



RELATÓRIO DE PROJETO DE BIOQUÍMICA

2019/2020

Transportadores catiónicos de aminoácidos como alvos para radioteranóstica do cancro

Rita Isabel Carvalho Teixeira

Nº 52397

Orientador: Dr. João Domingos Galamba Correia

Coorientadora: Dr.^a Cristina Pereira de Matos

Local: Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C²TN), Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Estrada Nacional 10 (km 139,7), 2695-066 Bobadela LRS, Portugal

Agradecimentos

Resumo

Durante o desenvolvimento tumoral, as células adquirem características de malignidade que lhes permite sobreviver, proliferar e disseminar para novos tecidos, através da corrente sanguínea ou linfática. De modo a satisfazer as suas necessidades, a maioria das células cancerígenas torna-se auxotrófica para nutrientes e fontes de energia, resultando na angiogénese e sobreexpressão de proteínas membranares de transporte, nomeadamente transportadores de aminoácidos catiónicos (CAs). Os radiomarcadores que alvejem selectivamente esses transportadores são ainda pouco explorados, especialmente aqueles baseados em radiometais, apesar do elevado potencial que apresentam para imagiologia não invasiva e terapêutica (teranóstica) do cancro.

Neste trabalho descreve-se a síntese de um novo agente quelante bifuncional do tipo pirazolo contendo o aminoácido histidina (His) ligada por uma cadeia espaçadora alifática com 6 carbonos (L^1) para preparação de complexos estáveis do tipo $fac-[M(L^1)(CO_3)]^+$ ($M = Re$ ou ^{99m}Tc). O conjugado L^1 foi preparado através do acoplamento do precursor N-prottegido $PzC_6NH_2(Boc)$ com aminoácido com grupos protetores Fmoc-His-trt-OH, usando as condições e reagentes padrão de conjugação, seguida da hidrólise dos grupos protetores. A purificação das moléculas obtidas foi realizada através de cromatografia em coluna e/ou extração líquido-líquido. A caracterização das moléculas sintetizadas foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H e ^{13}C e as suas correlações bidimensionais.

A síntese e purificação dos compostos contendo a unidade pirazolo foi, no geral, bem-sucedida, permitindo obter rendimentos superiores a 85% para a maioria dos compostos. A partir dos espetros de RMN, evidenciou-se o grau de pureza das amostras analisadas. A purificação do conjugado L^1 por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e a posterior preparação do complexo metálico de Re não foram realizadas.

Palavras-Chave: Aminoácido, Radiomarcador, Radiometal, Teranóstica, Agente quelante, Pirazolo, Conjugação, Rénio

Abstract

During the multistep development of human tumours, normal cells evolve progressively to a neoplastic state, acquiring a succession of hallmark capabilities that allow cancer cells to survive, proliferate, and disseminate. To fuel their metabolic needs, tumours are supplied with nutrients through the collective processes of angiogenesis and the prodigious expression of nutrient transporters in the plasma membranes of constituent cells, particularly, cationic amino acids transporters (CAT). Although potentially relevant from the clinical point of view, radiotracers targeting cationic amino acid transporters are relatively unexplored, especially, metal-based radiotracers.

This work was to synthesize and purify a new conjugate comprising a pyrazolyl-diamine chelating unit and the cationic amino acid histidine (His) linked by a hexyl linker (L^1), following the procedures described by the group, to prepare stable rhenium complexes of the type $fac-[M(L^1)(CO_3)]^+$ ($M=Re$). The purification of the obtained pyrazolyl-based compounds was performed by column chromatography and/or liquid-liquid extraction. To characterize the obtained pyrazolyl-based compounds $^1H/^{13}C$ NMR and bidimensional correlations were performed. The conjugate L^1 was prepared upon conjugation of the Boc-protected precursor $PzC_6NH_2(Boc)$ to Fmoc-His-trt-OH, using standard coupling reagents and conditions, followed by hydrolysis of the protecting groups with the respective reagent.

In general, the synthesis and purification of the pyrazolyl-based molecules were successful, with yields above 85% for most molecules. The compounds that were fully characterized $^1H/^{13}C$ NMR demonstrated high purity. The purification of the conjugated L^1 by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the preparation of Re-complexes could not be achieved.

Keywords: Amino acid, Radiotracer, Metal-based, Chelating unit, Pyrazolyl, Conjugation, Rhenium

Índice de Conteúdos

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas.....	Error! Bookmark not defined.
1. Introdução.....	1
Cancro.....	1
Transporte de Aminoácidos e Radioteranóstica do Cancro.....	2
Desenvolvimento de Radiofármacos para Teranóstica do Cancro.....	3
2. Parte Experimental.....	10
2.1 Materiais e Técnicas de Purificação e Caracterização Química.....	10
2.2 Plano Geral de Síntese do Conjugado L^1	11
2.2.1 PzOH (1).....	11
2.2.2 PzSO ₃ (2).....	11
2.2.3 EnBoc (3).....	12
2.2.4 PzNBOC (4).....	12
2.2.5 Precursor I (5).....	13
2.2.6 Precursor II (6).....	13
2.2.7 Conjugado L^1	14
3. Resultados e Discussão.....	15
3.1 Síntese e Caracterização de ligandos pirazolo-diamina (1-6).....	15
3.1.1 PzOH (1).....	16
3.1.2 PzSO ₃ (2).....	17
3.1.3 EnBoc (3).....	19
3.1.4 PzNBoc (4).....	20

3.1.5	Precursor I (5)	21
3.1.6	PzC ₆ NH ₂ (Boc) (6).....	22
3.2	Síntese do conjugado L ¹	23
3.2.1	Ativação do AA e Preparação do Conjugado L ¹ com grupos protetores (i).....	23
4.2.2.	Hidrólise dos grupos protetores (ii)	25
4.	Conclusão	27
	Bibliografia.....	29
	Anexo	32

Índice de Figuras

Figura 1. 1 - Representação esquemática de um radiofármaco com um elemento radioativo associado: perfusão (A) e específico (B).....	3
Figura 1.2 - Representação do precursor fac-[M(I)(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺ (M=Re, Tc).	6
Figura 1.3 - Ligando tridentado assimétrico do tipo pirazolo-diamina (A) ou pirazolo-aminocarboxilato (B). Os sítios possíveis para a conjugação de BM estão assinalados... Error! Bookmark not defined.	
Figura 1. 4 - Síntese do complexo do tipo fac-[M(CO) ₃ (L)] ⁺ (M=Re, ^{99m} Tc), sendo L é um agente quelante do tipo pirazolo-diamina contendo L-Arg ligada por uma cadeia espaçadora alifática (n=1,4). (i) indica as condições de acoplamento de N- α -Boc-L-Arg com o precursor N-protetido pz-C ₆ NH ₂ (Boc); (ii) e (iii) indicam as condições de remoção dos grupos protetores. (Esquema retirado da referência 10)	Error! Bookmark not defined.
Figura 1. 5 - Grupos utilizados para a protetores de aminas (N-protetores): A -Fmoc, B - Boc e C -Trt.	Error! Bookmark not defined.
Figura 2.1 – Conjugado L ¹ (n=4).....	Error! Bookmark not defined.
Figura 4.1 - Síntese do precursor pirazolo-diamina contendo um espaçador de natureza carbonada (n=4) (6) e condições das reações da via de síntese (i a viii).....	Error! Bookmark not defined.
Figura 4.1.1 - <i>Mecanismo de síntese do composto PzOH (1).</i> EtOH, 10°C, 1h, T.A.	15
Figura 4.1.4 – <i>Mecanismo de síntese do composto PzNBoc (4).</i> N	15
Figura 4.1. 2 – <i>Mecanismo de Síntese do composto PzSO₃ (2)</i>	16
Figura 4.1.1 - <i>Mecanismo de síntese do composto PzOH (1).</i>	16
Figura 4.1. 2 – <i>Mecanismo de Síntese do composto PzSO₃ (2)</i>	17
Figura 4.1. 3 – <i>Mecanismo de proteção da amina primária da etilenodiamina com o grupo N-protetor Boc, dando origem ao produto mono-substituído EnBoc (3).</i>	19
Figura 4.1. 3 – <i>Proteção da amina primária da etilenodiamina com o grupo N-protetor Boc, dando origem ao produto mono-substituído EnBoc (3).</i>	19
Figura 4.1.4 – <i>Mecanismo reacional para a síntese do composto PzNBoc (4)</i>	20
Figura 4.1.5 – <i>Mecanismos de síntese do precursor I (5), contendo uma cadeia espaçadora alifática (n=4) e o grupo ftalimida.</i> 5 : n = 4.....	21
Figura 4.1.5 – <i>Mecanismos reacional para a síntese do precursor I (5), contendo uma cadeia espaçadora alifática (n=4) e o grupo ftalimida.</i>	21
Figura 4.1. 6 – <i>Mecanismo de síntese do precursor N-protetido, PzC₆NH₂(Boc) (6).</i> Figura 4.1.5 – <i>Mecanismos de síntese do precursor I (5), contendo uma cadeia espaçadora alifática (n=4) e o grupo ftalimida.</i>	21

Figura 4.1. 6 – Mecanismo reacional para a síntese do precursor N-protegido, PzC₆NH₂(Boc) (6)	22
--	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Características dos Sistemas de Transporte de Aminoácidos Catiônicos.	2
Tabela 2 – Quadro resumo das características dos compostos sintetizados e respetivos rendimentos.	16

Lista de Abreviaturas

Arg	Arginina
BM	Biomolécula
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
CA	Aminoácido Catiônico
CDCI₃	Clorofórmio Deuterado
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> (Espetroscopia de Correlação)
d	Dobleto
DIPEA	Diisopropiletilamina
EnBoc	<i>N-tert</i> -Butoxicarbonilo-1,2-etanodiamina
eV	electrão-volt
fac	facial
Fmoc	Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo
HBTU	<i>o</i> -benzotriazol- <i>N,N',N'',N'''</i> -tetrametil-uronium
His	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Band Correlation</i> (Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta pressão)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> (Correlação Heteronuclear Múltipla Quântica)
LB	Ligando Bifuncional
Lys	Lisina
MeOH	Metanol
ppm	partes por milhão
Pz	Pirazolo
PzC₆NH₂(Boc)	<i>tert</i> -butil 2-((6-aminohexil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-ilo)etil)amino)-etilcarbamato
PzOH	2-(3,5-Dimetil-1H-pirazol-1-il)etanol
PzSO₃	<i>N</i> -(2- <i>p</i> -toluenosulfoniletil)-3,5-dimetil-1H-pirazolo
Re	Rénio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
RP	<i>Reverse Phase</i> (Fase Reversa)

s	Singleto
SN	Substituição Nucleofílica
t	Tripleto
t.a.	temperatura ambiente
t_{1/2}	Tempo de semi-vida
Tc	^{99m} Tc
TFA	Ácido Trifluoracético
THF	Tetrahidrofurano
TIPS	Triisopropilsilano
TLC	<i>Thin layer chromatography</i> (Cromatografia em camada Fina)
TMS	Tetrametilsilano
Trt	Tritil
Ts	<i>p</i> -toluenosulfonilo (tosilo)

1. Introdução

Cancro

De acordo com os dados de um relatório recente da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre cancro, uma em cada seis pessoas morrem em consequência de uma doença oncológica, o que constitui a segunda causa de mortalidade no mundo inteiro. Só em 2018, registaram-se cerca de 9,6 milhões de mortes globalmente.¹

O cancro é um termo que engloba um vasto número de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal de células e que podem invadir os tecidos circundantes, inclusivamente outros órgãos do corpo. São múltiplos os fatores que podem contribuir para o aparecimento de uma doença oncológica, como a exposição a certos agentes químicos, hormonas e radiações, influência genética e/ou estilos de vida, como dieta e o tabaco.²

A nível celular, os mecanismos regulatórios das células deixam de funcionar em prol da homeostasia do tecido, mas a favor das suas próprias necessidades. As células cancerígenas apresentam, deste modo, características de malignidade que lhes permite sobreviver, proliferar e disseminar para novos tecidos, através da corrente sanguínea ou linfática.³

A reprogramação das vias metabólicas confere a capacidade a estas células de adquirir nutrientes e fontes de energia de modo a suportar a sua rápida proliferação, como a glucose, aminoácidos, ácidos gordos, vitaminas e micronutrientes. Os mecanismos explorados pelas células tumorais envolvem, entre outros, a angiogénese e a sobreexpressão de proteínas membranares de transporte, nomeadamente, transportadores de aminoácidos.⁴⁻⁶

Os aminoácidos representam uma das classes de nutrientes mais importantes para a sobrevivência das células. Apresentam, principalmente, um papel vital na síntese proteica. Por outro lado, atuam em outros processos celulares como o metabolismo energético, sinalização celular e neurotransmissão, e são utilizados como fontes carbono para o crescimento celular.⁷

Todas as células mamíferas podem obter aminoácidos essenciais a partir de fontes externas, uma vez que não têm capacidade de sintetizar este tipo de aminoácidos. Os aminoácidos não essenciais são biosintetizados endogenamente. Contudo, no caso das células tumorais, a capacidade de síntese destes aminoácidos não corresponde às suas necessidades durante a proliferação celular. Como tal, necessitam de um maior fluxo destes aminoácidos para promover o seu elevado metabolismo.^{8,9}

Transporte de Aminoácidos e Radioteranóstica do Cancro

O transporte de aminoácidos é mediado por proteínas membranares codificadas por uma série de genes pertencentes a várias famílias do grupo transportador de solutos (SLC).⁷ As famílias de transportadores de aminoácidos são agrupadas em sistemas de transporte que contêm vários membros. Os sistemas identificados atualmente apresentam diferentes características em relação à sua especificidade, sensibilidade ao pH, expressão nos vários tecidos, mecanismos regulatórios e de transporte e significância biológica no cancro.¹⁰

Certos transportadores de aminoácidos são sobreexpressos em diferentes tipos de tumor. Estudos demonstram que foi detetada a sobreexpressão de transportadores dos aminoácidos catiónicos (CAs) em linhas humanas de cancro da mama e colorretal. O transporte de CA tais como a L-Arg, a L-Lys ou a L-His, é mediado por quatro transportadores diferentes, os que pertencem à família CAT, os membros da família y^+L e os transportadores de aminoácidos $B^{0,+}$ ($ATB^{0,+}$). As características dos transportadores de aminoácidos catiónicos e de aminoácidos neutros estão listadas na Tabela 1.^{6,11-13}

Tabela 1 – Características dos Sistemas de Transporte de Aminoácidos Catiónicos.

Sistema de Transporte AA	Nome da Proteína	Nome do gene	Substratos Primários	Mecanismo de Transporte
CAT	CAT-1	SLC7A1	L-AA Catiónicos	Facilitado
	CAT-2A, 2B	SLC7A2		
	CAT-3	SLC7A3		
y^+L	y^+LAT1	SLC7A7	L-AA Catiónicos, neutros	Antiporte Na^+
	y^+LAT2	SLC7A6		Co-transporte Na^+ e Cl^-
	$ATB^{0,+}$	SLC6A14		

O avanço no estudo do transporte de nutrientes em diferentes tipos de tumores permitiu constatar que o bloqueio destes transportadores levaria à privação de nutrientes essenciais e, conseqüentemente, à diminuição do crescimento e morte celular. Por outro lado, uma vez que estes transportadores apresentam uma sobreexpressão em células cancerígenas em comparação com as células normais, afetará a atividade biológica das células saudáveis em menor grau.^{4,8} Desta forma, os transportadores de aminoácidos que são sobreexpressos em células tumorais apresentam um elevado potencial como alvos para o diagnóstico precoce e tratamento do cancro.⁷

Nos últimos anos, tem vindo a crescer o interesse no desenvolvimento de radiomarcadores análogos a aminoácidos para o alveijamento dos transportadores, permitindo a imagiologia não invasiva e terapêutica (teranóstica) do cancro. ^{7-10,14}

Desenvolvimento de Radiofármacos para Teranóstica do Cancro

A imagiologia molecular é definida como a visualização não invasiva, caracterização e quantificação *in vivo* de processos bioquímicos e biológicos a nível molecular e celular utilizando sondas específicas. As técnicas de imagiologia, atualmente, disponíveis permitem não só efetuar um diagnóstico precoce de determinadas patologias, como também fazer o acompanhamento evolutivo das terapias convencionais, como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. A terapia através da utilização de radiação era, inicialmente, realizada pela exposição do paciente a uma fonte externa. Mais recentemente, o desenvolvimento de radiofármacos pode ser, em alguns casos uma alternativa à radioterapia externa. ¹⁵⁻¹⁷

Os radiofármacos são compostos orgânicos ou inorgânicos que apresentam na sua composição um elemento radioativo associado, um radioisótopo, sendo concebidos de forma a direcionar a radioatividade para órgãos ou tecidos alvo no paciente. Este tipo de compostos é utilizado em Medicina Nuclear para diagnóstico e terapia de diversas patologias, como o cancro. São administrados, na sua maioria, por via intravenosa e, dependendo das suas características, podem ser classificados como radiofármacos de perfusão (**1A**) ou específicos (**1B**). Um radiofármaco de perfusão apresenta uma biodistribuição que depende das suas propriedades físico-químicas tais como o peso molecular, carga e lipofilia. Já um radiofármaco específico apresenta na sua constituição um vetor biológico que determina o seu encaminhamento e interação com um alvo específico ^{18,19}

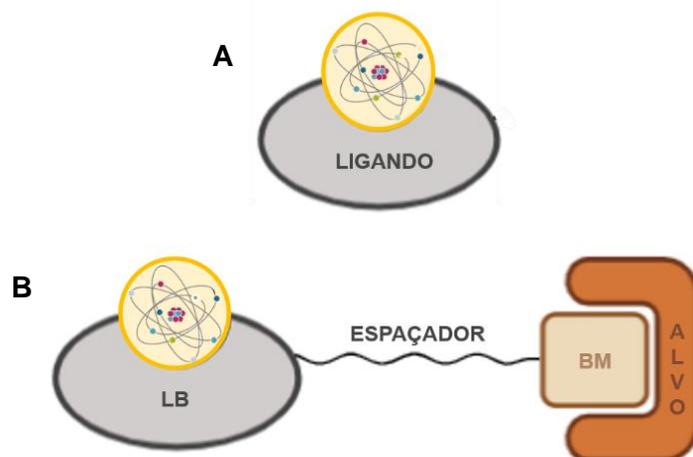


Figura 1. 1 - Representação esquemática de um radiofármaco: perfusão (A) e específico (B).

Recentemente, o rumo da investigação nesta área tem sofrido alterações, focando-se no desenvolvimento de radiofármacos específicos contendo um radionuclídeo metálico. Apesar dos radiometais serem pouco explorados para estes fins, apresentam um elevado interesse no desenvolvimento de radiofármacos devido às suas diversas propriedades nucleares, como o tempo de semi-vida ($t_{1/2}$), o tipo de energia de radiação que emite, para além de apresentarem uma química de coordenação variada. Neste tipo de radiofármacos, o radionuclídeo é estabilizado por um ligando bifuncional (LB) permitindo a ligação a uma biomolécula específica (BM) que direciona o radionuclídeo para o alvo molecular. Pode ser adicionada, como demonstrado na Fig. **1B**, uma cadeia espaçadora de natureza variada entre a BM e o LB. Esta cadeia espaçadora contribui para a modelação da farmacocinética do radiofármaco e permite o afastamento do fragmento metálico da BM, evitando que esta perca especificidade para o alvo molecular. ¹⁹

Os radiofármacos específicos devem apresentar elevada afinidade e especificidade para o alvo, o que permite visualizar alvos moleculares expressos ou sobreexpressos num determinado tecido. ¹⁹

Quanto à sua aplicação médica, os radiofármacos dividem-se em agentes de diagnóstico ou agentes terapêuticos. Os radiofármacos com aplicação em diagnóstico clínico são moléculas marcadas com isótopos radioativos emissores de radiação gama (γ), utilizados em tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou tomografia por emissão de positrão (PET). Este tipo de radiomarcadores não apresentam efeito terapêutico. Através da acumulação do radiofármaco num determinado alvo, permite fazer a quantificação *in vivo* dos alvos moleculares bem como obter informação funcional do sistema que está a ser analisado. ^{19,20}

Para terapia, os radiofármacos apresentam na sua constituição radioisótopos que distribuem pequenas doses de radiação ionizante, α ou β^- , para um órgão ou tecido específico. Idealmente, a dose deve ser suficiente de modo a, por um lado, induzir a morte celular de tecidos malignos, e por outro, ser removida rapidamente da corrente sanguínea e dos tecidos saudáveis para minimizar qualquer tipo de danos. ^{15,16,19}

Assim, o desenvolvimento de radiofármacos permite resolver necessidades não atendidas da prática clínica através da conceção de novas biomoléculas radiometaladas para teranóstica do cancro.

Complexos $fac-[M(L)(CO_3)]^+$ ($M=Re, {}^{99m}Tc$) com Ligandos Contendo a Unidade 3,5-Dimetil-1H- Pirazolo

No desenvolvimento de radiofármacos, são utilizados radionuclídeos adequados ao tipo de aplicação médica a que se destina. Portanto, deve-se ter em consideração parâmetros importantes na escolha do radionuclídeo como o $t_{1/2}$, a energia das partículas e/ou radiação eletromagnética emitidas, a disponibilidade e custo do radionuclídeo. Por outro lado, a natureza do metal e a sua química de coordenação irão determinar a escolha do ligando.¹⁹

O interesse na química do tecnécio demonstra a importância deste radioisótopo, ${}^{99m}Tc$, no desenvolvimento de radiofármacos para diagnóstico médico. De facto, em SPECT são utilizados complexos ou radiofármacos específicos marcados com Tc. O uso de Tc generalizou-se pela sua facilidade de produção a partir de um gerador de ${}^{99}Mo/{}^{99m}Tc$, pelas suas propriedades nucleares ($t_{1/2} = 6,0h$, $E_\gamma = 140 keV$), e pela sua química variada. O seu $t_{1/2}$ permite que o radiofármaco seja sintetizado e administrado no paciente, de modo a obter uma imagem. Por outro lado, é suficientemente curto para minimizar a dose de radiação fornecida ao paciente. A energia da radiação γ é adequada para deteção pelas câmaras gama localizadas nos centros hospitalares.^{15,18}

Os compostos de ${}^{99m}Tc$ não são obtidos em concentrações que permitam fazer a sua caracterização química usando as técnicas habituais. Deste modo, o desenvolvimento de novos complexos de Tc é precedido, normalmente, pela síntese dos complexos análogos de rénio (Re). O Re é um metal do mesmo grupo da tabela periódica (grupo 7) e, devido à contração dos lantanídeos, apresentam algumas propriedades semelhantes, como o tamanho, características físico-químicas e geometria de coordenação. A principal diferença reside no facto de os complexos de Re serem cineticamente mais inertes do que os análogos de Tc.¹⁵

De entre os vários estados de oxidação disponíveis (- I a VII), o Tc (I) e Re(I) têm uma configuração eletrónica d^6 e a sua estabilização é conseguida por ligandos que contenha átomos doadores como oxigénio, azoto ou enxofre.

Recentemente, foi descrita a síntese dos precursores $fac-[M(CO)_3(H_2O)_3]^+$ ($M = Re, Tc$) (figura 2) renovando o interesse no desenvolvimento de radiofármacos contendo radionuclídeos metálicos de estado de oxidação baixo, devido à sua preparação simples, à robustez química da unidade $fac-[M(CO_3)]^+$ e à labilidade das moléculas de água presentes na esfera de coordenação. Por outro lado, as unidades $fac-[M(CO)_3]^+$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$) apresenta dimensões reduzidas, o que permite a marcação radioisotópica de biomoléculas de baixa peso molecular, sem que haja perdas de especificidade e atividade.^{18,21,22}

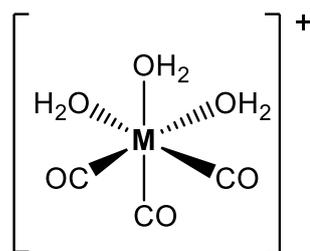


Figura 1.2 - Representação do precursor $fac-[M(I)(CO)_3(H_2O)_3]^+$ ($M=Re, Tc$).

A disponibilidade de sistemas de coordenação é outro fator importante para o desenvolvimento de novos radiofármacos específicos de Tc (I) ou Re (I). Os agentes quelantes devem ser altamente estáveis, de tamanho reduzido, com lipofilia adaptável e de fácil funcionalização. As três moléculas de água que pertencem ao precursor $fac-[M(CO)_3(H_2O)_3]^+$ são ligandos lábeis, podendo ser substituídas por ligandos mono, bi ou tridentados e, em alguns casos, derivatizados com grupos funcionais que permitem a ligação a determinadas BM. Com isto, vários ligandos bidentados e tridentados têm sido avaliados como potenciais agentes quelantes para a marcação de biomoléculas de interesse com $fac-[M(CO)_3]^+$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$).^{18,19,21-24}

Devido ao interesse nesta área de investigação, o Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do C²TN tem vindo a sintetizar e analisar o comportamento biológico de complexos organometálicos de Re (I) e Tc (I). Concretamente, tem sintetizado ligandos que estabilizem os fragmentos metálicos $fac-[M(CO)_3]^+$ ($M = Re, {}^{99m}Tc$), avaliando a possibilidade de os funcionalizar e ligar a biomoléculas, para imagiologia molecular. Neste âmbito, foram descritos complexos estáveis do tipo $fac-[M(L)(CO)_3]^+$, em que L é um agente quelante que combina uma unidade heterociclo 3,5-dimetil-1H-pirazolo com aminas alifáticas e/ou ácidos carboxílicos (Figura 1.3).²⁵

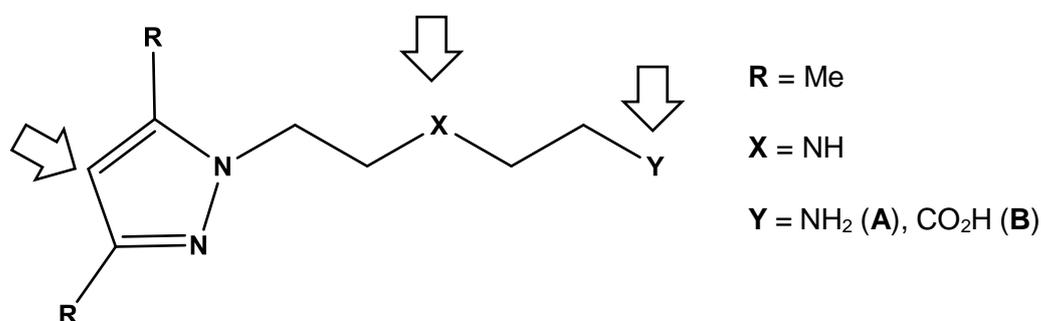


Figura 1.3 - Ligando tridentado assimétrico do tipo pirazolo-diamina (A) ou pirazolo-aminocarboxilato (B). Os sítios possíveis para a conjugação de BM estão assinalados.

O ligando do tipo pirazolo-diamina é muito versátil podendo ser derivatizado no anel, na amina central ou terminal da unidade pirazolo-diamina, o que permite a ligação de cadeias espaçadoras e/ou agentes biologicamente ativos (Fig.1.3A). Por outro lado, coordena eficazmente com os precursores tricarbonilo através do conjunto de átomos doadores N₃.

Como referido anteriormente, estudos têm revelado que radiomarcadores análogos a aminoácidos apresentam um elevado potencial para radioteranóstica do cancro, uma vez que conseguem alvejar seletivamente transportadores de CAs sobreexpressos em células tumorais. Contudo, este tipo específico de radiomarcadores são ainda pouco explorados, especialmente aqueles baseados em radiometais, com exceção de compostos do tipo fac-[^{99m}Tc/Re(CO)₃(L)]⁺, descritos pelo grupo, em que L é um agente quelante do tipo pirazolo-diamina contendo um CA pendente, L-Arg (Figura 1.4). Verificou-se que estes compostos conseguem acumular-se em vários tipos de células tumorais humanas, sendo que os resultados experimentais sugeriam que o seu transporte para o interior das células era mediado por transportadores de CAs.¹⁰

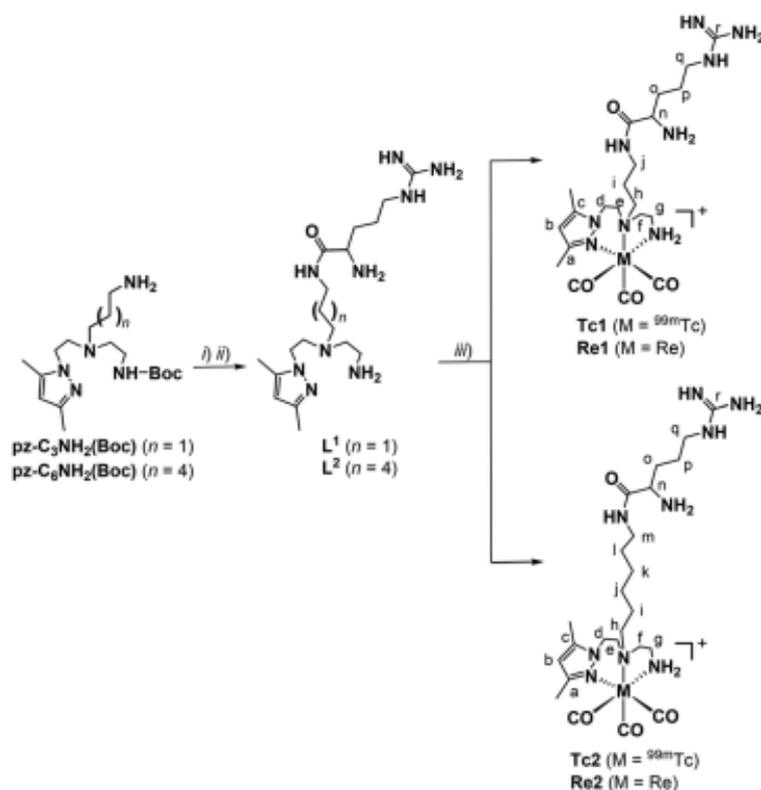


Figura 1. 4 - Síntese do complexo do tipo fac-[M(CO)₃(L)]⁺ (M = Re, ^{99m}Tc), sendo L um agente quelante do tipo pirazolo-diamina contendo L-Arg ligada por uma cadeia espaçadora alifática (n = 1,4). (i) indica as condições de acoplamento de N-α-Boc-L-Arg com o precursor N-protetido pz-C₆NH₂(Boc); (ii) e (iii) indicam as condições de remoção dos grupos protetores. (Esquema retirado da referência 10)

Para a síntese destes compostos é necessária a utilização de grupos protetores de aminas, garantindo que as reações ocorram apenas nos locais de interesse. O grupo protetor amplamente usado em síntese orgânica para grupos amina é o *tert*-butoxicarbonil (Boc). Partindo de um composto do tipo pirazolo N-prottegido, pz-C₆NH₂(Boc), é possível derivatizar a amina central, adicionando uma cadeia espaçadora alifática com o tamanho adequado. Com este agente quelante, realiza-se o acoplamento do aminoácido contendo grupos protetores utilizando reagentes e condições padrão para o acoplamento, seguido da hidrólise dos grupos protetores (Figura 1.4).

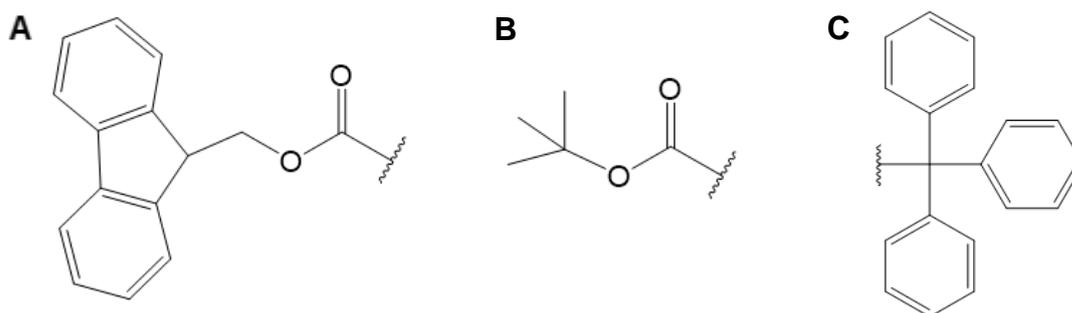


Figura 1. 5 - Grupos utilizados para proteção de aminas (N-protetores): **A**-Fmoc, **B**- Boc e **C**-Trt.

Para além do grupo Boc, também são utilizados os grupos N-protetores Fmoc e Tritil (Trt) (Figura 1.5). O Fmoc é pode ser facilmente removido em condições básicas utilizando piperidina, sendo um grupo lábil. A labilidade deste ácido deve-se à estabilização da sua base conjugada por ressonância quando se remove o hidrogénio. O grupo Tritil (Trt) é removido, posteriormente, juntamente com o grupo Boc, em condições básicas utilizando ácido trifluoracético (TFA).²⁷

2. Objetivos

O trabalho desenvolvido no âmbito deste projeto consistirá na síntese e caracterização de um conjugado pirazolo–aminoácido catiónico que irá ser utilizado na preparação de novos complexos metálicos (Re e ^{99m}Tc) para alvejamento dos transportadores de CAs. Deste modo, primeiramente, será sintetizado um novo agente quelante do tipo pirazolo contendo um CA diferente, L-His, ligado por uma cadeia espaçadora alifática com 6 carbonos – conjugado L^1 (Figura 2.1), a partir dos procedimentos descritos pelo grupo.

A purificação das moléculas obtidas pela via de síntese será realizada através de cromatografia em coluna e/ou extração líquido-líquido. A caracterização destes compostos será realizada por espectroscopia de infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e as suas correlações bidimensionais, por espectrometria de massa (ESI-MS) e HPLC.

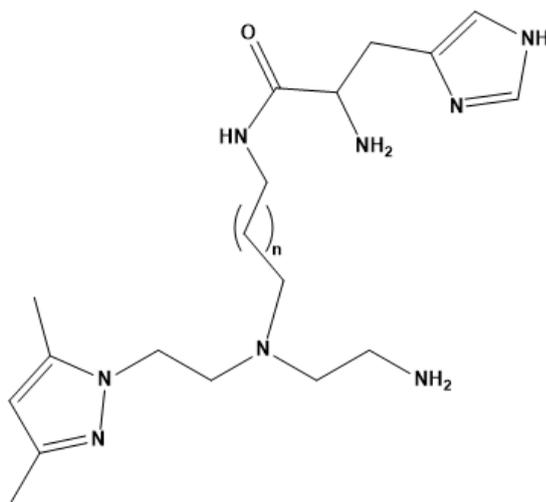


Figura 2.2 – Conjugado L^1 ($n=4$).

Posteriormente, será preparado o respetivo complexo radiometalado do tipo fac- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L})]^+$, análogos dos complexos radioativos de Tc (I), que será caracterizado pelas técnicas descritas.

3. Parte Experimental

3.1 Materiais e Técnicas de Purificação e Caracterização Química¹

▪ Solventes e Reagentes

Todos os reagentes químicos e solventes utilizados eram de qualidade pró-análise, foram adquiridos à Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Fluka Chemika, Basic Scharlau, Honeywell e Nova Biochem e foram utilizados sem qualquer purificação adicional, exceto o solvente dioxano que foi pré-seco em CaCl₂.

▪ Cromatografia em Camada Fina (TLC)

As reações químicas foram monitorizadas por TLC, utilizando tiras de sílica-gel 0,20 mm, em suporte de alumínio, com indicador de fluorescência da marca Macherey-Nagel. Os cromatogramas foram revelados com radiação ultravioleta (UV) ao comprimento de onda de 254 nm e/ou com recurso a uma câmara de iodo.

▪ Cromatografia em Coluna

As cromatografias em coluna foram realizadas utilizando sílica-gel, com granulometria 0,060 mesh da **marca**. O empacotamento das colunas foi realizado com uma mistura de sílica-gel e eluente, escolhido de acordo com o composto em estudo. Após a aplicação da amostra no topo da coluna, a eluição foi feita por ação da gravidade e os compostos recolhidos em frações de volume adequado. As frações recolhidas foram analisadas por TLC para determinar as que correspondiam aos produtos pretendidos.

▪ Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

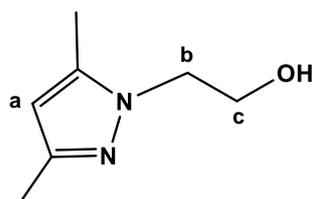
Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C_{APT} foram efetuados em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e registados num espectrofotómetro (Bruker Avance 300) 300 MHz. Os desvios químicos (δ) são apresentados em ppm e foram referenciados a partir das ressonâncias do solvente residual relativamente ao tetrametilsilano, SiMe₄ (TMS). A descrição dos espectros cumpre o seguinte formato: desvio químico de cada sinal (multiplicidade do sinal, intensidade relativa de cada sinal (número de prótons, nH), atribuição na molécula segundo a numeração apresentada (H_x). Nos espectros de ¹³C-RMN apenas se apresenta o desvio químico e a respetiva atribuição (C^x). Foram realizadas experiências 2D (¹H – ¹H COSY, ¹H – ¹³C HSQC) para melhor atribuição dos sinais.

¹ Para a caracterização química não foi possível recorrer a espectrometria de massa (MS), uma vez que o equipamento se encontrava em manutenção. Também não foi possível recorrer à espectroscopia de infravermelho (IV), que seria um dos objetivos finais do Projeto, devido à situação atual de Pandemia.

3.2 Síntese do Conjugado L¹

Para sintetizar o conjugado L¹ foram utilizados os procedimentos desenvolvidos pelo grupo na síntese do ligando análogo com L-Arg, começando pela síntese do anel pirazolo, 2-(3,5-Dimetil-1H-pirazol-1-il)etanol (**1**) até ao ligando pirazolo-diamina, *tert*-butil 2-((6-aminohexil)(2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-ilo)etil)amino)-etilcarbamato(**6**). Este composto possui um grupo protetor, Boc, no grupo amina que pertence à unidade quelante, uma cadeia espaçadora carbonada e uma função amina que deverá reagir com o grupo carboxílico do aminácido estudado neste trabalho, His. Deste modo, procedeu-se à conjugação do ligando pirazolo-diamina com Fmoc-His-Trt-OH, seguida da hidrólise dos grupos protetores.

3.2.1 PzOH (1)



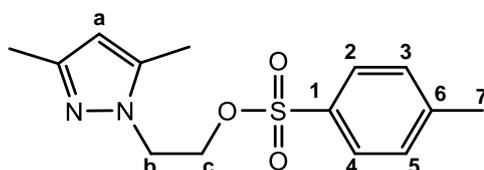
Uma solução de 2-hidroxietilhidrazina (16,9 g, 0,2 mol) em etanol absoluto (20 ml), foi adicionada, gota a gota, a 10°C, a uma solução de 2,4 – pentanodiona (20,0 g, 0,2 mol) em etanol absoluto (60 ml). Após a adição, a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h. O solvente foi, então, removido a pressão reduzida. Ao líquido amarelado foi adicionada a uma mistura de acetona/éter dietílico (10 ml/100 ml). O balão foi armazenado no congelador, formando, assim, um sólido branco amarelado. Os cristais formados foram filtrados e lavados com éter etílico frio e seco sob vácuo.

Rendimento: 22.9 g, 82 % de agulhas brancas amareladas

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 5,78 (s, 1H, H_a), 4,02 (t, 2H, H_b), 3,91 (t, 2H, H_c), 2,21 e 2,17 (s, 3H, CH₃), 2,14 (s, 3H, C₃H₆O)

¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 147,71 e 139,32 (CCH₃), 105,01 (C_a), 61,64 (C_c), 49,86 (C_b), 13,40 e 11,05 (CH₃)

3.2.2 PzSO₃ (2)



Cloreto de tosilo (9.5 g, 50.0 mmol) e **1** (7.0 g, 50.0 mmol) e foram suspensos em acetona (70 ml) e água (50 ml) e arrefecidos com um banho de gelo ($T < 10^{\circ}\text{C}$). A esta mistura foi adicionada, gota a gota, uma solução de NaOH (2.0 g, 50.0 mmol) em água destilada (25 ml), previamente colocada a uma temperatura de 0°C . Em seguida, deixou-se a mistura reacional sob agitação à temperatura ambiente, durante 1 h. Decorrido esse tempo, o solvente foi evaporado na linha de azoto e o precipitado que se formou foi filtrado, lavado com água destilada e seco sob vácuo.

Rendimento: 7,8 g, 65 % de sólido branco

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 7,62 (d, 2H, $\text{H}_{2,4}$), 7,27 (d, 2H, $\text{H}_{3,5}$), 5,73 (s, 1H, H_a), 4,32 (t, 2H, H_c), 4,22 (t, 2H, H_b), 2,42 (s, 3H, H_7), 2,21 e 2,10 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 148,11 e 140,51 (CCH_3), 145,03 (C_1), 132,33 (C_6), 129,94 ($\text{C}_{3,5}$), 127,95 ($\text{C}_{2,4}$), 105,44 (C_a), 68,89 (C_c), 47,21 (C_b), 21,74 (C_7), 13,35 e 11,06 (CH_3)

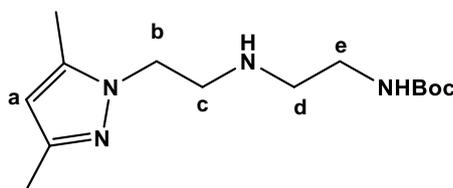
3.2.3 EnBoc (3)



Uma solução de dicarbonato de di-terc-butilo (Boc_2O) (6,5 g, 30,0 mmol) em dioxano (40 ml) foi adicionada, gota a gota, durante 1,5 h e a 15°C , a uma solução de 1,2-diaminoetano (12,0 g, 200 mmol) em dioxano seco (20 ml). A mistura foi deixada em agitação durante 22h e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. Ao resíduo obtido adicionou-se água (50 ml) e o filtrado foi extraído com CHCl_3 (4 x 60 ml). Secou-se a fase orgânica MgSO_4 e foi evaporada sob vácuo.

Rendimento: 5,7 g, 96% de óleo transparente

3.2.4 PzNBoc (4)

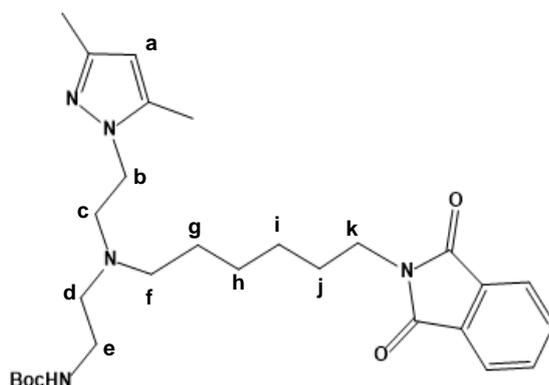


Uma solução aquosa de NaOH (0,5 g, 12,5 mmol) foi adicionada, lentamente, a **3** (2,0 g, 12,5 mmol) em THF (20 ml). Adicionou-se, gota a gota, uma solução de **2** (2,7 g, 9,2 mmol) em THF (15 ml) à mistura anterior, à temperatura ambiente. Após a adição completa dos reagentes, levou-se a mistura a refluxo durante 24 h. O produto obtido foi purificado por

cromatografia em coluna (CH_2Cl_2 (100-90%) / MeOH (0-10%)). As frações foram analisadas por TLC (MeOH (20%) / CH_2Cl_2 (80%)) e as que correspondiam ao produto foram transferidas para um balão redondo para a remoção do solvente a pressão reduzida. Posteriormente, dissolveu-se o produto obtido em CHCl_3 (50 ml) e extraiu-se o produto com água destilada (3 x 60 ml). Secou-se a fase orgânica MgSO_4 e foi evaporada sob vácuo.

Rendimento: 2,3 g, 87 % de óleo amarelo alaranjado

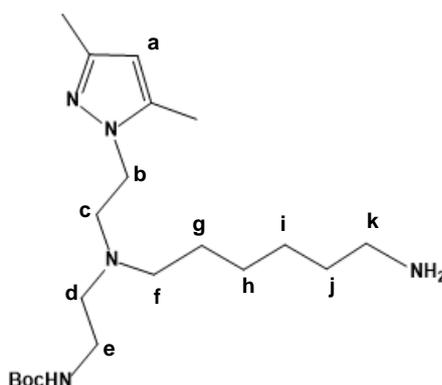
3.2.5 Precursor I (5)



O composto **4** (1,4 g, 5,1 mmol) foi dissolvido em dioxano seco (10 ml). Foi preparada uma mistura de N-(3-Bromohexil)ftalimida (3,9 g, 12,7 mmol), carbonato de potássio (K_2CO_3 , 1,7 g, 12,7 mmol) e iodeto de potássio (KI, 10%) em dioxano seco (50 ml). Fez-se a adição de **4**, gota a gota, e levou-se a mistura a refluxo durante a noite. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna (n-hexano (100-0%)/ EtOAc (0-100%)). As frações recolhidas foram analisadas por TLC (30% n-Hexano/ 70% EtOAc) e as que apresentavam produto foram colocadas num balão redondo para remoção do solvente a pressão reduzida. Posteriormente, colocou-se na linha de vácuo.

Rendimento: 0,8 g, 31 % de óleo amarelado

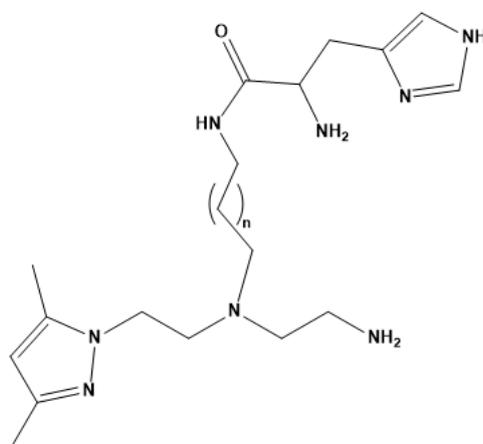
3.2.6 Precursor II (6)



Uma solução de hidrazina mono-hidratada (2,31 g, 30,0 mmol) em MeOH (20 ml) foi adicionada a uma solução de **5** (0,81g, 1,58 mmol) em MeOH (20 ml). Após a adição completa dos reagentes, levou-se a mistura a refluxo durante a noite, a uma temperatura de 90°C. Antes da remoção do solvente, foi adicionada à mistura uma solução aquosa de HCl 1M (40 ml) até pH 4,0, formando-se um precipitado branco que foi removido por filtração. A solução obtida foi transferida para um balão redondo e neutralizada com uma solução aquosa de NaOH 1M. Posteriormente, procedeu-se à extração do produto usando CH₂Cl₂ (3 x 70 ml). Secou-se a fase orgânica MgSO₄ e foi seca a pressão reduzida.

Rendimento: 0,33 g, 65% de óleo amarelado

3.2.7 Conjugado L¹



Fmoc-His-trt-OH (0,14 g, 0,22 mmol) e HBTU (0,08 g, 0,22 mmol) foram dissolvidos em diclorometano (5 ml) e a mistura resultante foi agitada 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se DIPEA (0,26 g, 2,00 mmol) e **6** (0,07 g, 0,20 mmol) em CH₂Cl₂ (1 ml) e deixou-se a mistura reacional sob agitação à temperatura ambiente, durante 4h. Foi feita uma monitorização da mistura reacional através de TLC (MeOH (20%) / CH₂Cl₂ (80%)). Posteriormente, dissolveu-se o produto em diclorometano (30 ml) e extraiu-se o produto usando água destilada (3x10ml). Secou-se a fase orgânica MgSO₄ e foi evaporada a pressão reduzida.

Para a hidrólise dos grupos protetores, dissolveu-se o produto obtido numa solução de piperidina (2 ml) em CH₂Cl₂ (10 ml). A mistura resultante foi agitada durante 30 min. O solvente foi evaporado na linha de azoto. O óleo obtido foi dissolvido numa solução de TFA (4,75 ml), Tis (0,12ml) e água destilada (0,12 ml) e colocou-se a mistura sob agitação durante 1 h. O solvente foi removido na linha de azoto e o produto foi armazenado num local frio.

4 Resultados e Discussão

4.1 Síntese e Caracterização de ligandos pirazolo-diamina (1-6)

No decorrer da parte experimental, seguindo os procedimentos descritos pelo grupo, os compostos **1** a **6** foram obtidos de acordo com a via de síntese apresentada no Esquema 4.1. A aparência dos produtos obtidos e os respectivos rendimentos de cada reação estão descritos na tabela 2. Foi realizada, apenas, a caracterização completa dos compostos **1** e **2** através de espectroscopia RMN de ^1H e ^{13}C .²

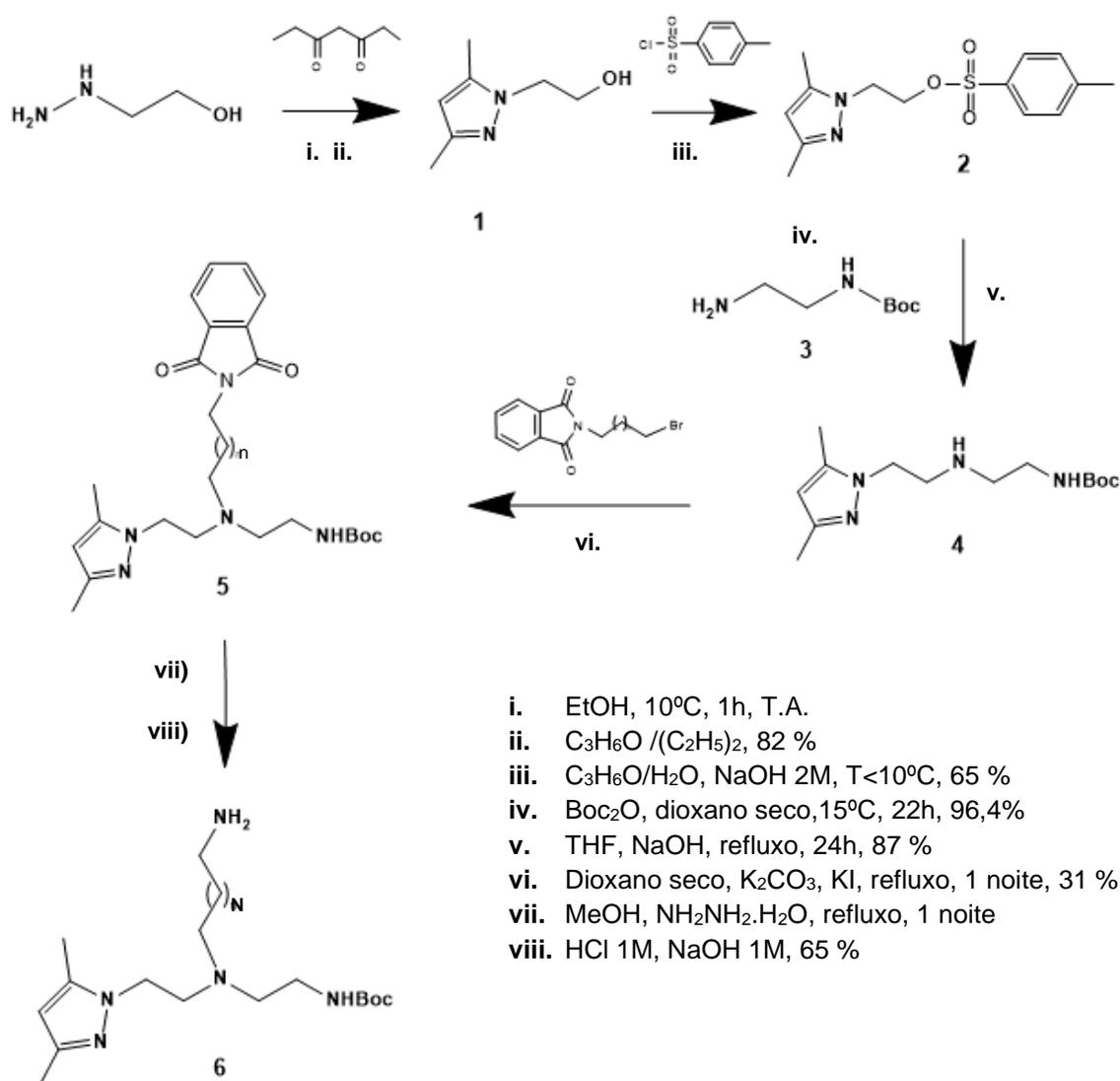


Figura 4. 1 - Síntese do precursor pirazolo-diamina N-protégido contendo uma cadeia espaçadora alifática ($n=4$), $\text{PzC}_6\text{NH}_2(\text{Boc})$ (**6**) e condições das reações da via de síntese (i a viii).

² Devido à situação da pandemia Covid-19, não foi possível proceder à caracterização completa dos restantes produtos por RMN, uma vez que as instalações do Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares do Instituto Superior Técnico se encontravam encerradas.

Tabela 2 – Quadro resumo das características dos compostos sintetizados e respectivos rendimentos.

Composto	Estado Físico	Rendimento (%)
1	Agulhas brancas amareladas	82,1%
2	Sólido Branco	64,6%
3	Óleo amarelado	96,4%
4	Óleo amarelo alaranjado	86,9%
5	Óleo amarelado	31,1%
6	Óleo amarelado	65,0%

4.1.1 PzOH (1)

De modo a incorporar a unidade heterociclo 3,5-dimetil-1H-pirazolo num ligando de maior dimensão, foi preparado, primeiramente, o composto PzOH (1). Este N-hidroximetilpirazolo foi sintetizado através de uma ciclocondensação de 2-hidroxiethylhidrazina com 2,4-pentanonona, em etanol absoluto (EtOH) a uma temperatura abaixo dos 15°C (Figura 4.1.1). Obtiveram-se cristais brancos amarelados, cuja forma se assemelhava a agulhas, com um rendimento de 82 %.

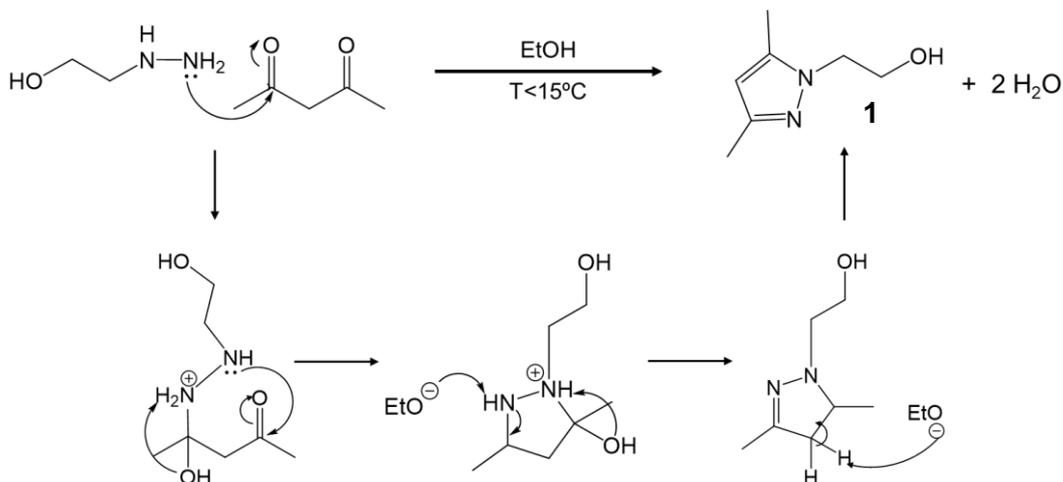


Figura 4.1.4- Mecanismo de síntese do composto PzOH (1).

No espectro $^1\text{H-RMN}$, a presença do sinal de protão aromático (**a**) a 5,78 ppm e os sinais a 2,21 e 2,17 ppm referentes aos protões equivalentes a cada um dos grupos metilo ligados ao anel pirazolilo, evidencia a presença do composto. Entre 3,91 e 4,04 ppm, são observados os sinais correspondentes à cadeia alifática presente no composto (**b** e **c**, respetivamente). O desvio entre os tripletos é expectável de acordo com os dados obtidos em experiências anteriores e dada a diferente vizinhança de cada conjunto de protões. Uma vez que o grupo hidroxilo apresenta um protão lábil, ou seja, a permuta do protão pelo deutério, não se observa o sinal correspondente a este protão.

Através das correlações 2D conseguiu-se atribuir todos os sinais de próton, inequivocamente, à exceção dos prótons correspondentes aos grupos metilo do anel. A correlação HMQC (H-C até 1 ligação) contribui para a associação de prótons a carbonos, através da comparação dos sinais individuais de cada um dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C com os dados da correlação, facilitando assim a leitura do espectro de carbono treze. A partir desta correlação foi possível atribuir, deste modo, os prótons **b** e **c**. Para a distinção dos sinais dos prótons dos carbonos primários correspondentes aos metilos do anel no ^1H RMN, seria necessário realizar uma correlação HMBC (H-C até 3 a 4 ligações). Este tipo de correlação permite obter informação sobre os carbonos quaternários

No espectro RMN de próton, também foi verificada a presença de um pico a 2,14 ppm, não correspondente ao composto caracterizado. Segundo a literatura²⁶, constatou-se que se tratava da presença de resíduos de acetona, o que pode ser explicado pelo facto de ter sido utilizado solvente em excesso na preparação do composto.

4.1.2 PzSO₃ (2)

A síntese do composto **2** baseou-se na ativação do composto, isto é, a conversão do grupo hidroxilo num grupo tosilo, um excelente grupo de saída em reações de substituição nucleofílica. Para tal, foi utilizada uma mistura de acetona e água como solvente. O mecanismo da reação consiste na reação do álcool primário do composto **1** com o cloreto de tosilo, eliminando o ião cloreto (Cl^-). A adição lenta de NaOH permitiu a subsequente desprotonação, formando cloreto de sódio (NaCl) e água. (Figura 4.1.2). Para evaporação do solvente, foi utilizada uma corrente de azoto pois a remoção da acetona a pressão reduzida poderia degradar o produto, uma vez que é sensível a temperaturas acima dos 30°C. Obteve-se um sólido branco com um rendimento de 65 %.

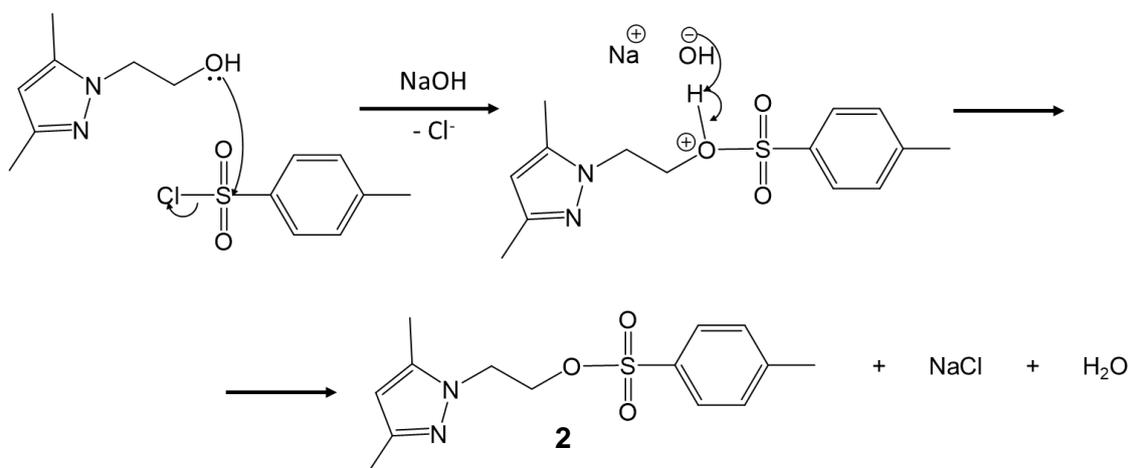


Figura 4.1. 5 – Mecanismo de Síntese do composto PzSO₃ (**2**)

No espectro ^1H RMN, observou-se um conjunto de sinais consistente com a integridade estrutural do composto. Os sinais característicos dos prótons correspondentes ao anel pirazolilo encontram-se na mesma gama de δ . O conjunto de sinais correspondentes aos prótons de **b** e **c** aparecem a um campo mais baixo, devido à presença do grupo tosilo. Os sinais dos prótons do anel aromático do grupo tosilo (**2 a 5**), bem como do grupo metilo (**7**) a ele associado são observados, respectivamente, a 7,62 e 7,27, e 2,42 ppm.

A correlação 2D COSY (H-H até 3 ligações) permitiu relacionar os grupos funcionais com prótons adjacentes. Deste modo, foi possível relacionar os prótons correspondentes aos carbonos do anel aromático que pertence ao grupo tosilo. Segundo esta correlação, permitiu relacionar os prótons em **3** e **5** com os prótons em **7** (Espectro **1A**). Também foi possível verificar que o próton **a** apresentava como vizinhança os prótons correspondentes aos metilos do anel (Espectro **1B**). A possível explicação para estas correlações seria a liberdade de rotação das ligações simples C-H. A análise bidimensional, através de uma experiência por HSQC, permitiu fazer a atribuição estrutural do composto. No entanto, não foi possível fazer a distinção dos sinais correspondentes ao conjunto de prótons relativos aos grupos metilo do anel.

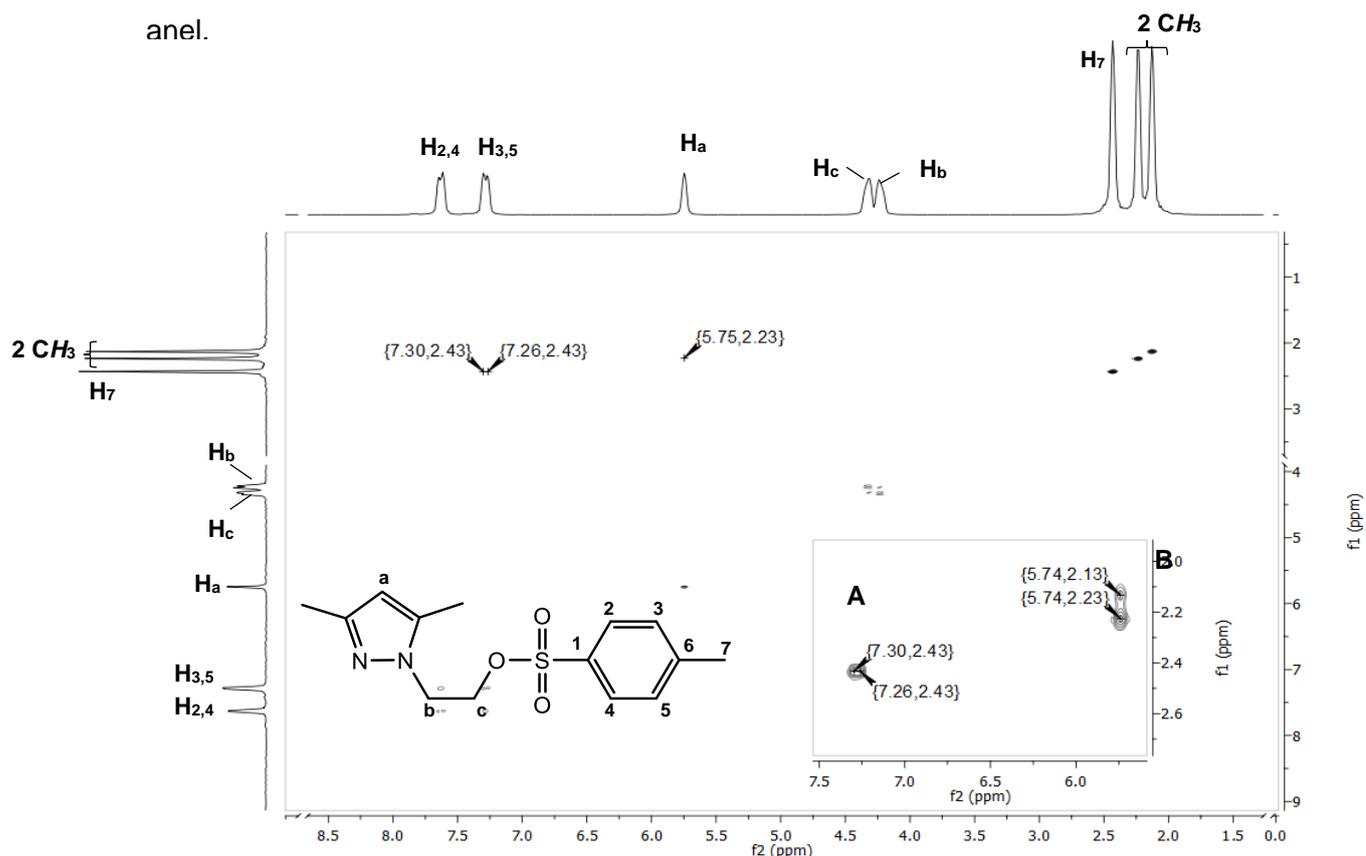


Figura 4.1.2.1 - Correlação 2D COSY em CDCl_3 do composto PzSO_3 (**2**). Estão representadas as correlações H-H com mais do que 3 ligações de distância. **A** – Correlação dos $\text{H}_{3,5}$ com H_7 ; **B** - Correlação do H_a e CH_3 (anel pirazolilo).

4.1.3 EnBoc (3)

A reação de N-proteção de aminas levada a cabo consistiu na utilização de um grupo protetor Boc. Este éster, quando é utilizado para a proteção de aminas, dá origem a um carbamato (3). O reagente mais utilizado para este tipo de proteção é o di-terc-butil-dicarbonato, $(\text{Boc})_2\text{O}$.

Para a síntese deste composto utilizou-se etilenodiamina e protegeu-se um dos grupos amina com o grupo Boc, de modo a prosseguir com as reações seguintes (Esquema 4.1.3). O mecanismo de proteção consiste num ataque do átomo de azoto da amina da etilenodiamina ao carbono do grupo carbonilo, com expulsão do carbonato. No passo seguinte, o próprio carbonato remove o protão do átomo de N e origina o produto final. Note-se que a adição de $(\text{Boc})_2\text{O}$ foi feita lentamente e na presença de excesso de diamina, de modo a obter apenas o produto mono-substituído (3).

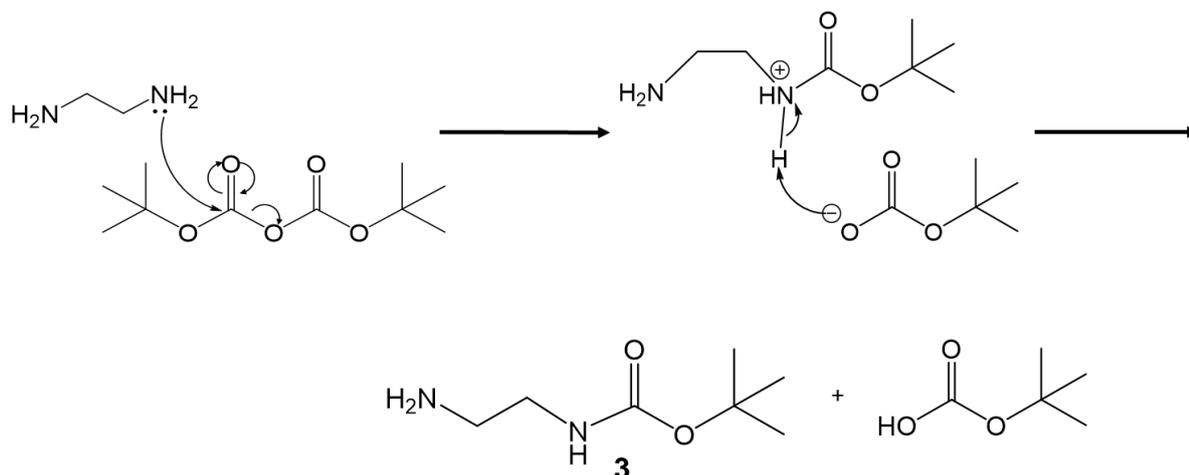


Figura 4.1. 7 – Proteção da amina primária da etilenodiamina com o grupo N-protetor Boc, dando origem ao produto mono-substituído EnBoc (3).

O solvente utilizado foi dioxano pré-seco em CaCl_2 . Deste modo, não permitiu a degradação do composto pela presença de água. Formou-se um precipitado branco, correspondente ao produto bis-substituído, que foi removido através de uma filtração. Para a separação do produto mono-substituído, procedeu-se à extração do composto para a fase orgânica. Deste modo, a partir deste ensaio obteve-se um óleo transparente, com um rendimento excelente, 96 %.

4.1.4 PzNBoc (4)

Esta reação consiste numa reação de substituição nucleofílica. Como referido anteriormente, para este tipo de reações, é necessário proteger uma das aminas primárias de modo a obter-se apenas o produto mono-substituído. Desta forma, a reação foi levada a cabo utilizando o composto **3** e o composto **2**.

A reação de tosilção levada a cabo em **iii** transformou o grupo hidroxilo de **1** num excelente grupo de saída (**OTs**), que é suscetível a uma reação S_N2 . Assim, efetuou-se a reação com a presença de hidróxido de sódio utilizando THF como solvente (Esquema 4.1.4). O átomo de azoto da amina primária do composto **3** ataca o carbono ligado ao grupo tosilo, eliminando-o. Deste modo, forma-se um sal de p-toluenosulfonil de sódio (NaOTs).

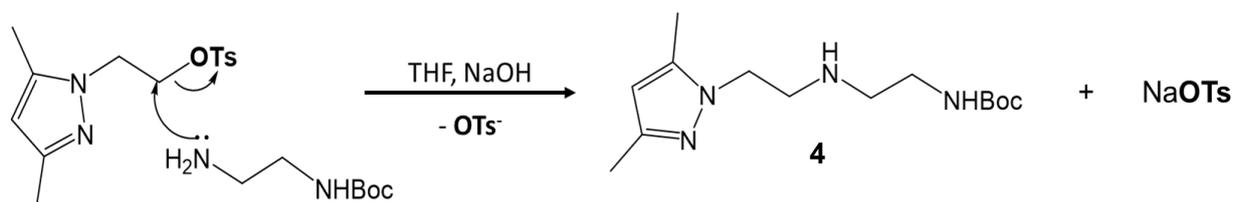


Figura 4.1.8 – Mecanismo reacional para a síntese do composto PzNBoc (**4**).

Esta reação decorreu em refluxo durante 24h. Ao fim deste tempo, era evidente por TLC a formação do produto. Para a purificação do composto foi utilizada uma coluna sílica gel e na fase móvel um gradiente de 0 – 10 % metanol/diclorometano. Este gradiente foi escolhido com base nos procedimentos descritos pelo grupo e em testes feitos por TLC com diferentes gradientes de MeOH (0, 5 e 10%), utilizando os reagentes e a mistura reacional. Deste modo, verificou-se que a 0% MeOH haveria a separação do composto tosilo, sendo o mais polar. A partir dos 5% até 10%, verifica-se uma maior separação do produto pretendido do composto **3** utilizado em excesso. As frações foram recolhidas e monitorizadas por TLC (20 % metanol/diclorometano).

O composto **4** foi obtido sob a forma de óleo viscosos de cor amarela alaranjada, com um rendimento de 87 %.

4.1.5 Precursor I (5)

Para a síntese deste precursor procedeu-se à derivatização da amina central do ligando pirazolo-diamina (4), adicionando uma cadeia espaçadora alifática de 6 átomos de carbono, através de uma reação de N-alkilação^{28,29}, utilizando o espaçador N-(6-bromohexil)ftalimida e K_2CO_3 , em dioxano seco. O átomo de carbono ligado ao halogéneo (Br) sofre o ataque nucleofílico pelo par não-ligante do átomo de azoto do composto 4. Sendo o átomo de bromo um bom grupo de saída, o ligando é N-alkilado pelo espaçador (Esquema 4.1.5). Como a reação não é energeticamente favorecida, adicionou-se uma solução de KI (10%), como agente catalisador da reação.

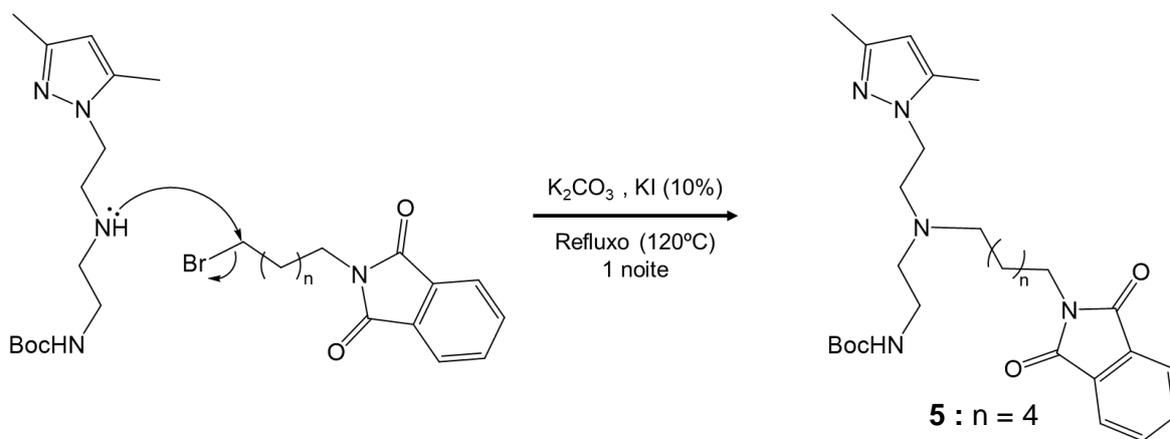


Figura 4.1.10 – Mecanismos reacional para a síntese do precursor I (5), contendo uma cadeia espaçadora alifática ($n=4$) e o grupo ftalimida.

A mistura reacional foi filtrada para remover o excesso de carbonato de potássio em suspensão. A purificação do produto foi realizada utilizando uma coluna sílica gel e na fase móvel um gradiente de 100 - 0 % n-hexano/acetato de etilo, como descrito pelo grupo. Este gradiente teve como objetivo de remover o espaçador que se encontrava em excesso e obter o composto 5 puro. Note-se que o precursor e o espaçador apresentam polaridades bastante distintas, de acordo com as frações foram recolhidas e monitorizadas por TLC (30% n-hexano/acetato de etilo).

O precursor foi, então, obtido sob a forma de um óleo viscoso de cor amarela alaranjada, com um rendimento de 31%. Esta reação não teve o melhor rendimento, em comparação com os resultados de experiências anteriores, com rendimentos de 50%. Uma possível explicação para este resultado pode dever-se à perda de produto durante a filtração. Nesta etapa, verificou-se a presença de um precipitado de coloração idêntica ao óleo obtido, o que indica que, devido ao excesso de carbonato, o composto pretendido depositou e não foi possível a sua extração.

4.1.6 PzC₆NH₂(Boc) (6)

Tendo em vista a síntese do ligando pirazolo-diamina, contendo a cadeia espaçadora, resolveu-se fazer a modificação estrutural do composto **5**, removendo o grupo ftalimida. A reação de desproteção com hidrazina-monohidratada decorreu em refluxo durante a noite, em MeOH. O par não ligante do átomo de azoto da hidrazina ataca o carbono do grupo carbonilo da ftalimida, promovendo a abertura do anel, onde a hidrazina fica acoplada. A adição de HCl promove o ataque do par não ligante do segundo átomo de azoto da hidrazina ao segundo carbonilo da ftalimida, levando à ciclização. Este processo promove a libertação da amina primária ligada ao ligando, precipitando a ftalazina.²⁸

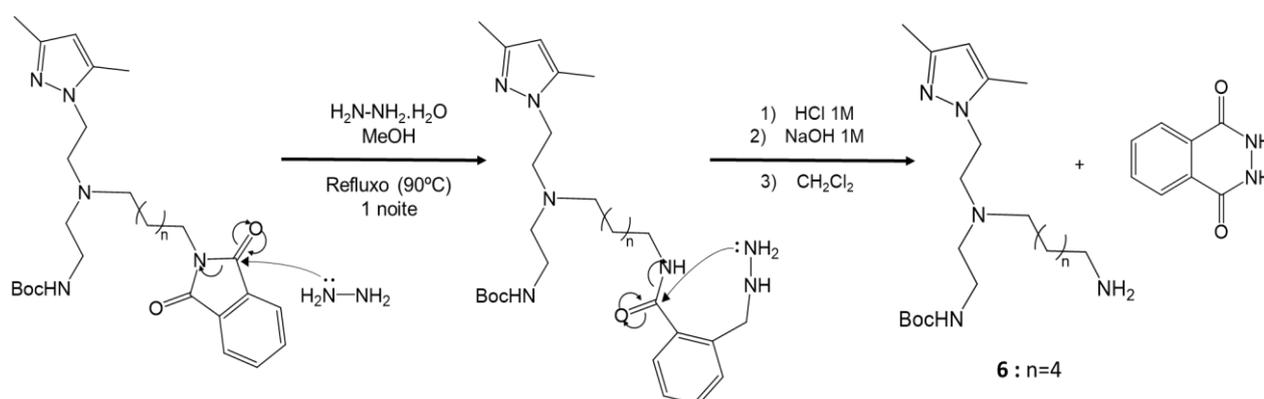


Figura 4.1. 13 – Mecanismo reacional para a síntese do precursor N-protetido, PzC₆NH₂(Boc) (**6**).

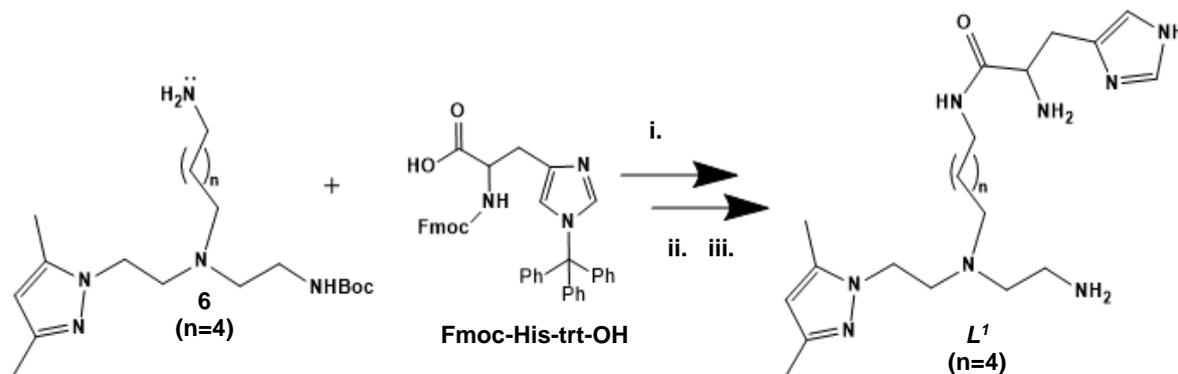
Filtrou-se, posteriormente, a mistura reacional, removendo a ftalazina que se formou. De modo a promover a desproteção da amina, foi utilizada uma solução de NaOH até pH ~7,0, que se extraiu com CH_2Cl_2 . O composto **6** foi obtido sob a forma de óleo viscoso de cor amarelada, com rendimento de 65 %.

Este rendimento, por comparação com o dos métodos descritos, é inferior ao esperado. Este valor pode ser explicado pela execução da medição do pH através de um método colorimétrico. Este método baseia-se no uso de indicadores que variam de cor em função do pH. Uma vez que a faixa de pH é avaliada visualmente, este método torna-se pouco preciso. Na primeira extração do composto para a fase orgânica e evaporação do solvente, não se observou o óleo como seria de esperar. A amina do composto estaria protonada, ficando na fase aquosa. Deste modo, repetiu-se o procedimento, acertando, novamente, o pH. Verificou-se, então, a presença do composto, no entanto, tendo em conta o rendimento obtido, pode-se concluir que parte ficou na fase aquosa, devido à imprecisão do método.

Uma forma de melhorar o rendimento, tendo em conta o problema apontado, seria utilizar um eletrodo de pH para a sua medição, durante a adição lenta de NaOH.

4.2 Síntese do conjugado L^1

Foi preparado o conjugado L^1 contendo His pendente seguindo os procedimentos experimentais descritos anteriormente. (Esquema 4.2).



- i. HBTU, DIPEA, CH_2Cl_2 , 4h, t.a.;
- ii. Piperidina - CH_2Cl_2 , 0,5h, t.a.
- iii. TFA-TIS- H_2O , 1h, t.a.

Figura 4. 3 - Síntese do Conjugado L^1 e condições das reações (i a iii).

4.2.1 Ativação do AA e Preparação do Conjugado L^1 com grupos protetores (i)

Neste procedimento, foi utilizado o aminoácido His com a presença de grupos protetores nos grupos amina, Fmoc-His-Trt-OH. Deste modo o acoplamento foi conseguido através do ataque nucleofílico da amina primária ao carbono do grupo α -COOH. Uma vez que se utilizou um composto previamente protegido, não foi necessária uma etapa sintética adicional, o contribuirá para um melhor rendimento.

Para realizar o acoplamento do aminoácido, HBTU, diclorometano e DIPEA são adicionados ao meio reacional e o próprio aminoácido. A DIPEA é adicionada para desprotonar o grupo α -COOH de Fmoc-His-Trt-OH (Esquema 4.2.1-A), o diclorometano para solubilizar os reagentes e HBTU para ativar o aminoácido (Esquema 4.2.1-B). A reação de ativação permite a diminuir a diferença de energia entre os reagentes e o complexo ativado, permitindo que a reação de formação da ligação amida (representada a vermelho no Esquema 4.2.1-C) entre o precursor $\text{PzC}_6\text{NH}_2\text{Boc}$ e o aminoácido seja energeticamente favorecida. O grupo ativador adicionado é também um bom grupo de saída, o que também favorece a reação. Com o derivado de aminoácido ativado, é possível proceder à reação de conjugação. Para a purificação do conjugado L^1 , foi realizada uma extração com diclorometano.

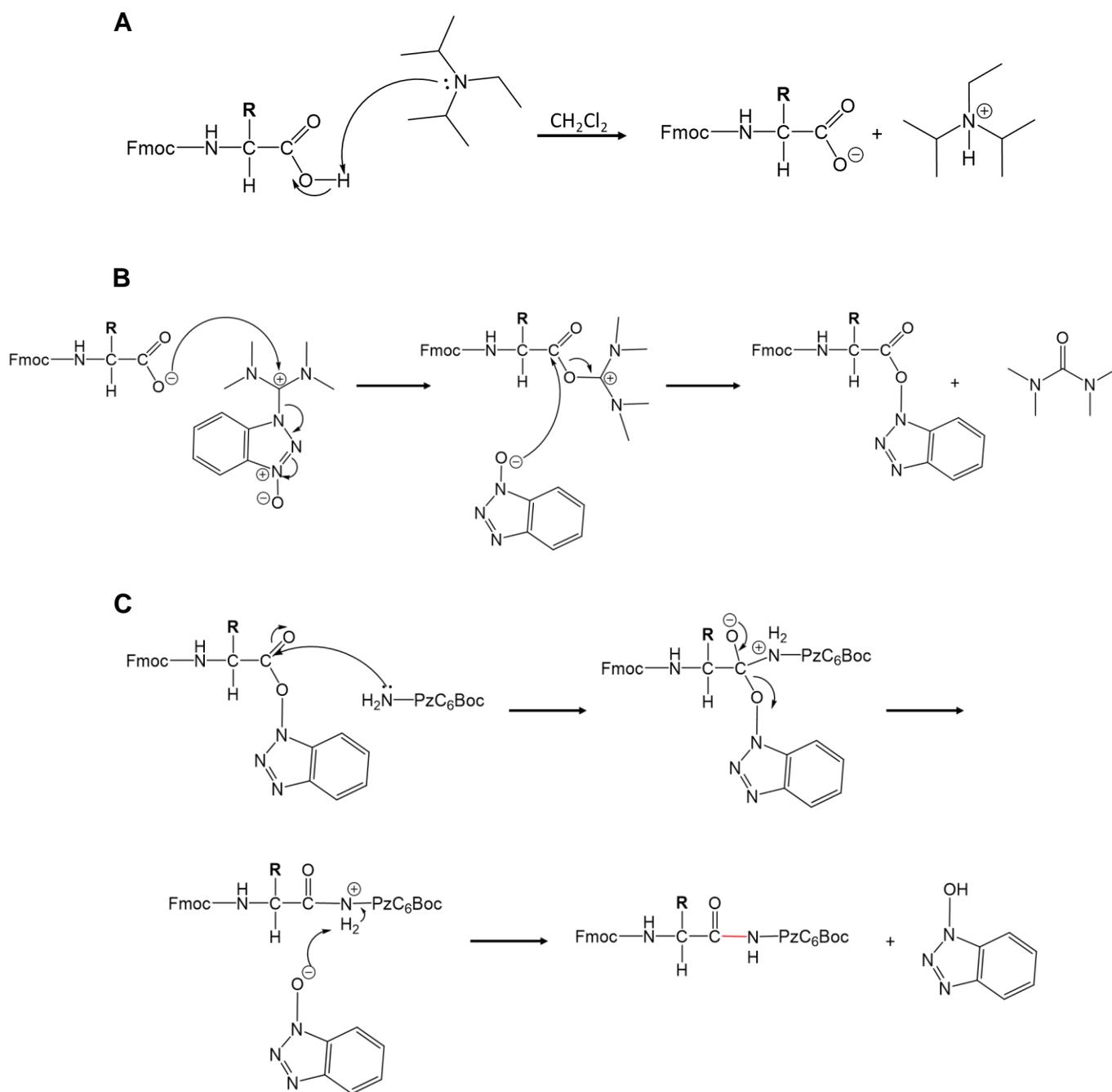


Figura 4.2.6 - Esquema geral para o acoplamento do Fmoc-His-Trt com o precursor PzC₆NH₂, em que R é a cadeia lateral de L-His e o grupo protetor Trt. **A:** Desprotonação do grupo ácido do derivado de L-His. **B:** Reação de ativação de Fmoc-His-Trt como HBTU; **C:** Reação de conjugação.

4.2.2. Hidrólise dos grupos protetores (ii)

Posteriormente, procedeu-se à desproteção das aminas primárias e hidrólise do grupo éster (Boc). Para tal foram necessários dois passos reacionais. O primeiro passo consistiu na remoção do grupo Fmoc, através de uma reação S_N1 , utilizando piperidina, em diclorometano, para a regeneração da amina livre ($-NH_2$), como representado no esquema 4.2.2.

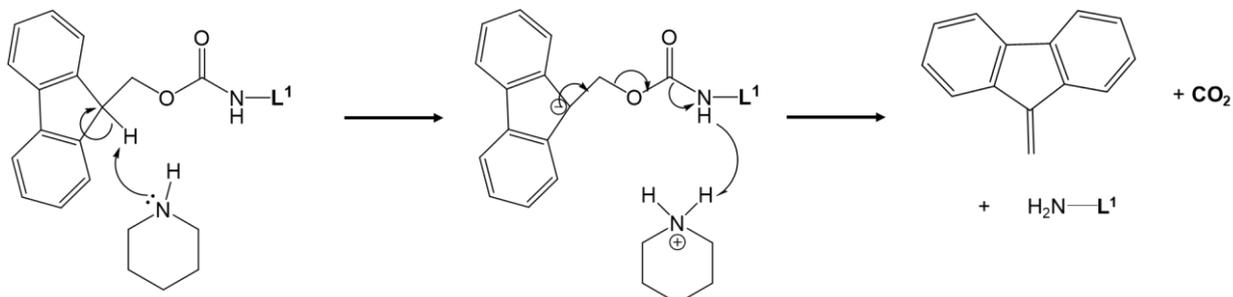


Figura 4.2.10 - Remoção do grupo Fmoc pela piperidina para a regeneração da $-NH_2$ livre, em que L^1 apresenta os grupos Boc e Trt.

De seguida, procedeu-se à remoção dos grupos protetores Boc e Trt, utilizando uma mistura TFA:TIPS:H₂O (95%:2,5%:2,5%). O processo de desproteção pelo TFA leva à formação de carbocátions intermediários muito reativos, através de uma reação S_N1 . Para evitar formação de produtos indesejáveis, foi adicionada uma espécie com maior nucleofilicidade, como o TIPS, à mistura. Este atua como um agente redutor uma vez que permite a transferência de hidreto devido à ligação Si-H fraca, eliminando, deste modo, o carbocátion formado. A quebra de ligação em TIPS gerou uma espécie carregada positivamente, que se junta com a base conjugada do TFA, formando um éter de sililo.

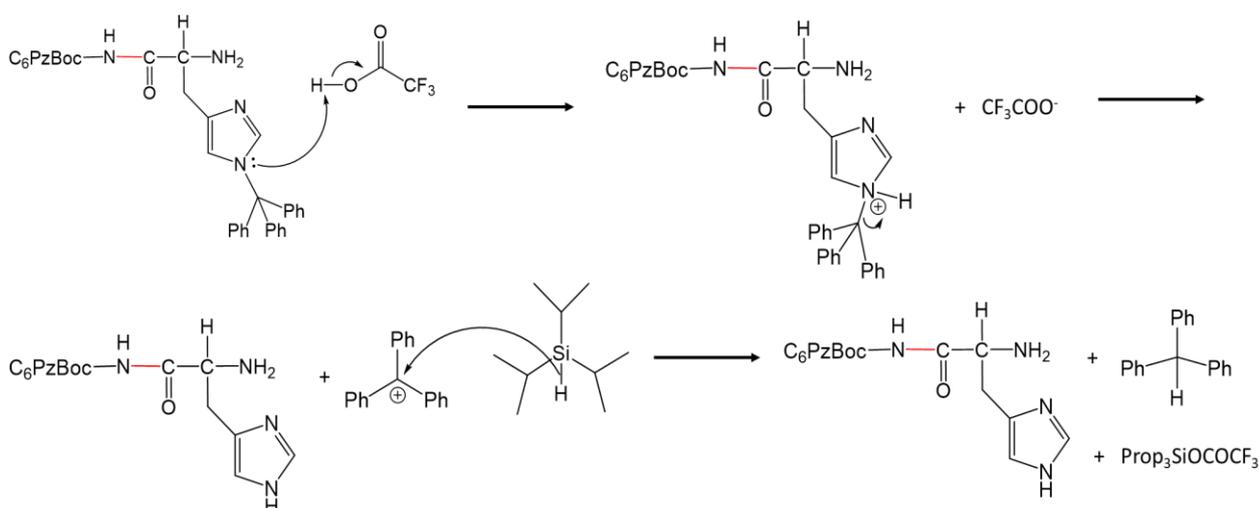


Figura 4.2.11 – Remoção dos grupo Tritil (Trt) e Boc utilizando a mistura TFA:TIPS:H₂O.

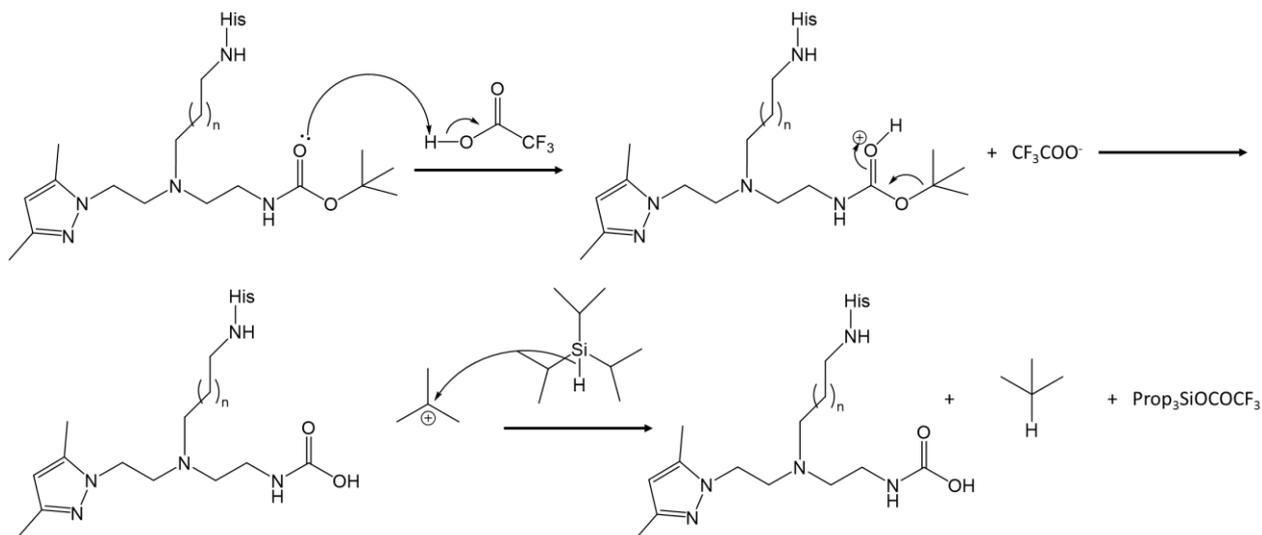


Figura 4.2.12 - Remoção do grupo protetor Boc para formação da amina primária do ligando pirazolo-diamina.

Obteve-se, deste modo, uma mistura contendo conjugado L¹ sob a forma de óleo de cor amarelada. Os passos seguintes seriam a extração e purificação por RP-HPLC, de acordo com os procedimentos descritos pelo grupo, para remover alguns dos agentes sequestrantes ou outras pequenas moléculas.

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa utiliza como fase estacionária uma superfície com menor polaridade do que a fase móvel. Esta técnica é utilizada com o intuito de solubilizar e separar compostos polares. Deste modo, os compostos não polares serão atraídos para a fase estacionária, tendo uma eluição mais lenta. Quanto maior a polaridade do soluto menor será o tempo de eluição.

O esperado, depois da purificação seria obter um óleo estável transparente com uma quantidade de 0,048 g, segundo a quantidade de composto **5** utilizada para a reação. No entanto, como não foi possível recorrer a RP-HPLC, o rendimento da reação de conjugação do aminácido L-His à cadeia espaçadora do ligando pirazolo-diamina não foi determinado.

5 Conclusão

No âmbito deste projeto foi desenvolvido um agente quelante do tipo pirazolo contendo um novo aminoácido catiónico pendente, L-His - Conjugado L^1 - ao contrário dos vários estudos feitos com L-Arg, através da via de síntese proposta pelo grupo.

A primeira estratégia sintética tinha como objetivo a obtenção de um ligando pirazolo – diamina tridentado assimétrico com a cadeia espaçadora alifática de 6 carbonos na amina central. Para tal, foi necessário incorporar a unidade heterociclo 3,5-dimetil-1H-pirazolo e adicionar uma cadeia com aminas alifáticas. A N-alquilação da amina central trata-se de uma reação regioseletiva, uma vez que a amina primária terminal potencialmente reativa foi protegida com um grupo protetor Boc.

A síntese e purificação dos compostos contendo a unidade pirazolo, **1** a **6**, foi, no geral, bem-sucedida, ao nível do rendimento, permitindo obter rendimentos superiores a 82%, excetuando o composto **5**, devido à formação e filtração de um precipitado contendo algum do produto, e o composto **6**, já que deriva do composto **5**.

A conjugação do aminoácido com o agente quelante sintetizado foi realizada em dois passos reacionais, a ativação do aminoácido com os grupos protetores (Fmoc e Trt) para a conjugação, seguida da hidrólise dos grupos protetores. A utilização de Fmoc-His-trt-OH teve como objetivo realizar o acoplamento do ligando com o grupo α -COOH do aminoácido. A desproteção das aminas primárias e hidrólise do grupo éster (Boc) foi dividida em duas partes, de modo a obter o conjugado intacto. Na primeira, procedeu-se à hidrólise do Fmoc utilizado a piperidina. Já a remoção global dos grupos Trt e Boc foi realizada utilizando uma mistura TFA-TIS-H₂O. A desproteção do conjugado L^1 consistiu em reações do tipo SN₁, onde se formou um carbocátion extremamente reativo e foi rapidamente eliminado de modo a não haver formação de produtos indesejados. Para a purificação do produto final seria necessário fazer uma cromatografia líquida através de RP-HPLC, que não foi possível de se realizar.

Um dos objetivos propostos para este trabalho seriam a caracterização das moléculas obtidas por espetrometria de massa (ESI-MS), através de métodos espectroscópicos, nomeadamente, ¹H e ¹³C RMN, infravermelho (IV), e HPLC. Outro seria a preparação do complexo metálico de Re e a sua caracterização. Por diferentes motivos, como a indisponibilidade do equipamento e o encerramento das instalações devido à situação da Pandemia Covid-19, não foi possível caracterizar completamente todos os compostos obtidos.

Foi realizada a caracterização completa dos compostos **1** e **2** por ¹H e ¹³C RMN. A partir dos espetros, evidenciou-se que o elevado grau de pureza destas amostras, apesar da presença de solvente na amostra de PzOH. As correlações 2D contribuíram para uma

atribuição inequívoca de todos os sinais de próton, à exceção dos prótons correspondentes aos grupos metilo do anel. No futuro, deve ser realizada a correlação HMBC (H-C até 3 ligações) para a melhor atribuição dos sinais do anel pirazolilo.

Concluindo, apesar da não execução de todos os objetivos, foi possível compreender uma nova estratégia de síntese de novos agentes quelantes contendo um fragmento biologicamente ativo, mais concretamente, um aminoácido catiónico, L-His. O objetivo futuro no desenvolvimento destes conjugados pirazolo-aminoácidos será a preparação de novos complexos metálicos de Re (I) e Tc (I) para analisar o seu comportamento biológico e interação com os transportadores de aminoácidos catiónicos sobreexpressos em vários tipos de células tumorais humanas. Deste modo, permitirá perceber a sua relevância nesta área e o seu potencial no desenvolvimento de radiofármacos para a imagiologia não invasiva e terapêutica (teranóstica) do cancro.

Bibliografia

- (1) Cancer <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed May 18, 2020).
- (2) Alguns tipos de cancro - IPO Lisboa <https://www.ipolisboa.min-saude.pt/sobre-o-cancro/alguns-tipos-de-cancro/> (accessed Apr 13, 2020).
- (3) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 657–658. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>.
- (4) Ganapathy, V.; Thangaraju, M.; Prasad, P. D. Nutrient Transporters in Cancer: Relevance to Warburg Hypothesis and Beyond. *Pharmacol. Ther.* **2009**, *121* (1), 29–40. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2008.09.005>.
- (5) Pavlova, N. N.; Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* **2016**, *23* (1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
- (6) Fuchs, B. C.; Bode, B. P. Amino Acid Transporters ASCT2 and LAT1 in Cancer: Partners in Crime? *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press August 1, 2005, pp 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2005.04.005>.
- (7) Huang, C.; McConathy, J. Radiolabeled Amino Acids for Oncologic Imaging. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54* (7), 1007–1010. <https://doi.org/10.2967/JNUMED.112.113100>.
- (8) Bhutia, Y. D.; Babu, E.; Ramachandran, S.; Ganapathy, V. Amino Acid Transporters in Cancer and Their Relevance to “Glutamine Addiction”: Novel Targets for the Design of a New Class of Anticancer Drugs. *Cancer Res.* **2015**, *75* (9), 1782 LP – 1788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3745>.
- (9) Pauwels, E. K. J.; McCready, V. R.; Stoot, J. H. M. B.; van Deurzen, D. F. P. The Mechanism of Accumulation of Tumour-Localising Radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, *25* (3), 286. <https://doi.org/10.1007/s002590050229>.
- (10) Morais, M.; Ferreira, V. F. C.; Figueira, F.; Mendes, F.; Raposinho, P.; Santos, I.; Oliveira, B. L.; Correia, J. D. G. Technetium-99m Complexes of L-Arginine Derivatives for Targeting Amino Acid Transporters. *Dalt. Trans.* **2017**, *46* (42), 14537–14547. <https://doi.org/10.1039/c7dt01146f>.
- (11) 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 ATB0,+ (SLC6A14) in Colorectal Cancer and Metastasis in Humans. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1741* (1–2), 215–223.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.04.002>.

- (12) Lu, Y.; Wang, W.; Wang, J.; Yang, C.; Mao, H. Overexpression of Arginine Transporter CAT-1 Is Associated with Accumulation of L-Arginine and Cell Growth in Human Colorectal Cancer Tissue. *PLoS One* **2013**, *8* (9), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073866>.
- (13) Closs, E. I.; Boissel, J. P.; Habermeier, A.; Rotmann, A. Structure and Function of Cationic Amino Acid Transporters (CATs). *Journal of Membrane Biology*. September 2006, pp 67–77. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0875-7>.
- (14) McConathy, J.; Yu, W.; Jarkas, N.; Seo, W.; Schuster, D. M.; Goodman, M. M. Radiohalogenated Nonnatural Amino Acids as PET and SPECT Tumor Imaging Agents. *Medicinal Research Reviews*. July 2012, pp 868–905. <https://doi.org/10.1002/med.20250>.
- (15) R. Dilworth, J.; J. Parrott, S. The Biomedical Chemistry of Technetium and Rhenium. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27* (1), 43–55. <https://doi.org/10.1039/A827043Z>.
- (16) Kassis, A. I.; Adelstein, S. J. Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46* (1 SUPPL.).
- (17) Josephs, D.; Spicer, J.; O'Doherty, M. Molecular Imaging in Clinical Trials. *Targeted Oncology*. September 2009, pp 151–168. <https://doi.org/10.1007/s11523-009-0117-x>.
- (18) Correia, J.; Paulo, A.; Santos, I. Re and Tc Complexes with Pyrazolyl-Containing Chelators: From Coordination Chemistry to Target-Specific Delivery of Radioactivity. *Curr. Radiopharm.* **2009**, *2* (4), 277–294. <https://doi.org/10.2174/1874471010902040277>.
- (19) Liu, S. The Role of Coordination Chemistry in the Development of Target-Specific Radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews*. September 10, 2004, pp 445–461. <https://doi.org/10.1039/b309961j>.
- (20) Pimlott, S. L.; Sutherland, A. Molecular Tracers for the PET and SPECT Imaging of Disease. *Chemical Society Reviews*. January 2011, pp 149–162. <https://doi.org/10.1039/b922628c>.
- (21) Banerjee, S. R.; Babich, J. W.; Zubieta, J. Bifunctional Chelates with Aliphatic Amine Donors for Labeling of Biomolecules with the {Tc(CO)₃}⁺ and {Re(CO)₃}⁺ Cores: The Crystal and Molecular Structure of [Re(CO)₃{(H₂NCH₂CH₂)₂N(CH₂)₄CO₂Me}]Br. *Inorg. Chem. Commun.* **2004**, *7* (4), 481–484. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2004.01.008>.

- (22) 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 $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand [8]. *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society August 12, 1998, pp 7987–7988. <https://doi.org/10.1021/ja980745t>.
- (23) Maria, L.; Cunha, S.; Videira, M.; Gano, L.; Paulo, A.; Santos, I.; Santos, I. C. Rhenium and Technetium Tricarbonyl Complexes Anchored by Pyrazole-Based Tripods: Novel Lead Structures for the Design of Myocardial Imaging Agents. *Dalt. Trans.* **2007**, No. 28, 3010–3019. <https://doi.org/10.1039/b705226j>.
- (24) Alberto, R. New Organometallic Technetium Complexes for Radiopharmaceutical Imaging. *Top. Curr. Chem.* **2005**, 252, 1–44. <https://doi.org/10.1007/b101223>.
- (25) Oliveira, B. L.; Raposinho, P. D.; Mendes, F.; Figueira, F.; Santos, I.; Ferreira, A.; Cordeiro, C.; Freire, A. P.; Correia, J. D. G. Re and Tc Tricarbonyl Complexes: From the Suppression of NO Biosynthesis in Macrophages to in Vivo Targeting of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Bioconjug. Chem.* **2010**, 21 (12), 2168–2172. <https://doi.org/10.1021/bc100291e>.
- (26) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, 29 (9), 2176–2179. <https://doi.org/10.1021/om100106e>.
- (27) Clayden, J.; Greeves, N.; & Warren, S. G., *Organic chemistry*. 2 ed.; Oxford University Press: Oxford, 2012; Vol.23, p 553 - 561
- (28) Pereira, E. Compostos Radioiodados para Terapia Auger, Master's Dissertation, Universidade Nova de Lisboa, 2015
- (29) Silva, K. Síntese do composto Tetrafluorborato de Cobre (I) Tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrila)-(Cu[MIBI]₄BF₄): Substrato utilizado na produção do Radiofármaco Sestamibi-^{99m}Tc, Master's Dissertation, Univeridade de São Paulo, 2005

Anexo

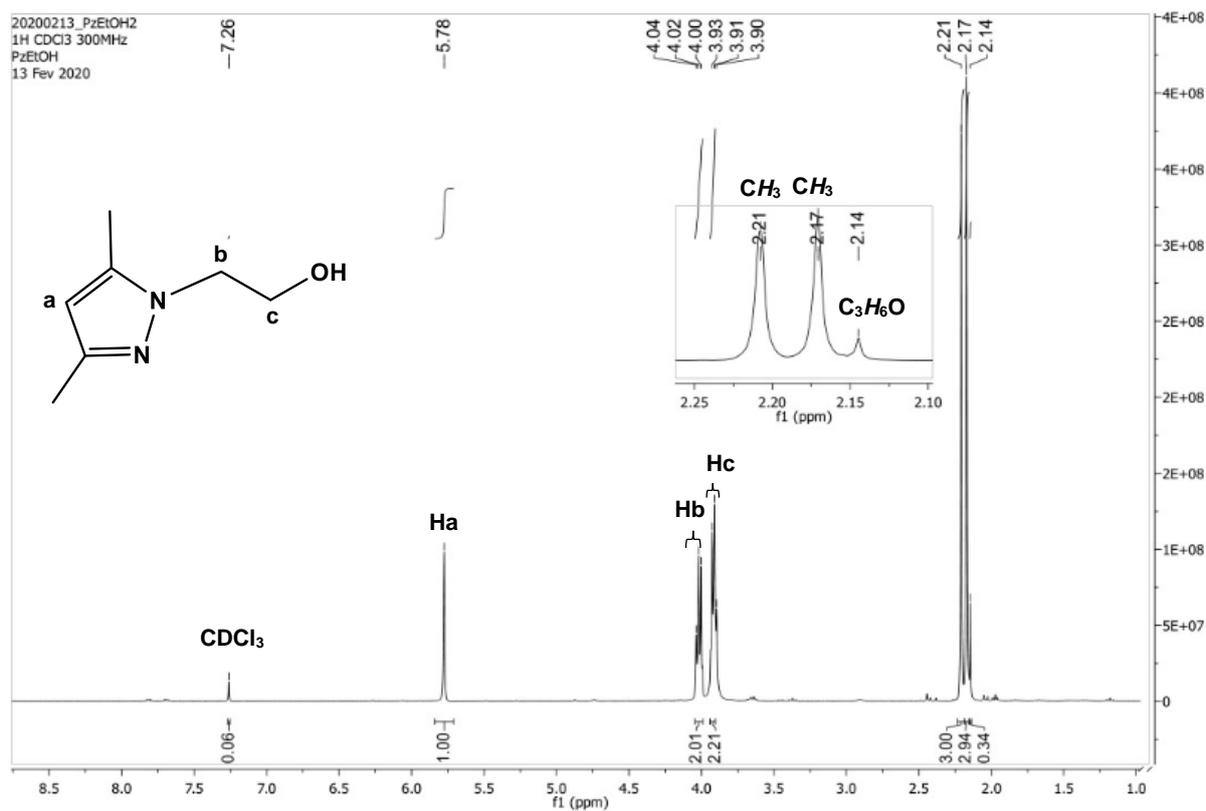


Figura 6.1 – Espetro de ¹H-RMN do composto PzOH, em CDCl₃

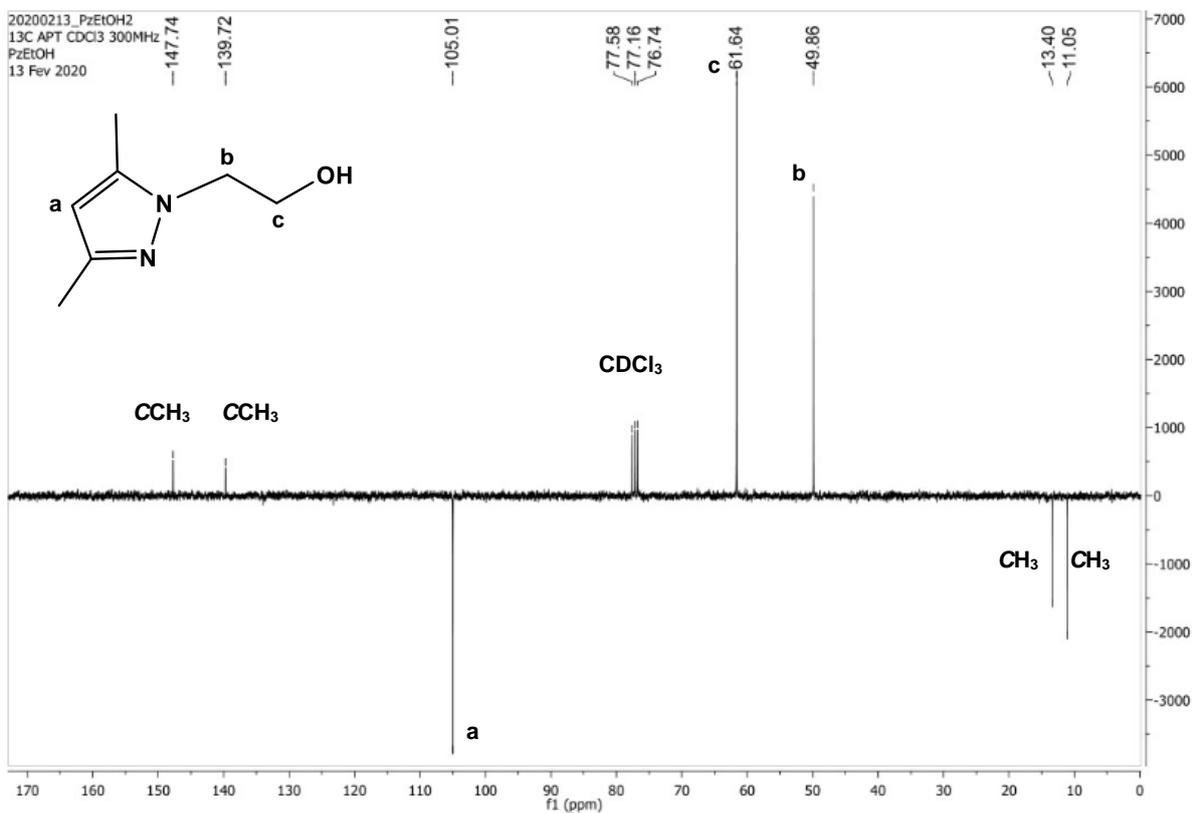


Figura 6.3 – Espetro de ¹³C-RMN do composto PzOH (1), em CDCl₃

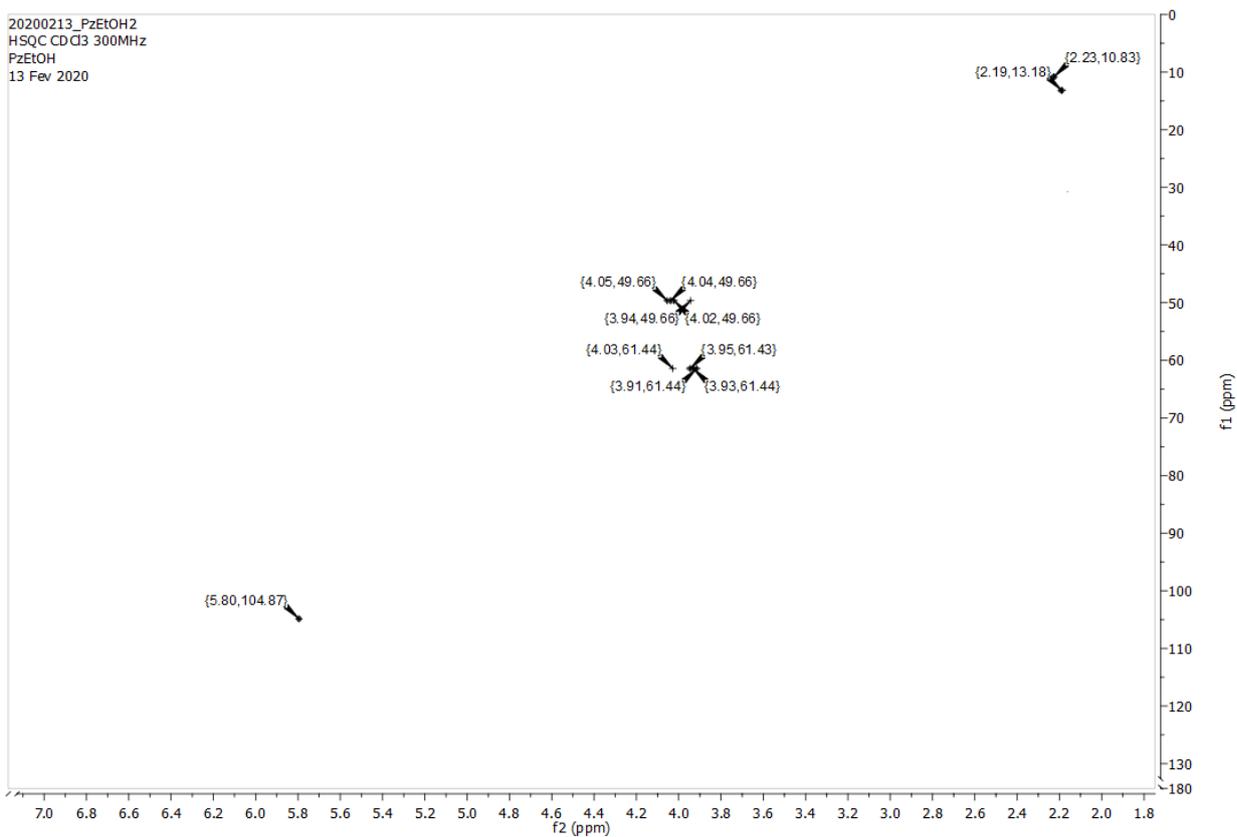


Figura 6. 4 – Correlação 2D HSQC do composto PzOH (1), em CDCl₃.

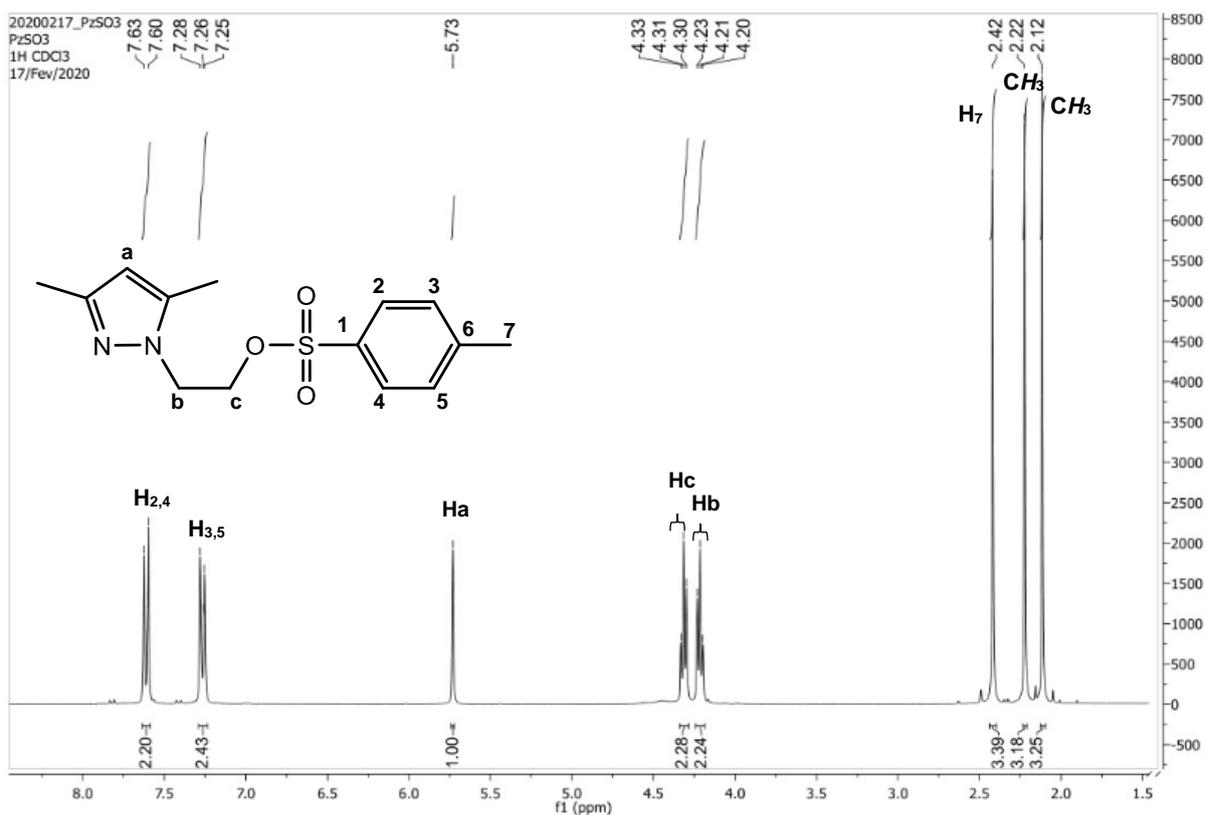


Figura 6.5 - Espetro de ¹H-RMN do composto PzSO₃ (2), em CDCl₃.

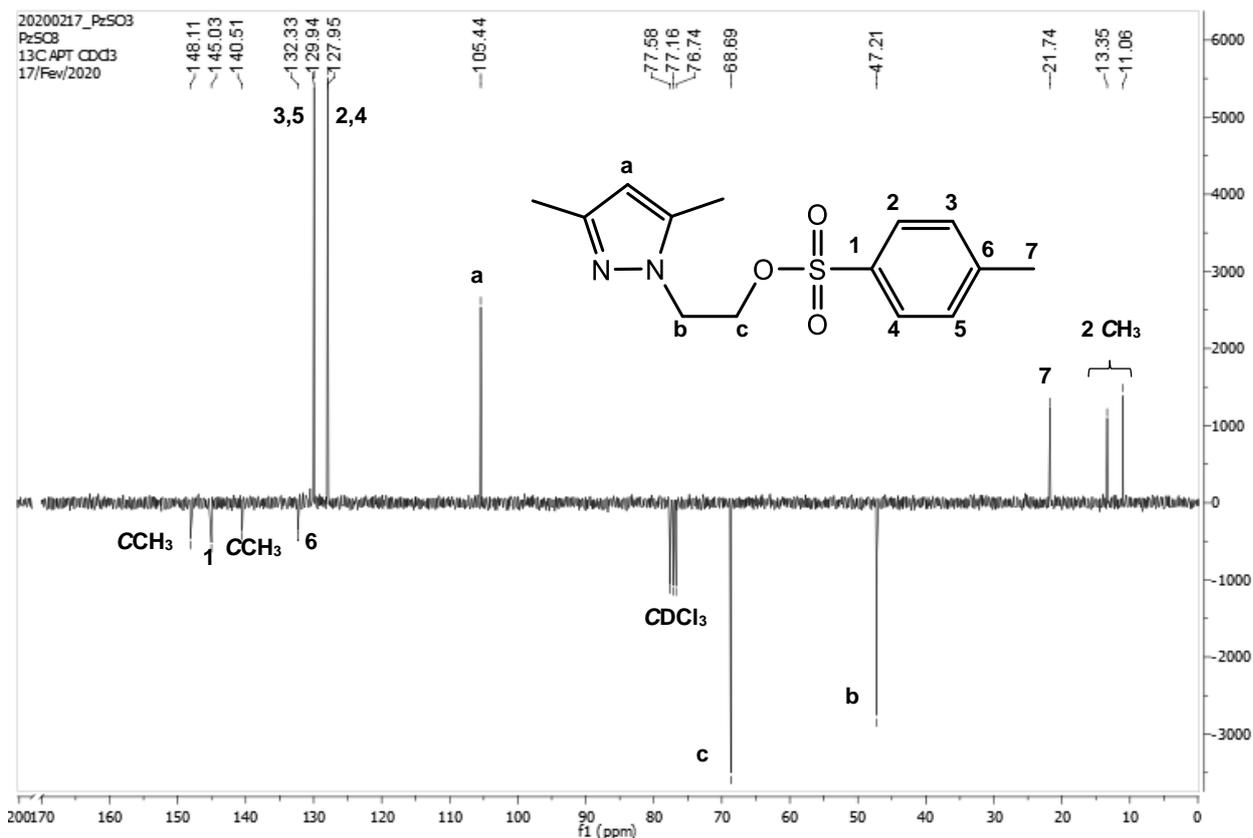


Figura 6.7 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto PzSO₃ (2), em CDCl₃.

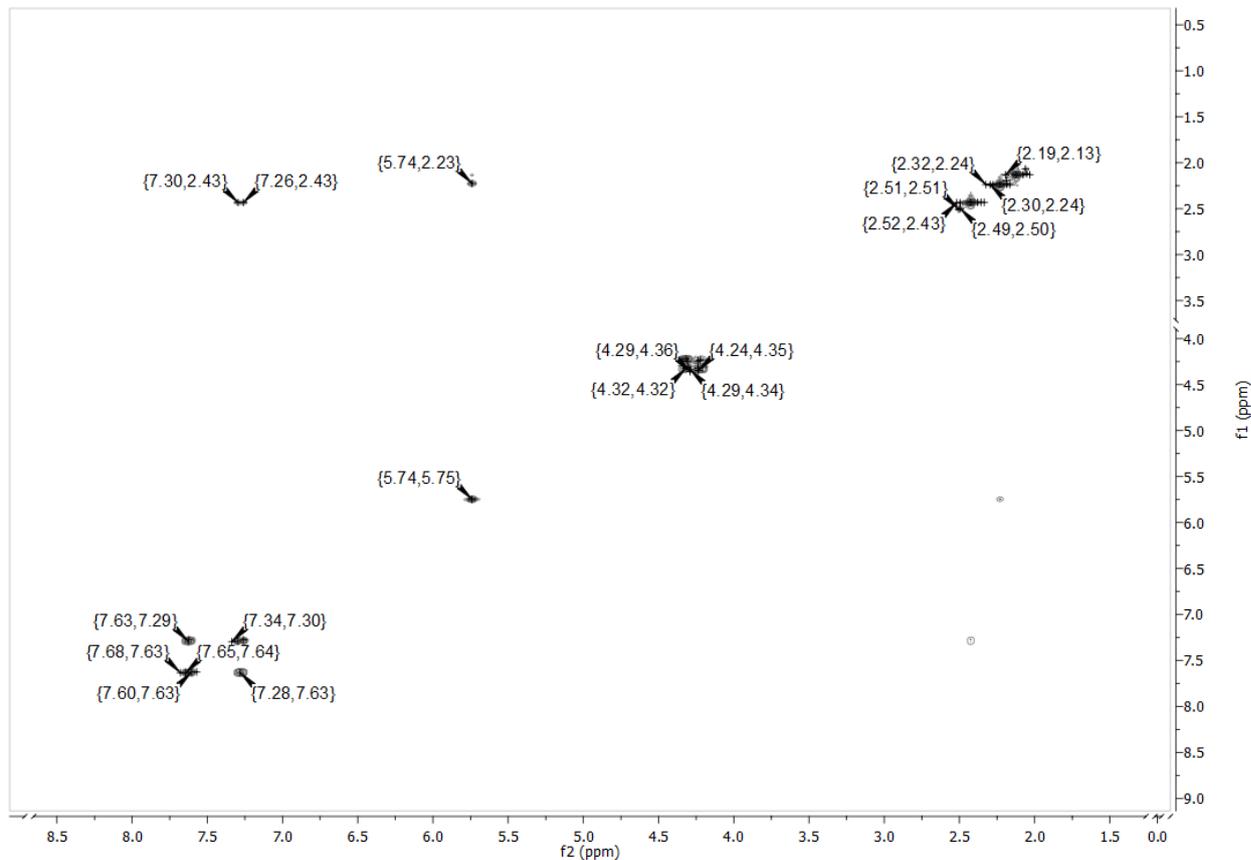


Figura 6.8 - Correlação 2D COSY do composto PzSO₃ (2), em CDCl₃.

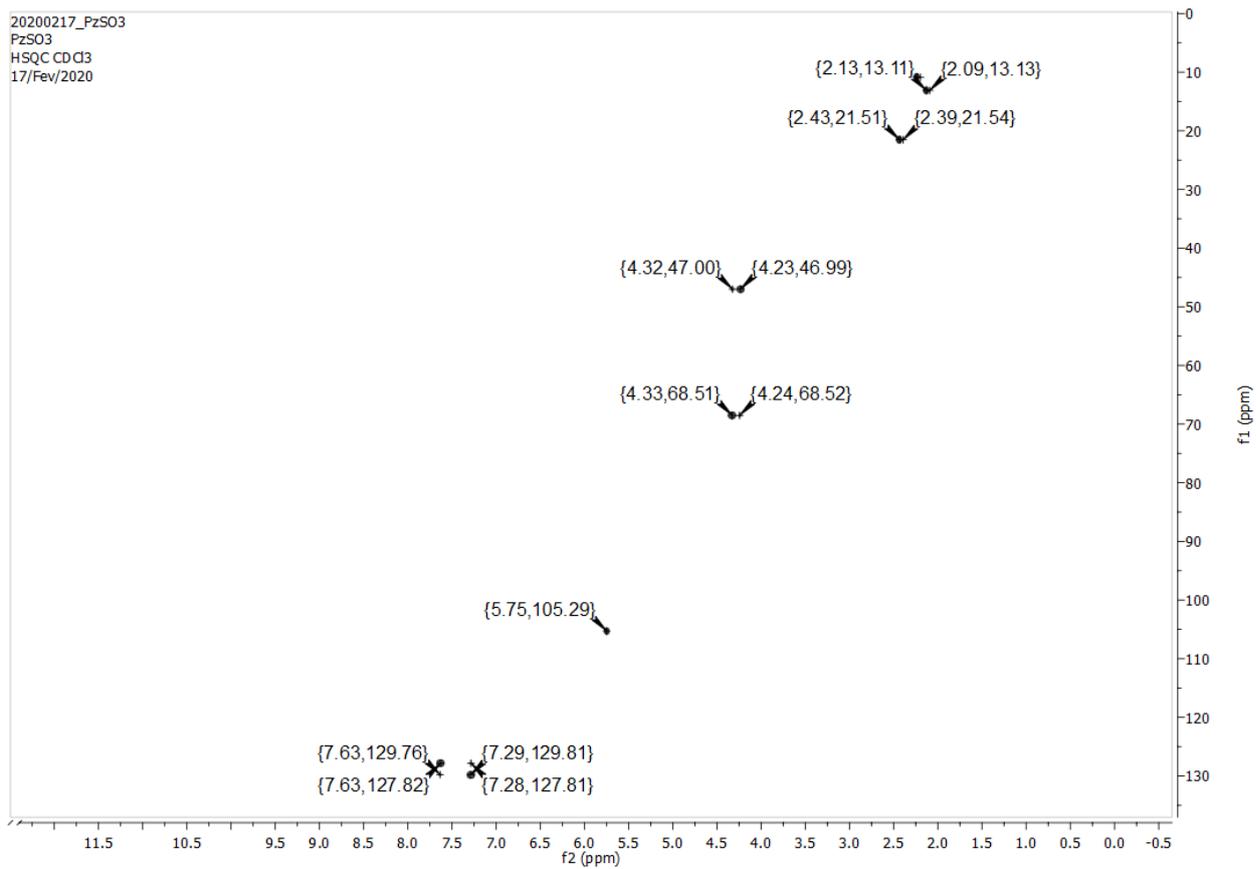


Figura 6.9 – Correlação HSQC do composto do composto PzSO₃ (2), em CDCl₃.