato 2-[(4-{[2-amino-etil][2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(nitrocarbamimidamido) de metilo (3)....	126
3.4.1.8 – Ácido 2-[(4-{[2-amino-etil] [2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(nitrocarbamimidamido) pentanóico (4)	127
3.4.1.9 – Ácido 2-[(4-{[2-(tert-butoxicarbonilamino)etil] [2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(metilcarbamimidamido) pentanóico (VI)	129
3.4.1.10 – Ácido 2-[(4-{[2-amino-etil] [2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(metilcarbamimidamido) pentanóico (5)	130
3.4.1.11 – Pentanoato 2-({[2-(trifluoroacetilamino)-3-metoxi-3-oxopropil]tio]acetil} amino)-5-(nitrocarbamimidamido) de metilo (VIII) .	131
3.4.1.12 – Ácido 2-({[(2-amino-2-carboxietil)tio]acetil}amino)-5-(nitrocarbamimidamido) pentanóico (6)	132
3.4.2 – Complexos Re1 - Re5	133
3.4.2.1 – <i>fac</i> -[Re(<i>k</i> ³ -L)(CO) ₃] ⁺ (L = 1 , Re1)	133

3.4.2.2 – <i>fac</i> -[Re(<i>k</i> ³ -L)(CO) ₃] ⁺ (L = 2 , Re2).....	134
3.4.2.3 – <i>fac</i> -[Re(<i>k</i> ³ -L)(CO) ₃] ⁺ (L = 3 , Re3).....	137
3.4.2.4 – <i>fac</i> -[Re(<i>k</i> ³ -L)(CO) ₃] ⁺ (L = 4 , Re4).....	138
3.4.2.5 – <i>fac</i> -[Re(<i>k</i> ³ -L)(CO) ₃] ⁺ (L = 5 , Re5).....	139
3.5 – PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE ^{99m}Tc	140
3.5.1 – Preparação do precursor <i>fac</i> -[^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺	140
3.5.2 – Preparação dos complexos ^{99m}Tc1 – ^{99m}Tc6	141
3.5.2.1 – Optimização das condições de obtenção de ^{99m}Tc1 – ^{99m}Tc6	141
3.5.2.1.1 - ^{99m}Tc1 : Reacção do <i>fac</i> -[^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺ com o conjugado 1	141
3.5.2.1.2 - ^{99m}Tc2 : Reacção do <i>fac</i> -[^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺ com o conjugado 2	142
3.5.2.1.3 - ^{99m}Tc3 : Reacção do <i>fac</i> -[^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺ com o conjugado 3	142
3.5.2.1.4 - ^{99m}Tc4 : Reacção do <i>fac</i> -[^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺ com o conjugado 4	143
3.5.2.1.5 - ^{99m}Tc5 : Reacção do <i>fac</i> -[^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺ com o conjugado 5	143
3.5.2.1.6 - ^{99m}Tc6 : Reacção do <i>fac</i> -[^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺ com o conjugado 6	143
3.6 – LIPOFILIA	144
3.7 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS	145
3.7.1 - Considerações gerais.....	145
3.7.2 - Ensaio cinéticos realizados seguindo a oxidação do NADPH.....	145
3.7.3 - Ensaio cinéticos realizados seguindo a formação do NO na presença de oxihemoglobina.....	146
3.7.3.1 – Preparação da oxihemoglobina.....	146
3.7.3.2 - Determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos substratos L-ArgOMe/L-ArgOH: validação do método de captura do NO pela oxihemoglobina.....	146
3.7.3.3 – Determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos compostos 2 , Re1 e Re2 contendo os substratos L-ArgOMe/L-ArgOH.....	146
3.7.3.4 – Determinação das constantes de inibição dos conjugados 4 - 6 e dos complexos Re3 - Re5 contendo os inibidores N ^ω -NO ₂ -L-ArgOMe/OH e N ^ω -CH ₃ -L-ArgOH.....	147
3.8 – AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR DOS COMPLEXOS DE ^{99m}Tc	147
3.8.1 - Cultura celular.....	147
3.8.2 – Ensaio de internalização.....	147
3.9 – AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO TUMORAL E FARMACOCINÉTICA DOS COMPLEXOS DE ^{99m}Tc	148
3.9.1 – Inoculação de murganhos com células do melanoma.....	148
3.9.2 – Ensaio de biodistribuição.....	148
3.9.3 – Estabilidade <i>in vivo</i>	149

Índice de Figuras

Figura 1.1	Câmara gama com detector rotativo utilizada na técnica SPECT (A) e representação esquemática dos seus principais componentes (B)	6
Figura 1.2	Técnica PET	7
Figura 1.3	Imagem obtida por PET com o radiofármaco [¹⁸ F]-FDG, onde se assinalam as lesões num pulmão.....	7
Figura 1.4	Gerador de ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc	10
Figura 1.5	Diagrama de decaimento radioactivo do ⁹⁹ Mo e do ^{99m} Tc.....	11
Figura 1.6	Exemplos de radiofármacos de ^{99m} Tc em uso clínico e respectivas aplicações.....	13
Figura 1.7	Estrutura do complexo neutro [^{99m} TcN(NOEt) ₂] (CisNoet®; NOEt = N-etil-N-etoxi-ditiocarbamato).....	15
Figura 1.8	Estrutura química dos complexos catiónicos [^{99m} TcN(PNP3)(DBODC)] ⁺ e [^{99m} TcN(PNP5)(DBODC)] ⁺ para perfusão do miocárdio	15
Figura 1.9	Representação esquemática da estrutura de um radiofármaco específico contendo um ligando bifuncional.....	17
Figura 1.10	Radiopéptidos de ^{99m} Tc actualmente em utilização clínica	18
Figura 1.11	Fragmentos metálicos de ^{99m} Tc utilizados para ligação a biomoléculas (BM = biomolécula).....	19
Figura 1.12	Estrutura do ^{99m} Tc-TRODAT, complexo útil na visualização dos transportadores da Dopamina (DAT), isto é para diagnóstico da doença de Parkinson.....	19
Figura 1.13	Estruturas propostas para os complexos com o fragmento metálico [Tc]-HYNIC para marcação radioactiva de biomoléculas.....	20
Figura 1.14	Complexos do tipo [^{99m} TcN(PNP)(SO-BM)] para marcação de biomoléculas .	21
Figura 1.15	Condições de preparação de <i>fac</i> -[^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺ a partir de [^{99m} TcO ₄] ⁻ .	22
Figura 1.16	Condições de preparação do precursor <i>fac</i> -[^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺ utilizando o "kit" <i>Isolink</i> ®	23
Figura 1.17	Complexos do tipo [2 + 1] (A = [2 _{BM} + 1]; B e C = [2 + 1 _{BM}])	25
Figura 1.18	Complexos organometálicos do tipo <i>fac</i> -[M(CO) ₃ L] ⁺ (M = Re, ^{99m} Tc), estabilizados com ligandos tridentados bifuncionais capazes de se ligarem a biomoléculas	26
Figura 1.19	Biosíntese do NO <i>in vivo</i> por oxidação da L-ArgOH a L-Cit, catalisada pelo óxido nítrico sintase (NOS), em reacção dependente do NADPH.....	28

Figura 1.20	Representação esquemática da estrutura das isoformas do óxido nítrico sintase	29
Figura 1.21	Mecanismo de oxidação da L-ArgOH a L-Cit catalisada pelo NOS	30
Figura 1.22	Passos sequenciais do mecanismo molecular de oxidação <i>in vivo</i> da L-ArgOH a NO e L-Cit, catalisada pelo NOS	31
Figura 1.23	Estrutura tridimensional obtida por difracção de raios-X do domínio oxigenase do eNOS Humano	32
Figura 1.24	Representação das interacções estabelecidas entre a NOH-L-ArgOH (NOHA) e o centro activo do enzima eNOS.....	33
Figura 1.25	Mecanismos conhecidos de acção do NO.....	34
Figura 1.26	Funções conhecidas do NO na biologia tumoral	38
Figura 1.27	N ^ω -NO ₂ -L-ArgOMe e S-alkil-isotioureias marcadas com isótopos radioactivos ¹⁸ F e ¹¹ C.....	40
Figura 2.1	Complexos organometálicos estabilizados com ligandos bifuncionais do tipo pirazolo-diamina e cisteína (M = Re, ^{99m} Tc).....	45
Figura 2.2	Síntese dos conjugados 1 e 2	47
Figura 2.3	Cromatograma de RP-HPLC da mistura reaccional da síntese do intermediário III (detecção UV, 254 nm)	49
Figura 2.4	Sobreposição dos cromatogramas analíticos dos conjugados 1 e 2 obtidos por RP-HPLC (detecção UV, 254 nm) utilizando uma coluna Nucleosil C18 (100 - 5 μm) e um gradiente de TFA 0,1 %/CH ₃ OH (Método 1, secção 3.2).	50
Figura 2.5	Espectro de ¹ H-RMN do intermediário III e respectivas atribuições dos sinais (D ₂ O)	51
Figura 2.6	Espectro de ¹³ C-RMN do ligando III em D ₂ O	52
Figura 2.7	Espectro de IV do conjugado 2 na zona de frequências 2000 – 500 cm ⁻¹ (KBr).....	53
Figura 2.8	Espectro de ¹ H- ¹ H COSY do conjugado 2 e respectivas atribuições dos sinais (D ₂ O)	55
Figura 2.9	Espectro de ¹ H- ¹³ C HSQC do ligando 2 e respectivas atribuições dos sinais (D ₂ O)	56
Figura 2.10	Síntese dos conjugados 3 – 5	57
Figura 2.11	Espectro de IV dos conjugados 2 e 3 na zona de frequências entre 2000 – 500 cm ⁻¹ (KBr)	60
Figura 2.12	Espectro de ¹ H-RMN do ligando 3 e respectivas atribuições dos sinais (D ₂ O)	61
Figura 2.13	Espectro de ¹³ C-RMN do conjugado 3 e respectivas atribuições dos sinais (D ₂ O)	62

Figura 2.14	(A) Espectro de massa no modo positivo do conjugado 4 obtido por ionização por electrospray; (B) expansão do pico correspondente a $[M+H]^+$; (C) simulação da série isotópica do ião molecular $[M]^+$	63
Figura 2.15	Espectro de ^1H -RMN do conjugado 5 e respectivas atribuições dos sinais (D_2O)	64
Figura 2.16	Espectro de ^{13}C -RMN do conjugado 5 e respectivas atribuições dos sinais (D_2O)	64
Figura 2.17	Síntese do ligando 6	65
Figura 2.18	Espectro de ^1H - ^1H COSY do conjugado 6 e atribuição dos sinais (D_2O).....	66
Figura 2.19	Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do conjugado 6 e atribuição dos sinais (D_2O)	67
Figura 2.20	Síntese dos complexos Re1 – Re5 por reacção directa dos conjugados 1 – 5 com o precursor $(\text{NEt}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$	68
Figura 2.21	Cromatograma de RP-HPLC da mistura reaccional da síntese de Re1 , obtido utilizando uma coluna Nucleosil C18 (100 - 5 μm) e um gradiente de TFA 0,1 %/ CH_3OH (Método 1, secção 3.2)	69
Figura 2.22	Síntese do complexo Re2 por via alternativa indirecta.....	70
Figura 2.23	Cromatograma de RP-HPLC do complexo Re2 obtido utilizando uma coluna Nucleosil C18 (100 - 5 μm) e um gradiente de TFA 0,1 %/ CH_3OH (Método 1, secção 3.2)	71
Figura 2.24	Cromatogramas analíticos de RP-HPLC dos <i>isómeros</i> Re2-a e Re-b obtidos utilizando uma coluna Nucleosil C18 (100 - 5 μm) e um gradiente de TFA 0,1 %/ CH_3OH (Método 1, secção 3.2).....	72
Figura 2.25	Espectros de IV do precursor $(\text{NEt}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ e dos complexos Re2 e Re3 , onde se destacam as bandas de vibração de extensão $\nu(\text{CO})$ (KBr)...	73
Figura 2.26	Espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo Re2 e respectivas atribuições dos sinais (D_2O)	76
Figura 2.27	Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo Re2 na zona δ 3,8 – 1,2.....	77
Figura 2.28	Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do complexo Re2 e respectivas atribuições dos sinais (D_2O)	79
Figura 2.29	Espectros de ^1H -RMN do conjugado 3 (A) e do complexo Re3 (B).....	80
Figura 2.30	Espectro de ^1H -RMN do complexo Re5 e respectivas atribuições dos sinais (D_2O)	81
Figura 2.31	Espectro de ^{13}C -RMN do complexo Re5 e respectivas atribuições dos sinais (D_2O)	81
Figura 2.32	(A) Espectro de massa no modo positivo do complexo Re3 obtido por ionização por electrospray; (B) expansão do pico correspondente a $[M+H]^+$.	82
Figura 2.33	Complexos radioactivos $^{99\text{m}}\text{Tc1}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc6}$	83

Figura 2.34	Preparação do precursor $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ e respectivo cromatograma analítico (coluna Nucleosil C18, 100 - 5 μ m, Método 1, secção 3.2, detecção γ)	84
Figura 2.35	Cromatogramas de RP-HPLC das misturas obtidas após reacção do conjugado 3 com o precursor $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$, utilizando as condições reaccionais apresentadas na Tabela 2.4 (coluna Nucleosil C18, 100 - 5 μ m, Método 1, secção 3.2, detecção γ).....	85
Figura 2.36	Cromatogramas de RP-HPLC das misturas obtidas após reacção do conjugado 6 com o precursor $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ (coluna Nucleosil C18, 100 - 5 μ m, Método 2, secção 3.2, detecção γ)	86
Figura 2.37	Cromatogramas analíticos de RP-HPLC dos complexos Re2 (detecção UV-254 nm) e $^{99m}Tc2$ (detecção γ)(coluna Nucleosil C18, 100 - 5 μ m, Método 2, secção 3.2)	88
Figura 2.38	Dependência da velocidade inicial (v) da concentração do substrato ($[S]$), segundo o comportamento cinético de Michaelis-Menten.....	90
Figura 2.39	Método Directo de Eisenthal e Cornish-Bowden para determinação das constantes V e K_m	91
Figura 2.40	Curva de progresso da reacção de conversão da L-ArgOH (150 μ M) em NO e L-Cit catalisada pelo iNOS. Reacção enzimática seguida espectrofotometricamente a 401 e 421 nm	93
Figura 2.41	Representação gráfica da regressão hiperbólica (A) e do Método Directo de Eisenthal e Cornish-Bowden (B) para a determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença de L-ArgOH.....	94
Figura 2.42	Representação gráfica da regressão hiperbólica (A) e do Método Directo de Eisenthal e Cornish-Bowden (B), para a determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença do inibidor 4 (150 μ M)	97
Figura 2.43	Avaliação da internalização <i>in vitro</i> dos complexos $^{99m}Tc2$, $^{99m}Tc4$, $^{99m}Tc5$ e $^{99m}Tc6$ em células de melanoma murino B16F1	100
Figura 2.44	Resultados de biodistribuição (% DI/órgão) do complexo $^{99m}Tc2$ em murganhos C57BL6 com melanoma murino B16F1.....	102
Figura 2.45	Resultados de biodistribuição (% DI/órgão) do complexo $^{99m}Tc4$ em murganhos C57BL6 com melanoma murino B16F1.....	103
Figura 2.46	Estabilidade <i>in vivo</i> /metabolização dos complexos $^{99m}Tc2$ e $^{99m}Tc4$. Radiocromatogramas obtidos por RP-HPLC analítico (Método 1, secção 3.2) 1 h após administração.....	106

Índice de Tabelas

Tabela 1.1	Principais inibidores do NOS, análogos da L-ArgOH.....	36
Tabela 1.2	Inibidores selectivos do NOS.....	37
Tabela 2.1	Dados de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN para os intermediários V e VI (D_2O).....	59
Tabela 2.2	Dados de RMN de ^1H dos complexos Re1 – Re5 e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).....	74
Tabela 2.3	Dados de RMN de ^{13}C dos complexos Re1 – Re5 e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).....	75
Tabela 2.4	Condições experimentais, rendimentos de reacção e tempos de retenção dos complexos $^{99\text{m}}\text{Tc3}/^{99\text{m}}\text{Tc4}$	85
Tabela 2.5	Tempos de retenção de RP-HPLC para os complexos organometálicos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e Re.....	87
Tabela 2.6	Valores de lipofilia ($\log P_{o/w}$) dos complexos $^{99\text{m}}\text{Tc2}$, $^{99\text{m}}\text{Tc4}$, $^{99\text{m}}\text{Tc5}$ e $^{99\text{m}}\text{Tc6}$	89
Tabela 2.7	Valores de K_m do iNOS obtidos na presença dos substratos L-ArgOH, L-ArgOMe, 2 , Re1 , Re2	95
Tabela 2.8	Valores de K_i do iNOS obtidos na presença dos inibidores $\text{N}^\omega\text{-NO}_2\text{-L-ArgOH}$, $\text{N}^\omega\text{-CH}_3\text{-L-ArgOH}$, 4 – 6 e Re3 – Re5	98
Tabela 2.9	Resultados de biodistribuição do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc2}$ em murganhos C57BL6 com melanoma murino B16F1, expressos em % DI/g órgão.....	102
Tabela 2.10	Resultados de biodistribuição do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc4}$ em murganhos C57BL6 com melanoma murino B16F1, expressos em % DI/g órgão.....	103
Tabela 2.11	Resultados de biodistribuição do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc4}$ purificado por RP-HPLC em murganhos C57BL6 com melanoma murino B16F1.....	105

Lista de símbolos e abreviaturas

Ac - grupo acetato

Asp - ácido aspártico

BC - boranocarbonato de potássio

BH₄ - tetrahidrobiopterina

BHE - barreira hemato-encefálica

BM - molécula biologicamente activa

BOC - tert-butoxicarbonilo

CaM - complexo Ca²⁺+calmodulina

CDK2 - *cyclin-dependent kinase 2*

CEA - antigénio carcinoembrionário

cGMP - guanosina monofosfato cíclica

cpm – contagens por minuto

d - dobreto

DAT - transportador da dopamina

Dbu - ácido 2,4-diaminobutírico

DCC – diciclohexilcarbodiimida

DCU - N,N'-diciclohexilureia

DI/g – dose injectada por grama de órgão

DMF - dimetilformamida

dp – desvio padrão

Dpr - ácido 2,3-diaminopropiónico

e⁻ - electrão

EC - *enzyme commission number*

ECD - dímero de etilcisteína

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

EDDA - etileno diamino diacetato

EDRF – factor relaxante derivado do endotélio/*endothelium-derived relaxing factor*

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

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

eV - electrão-volt

F – forte

f - fraca

fac - facial

FAD - flavina adenina dinucleotído

[¹⁸F]-FDG - [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxi-D-glicose

FGF – factor de crescimento do fibroblasto/*fibroblast growth factor*
FMN - flavina mononucleotído
Glu – ácido glutâmico
Gly - glicina
GRP - *Gastrin Releasing Peptide*
GSK-3 - *glycogen synthase kinase 3*
GTP - guanosina trifosfato
Hb - hemoglobina
HbO₂ - oxihemoglobina
HBTU - hexafluorofosfato de O-(benzotriazolo-1-ilo)-N,N,N',N'-tetrametilurônio
HMDP - hidroximetilenodifosfonato
HMPAO – hexametilpropileno amino oxima
HYNIC - ácido hidrazino nicotínico
IL-1 β - interleucina-1 β
imc - ácido-4-imidazolocarboxílico
INF γ - interferão γ
INF $\alpha\beta$ - interferão $\alpha\beta$
iNOS – óxido nítrico sintase induzida
ITLC - cromatografia em camada fina instantânea
IV – infravermelho
J - constante de acoplamento (Hz) entre dois núcleos
L-ArgOH - L-Arginina
LBF - ligando bifuncional
L-Cit - L-Citrulina
L-NA - N ^{ω} -Nitro-L-Arginina
L-NAA - N ^{ω} -Amino-L-Arginina
LNH - linfoma não-Hodgkin
L-NIL - N ^{ω} -Iminometil-Lisina
L-NIO - N ^{ω} -Iminometil-L-Ornitina
L-NMMA - N ^{ω} -MonoMetil-L-Arginina
L-NPA - N ^{ω} -Propil-L-Arginina
LPS – lipopolissacárido
Lys – lisina
m - múltiplo
M - média
MAG₃ – mercaptoacetiltriglicina
MC1R – receptores do tipo 1 da melanocortina
MDP – metilenodifosfonato

Me - metilo
Myr - miristato
NO – óxido nítrico
NADPH - fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotído
NAME - N^ω-Nitro-L-Arginina-Metil-Éster
NHS - N-hidroxisuccinimida
Nle – norleucina
NMDA - N-metil-D-aspartato
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
NOEt - N-etil- N-etoxi-ditiocarbamato
NOHA - NOH-L-ArgOH
NOH-L-ArgOH - N^ω-hidroxi-L-Arginina
NOS - óxido nítrico sintase
NSCLC - cancro do pulmão de não pequenas células/*Non small Cell Lung Cancer*
o/w – octanol/água
Palm – palmitato
PET - tomografia por emissão de positrões/*positron emission tomography*
p.i. - pós-injecção
Pim-1 - *protein kinase Pim-1*
PKC - *protein kinase C*
P_{o/w} – coeficiente de partição octanol/água
RGD - sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp
RMN - ressonância magnética nuclear
RP-HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
rpm – rotações por minuto
s - singuleto
sGC - enzima guanilato solúvel
SPECT - tomografia de emissão de fóton único/*single photon emission computed tomography*
SSS - serilserilserina
SSTR - receptores da somatostatina
t - tripleto
t.a – temperatura ambiente
TFA - ácido trifluoroacético
THF - tetrahidrofurano
TMS - tetrametilsilano
TNF α - *tumor necrosis factor α*
TPPTS - 3, 3', 3'' trissulfonato de trifenilfosfina trissódico

t_R – tempo de retenção

Tyr – tirosina

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

VEGF - factor de crescimento vascular endotelial/*vascular endothelial growth factor*

αMSH - *α-melanocyte stimulating hormone*

1400W - N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina

2,4-dipic - ácido 2,4-piridinodicarboxílico

α - alfa

γ - gama

k - hepticidade

δ – desvio químico

μM – micro molar

v – frequência de vibração

PREÂMBULO

A descoberta dos raios X por William Röntgen em 1895 e a sua aplicação na obtenção de imagens do corpo humano, pioneiramente exemplificada pela famosa radiografia da mão de sua mulher, contribuíram decisivamente para a atribuição do prémio Nobel da Física a este físico alemão em 1901. A introdução dos raios X na medicina deu origem à primeira técnica de imagem para diagnóstico clínico, culminando nas modernas técnicas de Mamografia, Ultra-sons e Tomografia Axial Computorizada, hoje correntemente utilizadas [1]. Outras técnicas mais recentes para imagiologia médica são a Ressonância Magnética de Imagem e as técnicas nucleares SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*) e PET (*Positron Emission Tomography*) utilizadas em medicina nuclear. As técnicas nucleares, que recorrem à administração de medicamentos contendo isótopos radioactivos (radiofármacos), apresentam como principais vantagens a sua sensibilidade intrínseca elevada, a possibilidade de detecção de alvos moleculares *in vivo* e a elevada resolução alcançada. Além disso, associada à caracterização anatómica de órgãos, permitem por vezes a sua avaliação funcional [2].

Um dos maiores desafios que se coloca actualmente à medicina em geral, e às técnicas de imagem em particular, é a detecção e quantificação *in vivo* das alterações bioquímicas e metabólicas a nível celular que antecedem as alterações morfológicas e anatómicas em caso de doença, permitindo assim um diagnóstico mais precoce. Uma das abordagens mais promissoras que tem vindo a ser seguida para se alcançar tal objectivo passa pelo desenvolvimento de novas sondas radioactivas para imagem capazes de reconhecer *in vivo*, com elevada especificidade e afinidade, alvos moleculares associados a determinados estados patológicos. Esta via integra-se num conceito mais geral actualmente designado por imagiologia molecular. De facto, nos últimos anos, essencialmente devido ao grande desenvolvimento verificado nas áreas da genómica e proteómica, foi possível identificar e caracterizar alguns dos alvos moleculares que estão sub- ou sobreexpressos em determinadas patologias. Assim, a síntese e caracterização química e biológica de novas sondas radioactivas, capazes de detectarem selectivamente *in vivo* esses alvos moleculares, é um dos desafios mais estimulantes que se coloca actualmente à química radiofarmacêutica [2, 3].

O tema desta tese de mestrado insere-se no âmbito desta nova abordagem, cujo objectivo a longo prazo é contribuir para o desenvolvimento de novos radiofármacos específicos de ^{99m}Tc , isótopo radioactivo mais utilizado em imagiologia nuclear, capazes de detectar e diagnosticar *in vivo* estados patológicos associados à desregulação do enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS), aqui considerado como alvo molecular específico.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 – RADIONUCLÍDEOS E SUAS APLICAÇÕES EM MEDICINA NUCLEAR

1.1.1 - Considerações gerais

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

Os radiofármacos são medicamentos, sem acção farmacológica, que têm na sua composição um isótopo radioactivo (radionuclídeo), de um elemento metálico ou não metálico, e são utilizados no diagnóstico ou terapia de doenças, dependendo da natureza e energia da radiação emitida [4, 5].

Os radiofármacos para diagnóstico contêm radionuclídeos emissores de radiação γ ou de partículas β^+ (positrões). Os radionuclídeos emissores γ com características mais apropriadas para diagnóstico e, conseqüentemente, mais utilizados em medicina nuclear são o ^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6,02$ h, $E_{\gamma(\text{max})} = 140$ KeV), o ^{123}I ($t_{1/2} = 13,20$ h, $E_{\gamma(\text{max})} = 159$ KeV), o ^{67}Ga ($t_{1/2} = 78,26$ h, $E_{\gamma(\text{max})} = 296$ KeV), o ^{201}Tl ($t_{1/2} = 72$ h, $E_{\gamma(\text{max})} = 167$ KeV) e o ^{111}In ($t_{1/2} = 67,9$ h, $E_{\gamma(\text{max})} = 245$ KeV) [6]. Apesar do ^{18}F ($t_{1/2} = 109,8$ min, $E_{\beta^+(\text{max})} = 202$ KeV) ser sem dúvida o radionuclídeo emissor β^+ mais utilizado em agentes de diagnóstico, existem ainda outros radionuclídeos de vida curta utilizados com alguma frequência na prática clínica, nomeadamente o ^{15}O ($t_{1/2} = 2,03$ min, $E_{\beta^+(\text{max})} = 650$ KeV), o ^{13}N ($t_{1/2} = 9,98$ min, $E_{\beta^+(\text{max})} = 432$ KeV) e o ^{11}C ($t_{1/2} = 20,4$ min, $E_{\beta^+(\text{max})} = 326$ KeV) [7].

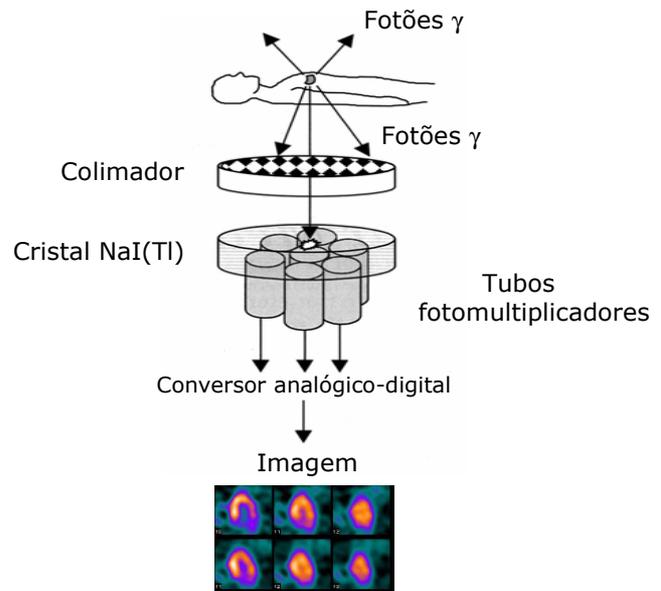
Após administração, distribuição e fixação do radiofármaco no órgão ou tecido alvo do paciente, a detecção externa da radiação emitida leva à obtenção de imagens que, após interpretação pelo clínico, poderão levar ao diagnóstico de diversas patologias.

Existem duas técnicas de imagem em medicina nuclear: a Tomografia de Emissão de Fóton Único (SPECT, *Single Photon Emission Computed Tomography*) e a Tomografia por Emissão de Positrões (PET, *Positron Emission Tomography*).

A técnica SPECT permite a detecção de fótons γ , com energia idealmente compreendida entre 100 e 150 KeV. A imagem tomográfica da distribuição da radiação é obtida à medida que uma câmara gama, constituída por um cristal único de NaI(Tl), vai rodando em torno do paciente, permitindo assim obter imagens nos diversos planos anatómicos (Figura 1.1) [4].



(A)



(B)

Figura 1.1: Câmara gama com detector rotativo utilizada na técnica SPECT (A) e representação esquemática dos seus principais componentes (B).

Na técnica PET, as imagens são obtidas por administração de radiofármacos que têm na sua composição radionuclídeos emissores de β^+ que, ao colidirem com os electrões do meio (tecidos), são rapidamente aniquilados, originando dois fotões γ antiparalelos com energia de 511 KeV. Devido à detecção simultânea dos dois fotões antiparalelos, por intermédio de detectores múltiplos dispostos de um modo circular, a resolução espacial e a sensibilidade da técnica PET (4 - 8 mm) são superiores às da técnica SPECT (7 - 10 mm) [4]. Na técnica PET, ao contrário da SPECT, não é necessário recorrer a colimadores, uma vez que os detectores circulares, por coincidência dos fotões antiparalelos, conseguem identificar o local onde ocorreu a aniquilação (Figura 1.2) [4].

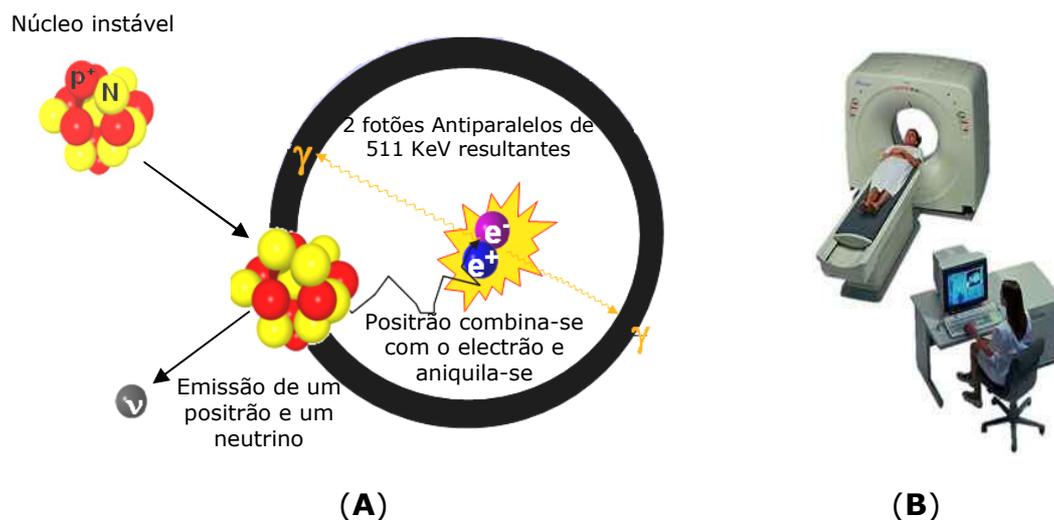


Figura 1.2: Técnica PET.

Aniquilação de uma partícula β^+ por interacção com um electrão, produzindo dois fótons γ antiparalelos de energia fixa (511 keV). O sinal dos fótons γ emitidos é facilmente detectado, permitindo a localização do radionuclídeo (A). Fotografia de uma câmara PET (B).

A $[^{18}\text{F}]$ -2-fluoro-2-deoxi-D-glicose ($[^{18}\text{F}]$ -FDG) é, actualmente, o radiofármaco mais utilizado na técnica PET, sendo responsável por mais de 95 % dos exames PET realizados. Na Figura 1.3 apresenta-se uma imagem obtida por PET com o radiofármaco $[^{18}\text{F}]$ -FDG, de um paciente com metástases múltiplas causadas por cancro do pulmão de não pequenas células (NSCLC - *Non small Cell Lung Cancer*) [4, 8].

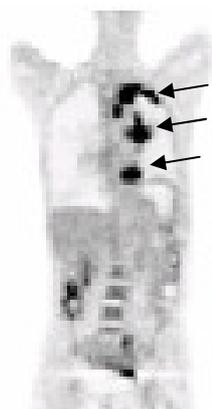


Figura 1.3: Imagem obtida por PET com o radiofármaco $[^{18}\text{F}]$ -FDG, onde se assinalam as lesões num pulmão.

Uma das desvantagens associadas à técnica PET é o período de semi-desintegração curto dos isótopos mais frequentemente utilizados (2 - 110 min), o que obriga a que sejam produzidos o mais próximo possível do local onde o exame vai ser realizado, com a consequente necessidade de um ciclotrão junto dos locais de utilização [4].

Os radiofármacos para terapia devem incluir na sua composição radionuclídeos emissores de radiação com elevado poder ionizante, com vista à destruição localizada e selectiva dos tecidos alvo, e de capacidade penetrante reduzida, de modo a evitar a irradiação desnecessária dos tecidos não-alvo. Os isótopos radioactivos que potencialmente preenchem os pré-requisitos referidos são os emissores de partículas carregadas, nomeadamente partículas alfa (α) e beta (β^-) e electrões Auger. Os radionuclídeos usados em radioterapia que sejam também emissores de radiação γ podem ser vantajosos, pois permitem visualizar, simultaneamente, a distribuição *in vivo* do radiofármaco utilizado no tratamento [9, 10].

Os radiofármacos actualmente aprovados para utilização em terapia são em número relativamente reduzido e restringem-se a compostos que contêm emissores β^- . De entre os radionuclídeos emissores β^- utilizados na clínica destacam-se o ^{90}Y ($t_{1/2} = 2,7$ d, $E_{\beta^- (\text{max})} = 2,27$ MeV), o ^{131}I ($t_{1/2} = 8,0$ d, $E_{\beta^- (\text{max})} = 0,81$ MeV, $E_{\gamma (\text{max})} = 0,364$ MeV) e o ^{153}Sm ($t_{1/2} = 1,9$ d, $E_{\beta^- (\text{max})} = 0,8$ MeV, $E_{\gamma (\text{max})} = 0,103$ MeV) [9, 10].

A utilização de radionuclídeos emissores de partículas α em radiofármacos para terapia encontra-se ainda numa fase inicial do seu desenvolvimento. Para que se torne possível a sua utilização rotineira é necessário desenvolver novos compostos radioactivos com elevada especificidade molecular *in vivo*, de modo a evitar a exposição de tecidos saudáveis adjacentes a radiação altamente ionizante. Além disso, os radionuclídeos utilizados deverão apresentar um período de semi-desintegração e energia adequados e serem de fácil acesso. A maioria dos radionuclídeos emissores de partículas α têm períodos de semi-desintegração demasiado longos, incompatíveis para aplicações *in vivo*, sendo as únicas excepções o ^{211}At ($t_{1/2} = 7,2$ h, $E_{\alpha (\text{média})} = 6,8$ MeV) e o ^{212}Bi ($t_{1/2} = 1$ h, $E_{\alpha (\text{média})} = 7,8$ MeV) [9, 10].

Alguns radionuclídeos emissores de electrões Auger tais como o ^{125}I ($t_{1/2} = 60,5$ d, 20 electrões/decaimento), ^{111}In ($t_{1/2} = 67,9$ h, 15 e^- /decaimento), $^{195\text{m}}\text{Pt}$ ($t_{1/2} = 4$ d, 36 e^- /decaimento) e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($t_{1/2} = 6,02$ h, 4 e^- /decaimento) são também promissores em termos de utilização em terapia. No entanto, devido ao curto alcance dos e^- Auger, é necessário desenvolver radiofármacos específicos que sejam capazes de chegar ao núcleo das células e de interactuar com o DNA [9 - 11].

1.1.2 – Importância do tecnécio-99m (^{99m}Tc)

1.1.2.1 – Considerações gerais sobre o tecnécio

O tecnécio, elemento de transição-*d* da tabela periódica, é um metal radioactivo não natural que foi descoberto por Perrier e Segré no final da década de 40, em Berkeley, Califórnia, quando estudavam num ciclotrão reacções de deuterões com molibdénio metálico. Este foi o primeiro elemento produzido pelo homem, derivando o seu nome da palavra grega “technetos” que significa artificial. O tecnécio apresenta 30 isótopos, 9 dos quais metaestáveis, com períodos de semi-desintegração que vão de alguns segundos a milhões de anos. O único isótopo disponível em quantidades macroscópicas é o ^{99}Tc , que tem um período de semi-desintegração de $2,12 \times 10^5$ anos [4]. De todos os isótopos de tecnécio, apenas o ^{99m}Tc apresenta um conjunto de propriedades físicas e químicas adequadas à sua utilização em exames de diagnóstico em medicina nuclear:

- decaimento por emissão de fotões γ com $E_{\text{max}} = 140 \text{ KeV}$ **1)** próxima do valor óptimo para imagem com as câmaras gama actuais e **2)** suficientemente elevada para atravessar os tecidos e permitir a obtenção de imagens dos órgãos;
- período de semi-desintegração ($t_{1/2} = 6,02 \text{ h}$) **1)** suficientemente longo para permitir a síntese do radiofármaco, o seu controlo de qualidade, a administração ao paciente e a aquisição de imagens e **2)** suficientemente curto para minimizar a dose de radiação a que o paciente está sujeito;
- facilidade de obtenção a partir de um gerador comercial de molibdénio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$);
- química de coordenação muito variada, o que permite preparar uma grande variedade de complexos com diferentes propriedades físico-químicas e biológicas.

Actualmente, o ^{99m}Tc é empregue em mais de 85 % de todos os exames de diagnóstico realizados em medicina nuclear [4].

O gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Figura 1.4), desenvolvido no Brookhaven National Laboratory no início dos anos 60, consiste num sistema composto por uma coluna cromatográfica de óxido de alumínio (Al_2O_3), ao qual está adsorvido o ^{99}Mo na forma de $[\text{MoO}_4]^{2-}$ [4].

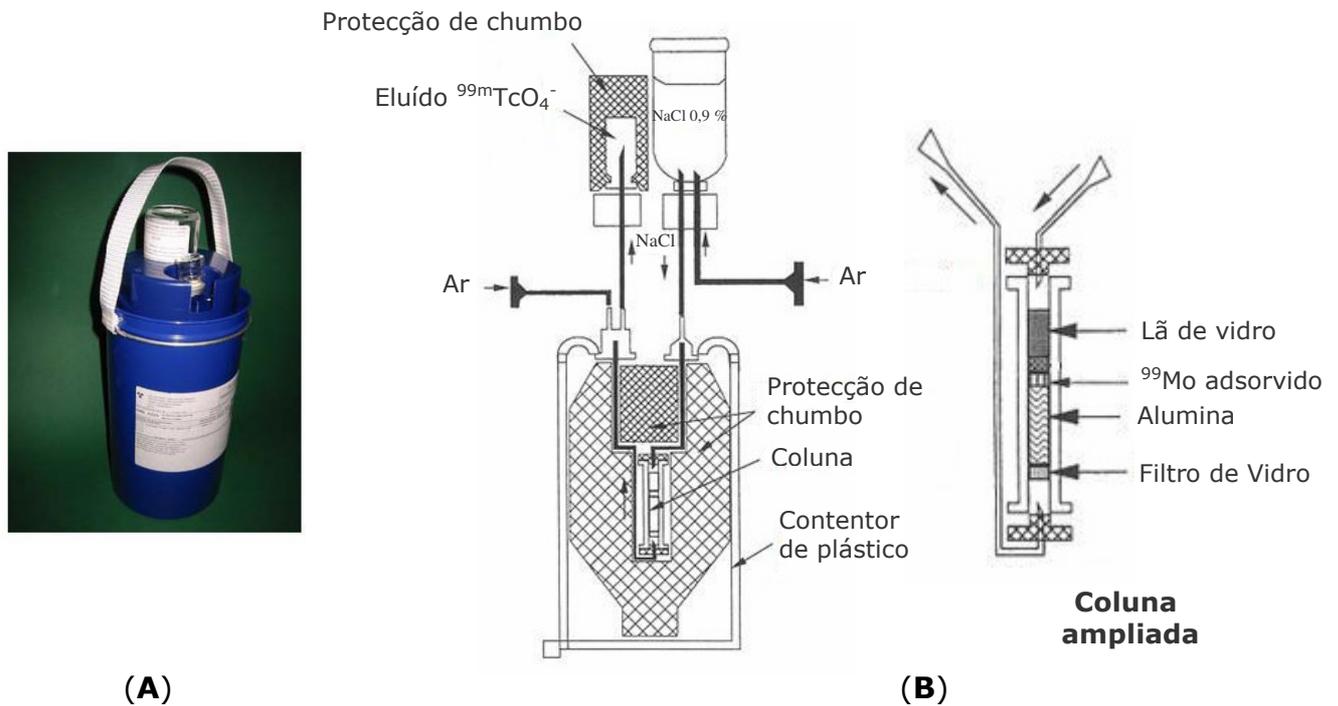


Figura 1.4: Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$.

(A) Fotografia do gerador comercial Mallinkrodt Ultra-TechneKow[®]. (B) Corte vertical do interior de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ e representação esquemática do seus componentes.

Tal como se ilustra na Figura 1.5, o ^{99}Mo desintegra-se dando origem ao ^{99m}Tc , que é obtido sob a forma de $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ e numa concentração final de 10^{-9} - 10^{-12} M, fazendo-se eluir o gerador com uma solução salina 0,9 % (estéril e apirogénia) [4].

Devido à diferença de cargas entre o $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ e o $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^{2-}$ é possível eluir selectivamente o pertecnetato, continuando o anião molibdato adsorvido na coluna.

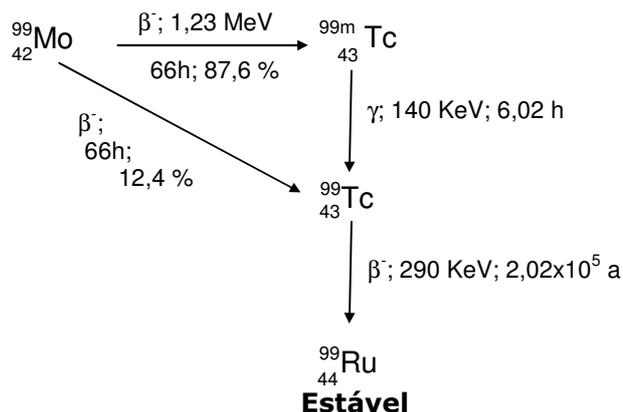


Figura 1.5: Diagrama de decaimento radioactivo do ${}^{99}\text{Mo}$ e do ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ [9].

O ${}^{99}\text{Mo}$ decai quer para o estado metaestável ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($t_{1/2} = 66 \text{ h}$, $E = 1,23 \text{ MeV}$) quer directamente para o estado fundamental ${}^{99}\text{Tc}$ por emissão β^- . O radionuclídeo ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ decai para ${}^{99}\text{Tc}$ por transição isomérica ($t_{1/2} = 6,02 \text{ h}$, $E = 140 \text{ KeV}$). O ${}^{99}\text{Tc}$ ($t_{1/2} = 2,02 \times 10^5 \text{ anos}$, $E = 290 \text{ KeV}$) decai por emissão β^- para ${}^{99}\text{Ru}$ estável.

O tecnécio apresenta vários estados de oxidação (-1 a VII), sendo possível isolar complexos deste elemento com geometrias de coordenação muito diversas. Em solução aquosa o ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ forma facilmente as espécies $[{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ e TcO_2 nas quais o metal se encontra no estado de oxidação VII e IV, respectivamente. A espécie TcO_2 não é útil do ponto de vista de síntese mas a espécie $[{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ constitui um bom material de partida para a síntese de outros complexos em meio aquoso. A redução do Tc (VII) a estados de oxidação mais baixos é realizada utilizando diferentes agentes redutores, sendo o cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) um dos compostos mais utilizados na preparação de radiofármacos de ${}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{III})$ ou ${}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{V})$. O estado de oxidação final a que o Tc(VII) é reduzido, depende não só da natureza do agente redutor, mas também das condições reaccionais e do tipo de ligando na presença do qual o metal é reduzido [4, 5, 12, 13].

Até ao momento, os estados de oxidação intermédios de Tc(III) e (V) têm sido os mais explorados para a síntese de radiofármacos de ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$. Recentemente, os complexos de Tc(I) do tipo tricarbonilo têm assumido uma importância crescente na investigação e desenvolvimento de novos radiofármacos de ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ [5].

Devido à baixa concentração total de tecnécio no eluído do gerador, não é possível a caracterização dos complexos de ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ pelos métodos convencionais utilizados em química inorgânica. Assim, a identificação estrutural desses complexos faz-se recorrendo à síntese dos compostos análogos de ${}^{99}\text{Tc}$ ou de Re inactivo. Devido a um fenómeno

genericamente denominado por contracção dos lantanídeos pode assumir-se que o comportamento químico do rénio é semelhante ao do tecnécio. A principal diferença reside no facto de os complexos de Re serem significativamente mais difíceis de reduzir e cineticamente mais inertes do que os seus análogos de Tc. Considera-se que os complexos de Re e Tc têm a mesma estrutura química quando apresentam um comportamento cromatográfico idêntico. Uma das técnicas mais utilizadas é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detector de radiação γ e a um detector UV [12].

A química do rénio tem sido alvo de grande desenvolvimento não só por servir como modelo inactivo para o desenvolvimento de radiofármacos de ^{99m}Tc , mas também para o desenvolvimento de radiofármacos contendo os isótopos radioactivos ^{186}Re e ^{188}Re , emissores β^- , potencialmente úteis para terapia [10].

1.1.2.2 – Radiofármacos de ^{99m}Tc

Os radiofármacos podem ser genericamente subdivididos em duas categorias, designadamente, radiofármacos de 1ª geração ou agentes de perfusão e radiofármacos de 2ª geração ou específicos [5].

Nos radiofármacos de 1ª geração assume-se que a farmacocinética e a selectividade são exclusivamente influenciadas pelas propriedades físico-químicas dos complexos formados, nomeadamente, pelo seu peso molecular, carga e lipofilia [5].

Os radiofármacos de 2ª geração, ou específicos, contêm uma biomolécula (anticorpo monoclonal, péptido regulador, agonista ou antagonista de receptores específicos, etc) com afinidade para alvos moleculares associados a determinados estados patológicos. Desta forma, a distribuição e fixação do radiofármaco nos tecidos e órgãos alvos são determinadas não só pelas suas propriedades físico-químicas, mas também pela capacidade que a biomolécula tem em reconhecer os seus alvos específicos *in vivo* [5].

1.1.2.2.1 – Radiofármacos de 1ª geração ou agentes de perfusão

Na Figura 1.6 estão representados alguns exemplos de radiofármacos de 1ª geração em utilização clínica, indicando-se também qual a sua aplicação.

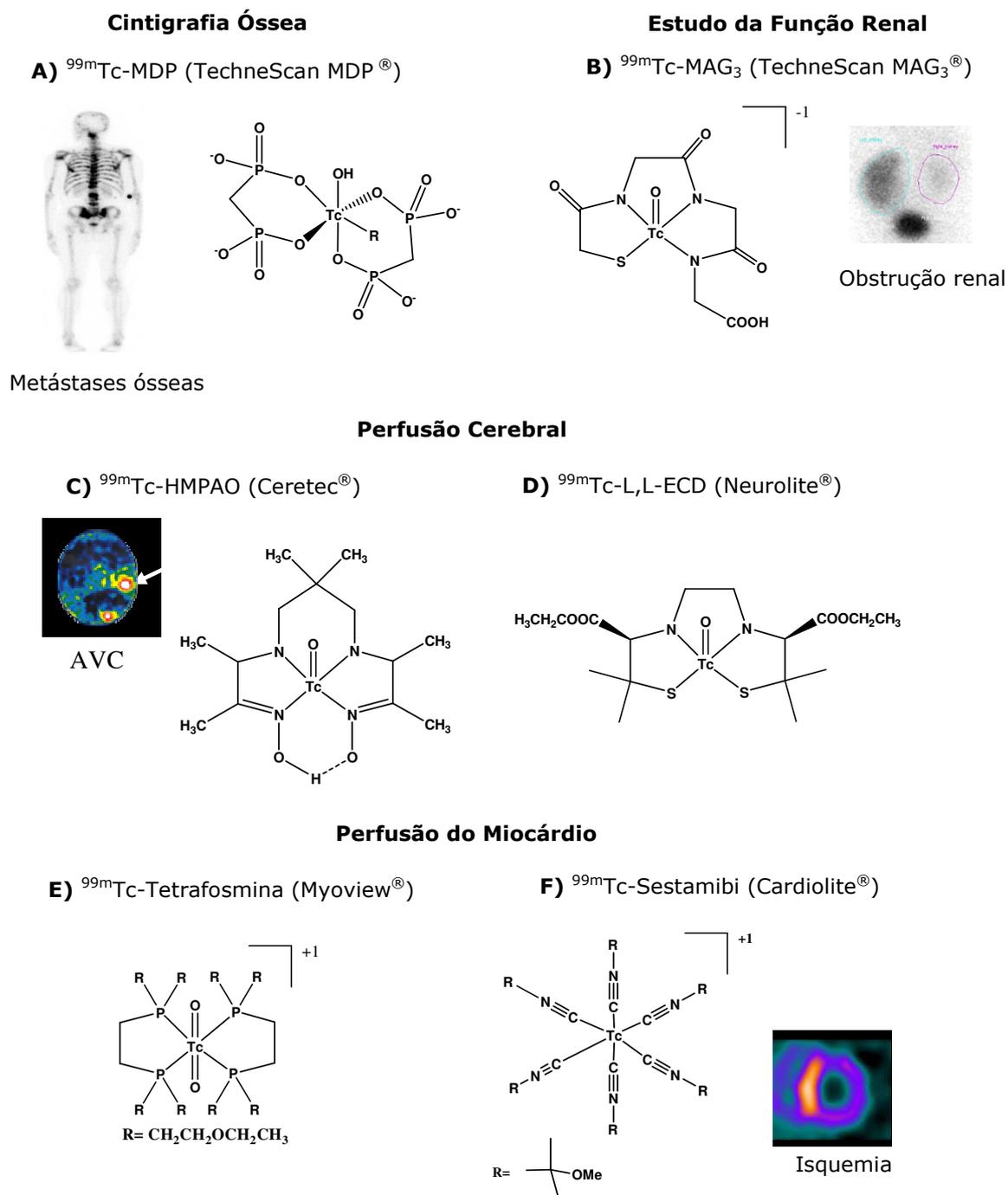


Figura 1.6: Exemplos de radiofármacos de ^{99m}Tc em uso clínico e respectivas aplicações.

* Na estrutura do ^{99m}Tc -MDP (A) o R indica a formação de misturas poliméricas [14].

O ^{99m}Tc -MDP (MDP = metilenodifosfonato; Figura 1.6, **A**) e o ^{99m}Tc -HMDP (HMDP = hidroximetilenodifosfonato), utilizados como agentes de imagem óssea, foram os primeiros radiofármacos desenvolvidos para aplicações de diagnóstico. Estes produtos fixam-se preferencialmente em locais de crescimento activo do osso (*e.g.* metástases e fracturas). A estrutura química dos complexos formados com os ligandos MDP e HMDP não é conhecida, uma vez que não se formam espécies químicas únicas, mas sim misturas poliméricas de cadeia curta e longa [12, 14].

Um dos radiofármacos de ^{99m}Tc mais utilizado para estudos de avaliação da função renal é o ^{99m}Tc -MAG₃ (Technescan MAG₃[®]; Figura 1.6, **B**). Apesar da estrutura exacta do complexo não ser conhecida, estima-se que a pH fisiológico o grupo carboxilato livre desprotonado não se coordena ao metal, conferindo ao complexo uma carga total 2⁻ responsável pela secreção tubular activa deste radiofármaco [4].

Devido à sua natureza neutra e lipofílica, o complexo ^{99m}Tc -HMPAO (Ceretek[®]; Figura 1.6, **C**) atravessa facilmente a Barreira Hemato-Encefálica (BHE). O seu mecanismo de retenção cerebral parece estar relacionado com a formação de uma espécie mais hidrofílica por reacção com o glutationato, impedindo que o complexo atravesse a BHE em sentido contrário [13, 15, 16].

O ^{99m}Tc -L,L-ECD (Neurolite[®]; Figura 1.6, **D**), utilizado para quantificar o fluxo sanguíneo cerebral, também atravessa facilmente a BHE devido à sua natureza neutra e lipofílica. A nível cerebral, uma das funções éster é hidrolisada a ácido, ficando o complexo carregado negativamente, o que leva, assim, à sua retenção selectiva no cérebro [4, 17].

A ^{99m}Tc -tetrafosmina (Myoview[®]; Figura 1.6, **E**) e o ^{99m}Tc -Sestamibi (Cardiolite[®]; Figura 1.6, **F**) são usados para estudos de perfusão do miocárdio. A fixação selectiva no miocárdio está relacionada com a natureza lipofílica e catiónica dos complexos formados [4, 18, 19]. O ^{99m}Tc -Sestamibi é o único radiofármaco em uso clínico, no qual o ^{99m}Tc se encontra no estado de oxidação I. É de salientar que, à excepção deste exemplo, praticamente todos os radiofármacos de primeira geração aprovados para uso clínico têm como base as unidades metálicas $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$ e $[\text{O}=\text{Tc}=\text{O}]^{+}$, em que o metal está no estado de oxidação V.

Recentemente, foi desenvolvido o complexo radioactivo $[\text{}^{99m}\text{TcN}(\text{NOEt})_2]$, potencialmente útil para a visualização do miocárdio, contendo a unidade $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ (Figura 1.7) [20].

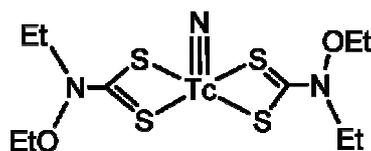


Figura 1.7: Estrutura do complexo neutro $[^{99m}\text{TcN}(\text{NOEt})_2]$ (CisNoet[®]; NOEt = N-etil- N-etoxi-ditiocarbamato) [20].

Os ensaios clínicos de fase III em curso permitiram evidenciar as suas excelentes propriedades farmacocinéticas, adequadas à visualização do miocárdio [21].

O mesmo grupo de investigação reportou ainda uma nova classe de complexos assimétricos com a unidade $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$, de fórmula geral $[^{99m}\text{TcN}(\text{PNP})(\text{L})]^+$ onde L é um ditiocarbamato monoaniónico do tipo $[\text{R}^1(\text{R}^2)\text{-N-C}(=\text{S})\text{S}]^-$, PNP é uma bisfosfina do tipo $[\text{R}^3_2(\text{P})\text{-(CH}_2)_2\text{]}_2\text{-N}(\text{R}^4)$ e $\text{R}^1\text{-R}^4$ são diferentes tipos de éteres alifáticos (Figura 1.8).

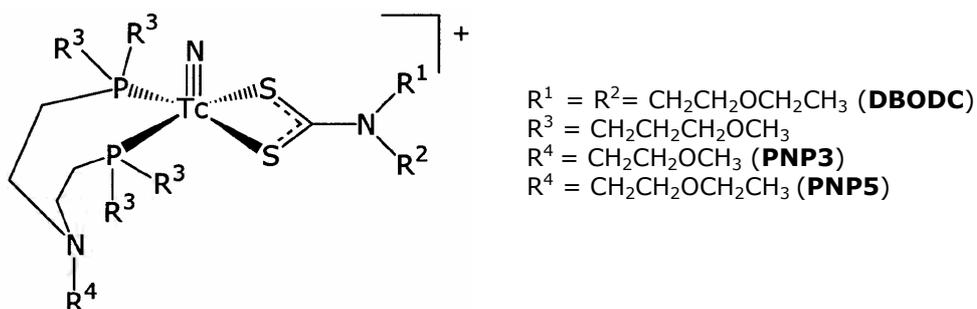


Figura 1.8: Estrutura química dos complexos cationicos $[^{99m}\text{TcN}(\text{PNP3})(\text{DBODC})]^+$ e $[^{99m}\text{TcN}(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ para perfusão do miocárdio [22].

Os estudos de biodistribuição em murganhos revelaram que os complexos $[^{99m}\text{TcN}(\text{PNP3})(\text{DBODC})]^+$ e $[^{99m}\text{TcN}(\text{PNP5})(\text{DBODC})]^+$ apresentam uma selectividade para o miocárdio e um comportamento biológico comparável aos radiofármacos comerciais Cardiolite[®] e Myoview[®] [22, 23].

1.1.2.2.2 – Radiofármacos de 2ª geração ou específicos

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 radiofármacos mais recentemente introduzidos no mercado, e aqueles que estão em fase de avaliação pré-clínica e clínica, pertencem à categoria dos radiofármacos específicos. De facto, a investigação em química radiofarmacêutica tem

sido direccionada no sentido do desenvolvimento de sondas radioactivas 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, a detecção precoce de certas doenças [24-29].

No desenvolvimento de radiofármacos específicos têm sido essencialmente exploradas duas aproximações diferentes, designadamente a marcação por via directa e indirecta.

No método de marcação por via directa, o metal liga-se directamente à biomolécula através de grupos funcionais nela existentes e que tenham afinidade para o metal em causa. As principais vantagens associadas a este método são a facilidade de execução e a elevada eficiência de marcação. No entanto, este método torna difícil a caracterização estrutural dos complexos formados [4, 29]. Além disso, esta abordagem restringe-se praticamente à marcação de anticorpos ou fragmentos de anticorpos monoclonais, pois na maioria das biomoléculas de baixo peso molecular, os grupos possíveis de coordenar ao metal radioactivo são muitas vezes indispensáveis para a sua actividade biológica.

Actualmente, apenas dois anticorpos monoclonais de ^{99m}Tc , em que o metal radioactivo se liga ao anticorpo monoclonal pelo método directo, estão aprovados para uso clínico: o Arcitumomab (CEA-Scan[®]; immunomedics, Inc) e o LeukoScan[®] (Immunomedics, Inc.). O Arcitumomab é um anticorpo monoclonal específico para o antigénio carcinoembrionário (CEA) sobreexpresso pelas células do cancro colorectal [30-35]. O LeukoScan[®], também conhecido por Sulesomab, é um fragmento de anticorpo monoclonal anti-granulócitos utilizado na avaliação e extensão da infecção/inflamação óssea em pacientes com suspeita de osteomielite [36].

Em ensaios clínicos de fase III está o Lymphoscan[®] (Immunomedics, Inc), que consiste num fragmento de anticorpo monoclonal ligado a ^{99m}Tc , para visualização do antigénio CD22 sobreexpresso em linfomas. O Lymphoscan[®] é indicado para o estadiamento e determinação da eficácia da terapia em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH) [31, 33].

No método de marcação por via indirecta são utilizados os chamados agentes quelantes bifuncionais (LBF), que permitem a estabilização do centro metálico e, simultaneamente, possibilitam a ligação à biomolécula (BM), sendo desejável que não alterem as suas propriedades biológicas (Figura 1.9).



Figura 1.9: Representação esquemática da estrutura de um radiofármaco específico contendo um ligando bifuncional.

De modo a minimizar a perda de actividade biológica, é geralmente aceite que o centro metálico deve estar o mais afastado possível da biomolécula. Com esta finalidade, a ligação entre o agente quelante e a biomolécula deverá ser feita através de um espaçador que, para além de aumentar a distância da biomolécula ao centro metálico, pode permitir, mediante a introdução de diferentes tipos de espaçadores, modelar a farmacocinética do radiofármaco [24-29].

No que diz respeito aos radiofármacos específicos de tecnécio em uso clínico que recorrem à via de marcação indirecta, são de destacar os radiopéptidos ^{99m}Tc -depreótido (Neospect[®]) e o ^{99m}Tc -Apcitide (Acutech[®]) (Figura 1.10). O ^{99m}Tc -depreótido é um péptido sintético que se liga especificamente aos receptores da somatostatina (SSTR) sobreexpressos em tumores pulmonares. O ^{99m}Tc -Apcitide é um radiofármaco para diagnóstico baseado num péptido sintético que se liga especificamente aos receptores GPIIb/IIIa sobreexpressos nas plaquetas activadas, o componente principal na formação activa de trombos. Este produto está indicado como agente de diagnóstico na localização de trombozes venosas agudas nas extremidades inferiores [37, 38].

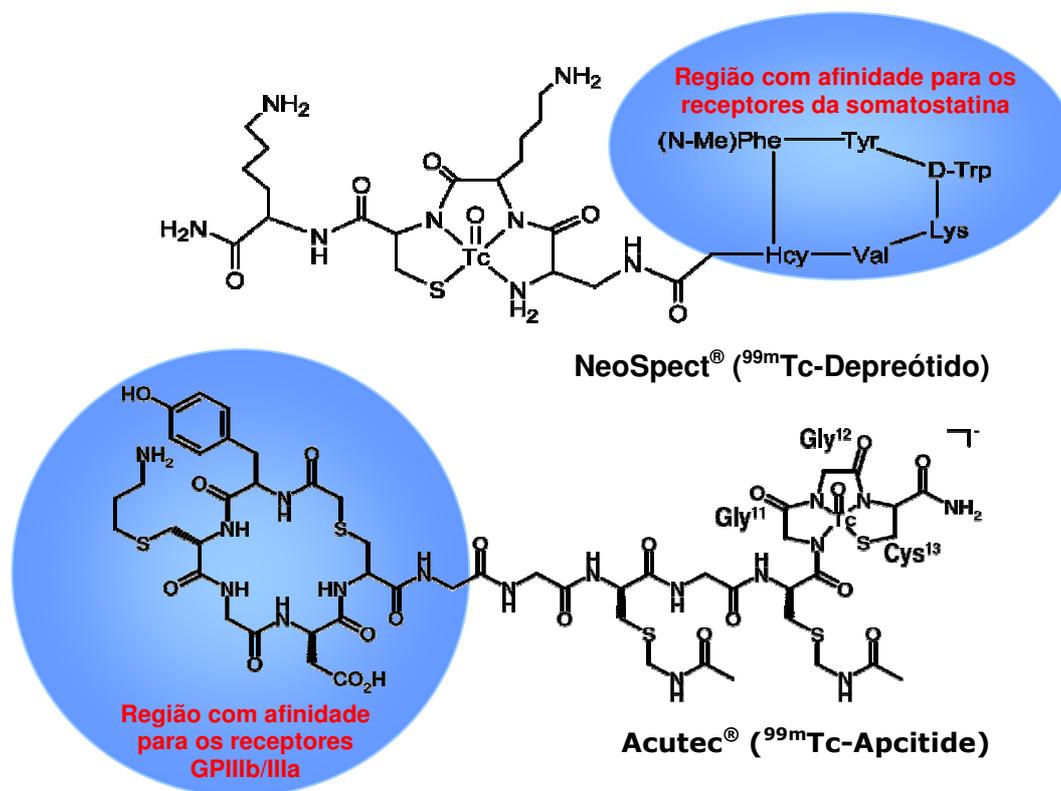


Figura 1.10: Radiopéptidos de ^{99m}Tc actualmente em utilização clínica.

1.1.2.3 – Novos complexos específicos de ^{99m}Tc – I & D

A concepção e síntese de novos agentes quelantes bifuncionais para estabilização do ^{99m}Tc em diferentes estados de oxidação, com vista ao desenvolvimento de novos complexos radioactivos potencialmente úteis em radiofarmácia, é uma área de intensa investigação na química radiofarmacêutica. As unidades de ^{99m}Tc e os respectivos estados de oxidação que têm sido mais utilizados para esse fim estão esquematizados na Figura 1.11 [24].

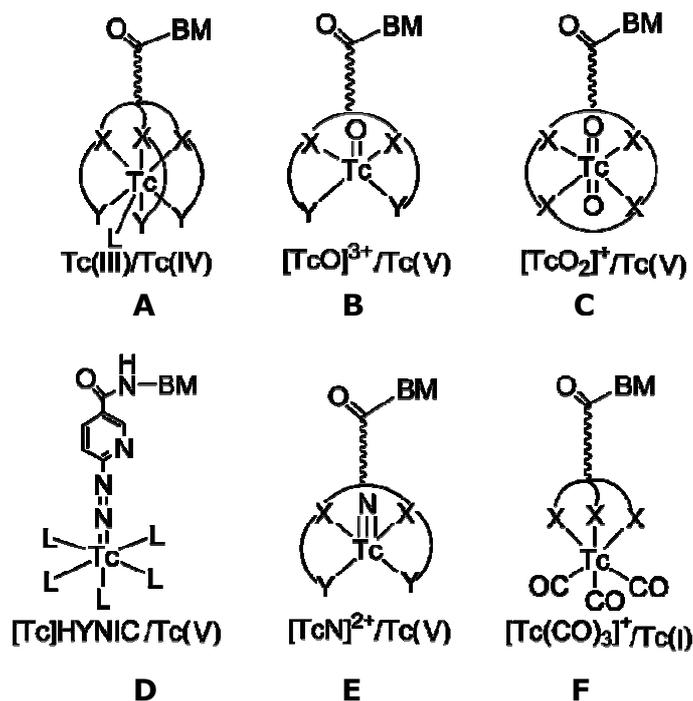


Figura 1.11: Fragmentos metálicos de ^{99m}Tc utilizados para ligação a biomoléculas (BM = biomolécula).

A unidade de ^{99m}Tc que tem sido mais explorada é a unidade $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$ (Figura 1.11, **B**). Os ligandos mais utilizados para estabilizar este fragmento metálico contêm átomos de S e N capazes de se coordenarem ao metal. De entre os vários biocomplexos já preparados, destacam-se os radiofármacos NeoSpect[®] e Acutec[®] em uso clínico, já referidos anteriormente, nos quais o centro metálico é estabilizado por um conjunto de átomos doadores N_3S . De referir ainda o complexo ^{99m}Tc -TRODAT (Figura 1.12), em que o metal está coordenado a um conjunto de átomos doadores N_2S_2 .

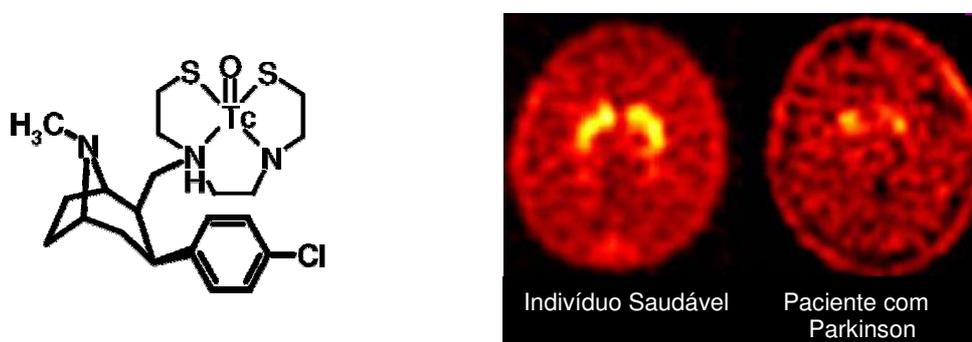


Figura 1.12: Estrutura do ^{99m}Tc -TRODAT, complexo útil na visualização dos transportadores da Dopamina (DAT), isto é, para diagnóstico da doença de Parkinson.

Este complexo radioactivo encontra-se em fase avançada de ensaios clínicos e serve para visualizar os transportadores da dopamina (DAT) [13].

Para além da unidade $[Tc=O]^{3+}$ têm ainda sido desenvolvidos esforços na concepção e preparação de novos agentes quelantes bifuncionais para a estabilização dos fragmentos metálicos $[Tc]-HYNIC$, $[Tc\equiv N]^{2+}$ e *fac*- $[Tc(CO)_3]^+$ (Figura 1.11, **D**, **E** e **F**).

Em determinadas condições reaccionais, o ácido hidrazino nicotínico (HYNIC; Figura 1.13, **A**), em conjugação com os co-ligandos tricina, glucoheptonato, EDDA (etileno diamino diacetato), fosfinas hidrossolúveis (*e.g.* TPPTS - 3, 3', 3'' trisulfonato de trifenilfosfina trissódico) ou N-heterociclos (*e.g.* derivados da piridina e do imidazolo) origina uma grande variedade de complexos mistos com o fragmento $[Tc]-HYNIC$ (Figura 1.13, **B**, **C** e **D**).

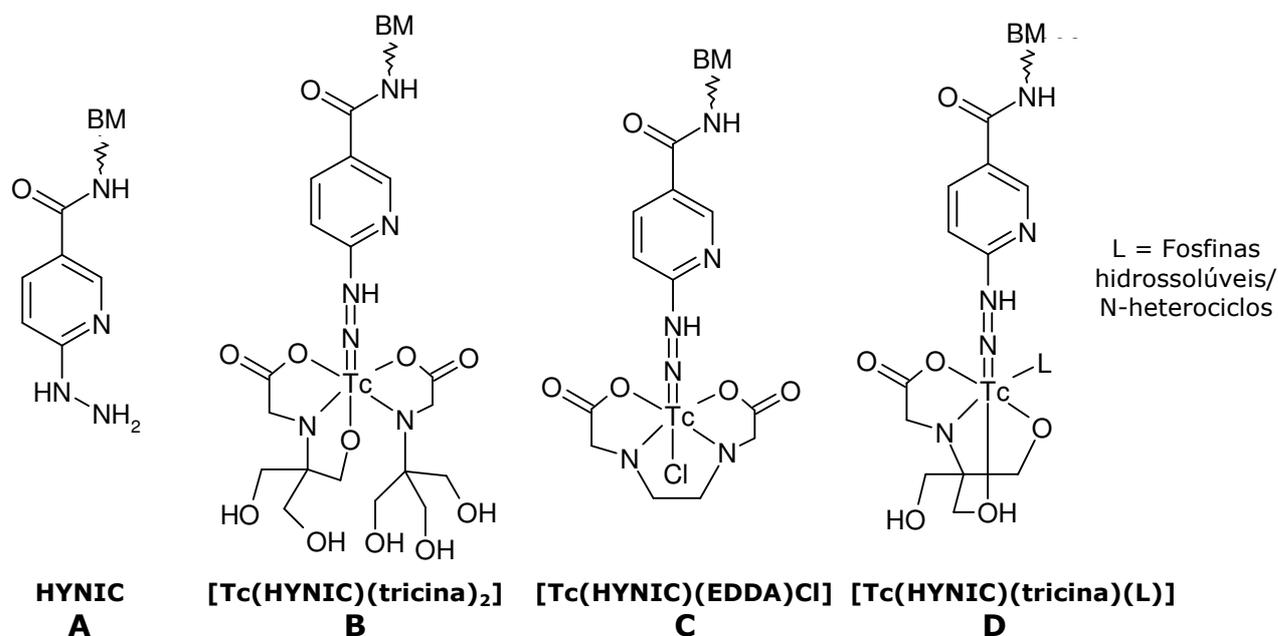


Figura 1.13: Estruturas propostas para os complexos com o fragmento metálico $[Tc]-HYNIC$ para marcação radioactiva de biomoléculas [5].

Desta forma, é possível a marcação radioactiva com elevados rendimentos de biomoléculas, nomeadamente de péptidos biologicamente activos e anticorpos monoclonais. A grande vantagem desta abordagem é a possibilidade de se poder regular a lipofilia e farmacocinética dos complexos através da escolha de diferentes combinações de co-ligandos [5, 39-41].

No que diz respeito ao fragmento metálico $[Tc\equiv N]^{2+}$, os complexos assimétricos e neutros do tipo $[^{99m}TcN(PNP)(SO-BM)]$ (Figura 1.14, SO = cisteína) têm sido propostos

como sondas radioativas para visualização dos receptores da benzodiazepina (BM = derivados do diazepam) e dos receptores 5-HT_{1A} do Sistema Nervoso Central (BM = 2-metoxifenilpiperazina). No entanto, os resultados obtidos até ao momento não têm sido promissores, uma vez que a retenção cerebral *in vivo* é negligível [42, 43].

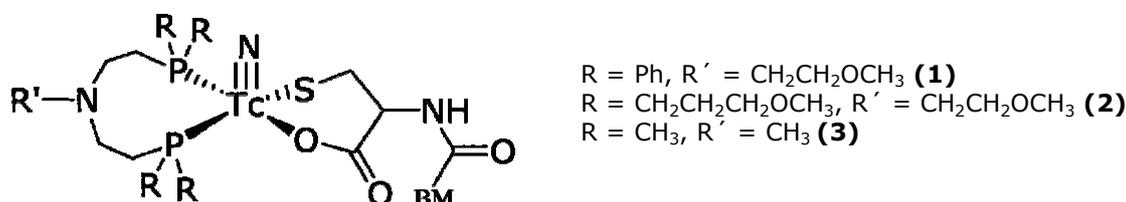


Figura 1.14: Complexos do tipo $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcN}(\text{PNP})(\text{SO-BM})]$ para marcação de biomoléculas [42, 43].

1.1.2.4 – Complexos específicos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ contendo a unidade *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$

1.1.2.4.1 – Vantagens da unidade *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$

De entre as metodologias mais recentemente introduzidas para o desenvolvimento de novos radiofármacos específicos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, a aproximação organometálica baseada em complexos com a unidade *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$, obtida a partir do precursor *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, tem sido uma das mais promissoras (Figura 1.11, **F**). Devido à configuração electrónica d^6 do metal, esta unidade apresenta uma elevada estabilidade cinética em relação à substituição total ou parcial dos ligandos CO, o que lhe confere elevada resistência. Também a estabilidade à oxidação, demonstrada numa vasta gama de pH em solução aquosa, constitui outra vantagem adicional da unidade *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$, relativamente às aproximações com as unidades de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ mais tradicionais, nomeadamente a unidade $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$. Para além disso, no precursor *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ os três ligandos carbonilo fortemente ligados ao centro metálico, labilizam as três moléculas de H_2O em posição trans, possibilitando a sua substituição por uma grande variedade de agentes quelantes. A facilidade de obtenção deste precursor a partir de $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ utilizando um “Kit” (*Isolink*[®], Tyco Healthcare, Mallinckrodt), introduzido no mercado para investigação, constitui uma das principais vantagens associadas à utilização da unidade *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ na química radiofarmacêutica [5, 26].

controladas, liberta CO e reduz simultaneamente o Tc(VII) a Tc(I). O BC é razoavelmente estável entre pH neutro e básico, mas decompõe-se rapidamente em meio ácido [46].

Foram as excelentes características do composto $K_2[H_3BCO_2]$ que permitiram o desenvolvimento do “kit” *Isolink*[®] para preparação do aquo-complexo *fac*- $[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ já atrás referido. Assim o complexo *fac*- $[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ pode ser obtido num único passo de forma quantitativa nas condições indicadas na Figura 1.16.

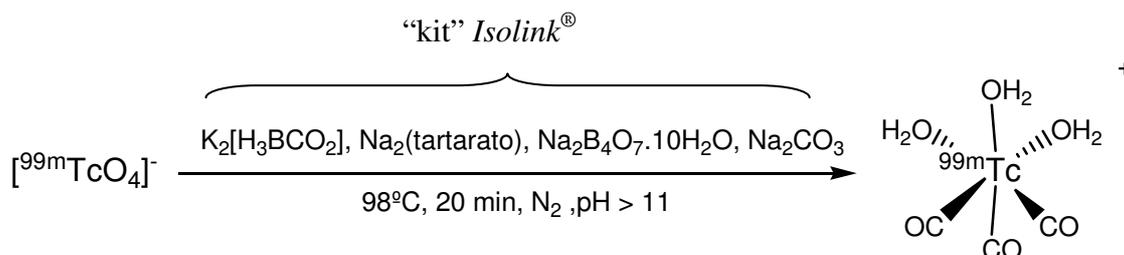


Figura 1.16: Condições de preparação do precursor *fac*- $[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ utilizando o “kit” *Isolink*[®].

1.1.2.4.3 – Ligandos para estabilização da unidade *fac*- $[M(CO)_3]^+$ ($M = Re, ^{99m}Tc$)

Com vista ao estudo da reactividade do fragmento metálico *fac*- $[M(H_2O)_3(CO)_3]^+$ ($M = Re, ^{99m}Tc$) e do respectivo mecanismo de substituição dos três ligandos H_2O , têm sido realizados estudos de coordenação com vários ligandos monodentados do tipo tioéter, isonitrilo, nitrilo, fosfina terciária e imidazolo. Demonstrou-se que da reacção do ligando neutro monodentado imidazolo com o precursor *fac*- $[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ resulta a coordenação sequencial de um, dois e eventualmente três ligandos imidazolo. Em meio fisiológico (NaCl 0,9%), as velocidades de coordenação dos dois primeiros ligandos imidazolo são rápidas, sendo a velocidade de coordenação da terceira molécula muito lenta. Este comportamento pode ser explicado pelo facto de, após coordenação de dois ligandos imidazolo, o catião resultante reagir com o ião Cl^- , existente em grande excesso em solução. Esta reacção parece ser preferencial por razões de compensação de carga, dificultando a coordenação da terceira molécula de imidazolo. Assim, este tipo de ligandos conduz a uma mistura de espécies mono e di-substituídas que estão em equilíbrio. Ao nível dos complexos de rénio foi verificado que apenas com um grande excesso de imidazolo é possível preparar o complexo tri-substituído [26, 47].

Exploraram-se ainda diferentes tipos de ligandos potencialmente bidentados com diversas combinações de átomos doadores, tais como o ácido 2,4-piridinodicarboxílico

(2,4-dipic) [26, 48], fosfinas heterofuncionalizadas [49-51], ácido-4-imidazolocarboxílico (imc) [48], histamina [52], ditiocarbamatos [53], diaminas [54], etc. Estes agentes quelantes mostraram ser fortemente coordenantes, resistentes à substituição e apresentavam uma velocidade de coordenação mais elevada que os ligandos monodentados. No entanto, os complexos resultantes apresentam ainda um sítio de coordenação livre possível de ligação às proteínas plasmáticas, o que pode deixar antever alguma instabilidade *in vivo* [55].

Apesar desta aparente desvantagem, alguns destes agentes bidentados foram já utilizados com sucesso para a ligação a biomoléculas. Como exemplo, refere-se a marcação de um péptido análogo da bombesina que se revelou útil para visualização dos receptores GRP (*Gastrin Releasing Peptide*), sobreexpressos numa variedade de tumores humanos (cancro da próstata, da mama, do pulmão, etc). O complexo $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3\text{-Dpr-SSS-BBN}[7-14]\text{NH}_2]$ (Dpr = ácido 2,3-diaminopropiónico; SSS = espaçador serilserilserina; BBN[7-14]NH₂ = análogo da bombesina) mostrou elevada estabilidade *in vitro* e *in vivo* e uma boa fixação em tumores PC-3 induzidos em murganhos (3,7 % Dose Injectada/g órgão, 1 h p.i.) [54].

A utilização de complexos mistos que contenham simultaneamente um ligando monodentado neutro e um ligando bidentado monoaniónico, numa aproximação correntemente conhecida como [2+1], tem sido proposta para ligação a biomoléculas. Nesta aproximação, a biomolécula pode ligar-se ao metal através do ligando monodentado $[2 + 1_{\text{BM}}]$ ou do bidentado $[2_{\text{BM}} + 1]$ (BM = biomolécula) (Figura 1.17). O facto de uma biomolécula poder estar ligada a um dos ligandos, enquanto o outro funciona como co-ligando variável que permite estabilizar o complexo e alterar as suas propriedades físicas e químicas, faz com que esta aproximação seja considerada uma estratégia eficiente para a marcação de biomoléculas [26, 48].

Os ligandos bidentados que se revelaram mais eficientes até ao momento para explorar esta abordagem são o ácido-4-imidazolocarboxílico e o ácido-2,4-picolínodicarboxílico. Os ligandos monodentados mais promissores são os derivados do imidazolo e do isonitrilo (Figura 1.17) [48].

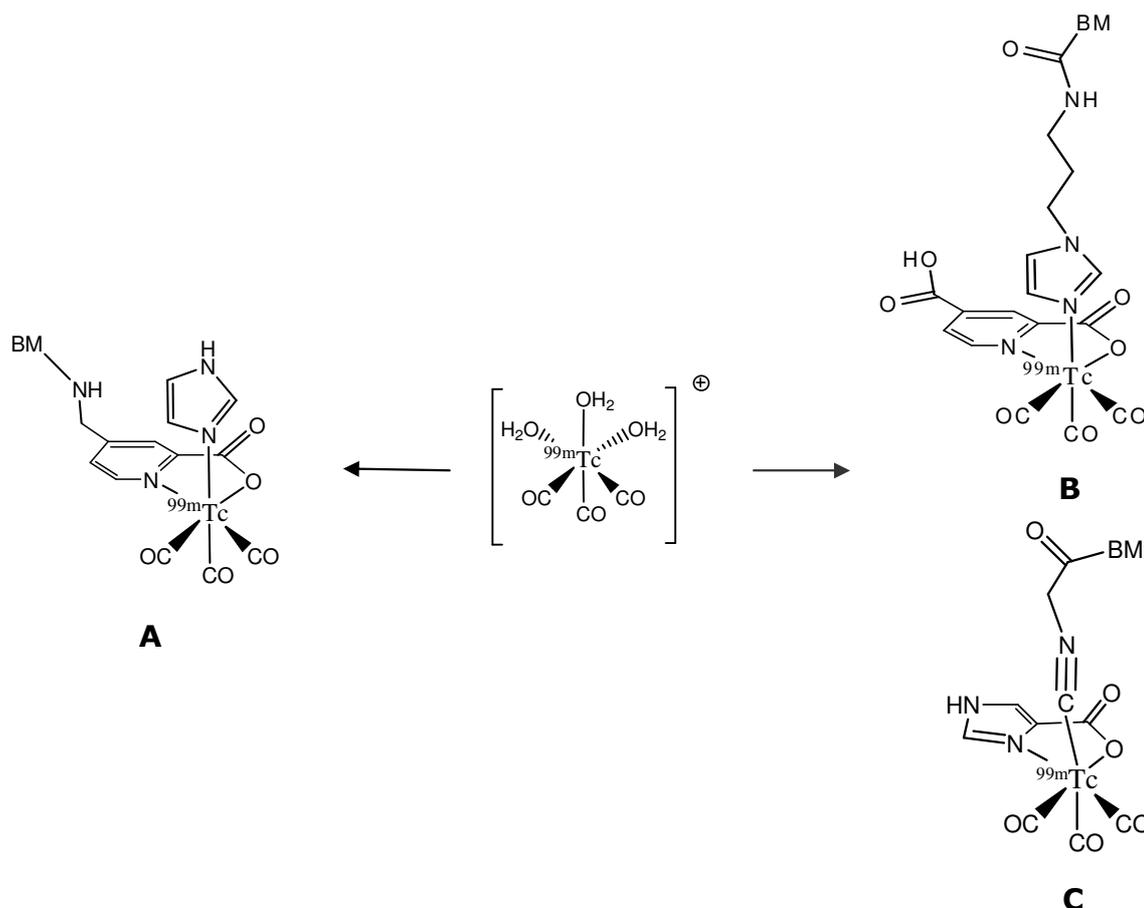


Figura 1.17: Complexos do tipo [2 + 1] (**A** = [2_{BM} + 1]; **B** e **C** = [2 + 1_{BM}]) [26, 48, 52].

Apesar da aproximação [2 + 1] ser promissora, principalmente devido à sua alegada versatilidade, a classe de ligandos tridentados mostrou ser a mais adequada para a estabilização da unidade *fac*-[M(CO)₃]⁺ (M = Re, ^{99m}Tc) [55]. Uma enorme variedade de ligandos tridentados, com diferentes conjuntos de átomos doadores, tais como aminas, amidas, N-heterociclos aromáticos (imidazolos, piridinas e pirazolos), ácidos carboxílicos, tioéteres, tióis e fosfinas tem sido explorada (Figura 1.18). A maioria dos ligandos apresentados conduz à formação de complexos com elevada estabilidade *in vitro* e *in vivo* [52, 55, 57-62].

Os ligandos contendo o grupo pirazolo (complexos **6** - **10**), recentemente introduzidos pelo Grupo de Química Inorgânica e Radiofarmacêutica do ITN, demonstraram uma grande capacidade de estabilização da unidade organometálica *fac*-[M(CO)₃]⁺ (M = Re, ^{99m}Tc), conduzindo à formação de complexos catiónicos estáveis. Os complexos de ^{99m}Tc foram obtidos com elevada actividade específica e rendimentos quantitativos mesmo quando a concentração final do ligando é da ordem de 5 x 10⁻⁵ M [60-65].

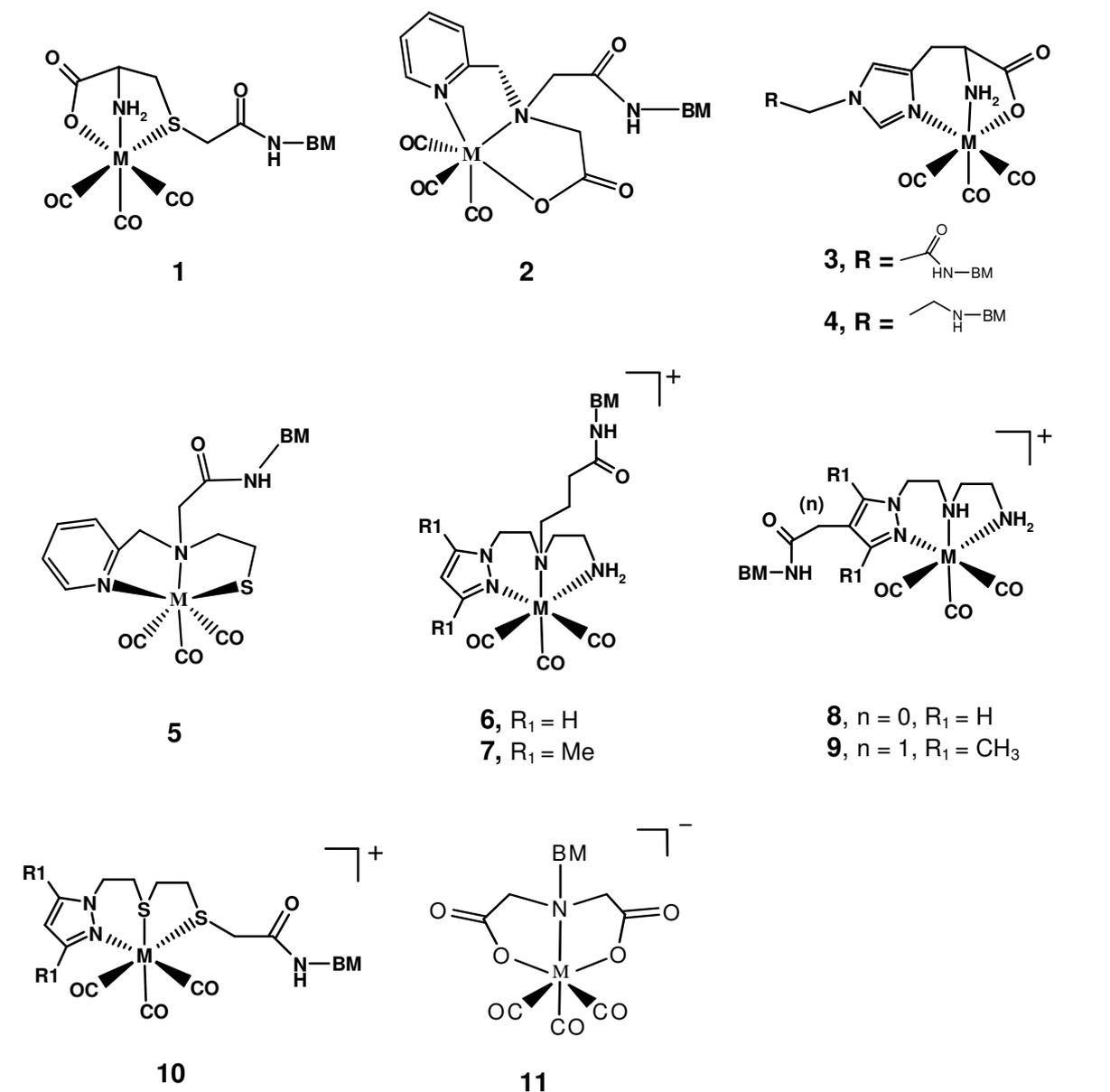


Figura 1.18: Complexos organometálicos do tipo $\text{fac}-[\text{M}(\text{CO})_3\text{L}]^+$ ($\text{M} = \text{Re}, {}^{99\text{m}}\text{Tc}$), estabilizados com ligandos tridentados bifuncionais capazes de se ligarem a biomoléculas.

1 - L = S-metilcarboxilcisteína [52]; **2** - L = Ácido-2-picolinamínico-N,N-diacético [55]; **3 e 4** - L = Histidina N^ε funcionalizada [57, 58]; **5** - L = Ácido-2-piridilmetil-N,N-(mercaptoetil)(aminoacético) [59]; **6** - L = $\text{pz}(\text{CH}_2)_2\text{N}((\text{CH}_2)_3\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ [60]; **7** - L = $3,5\text{-Me}_2\text{pz}(\text{CH}_2)_2\text{N}((\text{CH}_2)_3\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ [60]; **8** - L = $4\text{-(COOH)pz}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ [60]; **9** - L = $4\text{-(COOHCH}_2\text{)-}3,5\text{-Me}_2\text{pz}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ [61, 62]; **10** - L = $3,5\text{-Me}_2\text{pz}(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{COOH})$ [61]; **11** - L = Ácido iminodiacético [55].

Para além destas vantagens, é de referir ainda a grande versatilidade apresentada por esta família de ligandos, uma vez que é possível introduzir diferentes

substituintes no anel pirazolo e variar facilmente os átomos doadores, permitindo assim desenvolver uma série de complexos organometálicos com diferentes propriedades físico-químicas e biológicas (complexos **6 - 10**) [60-62].

Tendo por objectivo o desenvolvimento de novas sondas radioactivas capazes de detectar *in vivo* receptores específicos sobreexpressos em determinados tumores, o agente quelante bifuncional 3,5-Me₂pz(CH₂)₂N((CH₂)₃COOH)(CH₂)₂NH₂ (**pz**; ligando/complexo **7**) tem sido o mais explorado na marcação de péptidos biologicamente activos com a unidade *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃]⁺ [63-65].

De entre os péptidos já estudados, refira-se a preparação de complexos organometálicos contendo análogos da α MSH (*α -melanocyte stimulating hormone*) com afinidade para os receptores do tipo 1 da melanocortina (MC1R), sobreexpressos nas células de melanoma. O péptido Ac-Nle-Asp- α -MSH₆₋₁₁-NH₂ foi conjugado ao ligando **pz** e após reacção com a unidade *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃]⁺, originou um complexo que apresenta uma retenção tumoral razoável (4,24 \pm 0,29 % DI/g; 4 h p.i.) em murganhos com tumores induzidos do tipo melanoma B16F1 [63].

O mesmo ligando foi ainda utilizado na conjugação a três péptidos análogos da bombesina, apresentando os biocomplexos obtidos *fac*-[^{99m}Tc(L)(CO)₃-X-BBN[7-14]NH₂] (L = **pz**; X = espaçador β -alanina, serilserilserina ou glicilglicilglicina; BBN[7-14]NH₂ = análogo da bombesina) retenção moderada em murganhos com tumores da próstata induzidos (1,08 \pm 0,41 % DI/g, X = β -alanina; 1,76 \pm 0,79 % DI/g, X = serilserilserina e 1,7 \pm 1,20 % DI/g, X = glicilglicilglicina; 1 h p.i.) [64].

Mais recentemente, este ligando foi também utilizado para a marcação radioactiva de um péptido contendo a sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD), reconhecida pelo receptor integrina $\alpha_v\beta_3$ sobreexpresso em muitos tumores. O péptido c(-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys-) foi marcado com a unidade *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃]⁺, revelando os complexos formados uma retenção tumoral satisfatória (2,5 \pm 0,29 % DI/g, 1 h p.i.) em murganhos atómicos com tumores induzidos [65].

1.2 – SISTEMA ÓXIDO NÍTRICO – ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NO - NOS)

1.2.1 – Considerações gerais

A “substância lábil” conhecida como factor relaxante derivado do endotélio (EDRF - *Endothelium-Derived Relaxing Factor*), descrita de forma independente por Furchogott e Murad em 1980, foi posteriormente identificada como sendo óxido nítrico (NO) por Moncada *et al.* em 1987 [66]. O prémio Nobel da Medicina e Fisiologia em 1998 foi atribuído aos investigadores Robert Furchott, Louis Ignarro e Ferid Murad pelo trabalho

de investigação desenvolvido que levou à descoberta do NO como mediador biológico. Na última década o NO tornou-se um dos mediadores biológicos mais intensamente estudados [67, 68].

Das moléculas conhecidas com acção biológica, o NO é a mais simples, estando envolvida em diversos processos fisiológicos, nomeadamente na neurotransmissão, no controlo da pressão sanguínea (vasodilatação/vasoconstrição), na inibição da agregação plaquetária e na capacidade de resposta imunitária. Assim, uma alteração na concentração de NO no organismo poderá levar a uma grande variedade de estados patológicos, designadamente, anomalias cardiovasculares e cerebrais, doenças inflamatórias e infecciosas [67-72].

O óxido nítrico é produzido *in vivo* por uma família de enzimas designada por óxido nítrico sintase (NOS, EC 1.14.13.39, *L-arginine, NADPH:oxygen oxidoreductase, nitric-oxide-forming*), e forma-se quando a L-Arginina (L-ArgOH) é oxidada a L-Citrulina (L-Cit) (Figura 1.19).

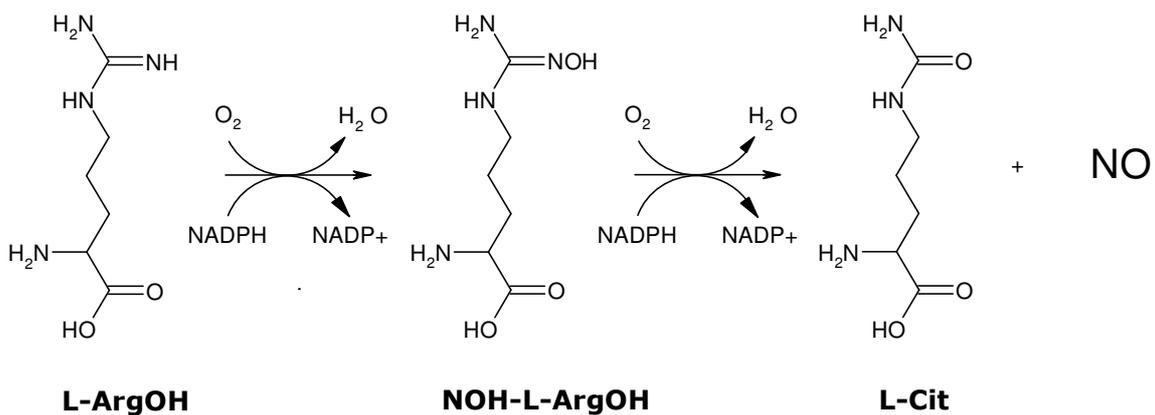


Figura 1.19: Biosíntese do NO *in vivo* por oxidação da L-ArgOH a L-Cit, catalisada pelo óxido nítrico sintase (NOS), em reacção dependente do NADPH.

Até ao momento, foram identificadas três isoformas do NOS (NOS neuronal, **nNOS**, tipo I; NOS induzida, **iNOS**, tipo II; NOS endotelial, **eNOS**, tipo III), tendo sido agrupadas em duas categorias: a constitutiva (**cNOS**) e a induzida (**iNOS**). A categoria **cNOS** está envolvida na sinalização celular e compreende a isoforma **nNOS**, presente normalmente nos neurónios, e a isoforma **eNOS**, associada às células endoteliais vasculares e às plaquetas. As isoformas **eNOS** e **nNOS** produzem pequenas quantidades de NO (nM ou pM) e a sua activação depende da interacção com a proteína calmodulina, que é, por sua vez, controlada pelos níveis de Ca^{2+} circulante. A categoria **iNOS** compreende a isoforma **iNOS** que não é expressa em condições normais, sendo induzida por lipopolissacáridos (LPS) e citocinas ($\text{INF}\gamma$, interferon γ ; $\text{INF}\alpha\beta$; IL-1 β , interleucina-1 β

e o TNF α , *tumor necrosis factor* α) em macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas. Esta isoforma actua ao nível do sistema imunitário, produzindo uma elevada concentração local de NO que possui acção citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microorganismos, parasitas e, em certas condições, células tumorais [67-72].

As três isoformas do NOS possuem grande homologia estrutural, apresentando todas elas o domínio redutase, na parte C-terminal, e o domínio oxigenase, na parte N-terminal (Figura 1.20). No domínio redutase estão os locais de ligação para o fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) e os co-factores flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), os quais transferem electrões para o grupo heme, localizado no domínio oxigenase, onde também se encontram os locais de ligação da tetrahydrobiopterina (BH₄) e do substrato L-ArgOH [67-72].

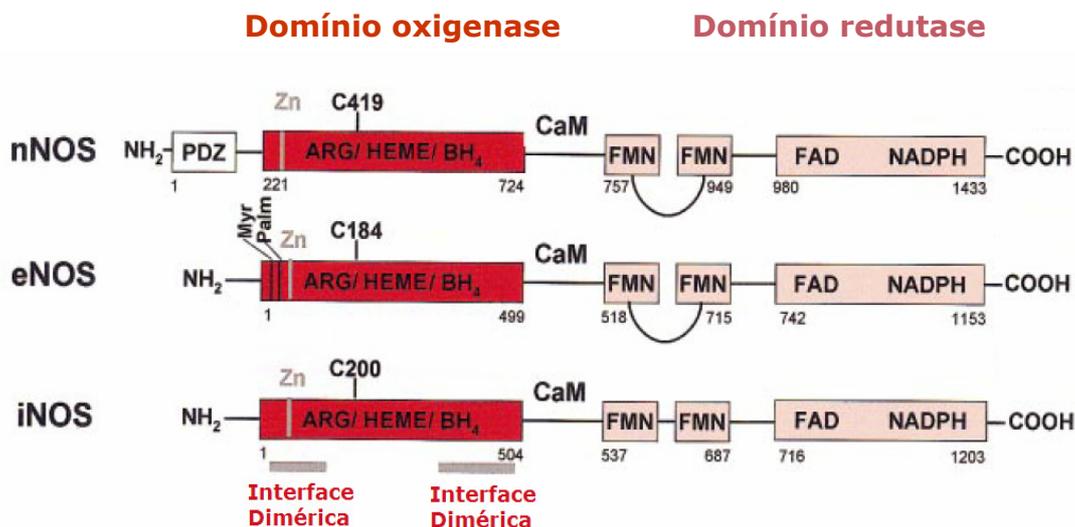


Figura 1.20: Representação esquemática da estrutura das isoformas do óxido nítrico sintase [68].

A parte N-terminal do enzima desempenha funções importantes na localização intracelular das isoformas constitutivas. Concretamente, no nNOS existe um domínio PDZ (Figura 1.20) que direcciona o enzima para os locais pós-sinápticos dos neurónios. Analogamente, o eNOS é direccionado para zonas de membrana onde se dá a retenção de moléculas sinalizadoras, o que é conseguido por duas acilações, uma pelo miristato (Myr) e outra pelo palmitato (Palm) (Figura 1.20) [68].

Entre os domínios N-terminal e C-terminal fica situado o local de ligação do complexo Ca²⁺ + calmodulina (CaM), o qual é responsável pelo alinhamento do domínio redutase com o domínio oxigenase, permitindo a transferência de electrões das flavinas

para o grupo heme. De notar que todas as isoformas apresentam o local de ligação para a calmodulina, no entanto, como já referido anteriormente, apenas no caso das isoformas constitutivas (eNOS e nNOS) a sua actividade está dependente do Ca^{2+} circulante. Todas as isoformas do NOS funcionam unicamente como estruturas diméricas, através da interacção entre os seus domínios oxigenases [67-72].

1.2.2 – Mecanismo de biosíntese do óxido nítrico

A reacção de oxidação da L-ArgOH a L-Cit, com a consequente formação de NO, ocorre em duas etapas consecutivas, envolvendo oxidações mediadas pelo grupo heme. Ambas as etapas requerem O_2 e NADPH como substratos, além da FAD, FMN e BH_4 como co-factores (Figura 1.21).

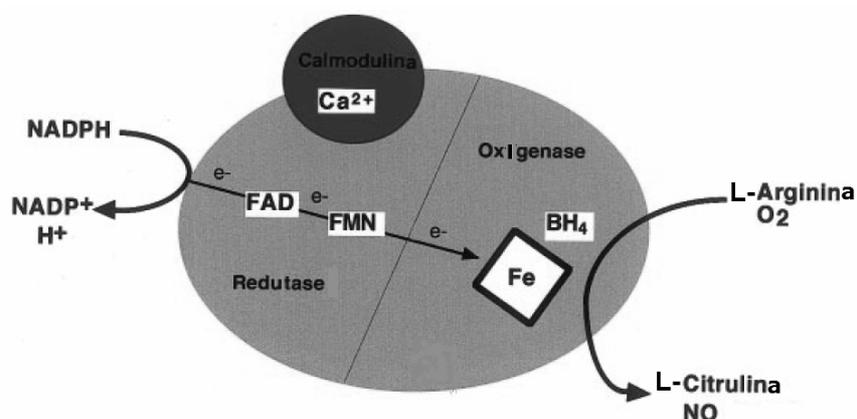


Figura 1.21: Mecanismo de oxidação da L-ArgOH a L-Cit catalisada pelo NOS [68].

Na primeira etapa, a L-ArgOH é hidroxilada num dos azotos do grupo guanidina, originando o intermediário N^{ω} -hidroxi-L-Arginina (NOH-L-ArgOH), num processo oxidativo análogo ao catalisado pelo citocromo P450 que envolve o complexo heme (ferro-protoporfirina IX) do NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NOH-L-ArgOH em NO e L-Cit. O mecanismo químico de oxidação *in vivo* proposto para a L-ArgOH é sumariamente descrito na Figura 1.22.

No primeiro passo a L-ArgOH liga-se ao centro activo do enzima perto do grupo heme (**1**). O complexo formado sofre uma redução por aceitação de um electrão do NADPH, transferido por intermédio dos co-factores FAD e FMN, sendo o ferro reduzido ao estado de oxidação (II) (**2**). O O_2 liga-se ao ferro (II), formando um peroxo-complexo (**3**) que aceita um segundo electrão do NADPH originando um oxo-complexo de Fe (V) (**4**). O oxo-complexo faz a transferência de um átomo de oxigénio para o substrato, formando o complexo **enzima-NOH-L-ArgOH** (**5**).

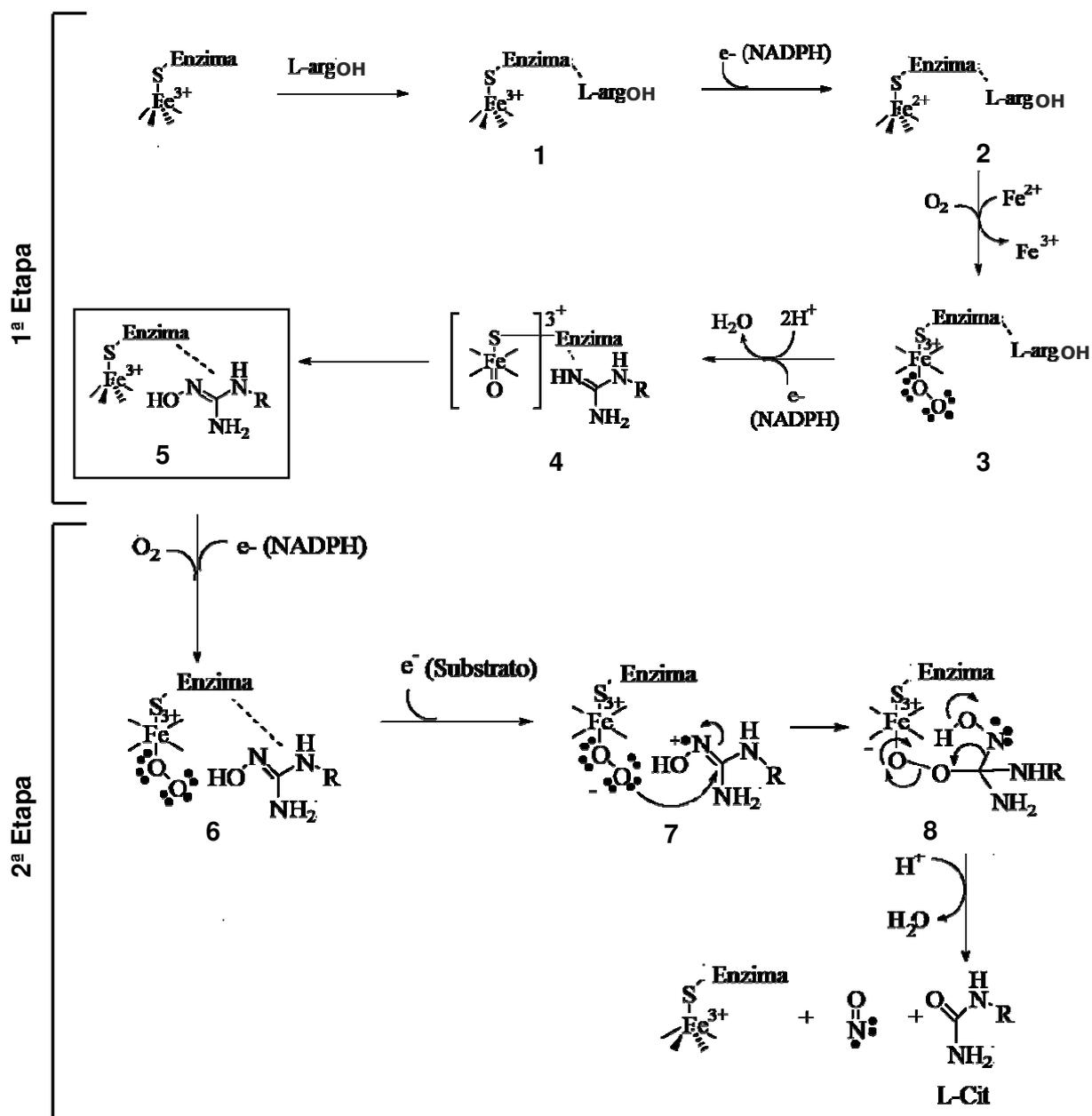


Figura 1.22: Passos sequenciais do mecanismo molecular de oxidação *in vivo* da L-ArgOH a NO e L-Cit, catalisada pelo NOS. Adaptado de [69].

A segunda etapa começa com a transferência de mais um electrão do NADPH e a coordenação de uma segunda molécula de O_2 , levando à formação do peroxo-complexo **6**. Seguidamente, um electrão do substrato **NOH-L-ArgOH** é transferido, formando-se um catião-radical e um peroxo-complexo do tipo $[Fe]^{3+}[OO]^-$ (**7**). O último passo consiste no ataque do oxigénio do peroxo-complexo **7**, originando o intermediário **8** que leva à

formação de **NO**, **L-citrulina**, **H₂O** e do **grupo heme** que restabelece o estado *redox* inicial [69, 70].

1.2.3 – Estrutura molecular do domínio oxigenase do enzima NOS

A estrutura tridimensional do domínio oxigenase do NOS complexado com L-ArgOH foi determinada pela primeira vez em 1998 a partir do iNOS de murganho, por difracção de raios-X [73]. Seguidamente foram determinadas as estruturas do iNOS e do eNOS humanas (Figura 1.23) [74]. A estrutura de raios-X do domínio redutase do NOS ainda não é conhecida [68].

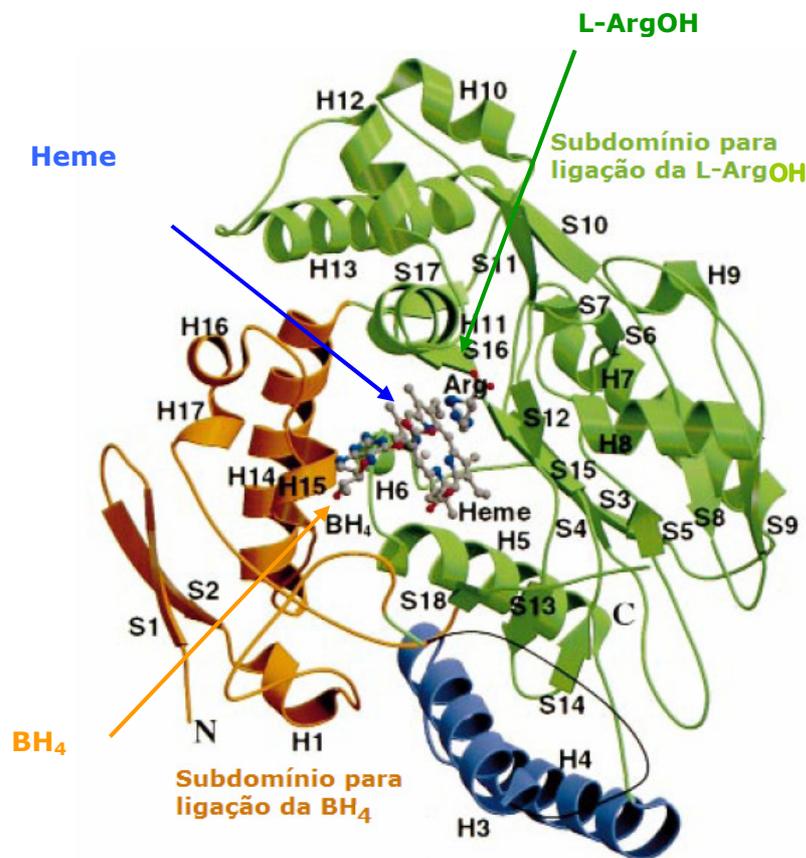


Figura 1.23: Estrutura tridimensional obtida por difracção de raios-X do domínio oxigenase do eNOS Humano [74].

Nas isoformas eNOS e iNOS humanas, o substrato liga-se ao enzima pelo grupo guanidina através de uma interacção bidentada com a cadeia lateral do resíduo de glutamato (Glu) adjacente ao centro activo. Essa interacção ocorre entre resíduos de aminoácidos diferentes para as duas isoformas (eNOS Glu 361, iNOS Glu 377). Na Figura 1.24 estão representadas detalhadamente as interacções estabelecidas entre a NOH-L-ArgOH (NOHA) e o centro activo do enzima eNOS.

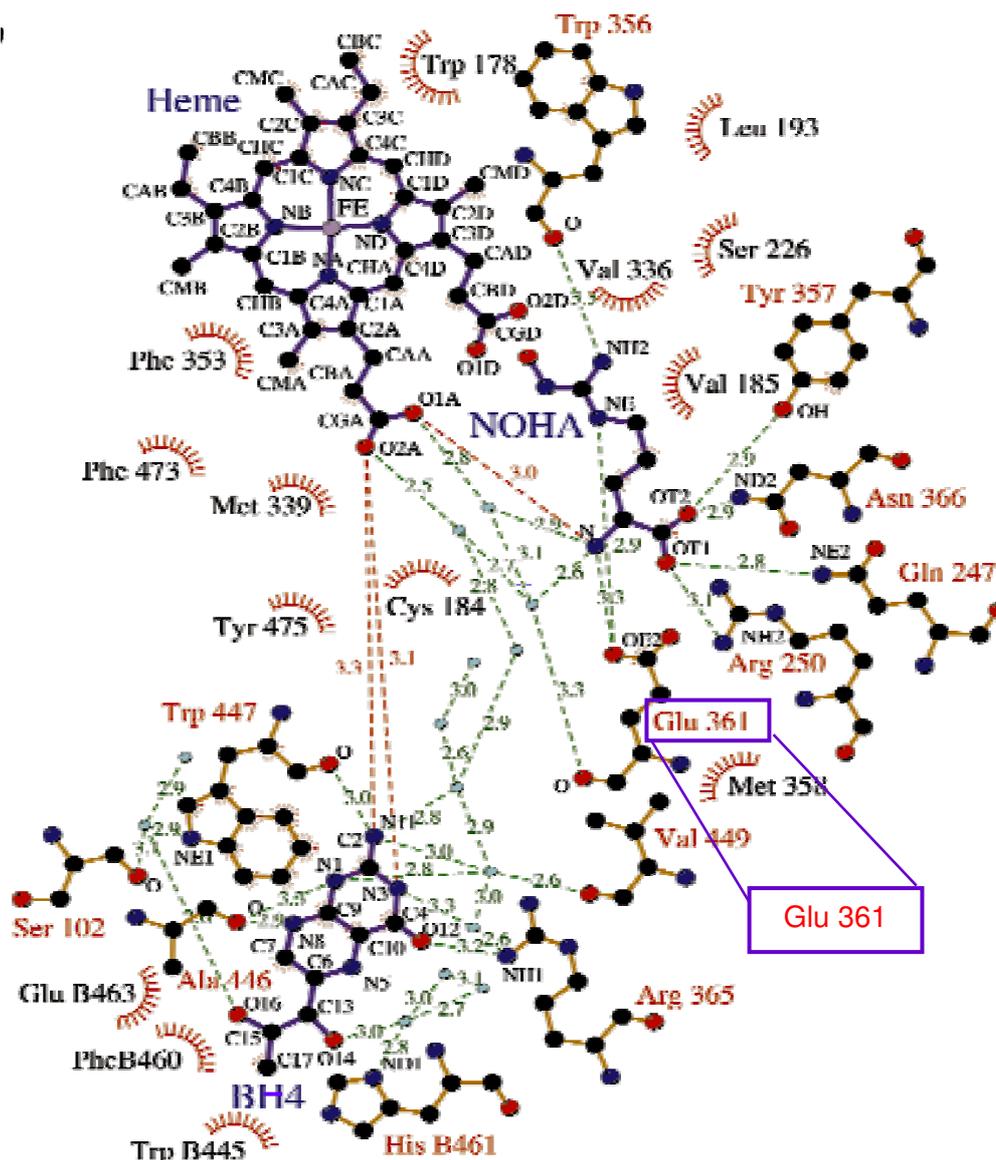


Figura 1.24: Representação das interacções estabelecidas entre a NOH-L-ArgOH e o centro activo do enzima eNOS. Os átomos de oxigénio, azoto e carbono estão representados a vermelho, a azul e a preto, respectivamente [74].

A ligação do substrato ao resíduo de glutamato é fundamental, como indicam os estudos realizados com variantes mutadas em que a substituição deste resíduo por um resíduo de glutamina, leucina ou alanina resulta na perda de actividade do enzima [74]. A cadeia lateral da L-ArgOH/NOH-L-ArgOH interage com o centro activo do enzima através de uma complexa rede de pontes de hidrogénio [73, 74].

As estruturas tridimensionais obtidas por difracção de raios-X sugerem que o tamanho relativo do centro activo varia na seguinte ordem: nNOS > iNOS > eNOS [75].

A existência destas diferenças entre as isoformas do NOS sugere que é possível a inibição selectiva de uma determinada isoforma em detrimento das outras.

1.2.4 - Mecanismos de acção do NO *in vivo*

A importância biológica do NO deve-se ao facto desta molécula de natureza radicalar actuar como um importante segundo-mensageiro no mecanismo de transducção de sinal, activando ou inibindo diversas moléculas-alvo envolvidas em processos patológicos, tais como a doença Alzheimer, a doença de Parkinson, doenças inflamatórias crónicas (artrites, colites), choque séptico, isquemia, hipertensão e cancro, entre outras [76, 77].

Ao contrário de outros mensageiros químicos, o NO não depende da sua natureza estrutural para se ligar a um receptor ou enzima, mas sim das suas propriedades *redox*. Outra característica do NO é a de não poder ser armazenado como outros mensageiros, pois é sintetizado *in vivo* e difunde-se rapidamente até ao seu local de acção [67, 77].

As vias pelas quais o NO produzido regula determinadas funções *in vivo* estão representadas na Figura 1.25.

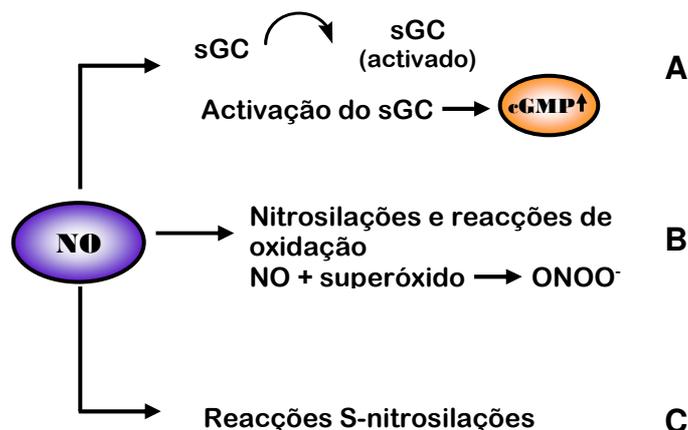


Figura 1.25: Mecanismos conhecidos de acção do NO [78].

Várias acções fisiológicas do NO, nomeadamente a neurotransmissão e a vasodilatação, são mediadas por alterações nos níveis de cGMP (guanosina monofosfato cíclica), devido à activação do sGC (enzima guanilato solúvel) (Figura 1.25, **A**) [77, 78].

A nível do Sistema Nervoso Central, a biosíntese do NO inicia-se com a libertação pelos neurónios pré-sinápticos do neurotransmissor glutamato, que se difunde pelo espaço sináptico e se liga ao seu receptor específico NMDA (N-metil-D-aspartato), localizado pós-sinápticamente. A activação destes receptores provoca a abertura dos canais de cálcio e leva ao aumento do fluxo de Ca^{2+} para o interior do terminal pós-

sináptico. A associação do Ca^{2+} à calmodulina promove a activação do nNOS e a consequente biosíntese de NO. O NO produzido *in situ* interage com o ferro do grupo heme do sGC, provocando uma alteração na sua conformação responsável pela sua activação. Por sua vez, o sGC activado catalisa a conversão do GTP (guanosina trifosfato) em cGMP. O mensageiro bioquímico cGMP, principal mediador dos efeitos do NO, actua activando diversas proteínas cinases responsáveis pela fosforilação de determinadas proteínas, levando ao correspondente efeito fisiológico [67, 69, 77 - 79].

A regulação da pressão sanguínea (vasodilatação/vasoconstrição) também é controlada principalmente pelo NO produzido nas células endoteliais. Neste caso a activação do sGC inicia-se em resposta a estímulos como a bradicinina ou acetilcolina que se ligam aos receptores de membrana das células endoteliais provocando a abertura dos canais de cálcio e o consequente aumento da concentração de Ca^{2+} nas células. Este aumento é responsável pela activação do enzima eNOS, e pela biosíntese do NO, através de um processo mediado pelo complexo CaM (Ca^{2+} + calmodulina), levando assim à vasodilatação por um mecanismo desencadeado pelo mensageiro cGMP [67, 69, 77 - 79].

Um outro mecanismo de acção do NO consiste no "ataque" a metalo-proteínas contendo cobre, ferro e zinco, originando a formação de complexos metálicos nitrosilados que provocam alterações na actividade biológica de proteínas e biomoléculas. A formação de radicais peroxinitrito (ONOO^-), com elevado potencial oxidante, também é conhecida por provocar, de um modo indirecto, alterações na actividade biológica de proteínas e biomoléculas (Figura 1.25, **B**) [67, 77 - 79].

A capacidade de formar S-nitrosotióis por reacção com os resíduos cisteína das proteínas, alterando a sua actividade de uma maneira semelhante à fosforilação, é outro mecanismo pelo qual o NO actua (Figura 1.25, **C**) [67, 77 - 79].

1.2.5 – Substratos e inibidores do NOS

São conhecidas diversas doenças cuja etiologia está directamente relacionada com a desregulação da biosíntese de NO *in vivo*. De referir que em alguns casos, uma concentração baixa de NO pode resultar em hipertensão e angina, e noutros, a sua concentração elevada pode ocasionar respostas inflamatórias, choque séptico ou até mesmo doenças neurodegenerativas.

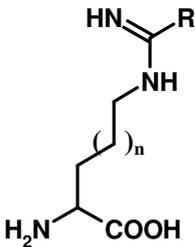
Consequentemente, existem duas abordagens terapêuticas distintas para o tratamento das doenças referidas. No caso da sobreprodução de NO, a utilização de inibidores do NOS, leva a uma diminuição da sua concentração, enquanto que, na falta

de NO, o uso de moléculas doadoras deste radical leva ao aumento da sua concentração local.

Quando existe uma deficiência de NO os compostos doadores de NO mais utilizados *in vivo* são os nitritos e nitratos orgânicos, complexos metálicos com NO coordenado, *N*-nitrosaminas, *S*-nitrosotióis e *N*-hidroxiguanidinas [79].

A abordagem mais promissora para controlo da sobreprodução do NO tem sido a síntese de análogos estruturais do substrato natural (L-ArgOH), que actuam como inibidores reversíveis do NOS. Os primeiros inibidores do NOS a serem preparados e avaliados biologicamente foram análogos da L-ArgOH N^ω -substituídos. Estes análogos apresentaram uma elevada afinidade para o NOS, no entanto, mostraram-se pouco selectivos perante as diferentes isoformas (Tabela 1.1) [80, 81].

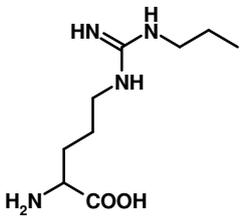
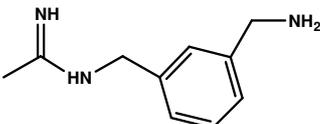
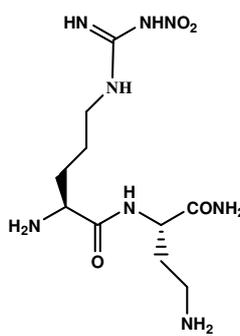
Tabela 1.1: Principais inibidores do NOS, análogos da L-ArgOH.

	Composto	R	n	IC ₅₀ (µM)		
				nNOS	iNOS	eNOS
	N^ω -Nitro-L-Arginina (L-NA, N^ω -NO ₂ -L-ArgOH)	NHNO ₂	1	0,52	7,6	0,50
	N^ω -Amino-L-Arginina (L-NAA)	NHNH ₂	1	4,8	3,8	3,7
	L-Tiocitrulina	S	1	7,4	3,6	8,4
	N^ω -MonoMetil-L-Arginina (L-NMMA, N^ω -CH ₃ -L-ArgOH)	NHCH ₃	1	5,9	14	10
	N^ω -Iminometil-L-Ornitina (L-NIO)	CH ₃	1	10	7,7	5,8
	N^ω -Iminometil-Lisina (L-NIL)	NHCH ₃	2	61	4,6	138

De todos os análogos da L-ArgOH sintetizados, o que revelou melhor capacidade de inibição enzimática foi a N^ω -NO₂-L-ArgOH. Apesar de apresentar uma afinidade elevada para o NOS, este análogo mostrou-se pouco selectivo (apenas ~ 15 vezes mais selectivo para o nNOS e eNOS do que para o iNOS) (Tabela 1.1) [81].

Mais recentemente foi demonstrado que a N^ω -Propil-L-Arginina, apresenta uma selectividade 3000 vezes superior para o nNOS do que para o iNOS, sendo o análogo conhecido da L-ArgOH com maior selectividade para uma das isoformas (Tabela 1.2). Este resultado veio pela primeira vez demonstrar que é possível inibir selectivamente uma isoforma do NOS realizando uma simples modificação no grupo guanidina e que a geometria e o tamanho da cadeia lateral do aminoácido são extremamente importantes para uma acção selectiva [82].

Tabela 1.2: Inibidores selectivos do NOS.

	IC50 (μM)		
	nNOS	iNOS	eNOS
N ^ω -Propil-L-Arginina (L-NPA)			
	0,057	180	8,5
N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina (1400W)			
	2*	0,007*	50*
N ^ω -NO ₂ -L-ArgOH-L-Dbu-NH ₂			
	0,13	25	200

* Valores de K_i

De referir ainda o composto N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina (1400W) (Tabela 1.2) que é o inibidor não derivado da L-ArgOH mais selectivo para o iNOS (~ 7000 vezes mais selectivo para o iNOS do que para o eNOS) [83].

Mais recentemente surgiram diferentes dipéptidos inibidores do NOS, destacando-se o N^ω-NO₂-L-ArgOH-L-Dbu-NH₂ (Dbu = ácido 2,4-diaminobutírico) que apresentou uma elevada selectividade para o nNOS (Tabela 1.2). A maior afinidade deste análogo da N^ω-Nitro-L-Arginina para o nNOS foi explicada pelo maior volume do centro activo desta isoforma, comprovado por cristalografia de raios-X [84].

1.2.6 – Óxido nítrico e cancro

Os efeitos do NO na biologia tumoral são ambíguos e complexos. Na Figura 1.26 estão resumidas as diferentes acções do NO, responsáveis pelo potencial desenvolvimento de tumores.

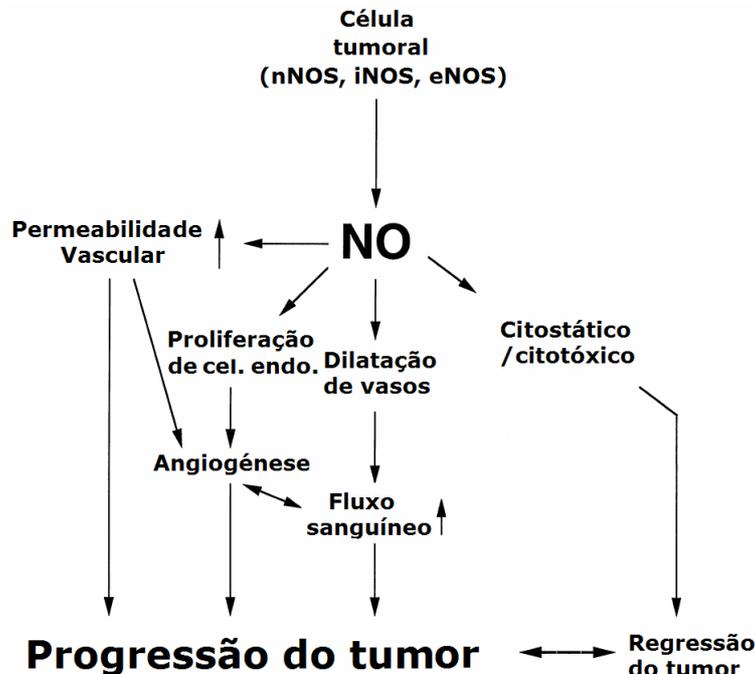


Figura 1.26: Funções conhecidas do NO na biologia tumoral. Adaptado de [85].

A facilidade com que o NO promove a progressão tumoral está associada não só às suas características **vasodilatadoras**, que levam a um aumento do **fluxo sanguíneo** nas células tumorais, como também à capacidade de induzir a **angiogénese** por intermédio do aumento da **proliferação de células endoteliais**, através da regulação da expressão de vários factores angiogénicos tais como o VEGF (factor de crescimento vascular endotelial/*Vascular Endothelial Growth Factor*) e o FGF (factor de crescimento do fibroblasto/*Fibroblast Growth Factor*)(Figura 1.26). O NO pode ainda favorecer a invasão tumoral e a angiogénese devido à sua capacidade de provocar lesões no DNA e em outras biomoléculas relevantes [77, 85 - 90].

Por outro lado, este mediador químico pode ter um efeito **citostático/citotóxico**, induzindo apoptose celular e exercendo uma acção antitumoral, com diminuição da velocidade de crescimento dos tumores e da formação de metástases (Figura 1.26) [77, 85 - 90].

A acção aparentemente ambígua do NO na génese e desenvolvimento de tumores pode ser atribuída a diferentes factores tais como a sua concentração, o tipo células considerado, o estadio de desenvolvimento do tumor, entre outros [77]. Segundo vários autores, o efeito do NO na biologia tumoral varia durante a progressão do tumor [77, 89].

Apesar de 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 que é observada com mais frequência em tumores, sendo sobreexpressa em cancros do cólon, da mama e da próstata, entre outros. Associado a este facto está a concentração local elevada de NO produzido por esta isoforma do NOS [77, 86, 87].

Devido à elevada concentração de NO associada a certos tipos de tumores, têm sido desenvolvidos vários estudos utilizando inibidores selectivos do NOS, com o intuito de prevenir a progressão tumoral [77, 91 - 98]. Estudos realizados com o composto N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina (1400W), anteriormente referido como sendo um potente inibidor do iNOS, demonstraram que este reduz significativamente o crescimento do adenocarcinoma mamário EMT6 e do cólon DLD-1, mutados para sobreexpressar o iNOS [91]. Resultados semelhantes foram obtidos com o N^ω-Nitro-L-Arginina-Metil-Éster (NAME, N^ω-NO₂-L-ArgOMe) após tratamento de murganhos aos quais foi induzido cancro da mama [92].

Resultados contraditórios foram no entanto obtidos por Xie *et al.*. Usando células de melanoma de murganho mutadas para sobreexpressar o iNOS, este grupo verificou que a elevada concentração de NO é também responsável pelo fraco crescimento do tumor, pela apoptose das células tumorais e pela perda de capacidade de metastização [99 - 101].

1.2.7 – Compostos radioactivos potencialmente úteis na detecção *in vivo* do NOS

Tal como referido anteriormente, é genericamente aceite que existe uma correlação directa entre a alteração da actividade do NOS e determinados estados patológicos, nomeadamente certos tipos de tumores. O desenvolvimento de sondas radioactivas, para PET ou SPECT, através da marcação de substratos ou inibidores do NOS com isótopos radioactivos emissores γ ou β^+ (^{99m}Tc/¹⁸F/¹¹C/¹²³I), poderá levar à visualização por técnicas não invasivas da expressão *in vivo* do NOS, permitindo o diagnóstico precoce de diferentes tipos de anomalias.

São poucos os exemplos conhecidos de substratos ou inibidores marcados com isótopos radioactivos. Os inibidores selectivos do iNOS apresentados na Figura 1.27 foram já marcados com ^{11}C e ^{18}F , no entanto, a sua baixa estabilidade *in vivo* e *in vitro*, tornaram estes compostos pouco promissores para detecção *in vivo* do iNOS [102, 103].

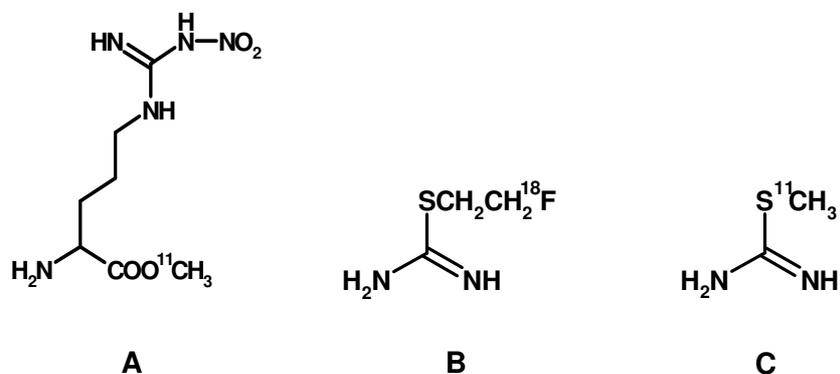


Figura 1.27: $\text{N}^{\omega}\text{-NO}_2\text{-L-ArgOMe}$ e S-alquil-isotioureias marcadas com isótopos radioactivos ^{18}F e ^{11}C .

A avaliação biológica do composto $\text{N}^{\omega}\text{-NO}_2\text{-L-Arg-}[^{11}\text{C}]\text{Metil-Éster}$, proposto como agente de diagnóstico para PET, demonstrou que ocorre hidrólise do éster *in vivo*, com formação de $[^{11}\text{C}]\text{metanol}$, o que inviabiliza a sua utilização na detecção *in vivo* do NOS [102].

No caso concreto das S-alquilo-isotioureias, estas revelaram-se igualmente instáveis, principalmente a alquil-isotioureia marcada com ^{18}F , que sofre decomposição por ataques nucleofílicos e por desfluoração [103].

Actualmente não são conhecidos quaisquer substratos ou inibidores do NOS marcados com o metal radioactivo $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

1.3 – OBJECTIVO DO TRABALHO

O trabalho apresentado nesta tese teve como principal objectivo a preparação e caracterização de novos complexos radioactivos com a unidade $fac-[^{99m}Tc(CO)_3]^+$, estabilizada com um ligando bifuncional (**LBF**) ligado à L-Arginina (**L-ArgOH**) ou seus derivados (**L-Arg-deriv**), para avaliação da expressão *in vivo* do NOS associado a certos estados patológicos, nomeadamente a certos tipos de tumores.

Para alcançar o objectivo proposto, foi necessário numa primeira fase verificar se a ligação dos substratos ou inibidores do NOS ao ligando bifuncional e à unidade organometálica $fac-[M(CO)_3]^+$ ($M = Re, ^{99m}Tc$) perturbava ou não o seu reconhecimento pelo enzima. Numa segunda fase pretendeu-se avaliar a retenção (*in vitro* e *in vivo*) dos complexos ^{99m}Tc em células do melanoma murino B16F1, conhecidas por expressarem a isoforma induzida do NOS (iNOS). Neste sentido, o trabalho desenvolvido contemplou os seguintes passos:

- 1** - Síntese e caracterização de conjugados do tipo **LBF-L-ArgOH** ou **LBF-L-Arg-deriv**.
- 2** - Estudo das propriedades de coordenação dos conjugados acima referidos face à unidade $fac-[M(CO)_3]^+$ ($M = Re, ^{99m}Tc$).
- 3** - Avaliação enzimática dos compostos **LBF-L-ArgOH**, **LBF-L-Arg-deriv** e dos respectivos complexos de Re(I) face ao iNOS.
- 4** - Avaliação biológica (*in vitro* e *in vivo*) dos complexos Tc(I) estabilizados pelos ligandos bifuncionais **LBF-L-ArgOH** e **LBF-L-Arg-deriv**.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Como referido na Introdução, o objectivo desta tese é contribuir para o desenvolvimento de novos complexos radioactivos contendo a unidade $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ e substratos ou inibidores do óxido nítrico sintase (NOS), potencialmente úteis para a visualização *in vivo* da expressão deste enzima. A escolha do radionuclídeo ^{99m}Tc , e mais especificamente do fragmento organometálico $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$, teve em consideração as suas excelentes propriedades, já amplamente discutidas, ideais para aplicação em química radiofarmacêutica.

Aproveitando a experiência do grupo de Química Inorgânica e Radiofarmacêutica (QIR) no desenvolvimento de novos ligandos contendo o heterociclo 3,5-dimetilo-1-pirazolilo para a estabilização da unidade $fac-[M(\text{CO})_3]^+$ ($M = \text{Re}, ^{99m}\text{Tc}$), escolheu-se um ligando bifuncional desta família com um grupo carboxilato livre ao qual se poderiam ligar diferentes aminoácidos com reconhecida afinidade para o enzima NOS. Este ligando neutro apresenta um conjunto de átomos doadores (N,N,N) capazes de estabilizar a unidade $fac-[M(\text{CO})_3]^+$, conduzindo à formação de complexos catiónicos de elevada estabilidade [60 – 65].

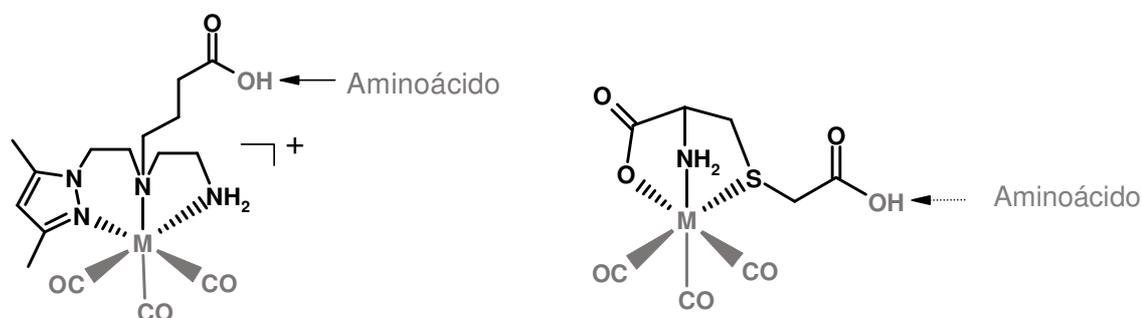


Figura 2.1: Complexos organometálicos estabilizados com ligandos bifuncionais do tipo pirazolo-diamina e cisteína ($M = \text{Re}, ^{99m}\text{Tc}$).

De modo a estudar a influência da ligação de um mesmo aminoácido a outras unidades quelantes, considerou-se a possibilidade de se utilizar como ligando bifuncional a cisteína derivada na função tiol com um grupo metilcarboxilato. Ao contrário do ligando contendo a unidade pirazolo-diamina, o ligando cisteína, caracterizado por conter um conjunto de átomos doadores do tipo N,O,S , leva à formação de complexos de $\text{Re}(\text{I})$ e $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ potencialmente neutros [52, 104, 105].

Assim, neste Capítulo descrevem-se as tarefas executadas de modo a alcançar o objectivo inicialmente proposto. Na **secção 2.2** descreve-se a síntese e caracterização química de novos conjugados contendo as unidades quelantes pirazolo-diamina e cisteína ligadas aos substratos L-ArgOMe/OH e aos inibidores N^{ω} -NO₂-L-ArgOMe/OH e N^{ω} -CH₃-L-ArgOH do enzima NOS. Nas **secções 2.3** e **2.4** descrevem-se as reacções dos precursores fac -[ReBr₃(CO)₃]²⁻ e fac -[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ com os conjugados sintetizados, bem como a respectiva caracterização química (Re) e radioquímica (^{99m}Tc) dos complexos resultantes. Na **secção 2.5** são apresentados os estudos enzimáticos que permitiram avaliar o modo como a afinidade original dos substratos/inibidores do iNOS é afectada com a sua ligação às unidades quelantes e às unidades organometálicas fac -[M(CO)₃]⁺ (M = ^{99m}Tc, Re). Ao nível de ^{99m}Tc, é discutido na **secção 2.6** o comportamento biológico *in vitro* (internalização em células do melanoma murino B16F1) e *in vivo* (murganhos com melanoma B16F1) dos complexos mais promissores.

2.2 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE CONJUGADOS CONTENDO A L-ARGOH E DERIVADOS

2.2.1 – Conjugados contendo a unidade quelante pirazolo-diamina e a L-ArgOMe (1) e L-ArgOH (2)

2.2.1.1 – Síntese dos conjugados 1 e 2

Os conjugados **1** e **2** contendo a unidade quelante tridentada pirazolo-diamina e os substratos do NOS L-ArgOMe e L-ArgOH foram sintetizados de acordo com o esquema reaccional apresentado na Figura 2.2.

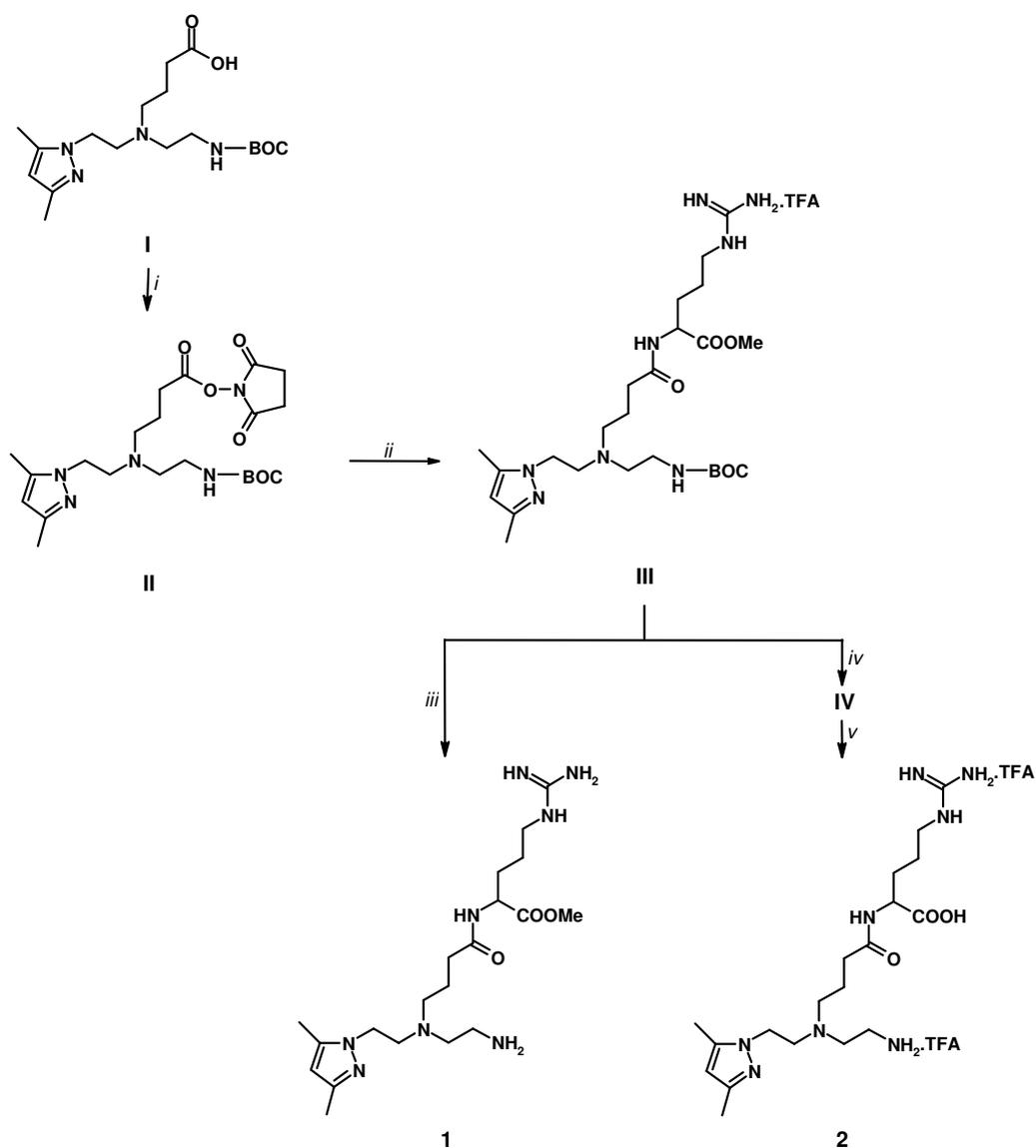


Figura 2.2: Síntese dos conjugados **1** e **2**; *i* - NHS, DCC, CH₂Cl₂, t.a., 18 h; *ii* - L-ArgOMe, H₂O, THF, NEt₃, t.a., 18 h; *iii* - 1) TFA/CH₂Cl₂ (3:1), t.a., 3 h. 2) NaOH 2 N (pH ~ 7), SEP-PAK®; *iv* - NaOH 2 N, t.a., 22 h; *v* - TFA/CH₂Cl₂ (3:1), t.a., 3 h.

O ácido carboxílico do composto precursor **I**, preparado de acordo com o método descrito na Literatura [60], foi activado por reacção com a N-hidroxisucinimida (NHS) em presença de N,N'-diciohexilcarbodiimida (DCC), originando o éster activado **II**. No decorrer da síntese observa-se a formação de um sólido branco correspondente à N,N'-diciohexilureia (DCU) que foi eliminada por filtração. O produto obtido (~ 98 % de rendimento, calculado por $^1\text{H-RMN}$) foi utilizado imediatamente, nas reacções consequentes, sem nenhuma purificação prévia. Tentativas de purificação do composto por cromatografia em coluna de sílica gel revelaram que este sofre decomposição em contacto com a sílica.

Inicialmente, a reacção de activação do ácido carboxílico foi realizada nas mesmas condições mas utilizando como agente activador a N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). O facto da EDC ser solúvel em H_2O poderia facilitar a purificação do éster activado por extracções/lavagens com este solvente. No entanto, nas condições utilizadas, o éster activado mostrou-se instável. Além disso, a ureia formada, por ser mais solúvel no meio reaccional, não pôde ser eliminada por simples filtração como no caso da DCU.

O composto intermediário **III** foi obtido por reacção do éster activado **II** com a L-ArgOMe (Figura 2.2). A insolubilidade da L-ArgOMe em solventes halogenados, bem como em solventes mais polares (CH_3CN e CH_3OH), tornou necessária a utilização de misturas THF/ H_2O para a solubilização total dos reagentes. Após ~ 18 horas de reacção, o solvente foi evaporado e o resíduo obtido lavado com CH_3COOEt . A redissolução deste resíduo em H_2O levou à precipitação de ureia ainda remanescente que foi eliminada por centrifugação. A purificação do composto **III** por cromatografia em coluna de sílica gel, com um gradiente de CH_3OH (5 - 20 %)/ $\text{CHCl}_3/\text{NH}_4\text{OH}$ (2 %), levou à obtenção do composto em rendimentos muito baixos (~ 12 %) devido, provavelmente, à sua decomposição durante o processo cromatográfico.

Com o intuito de se aumentar o rendimento, o intermediário **III** foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), tendo sido obtido com um rendimento global moderado (~ 56 %, calculado em função do precursor **I**). Na Figura 2.3 apresenta-se o cromatograma da mistura reaccional obtido com uma coluna preparativa (Waters μ Bondapak C18), utilizando um gradiente de TFA 0,1 %/ CH_3OH segundo o **Método 1** descrito na **secção 3.2** da parte experimental.

As fracções correspondentes aos picos mais intensos foram recolhidas e analisadas por $^1\text{H-RMN}$, à excepção dos picos com tempos de retenção de 6,2 min e 7,0

min que foram atribuídos à L-ArgOMe e à NHS, respectivamente, por comparação com os tempos de retenção de soluções padrão destes compostos.

A análise por ^1H -RMN do composto com tempo de retenção 18,1 min foi inconclusiva, tendo sido identificados não só os sinais característicos da L-ArgOMe, como também outros sinais. De realçar que neste espectro não foi identificado nenhum sinal correspondente à unidade quelante pirazolo-diamina.

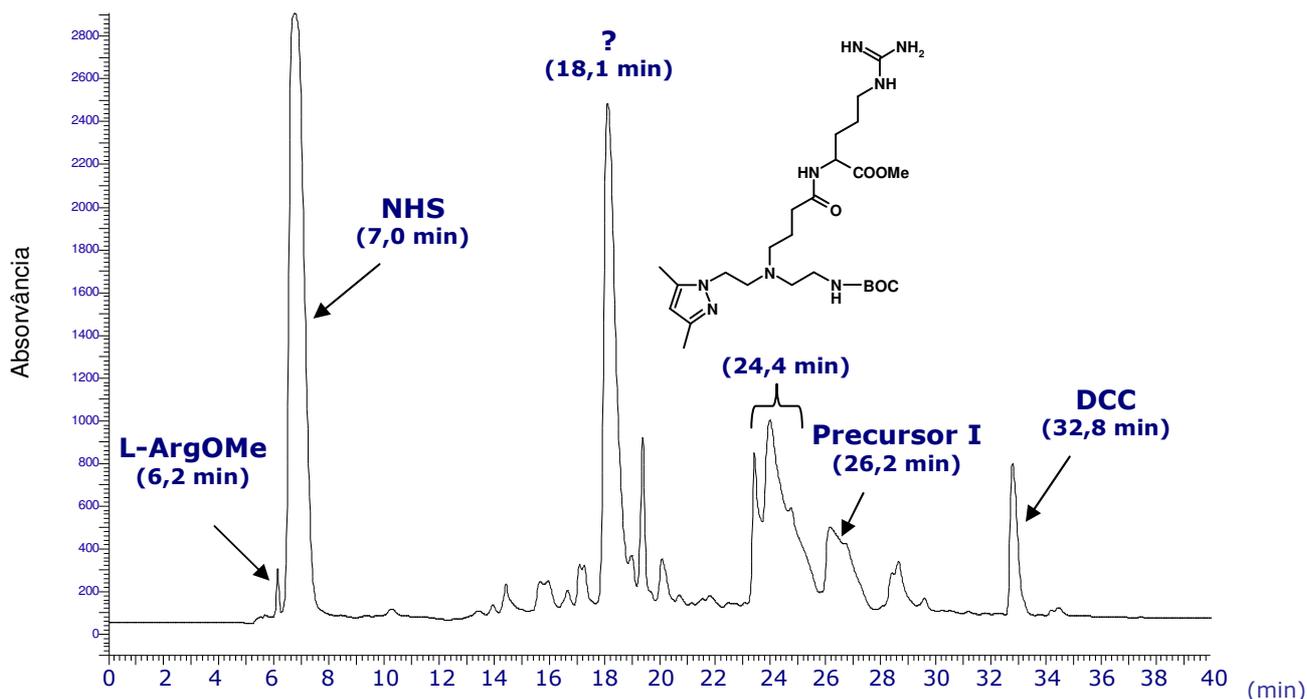


Figura 2.3: Cromatograma de RP-HPLC da mistura reaccional da síntese do intermediário **III** (detecção UV, 254 nm). O cromatograma foi obtido utilizando uma coluna preparativa Waters μ Bondapak C18 com um gradiente de TFA 0,1 %/ CH_3OH (**Método 1, secção 3.2**).

A análise dos espectros de ^1H -RMN revelou que a fracção com tempo de retenção de 24,4 min correspondia ao composto intermediário **III** pretendido. Os compostos eluídos com tempos de retenção de 26,2 min e de 32,8 min foram identificadas como sendo o precursor **I** e DCC, respectivamente.

O conjugado **1** obteve-se por tratamento do composto intermediário **III** com uma mistura TFA/ CH_2Cl_2 (3:1) à temperatura ambiente durante 3 h (Figura 2.2). Após evaporação do solvente, o resíduo obtido foi dissolvido em H_2O e a solução resultante neutralizada com NaOH 2 N. A evaporação do solvente originou um resíduo que, após extracção com metanol, levou à precipitação de sais que foram eliminados por

centrifugação. Após evaporação da solução metanólica, o resíduo oleoso obtido foi dissolvido em H₂O e purificado por RP-HPLC. O conjugado **1**, obtido na forma de sal trifluoroacetato após evaporação dos solventes de eluição, foi neutralizado com NaOH 2 N e tratado com um cartucho SEP-PAK[®], Waters, para remoção de sais (rendimento ~ 75%).

O conjugado **2** foi obtido em dois passos sequenciais a partir do intermediário **III** (Figura 2.2). O primeiro passo envolveu a hidrólise alcalina da função éster à temperatura ambiente durante ~ 22 h. Após neutralização com HCl 2 N, o solvente foi removido sob vácuo e o resíduo seco obtido extraído com metanol. Os sólidos foram eliminados por centrifugação e o metanol evaporado. O resíduo obtido foi retomado em H₂O e purificado por RP-HPLC, obtendo-se o intermediário **IV** na forma de um óleo transparente com um rendimento superior a 70 %. Por reacção de **IV** com uma mistura TFA/CH₂Cl₂ (3:1), seguido de um tratamento semelhante ao efectuado para o conjugado **1**, isolou-se o conjugado **2** por RP-HPLC na forma de sal de trifluoroacetato, sem neutralização final e purificação por SEP-PAK[®] (rendimento ~ 79 %).

Os conjugados **1** e **2**, solúveis em H₂O e CH₃OH e insolúveis em solventes halogenados, foram obtidos na forma de óleos transparentes com uma pureza química superior a 98 % (Figura 2.4).

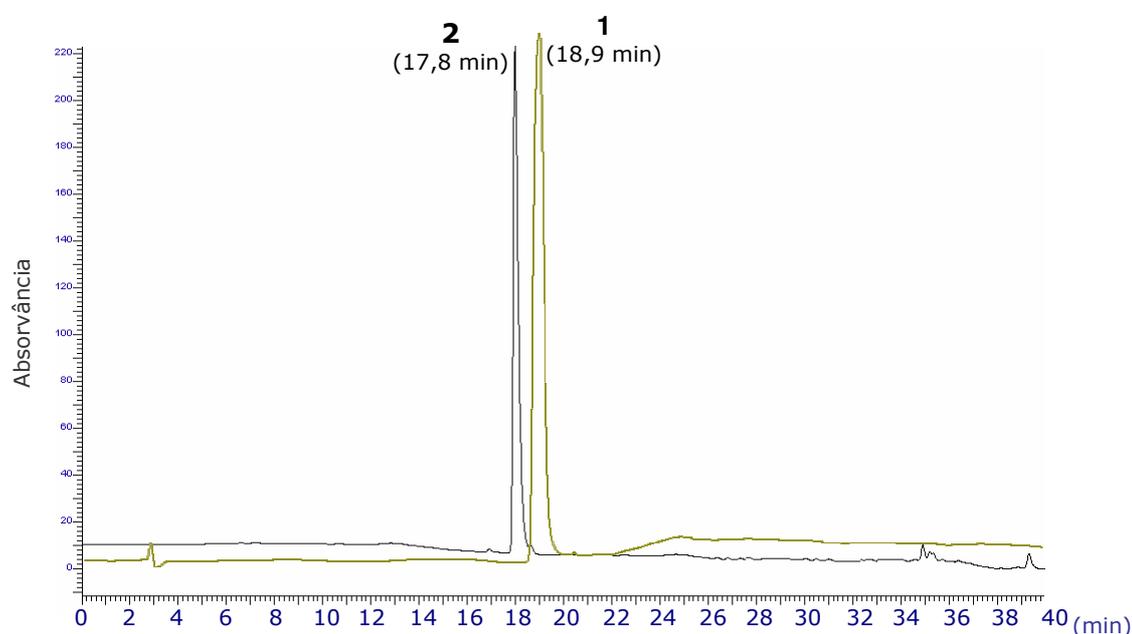


Figura 2.4: Sobreposição dos cromatogramas analíticos dos conjugados **1** e **2** obtidos por RP-HPLC (detecção UV, 254 nm) utilizando uma coluna Nucleosil C18 (100 - 5 µm) e um gradiente de TFA 0,1 %/CH₃OH (**Método 1, secção 3.2**).

2.2.1.2 – Caracterização dos conjugados 1 e 2

O éster activado **II** foi sumariamente caracterizado por ^1H -RMN, tendo o seu espectro apresentado sinais com multiplicidades e desvios químicos semelhantes aos encontrados para o precursor **I** e um sinal adicional correspondente à NHS ligada (δ 2.83, 4 H), desviado para campo baixo relativamente ao sinal da NHS livre (δ 2.78, 4 H), o que indicava a activação do ácido carboxílico.

A caracterização estrutural do intermediário **III** foi efectuada por espectroscopia de RMN, apresentando-se os espectros de ^1H e ^{13}C nas Figuras 2.5 e 2.6, respectivamente. A atribuição dos sinais de ^1H -RMN foi efectuada por comparação com os espectros do precursor **I** e da L-ArgOMe.

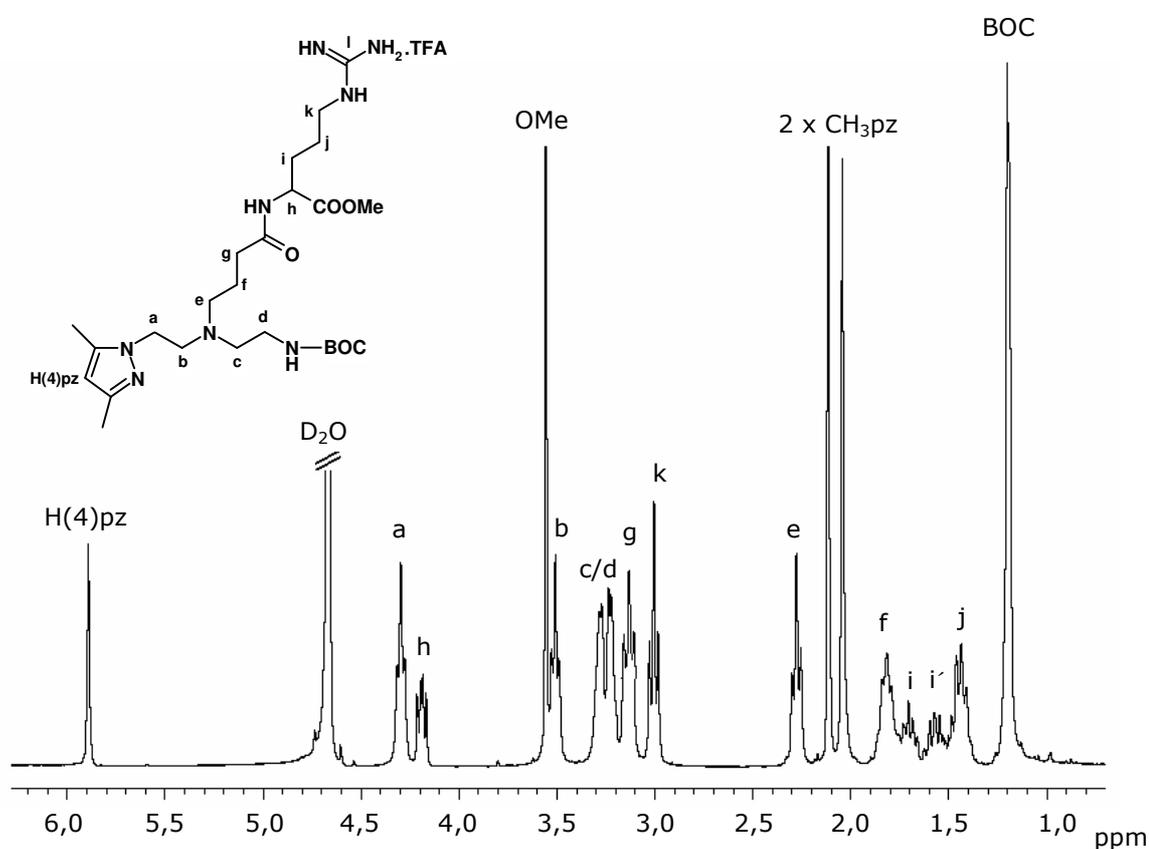


Figura 2.5: Espectro de ^1H -RMN do intermediário **III** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

O espectro de ^1H -RMN revelou a presença de um singuleto a δ 5,89, correspondente ao H(4)pz, e de dois singuletos a δ 2,12 e 2,04, integrando cada um deles para três prótons, relativos aos dois grupos metilo do anel pirazolo. Os sinais dos prótons alifáticos da unidade quelante pirazolo-diamina aparecem a δ 4,32 (H^a), 3,49 (H^b), 3,27 (H^c/H^d) e 3,23 (H^e/H^f). As ressonâncias dos prótons da cadeia espaçadora

aparecem como dois tripletos e um multipletto a δ 3,11 (H^g), 2,28 (H^e) e 1,82 (H^f), respectivamente. O sinal do grupo protector BOC da amina primária surge como um singletto a δ 1,20, integrando para 9 protões.

Na zona dos protões α de aminoácidos aparece um quarteto a δ 4,20, que integra para um protão, correspondente ao protão α da L-ArgOMe (H^h). Este sinal encontra-se desviado para campo baixo relativamente ao mesmo sinal na L-ArgOMe livre (δ 4.01). De realçar ainda que a ligação da L-ArgOMe ao grupo carboxilato do ligando bifuncional, através da amina primária, torna os protões H^i e $H^{i'}$ diastereotópicos, aparecendo como dois multiplettos a δ 1,70 e 1,54 que integram, cada um deles, para um protão. Na L-ArgOMe livre estes protões originam um único multipletto a δ 1.54.

Os protões da L-ArgOMe referentes ao grupo OMe (singletto) e aos protões metilénicos H^k (tripletto) e H^j (multipletto) aparecem a δ 3,56, 3,03 e 1,44, respectivamente.

O espectro de ^{13}C -RMN do intermediário **III** (Figura 2.6) apresenta a campo alto 15 sinais a valores de desvios químicos que variam entre 55,4 e 12,0 ppm, referentes aos carbonos CH_2 e CH_3 da molécula. O sinal correspondente ao carbono terciário do grupo protector BOC da amina aparece a δ 83,7. Os picos correspondentes aos carbonos do anel pirazolo (δ 150,9, 146,1 e 108,9) e aos grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$, δ 177 - 160) surgem a campo mais baixo.

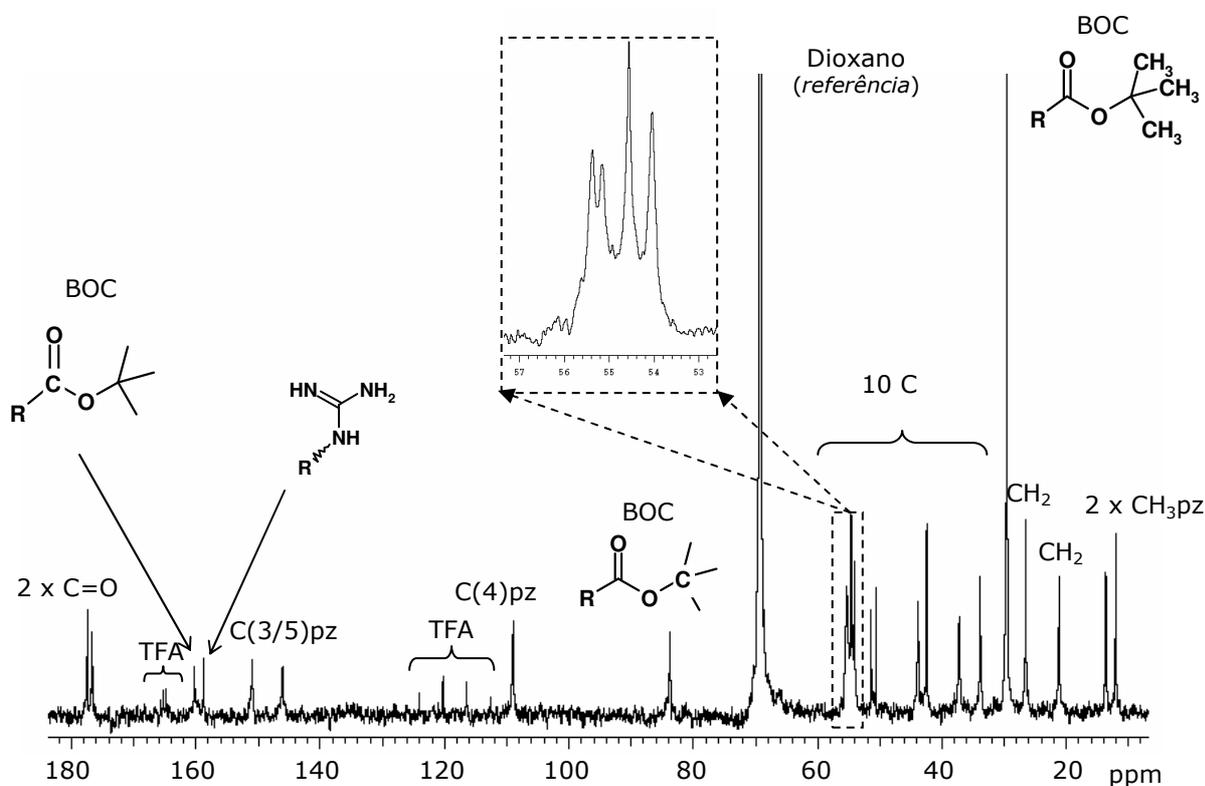


Figura 2.6 Espectro de ^{13}C -RMN do ligando **III** em D_2O .

De referir ainda a presença de um sinal a δ 158,7, atribuído ao carbono do grupo guanidina (C^l), que aparece na mesma zona que o carbono do grupo guanidina do aminoácido L-ArgOMe livre (δ 157,8).

No espectro de ^{13}C -RMN deste composto podem também observar-se sinais a δ 165,4 e 118,7 correspondentes aos carbonos do trifluoroacetato presente na molécula.

A caracterização dos conjugados **1** e **2** foi efectuada por espectroscopia de RMN, incluindo técnicas bidimensionais (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HSQC), espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) e espectroscopia de infravermelho (IV).

Como exemplo, apresenta-se na Figura 2.7 o espectro de IV do ligando **2** na zona de frequências 2000 – 500 cm^{-1} .

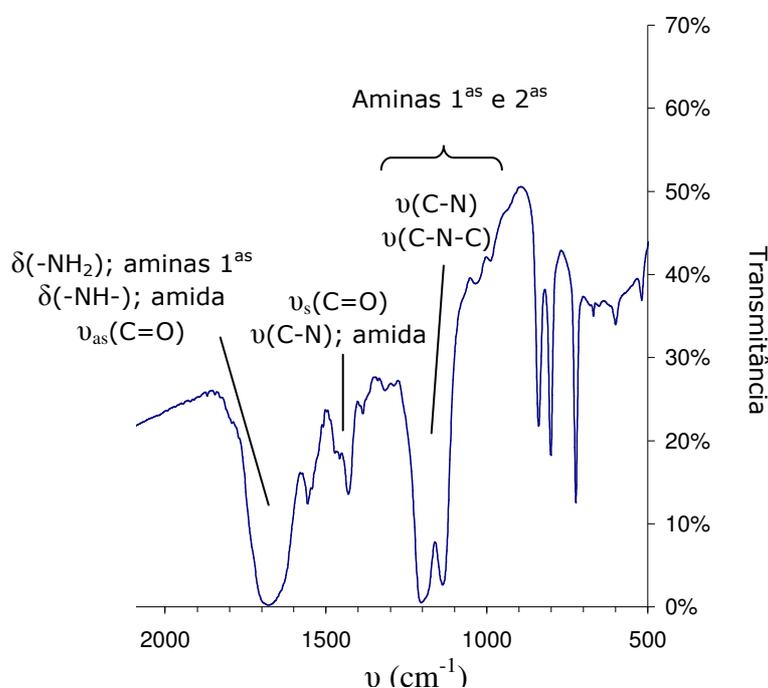


Figura 2.7: Espectro de IV do conjugado **2** na zona de frequências 2000 – 500 cm^{-1} (KBr).

O espectro apresenta uma banda de intensidade forte a 1676 cm^{-1} associada à vibração de extensão assimétrica C=O do grupo carboxilato. Esta banda de absorção está igualmente associada à vibração de extensão C=O e à deformação N-H da função amida [106].

Próximo de 1430 cm^{-1} foi observada uma banda de intensidade mais fraca, a qual foi atribuída à vibração de extensão simétrica do grupo carboxilato e à vibração de extensão C-N da função amida [106].

Por último, as duas bandas fortes a 1204 e 1137 cm^{-1} podem estar associadas à vibração de extensão C-N de aminas primárias e secundárias, onde se deverão incluir as bandas de absorção do grupo guanidina [106].

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C são semelhantes aos obtidos para o intermediário **III**, confirmando-se a remoção do grupo protector BOC da amina pelo desaparecimento dos respectivos sinais nos espectros de ^1H -RMN (δ 1,20, grupos CH_3) e de ^{13}C -RMN (C=O, δ 160,2; carbono terciário, δ 83,7 e CH_3 , δ 29,5).

A atribuição inequívoca de todos os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C dos conjugados **1** e **2** foi realizada através de experiências bidimensionais de ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HSQC. Os dados espectroscópicos obtidos com estes estudos permitiram confirmar algumas das atribuições dos sinais de RMN de ^1H já efectuadas para o composto intermediário **III**.

Nas Figuras 2.8 e 2.9 apresentam-se os espectros de ^1H - ^1H COSY ($^{2-3}J_{\text{H,H}}$) e ^1H - ^{13}C HSQC ($^1J_{\text{C,H}}$) do composto **2**, respectivamente, bem como as respectivas correlações observadas.

No espectro de ^1H - ^1H COSY o sinal correspondente ao protão H^a está inserido no multiplete centrado a δ 3,91, juntamente com o sinal de H^h , apresentando um acoplamento com H^b , cuja ressonância aparece como um triplete a δ 2,73. O sinal H^h , atribuído ao protão α da L-ArgOH, correlaciona-se com os protões diastereotópicos H^i e $\text{H}^{i'}$, cujas ressonâncias surgem como dois multipletos centrados a δ 1,64 e 1,51. De referir ainda que os sinais a δ 2,08 e 1,98, correspondentes aos metilos do anel pirazolo, apresentam um acoplamento a quatro ligações ($^4J_{\text{H,H}}$) com o protão 4 do mesmo anel.

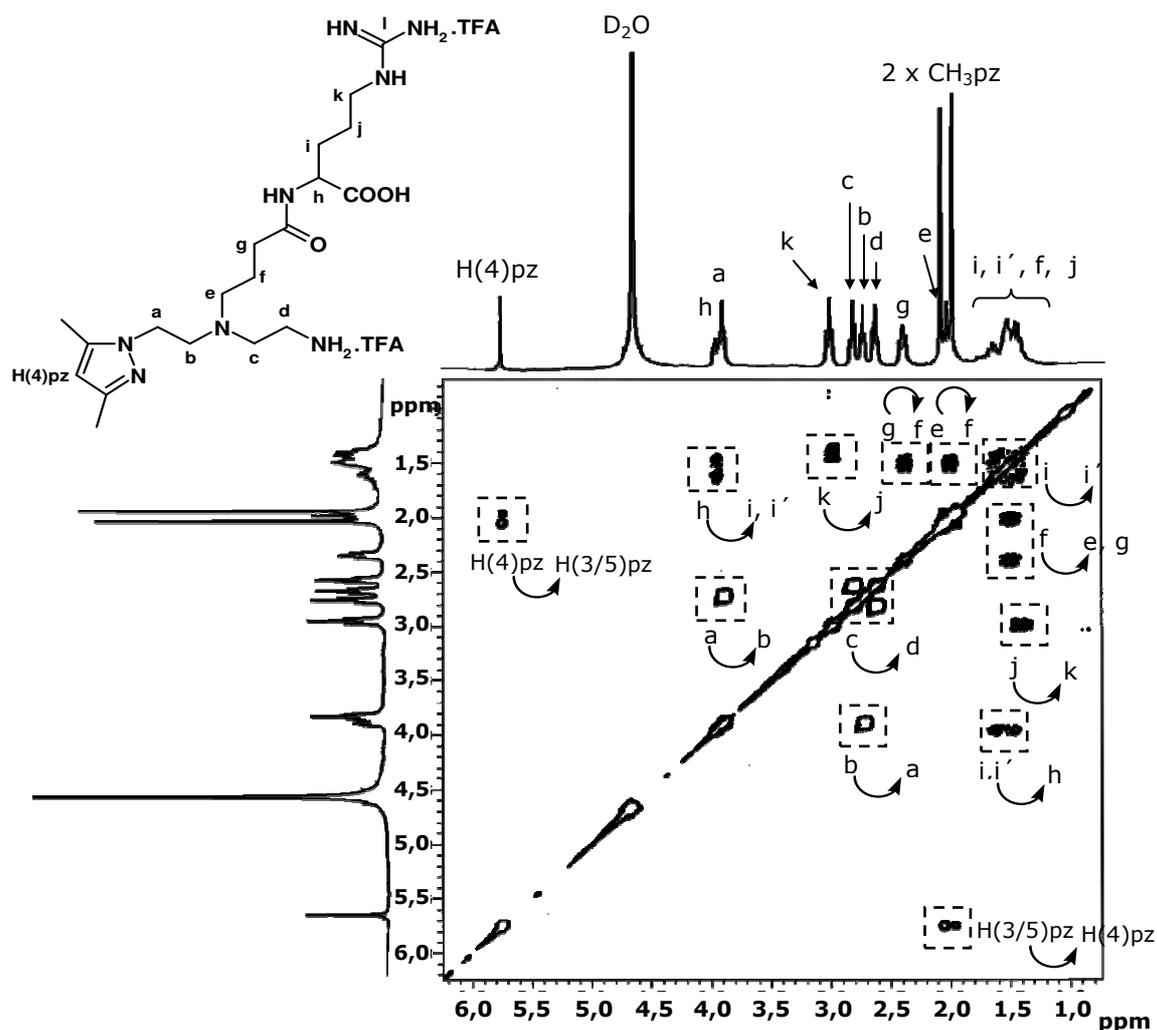


Figura 2.8: Espectro de ^1H - ^1H COSY do conjugado **2** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

Por ^1H - ^{13}C HSQC (Figura 2.9) foi também possível confirmar o carácter diastereotópico dos prótons H^i e $\text{H}^{i'}$, uma vez que ambos estão correlacionados com o mesmo carbono (C^i , δ 30,8).

Uma vez que no espectro de ^1H - ^{13}C HSQC apenas se observam as correlações C-H a J^1 , os sinais dos C=O (δ 180,7 e 177,5), carbono do grupo guanidina (C^1 , δ 158,7) e anel pirazolo (δ 150,6 e 143,5) foram identificados por RMN de ^{13}C .

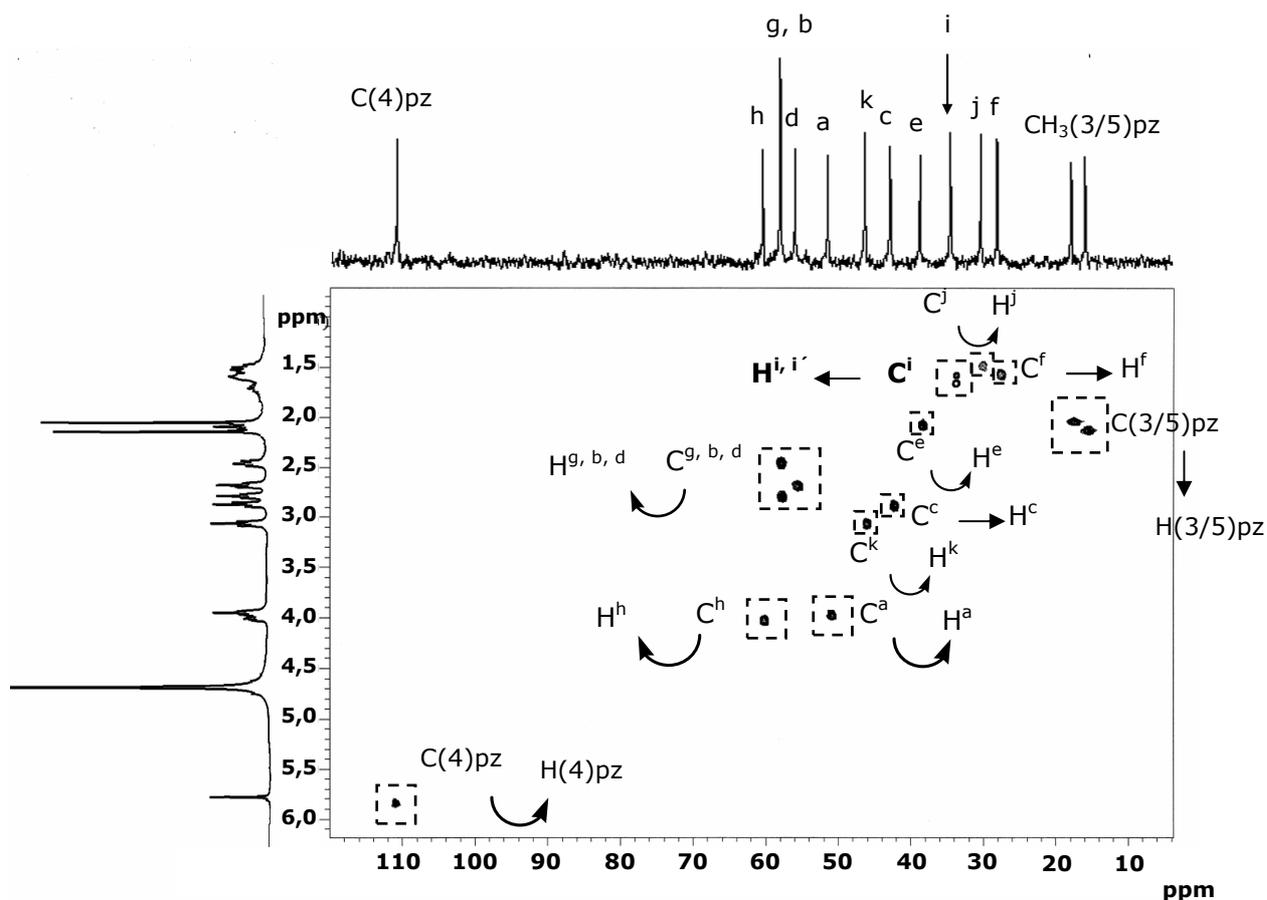


Figura 2.9: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do ligando **2** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

2.2.2 – Conjugados contendo a unidade quelante pirazolo-diamina e a $\text{N}^\omega\text{-NO}_2\text{-L-ArgOMe}$ (**3**), $\text{N}^\omega\text{-NO}_2\text{-L-ArgOH}$ (**4**) e $\text{N}^\omega\text{-CH}_3\text{-L-ArgOH}$ (**5**)

2.2.2.1 – Síntese dos conjugados **3** - **5**

Os conjugados contendo inibidores do NOS (**3** – **5**) foram preparados de acordo com as vias de síntese apresentadas na Figura 2.10. Os conjugados **3** e **4** foram obtidos directamente a partir do composto intermediário **V**, que foi preparado por acoplamento da $\text{N}^\omega\text{-NO}_2\text{-L-ArgOMe}$ ao éster activado **II**, seguindo uma estratégia semelhante à anteriormente descrita para o composto intermediário **III**.

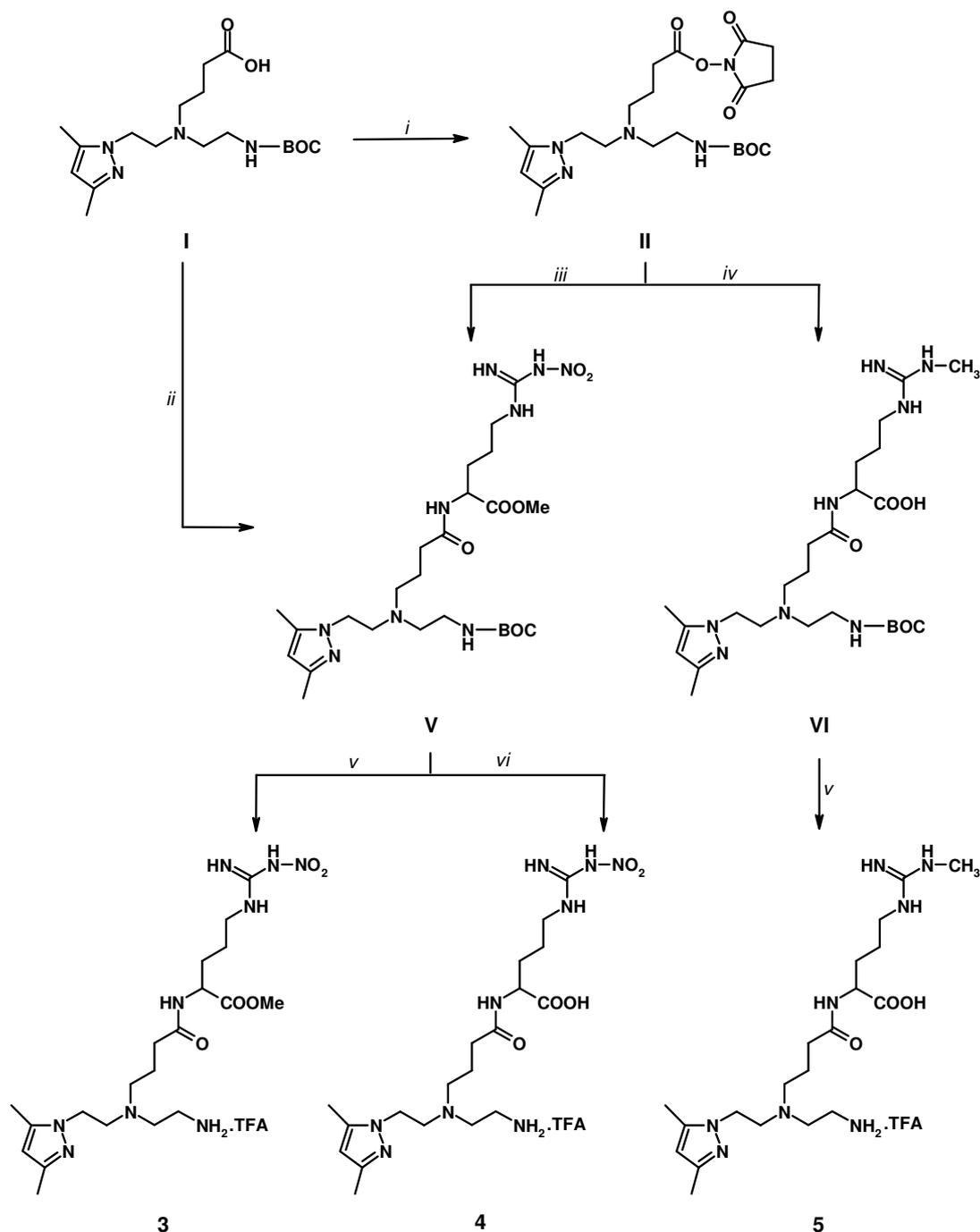


Figura 2.10: Síntese dos conjugados **3** - **5**; *i* - NHS, DCC, CH₂Cl₂, t.a., 18 h; *ii* - N^ω-NO₂-L-ArgOMe, HBTU, DMF/CH₃CN (3:1), NEt₃, t.a., 2 h; *iii* - N^ω-NO₂-L-Arg-OMe, H₂O, THF, NEt₃, t.a., 17 h; *iv* - N^ω-CH₃-L-ArgOH, H₂O, THF, NEt₃, t.a., 17 h; *v* - TFA/CH₂Cl₂ (3:1), t.a., 3 h; *vi* - HCl 3 N, t.a., 72 h.

Uma vez que o rendimento de obtenção do intermediário **V** por esta via de síntese foi baixo (~ 13 %), tentou-se a sua preparação por reacção directa do precursor **I** com a N^ω-NO₂-L-ArgOME na presença do agente de acoplamento *in situ* HBTU (hexafluorofosfato de O-(benzotriazolo-1-ilo)-N,N,N',N'-tetrametilurónio). A reacção foi

seguida por RP-HPLC analítico e, ao fim de 2 h, todo o precursor **I** já tinha sido consumido. O intermediário **V** foi assim obtido com rendimento elevado (~ 93 %) após purificação por RP-HPLC, utilizando as condições cromatográficas descritas na parte experimental (**secção 3.4.1.6**).

A reacção de remoção do grupo protector BOC do intermediário **V**, por hidrólise com o TFA, permitiu obter o conjugado **3** na forma de um óleo transparente com um rendimento de 58 %, após purificação por RP-HPLC.

A primeira tentativa de síntese do conjugado **4** numa forma pura envolveu num primeiro passo a hidrólise alcalina da função éster do intermediário **V** (NaOH 2 N, 22 h, t.a.), seguida da remoção do grupo protector BOC utilizando uma mistura TFA/CH₂Cl₂ (3:1). Após tratamento final da reacção, isolou-se uma fracção por RP-HPLC preparativo que, ao ser analisada por RP-HPLC analítico, revelou apenas um pico com uma pureza superior a 95 %. No entanto, a análise do espectro de ¹H-RMN revelou não só a presença de sinais correspondentes ao conjugado **4** pretendido, como também de um conjunto de sinais de menor intensidade, incluindo um singuleto na zona característica do protão 4 do anel pirazolo, de um outro composto (~ 28 %) atribuído a uma possível lactama obtida por uma reacção intramolecular (**secção 3.4.1.8**).

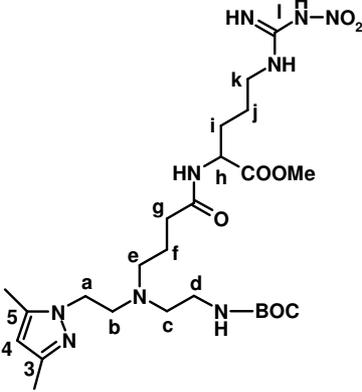
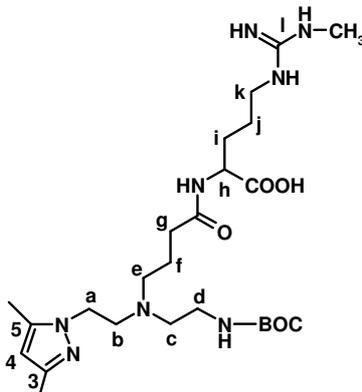
Tendo em conta a baixa pureza química com que foi obtido, preparou-se o composto **4** por uma via sintética alternativa que evitou o tipo de reacções secundárias descritas. Por hidrólise ácida do intermediário **V** com HCl, durante 72 horas à temperatura ambiente, obteve-se uma mistura dos conjugados **3** e **4** que foram isolados por RP-HPLC preparativo com um rendimento de 57 % e 36 %, respectivamente. As condições reaccionais utilizadas permitiram a remoção total do grupo protector BOC, no entanto, foi conseguida apenas uma hidrólise parcial da função éster.

O conjugado **5** foi sintetizado a partir do intermediário **VI** por remoção do grupo BOC com TFA, em condições semelhantes às utilizadas anteriormente para os outros conjugados. Após purificação por RP-HPLC, o composto foi obtido na sua forma de sal de trifluoroacetato com um rendimento de 79 %. O intermediário **VI** foi obtido com rendimento moderado (55 %) por reacção da N^ω-CH₃-L-ArgOH com um excesso de éster activado **II** (3 equivalentes).

2.2.2.2 – Caracterização dos conjugados 3 - 5

A caracterização estrutural dos intermediários **V** e **VI** baseou-se na espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C . Na Tabela 2.1 apresenta-se uma compilação dos dados espectroscópicos obtidos para os dois intermediários. Os desvios químicos e multiplicidades dos sinais são semelhantes aos encontrados para o intermediário **III** já descrito anteriormente, o que permitiu a atribuição dos sinais de ^1H -RMN e de alguns sinais de ^{13}C -RMN.

Tabela 2.1: Dados de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN para os intermediários **V** e **VI** (D_2O).

	Intermediário V		Intermediário VI
	δ (^1H)	δ (^{13}C)	δ (^1H)
	a	4,44 (t, 2H)	4,44 (t, 2H)
	b	3,54 (t, 2H)	3,55 (t largo, 2H)
	c	3,31/3,25	3,31/3,27
	d	2 x (d largo, 2H)	2 x (d largo, 2H)
	e	2,38 (t, 2H)	2,36 (t, 2H)
	f	1,83 (m, 2H)	1,84 (m, 2H)
	g	3,17 (m, 2H)	3,17 (t largo, 2H)
	h	4,24 (q, 1H)	4,18 (q, 1H)
	i; i'	1,74; 1,61	1,75; 1,60
		2 x (m, 1H)	2 x (m, 1H)
	j	1,50 (m, 2H)	1,47 (m, 2H)
	k	3,17 (m, 2H)	3,00 (m, 2H)
	l	-	-
	(4)pz	6,07 (s, 1H)	6,07 (s, 1H)
	(3/5)pz	2,19; 2,13	2,20; 2,13
		2 x (s, 3H)	2 x (s, 3H)
	OMe	3,57 (s, 3H)	-
	NCH ₃	-	2,63 (s, 3H)
	BOC	1,21 (s, 9H)	1,22 (s, 9H)
	C=O	-	-
		161,0 (C=O)	
		83,9 (C(CH ₃) ₃)	
		29,7 (C(CH ₃) ₃)	
		176,8	
		176,3	
			

A ressonância correspondente aos prótons metilénicos H^k da N^ω -NO₂-L-ArgOME do intermediário **V** encontra-se desviada para campo mais baixo (δ 3,17), relativamente ao mesmo sinal nos intermediários **III** (δ 3,03) e **VI** (δ 3,00), o que deverá estar de acordo com a presença de um grupo NO₂ atrator de electrões, que tem um efeito desblindante.

Os conjugados **3** e **4**, obtidos com uma pureza superior a 95 % (confirmada por RP-HPLC analítico), foram caracterizados por espectroscopia de RMN (¹H, ¹³C, ¹H-¹H COSY e ¹H-¹³C HSQC), espectrometria de massa (ESI-MS) e espectroscopia de IV.

Os espectros de IV dos conjugados **3** e **4**, quando comparados com os espectros obtidos para os conjugados similares **1** e **2**, apresentam duas bandas adicionais de intensidade média/forte entre 1661 – 1499 cm⁻¹ e 1389 – 1259 cm⁻¹, atribuíveis à vibração de extensão assimétrica e simétrica do grupo NO₂, respectivamente [106]. Na figura 2.11, o espectro de IV do conjugado **3** é comparado com o espectro equivalente do conjugado **2**.

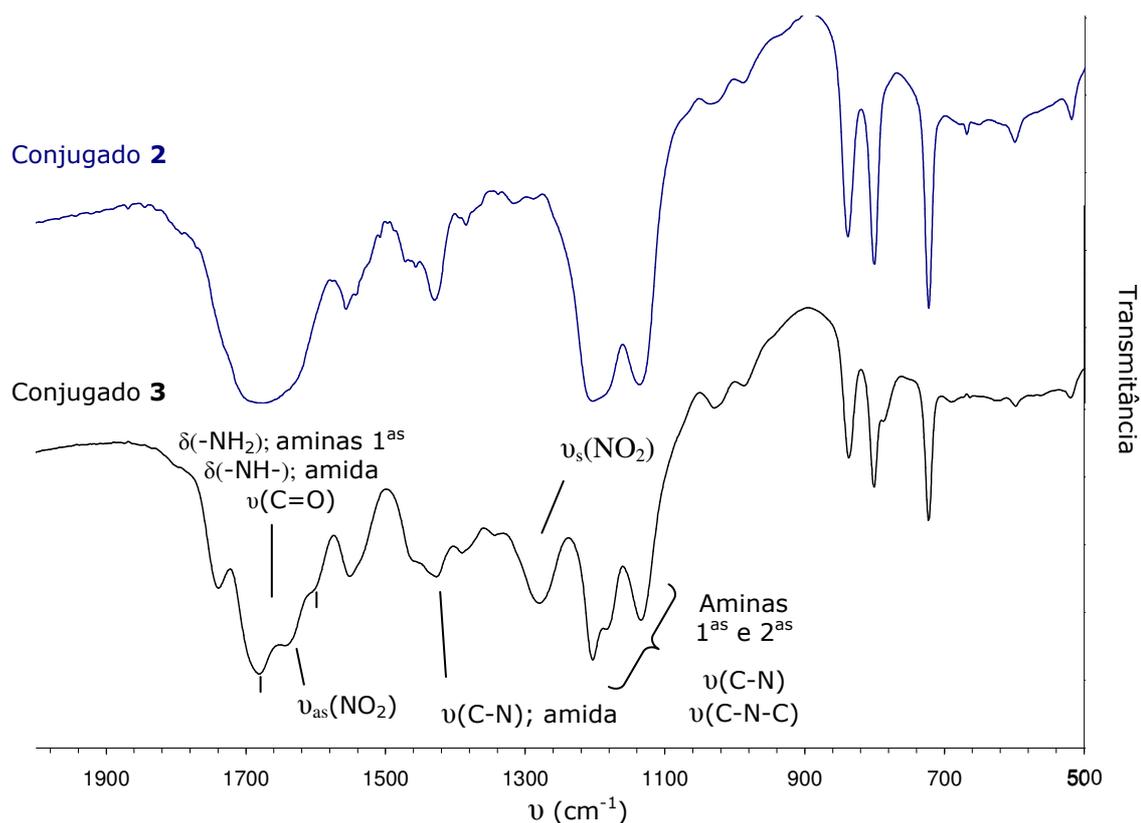


Figura 2.11: Espectro de IV dos conjugados **2** e **3** na zona de frequências entre 2000 – 500 cm⁻¹ (KBr).

A análise dos conjugados **3** e **4** por RMN de ^1H e ^{13}C revelou-se consistente com as estruturas esperadas. Os espectros de ^1H -RMN destes compostos caracterizam-se por apresentarem desvios químicos, integrações e multiplicidades semelhantes às atrás discutidas. Nas Figuras 2.12 e 2.13 apresentam-se como exemplo os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , respectivamente, do composto **3** com as correspondentes atribuições.

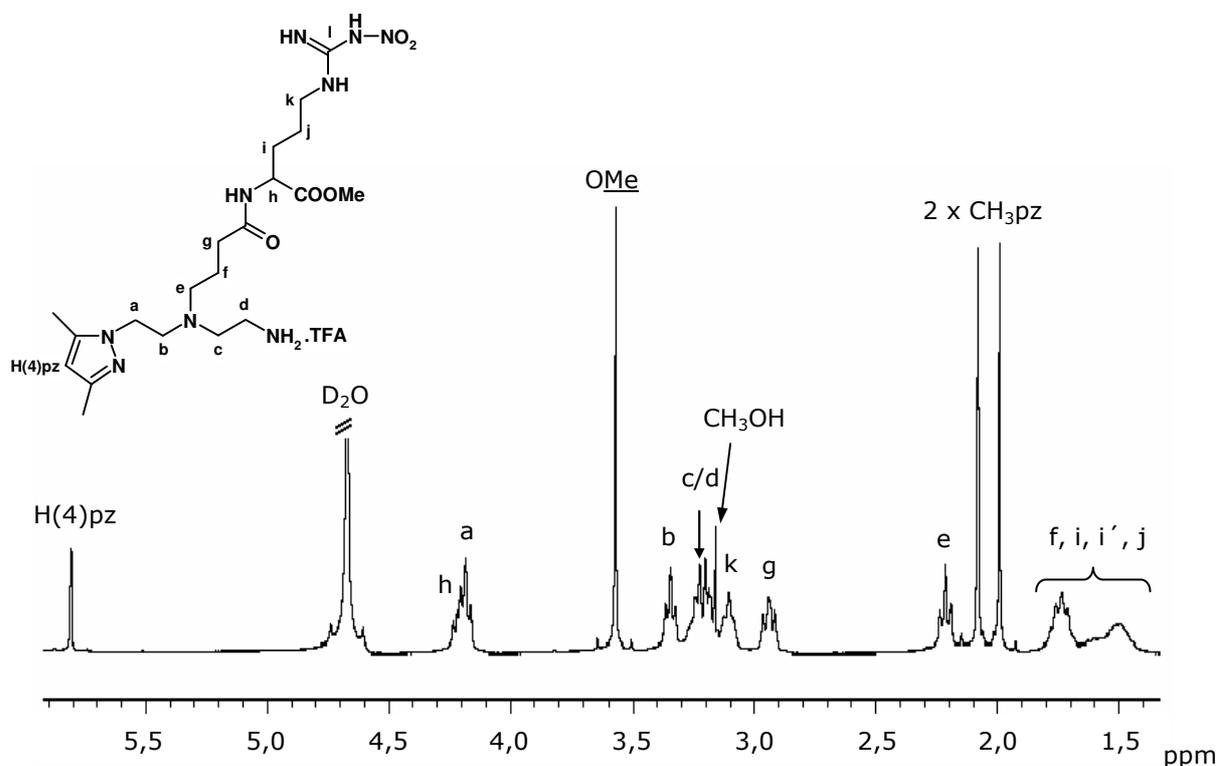


Figura 2.12: Espectro de ^1H -RMN do ligando **3** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

O espectro apresenta três singletos característicos, atribuídos ao protão 4 (δ 5,81) e aos grupos metilo 3 e 5 do anel pirazolo (δ 2,08 e 1,99). Observam-se ainda os sinais relativos aos protões alifáticos do ligando pirazolo-diamina (δ 4,18 - H^a ; δ 3,34 - H^b ; δ 3,25 - $\text{H}^{c/d}$; δ 3,22 - $\text{H}^{c/d}$; δ 2,94 - H^g ; δ 2,21 - H^e ; δ 1,76 - H^f) e da $\text{N}^\omega\text{-NO}_2\text{-L-ArgOMe}$ (δ 4,18 - H^h ; δ 3,10 - H^k ; δ 1,76 - H^i ; δ 1,60 - $\text{H}^{i'}$; δ 1,49 - H^j). O sinal relativo aos protões do éster metílico (OMe) surge como um singuleto a δ 3,57. O carácter diastereotópico dos protões H^i e $\text{H}^{i'}$, resultante da proximidade ao carbono quiral foi mais uma vez observado.

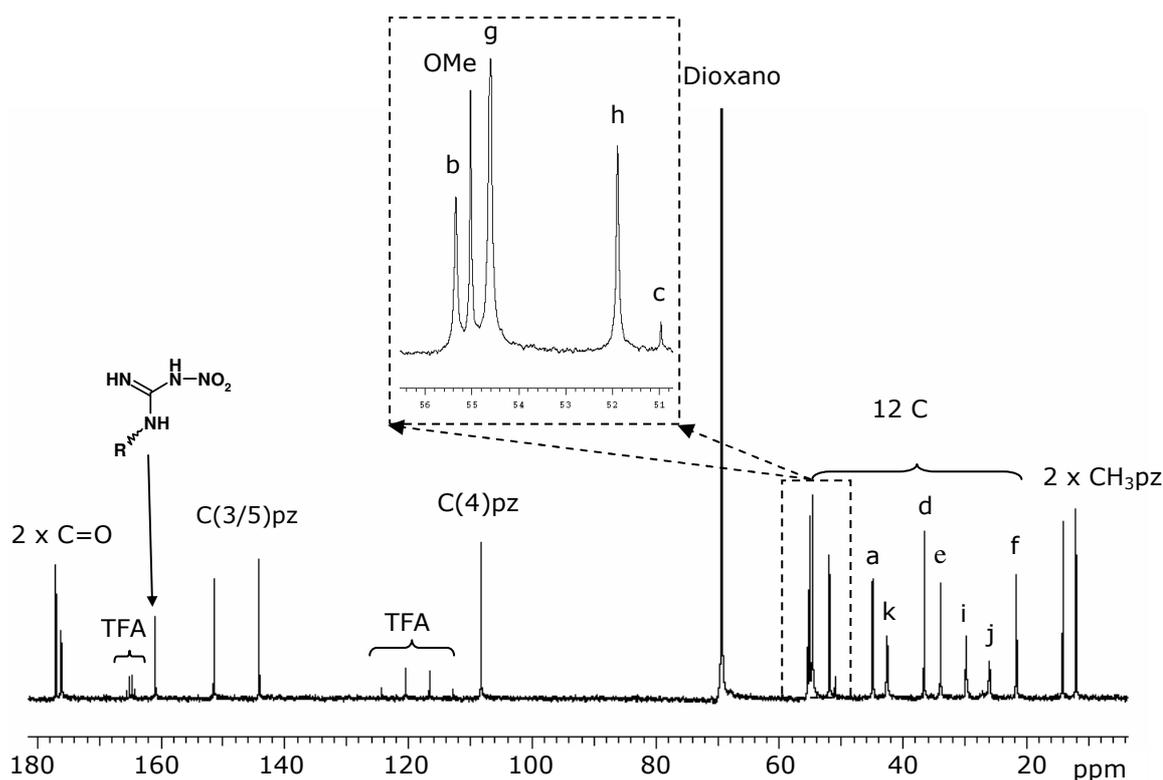


Figura 2.13: Espectro de ^{13}C -RMN do conjugado **3** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

No espectro de ^{13}C -RMN observam-se os sinais correspondentes aos dois grupos $\text{C}=\text{O}$ ($\delta \sim 176$), aos três carbonos do anel pirazolilo ($\delta 151 - 108$), aos onze sinais dos carbonos alifáticos ($\delta 55 - 21$) e, a campo mais alto, os sinais atribuídos aos grupos metilo do anel pirazolo ($\delta \sim 14$ e 12). Pode ainda encontrar-se um sinal a $\delta 55,0$ correspondente ao éster metílico e um sinal a $\delta 160,9$ correspondente ao carbono do grupo guanidina.

As formulações propostas para os conjugados **3** e **4** foram também confirmadas por ESI-MS. A título de exemplo, está representado na Figura 2.14 o espectro de massa obtido em modo positivo para o composto **4**. O espectro apresenta um pico maioritário a $m/z = 470$ com carga $+1$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), correspondente ao ião molecular para este composto (Figura 2.14 - **A**). Este pico apresenta uma distribuição isotópica (Figura 2.14 - **B**) que está de acordo com a formulação para o conjugado, como se pode confirmar por comparação com a simulação da respectiva série isotópica representada na Figura 2.14 - **C**.

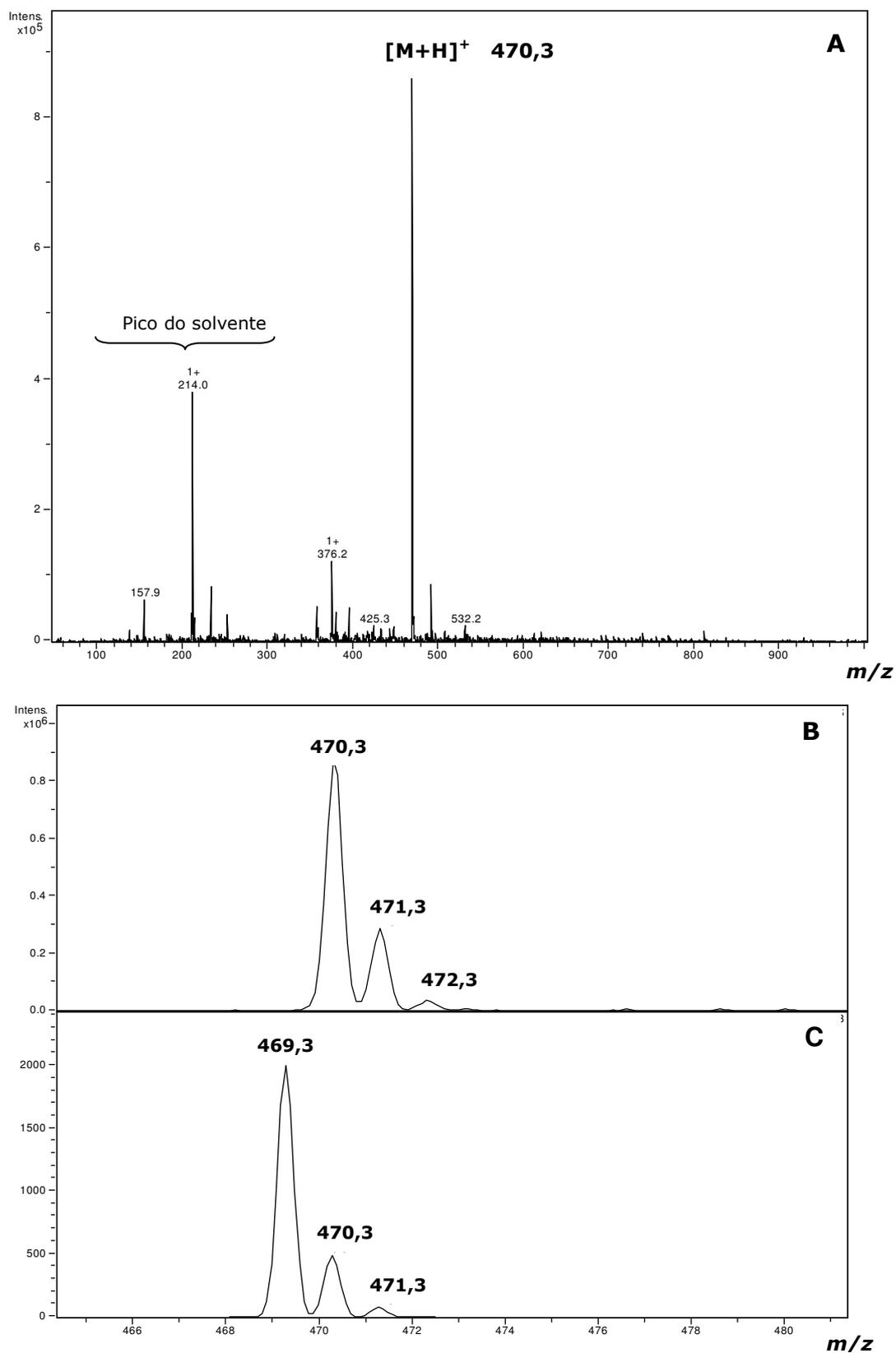


Figura 2.14: (A) Espectro de massa no modo positivo do conjugado **4** obtido por ionização por electrospray; (B) expansão do pico correspondente a [M+H]⁺; (C) simulação da série isotópica do ião molecular [M]⁺.

A caracterização estrutural do conjugado **5**, obtido com uma pureza superior a 95% (confirmada por RP-HPLC), foi efectuada por RMN (^1H , ^{13}C) e por ESI-MS. Os espectros de RMN estão de acordo com a estrutura esperada (Figuras 2.15 e 2.16), apresentando um perfil semelhante aos conjugados **1** – **4** já descritos.

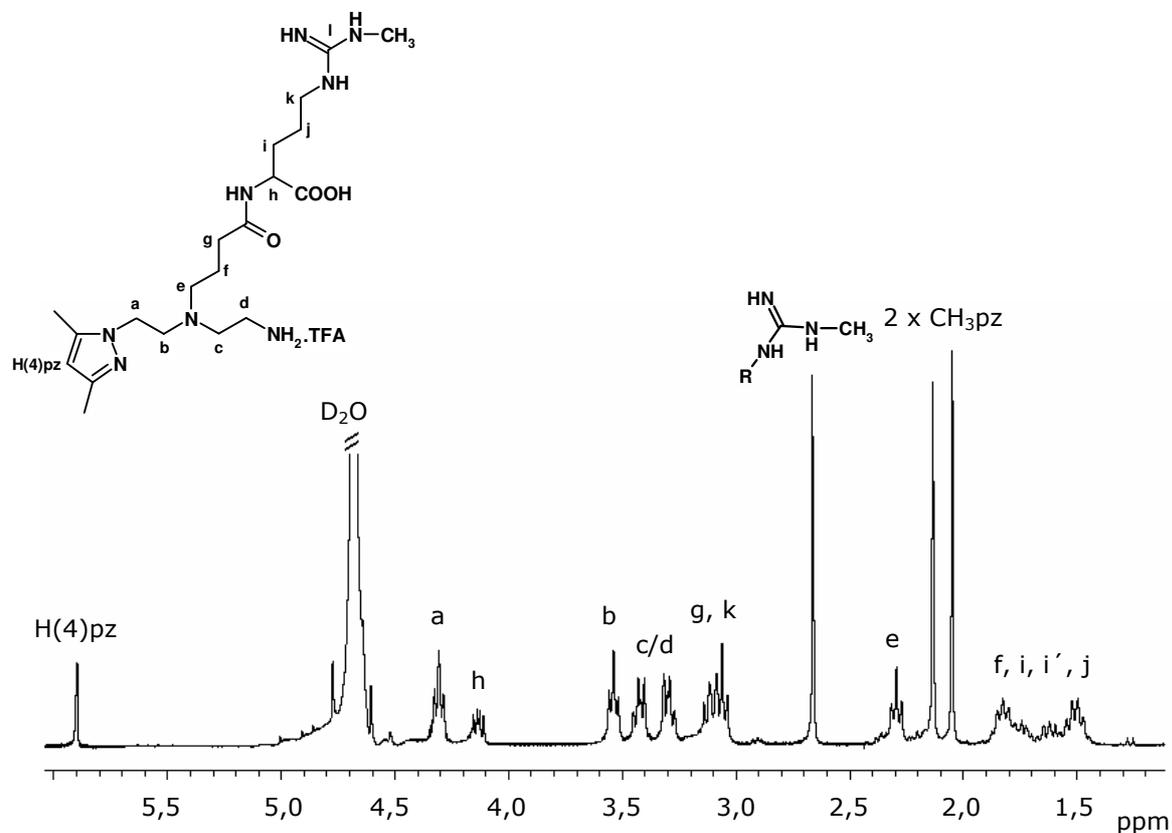


Figura 2.15: Espectro de ^1H -RMN do conjugado **5** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

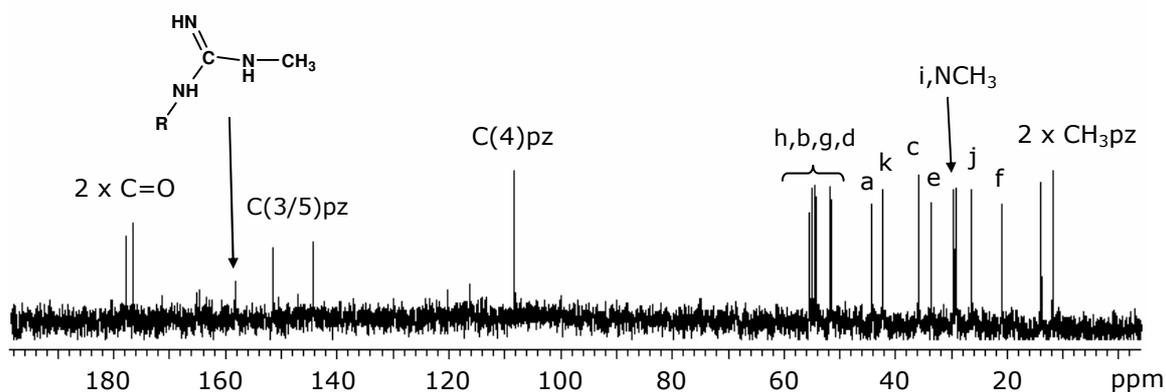


Figura 2.16: Espectro de ^{13}C -RMN do conjugado **5** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

O espectro de ^1H -RMN do ligando **5** apresenta um singuleto característico a δ 2,67, referente ao grupo metilo da guanidina. No espectro ^{13}C -RMN observa-se também o sinal deste grupo metilo a δ 29,8. O sinal do carbono central da guanidina aparece a δ 158,5, valor próximo ao encontrado para os ligandos **1** e **2**.

O espectro de massa (ESI-MS) em modo positivo para o conjugado **5** apresenta dois picos a $m/z = 439$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ e a 220 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, que estão de acordo com a sua formulação teórica (m/z para $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_3 = 438$).

2.2.3 – Conjugado contendo a unidade quelante cisteína e a N^ω - NO_2 -L-ArgOH (**6**)

2.2.3.1 – Síntese do conjugado **6**

A síntese do conjugado **6** contendo a unidade tridentada cisteína e o inibidor do NOS N^ω - NO_2 -L-ArgOH foi efectuada em dois passos, de acordo com as condições reaccionais apresentadas na Figura 2.17.

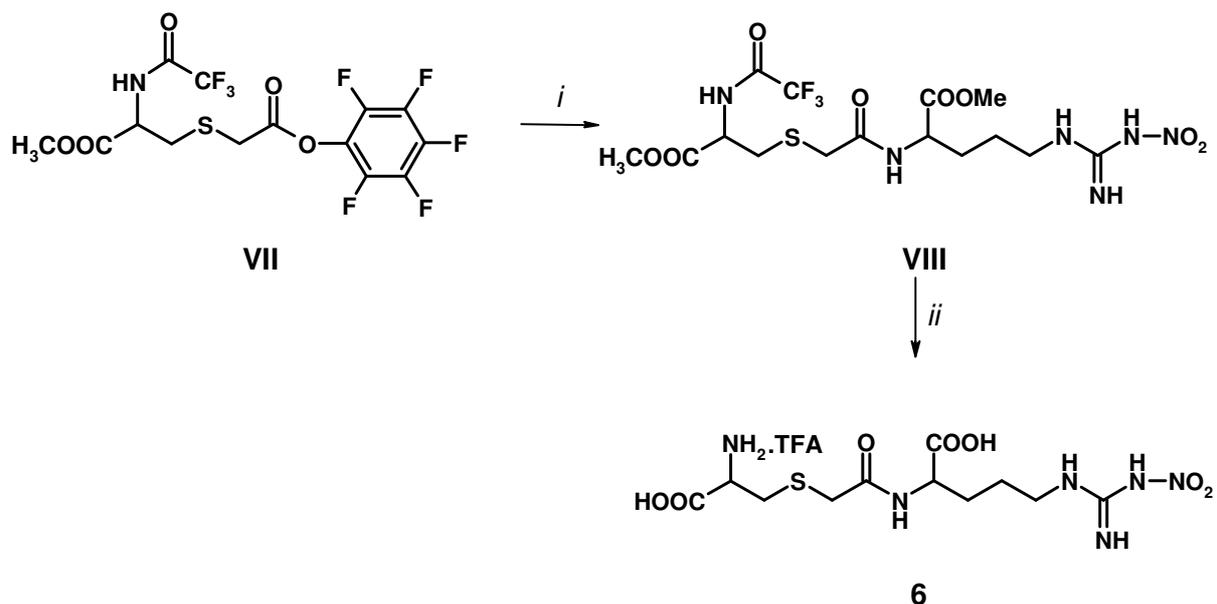


Figura 2.17: Síntese do ligando **6**. *i* - N^ω - NO_2 -L-ArgOMe, DMF/H₂O (4:1), NEt₃, t.a., 19 h; *ii* - CH₃OH/H₂O, K₂CO₃, t.a., 5 dias.

O primeiro passo envolveu a preparação do composto intermediário **VIII**, obtido por acoplamento da N^ω - NO_2 -L-ArgOMe ao éster metílico da cisteína. Este éster está funcionalizado no grupo tiol com a unidade metilcarboxilato activada com pentafluorfenol e protegido na função amina com o grupo trifluoroacetato (**VII**). O composto intermediário **VIII** foi obtido com rendimento elevado (~ 86 %) após purificação em

coluna de sílica gel de tamanho apropriado, usando um gradiente de CH₃OH (3 - 8 %)/CHCl₃.

No segundo passo procedeu-se à hidrólise dos ésteres metílicos e remoção do grupo protector da amina em condições alcalinas. A reacção foi seguida por RP-HPLC, observando-se a formação de um pico maioritário ao fim de 5 dias. O ligando **6** foi obtido sob a forma de um óleo transparente com rendimento moderado (51 %), após purificação por RP-HPLC preparativo.

2.2.3.2 – Caracterização do conjugado **6**

A caracterização do conjugado **6** foi realizada por RMN (¹H, ¹³C) e ESI-MS. Para atribuição dos sinais de RMN realizaram-se experiências de ¹H-¹H COSY e ¹H-¹³C HSQC, cujos espectros são apresentados nas Figuras 2.18 e 2.19, respectivamente.

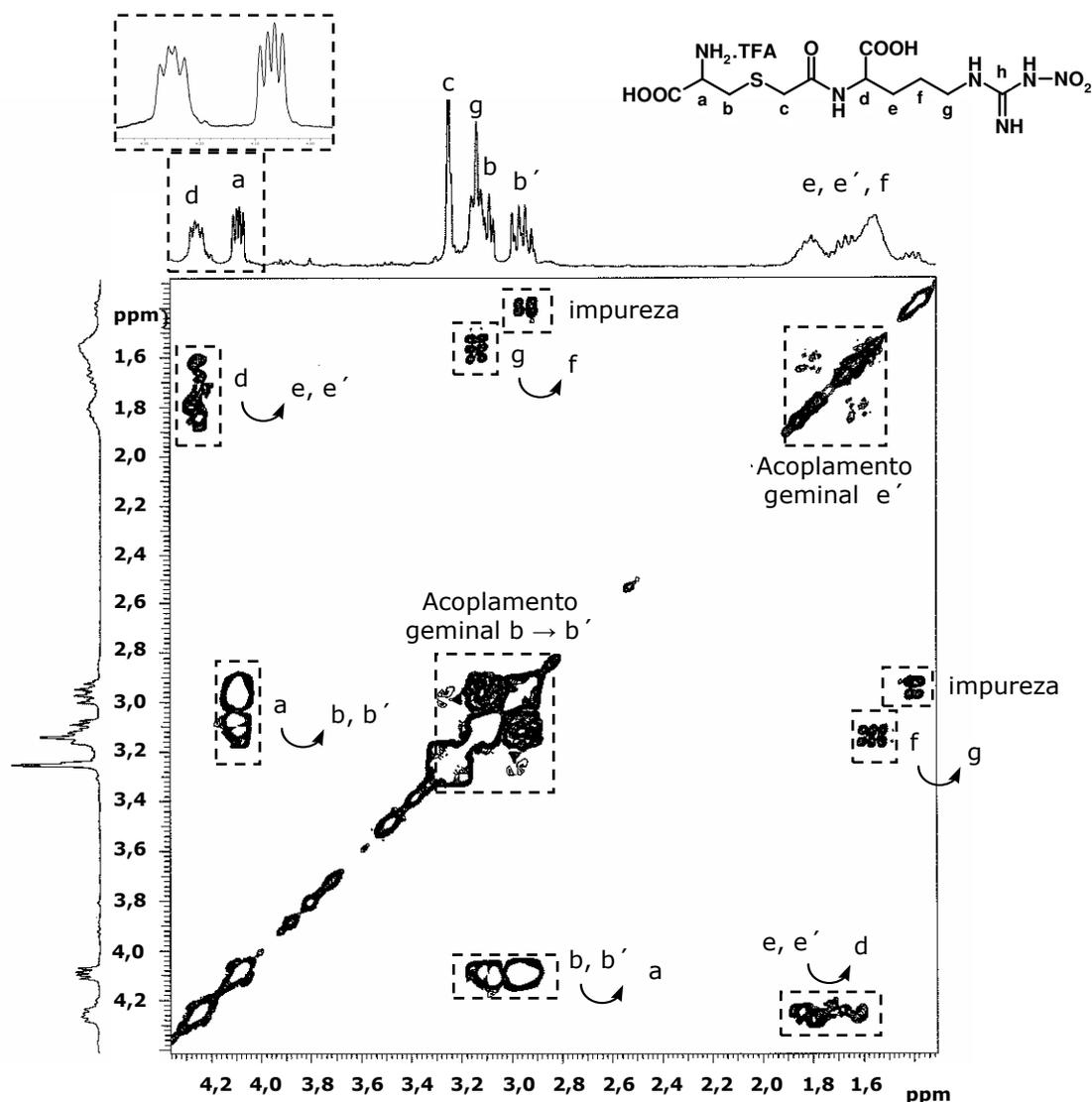


Figura 2.18: Espectro de ¹H-¹H COSY do conjugado **6** e atribuição dos sinais (D₂O).

No espectro de ^1H - ^1H COSY o sinal referente ao próton H^a da unidade cisteína surge como um quarteto a δ 4,09, apresentando acoplamento aos prótons H^b e $\text{H}^{b'}$ que aparecem a δ 3,07 e 2,95 como dois multipletos separados. Foi possível a atribuição inequívoca do singuleto a δ 3,22 aos prótons H^c , uma vez que estes prótons não se correlacionam com nenhum outro sinal da molécula. O multipletto correspondente aos prótons H^d aparece a campo baixo (δ 4,25) acoplado com H^e e $\text{H}^{e'}$, cujas ressonâncias surgem como dois multipletos a δ 1,83 e 1,69. É também possível observar uma correlação entre os prótons H^f (δ 1,55) e os prótons H^g , que surgem a δ 3,14 como um triplete.

No espectro de ^1H - ^{13}C HSQC observou-se a correlação dos sinais dos prótons H^b e $\text{H}^{b'}$ com o mesmo carbono (δ 34,1, C^b), confirmando o carácter diastereotópico destes prótons. Encontrou-se o mesmo tipo de correlação entre os prótons H^e e $\text{H}^{e'}$ com o correspondente carbono (δ 29,7, C^e). Os restantes sinais a δ 54,8, 54,4, 42,5, 36,8 e 25,9 foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos C^d , C^a , C^g , C^c e C^f .

No espectro de RMN de ^{13}C do conjugado **6** foi ainda possível observar os restantes sinais, correspondentes aos grupos $\text{C}=\text{O}$ a δ 177,2, 174,2 e 172,7, e ao carbono do grupo guanidina (C^h) a δ 160,9.

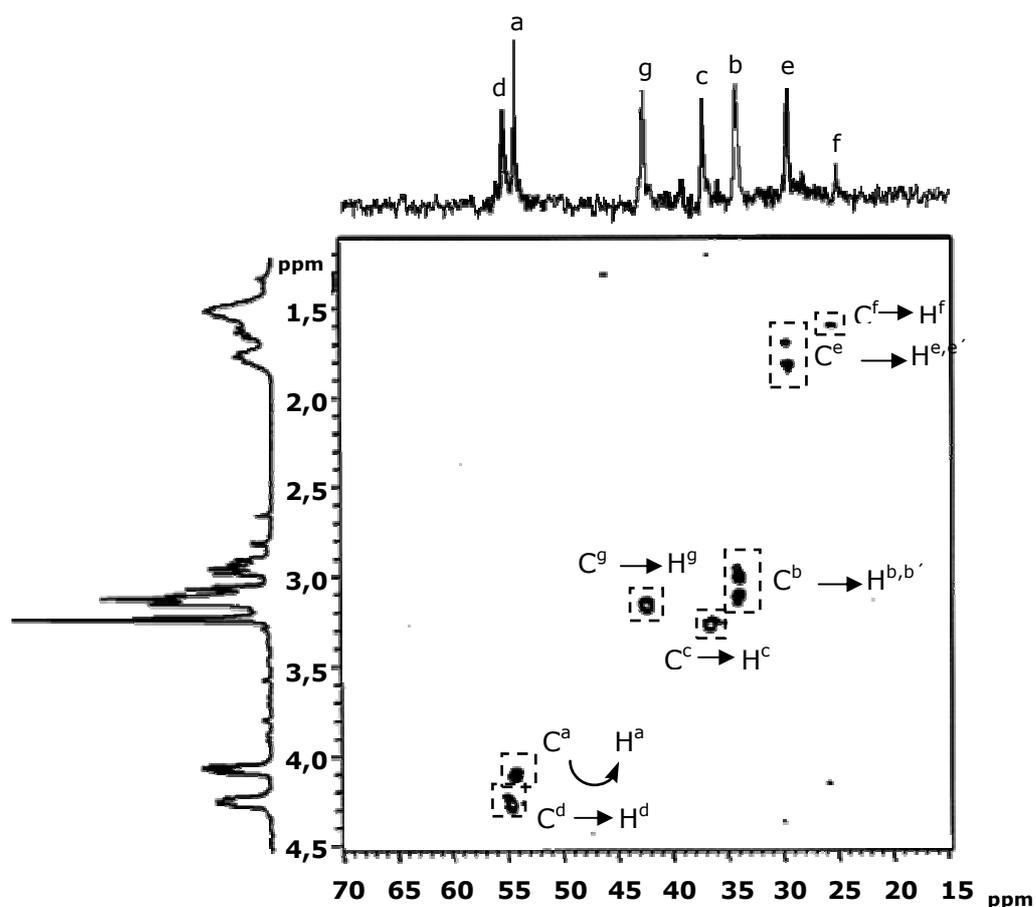


Figura 2.19: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do conjugado **6** e atribuição dos sinais (D_2O).

2.3 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS *fac*-[Re(k^3 -L)(CO)₃]⁺ (L = 1 - 5)

Os complexos [Re(k^3 -L)(CO)₃]⁺ (L = 1, **Re1**; 2, **Re2**; 3, **Re3**; 4, **Re4**; 5, **Re5**) foram sintetizados com rendimentos moderados a elevados (40 - 85 %) por refluxo de uma solução metanólica (**Re1** e **Re3**) ou aquosa (**Re2**, **Re4** e **Re5**) do precursor (NEt₄)₂[ReBr₃(CO)₃] com quantidades estequiométricas dos respectivos conjugados (Figura 2.20).

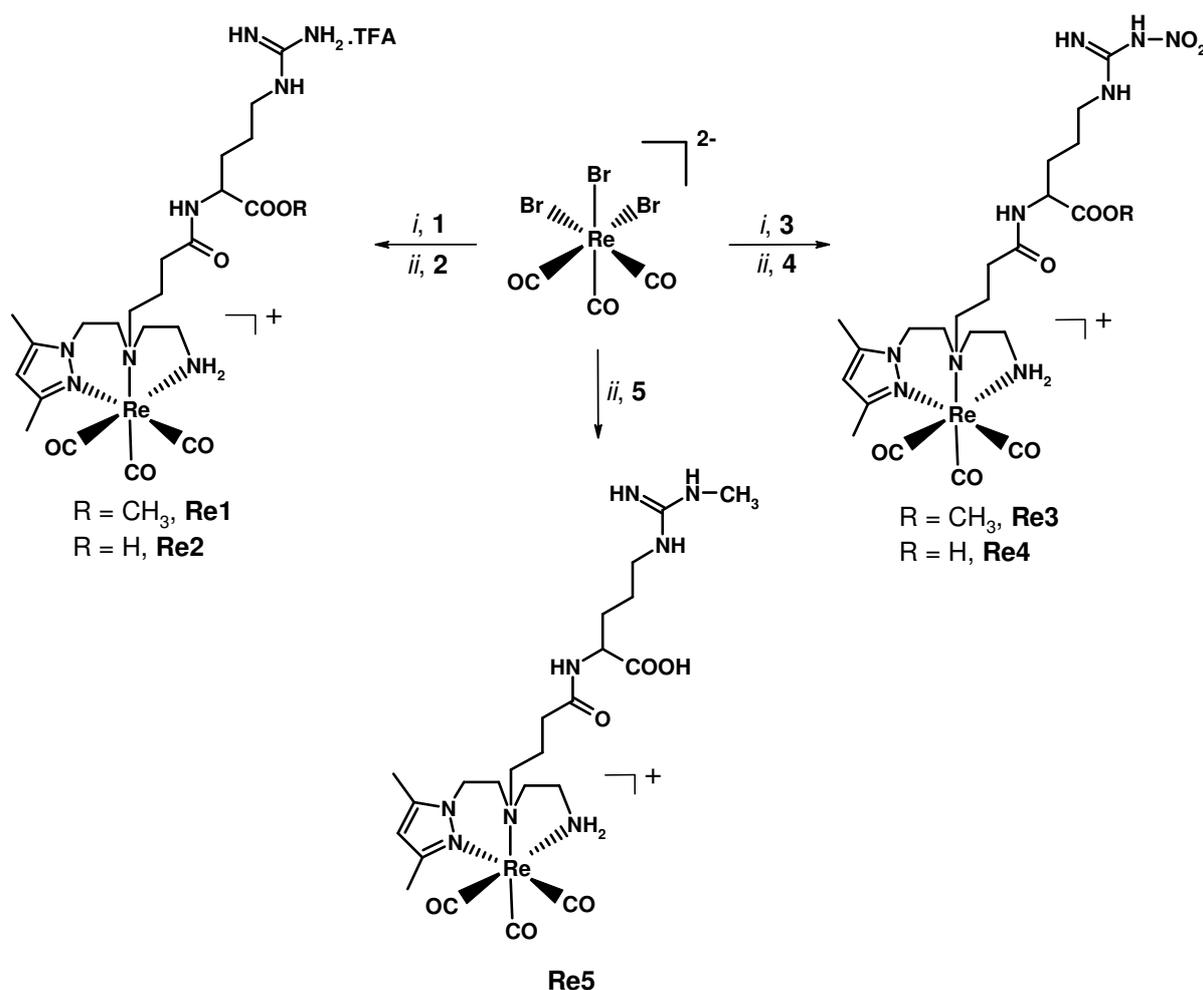


Figura 2.20: Síntese dos complexos **Re1** - **Re5** por reacção directa dos conjugados 1 - 5 com o precursor (NEt₄)₂[ReBr₃(CO)₃]. *i* - CH₃OH, refluxo, 18 h; *ii* - H₂O, refluxo, 18 h.

Os complexos **Re1** - **Re5** foram previamente purificados por lavagem dos resíduos obtidos após evaporação do solvente reaccional com CHCl₃, de modo a remover o [NEt₄]Br formado. O resíduo obtido após este tratamento foi dissolvido em H₂O, formando-se um sólido branco que foi separado por centrifugação e eliminado. O sobrenadante foi purificado por RP-HPLC de acordo com o procedimento descrito na

secção 3.4.2. O cromatograma analítico da mistura reaccional obtida após a síntese do complexo **Re1** é apresentado na Figura 2.21, a título exemplificativo.

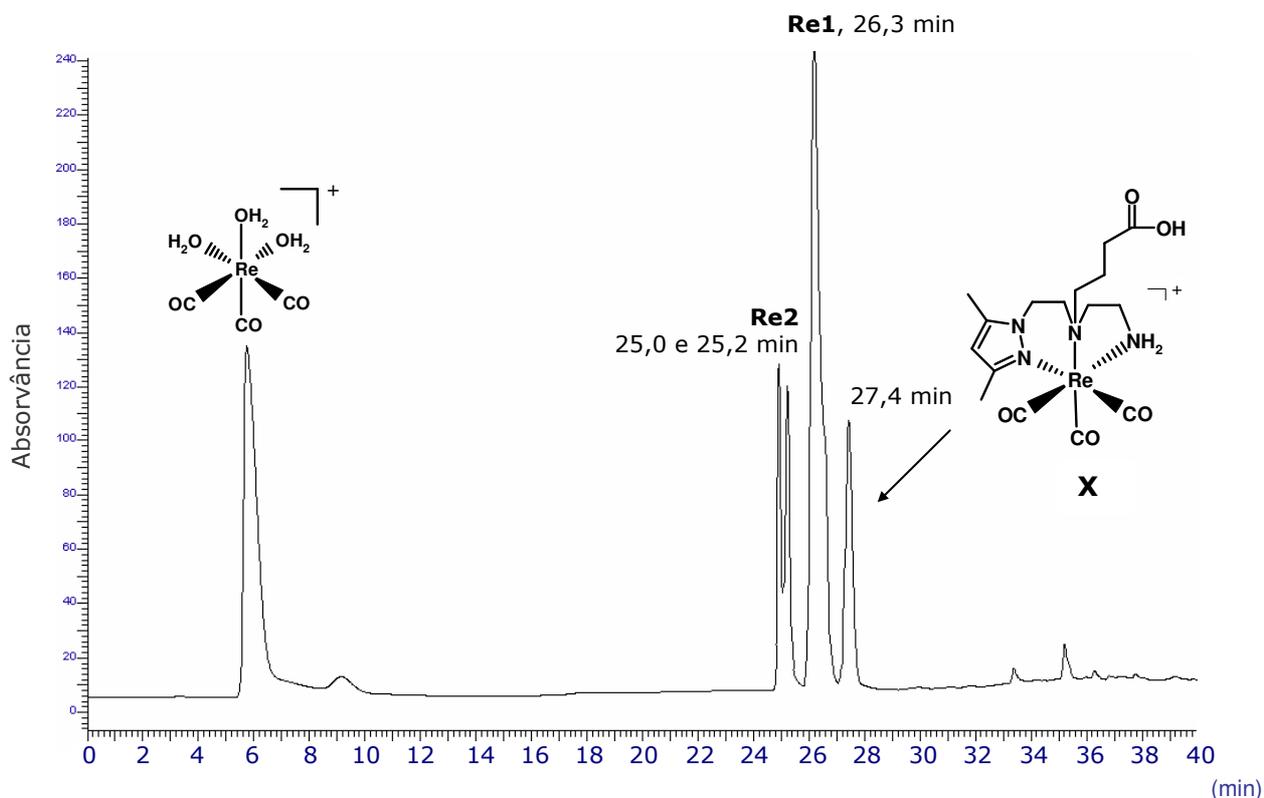


Figura 2.21: Cromatograma de RP-HPLC da mistura reaccional da síntese de **Re1**, obtido utilizando uma coluna Nucleosil C18 (100 - 5 μ m) e um gradiente de TFA 0,1 %/CH₃OH (**Método 1, secção 3.2**).

A análise cromatográfica da mistura reaccional revelou a presença de três picos com tempos de retenção de 25,2 min, 26,3 min e 27,4 min. As fracções correspondentes a estes picos foram recolhidas por RP-HPLC preparativo e analisadas por ¹H-RMN, após evaporação dos solventes de eluição. O pico com tempo de retenção de 26,3 min foi identificado como sendo o complexo **Re1**. O moderado rendimento (61 %) com que foi obtido está associado à formação dos complexos **Re2** ($t_R = \sim 25,1$ min) e **X** ($t_R = 27,4$ min). A formação destes compostos pode ser explicada pela hidrólise da função éster e da função amida nas condições reaccionais utilizadas.

Tendo por objectivo provar que a coordenação dos diferentes conjugados ao fragmento metálico se faz exclusivamente pela unidade quelante pirazolo-diamina e que os grupos funcionais da "unidade bioactiva L-Arg" não estão envolvidos na coordenação, o complexo **Re2** foi também sintetizado pela via sintética alternativa esquematizada na Figura 2.22.

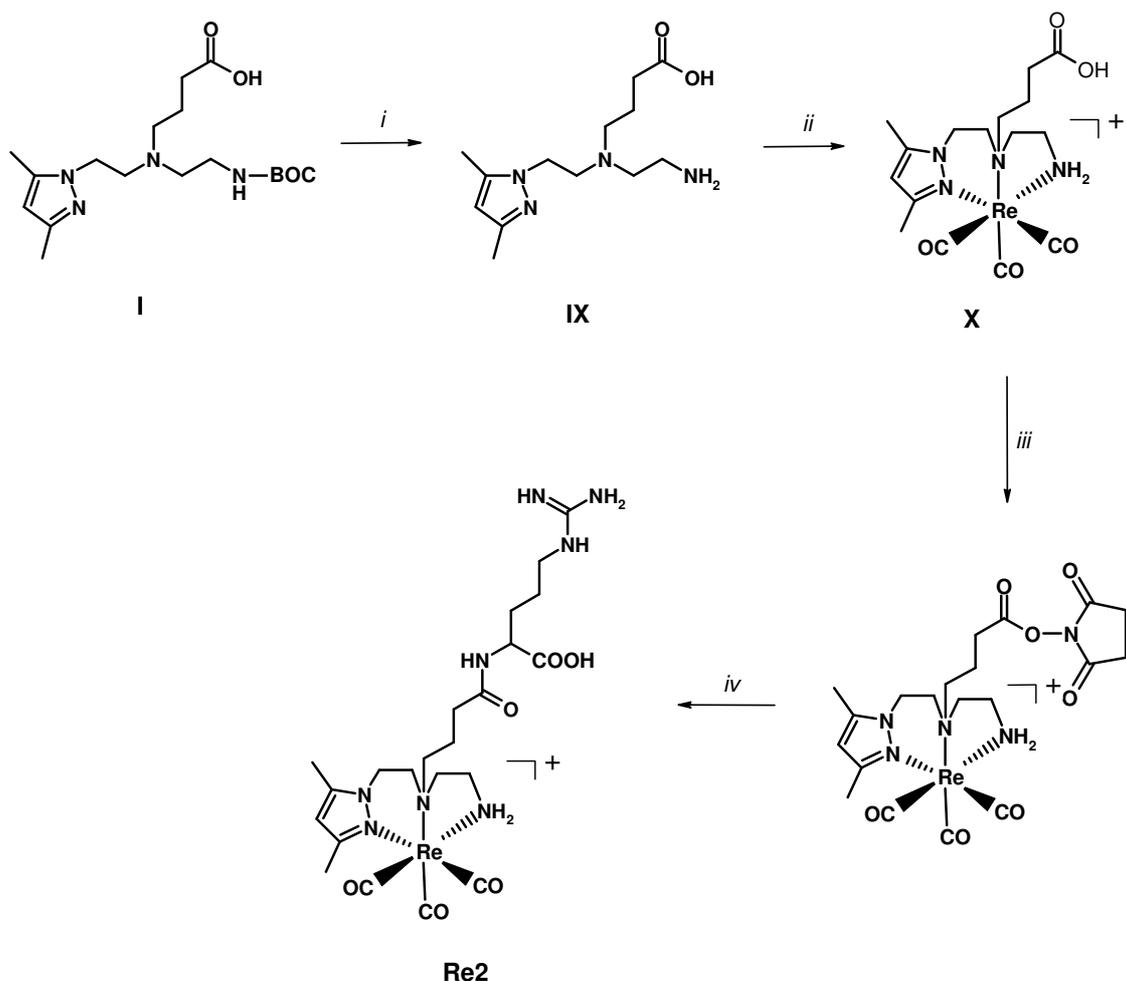


Figura 2.22: Síntese do complexo **Re2** por via alternativa indirecta. *i* - TFA/CH₂Cl₂ (3:1), t.a., 3 h; *ii* - (NEt₄)₂[Re(Br)₃(CO)₃], H₂O, refluxo, 18 h; *iii* - NHS, DCC, DMF, t.a., 24 h; *iv* - L-ArgOH, NEt₃, H₂O, t.a., 16 h.

No método utilizado, o complexo **Re2** foi obtido por reacção da L-ArgOH com o éster activado do complexo **X**, sintetizado de acordo com os dados descritos na literatura [107]. O composto foi obtido com baixo rendimento (~ 38 %) após purificação por RP-HPLC preparativo (**secção 3.4.2.2**).

A análise dos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN do complexo **Re2** obtido pela via de síntese directa (Figura 2.20, *ii*) e indirecta (Figura 2.22) permitiram concluir que o grupo carboxilato e os átomos de azoto do grupo guanidina não interferem na ligação ao fragmento metálico, estando disponíveis para se ligarem ao centro activo do enzima NOS. Na Figura 2.23 é apresentado o cromatograma analítico do complexo **Re2**.

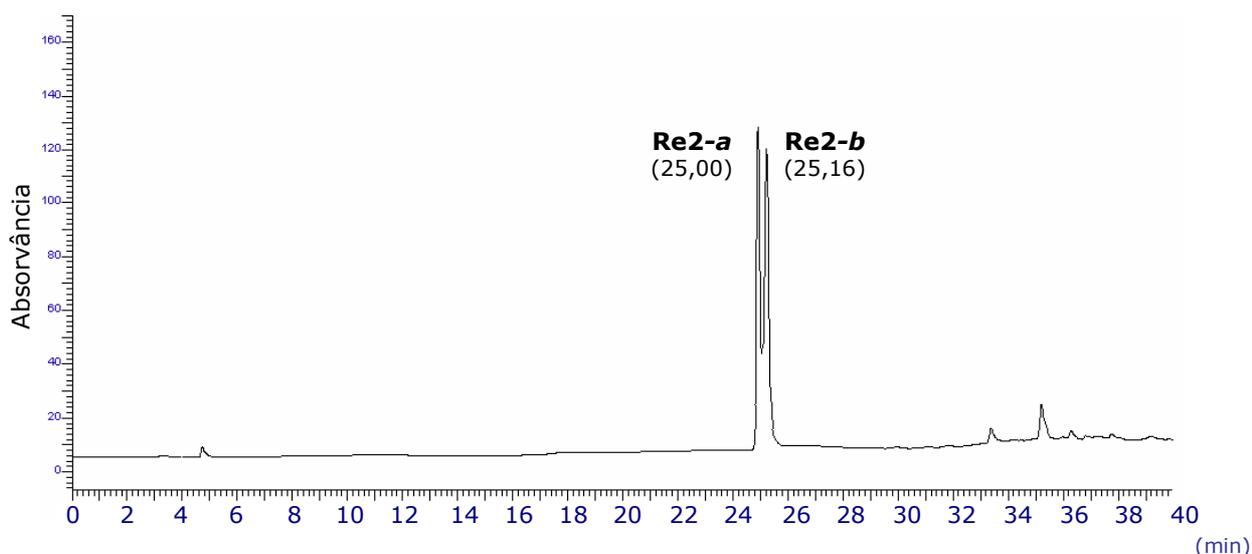


Figura 2.23: Cromatograma de RP-HPLC do complexo **Re2** obtido utilizando uma coluna Nucleosil C18 (100 - 5 μ m) e um gradiente de TFA 0,1 %/CH₃OH (**Método 1, secção 3.2**).

A presença de dois picos distintos no cromatograma analítico com tempos de retenção semelhantes indicia a existência de dois isómeros (**Re2-a**: t_R - 25,00 min; **Re2-b**: t_R - 25,16 min). A sua formação poderá resultar da presença de dois centros quirais no conjugado, nomeadamente a amina terciária da unidade quelante e o carbono α do aminoácido, que poderá levar à formação de diastereoisómeros identificáveis por RP-HPLC. O mesmo perfil cromatográfico, isto é, a presença de dois picos, foi observado para todos os complexos que apresentam na unidade "L-Arg" o grupo carboxilato livre (**Re4** e **Re5**).

Com o objectivo de se caracterizar estruturalmente cada um dos isómeros, optimizou-se um método cromatográfico, que envolveu a escolha do gradiente, tempo de corrida e eluentes mais adequados para a separação e isolamento dos isómeros por RP-HPLC semi-preparativo (coluna semi-preparativa: EP 250/8 Nucleosil C18, 100-7, 250 x 8 mm; fluxo: 2 mL/min; eluentes: A - TFA 0,1 %, B - CH₃OH; gradiente: t = 0 - 5 min, 10 % B; 5 - 50 min, 10 \rightarrow 100 % B; 50 - 54 min, 100 % B; 54 - 55 min: 100 \rightarrow 10 % B; 55 - 60 min, 10 % B). As fracções correspondentes a cada um dos isómeros foram recolhidas e a sua pureza química (\sim 95 %) avaliada por RP-HPLC (Figura 2.24).

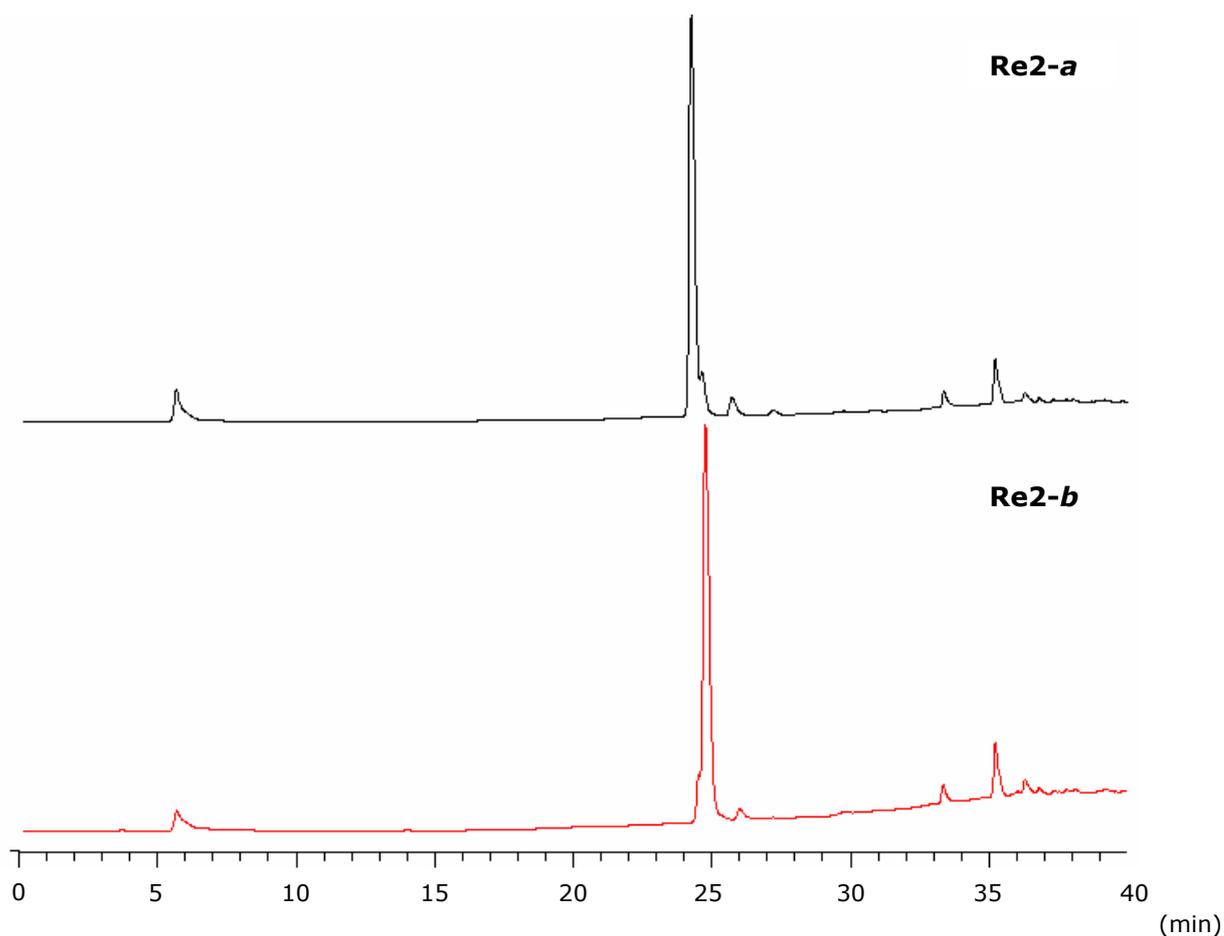


Figura 2.24: Cromatogramas analíticos de RP-HPLC dos *isómeros* **Re2-a** e **Re-b** obtidos utilizando uma coluna Nucleosil C18 (100 - 5 μm) e um gradiente de TFA 0,1 %/ CH_3OH (**Método 1, secção 3.2**).

Os isómeros isolados foram caracterizados de forma independente por espectroscopia de RMN, no entanto, não foram encontradas diferenças nos espectros de ^1H e ^{13}C . O facto dos isómeros não serem distinguíveis por RMN pode ser devido à sobreposição ocasional dos sinais, já que é previsível que apresentem desvios químicos muito semelhantes. De referir que os isómeros não se interconvertem mesmo após 5 dias em solução aquosa, como relevaram os cromatogramas analíticos obtidos por RP-HPLC.

Os complexos **Re1** - **Re5** foram obtidos com elevada pureza (> 95 %) na forma de óleos transparentes, solúveis em H_2O e em solventes polares, e insolúveis em solventes halogenados. A sua caracterização foi realizada por espectroscopia de IV (apenas para os complexos **Re2** e **Re3**), espectroscopia de RMN (^1H , ^{13}C) e por espectrometria de massa (ESI-MS). Os dados espectroscópicos de IV e RMN, juntamente com a análise dos espectros de massa, estão de acordo com as formulações propostas para todos os complexos.

A característica mais importante dos espectros de IV dos complexos **Re2** e **Re3** é a presença de duas bandas de intensidade muito forte na região entre 2100 – 1900 cm^{-1} , atribuíveis à vibração de extensão dos ligandos CO da unidade *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ (Figura 2.25). Estas bandas aparecem desviadas para frequências superiores relativamente ao precursor de partida $(\text{NEt}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$, o que é indicativo da coordenação dos conjugados ao centro metálico. Este efeito está exemplificado na Figura 2.25, onde se evidencia o desvio das bandas de vibração de extensão $\nu(\text{CO})$ dos complexos **Re2** (2029 e 1915 cm^{-1}) e **Re3** (2028 e 1911 cm^{-1}), por comparação com o precursor $(\text{NEt}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ (1998 e 1853 cm^{-1}).

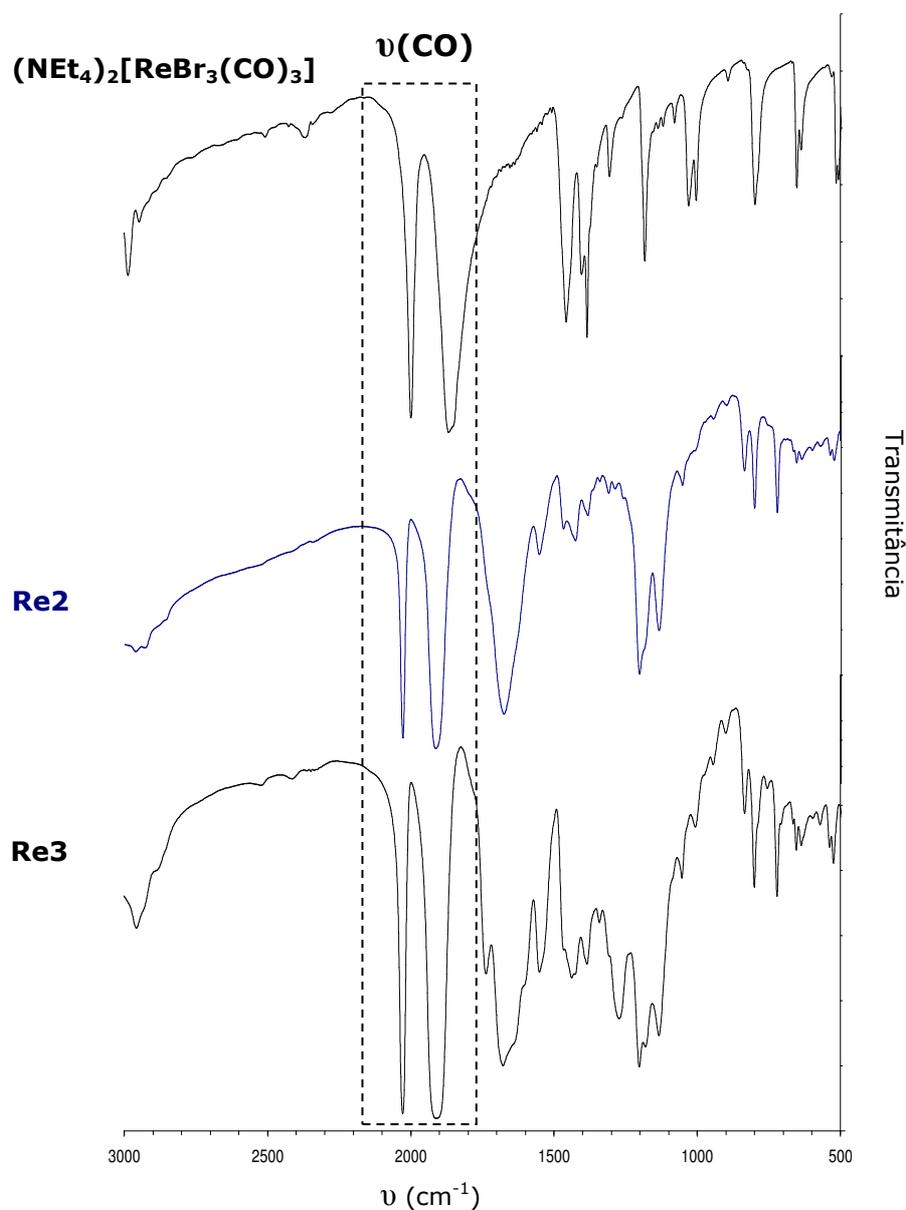


Figura 2.25: Espectros de IV do precursor $(\text{NEt}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ e dos complexos **Re2** e **Re3**, onde se destacam as bandas de vibração de extensão $\nu(\text{CO})$ (KBr).

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos complexos **Re1** – **Re5** com a atribuição dos respectivos sinais são apresentados nas Tabelas 2.2 e 2.3, respectivamente.

Tabela 2.2: Dados de RMN de ^1H dos complexos **Re1** – **Re5** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

	δ (^1H)					Multiplicidade
	Re1	Re2	Re3	Re4	Re5	
a	4,33	4,30	4,31	4,33	4,32	m largo, 1H
a'	4,04	4,02	4,04	4,00	4,04	m largo, 1H
b	3,28	3,24	3,25	3,23	3,26	m largo, 1H
b'	2,55	2,52	2,53	2,49	2,54	t largo, 1H
c						
c'	2,70	2,69	2,71	2,70	2,73	m largo, 2H
d	3,02	3,03	3,01	3,00	3,05	m largo, 1H
d'	2,37	2,31	2,34	2,30	2,35	m largo, 1H
e						
e'	2,25	2,23	2,25	2,24	2,24	2H* (sobreposição com $\text{CH}_3(3/5)\text{pz}$)
f	2,05	2,02	2,03	2,05	2,03	m, 1H
f'	1,90	1,89	1,90	1,90	1,90	m, 1H
g	3,46	3,45	3,45	3,44	3,47	t largo, 1H
g'	3,28	3,24	3,25	3,23	3,26	m largo, 1H
h	4,26	4,22	4,26	4,25	4,21	m largo, 1H
i	1,75	1,77	1,76	1,75	1,74	m, 1H
i'	1,59	1,62	1,61	1,65	1,62	m, 1H
j	1,50	1,53	1,55	1,58	1,51	m, 2H
k	3,02	3,03	3,12	3,12	3,05	t largo, 2H
OCH_3	3,59	-	3,59	-	-	s, 3H
NCH_3 ($\text{N}^\omega\text{-CH}_3\text{-L-ArgOH}$)	-	-	-	-	2,63	s, 3H
NH_2	5,07 3,66	5,03 3,62	5,02 3,61	5,06 3,63	5,03 3,67	s largo, 1H s largo, 1H
H(4)pz	6,00	5,98	6,00	5,98	6,00	s, 1H
$\text{CH}_3(3/5)\text{pz}$	2,24 2,13	2,21 2,11	2,23 2,12	2,21 2,11	2,24 2,13	s, 3H

- Re1** - R = H, $\text{R}_1 = \text{CH}_3$
Re2 - R = H, $\text{R}_1 = \text{H}$
Re3 - R = NO_2 , $\text{R}_1 = \text{CH}_3$
Re4 - R = NO_2 , $\text{R}_1 = \text{H}$
Re5 - R = CH_3 , $\text{R}_1 = \text{H}$

Tabela 2.3: Dados de RMN de ^{13}C dos complexos **Re1** – **Re5** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

	δ (^{13}C)					
	Re1	Re2	Re3	Re4	Re5	
a	48,9	49,2	48,9	48,8	48,9	
b	54,6	54,6	54,6	54,3	54,3	
c	63,1	63,4	63,3	63,1	63,1	
d	44,0	44,4	44,2	44,1	44,2	
e	34,3	34,6	34,4	34,4	34,3	
f	22,1	22,4	22,2	22,1	22,1	
g	67,6	67,9	67,5	66,3	67,5	
h	54,8	54,8	54,8	54,5	54,7	
i	29,7	29,9	29,8	29,8	29,7	
j	26,7	27,0	26,3	26,3	26,8	
k	42,4	42,8	42,6	42,5	42,5	
l	159,3	159,0	161,0	160,8	160,0	
OCH_3	55,0	-	55,1	-	-	
NCH_3 ($\text{N}^\omega\text{-CH}_3\text{-L-ArgOH}$)	-	-	-	-	29,3	
$\text{C}(4)\text{pz}$	109,5	110,0	109,8	109,6	109,7	
$\text{C}(3/5)\text{pz}$	(-C-)	155,8	156,0	155,7	155,6	155,7
		146,3	146,5	146,2	146,1	146,2
	(- CH_3)	17,5	17,6	17,3	17,2	17,3
		13,0	13,1	12,9	12,7	12,8
$\text{C}=\text{O}$	177,6; 176,3	177,6; 176,4	177,6; 176,2	177,3*	177,6*	
$\text{C}\equiv\text{O}$	3 x ~ 196,2	3 x ~ 196,4	3 x ~ 196,1	3 x ~ 196,5	3 x ~ 195,6	

* Embora fossem esperados dois sinais para os grupos carboxilato e amida, observou-se apenas um sinal na zona dos grupos $\text{C}=\text{O}$.

Tal como seria de esperar, o padrão dos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN dos complexos são semelhantes entre si, com desvios químicos praticamente sobreponíveis, tal como se pode concluir por análise dos resultados compilados nas tabelas.

A atribuição inequívoca dos sinais de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foi efectuada por intermédio de experiências bidimensionais de ^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HSQC obtidas para os complexos **Re2** e **Re3**. Na figura 2.26 é apresentado o espectro de ^1H - ^1H COSY do

complexo **Re2** utilizado como modelo para caracterização dos restantes complexos de rênio.

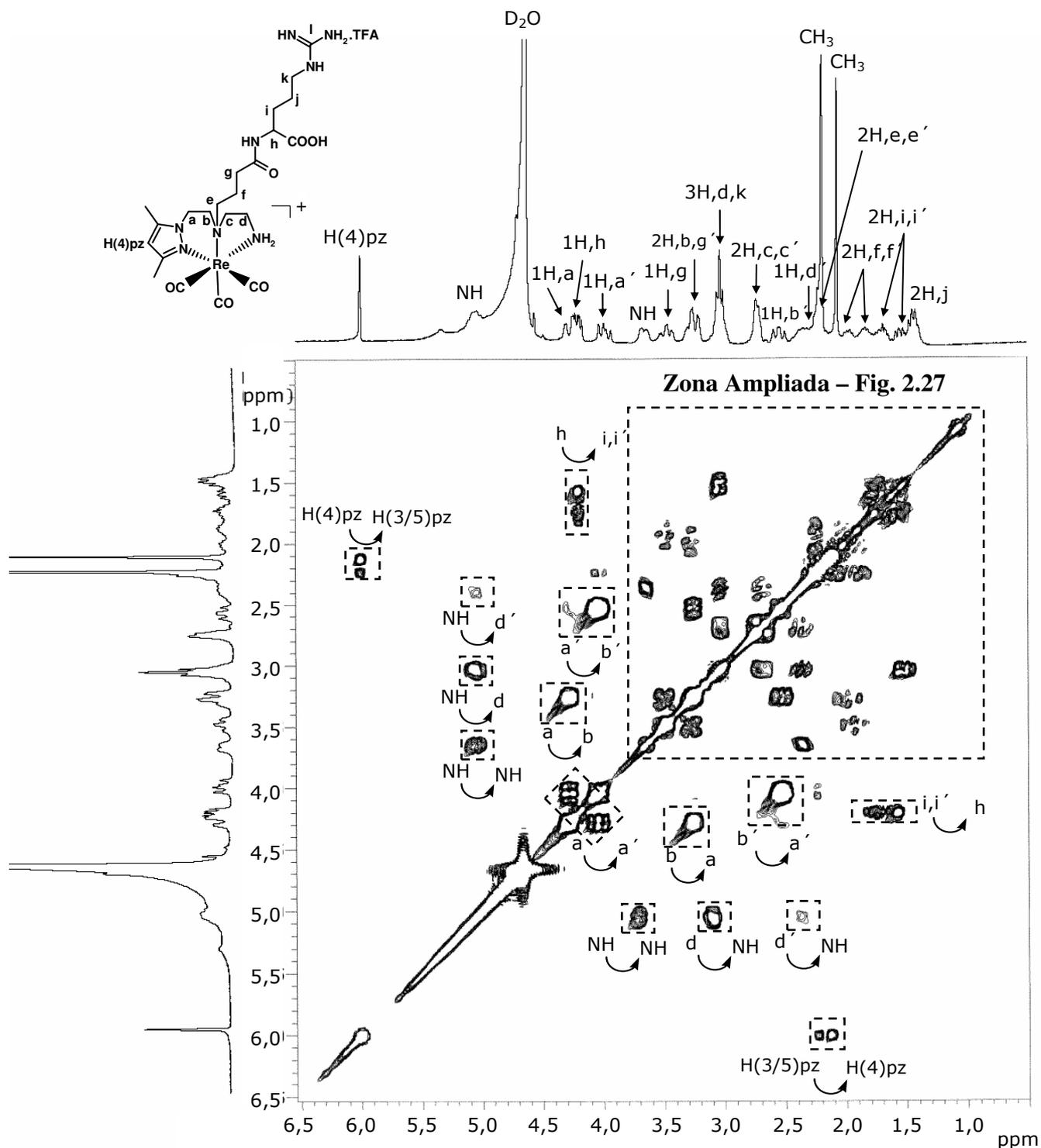


Figura 2.26: Espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo **Re2** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

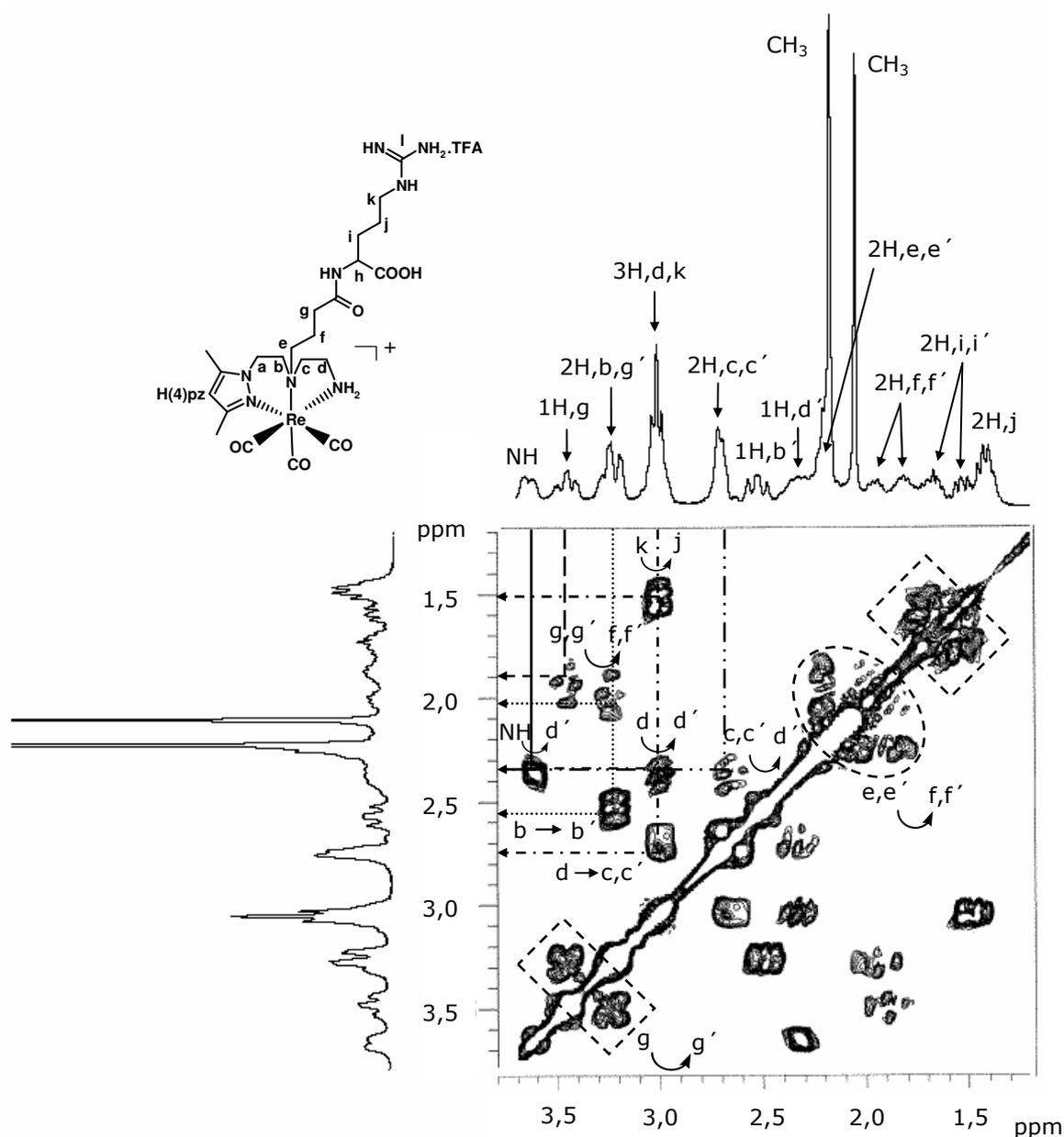


Figura 2.27: Ampliação do espectro de ^1H - ^1H COSY do complexo **Re2** na zona δ 3,8 – 1,2.

Uma vez que a atribuição completa dos sinais de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foi já apresentada quer nas Tabelas 2.2 e 2.3, quer no espectro das Figuras 2.26 e 2.27, seguidamente faz-se apenas uma descrição sumária das correlações consideradas mais relevantes para a identificação estrutural dos complexos.

No espectro do complexo **Re2** observam-se três singletos atribuídos ao H(4)pz ($\delta \sim 6,00$) e aos grupos metilo 3 e 5 do anel pirazolo ($\delta \sim 2,22$ e $2,12$) da unidade quelante pirazolo-diamina.

A presença de 5 pares de multipletos (**a - a'**, **b - b'**, **d - d'**, **f - f'**, **g - g'**), integrando cada um deles para um protão é compatível com a coordenação tridentada da unidade quelante pirazolo-diamina ao centro metálico *fac*-[Re(CO)₃]⁺. De facto, após coordenação, a maior parte dos protões metilénicos do ligando bifuncional tornam-se magneticamente não equivalentes, originando um padrão diastereotópico muito semelhante ao descrito anteriormente para outros complexos da mesma família contendo a mesma unidade quelante. Este perfil é consistente com o modo de coordenação tridentado, através dos átomos doadores *N,N,N*, tendo sido inequivocamente identificado e caracterizado por cristalografia de raios-X [62].

No espectro surgem também dois sinais largos, atribuídos aos protões da amina primária NH₂ ($\delta \sim 5,03$ e $3,62$), também diastereotópicos, e que estão correlacionados com os sinais dos protões vicinais H^d ($\delta 3,03$) e H^{d'} ($\delta 2,31$).

Os sinais correspondentes aos protões da L-ArgOH apresentam multiplicidades e desvios químicos semelhantes aos encontrados no conjugado livre **2**, confirmando mais uma vez que, apesar de possuir grupos potencialmente coordenantes, estes não estão envolvidos na ligação ao centro metálico.

No espectro de ¹H-¹³C HSQC, apresentado na Figura 2.28, estão representadas as correlações ¹H-¹³C obtidas para o complexo **Re2**. A característica mais importante a realçar neste espectro é a correlação dos protões diastereotópicos geminais com o respectivo carbono (e.g. H^a, $\delta 4,30$ /H^{a'}, $\delta 4,02 \Rightarrow$ C^a, $\delta 49,2$).

O sinal a $\delta 110,0$ foi atribuído ao carbono C(4) do anel pirazolo devido à correlação observada com o H(4)pz ($\delta 5,98$). A campo mais alto, encontram-se 11 sinais ($\delta 67,9$ - C^g, $63,4$ - C^c, $54,8$ - C^b, $54,6$ - C^h, $49,2$ - C^a, $44,4$ - C^d, $42,8$ - C^k, $34,6$ - C^e, $29,9$ - Cⁱ, $27,0$ - C^j, $22,4$ - C^f) atribuídos aos carbonos alifáticos da unidade quelante e da L-ArgOH. Os sinais a $\delta 13,1$ e $17,6$ atribuíram-se aos grupos metilo 3 e 5 do anel pirazolo.

No espectro de RMN de ¹³C do complexo **Re2** foi ainda possível observar os restantes sinais, nomeadamente os sinais dos grupos C=O ($\delta 177,6$ e $176,4$), carbono do grupo guanidina (C^h, $\delta 159,0$) e anel pirazolo ($\delta 156,0$ e $146,5$)(Tabela 2.3). A campo mais baixo, foram também identificados os sinais dos ligandos carbonilo (C=O, $\delta \sim 196,4$) coordenados facialmente ao rénio.

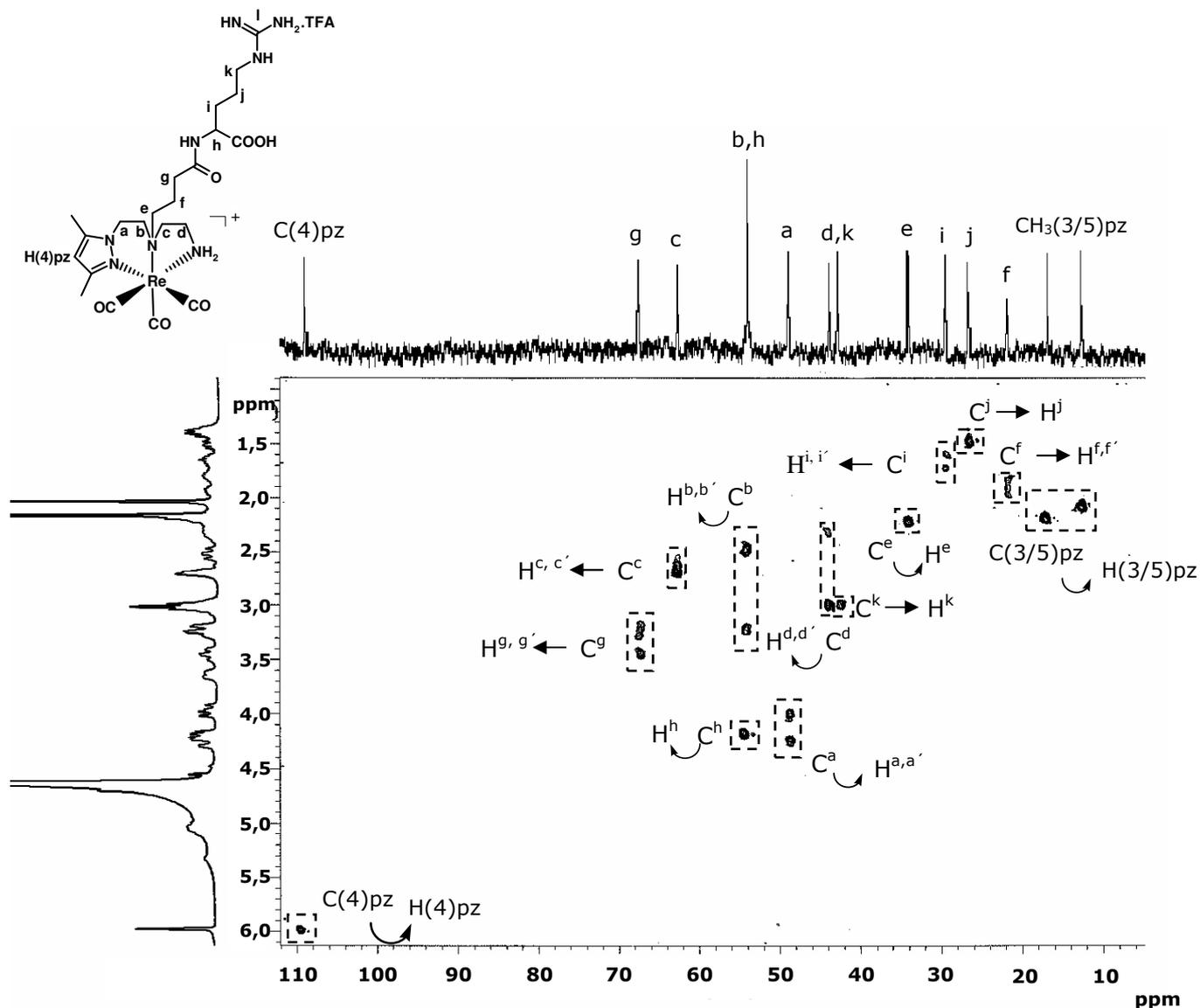


Figura 2.28: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC do complexo **Re2** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

Uma outra característica geral observada em todos os espectros de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN dos complexos relaciona-se com um desvio para campo mais baixo de alguns sinais, relativamente aos conjugados não coordenados. A título de exemplo, apresentam-se na Figura 2.29 os espectros de ^1H -RMN do conjugado **3** e do respectivo complexo de Re (**Re3**). Como se pode verificar, o protão H(4)pz do anel pirazolo de **Re3** (δ 6,00) encontra-se desviado ($\Delta = 0,19$ ppm) para campo mais baixo, relativamente ao desvio do mesmo sinal no conjugado livre ($\delta \sim 5,81$).

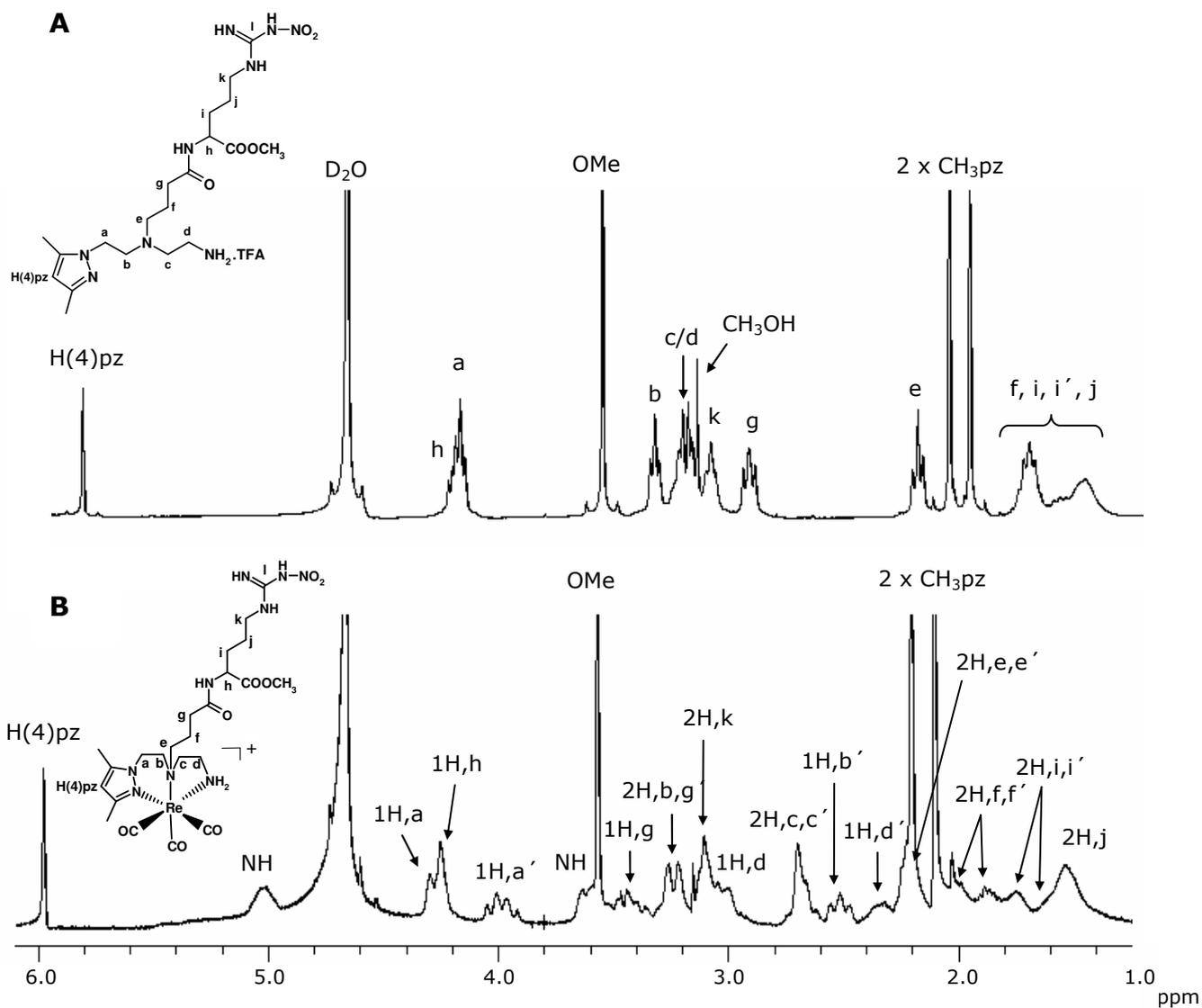


Figura 2.29: Espectros de ¹H-RMN do conjugado **3** (A) e do complexo **Re3** (B).

Nas Figuras 2.30 e 2.31 apresentam-se, respectivamente, os espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN do complexo **Re5**.

O padrão dos espectros de RMN é idêntico ao descrito anteriormente, permitindo a atribuição de todos os sinais observados.

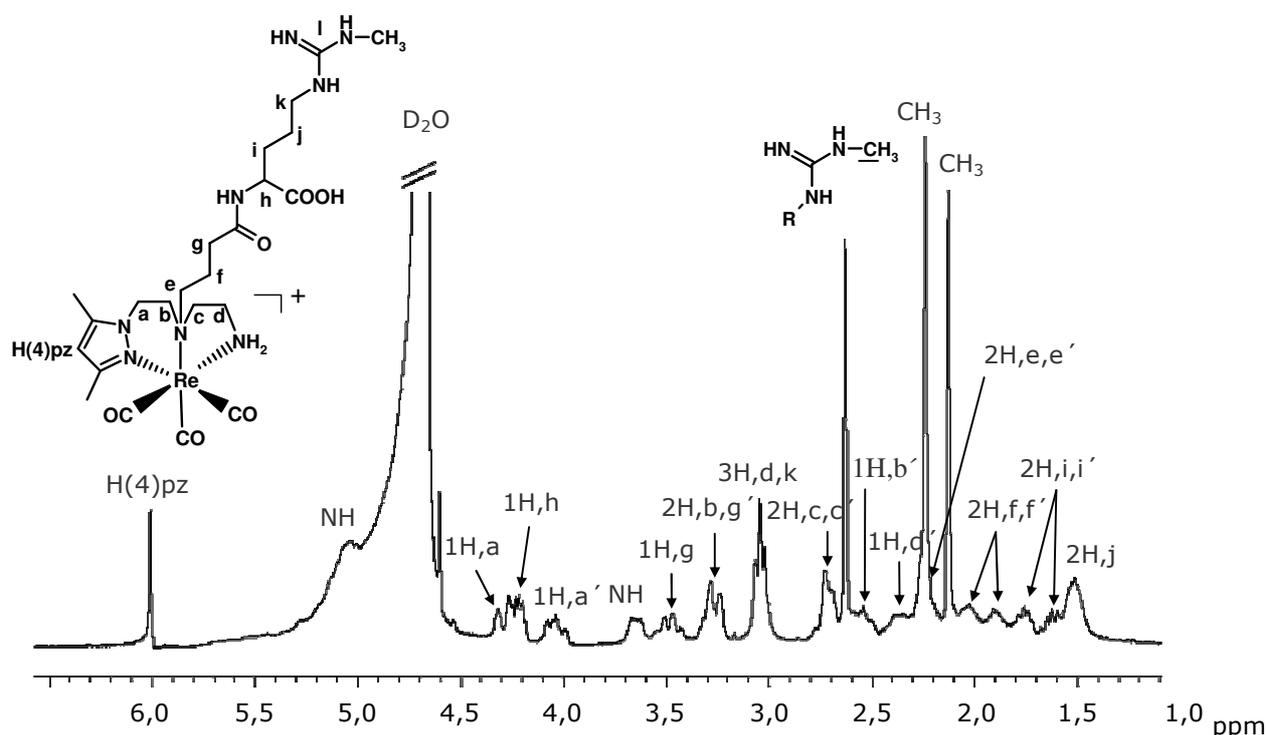


Figura 2.30: Espectro de ^1H -RMN do complexo **Re5** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

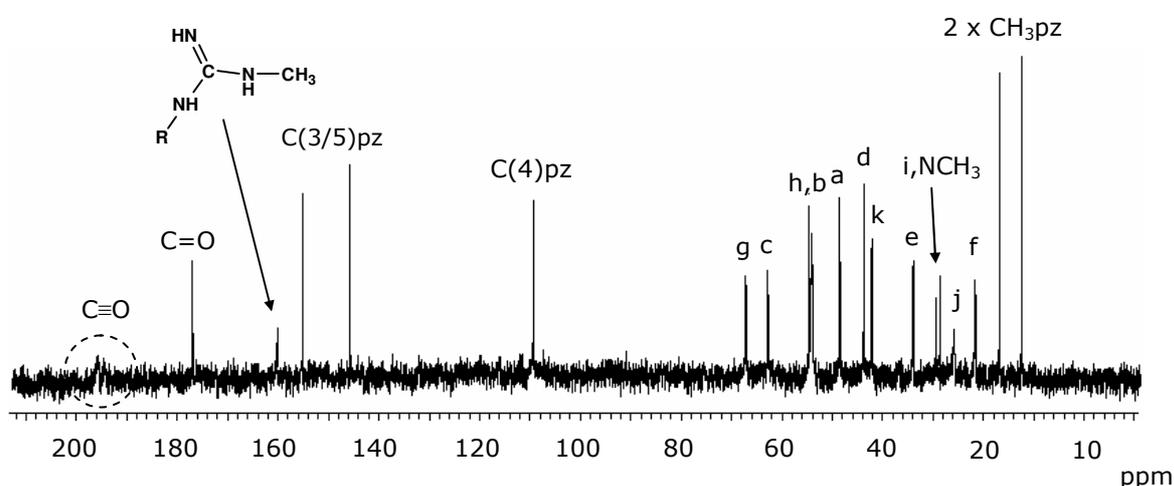


Figura 2.31: Espectro de ^{13}C -RMN do complexo **Re5** e respectivas atribuições dos sinais (D_2O).

No espectro de ^1H -RMN o singuleto a δ 2,63, correspondente ao grupo metilo da guanidina, aparece a um desvio igual ao encontrado para o conjugado livre (**5**, δ 2,63). O espectro de ^{13}C -RMN apresentou 19 carbonos, sendo dois deles (δ 160,0 e 29,3) referentes ao carbono central e ao grupo metilo da guanidina.

A espectrometria de massa confirmou a formulação proposta para os complexos de rénio, sendo as razões m/z calculadas e observadas coincidentes. A título de exemplo, apresenta-se na Figura 2.32 o espectro de massa do complexo **Re3**.

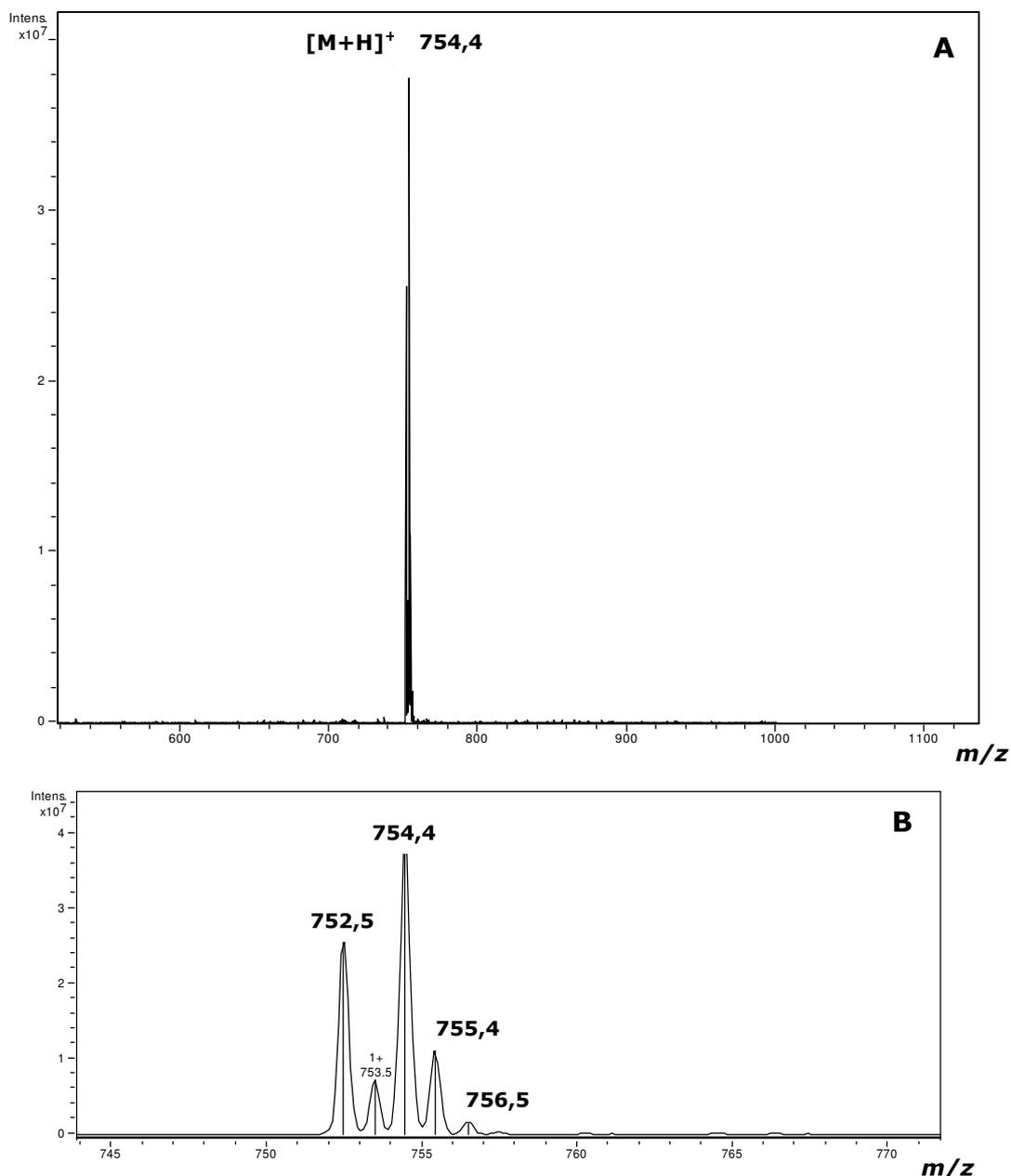


Figura 2.32: (A) Espectro de massa no modo positivo do complexo **Re3** obtido por ionização por electrospray; (B) expansão do pico correspondente a $[M+H]^+$.

O espectro ESI-MS do complexo **Re3** apresenta um padrão típico dos complexos de rénio devido à abundância natural do ^{185}Re e ^{187}Re , com um pico a $m/z = 752$ ($[M+H]^+$) e $m/z = 754$ ($[M+H]^+$) correspondente a $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_9\text{O}_8\text{Re}$.

2.4 – SÍNTESE RADIOQUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS $fac-[^{99m}Tc(k^3-L)(CO)_3]^+$ (L = 1 - 6)

Os complexos organometálicos de $^{99m}Tc1$ - $^{99m}Tc6$ foram preparados por reacção dos conjugados **1** - **6** com uma solução contendo o precursor $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ (Figura 2.33).

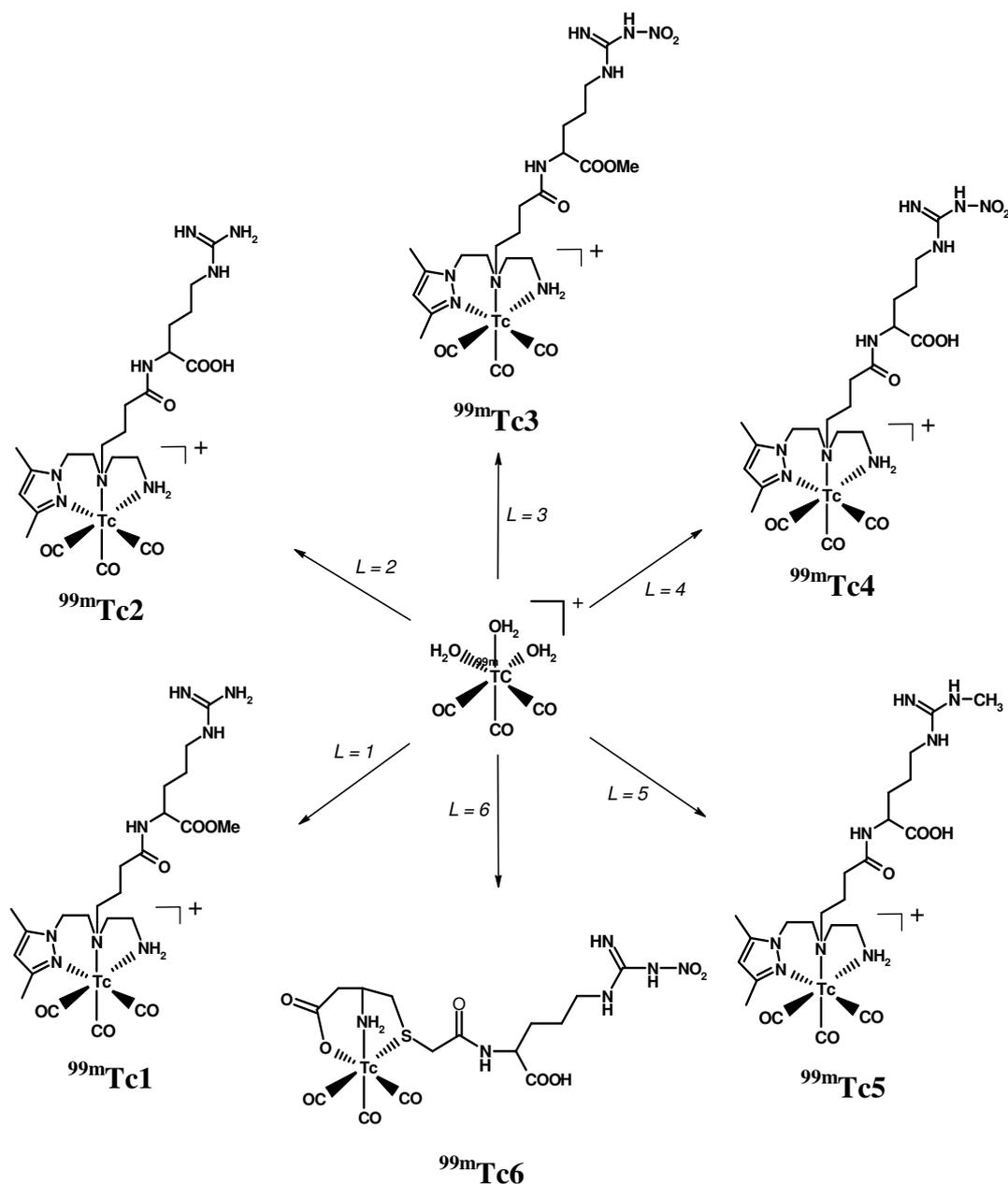


Figura 2.33: Complexos radioactivos $^{99m}Tc1$ - $^{99m}Tc6$.

O aquo-complexo $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ foi obtido quantitativamente por adição de uma solução de $Na[^{99m}TcO_4]$ a um Kit *Isolink*[®], seguido de aquecimento a 100 °C durante 30 minutos. Após arrefecimento, ajustou-se o pH da reacção (~ 7,4) com uma

solução de HCl 1N e diluiu-se com soro fisiológico (NaCl 0,9 %) ou tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4). A pureza radioquímica do precursor foi controlada por RP-HPLC analítico (Figura 2.34).

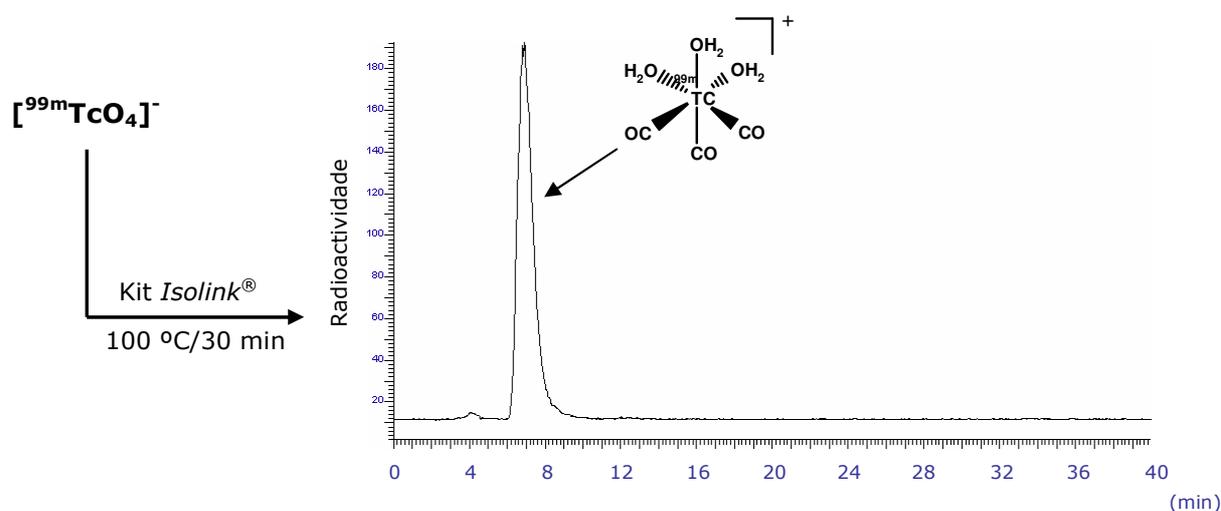


Figura 2.34: Preparação do precursor $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e respectivo cromatograma analítico (coluna Nucleosil C18, 100 - 5 μm , **Método 1, secção 3.2**, detecção γ).

As condições reaccionais de obtenção dos complexos $^{99m}\text{Tc1}$ - $^{99m}\text{Tc6}$ foram optimizadas em termos de concentração final de conjugado ($[\text{L}]$), tipo de meio reaccional (NaCl 0,9 % ou tampão fosfato pH 7,4), pH, temperatura e tempo de reacção (**secção 3.5.2**).

O complexo $^{99m}\text{Tc1}$ foi sempre obtido com rendimentos negligenciáveis (< 2 %), uma vez que em todas as condições testadas se verificou hidrólise da função éster do conjugado **1** e a obtenção directa do complexo $^{99m}\text{Tc2}$. Nas condições mais drásticas utilizadas (30 min/100 °C, NaCl 0,9 %, pH 7,4, $[\text{L}] = 5 \times 10^{-5}$ M) observou-se a formação do complexo $^{99m}\text{Tc2}$ num rendimento superior a 97 %. A diminuição da temperatura (50 e 37 °C) e do pH (pH 3 - 4) levou a um decréscimo acentuado no rendimento total de reacção (< 5 %), ocorrendo também a hidrólise da função éster com formação do composto $^{99m}\text{Tc2}$.

O complexo $^{99m}\text{Tc2}$ foi também obtido com rendimentos elevados (~ 95 %) por reacção directa do conjugado **2** com o aquo-complexo $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, utilizando concentrações finais de ligando entre 1×10^{-4} M e 5×10^{-5} M (30 min/100 °C, NaCl 0,9 %, pH 7,4). Quando se tentou aumentar a actividade específica, baixando-se a concentração final de ligando ($[\text{L}] = 1 \times 10^{-5}$ M) e mantendo-se as condições reaccionais acima referidas, o complexo foi obtido em rendimento inferior (~ 57 %).

2. Resultados e discussão

Quando se fez reagir o conjugado **3**, em diferentes condições reaccionais, com o precursor $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$, para além do composto pretendido ($^{99m}Tc3$), obteve-se também, na maioria dos casos, o complexo $^{99m}Tc4$ resultante da hidrólise parcial da função éster (Tabela 2.4, Figura 2.35).

Tabela 2.4: Condições experimentais, rendimentos de reacção e tempos de retenção dos complexos $^{99m}Tc3$ / $^{99m}Tc4$

Entrada	Rendimento (%)		[L] (M)	tempo (min)	Temp. (°C)	pH	t. retenção (min)	
	$^{99m}Tc3$ (éster)	$^{99m}Tc4$ (ácido)					$^{99m}Tc3$ (éster)	$^{99m}Tc4$ (ácido)
1	21,38	-			100	4 - 5 (NaCl 0,9 %)		
2	29,83	5,80			75	7,4		
3	17,15	80,60	5×10^{-5}	30	100	(tampão fosfato 0,2 M pH 7,4)	29,2	27,6
4	5,03	87,03			100	7,0 - 7,4 (NaCl 0,9 %)		

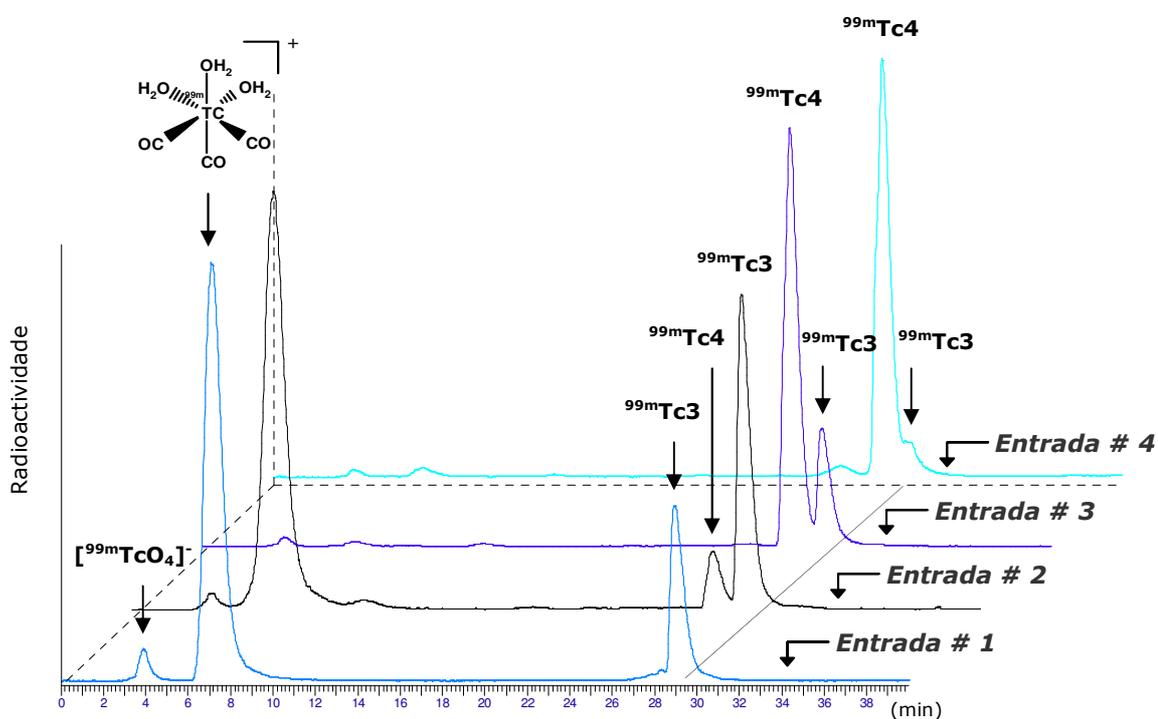


Figura 2.35: Cromatogramas de RP-HPLC das misturas obtidas após reacção do conjugado **3** com o precursor $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$, utilizando as condições reaccionais apresentadas na Tabela 2.4 (coluna Nucleosil C18, 100 - 5 μ m, **Método 1**, **secção 3.2**, detecção γ).

A pH ácido (**Entrada 1**) conseguiu-se evitar a hidrólise da função éster, no entanto, o complexo $^{99m}\text{Tc}3$ foi obtido com baixo rendimento (21,4 %). Quando se alcalinizou o meio reaccional (pH 7,4 - **Entradas 2 - 4**) o rendimento geral da reacção aumentou, no entanto, observou-se a hidrólise parcial do éster.

O complexo $^{99m}\text{Tc}4$ foi obtido com bom rendimento ($\sim 87\%$) por reacção directa do conjugado **4** com o aquo-complexo $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, utilizando uma concentração final de ligando de 6×10^{-5} M (30 min/100 °C, tampão fosfato 0,2 M pH 7,4). Quando a reacção foi realizada nas mesmas condições mas em soro fisiológico (NaCl 0,9 %, pH $\sim 7,4$) o rendimento obtido foi inferior ($\sim 77\%$).

O complexo $^{99m}\text{Tc}5$ foi obtido com um rendimento elevado ($\sim 94\%$) utilizando uma concentração final de conjugado de 5×10^{-5} M (45 min/100 °C, NaCl 0,9%, pH 7,4).

A reacção do precursor $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com o conjugado **6** conduz à formação de um complexo de ^{99m}Tc com elevado rendimento (94 %) e elevada actividade específica ($[L] = 5 \times 10^{-5}$, **reacção 3**, Figura 2.36).

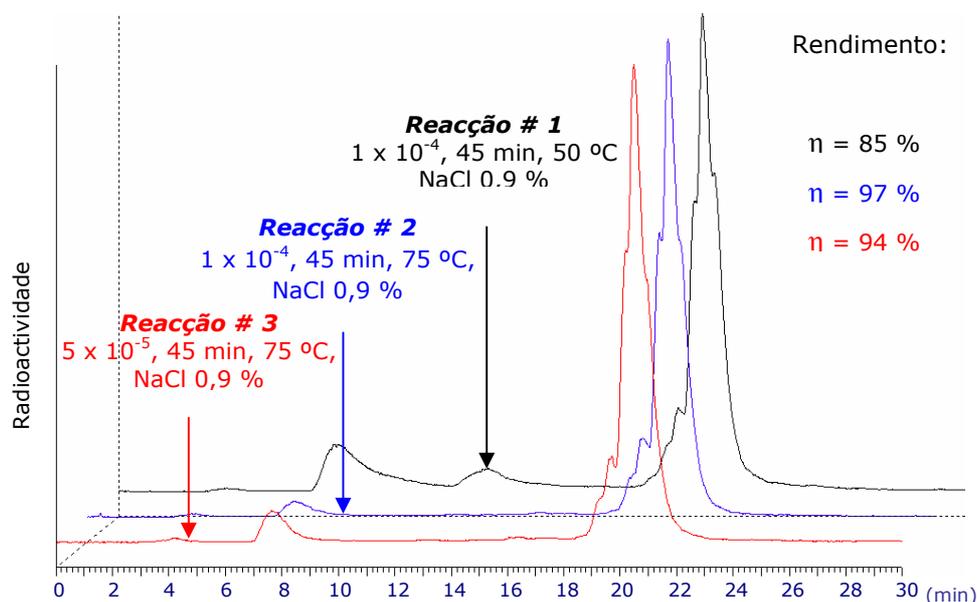


Figura 2.36: Cromatogramas de RP-HPLC das misturas obtidas após reacção do conjugado **6** com o precursor $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (coluna Nucleosil C18, 100 - 5 μm , **Método 2**, **secção 3.2**, detecção γ).

De realçar que nas condições reaccionais testadas se observou sempre a formação de um pico de RP-HPLC largo e assimétrico, que parece corresponder a uma

mistura de diferentes espécies radioquímicas com tempos de retenção semelhantes ($t_R = \sim 21$ min, Figura 2.36). Este comportamento poderá ser justificado com base na formação de diferentes isómeros devido à presença de um centro proquiral (S-tioéter) e de dois centros quirais (carbonos α da N^ω -NO₂-L-ArgOH e cisteína) no conjugado **6** [54, 104, 105]. Para além disso, o facto de na N^ω -NO₂-L-ArgOH existirem átomos doadores capazes de se coordenarem ao centro metálico (e.g. α -COOH), leva a supor que o complexo $^{99m}\text{Tc6}$ não deve ser a única espécie radioquímica que se forma ao nível de ^{99m}Tc . Apesar dos esforços desenvolvidos não foi possível preparar o complexo análogo de Re(I), pelo que nada se pode concluir acerca da identidade das espécies radioquímicas de ^{99m}Tc formadas.

A caracterização/identificação dos complexos $^{99m}\text{Tc1}$ - $^{99m}\text{Tc5}$ foi efectuada comparando os seus perfis cromatográficos (detecção γ) com os dos complexos análogos **Re1** - **Re5** (detecção UV), isolados e caracterizados macroscopicamente. Na Tabela 2.5 apresentam-se os tempos de retenção dos complexos de ^{99m}Tc e dos respectivos análogos de Re.

Tabela 2.5: Tempos de retenção de RP-HPLC para os complexos organometálicos de ^{99m}Tc e Re.

Conjugado	Tempo de retenção – RP-HPLC (min)	
	Re	^{99m}Tc
1	Re1 – 26,9	$^{99m}\text{Tc1}$ – 29,1
2	Re2 – 25,2	$^{99m}\text{Tc2}$ – 26,6
3	Re3 – 29,8	$^{99m}\text{Tc3}$ – 29,2
4	Re4 – 27,3	$^{99m}\text{Tc4}$ – 27,4
5	Re5 – 26,0	$^{99m}\text{Tc5}$ – 26,4

A título de exemplo, apresentam-se na Figura 2.37 os cromatogramas dos complexos **Re2** e $^{99m}\text{Tc2}$.

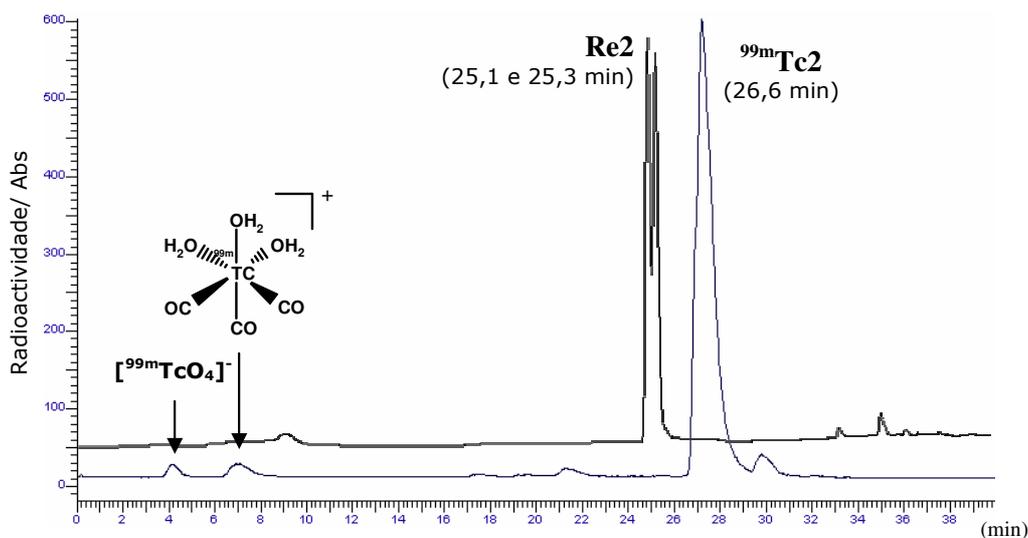


Figura 2.37: Cromatogramas analíticos de RP-HPLC dos complexos **Re2** (detecção UV-254 nm) e $^{99m}\text{Tc2}$ (detecção γ)(coluna Nucleosil C18, 100 - 5 μm , **Método 2, secção 3.2**).

Como se pode observar nos cromatogramas apresentados, os dois complexos têm tempos de retenção semelhantes (**Re2**, $\sim 25,2$ min; $^{99m}\text{Tc2}$, 26,6 min), o que leva a supor estarmos na presença de compostos análogos. As pequenas diferenças nos tempos de retenção dos complexos **Re2** e $^{99m}\text{Tc2}$ são devidas ao facto de o detector de UV, utilizado para detectar os complexos de Re, e o detector γ , utilizado para detectar os complexos de ^{99m}Tc , estarem montados em série, impossibilitando a detecção simultânea dos dois complexos.

Ao contrário do que se passa com os complexos **Re2**, **Re4** e **Re5** nos complexos análogos de ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc2}$, $^{99m}\text{Tc4}$ e $^{99m}\text{Tc5}$) apenas se observa a presença de um pico bem definido para cada complexo, o que sugere a formação de um único isómero ou de 2 isómeros com tempos de retenção idênticos.

2.4.1 – Avaliação da lipofilia dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$, $^{99m}\text{Tc}4$, $^{99m}\text{Tc}5$ e $^{99m}\text{Tc}6$

A lipofilia é uma propriedade geral de fármacos e radiofármacos que influencia significativamente a sua farmacocinética e propriedades biológicas. Um dos parâmetros mais correntemente utilizados para a sua quantificação é o coeficiente de partição n-octanol/água ($P_{o/w}$), expresso em termos de $\log P_{o/w}$.

Tendo em consideração que os complexos $^{99m}\text{Tc}1$ e $^{99m}\text{Tc}3$ sofrem hidrólise da função éster nas condições de reacção utilizadas, levando à formação *in situ* dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$ e $^{99m}\text{Tc}4$, respectivamente, determinaram-se os valores de $\log P_{o/w}$ apenas para os complexos $^{99m}\text{Tc}2$, $^{99m}\text{Tc}4$, $^{99m}\text{Tc}5$ e $^{99m}\text{Tc}6$, de acordo com o método descrito na **secção 3.6** (Tabela 2.6).

Tabela 2.6: Valores de lipofilia ($\log P_{o/w}$) dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$, $^{99m}\text{Tc}4$, $^{99m}\text{Tc}5$ e $^{99m}\text{Tc}6$.

Complexo	$\log P_{o/w} \pm dp$
$^{99m}\text{Tc}2$	$-1,837 \pm 0,002$
$^{99m}\text{Tc}4$	$-1,409 \pm 0,008$
$^{99m}\text{Tc}5$	$-2,190 \pm 0,002$
$^{99m}\text{Tc}6$	$-2,045 \pm 0,003$

Os valores de $\log P_{o/w}$ negativos encontrados indicam que os complexos radioactivos são hidrofílicos, o que poderá determinar que, quando administrados, sejam eliminados essencialmente por via renal.

Os resultados obtidos permitem confirmar a influência das unidades quelantes nas características físicas e químicas dos respectivos complexos de ^{99m}Tc . De facto, a ligação do mesmo aminoácido ($\text{N}^{\omega}\text{-NO}_2\text{-L-ArgOH}$) às unidades quelantes pirazolo-diamina e cisteína leva à formação de complexos com lipofilias diferentes: $^{99m}\text{Tc}4$, $\log P_{o/w} = -1,409 \pm 0,008$ vs $^{99m}\text{Tc}6$, $\log P_{o/w} = -2,045 \pm 0,003$.

A maior hidrofília apresentada pelo complexo $^{99m}\text{Tc}6$ deve estar relacionada com o facto de o ligando bifuncional ser um dipéptido que, devido às suas características intrínsecas, apresenta um carácter hidrofílico acentuado.

2.5 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS

2.5.1 – Considerações gerais

A equação de **Michaelis-Menten (Eq1)** pode ser utilizada para analisar o comportamento cinético da maioria dos enzimas conhecidos, assumindo que a concentração do complexo **Enzima-Substrato** ($\mathbf{E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P}$) se mantém aproximadamente invariável no intervalo de tempo em que a velocidade inicial está a ser medida (*estado estacionário*) e que apenas se varia a concentração de um único substrato.

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq 1})$$

v = Velocidade inicial.

V = Velocidade limite da reacção enzimática. $V = k_{\text{cat}} \cdot E_0$, em que E_0 é a concentração de enzima e k_{cat} o seu *turnover*.

K_m (constante de **Michaelis-Menten**) = Concentração de substrato ($[S]$) em que a velocidade da reacção é metade da velocidade limite.

Os parâmetros cinéticos V 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 em função de $[S]$ (Figura 2.38).

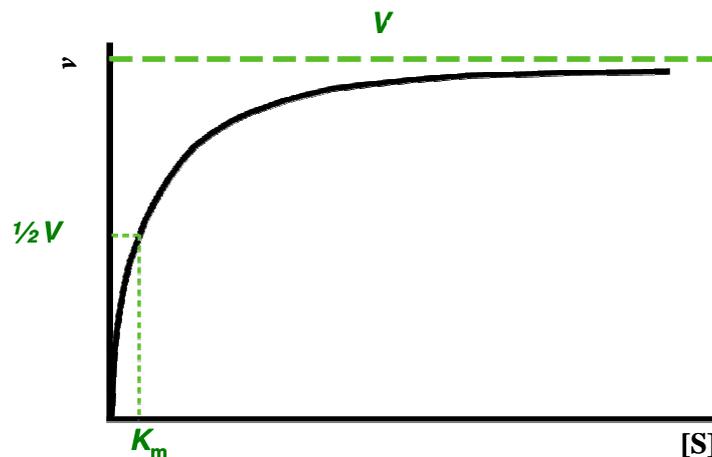


Figura 2.38: Dependência da velocidade inicial (v) da concentração do substrato ($[S]$), segundo o comportamento cinético de Michaelis-Menten.

Alternativamente, é possível determinar as constantes cinéticas recorrendo a formas linearizadas da equação de **Michaelis-Menten**. A sua principal utilidade está no diagnóstico de detalhes mecanísticos no caso de enzimas com vários substratos e na clarificação do modo de acção de inibidores. De entre os vários métodos de linearização existentes o mais utilizado é a representação de **Lineweaver-Burk**, de $1/v$ (y) em função de $1/[S]$ (x). Para além deste método, as representações de $[S]/v$ (y), em função de $[S]$ (x) (**Hanes-Woolf**), ou de v (y), em função de $v/[S]$ (x) (**Eadie-Hofstee**) têm sido frequentemente utilizadas, apresentando cada um desses métodos vantagens e desvantagens [108].

O método utilizado nesta tese para a determinação das constantes cinéticas foi o Método Directo de **Eisenthal** e **Cornish-Bowden**. Considerando um par de valores experimentais de $[S]_1$ (x_1) e v_1 (y_1), define-se uma recta que intersecta o eixo das abcissas em $-[S]_1$ e o das ordenadas em v_1 . Um segundo par de valores experimentais de $[S]_2$ (x_2) e v_2 (y_2) define uma outra recta que cruza a anterior num ponto cuja extrapolação nos eixos dos x e y , define os valores de K_m e V , respectivamente (Figura 2.39) [109 - 112].

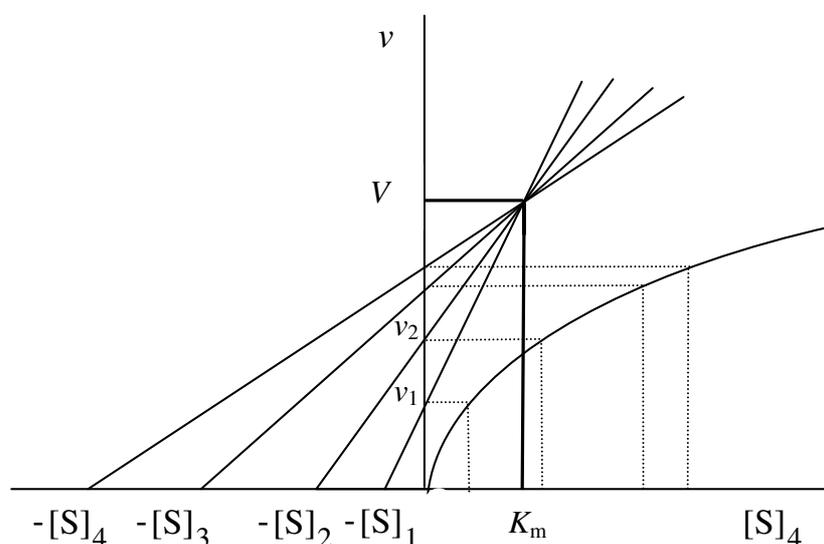


Figura 2.39: Método Directo de **Eisenthal** e **Cornish-Bowden** para determinação das constantes V e K_m .

A principal vantagem deste método não paramétrico é, ao contrário dos métodos de regressão linear, evitar a utilização de recíprocos (e.g. **Lineweaver-Burk**, $1/v$ vs $1/[S]$), minimizando-se de forma significativa a influência dos erros experimentais na

avaliação das constantes cinéticas. Para além disso, é um método estatisticamente robusto, sendo especialmente útil quando o número de ensaios é reduzido [109 - 112].

2.5.2 – Avaliação da actividade enzimática do iNOS na presença dos conjugados 2, 4 - 6 e dos complexos Re1 - Re5

De modo a avaliar em que medida a afinidade original dos substratos (L-ArgOMe/OH) e inibidores (N^{ω} -NO₂-L-ArgOMe/OH, N^{ω} -CH₃-L-ArgOH) para o óxido nítrico sintase é afectada pela sua ligação a uma unidade quelante e à unidade organometálica *fac*-[M(CO)₃]⁺ (M = Re, ^{99m}Tc), determinaram-se os parâmetros cinéticos (K_m , K_i) do iNOS na presença dos conjugados **2, 4 - 6** e dos complexos **Re1 - Re5**.

Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando o enzima iNOS recombinante de rato fornecido em tampão HEPES 25 mM pH 7,4 contendo 10 % glicerol e 8 μM de tetrahydrobiopterina (Sigma).

2.5.2.1 – Avaliação da actividade enzimática do iNOS na presença dos substratos 2, Re1 e Re2

Como referido no capítulo introdutório, o NO é produzido a partir da conversão da L-ArgOH em L-Cit, numa reacção enzimática catalisada pelo NOS que requer O₂ e NADPH. Os parâmetros cinéticos desta reacção podem ser determinados através de dois métodos principais: seguindo o aumento de absorvância a 401 e 421 nm associado à formação da metahemoglobina, obtida por reacção do NO com a oxihemoglobina, ou seguindo a formação da L-[¹⁴C]/[³H]Cit, utilizando L-[¹⁴C]/[³H]ArgOH como substrato. Outros métodos menos usuais descritos na literatura consistem na medição dos produtos de decomposição do NO (nitritos, NO₂⁻; nitratos, NO₃⁻) utilizando o reagente de Greiss ou na avaliação do consumo do NADPH, seguindo a reacção a 340 nm [113, 114].

A metodologia inicialmente escolhida para a determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS consistiu em seguir o decréscimo da absorvância a 340 nm, associado à oxidação do NADPH a NADP⁺ ($\epsilon_{340} \text{ NADPH} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Apesar deste método ser atractivo devido à sua simplicidade, os parâmetros cinéticos do iNOS obtidos na presença dos substratos L-ArgOH e L-ArgOMe não foram reprodutíveis (**secção 3.7.2**). A falta de reprodutibilidade deste método pode ser explicada pela sua baixa sensibilidade, na medida em que o NADPH em condições aeróbias e na presença de NO₂⁻ e NO₃⁻ (produtos de decomposição do NO) sofre processos de oxidação, não permitindo uma quantificação rigorosa do NO e L-Cit formados [114, 115].

Optou-se então por escolher o método de captura do NO pela oxihemoglobina, descrito por Hevel & Marletta [113]. A diferença significativa entre os coeficientes de absorvidade molar da oxihemoglobina e metahemoglobina a 401 e 421 nm ($\Delta\epsilon = 77,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) tornam este método mais sensível do que o método do NADPH anteriormente descrito [116]. Além disso, o facto da oxihemoglobina apresentar uma maior afinidade para o NO do que para o O_2 , minimizando-se a sua autooxidação, contribui decisivamente para a maior sensibilidade do método [114].

A oxihemoglobina foi preparada segundo o procedimento experimental apresentado na **secção 3.7.3.1** [115].

Após optimização das condições experimentais, nomeadamente da concentração de oxihemoglobina ($6 \mu\text{M}$) e da ordem de adição do enzima, o método de captura do NO pela oxihemoglobina permitiu a determinação rigorosa dos parâmetros cinéticos do iNOS. O modo como estes parâmetros foram determinados é exemplificado seguidamente, utilizando o substrato natural L-ArgOH. Na Figura 2.40 apresenta-se a curva de progresso da reacção de conversão da L-ArgOH ($150 \mu\text{M}$) em NO e L-Cit catalisada pelo iNOS (secção experimental **3.7.3.2**).

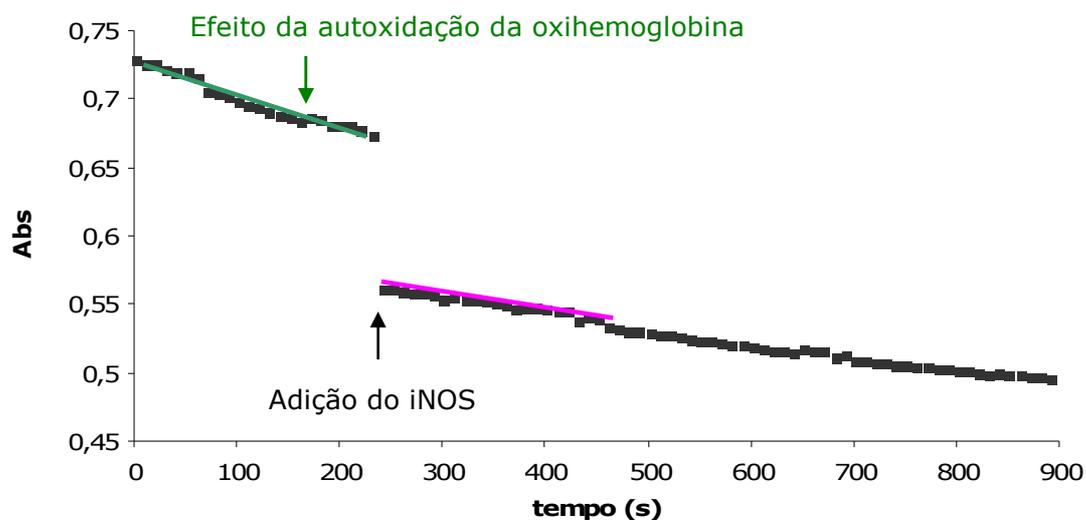


Figura 2.40: Curva de progresso da reacção de conversão da L-ArgOH ($150 \mu\text{M}$) em NO e L-Cit catalisada pelo iNOS. Reacção enzimática seguida espectrofotometricamente a 401 e 421 nm.

Calculando a diferença entre o declive da curva associada à autooxidação da oxihemoglobina e o declive da curva após adição do enzima obteve-se o valor da velocidade inicial (v) associado à conversão da L-ArgOH ($150 \mu\text{M}$) em NO e L-Cit.

Utilizando seis concentrações diferentes de L-ArgOH (5, 20, 35, 50, 150 e 250 μM) obtiveram-se seis curvas de progresso, com as quais foi possível calcular as correspondentes velocidades iniciais. De seguida, ajustou-se a equação de Michaelis-Menten a essas velocidades (Figura 2.41, **A**), sendo o K_m determinado através do Método Directo de **Eisenthal e Cornish-Bowden** (Figura 2.41, **B**), recorrendo-se ao programa *Hyper32* (J.S. Easterby, University of Liverpool, UK; <http://www.liv.ac.uk/~jse/software.html>) [108, 110 - 112].

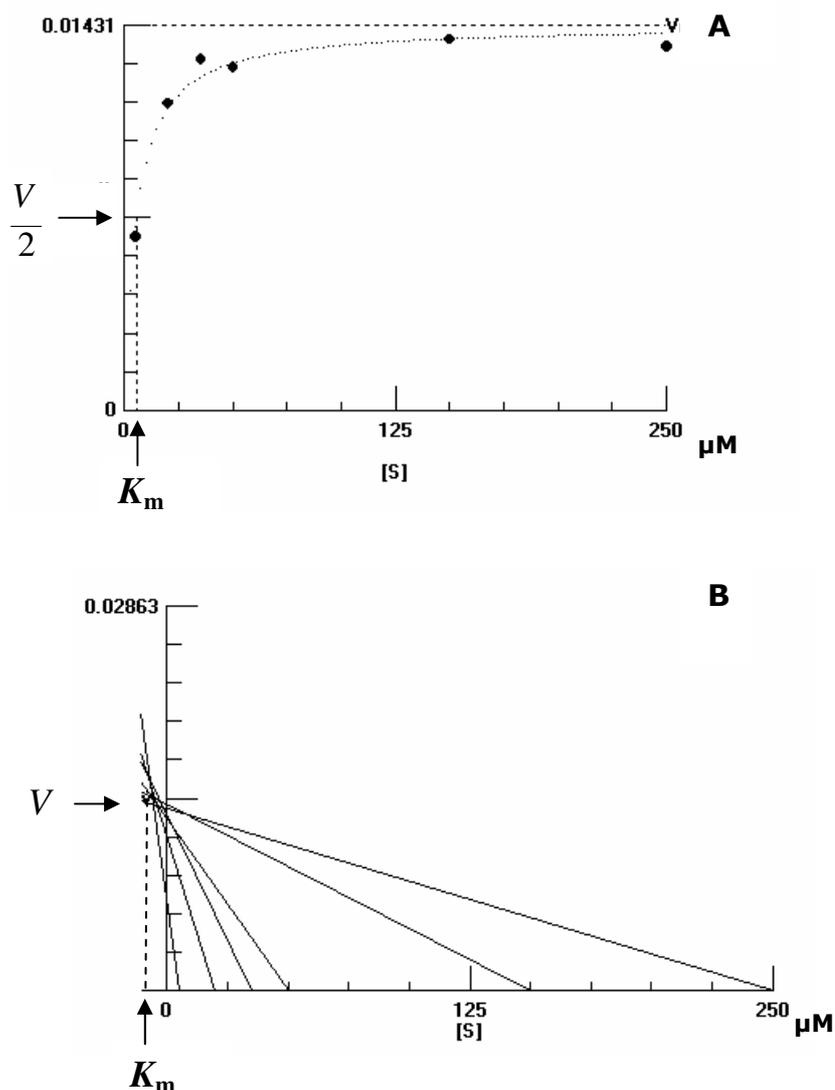


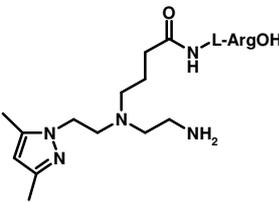
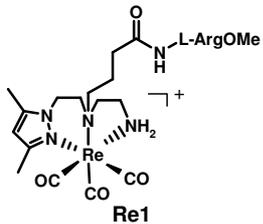
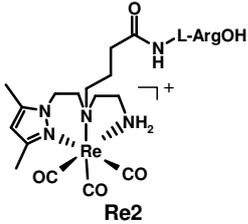
Figura 2.41: Representação gráfica da regressão hiperbólica (**A**) e do Método Directo de **Eisenthal e Cornish-Bowden** (**B**) para a determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença de L-ArgOH.

A regressão hiperbólica, representada na Figura 2.41 (**A**) mostra que o enzima pode ser analisado segundo uma cinética de Michaelis-Menten. Na figura 2.41 (**B**) as interacções pouco dispersas no segundo quadrante confirmam esta hipótese. O valor de

K_m do iNOS obtido na presença do seu substrato natural foi de 6 μM , encontrando-se dentro da gama de valores descritos na literatura (2 - 15 μM) [113].

Os valores de K_m do iNOS obtidos na presença dos compostos L-ArgOMe, **2**, **Re1** e **Re2**, avaliados como substratos do enzima (**secção 3.7.3.3**), são apresentados na Tabela 2.7.

Tabela 2.7: Valores de K_m do iNOS obtidos na presença dos substratos L-ArgOH, L-ArgOMe, **2**, **Re1**, **Re2**.

Composto	Método Directo
	K_m (μM)
L-ArgOH	6
L-ArgOMe	13
	57
	377
	245

Os resultados obtidos permitiram concluir que a afinidade dos aminoácidos L-ArgOH/L-ArgOMe para o enzima iNOS é negativamente afectada pela sua ligação à unidade quelante pirazolo-diamina, como se pode observar pelo aumento dos valores de K_m . Verificou-se ainda que os complexos **Re1** e **Re2** apresentam uma menor afinidade para o iNOS relativamente ao conjugado **2**. Este resultado poderá estar relacionado com problemas de impedimento estereoquímico que dificultam o acesso da unidade bioactiva "L-Arg" ao centro activo do enzima. O complexo **Re2**, contendo a função carboxílica, apresenta uma maior afinidade para o iNOS do que o complexo **Re1**. Esta tendência está de acordo com os parâmetros cinéticos obtidos para os aminoácidos L-ArgOH e L-

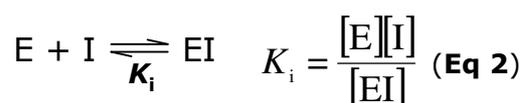
ArgOMe, evidenciando a importância do grupo carboxilato na interação por pontes de hidrogénio com o centro activo do enzima [74, 117].

De um modo geral, os resultados apresentados estão em concordância com estudos recentes que demonstraram que modificações estruturais efectuadas na α -NH₂ e no α -COOH da L-ArgOH levam a uma diminuição da actividade enzimática [118, 119].

Apesar dos valores de K_m serem moderados, os resultados obtidos apresentam alguma relevância na medida em que os compostos **Re1** e **Re2** são os primeiros complexos organometálicos testados como substratos do iNOS.

2.5.2.2 – Avaliação da cinética de inibição do iNOS na presença dos inibidores 4 – 6 e Re3 - Re5

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 2**).



O efeito inibitório dos compostos N^ω-NO₂-L-ArgOH, N^ω-CH₃-L-ArgOH, **4 – 6** e **Re3 - Re5** na actividade enzimática do iNOS foi avaliado calculando-se os valores de K_i a partir da equação de Michaelis-Menten, assumindo-se um mecanismo de inibição competitiva (**Eq 3**).

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

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 **4**. Numa primeira fase, determinaram-se as velocidades iniciais (v) da reacção enzimática utilizando diferentes concentrações de L-ArgOH (20, 50 e 150 μ M) a uma concentração fixa de inibidor (**4**, 150 μ M). O K_m^{app} do iNOS obtido na presença de **4**, determinado pelo Método Directo de **Eisenthal** e **Cornish-Bowden** (Figura 2.42), foi de 12 μ M.

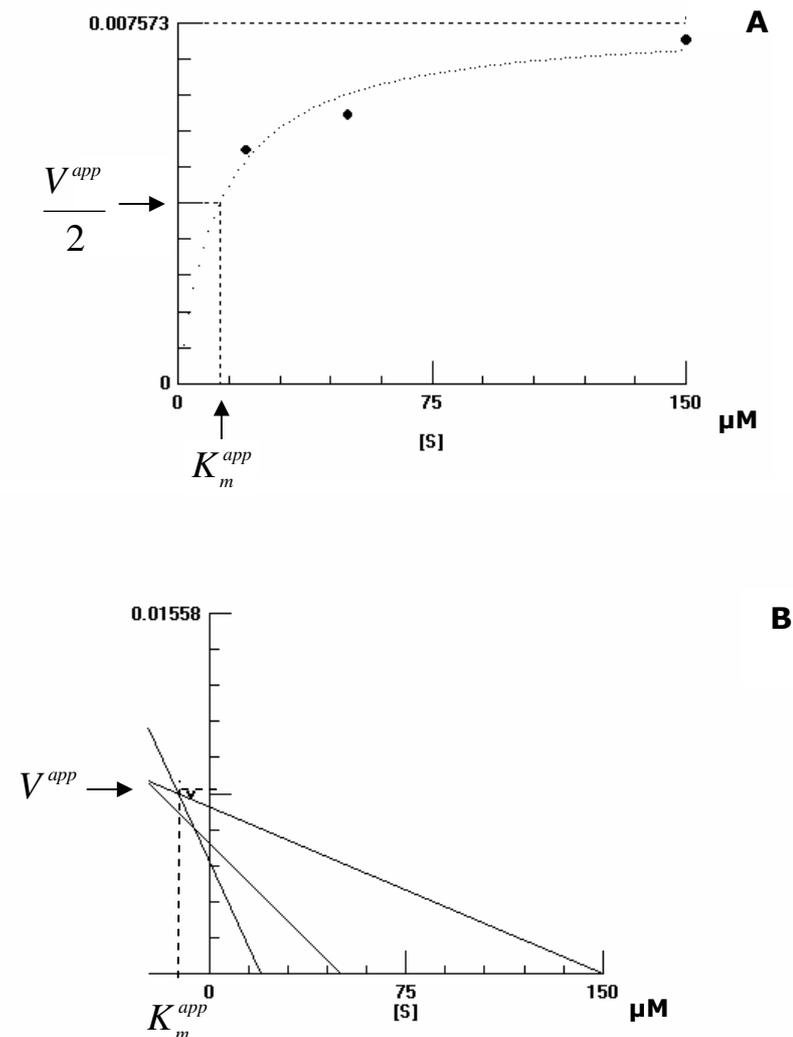


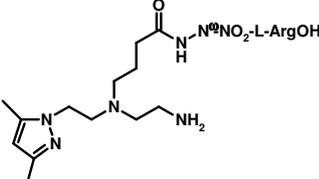
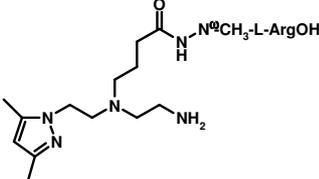
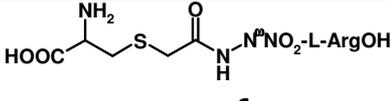
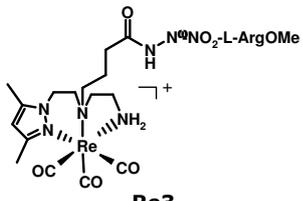
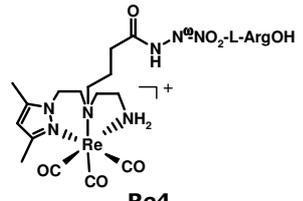
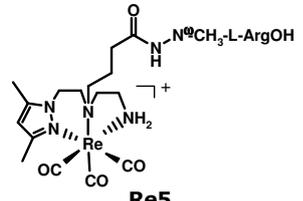
Figura 2.42: Representação gráfica da regressão hiperbólica (A) e do Método Directo de Eisenthal e Cornish-Bowden (B), para a determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença do inibidor **4** (150 μM).

A constante K_i para cada inibidor foi calculada a partir da Equação 4, utilizando o valor de K_m obtido na ausência do inibidor (6 μM), a concentração de inibidor utilizada nos ensaios ($[I] = 150 \mu\text{M}$) e o K_m^{app} determinado experimentalmente como exemplificado.

$$K_m^{app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \quad (\text{Eq 4})$$

Os valores de K_i do iNOS na presença dos inibidores $\text{N}^\omega\text{-NO}_2\text{-L-ArgOH}$, $\text{N}^\omega\text{-CH}_3\text{-L-ArgOH}$, **4 – 6** e **Re3 – Re5** são apresentados na Tabela 2.8.

Tabela 2.8: Valores de K_i do iNOS obtidos na presença dos inibidores N^ω -NO₂-L-ArgOH, N^ω -CH₃-L-ArgOH, **4** – **6** e **Re3** - **Re5**.

Composto	Método Directo K_i (μ M)
N^ω-NO₂-L-ArgOH	3; 8*
N^ω-CH₃-L-ArgOH	8; 4*
 4	178
 5	18
 6	28
 Re3	1094
 Re4	84
 Re5	36

* Ref. [120]

Tal como para os substratos L-ArgOH e L-ArgOMe, o método de captura do NO pela oxihemoglobina permitiu a determinação exacta dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos inibidores N^ω -NO₂-L-ArgOH e N^ω -CH₃-L-ArgOH. Os valores de K_i encontrados são semelhantes aos descritos na literatura.

Os resultados obtidos indicam que a ligação dos compostos N^{ω} -NO₂-L-ArgOH e N^{ω} -CH₃-L-ArgOH à unidade quelante pirazolo-diamina diminui o seu poder inibitório, como se observa pelo aumento do K_i . Esse efeito é mais acentuado para a N^{ω} -NO₂-L-ArgOH (**4**, $K_i = 178 \mu\text{M}$) do que para a N^{ω} -CH₃-L-ArgOH (**5**, $K_i = 18 \mu\text{M}$). Curiosamente, o poder inibitório da N^{ω} -NO₂-L-ArgOH parece ser menos afectado quando se encontra ligado à unidade quelante cisteína (**6**, $K_i = 28 \mu\text{M}$).

Os parâmetros cinéticos do iNOS obtidos na presença de **Re3** e **Re4** permitem concluir que, tal como anteriormente, a presença do grupo α -COOH na unidade L-Arginina leva a um aumento da afinidade para o enzima.

A coordenação dos inibidores à unidade *fac*-[Re(CO)₃]⁺ através do ligando bifuncional, leva igualmente a uma diminuição do poder inibitório para todos os complexos, à excepção de **Re4**. De facto, o poder inibitório do conjugado **4** aumentou após coordenação à unidade organometálica. Um efeito semelhante foi recentemente observado quando um fragmento metálico foi ligado a um inibidor activo de várias proteínas cinases (*e.g.* GSK-3, CDK2, Pim-1, PKC, etc). Mais concretamente, Meggers *et al.* desenvolveram um complexo organometálico de ruténio contendo um análogo da staurosporina (arciriaflavina-A) que, por exemplo, para a GSK-3 (*glycogen synthase kinase 3*), apresentou um poder inibitório cerca de 15000 superior ao do inibidor original não ligado. Este efeito foi atribuído à obtenção de uma estrutura tridimensional mais rígida, com uma conformação fixa mais apropriada, que aumenta a afinidade para o enzima [121, 122].

Noutro estudo recente, foi verificado que conjugados contendo derivados da glucose e da timidina apenas apresentavam efeito inibitório sobre os respectivos enzimas alvo (hexocinase e timidina cinase) após coordenação à unidade tricarbonilo de Re através de um ligando bifuncional [123].

2.6 – ESTUDOS DE AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

2.6.1 - Estudos *in vitro* com células de melanoma murino B16F1

A avaliação da internalização celular *in vitro* de compostos radioactivos, potencialmente úteis como radiofármacos específicos, é fundamental para testar a sua capacidade para atravessarem a membrana celular e interagirem com os seus alvos específicos localizados intracelularmente (e.g. enzimas, mRNA, etc).

A internalização celular dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$, $^{99m}\text{Tc}4$, $^{99m}\text{Tc}5$ e $^{99m}\text{Tc}6$ não purificados foi testada em células do melanoma murino B16F1 de acordo com o procedimento descrito na **secção 3.8.2**. Esta linha celular foi escolhida por se considerar que expressa o enzima NOS, incluindo a isoforma induzida, de acordo com estudos recentes [124 - 126].

A percentagem de radioactividade internalizada, expressa em função da radioactividade ligada à superfície das células, é apresentada na Figura 2.43 para cada um dos complexos.

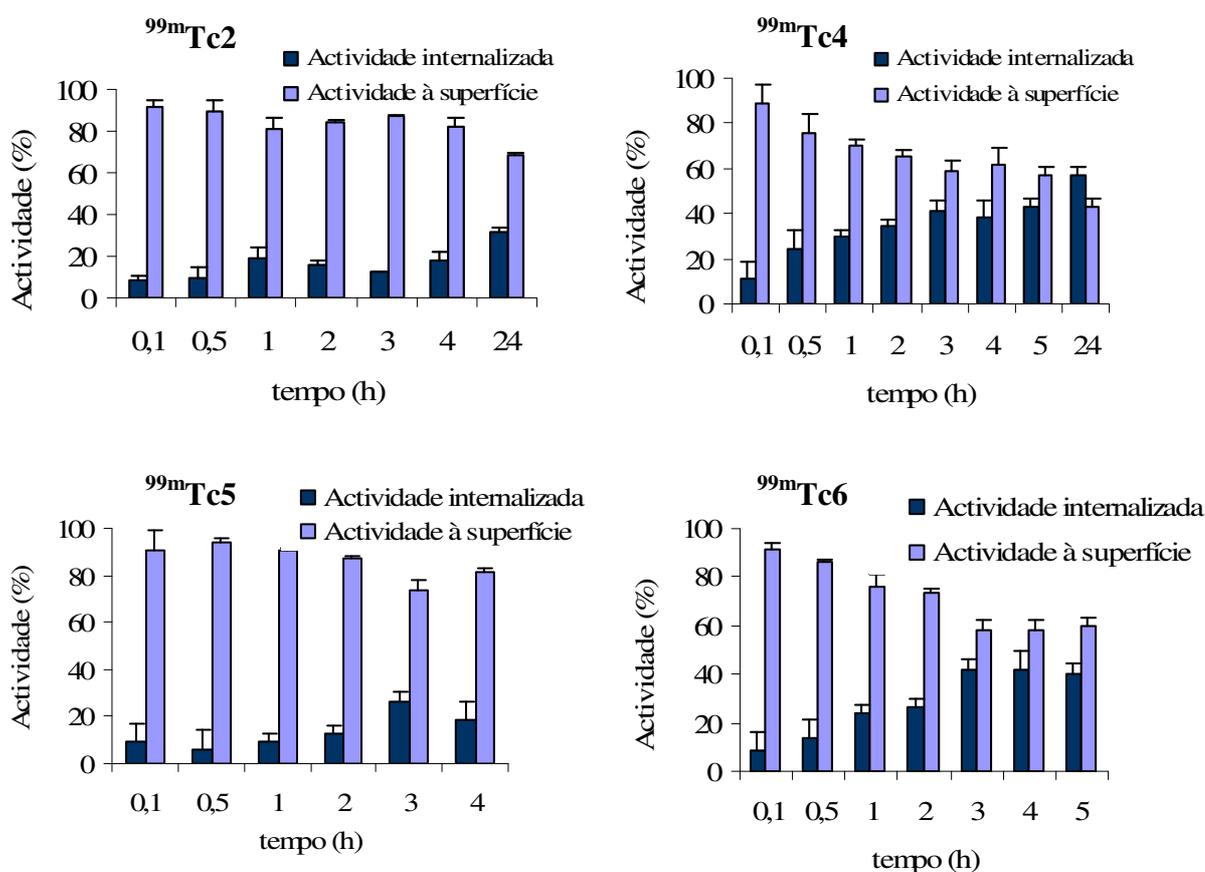


Figura 2.43: Avaliação da internalização *in vitro* dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$, $^{99m}\text{Tc}4$, $^{99m}\text{Tc}5$ e $^{99m}\text{Tc}6$ em células de melanoma murino B16F1.

Os complexos $^{99m}\text{Tc}4$ e $^{99m}\text{Tc}6$, contendo a unidade bioactiva $\text{N}^{\omega}\text{-NO}_2\text{-L-ArgOH}$, foram os que revelaram uma maior taxa de internalização celular ($\sim 40\%$ de actividade internalizada) ao fim de 4 horas de estudo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os valores de internalização obtidos para os complexos $^{99m}\text{Tc}2$ e $^{99m}\text{Tc}5$ foram significativamente mais baixos ($\sim 18\%$ de actividade internalizada, $t = 4\text{ h}$).

A internalização celular dos complexos de ^{99m}Tc , relativamente à radioactividade total à qual as células estiveram expostas ($\sim 200000\text{ cpm}$) foi de um modo geral baixa ($0,1 - 0,6\%$, $t = 4\text{ h}$). A baixa internalização observada poderá estar relacionada não só com a capacidade dos complexos atravessarem a membrana celular, mas também com o tipo de linha celular testada, que poderá não expressar o iNOS em níveis adequados.

2.6.2 – Farmacocinética dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$ e $^{99m}\text{Tc}4$ em murganhos com tumores e sua estabilidade *in vivo*

A avaliação do comportamento biológico de complexos radioactivos em modelos animais é importante, não só por permitir estudar a selectividade e especificidade dos complexos para determinados órgãos ou tecidos alvos, como também por possibilitar a avaliação da sua velocidade e via de eliminação. Através destes estudos é também possível avaliar a estabilidade dos complexos radioactivos *in vivo*.

De um modo geral, pode afirmar-se que os compostos radioactivos com potencial interesse clínico deverão apresentar uma excreção relativamente rápida de modo a reduzir o tempo de exposição do organismo à radiação, mas suficientemente lenta para permitir que o complexo radioactivo interaja com o seu alvo.

Os complexos $^{99m}\text{Tc}2$ e $^{99m}\text{Tc}4$ foram escolhidos para avaliação biológica *in vivo* uma vez que continham na sua composição um substrato e um inibidor do iNOS, respectivamente. Para além disso, o complexo $^{99m}\text{Tc}4$ reunia, simultaneamente, duas propriedades que lhe conferiam um maior potencial para detecção *in vivo* de zonas de maior expressão de iNOS: *(i)* afinidade razoável para o seu alvo (K_i para o complexo análogo de rénio, $\text{Re}4 = 84\text{ }\mu\text{M}$); *(ii)* valores de internalização celular globalmente mais altos.

A biodistribuição foi estudada em murganhos fêmea C57BL/6 (Charles River, 8-10 semanas, $n = 4$) nos quais se induziu o tumor com células de melanoma murino B16F1, de acordo com o procedimento descrito na **secção 3.9.1**. Os complexos de ^{99m}Tc avaliados foram preparados com elevada pureza radioquímica ($\sim 95\%$) e elevada actividade específica, não tendo sido necessário proceder a nenhuma purificação prévia antes da realização dos estudos biológicos.

Os resultados de biodistribuição dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$ e $^{99m}\text{Tc}4$ nos tecidos, expressos em percentagem da dose injectada por grama de órgão (% DI/g órgão) e

também por órgão total (% DI/órgão), são apresentados nas Tabelas 2.9 e 2.10 e nas Figuras 2.44 e 2.45, respectivamente.

Tabela 2.9: Resultados de biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc}2$ em murganhos C57BL6 com melanoma murino B16F1, expressos em % DI/g órgão.

Órgão	% DI/g órgão (média ± dp)	
	1h	4h
Sangue	0,94 ± 0,23	0,57 ± 0,16
Fígado	5,65 ± 2,70	2,80 ± 1,21
Intestino	4,71 ± 0,74	4,47 ± 2,39
Baço	0,74 ± 0,35	0,64 ± 0,16
Coração	0,41 ± 0,09	0,24 ± 0,06
Pulmão	0,86 ± 0,13	0,53 ± 0,08
Rim	3,50 ± 0,91	2,10 ± 0,64
Músculo	0,19 ± 0,11	0,07 ± 0,02
Osso	0,22 ± 0,07	0,13 ± 0,03
Estômago	1,89 ± 1,26	1,08 ± 0,62
Adrenais	0,93 ± 0,53	0,39 ± 0,12
Pâncreas	0,42 ± 0,09	0,24 ± 0,05
Tumor	1,00 ± 0,33	0,43 ± 0,08

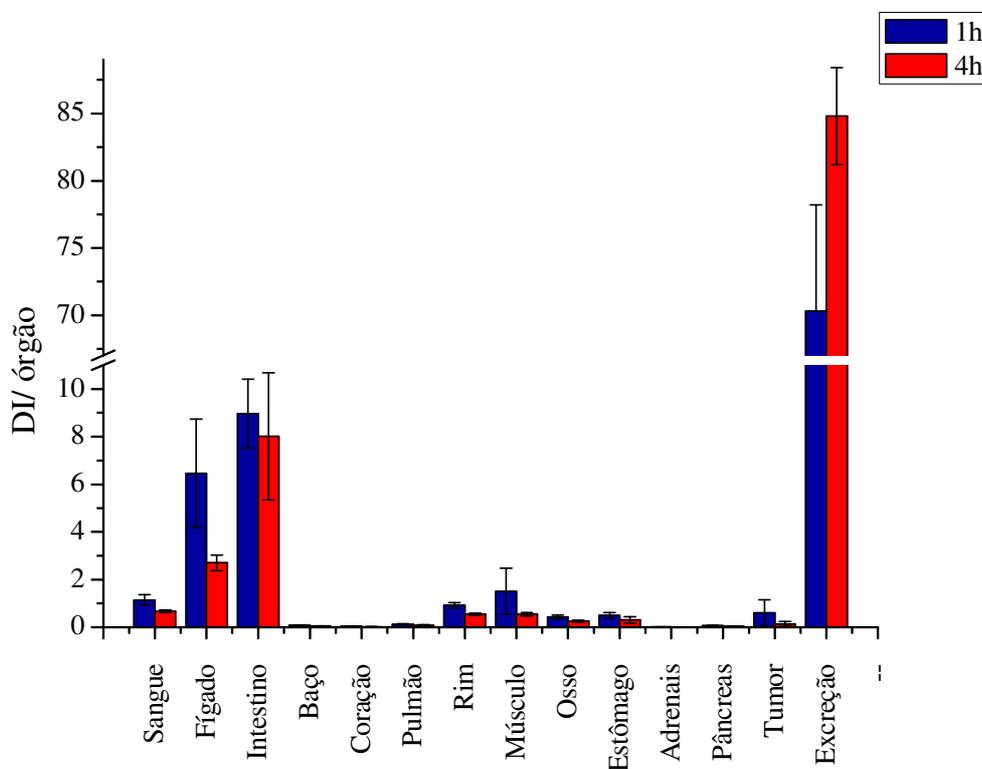


Figura 2.44: Resultados de biodistribuição (% DI/órgão) do complexo $^{99m}\text{Tc}2$ em murganhos C57BL6 com melanoma murino B16F1.

Tabela 2.10: Resultados de biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc4}$ em murganhos C57BL6 com melanoma murino B16F1, expressos em % DI/g órgão.

Órgão	% DI/ g órgão (média ± dp)	
	1h	4h
Sangue	1,81 ± 0,17	1,26 ± 0,12
Fígado	12,08 ± 6,12	11,80 ± 4,97
Intestino	15,11 ± 1,48	17,24 ± 2,48
Baço	6,32 ± 4,23	6,87 ± 3,16
Coração	0,67 ± 0,11	0,46 ± 0,09
Pulmão	2,20 ± 1,06	1,36 ± 0,42
Rim	3,88 ± 0,53	3,21 ± 0,23
Músculo	0,21 ± 0,06	0,12 ± 0,01
Osso	0,32 ± 0,07	0,26 ± 0,05
Estômago	3,38 ± 1,43	0,94 ± 0,32
Pâncreas	0,62 ± 0,18	0,36 ± 0,03
Tumor	0,52 ± 0,24	0,28 ± 0,01

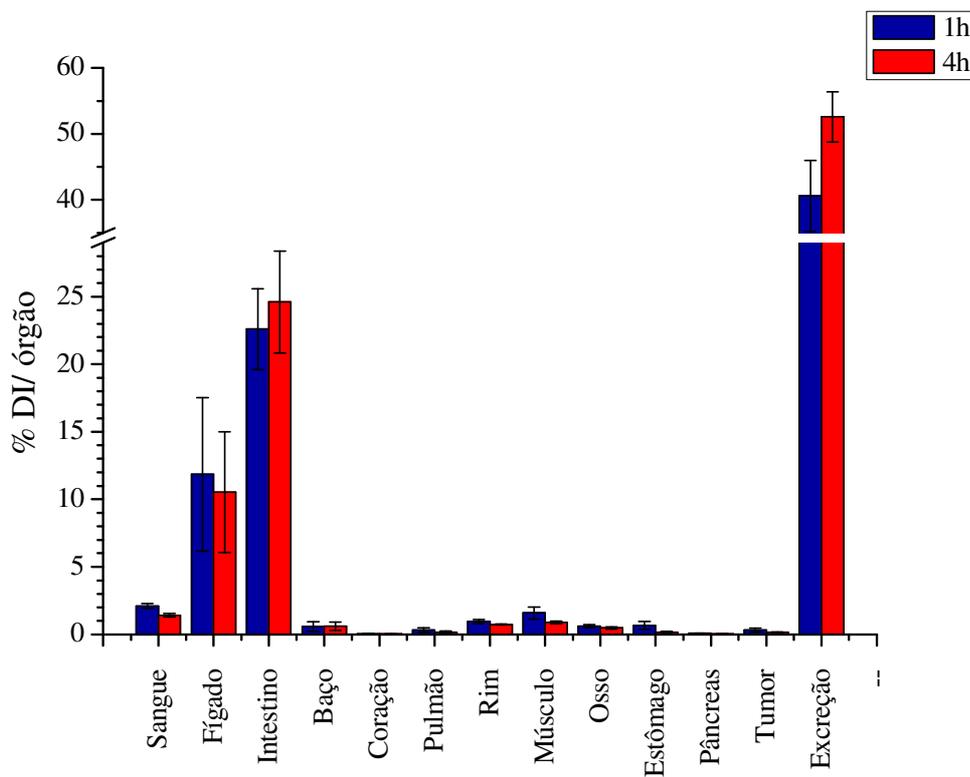


Figura 2.45: Resultados de biodistribuição (% DI/órgão) do complexo $^{99m}\text{Tc4}$ em murganhos C57BL6 com melanoma murino B16F1.

O complexo $^{99m}\text{Tc}2$ é rapidamente eliminado, uma vez que, 1 hora após administração, apenas $\sim 30\%$ da actividade total injectada estava ainda retida nos diversos tecidos e órgãos. Em relação à via de excreção, este composto é eliminado principalmente por via renal, embora apresente também uma certa percentagem de eliminação hepatobiliar, demonstrada pela ligeira acumulação de actividade no fígado ($2,70 \pm 0,33$ DI/órgão, 4 h p.i.) e intestino ($8,02 \pm 2,66$ DI/órgão, 4 h p.i.). O complexo $^{99m}\text{Tc}4$ apresenta uma eliminação mais lenta, atingindo uma excreção total de $52,6 \pm 3,8\%$ da dose injectada, 4 horas após administração. Este composto apresenta também uma componente hepatobiliar mais acentuada (fígado = $10,52 \pm 4,46$ DI/órgão, intestino = $24,60 \pm 3,77$ DI/órgão, 4 h p.i.). Este comportamento não pode ser só explicado pela lipofilia do complexo $^{99m}\text{Tc}4$, uma vez que a determinação do coeficiente de partilha n-octanol/água ($P_{o/w}$), expresso em $\log P_{o/w}$, demonstrou que este complexo é significativamente hidrofílico ($\log P_{o/w} = -1,409 \pm 0,008$). Neste caso, o perfil de biodistribuição obtido parece estar a ser decisivamente afectado pela presença da unidade $\text{N}^{\omega}\text{-NO}_2\text{-L-ArgOH}$. Estudos de farmacocinética anteriormente realizados com a $\text{N}^{\omega}\text{-NO}_2\text{-L-ArgOH}$ em modelos animais demonstraram que este aminoácido apresenta um comportamento essencialmente hepatobiliar, à semelhança do que se passa com $^{99m}\text{Tc}4$ [127].

O complexo $^{99m}\text{Tc}2$ é rapidamente eliminado do sangue ($0,57 \pm 0,16\%$ DI/g órgão, 4 h p.i.), enquanto que o composto $^{99m}\text{Tc}4$ apresenta uma depuração sanguínea mais lenta ($1,26 \pm 0,12$ DI/g órgão, 4 h p.i.), aproximadamente metade do valor encontrado para o complexo $^{99m}\text{Tc}2$.

Os baixos valores de retenção de actividade no estômago ($^{99m}\text{Tc}2$, $1,08 \pm 0,62\%$ e $^{99m}\text{Tc}4$, $0,94 \pm 0,32\%$ DI/g órgão, 4 h p.i.) revelam que não existe dissociação e oxidação do ^{99m}Tc ligado à unidade quelante pirazolo-diamina.

É de referir que o $^{99m}\text{Tc}4$ apresenta uma certa fixação no baço ($6,87 \pm 3,16$ DI/g órgão, 4 h p.i.) o que pode indicar a existência de espécies coloidais na preparação, que se sabe serem captadas por este órgão. Esta despistagem poderia ter sido feita por cromatografia em camada fina instantânea (ITLC), utilizando um sistema adequado de eluentes. No entanto, decidiu-se antes purificar o composto $^{99m}\text{Tc}4$ por RP-HPLC (**secção 3.9.2**), sabendo que quaisquer espécies coloidais ficavam retidas na coluna. Esta purificação permitiria também avaliar o efeito do aumento da actividade específica do complexo, por eliminação do conjugado frio, no perfil farmacocinético geral do composto e na fixação tumoral em particular. Os resultados de biodistribuição obtidos para o complexo $^{99m}\text{Tc}4$ purificado apresentam-se na Tabela 2.11.

Tabela 2.11: Resultados de biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc4}$ purificado por RP-HPLC em murganhos C57BL6 com melanoma murino B16F1.

Órgão	% DI/ g órgão (média \pm dp)		% DI/ órgão (média \pm dp)	
	1h	4h	1h	4h
Sangue	1,59 \pm 0,69	0,60 \pm 0,12	1,85 \pm 0,90	0,69 \pm 0,11
Fígado	1,36 \pm 0,43	1,81 \pm 1,14	1,27 \pm 0,39	1,50 \pm 1,03
Intestino	22,17 \pm 2,99	19,99 \pm 2,39	33,97 \pm 6,03	31,41 \pm 4,90
Baço	0,31 \pm 0,05	0,25 \pm 0,12	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01
Coração	0,20 \pm 0,01	0,12 \pm 0,04	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
Pulmão	0,47 \pm 0,05	0,28 \pm 0,12	0,07 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
Rim	1,81 \pm 0,24	1,06 \pm 0,24	0,41 \pm 0,03	0,25 \pm 0,05
Músculo	0,21 \pm 0,25	0,07 \pm 0,04	1,56 \pm 0,45	0,55 \pm 0,27
Osso	0,18 \pm 0,02	0,12 \pm 0,05	0,34 \pm 0,03	0,23 \pm 0,06
Estômago	0,42 \pm 0,19	0,06 \pm 0,03	0,11 \pm 0,04	0,02 \pm 0,01
Pâncreas	0,27 \pm 0,11	0,08 \pm 0,03	0,04 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
Tumor	0,41 \pm 0,09	0,14 \pm 0,06	0,39 \pm 0,12	0,14 \pm 0,07
Excreção total (%)			50,3 \pm 11,2	59,0 \pm 6,0

Como se pode observar pela análise dos dados apresentados na Tabela 2.11, o composto $^{99m}\text{Tc4}$ apresenta, como anteriormente, uma eliminação mista, isto é, hepatobiliar e renal. No entanto, a excreção através do sistema hepatobiliar é mais rápida do que a encontrada quando se utilizou o complexo $^{99m}\text{Tc4}$ não purificado.

A purificação também levou a uma diminuição significativa de fixação no baço. Este resultado parece confirmar que na preparação não purificada existiam espécies coloidais que, por não serem facilmente metabolizadas, ficaram retidas por um período mais longo no fígado e no baço.

Genericamente podemos dizer que para ambos os complexos, à excepção dos órgãos relacionados com as vias de excreção, não houve fixação significativa de actividade em nenhum órgão ou tecido, incluindo no tumor. O aumento da actividade específica do complexo $^{99m}\text{Tc4}$ não levou a qualquer aumento de fixação tumoral ($^{99m}\text{Tc4}$ não purificado, $0,16 \pm 0,03$ % DI/g órgão e $^{99m}\text{Tc4}$ purificado, $0,14 \pm 0,06$ % DI/g órgão).

Paralelamente aos ensaios de biodistribuição, foram também estudadas a estabilidade e a metabolização dos complexos $^{99m}\text{Tc2}$ e $^{99m}\text{Tc4}$ (purificado e não purificado) *in vivo*. Estes estudos permitiram avaliar a estabilidade dos complexos em

relação à reoxidação, transquelatação e metabolização *in vivo*. Assim, recolheram-se amostras de urina e sangue dos murganhos 1 h após administração. Depois de tratamento adequado, fez-se a análise das amostras biológicas por RP-HPLC (**secção 3.9.3**).

Na figura 2.46 são apresentados os cromatogramas obtidos por RP-HPLC das amostras biológicas analisadas.

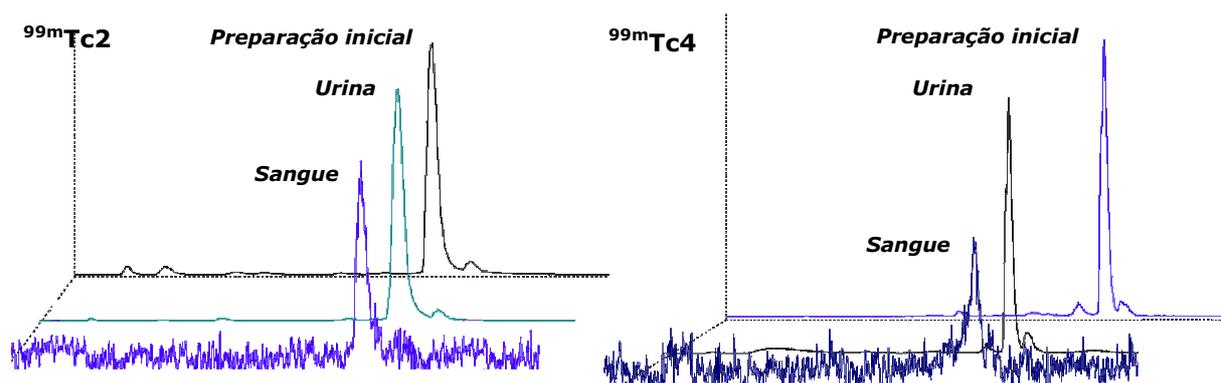


Figura 2.46: Estabilidade *in vivo*/metabolização dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$ e $^{99m}\text{Tc}4$. Radiocromatogramas obtidos por RP-HPLC analítico (**Método 1, secção 3.2**) 1 h após administração.

Os soros obtidos a partir do sangue de murganho não evidenciaram a formação de $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ (obtido por reoxidação do complexo), nem de produtos resultantes da transquelatação e metabolização dos complexos. Mais de 98 % da radioactividade presente no soro pôde ser atribuída aos complexos inicialmente injectados.

A análise da urina também não revelou a presença de espécies radioquímicas formadas pela degradação e/ou metabolização dos complexos iniciais.

Os resultados obtidos demonstraram a elevada estabilidade dos complexos *in vivo* e a resistência à metabolização.

**CONCLUSÕES E
PERSPECTIVAS**

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados novos conjugados contendo a unidade pirazolo-diamina (átomos doadores *N,N,N*) ligada aos substratos L-ArgOMe/OH (**1** e **2**) e aos inibidores N^{ω} -NO₂-L-ArgOMe/OH (**3** e **4**)/ N^{ω} -CH₃-L-ArgOH (**5**) do óxido nítrico sintase (NOS). De modo a estudar a influência da ligação de um mesmo aminoácido a outras unidades quelantes, preparou-se e caracterizou-se um conjugado contendo o inibidor N^{ω} -NO₂-L-ArgOH ligado à unidade quelante cisteína (**6**, átomos doadores *N,O,S*). Os conjugados foram obtidos com rendimentos moderados e elevada pureza química (> 95%) após purificação por RP-HPLC preparativo. A elevada solubilidade dos conjugados em soluções aquosas é uma característica relevante não só para aplicação em química radiofarmacêutica, como também para a realização de estudos enzimáticos.

Por reacção dos conjugados **1** – **5** com o precursor [NEt₄]₂[ReBr₃(CO)₃] obtiveram-se complexos do tipo *fac*-[Re(*k*³-L)(CO)₃]⁺ (L = **1**, **Re1**; **2**, **Re2**; **3**, **Re3**; **4**, **Re4**; **5**, **Re5**), em que o ligando estabilizador se coordena ao metal de modo tridentado {*k*³-*N,N,N*}. O modo de coordenação foi inequivocamente confirmado por uma via de síntese alternativa em que o fragmento metálico "Re(CO)₃" foi ligado à unidade quelante pirazolo-diamina e o complexo resultante posteriormente ligado ao substrato L-ArgOH. Esta reacção permitiu confirmar que a "unidade bioactiva" (*grupo guanidina*) não está envolvida em interacções não específicas com o metal, encontrando-se disponível para interagir com o centro activo do enzima.

A análise cromatográfica dos complexos **Re2**, **Re4** e **Re5** por RP-HPLC analítico mostrou a presença de dois isómeros que, para o complexo **Re2**, foram separados por RP-HPLC semi-preparativo e caracterizados de forma independente (RP-HPLC analítico e RMN de ¹H e ¹³C). Os isómeros foram isolados (**Re2-a** e **Re2-b**) com uma pureza química > 95 % e não apresentaram quaisquer diferenças nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C. A análise por RP-HPLC analítico revelou que os isómeros não se interconvertiam mesmo após 5 dias em solução aquosa.

Os complexos radioactivos ^{99m}Tc**2**, ^{99m}Tc**4**, ^{99m}Tc**5** e ^{99m}Tc**6** foram preparados com bons rendimentos (> 90 %) e actividades específicas elevadas por reacção dos conjugados **2**, **4**, **5** e **6** com o precursor *fac*-[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺. A reacção deste precursor com **1** e **3** conduziu, mesmo após optimização das condições reaccionais, à formação dos complexos ^{99m}Tc**1** e ^{99m}Tc**3** em baixos rendimentos. Este resultado foi atribuído à hidrólise dos ésteres metílicos *in situ*, com formação preferencial de ^{99m}Tc**2** e ^{99m}Tc**4**.

Os complexos radioactivos $^{99m}\text{Tc1}$ - $^{99m}\text{Tc5}$ foram identificados por comparação dos seus perfis cromatográficos (RP-HPLC) com os dos correspondentes análogos **Re1** - **Re5**.

O carácter lipofílico/hidrofílico de $^{99m}\text{Tc2}$, $^{99m}\text{Tc4}$, $^{99m}\text{Tc5}$ e $^{99m}\text{Tc6}$, foi avaliado por determinação do coeficiente de partição o/w. Os valores de $\log P_{o/w}$ encontrados permitiram concluir que todos os complexos apresentam um carácter hidrofílico acentuado.

Os parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos conjugados **2** ($K_m = 57 \mu\text{M}$), **4** ($K_i = 178 \mu\text{M}$), **5** ($K_i = 18 \mu\text{M}$) e **6** ($K_i = 28 \mu\text{M}$) e dos complexos organometálicos **Re1** ($K_m = 377 \mu\text{M}$), **Re2** ($K_m = 245 \mu\text{M}$), **Re3** ($K_i = 1094 \mu\text{M}$), **Re4** ($K_i = 84 \mu\text{M}$) e **Re5** ($K_i = 36 \mu\text{M}$) foram determinados pelo Método Directo de **Eisenthal** e **Cornish-Bowden**.

A análise genérica dos dados obtidos a partir dos estudos enzimáticos revelou que o enzima parece reconhecer mais facilmente os compostos contendo a função ácido carboxílico do que os compostos contendo a função éster (**Re1** vs **Re2** e **Re3** vs **Re4**). Este resultado está de acordo com a importância atribuída às interacções por pontes de hidrogénio entre o grupo $\alpha\text{-COOH}$ da arginina e o centro activo do enzima [117, 118].

Foi ainda possível demonstrar que a ligação dos substratos ou inibidores do NOS ao ligando bifuncional, e a posterior coordenação dos conjugados à unidade $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$, conduz a uma diminuição da afinidade para o enzima, à excepção do complexo **Re4**. A acção inibitória deste complexo aumentou relativamente ao respectivo conjugado.

Os resultados obtidos parecem também indicar que a afinidade dos conjugados contendo inibidores do iNOS é menos afectada pela coordenação ao metal (**4** vs **Re4**, **5** vs **Re5**) do que a afinidade dos conjugados contendo substratos (**2** vs **Re2**). Os valores das constantes de inibição encontrados para **Re4** e **Re5** comparam-se favoravelmente com os valores de alguns compostos orgânicos desenvolvidos especificamente como inibidores do iNOS.

Os estudos de internalização com a linha celular de melanoma murino B16F1 mostraram que os complexos $^{99m}\text{Tc2}$, $^{99m}\text{Tc4}$, $^{99m}\text{Tc5}$ e $^{99m}\text{Tc6}$ apresentam uma afinidade reduzida para estas células.

O facto de se ter observado uma internalização reduzida dos complexos de ^{99m}Tc na linha celular B16F1 não invalida que, *in vivo*, não se possa observar fixação dos complexos radioactivos nos tumores induzidos com estas células. Além disso, os resultados promissores obtidos nos ensaios enzimáticos, levaram-nos a estudar a

biodistribuição dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$ e $^{99m}\text{Tc}4$ em murganhos com melanoma murino B16F1. Os estudos *in vivo* revelaram que os complexos $^{99m}\text{Tc}2$ e $^{99m}\text{Tc}4$ apresentam uma rápida eliminação quer pela via renal quer pela hepatobiliar. Estes estudos mostraram não haver fixação específica em nenhum órgão ou tecido, incluindo no tumor.

Os perfis de biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc}4$ purificado e não purificado são comparáveis, não se tendo observado qualquer aumento da retenção tumoral no caso do composto purificado (maior actividade específica).

A avaliação da estabilidade mostrou que os complexos ^{99m}Tc são estáveis *in vivo*, não sofrendo processos de transquelatação e/ou metabolização.

Como conclusão geral pode dizer-se que os resultados preliminares obtidos são promissores, no entanto, é ainda necessário proceder a alterações estruturais nos complexos de modo a aumentar a afinidade/selectividade para o iNOS. Neste contexto, a continuação do trabalho poderá passar pelo desenvolvimento de novos biocomplexos com a unidade *fac*- $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ ($\text{M} = \text{Re}, ^{99m}\text{Tc}$) estabilizada com conjugados contendo a unidade quelante pirazolo-diamina ligada, por exemplo, à N-(3-(Aminometil)benzil)acetamidina (1400W), que é um dos compostos conhecidos com maior acção inibitória do iNOS. Alternativamente, poder-se-á ligar à mesma unidade quelante o aminoácido $\text{N}^\omega\text{-OH-L-ArgOH}$, cuja afinidade para o NOS é menos afectada por modificações na $\alpha\text{-NH}_2$ e $\alpha\text{-COOH}$ [118, 119].

O facto dos complexos de ^{99m}Tc testados terem apresentado uma baixa internalização celular poderá estar relacionado não só com o tipo de linha celular utilizada, mas também com a capacidade dos complexos atravessarem a membrana celular. Assim, torna-se necessário realizar estudos *in vitro* com outras linhas celulares tumorais, nomeadamente com células de adenocarcinoma do cólon DLD-1 e mamário EMT6, ou com macrófagos (RAW 264.7) induzidos com LPS para expressar o iNOS [95, 128]. Relativamente ao transporte dos complexos através da membrana celular, ter-se-á que avaliar em que medida esse transporte é mediado pelos transportadores de aminoácidos, nomeadamente pelos sistemas y^+ e **LAT1** responsáveis pelo transporte de aminoácidos catiónicos (L-ArgOH, $\text{N}^\omega\text{-CH}_3\text{-L-ArgOH}$) e neutros ($\text{N}^\omega\text{-NO}_2\text{-L-ArgOH}$), respectivamente [127 - 130]. Na sequência desta avaliação, o estudo deverá ser alargado ao desenvolvimento de complexos contendo funções que sejam reconhecidas simultaneamente pelo enzima iNOS e pelos transportadores de aminoácidos, que também se encontram sobreexpressos em diferentes tipos de tumores [131 - 133].

3 PARTE
EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – SOLVENTES E REAGENTES

Todos os reagentes químicos e solventes utilizados eram de qualidade pró análise e foram usados sem qualquer purificação adicional, excepto quando expressamente indicado.

3.2 - TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna foi realizada utilizando sílica gel, com granulometria 70-230 mesh ASTM Merck, em colunas de vidro de dimensões apropriadas à quantidade de amostra a purificar.

Cromatografia em camada fina (TLC)

As reacções de síntese química foram monitorizadas por TLC usando placas de sílica-gel MERCK 60-F₂₅₄ com 0,2 mm de espessura, em suporte de alumínio. As placas de cromatografia foram reveladas com radiação UV (254 nm), com iodo ou com solução de ninidrina (3 % p/v numa solução de 5 % de ácido acético em metanol).

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A purificação e o controlo analítico dos compostos orgânicos e dos complexos de Re, bem como a identificação dos complexos de ^{99m}Tc, foram realizados num sistema cromatográfico equipado com uma bomba Perkin Elmer series 200 e com dois detectores em série: um detector de radiação γ (Berthold Lb 509) e um detector UV/visível (Shimadzu SPD-10 AV ou Perkin Helmer Lc 290).

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

A purificação dos compostos sintetizados (conjugados **1 – 6** e complexos **Re1 – Re5**) realizou-se nas seguintes condições cromatográficas:

Coluna: Preparativa, Waters μ Bondapak C18 (19 mm x 150 mm)

Pré-coluna: Hypersil C18 (ODS), 4,6 x 25 mm, 10 μ m

Fluxo: 5,5 mL/minuto

Detecção UV: 254 nm

Capítulo 3

Eluentes: **A** – TFA 0,1 %; **B** - CH₃OH

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

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

Fluxo: 2,0 mL/minuto

Detecção UV: 254 nm

Eluentes: **A** – TFA 0,1 %; **B** - CH₃OH

As condições cromatográficas para controlo analítico dos compostos sintetizados e para caracterização dos complexos de ^{99m}Tc foram as seguintes:

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/minuto

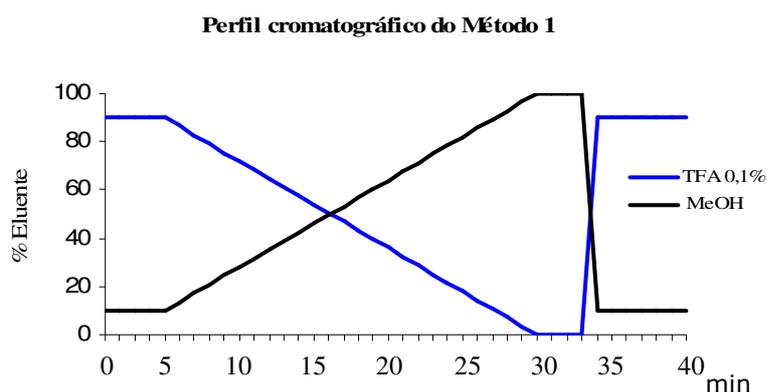
Detecção UV: 254 ou 220 nm

Eluentes: **A** – TFA 0,1 %; **B** - CH₃OH

Os gradientes de eluição utilizados nas purificações/análises por RP-HPLC foram:

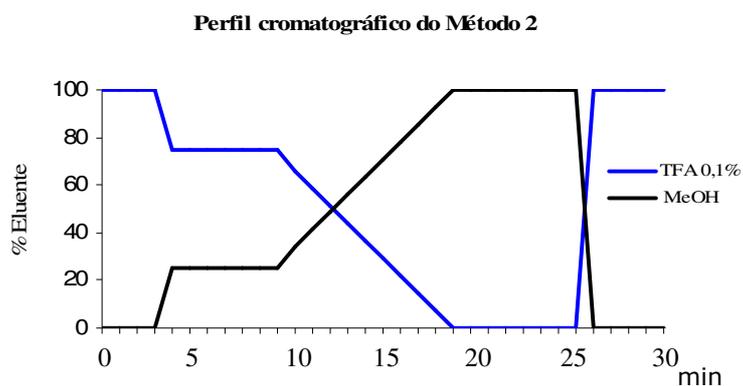
Método 1:

Passo	Tempo (min)	% A	% B
1	0 - 5	90	10
2	5 - 30	90 → 0	10 → 100
3	30 - 34	0	100
4	34 - 35	0 → 90	100 → 10
5	35 - 40	90	10



Método 2:

Passo	Tempo (min)	% A	% B
1	0 - 3	100	0
2	3 - 3,1	100 → 75	0 → 25
3	3,1 - 9	75	25
4	9 - 9,1	75 → 66	25 → 34
5	9,1 - 18	66 → 0	34 → 100
6	18 - 25	0	100
7	25 - 25,1	0 → 100	100 → 0
8	25,1 - 30	100	0

**Espectrometria de Massa (ESI-MS)**

Os compostos sintetizados foram analisados por espectrometria de massa com ionização por electrospray, num equipamento Bruker modelo Esquire 3000 plus, no Laboratório de Espectrometria de Massa do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET), Oeiras.

Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de IV foram adquiridos num espectrómetro Tensor 27, Bruker. As amostras foram preparadas sob a forma de pastilhas de KBr. As intensidades das bandas de absorção dos espectros de IV são descritas como fortes (F), médias (M) ou fracas (f).

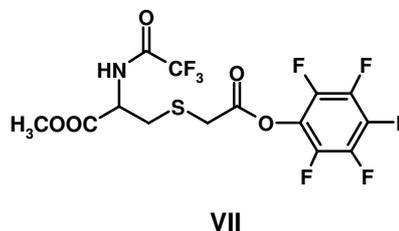
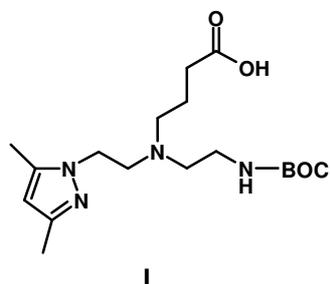
Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{19}F foram obtidos num espectrómetro Varian Unity 300 MHz, à temperatura ambiente. Utilizou-se o sinal residual dos solventes deuterados para os quais são conhecidos os desvios químicos relativamente ao tetrametilsilano (TMS).

Medição da actividade das soluções radioactivas

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

3.3 – MATERIAIS DE PARTIDA



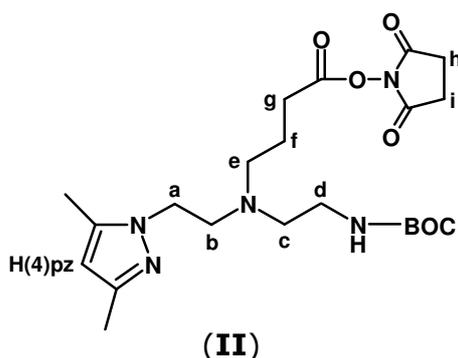
Os compostos precursores **I**, **VII**, $(\text{NEt}_4)_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ e $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$ foram sintetizados de acordo com os métodos descritos na literatura [44, 60, 104].

Os conjugados **2 - 6** e os complexos **Re1 - Re5** foram liofilizados e guardados a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ na forma de sal trifluoroacetato em alíquotas de 5 - 10 mg. O conjugado **1** foi guardado na forma de sal de sódio.

3.4 – SÍNTESE DOS CONJUGADOS 1 - 6 E DOS COMPLEXOS Re1 - Re5

3.4.1 – Conjugados 1 - 6 e compostos intermediários

3.4.1.1 - 4-[(2-(tert-butoxicarbonilamino)etil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil)amino]butanoato 2,5-dioxopirrolidino-1-il (**II**)



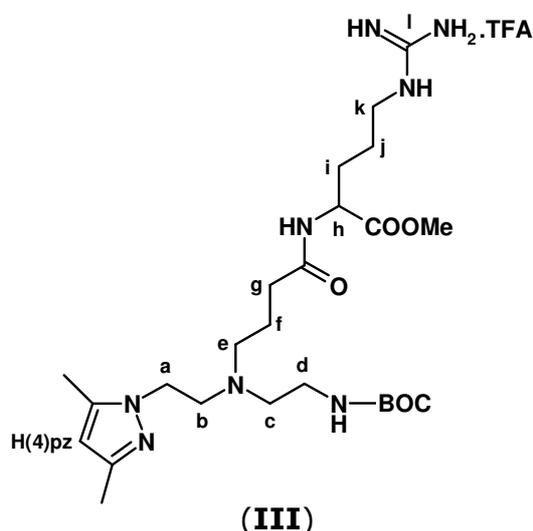
A uma solução de precursor **I** (200 mg, 0,543 mmol) e N-hidroxisuccinimida (NHS, 75 mg, 0,651 mmol) em CH_2Cl_2 (7 mL) adicionou-se lentamente uma solução de diclohexilcarbodiimida (DCC, 134 mg, 0,651 mmol) no mesmo solvente (3 mL). A reacção foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 18 horas. O controlo da mistura reaccional foi efectuado por TLC (eluente: CH_3OH 15%/ CH_2Cl_2). O precipitado de

N,N'-díciclohexilureia (DCU) obtido foi eliminado por filtração com celite e lavado com CH_2Cl_2 . Ao filtrado obtido adicionou-se n-hexano para forçar a precipitação de mais DCU ainda em solução e arrefeceu-se a solução a -18°C durante 30 minutos. A DCU formada foi eliminada por filtração e o solvente evaporado a pressão reduzida. Após secagem em linha de vazio obteve-se um resíduo de aspecto oleoso amarelado (250 mg) que por TLC revelou três manchas com Rfs de 0,22 (composto **I**), 0,45 (NHS) e 0,81 (éster activado **II**). O produto foi utilizado nos passos seguintes sem purificação prévia. Rendimento: $\sim 98\%$ por $^1\text{H-RMN}$ (rendimento calculado por integração dos sinais correspondentes ao grupo BOC do composto de partida **I** e do éster activado **II**).

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 20°C , δ ppm): 5,83 (s, 1H, H(4)pz); 4,06 (t largo, 2H, CH_2); 3,12 (t largo, 2H, CH_2); 2,90 (largo, 2H, CH_2); 2,83 (s, 4H, CH_2^{h} + CH_2^{i}); 2,65 (d largo, 2H, CH_2); 2,56 (t, 2H, CH_2); 2,27 (s, 3H, CH_3pz); 2,16 (s, 3H, CH_3pz); 1,86 – 1,68 (m, 4H, CH_2); 1,42 (s, 9H, CH_3).

Outros sinais de $^1\text{H-RMN}$: 2,78 (s, NHS livre); 1,49 (s, CH_3 , BOC do composto de partida **I**); 1,37- 1,11 (DCU).

3.4.1.2 – Pentanoato 2-[(4-{[2-(tert-butoxicarbonilamino)etil][2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(carbamidamido) de metilo (**III**)



A uma solução de éster activado **II** (250 mg, 0,536 mmol) em THF (10 mL) foram adicionadas L-ArgOMe (160 mg, 0,616 mmol) e NEt_3 (379 mg, 3,752 mmol) dissolvidas na mínima quantidade de H_2O . Após alguns segundos de agitação a suspensão tornou-se límpida. De seguida, adicionou-se mais NEt_3 (65 mg, 0,643 mmol) e deixou-se reagir à temperatura ambiente. A reacção foi controlada por TLC (eluente: CH_3OH 15%/ CH_2Cl_2).

Após ~18 horas quase todo o éster activado inicial tinha sido consumido. Por evaporação do solvente obteve-se um resíduo que foi lavado com CH₃COOEt e redissolvido em H₂O para precipitação de DCU remanescente. Após eliminação da DCU por centrifugação, o sobrenadante foi filtrado por filtro Millipore de 0,22 µm e purificado por RP-HPLC (coluna: Waters µ Bondapak C18, **Método 1**). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 56 % (195 mg, 0,299 mmol).

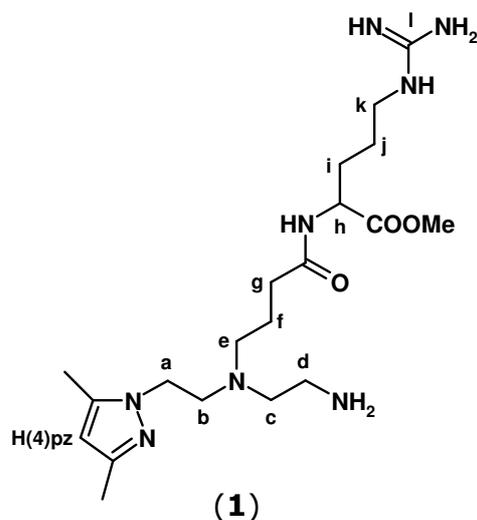
Rf: 0,75 (eluente: CHCl₃ 49 %/CH₃OH 49 %/NH₄OH 2 %)

RP-HPLC (t_R): 25,1 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 µm; **Método 1**)

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 5,89 (s, 1H, H(4)pz); 4,32 (t, 2H, CH₂^a); 4,20 (q, 1H, CH^h); 3,56 (s, 3H, OCH₃); 3,49 (t, 2H, CH₂^b); 3,27 (d, 2H, CH₂^{c/d}); 3,23 (d, 2H, CH₂^{c/d}); 3,11 (t, 2H, CH₂^g); 3,03 (t, 2H, CH₂^k); 2,28 (t, 2H, CH₂^e); 2,12 (s, 3H, CH₃pz); 2,04 (s, 3H, CH₃pz); 1,82 (m, 2H, CH₂^f); 1,70 (m, 1H, CHⁱ); 1,54 (m, 1H, CH^{i'}); 1,44 (m, 2H, CH₂^j); 1,20 (s, 9H, CH₃).

¹³C-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 177,4 (CO); 176,7 (CO); 165,4 (q, CF₃COO⁻); 160,2 (CO, BOC); 158,7 (C^l-Guanidina-L-Arg); 150,9 (C(3/5)pz); 146,1 (C(3/5)pz); 118,7 (q, CF₃COO⁻); 108,9 (C(4)pz); 83,7 (C(CH₃)₃); 55,4; 55,1 (OCH₃); 54,6; 54,0; 51,9; 50,8; 43,8; 42,4; 37,2; 33,8; 29,5(C(CH₃)₃); 26,5; 21,1; 13,6 (CH₃pz); 12,0 (CH₃pz).

3.4.1.3 – Pentanoato 2-[(4-{[2-amino-etil][2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(carbamimidamido) de metilo (**1**)



A uma solução de **III** (100 mg, 0,153 mmol) em CH₂Cl₂ (1 mL) foi adicionado ácido trifluoroacético (3 mL, 40 mmol) 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 e neutralizado com NaOH 2N. A água foi evaporada e o resíduo obtido foi extraído com metanol. Os sólidos formados foram eliminados por centrifugação e o sobrenadante foi evaporado a pressão reduzida. O óleo obtido foi dissolvido em H₂O, filtrado por um filtro Millipore de 0,22 µm e purificado por RP-HPLC (coluna: Waters µ Bondapak C18, **Método 1**). O produto, isolado na forma de sal trifluoroacetato, foi neutralizado com NaOH 2N e purificado com um cartucho de fase reversa (SEP-PAK[®], Waters). O cartucho foi acondicionado fazendo passar sequencialmente, com um fluxo de 1 a 2 gotas por segundo, água (5mL), metanol (5mL) e ar (5mL). A amostra foi aplicada num volume de 100 µL de H₂O (25 mg/100 µL) e o cartucho eluído com um gradiente de CH₃OH/H₂O (0 %, 25 %, 75 %, 100 %). As fracções eluídas com 25 % e 75 % CH₃OH/H₂O foram analisadas por TLC (eluente: CH₃OH 49 %/CHCl₃ 49 %/NH₄OH 2 %) e apresentavam apenas uma mancha correspondente ao conjugado **1**. O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição. Rendimento: 75 % (50 mg, 0,114 mmol).

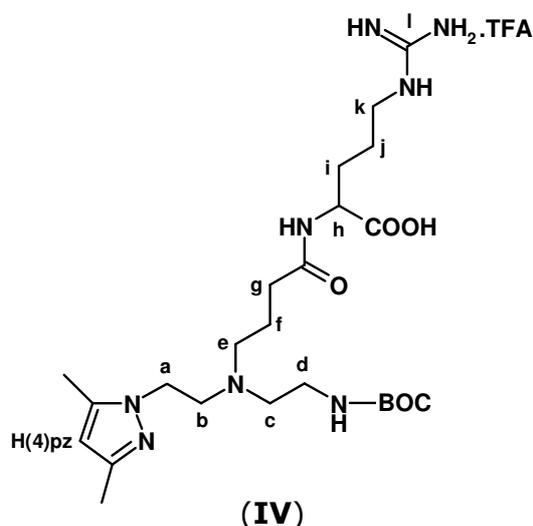
RP-HPLC (t_R): 18,9 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 µm; **Método 1**)

IV (KBr, cm⁻¹): 3363 F v(NH₂, -NH-); ~ 1678 F v(C=O), δ(-NH₂, aminas) e δ(-NH-, amida); 1400 M v(C-N, amida); 1203 e 1135 F v(C-N, aminas 1^{as} e 2^{as}); 836 f; 801 f; 722 f.

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 5,95 (s, 1H, H(4)pz); 4,35 (t, 2H, CH₂^a); 4,21 (q, 1H, CH^h); 3,59 (s, 3H, OCH₃); 3,54 (t, 2H, CH₂); 3,43 (t, 2H, CH₂); 3,28 (t, 2H, CH₂); 3,12 (t, 2H, CH₂); 3,04 (t, 2H, CH₂); 2,28 (t, 2H, CH₂^e); 2,15 (s, 3H, CH₃pz); 2,07 (s, 3H, CH₃pz); 1,82 (m, 2H, CH₂^f); 1,70 (m, 1H, CHⁱ); 1,54 (m, 1H, CH^{i'}); 1,44 (m, 2H, CH₂^j).

¹³C-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 174,0 (CO); 173,4 (CO); 157,5 (C^l-Guanidina-L-Arg); 148,5 (C(3/5)pz); 142,8 (C(3/5)pz); 106,1 (C(4)pz); 52,6; 52,3; 51,9; 51,4; 49,5; 41,5; 39,7; 33,1; 30,8; 26,8; 23,7; 18,2; 11,0 (CH₃pz); 9,3 (CH₃pz).

3.4.1.4 – Ácido 2-[(4-{[2-(tert-butoxicarbonilamino)etil] [2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(carbamimidamido) pentanóico (**IV**)



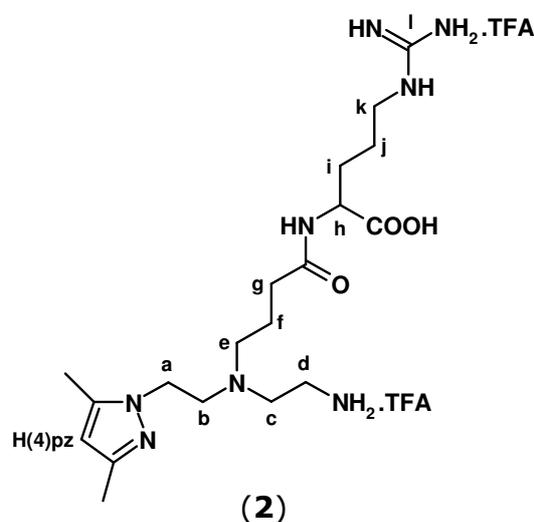
Dissolveu-se o intermediário **III** (140 mg, 0,215 mmol) numa solução de NaOH 2 N (3,5 mL, 3,564 mmol) e deixou-se em agitação, à temperatura ambiente, durante 22 horas. Após neutralização com HCl 2 N, evaporou-se a H₂O a pressão reduzida e o resíduo seco obtido foi extraído com CH₃OH. Os sólidos foram eliminados por centrifugação e o sobrenadante evaporado também a pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em H₂O, filtrado por um filtro Millipore de 0,22 μm e purificado por RP-HPLC (coluna: Waters μ Bondapak C18, **Método 1**). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 73 % (100 mg, 0,156 mmol).

RP-HPLC (t_R): 24,3 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm; **Método 1**)

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 5,99 (s, 1H, H(4)pz); 4,38 (t, 2H, CH₂^a); 4,15 (q, 1H, CH^h); 3,54 (t, 2H, CH₂^b); 3,29 (d largo, 2H, CH₂^{c/d}); 3,23 (d largo, 2H, CH₂^{c/d}); 3,15 (t, 2H, CH₂^g); 3,02 (t, 2H, CH₂^k); 2,30 (t, 2H, CH₂^e); 2,16 (s, 3H, CH₃pz); 1,88 (s, 3H, CH₃pz); 1,83 (m, 2H, CH₂^f); 1,73 (m, 1H, CHⁱ); 1,57 (m, 1H, CH^{i'}); 1,47 (m, 2H, CH₂^j); 1,21 (s, 9H, CH₃).

3.4.1.5 – Ácido 2-[(4-{[2-amino-etil] [2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino} butanoil)amino]-5-(carbamimidamido) pentanóico (**2**)



A uma solução de **IV** (100 mg, 0,156 mmol) em CH_2Cl_2 (1 mL) adicionou-se ácido trifluoroacético (3 mL, 40 mmol) e deixou-se reagir sob agitação, à temperatura ambiente, durante 3h. Após evaporação do solvente obteve-se um óleo que foi dissolvido em água e neutralizado com NaOH 2N. A água foi evaporada a pressão reduzida 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 H_2O , filtrado por filtro Millipore de 0,22 μm e purificado por RP-HPLC (coluna: Waters μ Bondapak C18, **Método 1**). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 79 % (80 mg, 0,123 mmol).

RP-HPLC (t_R): 17,8 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm ; **Método 1**)

IV (KBr, cm^{-1}): 3403 F $\nu(\text{NH}_2, -\text{NH}-, \text{OH})$; ~ 1676 F $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(-\text{NH}_2, \text{aminas})$ e $\delta(-\text{NH}-, \text{amida})$; 1430 M $\nu(\text{C}-\text{N}, \text{amida})$ e $\nu_s(\text{C}(\equiv\text{O})_2)$; 1204 e 1137 F $\nu(\text{C}-\text{N}, \text{aminas } 1^{\text{as}} \text{ e } 2^{\text{as}})$; 839 f; 801 f; 723 f.

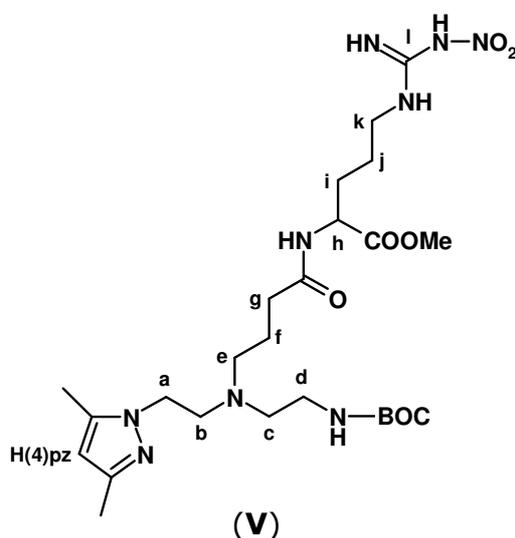
$^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 20°C, δ ppm): 5,78 (s, 1H, H(4)pz); 3,97 (q, 1H, CH^h); 3,91 (t, 2H, CH_2^a); 3,01 (t, 2H, CH_2^k); 2,82 (t, 2H, CH_2^c); 2,73 (t, 2H, CH_2^b); 2,62 (t, 2H, CH_2^d); 2,40 (t, 2H, CH_2^g); 2,08 (s, 3H, CH_3pz); 2,02 (t, 2H, CH_2^e); 1,98 (s, 3H, CH_3pz); 1,64 (m, 1H, CH^i); 1,51 (m, 3H, $\text{CH}_2^f + \text{CH}^j$); 1,44 (m, 2H, CH_2^j).

^{13}C -RMN (D_2O , 20°C , δ ppm): 180,7 (CO); 177,5 (CO); 165,4 (q, CF_3COO^-); 158,7 (C^{l} -Guanidina-L-Arg); 150,6 (C(3/5)pz); 143,5 (C(3/5)pz); 118,3 (q, CF_3COO^-); 107,3 (C(4)pz); 56,6 (C^{h}); 54,4 (C^{b}); 54,3 (C^{g}) 52,2 (C^{d}); 47,5 (C^{a}); 42,6 (C^{k}); 38,9 (C^{c}); 34,9 (C^{e}); 30,8 (C^{i}); 26,6 (C^{j}); 24,1 (C^{f}); 12,3 (CH_3pz); 12,0 (CH_3pz).

* A atribuição dos sinais dos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foi efectuada por intermédio de experiências bidimensionais (^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HSQC)

ESI-MS (+) (m/z): 425 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 213 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$; calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_3 = 424$.

3.4.1.6 – Pentanoato 2-[(4-{[2-(tert-butoxicarbonilamino)etil][2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(nitrocarbamimidamido) de metilo (**V**)



- Método de síntese 1

Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em **3.4.1.2** para o composto **III**, a partir do éster activado **II** (107 mg, 0,230 mmol) e da $\text{N}^{\omega}\text{-NO}_2\text{-L-ArgOMe}$ (77 mg, 0,288 mmol). O composto foi obtido sob a forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição resultantes da purificação por RP-HPLC.

Rendimento: 13 % (18 mg, 0,031 mmol).

- Método de síntese 2

A uma solução de precursor **I** (200 mg, 0,543 mmol) em DMF/ CH_3CN secos (3:1) adicionou-se NEt_3 seca (164 mg, 1,628 mmol) e HBTU (205 mg, 0,543 mmol), sob

agitação, em atmosfera de azoto. Após alguns minutos, adicionou-se N^{ω} -NO₂-L-ArgOMe (146 mg, 0,543 mmol) e a mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente. A reacção foi seguida por RP-HPLC e ao fim de 2 h todo o ligando de partida tinha já sido consumido. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo alaranjado obtido dissolvido numa solução de CH₃OH 10 % em H₂O, filtrado por um filtro Millipore de 0,22 μm e purificado por RP-HPLC (coluna: Waters μ Bondapak C18, **Método 1**). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 93 % (296 mg, 0,507 mmol).

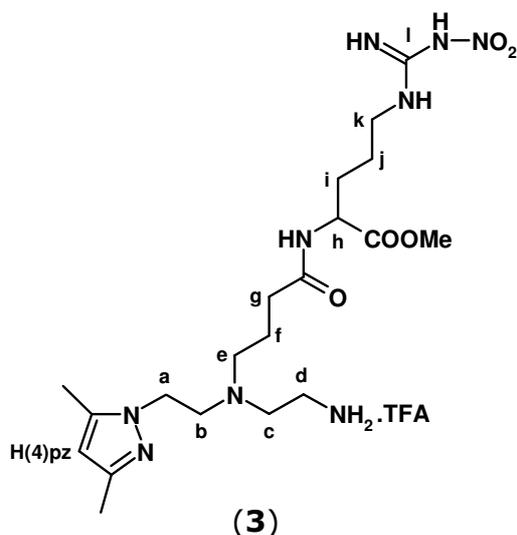
Rf: 0,90 (eluente: CHCl₃ 49 %/CH₃OH 49 %/NH₄OH 2 %)

RP-HPLC (t_R): 28,8 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm; **Método 1**)

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 6,07 (s, 1H, H(4)pz); 4,44 (t, 2H, CH₂^a); 4,24 (q, H, CH^h); 3,57 (s, 3H, OCH₃); 3,54 (t, 2H, CH₂^b); 3,31 (d largo, 2H, CH₂^{c/d}); 3,25 (d largo, 2H, CH₂^{c/d}); 3,17 (m, 4H, CH₂^g + CH₂^k); 2,38 (t, 2H, CH₂^e); 2,19 (s, 3H, CH₃pz); 2,13 (s, 3H, CH₃pz); 1,83 (m, 2H, CH₂^f); 1,74 (m, 1H, CHⁱ); 1,61 (m, 1H, CH^{i'}); 1,50 (m, 2H, CH₂^j); 1,21 (s, 9H, CH₃).

¹³C-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 176,8 (CO); 176,3 (CO); 165,3 (q, CF₃COO⁻); 161,0 (CO, BOC); 160,5 (C^l-Guanidina-N^ω-NO₂-L-Arg); 150,5 (C(3/5)pz); 147,5 (C(3/5)pz); 118,5 (q, CF₃COO⁻); 109,7 (C(4)pz); 83,9 (C(CH₃)₃); 70,7; 55,8; 55,4; 55,1 (OCH₃); 54,7; 53,6; 44,1; 42,7; 37,4; 33,9; 32,2; 29,7 (C(CH₃)₃); 21,3; 13,3 (CH₃pz); 12,3 (CH₃pz).

3.4.1.7 – Pentanoato 2-[(4-{[2-amino-etil][2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(nitrocarbamimidamido) de metilo (**3**)



A uma solução de **V** (215 mg, 0,368 mmol) em CH₂Cl₂ (1 mL) adicionou-se ácido trifluoroacético (3 mL, 40 mmol) 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 e neutralizado com NaOH 2N. 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 CH₃OH 10 % em H₂O, filtrado por um filtro Millipore de 0,22 µm e purificado por RP-HPLC (coluna: Waters µ Bondapak C18, **Método 1**). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 58 % (128 mg, 0,215 mmol).

RP-HPLC (t_R): 21,9 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 µm; **Método 1**)

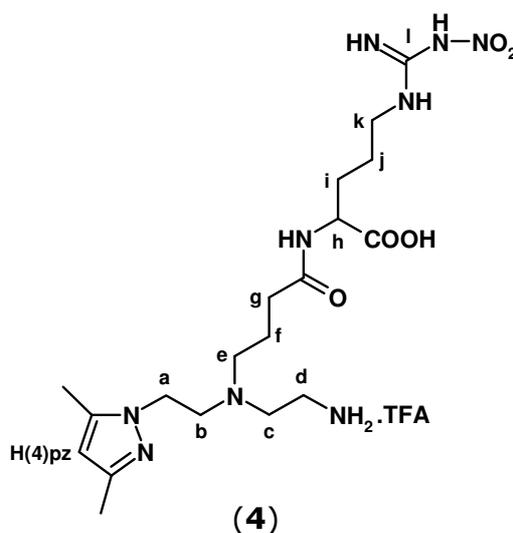
IV (KBr, cm⁻¹): 3405 F ν(NH₂, -NH-); ~ 1680 F ν(C=O), δ(-NH₂, amins), δ(-NH-, amida) e ν_{as}(NO₂); 1427 M ν(C-N, amida); 1279 M ν_s(NO₂); 1203 e 1134 F ν(C-N, amins 1^{as} e 2^{as}); 836 f; 800 f; 722 f.

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 5,81 (s, 1H, H(4)pz); 4,18 (m, 3H, CH₂^a + CH^h); 3,57 (s, 3H, OCH₃); 3,34 (t, 2H, CH₂^b); 3,25 (t largo, 2H, CH₂^{c/d}); 3,22 (t largo, 2H, CH₂^{c/d}); 3,10 (t largo, 2H, CH₂^k); 2,94 (t, 2H, CH₂^g); 2,21 (t, 2H, CH₂^e); 2,08 (s, 3H, CH₃pz); 1,99 (s, 3H, CH₃pz); 1,76 (m, 3H, CH₂^f + CHⁱ); 1,60 (m, 1H, CHⁱ); 1,49 (m, 2H, CH₂^j).

^{13}C -RMN (D_2O , 20°C , δ ppm): 176,9 (CO); 176,0 (CO); 165,6 (q, CF_3COO^-); 160,9 (C^{l} -Guanidina- N^{ω} - NO_2 -L-Arg); 151,4 ($\text{C}(3/5)\text{pz}$); 144,1 ($\text{C}(3/5)\text{pz}$); 118,5 (q, CF_3COO^-); 108,2 ($\text{C}(4)\text{pz}$); 55,3 (C^{b}); 55,0 (OCH_3); 54,6 (C^{g}); 51,9 (C^{h}); 50,9 (C^{c}); 44,9 (C^{a}); 42,6 (C^{k}); 36,6 (C^{d}); 33,9 (C^{e}); 29,8 (C^{i}); 26,0 (C^{j}); 21,6 (C^{f}); 14,2 (CH_3pz); 12,0 (CH_3pz).

ESI-MS (+) (m/z): 484 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{N}_9\text{O}_5 = 483$.

3.4.1.8 – Ácido 2-[(4-{[2-amino-etil] [2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino} butanoil)amino]-5-(nitrocarbamimidamido) pentanóico (**4**)



O composto **V** (81 mg, 0,139 mmol) foi dissolvido numa solução de HCl 3 N (5 mL, 15 mmol) e a solução resultante deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 72 h. A mistura reaccional foi neutralizada com NaOH 1 N, a H_2O evaporada a pressão reduzida e o resíduo seco foi extraído com CH_3OH . Os sólidos brancos formados foram eliminados por centrifugação e o sobrenadante evaporado sob vácuo. O resíduo obtido foi dissolvido numa solução de CH_3OH 10 % em H_2O , filtrado por um filtro Millipore de 0,22 μm e purificado por RP-HPLC (coluna: Waters μ Bondapak C18, **Método 1**). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 36 % (28,8 mg, 0,05 mmol).

RP-HPLC (t_{R}): 20,5 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm ; **Método 1**)

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

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 5,85 (s, 1H, H(4)pz); 4,44 (t, 2H, CH₂^a); 4,00 (q, H, CH^h); 3,45 (t, 2H, CH₂^b); 3,36 (t, 2H, CH₂^{c/d}); 3,17 (t, 2H, CH₂^{c/d}); 3,10 (t, 2H, CH₂^k); 2,95 (t, 2H, CH₂^g); 2,21 (t, 2H, CH₂^e); 2,09 (s, 3H, CH₃pz); 2,02 (s, 3H, CH₃pz); 1,72 (m, 2H, CH₂^f); 1,56 (m, 1H, CHⁱ); 1,45 (m, 1H, CHⁱ); 1,36 (m, 2H, CH₂^j).

¹³C-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 177,5 (CO); 176,8 (CO); 164,9 (q, CF₃COO⁻); 160,9 (C^l-Guanidina-N^ω-NO₂-L-Arg); 151,1 (C(3/5)pz); 145,9 (C(3/5)pz); 118,4 (q, CF₃COO⁻); 109,1 (C(4)pz); 55,5 (C^h); 54,7(C^b); 54,1(C^g); 51,8(C^d); 44,2 (C^a); 42,6 (C^k); 36,0 (C^c); 33,8 (C^e); 29,8 (Cⁱ); 26,0 (C^j); 21,0 (C^f); 13,6 (CH₃pz); 12,0 (CH₃pz).

* A atribuição dos sinais dos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN foi efectuada por intermédio de experiências bidimensionais (¹H-¹H COSY e ¹H-¹³C HSQC)

ESI-MS (+) (*m/z*): 470 [M+H]⁺; calculada para C₁₉H₃₅N₉O₅ = 469.

- Tentativa de síntese do composto 4 por via alternativa

O composto **V** (164 mg, 0,280 mmol) foi dissolvido numa solução de NaOH 1 N (3 mL, 3 mmol) e deixou-se sob agitação, à temperatura ambiente, durante 22 h. A mistura reaccional foi neutralizada com HCl 2 N, a água evaporada a pressão reduzida e o resíduo seco obtido foi extraído com metanol. Após eliminação do sólido formado por centrifugação evaporou-se o sobrenadante sob vácuo. O óleo obtido foi dissolvido numa solução TFA/CH₂Cl₂ (3:1) e deixou-se reagir sob agitação, à temperatura ambiente, durante 3 h. Após esse tempo a mistura reaccional foi tratada utilizando um procedimento igual ao descrito em **3.4.1.7**. O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 62 % (101 mg, 0,173 mmol).

* O controlo analítico do "composto **4**" purificado por RP-HPLC preparativo mostrou uma pureza superior a 95 %, no entanto, no espectro de ¹H-RMN é possível identificar, para além dos sinais correspondentes ao conjugado **4**, vários multipletos de menor intensidade e um singuleto adicional na zona característica do protão 4 do anel pirazolo, atribuíveis a uma possível lactama obtida por reacção intramolecular (~ 28 %).

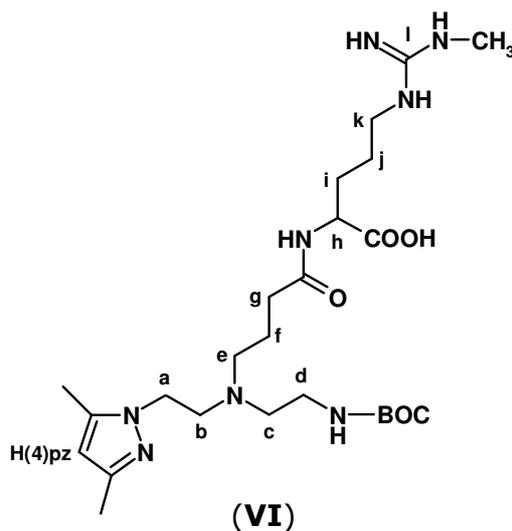
RP-HPLC (*t_R*): 20,1 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm; **Método 1**)

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 5,90 (s, 1H, H(4)pz); 4,33 (t, 2H, CH₂^a); 4,13 (q largo, 1H, CH^h); 3,53 (t, 2H, CH₂); 3,42 (t, 2H, CH₂); 3,29 (t, 2H, CH₂); 3,13 (m, 4H, CH₂);

2,26 (t, 2H, CH₂^e); 2,09 (s, 3H, CH₃pz); 2,02 (s, 3H, CH₃pz); 1,81 (m, 2H, CH₂^f); 1,77 (m, 1H, CHⁱ); 1,61 (m, 1H, CH^{i'}); 1,51 (m, 2H, CH₂^j).

¹H-RMN da possível lactama (D₂O, 20°C, δ ppm): 5,93 (s, ~ 0,29H, H(4)pz); 4,53 (d largo); 4,05 (t largo); 3,87 (t largo); 2,12 (s, ~0,31H, CH₃pz).

3.4.1.9 – Ácido 2-[(4-{[2-(tert-butoxicarbonilamino)etil] [2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanoil)amino]-5-(metilcarbamidamido) pentanóico (VI)



Este composto foi preparado utilizando um procedimento análogo ao descrito em **3.4.1.2** para o composto **III**, com a exceção de se ter usado um excesso de éster activado **II** (130 mg, 0,279 mmol) que reagiu com a N^ω-CH₃-L-ArgOH (25 mg, 0,101 mmol). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição resultantes da purificação por RP-HPLC.

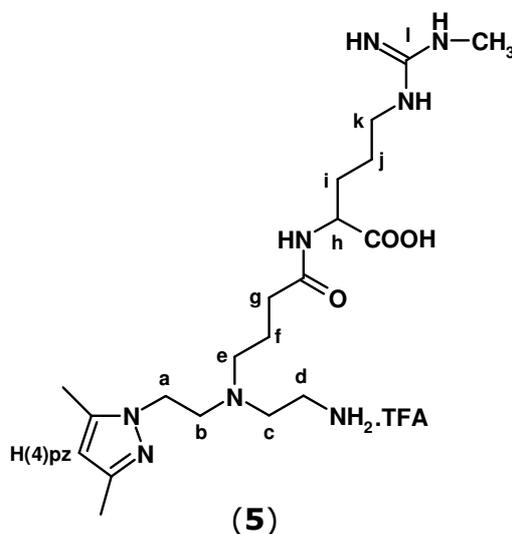
Rendimento: 55 % (30 mg, 0,055 mmol),

Rf: 0,80 (eluente: CHCl₃ 49 %/CH₃OH 49 %/NH₄OH 2 %)

RP-HPLC (t_R): 27,2 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm; **Método 1**)

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 6,07 (s, 1H, H(4)pz); 4,44 (t largo, 2H, CH₂^a); 4,18 (q, 1H, CH^h); 3,55 (t largo, 2H, CH₂^b); 3,31 (d largo, 2H, CH₂^{c/b}); 3,27 (d largo, 2H, CH₂^{c/b}); 3,17 (t largo, 2H, CH₂^g); 3,00 (t, 2H, CH₂^k); 2,63 (s, 3H, NHCH₃); 2,36 (t, 2H, CH₂^e); 2,20 (s, 3H, CH₃pz); 2,13 (s, 3H, CH₃pz); 1,84 (m, 2H, CH₂^f); 1,75 (m, 1H, CHⁱ); 1,60 (m, 1H, CH^{i'}); 1,47 (m, 2H, CH₂^j); 1,22 (s, 9H, CH₃).

3.4.1.10 – Ácido 2-[(4-{[2-amino-etil] [2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino} butanoil)amino]-5-(metilcarbamimidamido) pentanóico (**5**)



Este composto foi preparado e purificado utilizando um procedimento análogo ao descrito em **3.4.1.7** para o composto **3**, por hidrólise do intermediário **VI** (30 mg, 0,055 mmol) com TFA/CH₂Cl₂ (3:1). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 79 % (24mg, 0,043 mmol).

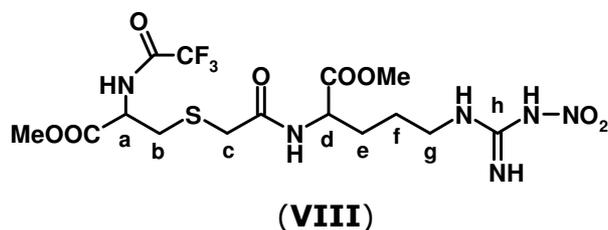
RP-HPLC (*t_R*): 19,5 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm; **Método 1**)

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 5,89 (s, 1H, H(4)pz); 4,30 (t, 2H, CH₂^a); 4,11 (q, 1H, CH^h); 3,53 (t, 2H, CH₂^b); 3,44 (t, 2H, CH₂^c); 3,29 (t, 2H, CH₂^d); 3,09 (m, 4H, CH₂^g + CH₂^k); 2,67 (s, 3H, NHCH₃); 2,30 (t, 2H, CH₂^e); 2,13 (s, 3H, CH₃pz); 2,04 (s, 3H, CH₃pz); 1,85 (t, 2H, CH₂^f); 1,77 (m, 1H, CHⁱ); 1,62 (m, 1H, CH^{i'}); 1,50 (m, 2H, CH₂^j).

¹³C-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 178,1 (CO); 176,8 (CO); 164,9 (q, CF₃COO⁻); 158,5 (C^l-Guanidina-N^o-CH₃-L-Arg); 151,7 (C(3/5)pz); 144,6 (C(3/5)pz); 120,4 (q, CF₃COO⁻); 108,5 (C(4)pz); 55,6 (C^h); 55,1 (C^b); 54,6 (C^g); 51,9 (C^d); 44,4 (C^a); 42,5 (C^k); 36,1 (C^c); 33,9 (C^e); 29,8 (NHCH₃); 29,4 (Cⁱ); 26,7 (C^j); 21,2 (C^f); 14,1 (CH₃pz); 12,0 (CH₃pz).

ESI-MS (+) (*m/z*): 439 [M+H]⁺, 220 [M+2H]²⁺; calculada para C₂₀H₃₈N₈O₃ = 438.

3.4.1.11 – Pentanoato 2-({[2-(trifluoroacetilamino)-3-metoxi-3-oxopropil]tio]acetil} amino)-5-(nitrocarbamimidamido) de metilo (**VIII**)



A uma solução de N^{ω} -NO₂-L-ArgOMe (81 mg, 0,302 mmol) em DMF/H₂O (2,5 mL, 4:1) foi adicionado NEt₃ (146 mg, 1,452 mmol). Após 60 minutos em agitação à temperatura ambiente, a reacção foi arrefecida a 0° C em banho de gelo e adicionou-se o composto **VII** (110 mg, 0,242 mmol, **secção 3.3**) dissolvido em DMF (2 mL). À solução anterior foi adicionada mais NEt₃ (24 mg, 0,242 mmol) e deixou-se reagir à temperatura ambiente durante 20 horas. O solvente de reacção foi evaporado na linha de vazio e o resíduo resultante purificado por cromatografia em coluna de sílica gel com um gradiente de CH₃OH (3-8 %)/CHCl₃. O produto foi obtido na forma de um óleo amarelado. Rendimento: 86 % (105 mg, 0,208 mmol).

Rf: 0,5 (eluente: 15 % CH₃OH/CHCl₃)

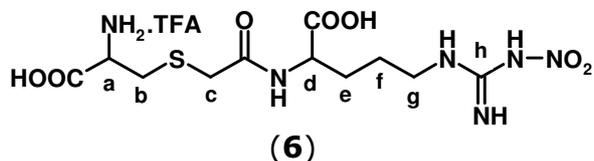
RP-HPLC (t_R): 21,3 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm; **Método 2**)

¹H-RMN (CD₃OD, 20°C, δ ppm): 4,76 (q, 1H, CH^a); 4,46 (q, 1H, CH^d); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,72 (s, 3H, OCH₃); 3,36 – 3,20 (m, 4H, CH₂^c + CH₂^g); 2,95 (m, 2H, CH₂^b); 1,92 (m, 1H, CH^e); 1,73 (m, 3H, CH^{e'} + CH₂^f).

¹³C-RMN (CD₃OD, 20°C, δ ppm): 176,0 (C=O); 174,7 (C=O); 173,5 (C=O); 163,4 (C^h-Guanidina-N^ω-NO₂-L-Arg); 81,9 (CF₃COONHR); 55,9; 55,8; 55,7; 55,3; 44,0; 37,8; 36,3; 32,0; 28,4.

¹⁹F-RMN (CD₃OD, δ ppm): -76,01 (s)

3.4.1.12 – Ácido 2-({[(2-amino-2-carboxietil)tio]acetil}amino)-5-(nitrocarbamimidamido) pentanóico (**6**)



A uma solução de **VIII** (55 mg, 0,109 mmol) em CH₃OH/H₂O (1:1) foi adicionado K₂CO₃ (154 mg, 1,12 mmol) em excesso e deixou-se reagir à temperatura ambiente sob agitação. A reacção foi seguida por RP-HPLC analítico e ao fim de 120 horas observou-se a formação de um pico maioritário. A mistura foi centrifugada e o sólido branco correspondente a K₂CO₃ eliminado. O sobrenadante foi neutralizado com HCl 3N e a solução resultante concentrada, filtrada com um filtro Millipore de 0,22 µm e purificada por RP-HPLC (coluna: Waters µ Bondapak C18, **Método 2**). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 51 % (27 mg, 0,055 mmol).

RP-HPLC (t_R): 13,4 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 µm; **Método 2**)

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 4,25 (q, 1H, CH^d); 4,09 (q, 1H, CH^a); 3,22 (s, 2H, CH₂^c); 3,14 (t, 2H, CH₂^g); 3,07 (m, 1H, CH^b); 2,95 (m, 1H, CH^{b'}); 1,83 (m, 1H, CH^e); 1,69 (m, 1H, CH^{e'}); 1,55 (m, 2H, CH₂^f).

¹³C-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 177,2 (CO); 174,2 (CO); 172,7 (CO); 165,1 (q, CF₃COO⁻); 160,9 (C^h-Guanidina- N^ω-NO₂-L-Arg); 120,4 (q, CF₃COO⁻); 54,8 (C^d); 54,4 (C^a); 42,5 (C^g); 36,8 (C^c); 34,1 (C^b); 29,7 (C^e); 25,9 (C^f).

* A atribuição dos sinais dos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN foi efectuada por intermédio de experiências bidimensionais (¹H-¹H COSY e ¹H-¹³C HSQC)

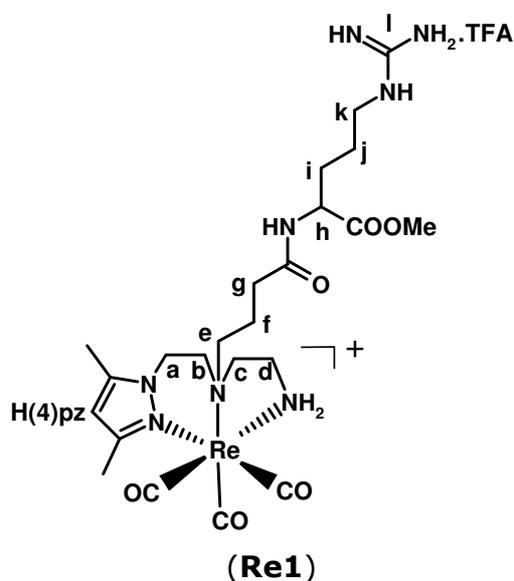
¹⁹F-RMN (CD₃OD, δ ppm): -76,15 (s, CF₃COO⁻ contra ião)

ESI-MS (-) (m/z): 379 [M-H]⁻; calculada para C₁₁H₂₀N₆O₇S = 380.

3.4.2 – Complexos Re1 - Re5

Os complexos do tipo $fac-[Re(k^3-L)(CO)_3]^+$ ($L = \mathbf{1}, \mathbf{Re1}; \mathbf{2}, \mathbf{Re2}; \mathbf{3}, \mathbf{Re3}; \mathbf{4}, \mathbf{Re4}; \mathbf{5}, \mathbf{Re5}$) foram preparados por refluxo de uma solução metanólica ($\mathbf{Re1}$ e $\mathbf{Re3}$) ou aquosa ($\mathbf{Re2}, \mathbf{Re4}$ e $\mathbf{Re5}$) do precursor $(NEt_4)_2[ReBr_3(CO)_3]$ com os respectivos ligandos, na estequiometria 1:1, durante ~ 18 horas sob atmosfera de azoto. O solvente foi evaporado e o resíduo lavado com $CHCl_3$. O resíduo obtido foi redissolvido em H_2O , formando-se um sólido branco que foi eliminado por centrifugação. O sobrenadante foi filtrado por um filtro Millipore de $0,22 \mu m$ e purificado por RP-HPLC (coluna: Waters μ Bondapak C18, **Método 1**).

3.4.2.1 – $fac-[Re(k^3-L)(CO)_3]^+$ ($L = \mathbf{1}, \mathbf{Re1}$)



A partir de 13 mg (0,020 mmol) de **1** obtiveram-se 10 mg (0,012mmol) do complexo **Re1**, sob a forma um óleo transparente.

Rendimento: 61 %.

RP-HPLC (t_R): 26,2 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm ; **Método 1**)

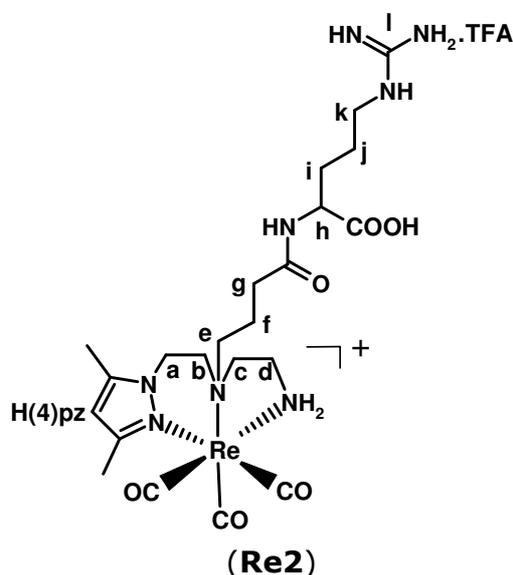
1H -RMN (D_2O , $20^\circ C$, δ ppm): 6,00 (s, 1H, H(4)pz); 5,07 (s largo, 1H, NH_2); 4,33 (m largo, 1H, CH^a); 4,26 (m largo, 1H, CH^h); 4,04 (m largo, 1H, $CH^{a'}$); 3,66 (s largo, 1H, NH_2); 3,59 (s, 3H, OCH_3); 3,46 (t largo, 1H, CH^g); 3,28 (m largo, 2H, $CH^{g'}$ + CH^b); 3,02 (t, 3H, CH_2^k + CH^d); 2,70 (m largo, 2H, CH^c + $CH^{c'}$); 2,55 (t largo, 1H, CH^b); 2,37 (m largo, 1H, $CH^{d'}$); 2,25 (m largo, 2H, CH^e + $CH^{e'}$); 2,24 (s, 3H, CH_3pz); 2,13 (s, 3H,

CH₃pz); 2,05 (m largo, 1H, CH^f); 1,90 (m largo, 1H, CH^{f'}); 1,75 (m, 1H, CHⁱ); 1,59 (m, 1H, CH^{i'}); 1,50 (m largo, 2H, CH₂^j).

¹³C-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 3 x ~ 196,2 (C≡O); 177,6 (CO); 176,3 (CO); 165,0 (q, CF₃COO⁻); 159,3 (C^l-Guanidina-L-Arg); 155,8 (C(3/5)pz); 146,3 (C(3/5)pz); 120,4 (q, CF₃COO⁻); 109,5 (C(4)Pz); 67,6 (C^g); 63,1 (C^c); 55,0 (OCH₃); 54,8 (C^h); 54,6 (C^b); 48,9 (C^a); 44,0 (C^d); 42,4 (C^k); 34,3 (C^e); 29,7 (Cⁱ); 26,7 (C^j); 22,1 (C^f); 17,5 (CH₃pz); 13,0 (CH₃pz).

ESI-MS (+) (m/z): 709 [M+H]⁺, 355 [M+2H]²⁺; calculada para C₂₃H₃₈N₈O₆Re = 708.

3.4.2.2 – *fac*-[Re(k³-L)(CO)₃]⁺ (L = **2**, **Re2**)



- Método directo de síntese por reacção do conjugado **2** com precursor *fac*-[ReBr₃(CO)₃]

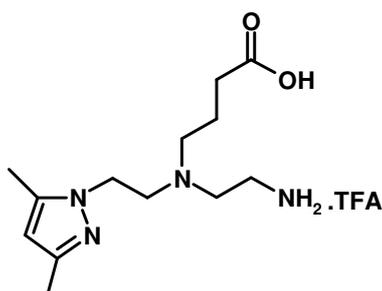
A partir de 10 mg (0,015 mmol) de **2** obtiveram-se 10 mg (0,012 mmol) do complexo **Re2**, sob a forma de um óleo transparente.

Rendimento: 80 %.

- Método alternativo de síntese: método de pré-ligação da unidade *fac*-[Re(CO)₃]⁺ ao ligando bifuncional

O complexo **Re2** foi também sintetizado segundo o método de síntese a seguir descrito:

1) Síntese de IX



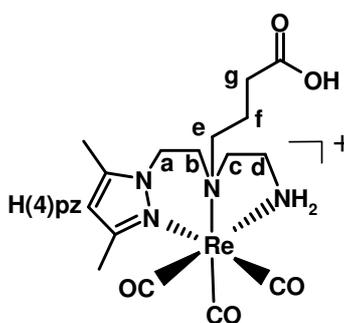
(IX)

A uma solução de **I** (80 mg, 0,217 mmol, **secção 3.3**) em CH₂Cl₂ (1 mL) adicionou-se ácido trifluoroacético (3 mL, 40 mmol) e deixou-se reagir sob agitação, à temperatura ambiente, durante 3h. Após evaporação do solvente o óleo obtido foi triturado com éter dietílico formando-se um sólido amarelado.

Rendimento: 90 % (75 mg, 0,196 mmol).

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 6,11 (s, 1H, H(4)pz); 4,50 (t, 2H, CH₂); 3,53 (t, 2H, CH₂); 3,43 (d, 2H, CH₂); 3,27 (d, 2H, CH₂); 3,14 (t, 2H, CH₂); 2,29 (t, 2H, CH₂); 2,16 (s, 3H, CH₃pz); 2,11 (s, 3H, CH₃pz); 1,79 (m, 2H, CH₂).

2) Síntese de X



(X)

O complexo **X** foi obtido por refluxo de uma solução aquosa do precursor (NEt₄)₂[ReBr₃(CO)₃] (100 mg, 0,131 mmol) com o ligando **IX** (50 mg, 0,131 mmol), durante ~18 horas sob atmosfera de azoto. O produto bruto foi purificado por RP-HPLC de acordo com os procedimentos anteriormente descritos (**secção 3.4.2**). O produto foi obtido na forma de um sólido amarelado após evaporação dos solventes de eluição.

Rendimento: 71 % (50 mg, 0,093 mmol).

IV (KBr, cm^{-1}): 2028 M, 1914 e 1888 F $\nu(\text{C}\equiv\text{O})$; 1668 F $\nu(\text{C}=\text{O})$; 1421 M; 1199 M; 1131 M; 801 f; 718 f; 655 f.

^1H -RMN (D_2O , 20°C , δ ppm): 6,01 (s, 1H, H(4)pz); 5,07 (s largo, 1H, NH_2); 4,33 (dd, 1H, CH^a); 4,07 (m, 1H, $\text{CH}^{a'}$); 3,62 (s largo, 1H, NH_2); 3,50 (m, 1H, CH^g); 3,27 (m, 2H, $\text{CH}^g + \text{CH}^b$); 3,03 (s largo, 1H, CH^d); 2,72 (d, 2H, $\text{CH}^c + \text{CH}^{c'}$); 2,54 (t largo, 1H, $\text{CH}^{b'}$); 2,37 (m largo, 1H, $\text{CH}^{d'}$); 2,33 (t, 2H, $\text{CH}^e + \text{CH}^{e'}$); 2,24 (s, 3H, CH_3pz); 2,14 (s, 3H, CH_3pz); 2,04 (m, 1H, CH^f); 1,88 (m largo, 1H, $\text{CH}^{f'}$).

^{13}C -RMN (D_2O , 20°C , δ ppm): 3 x $\sim 196,2$ ($\text{C}\equiv\text{O}$); 179,8 (CO); 155,7 (C(3/5)pz); 146,3 (C(3/5)pz); 109,8 (C(4)Pz); 67,8 (C^g); 63,2 (C^c); 54,5 (C^b); 49,1 (C^a); 44,2 (C^d); 33,1 (C^e); 21,6 (C^f); 17,3 (CH_3pz); 12,9 (CH_3pz).

* A atribuição dos sinais dos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foi efectuada por intermédio de experiências bidimensionais (^1H - ^1H COSY e ^1H - ^{13}C HSQC)

3) Síntese de Re2

A uma solução de **X** (30 mg, 0,056 mmol) e NHS (7,2 mg, 0,064 mmol) em DMF (2 mL) adicionou-se lentamente uma solução de DCC (13,2 mg, 0,064 mmol) em DMF (0,5 mL). A solução foi mantida sob agitação em atmosfera de azoto à temperatura ambiente, durante 24 h. À solução anterior adicionou-se uma solução de L-ArgOH (11,2 mg, 0,064 mmol) e de NEt_3 (19,4 mg, 0,192 mmol) dissolvidos em H_2O (1 mL). A mistura resultante foi agitada durante mais 16 h. O solvente foi evaporado sob vácuo e o resíduo obtido dissolvido em água. Em seguida, o precipitado de ureia formado foi removido por centrifugação e o sobrenadante filtrado por um filtro Millipore de $0,22\ \mu\text{m}$ e purificado por RP-HPLC (coluna: Waters μ Bondapak C18, **Método 1**). O produto foi obtido na forma de um óleo transparente após evaporação dos solventes de eluição. Rendimento: 38 % (16 mg, 0,019 mmol, rendimento calculado com base no complexo **X** que não reagiu).

RP-HPLC (t_R): 25,2 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm ; **Método 1**)

IV (KBr, cm^{-1}): 3422 F $\nu(\text{NH}_2, -\text{NH}-, \text{OH})$; 2029 e 1915 F $\nu(\text{C}\equiv\text{O})$; ~ 1676 F $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta(-\text{NH}_2, \text{aminas})$ e $\delta(-\text{NH}-, \text{amida})$; 1427 M $\nu(\text{C}-\text{N}, \text{amida})$ e $\nu_s(\text{C}(=\text{O})_2)$; 1203 e 1135 F $\nu(\text{C}-\text{N}, \text{aminas } 1^{\text{as}} \text{ e } 2^{\text{as}})$; 837 f; 801 f; 722 f.

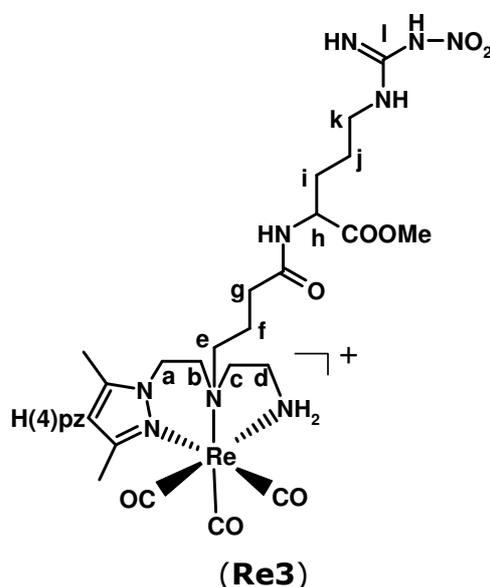
$^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 20°C , δ ppm): 5,98 (s, 1H, H(4)pz); 5,03 (s largo, 1H, NH_2); 4,30 (m largo, 1H, CH^a); 4,22 (m largo, 1H, CH^h); 4,02 (m largo, 1H, $\text{CH}^{a'}$); 3,62 (s largo, 1H, NH_2); 3,45 (t largo, 1H, CH^g); 3,24 (m largo, 2H, $\text{CH}^{g'} + \text{CH}^b$); 3,03 (t, 3H, $\text{CH}_2^k + \text{CH}^d$); 2,69 (m largo, 2H, $\text{CH}^c + \text{CH}^{c'}$); 2,52 (t largo, 1H, $\text{CH}^{b'}$); 2,31 (m largo, 1H, $\text{CH}^{d'}$); 2,23 (m largo, 2H, $\text{CH}^e + \text{CH}^{e'}$); 2,21 (s, 3H, CH_3pz); 2,11 (s, 3H, CH_3pz); 2,02 (m largo, 1H, CH^f); 1,89 (m largo, 1H, CH^f); 1,77 (m, 1H, CH^i); 1,62 (m, 1H, $\text{CH}^{i'}$); 1,53 (m largo, 2H, CH_2^j).

$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O , 20°C , δ ppm): 3 x $\sim 196,4$ ($\text{C}\equiv\text{O}$); 177,6 (CO); 176,4 (CO); 165,3 (q, CF_3COO^-); 159,0 (C^l -Guanidina-L-Arg); 156,0 ($\text{C}(3/5)\text{pz}$); 146,5 ($\text{C}(3/5)\text{pz}$); 118,6 (q, CF_3COO^-); 110,0 ($\text{C}(4)\text{Pz}$); 67,9 (C^g); 63,4 (C^c); 54,8 (C^h); 54,6 (C^b); 49,2 (C^a); 44,4 (C^d); 42,8 (C^k); 34,6 (C^e); 29,9 (C^i); 27,0 (C^j); 22,4 (C^f); 17,6 (CH_3pz); 13,1 (CH_3pz).

* A atribuição dos sinais dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ e $^{13}\text{C-RMN}$ foi efectuada por intermédio de experiências bidimensionais ($^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ e $^1\text{H-}^{13}\text{C HSQC}$)

ESI-MS (+) (m/z): 695 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 348 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$; calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_6\text{Re} = 694$.

3.4.2.3 – *fac*- $[\text{Re}(\text{k}^3\text{-L})(\text{CO})_3]^+$ (L = **3**, **Re3**)



A partir de 40 mg (0,067 mmol) de **3** obtiveram-se 38 mg (0,050mmol) do complexo **Re3**, sob a forma um óleo transparente.

Rendimento: 75 %.

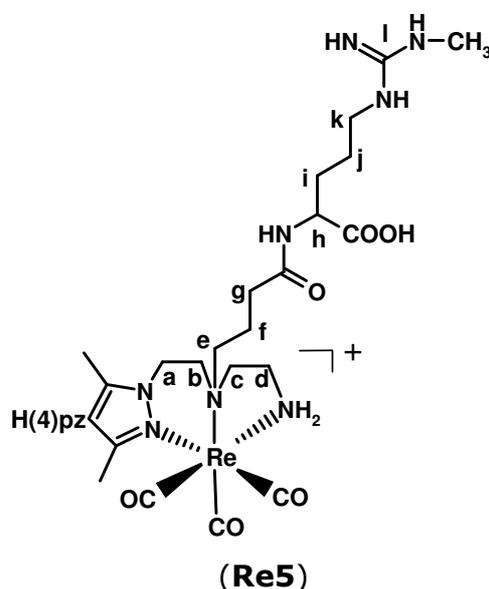
RP-HPLC (t_r): 29,8 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm ; **Método 1**)

RP-HPLC (t_R): 27,3 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm ; **Método 1**)
 $^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 20°C, δ ppm): 5,98 (s, 1H, H(4)pz); 5,06 (s largo, 1H, NH_2); 4,33 (m largo, 1H, CH^a); 4,25 (m largo, 1H, CH^h); 4,00 (m largo, 1H, $\text{CH}^{a'}$); 3,63 (s largo, 1H, NH_2); 3,44 (t largo, 1H, CH^g); 3,23 (m largo, 2H, $\text{CH}^{g'}$ + CH^b); 3,12 (t largo, 2H, CH_2^k); 3,00 (m largo, 1H, CH^d); 2,70 (m largo, 2H, CH^c + $\text{CH}^{c'}$); 2,49 (t largo, 1H, $\text{CH}^{b'}$); 2,30 (m largo, 1H, $\text{CH}^{d'}$); 2,24 (m largo, 2H, CH^e + $\text{CH}^{e'}$); 2,21 (s, 3H, CH_3pz); 2,11 (s, 3H, CH_3pz); 2,05 (m largo, 1H, CH^f); 1,90 (m largo, 1H, $\text{CH}^{f'}$); 1,75 (m largo, 1H, CH^i); 1,65 (m largo, 1H, $\text{CH}^{i'}$); 1,58 (m largo, 2H, CH_2^j).

$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O , 20°C, δ ppm): 3 x \sim 196,5 ($\text{C}\equiv\text{O}$); 177,3 (CO); 160,8 (C^l -Guanidina- N^ω - NO_2 -L-Arg); 155,6 (C(3/5)pz); 146,1 (C(3/5)pz); 109,6 (C(4)Pz); 66,3 (C^g); 63,1 (C^c); 54,5 (C^h); 54,3 (C^b); 48,8 (C^a); 44,1 (C^d); 42,5 (C^k); 34,4 (C^e); 29,8 (C^i); 26,3 (C^j); 22,1 (C^f); 17,2 (CH_3pz); 12,7 (CH_3pz).

ESI-MS (+) (m/z): 740 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_8\text{Re} = 739$.

3.4.2.5 – *fac*- $[\text{Re}(\text{k}^3\text{-L})(\text{CO})_3]^+$ (L = 5, Re5)



A partir de 10 mg (0,018 mmol) de **5** obtiveram-se 7 mg (0,010 mmol) do complexo **Re5**, sob a forma um óleo transparente.

Rendimento: 55 %.

RP-HPLC (t_R): 26,0 min (coluna analítica EC 250/4 Nucleosil C18, 100-5 μm ; **Método 1**)

¹H-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): 6,00 (s, 1H, H(4)pz); 5,03 (s largo, 1H, NH₂); 4,32 (m largo, 1H, CH^a); 4,21 (m largo, 1H, CH^h); 4,04 (m largo, 1H, CH^{a'}); 3,67 (s largo, 1H, NH₂); 3,47 (t largo, 1H, CH^g); 3,26 (m largo, 2H, CH^{g'} + CH^b); 3,05 (t, 3H, CH₂^k + CH^d); 2,73 (m largo, 2H, CH^c + CH^{c'}); 2,63 (s, 3H, N^ω-CH₃-L-Arg); 2,54 (m largo, 1H, CH^{b'}); 2,35 (m largo, 1H, CH^{d'}); 2,24 (2H, CH^e + CH^{e'}); 2,24 (s, 3H, CH₃pz); 2,13 (s, 3H, CH₃pz); 2,03 (m largo, 1H, CH^f); 1,90 (m largo, 1H, CH^{f'}); 1,74 (m, 1H, CHⁱ); 1,62 (m, 1H, CH^{i'}); 1,51 (m largo, 2H, CH₂^j).

¹³C-RMN (D₂O, 20°C, δ ppm): ~ 195,6; 177,6 (CO); 160,0 (C^l-Guanidina-N^ω-CH₃-L-Arg); 155,7 (C(3/5)pz); 146,2 (C(3/5)pz); 109,7 (C(4)Pz); 67,5 (C^g); 63,1 (C^c); 54,7 (C^h); 54,3 (C^b); 48,9 (C^a); 44,2 (C^d); 42,5 (C^k); 34,3 (C^e); 29,7 (Cⁱ); 29,3 (N^ω-CH₃); 26,8 (C^j); 22,1 (C^f); 17,3 (CH₃pz); 12,8 (CH₃pz).

ESI-MS (+) (*m/z*): 709 [M+H]⁺; calculada para C₂₃H₃₈N₈O₆Re = 708.

3.5 – PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS DE ^{99m}Tc

As manipulações das substâncias radioactivas (^{99m}Tc) foram efectuadas em condições de protecção e segurança radiológica, com um visor de vidro impregnado com 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 foi monitorizada por leitura de dosímetro individual de corpo e mãos.

3.5.1 – Preparação do precursor *fac*-[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺

O Na[^{99m}TcO₄] foi obtido por eluição de um gerador ⁹⁹Mo/^{99m}Tc (Mallinckrodt - Ultra-TechneKow[®] FM ou ELUMATIC III[®]) com uma solução de NaCl 0,9 %. A actividade do eluído (~ 20 mCi, ~ 5 mL) foi medida numa câmara de ionização (Aloka, Curimeter IGC-3, Tokyo, Japan).

O precursor *fac*-[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ é obtido fazendo reagir o Na[^{99m}TcO₄] (1,5 - 2 mL, ~ 8 mCi) com um kit liofilizado comercialmente disponível (*Isolink*[®]), durante 30 minutos a 100°C. Após reacção e arrefecimento em banho de água, a solução do kit foi neutralizada com ~ 170 µL de HCl 1M, para eliminar o excesso de boranocarbonato, e diluída com soro fisiológico (~ 3 mL de NaCl 0,9 %) ou tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 (~ 3

mL). A determinação do rendimento e pureza radioquímica foi efectuada por RP-HPLC (EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Macherey Nagel, **Método 1**).

3.5.2 – Preparação dos complexos $^{99m}\text{Tc1}$ – $^{99m}\text{Tc6}$

Num frasco, previamente purgado com azoto e selado com tampa de borracha e cápsula de alumínio, fez-se reagir 900 μL de uma solução de $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ ($\sim 1,5$ mCi) com alíquotas de 100 μL de soluções de diferentes concentrações do respectivo conjugado (10^{-3} – 10^{-4} M), de modo a obter-se uma concentração final de $\sim 10^{-4}$ – 10^{-5} M. As condições de reacção foram optimizadas para cada um dos conjugados no que diz respeito ao pH, tipo de meio reaccional (NaCl 0,9 % ou tampão fosfato 0,2 M pH 7,4), tempo, à concentração final de ligando e à temperatura. O rendimento foi determinado por RP-HPLC (EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Macherey Nagel, **Método 1**). Os complexos de ^{99m}Tc foram caracterizados por comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção dos complexos análogos de Re(I).

3.5.2.1 – Optimização das condições de obtenção de $^{99m}\text{Tc1}$ – $^{99m}\text{Tc6}$

3.5.2.1.1 - $^{99m}\text{Tc1}$: Reacção do $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com o conjugado 1

Entrada	Rendimento		[L] (M)	tempo (min)	Temp. (°C)	pH	t. retenção (min)	
	(%)						$^{99m}\text{Tc1}$ (éster)	$^{99m}\text{Tc2}$ (ácido)
	$^{99m}\text{Tc1}$	$^{99m}\text{Tc2}$						
1	-	97,71	5×10^{-5}	30	100			
2	-	-	5×10^{-5}	30	37	7,0 – 7,4		
3	-	1,51	5×10^{-5}	30	50	(NaCl 0,9 %)	29,6 26,8	
4	0,69	3,34	1×10^{-4}	30	50			
5	-	2,90	1×10^{-4}	60	100	3 - 4 (NaCl 0,9 %)		

* Nas diferentes condições de reacção testadas observou-se sempre hidrólise da função éster com a consequente formação do complexo $^{99m}\text{Tc2}$

3.5.2.1.2 - $^{99m}\text{Tc}2$: Reacção do $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com o conjugado 2

Entrada	Rendimento		[L] (M)	tempo (min)	Temp. (°C)	pH	t. retenção (min)	
	($^{99m}\text{Tc}2$) (%)							
1	94,50		1×10^{-4}					
2	93,44		5×10^{-5}	30	100	7,0 - 7,4 (NaCl 0,9 %)	26,6	
3	56,85		1×10^{-5}					

3.5.2.1.3 - $^{99m}\text{Tc}3$: Reacção do $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com o conjugado 3

Entrada	Rendimento		[L] (M)	tempo (min)	Temp. (°C)	pH	t. retenção (min)	
	($^{99m}\text{Tc}3$ $^{99m}\text{Tc}4$) (%)							
	(éster)	(ácido)					(éster)	(ácido)
1	21,38	-	5×10^{-5}	30	100	4 - 5 (NaCl 0,9 %)		
2	29,83	5,80	5×10^{-5}	30	75	7,4		
3	17,15	80,60	5×10^{-5}	30	100	(tampão fosfato 0,2 M pH 7,4)	29,2	27,6
4	5,03	87,03	5×10^{-5}	30	100	7,0 - 7,4 (NaCl 0,9 %)		

* Nas condições apresentadas nas **entradas 1,2 e 3** é possível evitar a hidrólise total da função éster do complexo $^{99m}\text{Tc}3$

3.5.2.1.4 - $^{99m}\text{Tc}4$: Reacção do $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com o conjugado 4

<i>Entrada</i>	Rendimento		tempo (min)	Temp. (°C)	pH	t. retenção (min)
	(%)	[L] (M)				
	$^{99m}\text{Tc}4$					
1	86,93	6×10^{-5}	30	100	7,4 (tampão fosfato 0,2 M pH 7,4)	27,4
2	77,40	6×10^{-5}	30	100	7,0 - 7,4	
3	82,74	6×10^{-5}	45	100	(NaCl 0,9 %)	

3.5.2.1.5 - $^{99m}\text{Tc}5$: Reacção do $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com o conjugado 5

<i>Entrada</i>	Rendimento		tempo (min)	Temp. (°C)	pH	t. retenção (min)
	(%)	[L] (M)				
	$^{99m}\text{Tc}5$					
1	93,72	5×10^{-5}	45	100	7,0 - 7,4 (NaCl 0,9 %)	26,4

3.5.2.1.6 - $^{99m}\text{Tc}6$: Reacção do $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com o conjugado 6

<i>Entrada</i>	Rendimento		tempo (min)	Temp. (°C)	pH	t. retenção (min)
	(%)	[L] (M)				
	$^{99m}\text{Tc}6$					
1	85	1×10^{-4}		50		
2	97	1×10^{-4}	45	75	7,0 - 7,4 (NaCl 0,9 %)	21,0
3	94	5×10^{-5}		75		

3.6 – LIPOFILIA

A lipofilia dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$, $^{99m}\text{Tc}4$, $^{99m}\text{Tc}5$ e $^{99m}\text{Tc}6$ 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: em frascos de 200 μL , capsulados e purgados com azoto, fez-se reagir 20 μL de conjugado (solução 1 mM) com 180 μL de solução do precursor $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, durante 45 minutos a 100° C. A pureza radioquímica (~100 %) foi determinada por RP-HPLC (EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Macherey Nagel, **Método 1**).

Em dois tubos de centrifuga (dois ensaios em paralelo) contendo 1 mL de PBS adicionou-se 1 mL de n-octanol, agitando-se de seguida, em vórtex durante 1 minuto. Seguidamente, adicionou-se 50 μL do complexo radioactivo em estudo a cada um dos tubos, agitou-se novamente em vórtex durante 1 min e centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 minutos. Após centrifugação separaram-se as duas fases e retiraram-se 2 alíquotas de 50 μL de cada uma delas para tubos de centrifuga. Mediu-se a radioactividade de ambas as fases num contador gama (Berthold, LB 2111, Germany). Retirou-se 500 μL da fase com maior radioactividade (fase aquosa) e extraiu-se com 500 μL de n-octanol. De seguida, agitou-se novamente em vórtex durante 1 minuto, centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 minutos, separaram-se as fases e retiraram-se 3 alíquotas de 50 μL de cada uma delas para tubos de centrifuga. Após medição da radioactividade de ambas as fases o coeficiente de partição foi calculado do seguinte modo:

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

em que: $P_{o/w}$ = coeficiente de partição, C_1 = radioactividade na fase orgânica, C_2 = radioactividade na fase aquosa. Os resultados foram expressos em $\log P_{o/w}$.

Complexo	$\log P_{o/w} \pm dp$
$^{99m}\text{Tc}2$	-1,837 \pm 0,002
$^{99m}\text{Tc}4$	-1,409 \pm 0,008
$^{99m}\text{Tc}5$	-2,190 \pm 0,002
$^{99m}\text{Tc}6$	-2,045 \pm 0,003

3.7 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS

3.7.1 - Considerações gerais

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 $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Para os ensaios enzimáticos cada alíquota de enzima foi diluída em tampão HEPES 50 mM pH 7,4 (Sigma) até um volume final de 200 μL .

Os ensaios cinéticos foram realizados num espectrofotómetro Agilent Technologies 8453 UV-Vis, com suporte termostaticado e agitação magnética na cuvette (Quartz, percurso óptico = 1,0 cm). Todos os reagentes (oxihemoglobina, NADPH, H_4B e DTT; Sigma) utilizados nas determinações enzimáticas foram preparados em tampão HEPES 50 mM pH 7,4 e mantidos em gelo durante o ensaio.

As soluções dos aminoácidos L-ArgOMe/OH, $\text{N}^\omega\text{-NO}_2\text{-L-ArgOH}$ e $\text{N}^\omega\text{-CH}_3\text{-L-ArgOH}$, dos conjugados **1** – **6** e dos complexos **Re1** - **Re5** (10 mM) foram preparadas em H_2O .

3.7.2 - Ensaios cinéticos realizados seguindo a oxidação do NADPH

Estes ensaios cinéticos foram realizados num volume final de 1500 μL de HEPES 50 mM pH 7,4, contendo 100 μM DTT, 10 μM H_4B , 200 μM NADPH e diferentes concentrações de L-ArgOMe ou L-ArgOH (50 μM , 100 μM , 250 μM e 500 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 340 nm durante ~ 3 min de modo a quantificar-se a autooxidação do NADPH. A reacção enzimática foi iniciada com a adição do iNOS (~ 1 U, 50 μL) prosseguindo-se a incubação por mais ~ 12 min. A formação dos produtos de reacção NO e L-Cit foi seguida indirectamente medindo o decréscimo de absorvância a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,2\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), promovido pela oxidação do NADPH a NADP^+ . Com estes ensaios não foram obtidos resultados reprodutíveis devido à menor sensibilidade deste método [113].

3.7.3 - Ensaios cinéticos realizados seguindo a formação do NO na presença de oxihemoglobina

3.7.3.1 – 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. 20 µL da solução stock assim obtida foi diluída em 1480 µL de solução tampão (diluição utilizada nos ensaios enzimáticos) e a sua concentração calculada a partir do coeficiente de absorção molar a 415 nm ($\epsilon_{415} = 131 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, [HbO₂] = 6 µM) [115].

3.7.3.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos substratos L-ArgOMe/L-ArgOH: validação do método de captura do NO pela oxihemoglobina

Os ensaios enzimáticos foram efectuados num volume final de 1,5 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-ArgOMe/L-ArgOH (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 (~ 1 U, 50 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.

3.7.3.3 – Determinação dos parâmetros cinéticos do iNOS na presença dos compostos **2**, **Re1** e **Re2** contendo os substratos L-ArgOMe/L-ArgOH

Os compostos **2**, **Re1** e **Re2** foram avaliados como substratos do enzima iNOS de acordo com o método anteriormente descrito, utilizando três concentrações diferentes de cada um dos compostos (100 µM, 200 µM e 500 µM).

3.7.3.4 – Determinação das constantes de inibição dos conjugados **4 - 6** e dos complexos **Re3 - Re5** contendo os inibidores N^{ω} -NO₂-L-ArgOMe/OH e N^{ω} -CH₃-L-ArgOH.

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 1500 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 (20 μ M, 50 μ M e 150 μ M) e uma concentração fixa do inibidor a avaliar (150 μ M). A reacção enzimática, seguida espectrofotometricamente a 401 e 421 nm durante \sim 12 min, foi iniciada com a adição do iNOS (\sim 1 U, 50 μ L) à solução anterior, previamente incubada a 37 °C durante \sim 8 min (5 min de pré-incubação + 3 min para seguir a autoxidação).

3.8 – AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR DOS COMPLEXOS DE ^{99m}Tc

3.8.1 - Cultura celular

Na caracterização biológica dos complexos de ^{99m}Tc foram utilizadas células de melanoma murino B16F1 (ECACC, England).

O meio usado na cultura destas células foi o *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contendo GlutaMax I e complementado com 10 % de soro bovino fetal inactivado e 1 % de solução de antibióticos de penicilina/estreptomicina (reagentes da Gibco). As células cresceram numa atmosfera de 5 % CO₂ a 37 °C, sendo o meio de cultura mudado cada dois dias. As células aderem em monocamadas e, quando perto da confluência, são retiradas do frasco de cultura com tripsina/EDTA e postas em nova cultura.

3.8.2 – Ensaios de internalização

As células B16F1 foram cultivadas como descrito anteriormente, coradas com azul de tripano (cora de azul as células não viáveis) e contadas as células viáveis por observação ao microscópio usando um hematocitómetro.

Em placas de 24 poços foram colocadas cerca de $0,2 \times 10^6$ células/poço suspensas em 500 μ L de meio de cultura. Após aderirem durante a noite, as células foram

incubadas com soluções dos complexos radioactivos ($^{99m}\text{Tc}2$, $^{99m}\text{Tc}4$, $^{99m}\text{Tc}5$ e $^{99m}\text{Tc}6$) em *Modified Eagle's Medium* (MEM) com 25 mM HEPES e 0,2 % de BSA (~ 200000 cpm/poço), em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C, durante períodos de 5 min a 24h. Após a incubação, as soluções dos complexos foram retiradas e a internalização interrompida por lavagem das células com MEM/0,2 % BSA gelado. A radioactividade na membrana celular foi removida por duas lavagens das células com um tampão ácido (50 mM glicina.HCl/100 mM NaCl, pH 2,8) durante 5 min à temperatura ambiente. Após esta lavagem ácida, o pH das células foi neutralizado com PBS 0,2 % BSA gelado. Por fim, a internalização do complexo radioactivo foi determinada após a lise das células com uma solução de NaOH 1 M durante 10 min a 37 °C. A radioactividade internalizada e ligada à superfície das células foi medida usando um contador gama. A internalização foi expressa como a fracção da radioactividade total ligada (radioactividade na membrana e no interior da célula). Os ensaios foram feitos em quadruplicado para cada tempo estudado.

3.9 – AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO TUMORAL E FARMACOCINÉTICA DOS COMPLEXOS DE ^{99m}Tc

3.9.1 – Inoculação de murganhos com células do melanona

Todas as experiências *in vivo* foram realizadas de acordo com as normas portuguesas de manipulação de animais. Os animais foram mantidos em salas de temperatura e humidade controlada num horário 12h luz/ 12h escuridão e em dieta normal *ad libitum*.

Os estudos de biodistribuição dos complexos de ^{99m}Tc foram efectuados em murganhos fêmeas C57BL/6 (Charles River, 8 - 10 semanas, n = 4) nos quais foi induzido o tumor a partir das células de melanoma murino B16F1.

Os animais foram inoculados no dorso com 1×10^6 células em 100 μL PBS, injectadas sub-cutaneamente. Tumores de 0,2 a 1,2 g desenvolveram-se após 10 a 12 dias de inoculação.

3.9.2 – Ensaios de biodistribuição

Neste estudo avaliaram-se as características biológicas do complexo $^{99m}\text{Tc}2$ não purificado e do complexo $^{99m}\text{Tc}4$ purificado e não purificado. A purificação deste último fez-se por RP-HPLC semi-preparativo (Coluna: EP 250/8 Nucleosil C18, 100-7 μm , Macherey Nagel) recorrendo ao **Método 1** descrito em **3.2**. A purificação envolveu a recolha da fracção correspondente ao respectivo complexo de ^{99m}Tc , a evaporação do

solvente em corrente de azoto a 30 °C e a reconstituição em 1 mL de soro fisiológico (NaCl 0,9 %, pH 7,0 - 7,4). Por último procedeu-se à determinação da pureza radioquímica por RP-HPLC analítico (> 95 %).

Os complexos de ^{99m}Tc foram injectados (50 - 200 μCi em $\sim 100 \mu\text{L}$ de PBS) na zona retroorbital de murganhos previamente anestesiados com isoflurano. Após 1h e 4h os animais foram sacrificados por deslocação cervical, e o tumor e os órgãos de interesse foram retirados, pesados e as suas radioactividades medidas num contador gama (Berthold, LB2111, Germany). Os resultados foram expressos em percentagem de dose injectada por órgão total (% DI/órgão) e também por grama de órgão (% DI/g órgão). Relativamente ao sangue, osso e músculo a % DI/g de órgão foi calculada assumindo que estes tecidos representam cerca de 7, 10 e 40 % do peso total do corpo, respectivamente. A diferença de radioactividade entre o animal injectado e sacrificado foi assumida como excreção total. Amostras de sangue e urina foram recolhidas para avaliação da estabilidade *in vivo* (**secção 3.8.3**).

3.9.3 – Estabilidade *in vivo*

A estabilidade *in vivo* dos complexos $^{99m}\text{Tc}2$ e $^{99m}\text{Tc}4$ foi avaliada nas amostras de sangue e urina dos murganhos sacrificados após 1h de injeção.

As amostras de urina, previamente centrifugadas e filtradas (filtro Millipore 0,22 μm), foram analisadas por RP-HPLC analítico (EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Macherey Nagel, **Método 1, secção 3.2**).

As amostras de sangue foram centrifugadas (3000 rpm, 15 min, 4 °C) e a alíquotas de 100 μL de soro foi adicionado 200 μL de etanol para provocar a precipitação das proteínas. Após centrifugação (3000 rpm, 15 min, 4 °C), o sobrenadante foi filtrado (filtro Millipore 0,22 μm) e analisado por RP-HPLC analítico (EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18, Macherey Nagel, **Método 1, secção 3.2**).

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] - McCready, V. R., *Milestones in nuclear medicine*, Eur J Nucl Med **2000**, 27, S49 – S79.
- [2] – Jaffer, F. A.; Weissleder, R., Molecular imaging in clinical arena, JAMA **2005**, 293, 855 - 862.
- [3]– Erba, P. A.; Signore, A.; Mariani, G., *Prospective Molecular Targets For The Developmente of ^{99m}Tc-Labelled Agents With Potential Clinical Use*, Technetium, Rhenium and Others Metals in Chemistry and Nuclear Medicine **2006**, 7, 665 - 682, eds; Mazzi, U., SGE Ditoriali.
- [4] - Saha, Gopal B., *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 5th edition, Springer **2004**.
- [5] - Liu, S., *The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals*, Chem. Soc. Rev. **2004**, 33, 445 - 461.
- [6] - Anderson, C. J.; Welch, M. J., *Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging*, Chem. Rev. **1999**, 99, 2219 - 2234.
- [7] - Schlyer, D. J., *PET tracers; radiochemistry*, Ann. Acad. Med. Singapore **2004**, 33,146 - 54.
- [8] - Ido, T.; Wan, C.; Casella, V.; Fowler, J.; Wolf, A. P.; Reivich, M.; Kuhl, D., *Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. F-18 labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and C-14 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose*, J. Labelled Compd Radiopharm. **1978**, 14, 175 - 184.
- [9] – Kassis, A. I.; Adelstein, S. J., *Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy*, J. Nucl. Med. **2005**, 46, 4S - 12S.
- [10] - Volkert, W. A.; Hoffman, T. J., *Therapeutic Radiopharmaceuticals*, Chem. Rev. **1999**, 99, 2269 - 2292.
- [11] – Hafliger, P.; Agorastos, N.; Spingler, B.; Georgiev, O.; Viola, G.; Alberto, R., *Induction of DNA-double-strand breaks by auger electrons from ^{99m}Tc complexes with DNA-binding ligands*, Chembiochem. **2005**, 6, 414 – 21.

Referências bibliográficas

[12] - Jurisson, S. S.; Lydon, J. D., *Potential Technetium Small Molecule radiopharmaceutical*, Chem. Rev. **1999**, 99, 2205 - 2218.

[13] - Dilworth, J. R.; Parrott, S. J., *The biomedical chemistry of technetium and rhenium*, Chem. Soc. Rev. **1998**, 27, 43 - 55.

[14] - Srisvastava, S. C.; Deutsch, E., *Twenty years of the "technetium symposium"*, Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine **2002**, 6, XXVII - XXXVII, Padova: SGEEditoriali.

[15] - Kung, H. F., *New technetium 99m-Labeled Brain Perfusion Imaging Agents*, Semin. Nucl. Med. **1990**, 20, 150 - 158.

[16] - Leonard, J. P.; Nowotnik, D. P.; Neirinckx, R. D., *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 - 1823.

[17] - Walovitch, R. C.; Hill, T. C.; Garrity, S. T.; Cheesman, E. H.; Burgess, B. A.; O'Leary, D. H.; Watson, A. D.; Ganey, M. V.; Morgan, R. A.; Williams, S. J., *Characterization of technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging, Part 1: Biodistribution and brain imaging in humans*, J. Nucl. Med. **1989**, 30, 1892 - 901.

[18] - Kelly, J. D.; Forster, A. M.; Higley, B.; Archer, C. M.; Booker, F. S.; Canning, L. R.; Chiu, K. W.; Edwards, B.; Gill, H. K.; McPartlin, M., *Technetium-99m-tetrofosmin as a new radiopharmaceutical for myocardial perfusion imaging*, J. Nucl. Med. **1993**, 34, 222 - 227.

[19] - Abrams, M. J.; Davison, A.; Jones, A. G.; Costello, C. E.; Pang, H., *Synthesis and characterization of hexakis (alkyl-isocyanide) and hexakis (aryl-isocyanide) complexes of technetium (I)*, Inorg. Chem. **1983**, 22, 2798 - 2800.

[20] - Pasqualini, R.; Duatti, A., *Synthesis and characterization of the new neutral myocardial imaging agent [^{99m}TcN(NOEt)₂] (NOEt =N-ethyl-N-ethoxydithiocarbamate)*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1992**, 1354 - 1355.

- [21] - Fagret, D.; Ghezzi, C.; Vanzetto, G., *^{99m}Tc-N-NOEt Imaging for Myocardial Perfusion: Can It Offer More Than We Already Have?*, J. Nucl. Med. **2001**, 42, 1395 - 1396.
- [22] - Bolzati, C.; Boschi, A.; Uccelli, L.; Tisato, F.; Refosco, F.; Cagnolini, A.; Duatti, A.; Prakash, S.; Bandoli, G.; Vittadini, A., *Chemistry of the Strong Electrophilic Metal Fragment [⁹⁹Tc(N)(PXP)]₂⁺ (PXP = Diphosphine Ligand). A Novel Tool for the Selective Labeling of Small Molecules*, J. Am. Chem. Soc. **2002**, 124, 11468 - 11479.
- [23] - Boschi, A.; Uccelli, L.; Bolzati, C.; Duatti, A.; Sabba, N.; Moretti, E.; Domenico, G.; Zavattini, G.; Refosco, F.; Giganti, M. *Synthesis and Biologic Evaluation of Monocationic Asymmetric ^{99m}Tc-Nitride Heterocomplexes Showing High Heart Uptake and Improved Imaging Properties*, J. Nucl. Med. **2003**, 44, 806 - 814.
- [24] - Liu, S.; Edwards, D. S., *^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals*, Chem. Rev. **1999**, 99, 2235 - 2268.
- [25] - Liu, S.; Edwards, D. S.; Barrett, J. A., *^{99m}Tc Labeling of Highly Potent Small Peptides*, Bioconjugate Chem. **1997**, 8, 621 - 636.
- [26] - Alberto, R., *New Organometallic Technetium Complexes for Radiopharmaceutical Imaging*, Top. Curr. Chem. **2005**, 252, 1 - 45.
- [27] - Blok, D.; Feitsma, R. I. J.; Vermeij, P.; Pauwels, E. J. K., *Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine*, Euro. J. Nucl. Med. **1999**, 26, 1511 - 1519.
- [28] - Signore, A.; Annovazzi, A.; Chianelli, M.; Corsetti, F.; Van de Wiele, C.; Watherhouse, R. N.; Scopianaro, F., *Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy*, Euro. J. Nucl. Med. **2001**, 28, 1555 - 1565.
- [29] - Okarvi, S. M., *Peptide-Based Radiopharmaceuticals : Future Tools for Diagnostic Imaging of Cancers and Other Diseases*, Med. Res. Rev. **2004**, 3, 357 - 397.
- [30] - Larson, S. M.; Divgi, C. R.; Scott, A. M., *Overview of clinical radioimmunodetection of human tumors*, Cancer **1994**, 73, 832 - 835.
- [31] - http://www.cigna.com/health/provider/medical/procedural/coverage_positions/medical/mm_0245_coveragepositioncriteria_monoclonal_antibody_imaging.pdf; Acedido em 4 de setembro de 2006.

Referências bibliográficas

- [32] - Erb, D. A.; Nabi, H. A., *Clinical and technical considerations for imaging colorectal cancers with technetium-99m-labeled antiCEA Fab' fragment*, J. Nucl. Med. Technol. **2000**, 28, 12 - 18.
- [33] - <http://www.immunomedics.com/>; Acedido em 4 de Setembro de 2006.
- [34] - Goldenberg, D. M., *New developments in monoclonal antibodies for cancer detection and therapy*, CA Cancer J. Clin. **1994**, 44, 43 - 64
- [35] - Trisha Gura, *Therapeutic antibodies: Magic bullets hit the target*, Nature **2002**, 417, 584 - 586.
- [36] - Rubello, D.; Casara, D.; Maran, A.; Avogaro, A.; Tiengo, A.; Muzzio, P. C., *Role of anti-granulocyte Fab' fragment antibody scintigraphy (LeukoScan) in evaluating bone infection: acquisition protocol, interpretation criteria and clinical results*, Nucl. Med. Comm. **2004**, 25, 39 - 47.
- [37] - Beath, M.; Kolbeck, K. G.; Danielsson, R., *Somatostatin receptor scintigraphy with 99mTc-Depreotide (NeoSpect) in discriminating between malignant and benign lesions in the diagnosis of lung cancer: a pilot study*, Acta. Radiol. **2004**, 45, 833 - 839.
- [38] - Francesconi, L. C.; Zheng, Y.; Bartis, J.; Blumenstein, M.; Costello, C.; Rosch, M. A., *Preparation and Characterization of [99TcO] Apcitide: A Technetium Labeled Peptide*, Inorg. Chem. **2004**, 43, 2867 - 2875.
- [39] - Liu, S.; Edwards, D. S. ; Harris, A. R., *A Novel Ternary Ligand System for 99mTc-Labeling of Hydrazino Nicotinamide-Modified Biologically Active Molecules Using Imine-N-Containing Heterocycles as Coligands*, Bioconjugate chem. **1998**, 9, 583 - 595.
- [40] - Rajopadhye, M.; Harris, T. D.; Yu, K.; Glowacka, D.; Damphousse, P. R.; Barrett, J. A.; Heminway, S. J.; Edwards, D. S. ; Carroll, T. R., *Synthesis, evaluation and Tc-99m complexation of a hydrazinonicotinyl conjugate of a GP IIb/IIIa antagonist cyclic peptide for the detection of deep vein thrombosis*, Bioorganic Med. Chem. Letters **1997**, 7, 955 - 960.
- [41] - Edwards, D. S.; Liu, S.; Barrett, J. A.; Harris, A. R.; Looby, R. J.; Ziegler, M. C.; Heminway, S. J.; Carroll, T. R., *New and Versatile Ternary Ligand System for Technetium*

Radiopharmaceuticals: Water Soluble Phosphines and Tricine as Coligands in Labeling a Hydrazinonicotinamide-Modified Cyclic Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonist with ^{99m}Tc , *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 146 - 154.

[42] - Bolzati, C.; Mahmood, A.; Malagò, E.; Uccelli, L.; Boschi, A.; Jones, A. G.; Refosco, F.; Duatti, A.; Tisato, F., *The $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]2+$ Metal Fragment: A Technetium-Nitrido Synthone for Use with Biologically Active Molecules. The N-(2-Methoxyphenyl)piperazyl-cysteine Analogues as Examples*, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 1231 - 1242.

[43] - Boschi, A.; Uccelli, L.; Duatti, A.; Bolzati, C.; Refosco, F.; Tisato, F.; Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Varani, K. and Borea, P. A., *Asymmetrical Nitrido Tc- 99m Heterocomplexes as Potential Imaging Agents for Benzodiazepine Receptors*, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 1279 - 1288.

[44] - Alberto, R.; Egli, A.; Abram, U.; Hegetschweiler, K.; Gramlich, V.; Schubiger, A. P., *Synthesis and reactivity of $[\text{NEt}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$. Formation and structural characterization of the clusters $[\text{NEt}_4][\text{Re}_3(\mu_3\text{-OH})(\mu\text{-OH})_3(\text{CO})_9]$ and $[\text{NEt}_4][\text{Re}_2(\mu\text{-OH})_3(\text{CO})_6]$ by alkaline titration*, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 2815 - 2820.

[45] - Alberto, R.; Schibli, R.; Egli, A.; Schubiger, A. P.; Abram, U.; Kaden, T. A., *A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand*, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7987 - 7988.

[46] - Alberto, R.; Ortner, K.; Wheatley, N.; Schibli, R.; Schubiger, A. P., *Synthesis and properties of boranocarbonate: A convenient in situ CO source for the aqueous preparation of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$* , *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3135 - 3136.

[47] - Alberto, R.; Schibli, R.; Waibel, R.; Ulrich, A.; Schubiger, A. P., *Basic aqueous chemistry of $[\text{M}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ ($\text{M}=\text{Re}, \text{Tc}$) directed towards radiopharmaceutical application*, *Coordination Chem. Rev.* **1999**, 190-192, 901 - 919.

[48] - Mundwiler, S.; Kündig, M.; Ortner, K.; Alberto, R., *A new $[2 + 1]$ mixed ligand concept based on $[\text{}^{99(m)}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$: a basic study*, *Dalton Trans.* **2004**, 1320 - 1328.

[49] - Santos, I.; Paulo, A.; Correia, J. D. G., *Rhenium and Technetium Complexes Anchored by Phosphines and Scorpionates for Radiopharmaceutical Applications*, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 252, 45 - 84.

[50] - Correia, J. D. G.; Domingos, A.; Santos, I.; Alberto, R.; Ortner, K. *Re -Tricarbonyl Complexes with Ligands Containing P, N, N and P, N, O Donor Atom Set: Synthesis and Structural Characterization*, Inorg. Chem. **2001**, 40, 5147 - 5151.

[51] - Palma, E.; Correia, J. D. G.; Domingos, A.; Santos, I.; Alberto, R. ; Spies, H., *Rhenium and technetium tricarbonyl complexes anchored by 5-HT_{1A} receptor-binding ligands containing P,O/N donor atom sets*, J. Organometallic Chem. **2004**, 689, 4811 - 4819.

[52] - Alberto, R.; Pak, J. K.; Staveren, D.; Mundwiler, S.; Benny, P., *Mono-, bi-, or tridentate ligands? The labeling of peptides with ^{99m}Tc-carbonyls*, Biopolymers **2004**, 76, 324 - 33.

[53] - Gorshkov, N. I.; Schibli, R.; Schubiger, A. P.; Lumpov, A. A.; Miroslavov, A. E. ; Suglobov, D. N., *"2 + 1" Dithiocarbamate-isocyanide chelating systems for linking M(CO)₃ (M = ^{99m}Tc, Re) fragment to biomolecules*, J. Organometallic Chem. **2004**, 689, 4757 - 4763.

[54] - Smith, C. J.; Sieckman, G. L.; Owen, N. K.; Hayes, D. L.; Mazaru, D. G.; Kannan, R.; Volkert, W. A.; Hoffman, T. J., *Radiochemical investigations of Gastrin-releasing Peptides Receptor-specific [^{99m}Tc(X)(CO)₃-Dpr-Ser-Ser-Ser-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-(NH₂)] in PC-3, Tumor-bearing, Rodent Models: Syntheses, Radiolabeling and in vitro/in vivo Studies where Dpr = 2,3-Diaminopropionic acid and X = H₂O or P(CH₂OH)₃*, Cancer Research **2003**, 63, 4082 - 4088.

[55] - Schibli, R.; 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*, Bioconjugate Chem. **2000**, 11, 345 - 351.

[56] - Banerjee, S. R.; Maresca, K. P.; Francesconi, L.; Valliant, J.; Babich, J. W.; Zubieta, J., *New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc: a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design*, Nucl. Med. Biology **2005**, 32, 1 - 20.

- [57] – Staveren, D. R.; Mundwiler, S.; Hoffmanns, U.; Pak, J. K.; Spingler, B.; Metzler-Nolte, N.; Alberto, R. *Conjugation of a novel histidine derivative to biomolecules and labelling with $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$* , *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2593 - 2603.
- [58] - Pak, J. K.; Benny, P.; Spingler, B.; Ortner, K.; Alberto, R., *N^εFunctionalization of Metal and Organic Protected L-Histidine for a Highly Efficient, Direct Labeling of Biomolecules with $[\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$* , *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 2053 - 2061.
- [59] – Lazarova, N.; Babich, J.; Valliant, J.; Schaffer, P.; James, S.; Zubieta, J., *Thiol and Thioether-Based Bifunctional Chelates for the $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ Core (M= Tc, Re)*, *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 6763 - 6770.
- [60] - Alves, S.; Paulo, A.; Correia, J. D. G.; Gano, L.; Smith, C. J.; Hoffman, T. J.; Santos, I., *Pyrazolyl Derivatives as Bifunctional Chelators for Labeling Tumor-Seeking Peptides with the fac- $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ Moiety (M = ^{99m}Tc , Re): Synthesis, Characterization, and Biological Behavior*, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 438 - 449.
- [61] - Vitor, R.; Alves, S.; Correia, J. D. G.; Paulo, A. ; Santos, I., *Rhenium(I) and Technetium(I) Tricarbonyl Complexes Anchored by Bifunctional Pyrazole-Diamine and Pyrazole-Dithioether Chelators*, *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4764 - 4774.
- [62] - Alves, S.; Paulo, A.; Correia, J. D. G.; Domingos, A.; Santos, I., *Coordination Capabilities of Pyrazolyl Containing Ligands Towards the fac- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ Moiety*, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 24, 4714 - 4719.
- [63] – Alves, S.; Vitor, R.; Raposinho, P. D.; Marques, F.; Correia, J. D. C.; Paulo, A.; Santos, I., *Metal-Based Drugs for Diagnosis and Therapy*, in *Metal ions in biology and medicine* **2006**, vol 9, pp 3 - 8, eds: Alpoim, M. C.; Morais, P. V.; Santos, M. A.; Cristovão, A. J.; Centeno, J. A.; Collery, P., John Libbey Eurotext.
- [64] - Alves, S.; Correia, J. D. G.; Santos, I.; Veerendra, B.; Sieckman, G. L.; Hoffman, T. J.; Rold, T. L.; Figueroa, S. D.; Retzlöff, L.; McCrate, J.; Prasenphanich, A.; Smith, C. J., *Pyrazolyl conjugates of bombesin: a new tridentate ligand framework for the stabilization of fac- $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ moiety*, *Nucl. Med. Biology* **2006**, 33, 625 - 634.
- [65] - Alves, S.; Correia, J. D. G.; Rold, T. L.; Prasanphanich, A.; Haubner, R.; Rupprich, M.; Guggenberg, E.; Alberto, R.; Decristoforo, C.; Santos, I.; Smith, C. J., *In Vitro and In*

Referências bibliográficas

Vivo Evaluation of a Novel $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -Pyrazolyl Conjugate of cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys), Bioconjugate Chem. **2007**, 18, 530 – 537.

[66] - Palmer, R. M. J.; Ferrige, A. G.; Moncada, S., *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*, Nature **1987**, 327, 524 - 526.

[67] - Moncada, S.; Palmer, R. M. J.; Higgs, E. A., *Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, Pharmacol. Rev. **1991**, 43, 109 - 142.

[68] - Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G., *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*, Biochem. J. **2001**, 357, 593 - 615.

[69] - Kerwin, J. F.; Lancaster, J. R., *Nitric Oxide: A New Paradigm for second messengers*, J. Med. Chem. **1995**, 38, 4343 - 4356.

[70] - Marletta, M. A., *Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism*, J. Biol. Chem. **1993**, 268, 12231 - 12234.

[71] - 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 - 684.

[72] - Li, H.; Poulos, T. L., *Structure–function studies on nitric oxide synthases*, J. Inor. Biochem. **2005**, 99, 293 – 305.

[73] - Crane, B. R.; Arvai, A. S.; Ghosh, D. K.; Wu, C.; Getzoff, E. D.; Stuehr, D. J.; Tainer, J.A., *Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate*, Science **1999**, 279, 2121 - 2126.

[74] - Fischmann, T. O.; Hruza, A.; Niu, X.; Fossetta, J. D.; Lunn, C. A.; Dolphin, E.; Prongay, A. J.; Reichert, P.; Lundell, D. J.; Narula, S. K. ; Weber, P. C., *Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation*, Nat. Struct. Biol. **1999**, 3, 233 - 242.

[75] - Mack, H. L.; Flinspach, M. L.; Igarashi, J.; Jamal, J.; Yang, W.; Gómez-Vidal, J. A.; Litzinger, E. A.; Huang, H.; Erdal, E. P.; Silverman, R. B. ; Poulos, T. L., *Exploring the*

Binding Conformations of Bulkier Dipeptide Amide Inhibitors in Constitutive Nitric Oxide Synthases, *Biochemistry* **2005**, 44, 15222 - 15229.

[76] – Zhang, H. Q.; Dixon, R. P.; Marletta, M.A.; Nikolic, D.; Breemen, R.; Silverman, R. B., *Mechanism of Inactivation of Neuronal Nitric Oxide Synthase by N^ω-Allyl-L-Arginine*, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10888 - 10902.

[77] – Fukumura, D.; Kashiwagi, S.; Jain, R. K., *The role of nitric oxide in tumour progression*, *Nature* **2006**, 6, 521 – 534.

[78] – Korhonen, R.; Lathi, A.; Kankaanranta, H.; Moilanen, E., *Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation*, *Curr. Drug Targets: Inflammation Allergy* **2005**, 4, 471 - 479.

[79] - Wang, P. G.; Xian, M.; Tang, X.; Wu, X.; Wen, Z.; Gai, T.; Janczuk, A. J., *Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications*, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 1091 - 1134.

[80] – Salermo, L.; Sorrenti, V.; Giacomo, C.; Romeo, G.; Siracusa, M. A., *Progress in the Development of Selective Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibitors*, *Curr. Pharm. Des.* **2002**, 8, 177-200.

[81] – Moore, W. M; 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 - 1564.

[82] – 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 - 3870.

[83] – Garvey, E. R.; Oplinger, J. A; Furfine, E. S.; Kiff, R. J.; Lazlo, F.; Nhittle, B. J. R. ; Knowles, R. G., *1400W Is a Slow, Tight Binding, and Highly Selective Inhibitor of Inducible Nitric-Oxide Synthase in Vitro and in Vivo*, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 4959 - 4963.

Referências bibliográficas

- [84] - 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 - 2945.
- [85] – Fukumura, D.; Jain, R. K., *Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors*, Cancer Metastasis Rev. **1998**, 17, 77 – 89.
- [86] - Lind, D. S., *Arginine Metabolism: Enzymology, Nutrition and Clinical Significance*, J. Nutr. **2004**, 134, 2837S - 2841S.
- [87] – Lala, P. K., *Significance of nitric oxide in carcinogenesis, tumor progression and cancer therapy*, Canc. Metastasis Rev **1998**, 17, 1 - 6.
- [88] Cooke, J. P.; Losordo, D. W., *Nitric Oxide and Angiogenesis*, Circulation **2002**, 105, 2133 – 2135.
- [89] – Alexandrova, R.; Mileva, M.; Zvetkova, E., *Nitric oxide and cancer*, Exp. Pathol. and Parasitol. **2001**, 4, 13 - 18.
- [90] – Lechner, M.; Lirk, P.; Rieder, J., *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin*, Sem. Cancer Biol. **2005**, 15, 277 - 289.
- [91] – Thomsen, L. L.; Topley, S. P.; Knowles, R. G.; Keerie, A. J.; Frend, 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 - 3304.
- [92] – Jadeski, L. C.; Lala, P., *Nitric Oxide Synthase Inhibition by N^ω-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Inhibits Tumor-Induced Angiogenesis in Mammary Tumors*, Am. J. Pathol **1999**, 4, 1381 - 1389.
- [93] – Xie, K.; Huang, S., *Nitric oxide in cancer biology and treatment*, Free Radical Biol. Med. **2003**, 34, 969 - 986.
- [94] – Crowell, J. A.; Steele, V. E.; Sigman, C. C.; Fay, J. R., *Is Inducible Nitric Oxide Synthase a Target for Chemoprevention?*, Mol. Cancer Ther. **2003**, 2, 815 - 823.
- [95] – Hofseth, L. J.; Hussain, S. P.; Wogan, G. N.; Harris, C. C., *Nitric Oxide in Cancer and Chemoprevention*, Free radical Biol. Med. **2003**, 34, 955 - 968.

- [96] – Chen, T.; Nines, R. G.; Peschke, S. M.; Kresty, L.A. ; Stoner, G. D., *Chemopreventive Effects of a Selective Nitric Oxide Synthase Inhibitor on Carcinogen-Induced Rat Esophageal Tumorigenesis*, *Cancer Res.* **2004**, 64, 3714 - 3717.
- [97] – Thomsen, L. L.; Miles, D. W., *Role of oxide nitric in tumour progression: Lessons from human tumours*, *Cancer Res.* **1998**, 17, 107 - 118.
- [98] – Shang, Z. J.; Li, Z. B. ; Li, J. R., *In vitro effects of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on oral squamous cell carcinoma: a preliminary study*, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2006**, 35, 539 - 543.
- [99] - Xie, K.; Huang, S.; Dong, Z.; Juang, S. H.; Gutman, M.; Xie, Q. W. ; Fidler, N. C., *Transfection with inducible nitric oxide synthase gene supresses tumorigenicity and abrogates metastasis in K-1735 murine melanoma cells*, *J. Exp. Med.* **1995**, 181, 1333 - 1343.
- [100] – Xie, K.; Fidler, I. J., *Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase*, *Cancer Metastasis Rev.* **1998**, 17, 55 - 75.
- [101] – Wei, D.; Richardson, E. L.; Zhu, K.; Liwei, W.; Le, X.; He, Y.; Huang, S.; Xie, K., *Direct Demonstration of negative Regulation of Tumor Growth and Metastasis by Host-inducible Nitric Oxide Synthase*, *Cancer Res* **2003**, 63, 3855 - 3859.
- [102] – Roeda, D.; Crouzel, C.; Brouillet, E.; Valette, H., *Synthesis and In Vivo Distribution of No-Carrier-Added N(ω)-Nitro-L-Arginine^[11C] Methyl Ester, a Nitric Oxide Synthase Inhibitor*, *Nucl. Med. and Biol.* **1996**, 23, 509 - 512.
- [103] – 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-[^{11C}]Methylisothiourea and S-(2-[^{18F}]Fluoroethyl)isothiourea, as Potential Psitron Emission Tomography Tracers*, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 5110 - 5118.
- [104] - Xavier, C.; Pak, J. K.; Santos, I.; Alberto, R., *Evaluation of two chelators for labelling a pna monomer with the fac-[^{99m}Tc(CO)₃]⁺ moiety*, *J. Organomet. Chem.* **2006**, 692, 1332 - 1339.

Referências bibliográficas

- [105] - Staveren, D. R.; Benny, P. D.; Waibel, R.; Kurz, P.; Pak, J. K.; Alberto, R., *S-Functionalized Cysteine: Powerful Ligands for the Labelling of Bioactive Molecules with Triaquatricarbonyltechnetium-99m(1+) ($[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$)*, *Helv. Chim. Acta* **2005**, 88, 447 - 460.
- [106] - Silverstein; Bassler; Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th Edition, Wiley-VCH, New York, **1991**.
- [107] - Palma, E.; Oliveira, B. L.; Correia, J. D. G.; Gano, L.; Maria, L.; Santos, I. C.; Santos, I., *A new bisphosphonate-containing $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ tricarbonyl complex potentially useful as bone-seeking agent: synthesis and biological evaluation*, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, DOI - 10.1007/s00775-007-0215-0.
- [108] - Copeland, R. A., *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed., Wiley-VCH, New York, **2000**
- [109] - Sousa Silva, M.; Ferreira, A. E.; Tomas, A. M.; Cordeiro, C.; Ponces Freire, A., *Quantitative assessment of the glyoxalase pathway in Leishmania infantum as a therapeutic target by modelling and computer simulation*, *FEBS J.* **2005**, 272, 2388 - 2398.
- [110] - Athel Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Revised edition, Portland Press, **1995**.
- [111] - Cornish-Bowden, A.; Eisenthal, R., *The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters*, *Biochem. J.* **1974**, 139, 715 - 720.
- [112] - Cornish-Bowden, A.; Eisenthal, R., *Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods*. *Biochem. J.* **1974**, 139, 721 - 730.
- [113] - Hevel, J. M.; Marletta, M. A., *Nitric-oxide synthase assays*, *Meth. Enzymol.* **1994**, 233, 250-258.
- [114] - Archer, S., *Measurement of nitric oxide in biological models*, *FASEB J.* **1993**, 7, 349-360.

- [115] – Wolff, D. J.; Gauld, D. S.; Neulander, M. J.; Southan, G., *Inactivation of Nitric Oxide Synthase by Substituted Aminoguanidines and Aminoisothioureas*, J. Pharmacol. Exp. Ther. **1997**, 283, 265 – 273.
- [116] - Knowles, R. G.; Moncada, S., *Nitric oxide synthases in mammals*, Biochem J. **1994**, 298, 249 – 58.
- [117] - Flinspach, M. L.; Li, H.; Jamal, J.; Yang, W.; Huang, H.; Hah, J. M.; Gómez-Vidal, J. A.; Litzinger, E. A.; Silverman, R. B.; Poulos, T. L., *Structural basis for dipeptide amide isoform-selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase*, Nat. Struct. Biol. **2004**, 11, 54 – 59.
- [118] – Mansuy, D.; Boucher, D. M., *Mechanisms and novel directions in the biological applications of nitric oxide donors*, Free Radic. Biol. Med. **2004**, 37, 1105 – 1121.
- [119] - Xian, M.; Fujiwara, N.; Wen, Z.; Cai, T.; Kazuma, S.; Janczuk, A. J.; Tang, X.; Telyatnikov, V. V.; Zhang, Y.; Chen, X.; Miyamoto, Y.; Taniguchi, N.; Wang, P. G., *Novel substrates for nitric oxide synthases*, Bioorg. Med. Chem. **2002**, 10, 3049 – 3055.
- [120] - Reif, D. W.; McCreedy, S. A., *N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases*, Arch-Biochem-Biophys. **1995**, 320, 170-176.
- [121] – Debreczeni, J. É.; Bullock, A. N.; Atilla, G. E.; William D. S.; Bregman, H.; Knapp, S.; Meggers E., *Ruthenium Half-Sandwich Complexes Bound to Protein Kinase Pim-1***, Angew. Chem. Int. Ed. **2006**, 45, 1580 – 1585.
- [122] – Bregman, H.; Williams, D. S.; Atilla, G. E.; Carroll, P. J.; Meggers, E., *An organometallic inhibitor for glycogen synthase kinase 3*, J. Am. Chem. Soc. **2004**, 126, 13594-13595.
- [123] - Schibli, R.; Dumas, C.; Petrig, J.; Spadola, L.; Scapozza, L.; Garcia-Garayoa, E.; Schubiger, P. A., *Synthesis and in Vitro Characterization of Organometallic Rhenium and Technetium Glucose Complexes against Glut 1 and Hexokinase*, Bioconjugate Chem. **2005**, 16 , 105 -112.
- [124] - Qiu, H.; Orr, F. W.; Jensen, D.; Wang, H. H.; McIntosh, A. R.; Hasinoff, B. B.; Nance, D. M.; Pylypas, S.; Qi, K.; Song, C.; Muschel, R. J.; Al-Mehdi, A. B., *Arrest of B16 melanoma cells in the mouse pulmonary microcirculation induces endothelial nitric oxide*

Referências bibliográficas

synthase-dependent nitric oxide release that is cytotoxic to the tumor cells, Am. J. Pathol. **2003**, 162, 403 - 412.

[125] - Wang, H. H.; McIntosh, A. R.; Hasinoff, B. B.; Rector, E. S.; Ahmed, N.; Nance, D. M.; Orr, F. W., *B16 melanoma cell arrest in the mouse liver induces nitric oxide release and sinusoidal cytotoxicity: a natural hepatic defense against metastasis*, Cancer Res. **2000**, 60, 5862 - 5869.

[126] - Wang, H. H.; McIntosh, A. R.; Hasinoff, B. B.; MacNeil, B.; Rector, E.; Nance, D. M.; Orr, F. W., *Regulation of B16F1 melanoma cell metastasis by inducible functions of the hepatic microvasculature*, Euro. J. Cancer **2002**, 38, 1261 - 1270.

[127] - Tabrizi-Fard, M. A.; Fung, H. L., *Pharmacokinetics and steady-state tissue distribution of L- and D-isomers of nitroarginine in rats*, Drug. Metab. Dispos. **1996**, 24, 1241-1246.

[128] - Schmidt, K.; Klatt, P.; Mayer, B., *Uptake of nitric oxide synthase inhibitors by macrophage RAW 264.7 cells*, Biochem. J. **1994**, 301, 313 - 316.

[129] - Hatanaka, T.; Nakanishi, T.; Huang, W.; Leibach, F. H.; Prasad, P. D.; Ganapathy, V.; Ganapathy, M. E., *Na⁺- and Cl⁻-coupled active transport of nitric oxide synthase inhibitors via amino acid transport system B^{0,+}*, J. Clin. Invest. **2001**, 107, 1035 - 1043.

[130] - Hyde, R.; Taylor, P. M.; Hundal, H. S., *Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells*, Biochem. J. **2003**, 373, 1 - 18.

[131] - Liu, Y.; Pak, J. K.; Schmutz, P.; Bauwens, M.; Mertens, J.; Knight, H.; Alberto, R., *Amino Acids Labeled with [^{99m}Tc(CO)₃]⁺ and Recognized by the L-type Amino Acid Transporter LAT1*, J. Am. Chem. Soc. **2006**, 128, 15996 - 15997.

[132] - Yanagida, O.; Kanai, Y.; Chairoungdua, A.; Kim, D. K.; Segawa, H.; Nii, T.; Cha, S. H.; Matsuo, H.; Fukushima, J.; Fukasawa, Y.; Tani, Y.; Taketani, Y.; Uchino, H.; Kim, J. Y.; Inatomi, J.; Okayasu, I.; Miyamoto, K.; Takeda, E.; Goya, T.; Endou, H., *Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines*, Biochim. Biophys. Acta. **2001**, 1514, 291 - 302.

[133] - Gupta, N.; Miyauchi, S.; Martindale, R. G.; Herdman, A. V.; Podolsky, R.; Miyake, K.; Mager, S.; Prasad, P. D.; Ganapathy, M. E.; Ganapathy, V., *Upregulation of the*

amino acid transporter ATB^{0,+} (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans,
Biochim. Biophys. Acta **2005**, 1741, 215 - 223.