

Marina Joana Dias Pires

Síntese de Precursores de Radiofármacos para a Detecção de Hipóxia Tumoral

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Setembro de 2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Marina Joana Dias Pires

Síntese de Precursores de Radiofármacos para a Detecção de Hipóxia Tumoral

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, área de
especialização em Processos Químicos Industriais**

Orientação:

Doutora Maria Elisa da Silva Serra

Setembro de 2011

Universidade de Coimbra

*“ O difícil é aquilo que pode ser feito imediatamente. O impossível é aquilo
que demora um pouco mais de tempo”*

George Santayana

Agradecimentos

Como “o que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano” (Isaac Newton), parte da formação académica, profissional e até individual, é adquirida pela partilha de experiências. Pelos ensinamentos, colaboração, apoio, dedicação e disponibilidade, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos a todos os que me ajudaram ao longo destes dois anos de Mestrado em Química e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento holístico.

À Professora Doutora Maria Elisa Serra, orientadora deste trabalho de estágio, de um modo muito especial agradeço pela sua inteira disponibilidade, incentivo, apoio e confiança depositada. Pelo conhecimento transmitido, lições de Orgânica, sugestões indispensáveis. Por tudo o que me ensinou, pelos bons momentos e por ter sido fundamental na minha integração e desempenho. Obrigada pelos bons momentos e amizade.

À Professora Doutora Dina Murtinho, pelo auxílio, prontidão e constante disponibilidade. Muito obrigada pela dedicação e pelos esclarecimentos dados sempre com uma contagiante boa disposição. Agradeço especialmente pela confiança e alegria demonstradas que tanto me entusiasmaram ao longo deste trabalho, mesmo nos dias menos bons.

À Doutora Teresa Pinho e Melo, agradeço pelos ensinamentos, lições de espectroscopia de RMN e pelos esclarecimentos.

Ao Doutor Arménio Serra, obrigada pela boa disposição e ajuda na realização de espectroscopia de IV.

À Doutora Alexandra Gonsalves, agradeço pela disponibilidade e realização dos LC-MS.

Ao Grupo de Química Orgânica, muito obrigada pela amizade, simpatia, auxílio e ânimo. De um modo particular, ao Filipe e à Amélia pela amizade. Ao Doutor Rocha Gonsalves, à Doutora Isabel, Doutora Ana Lúcia, Sílvia, Bruna, Susana, Fernanda, Sónia, ao Nelson e ao Bruno, e claro, à Dona Lurdes. A todos os meus colegas de laboratório, obrigada!

Agradeço especialmente aos meus amigos e familiares, a todos aqueles que marcam os meus dias, que me fazem sorrir... Aos que no fim de um dia de trabalho estão presentes para me ouvir e apoiar. Agradeço pelo incentivo incondicional, ajuda, paciência e compreensão.

Obrigada Pai; Obrigada Mãe!!

Um sincero agradecimento à vossa contribuição na minha formação pessoal e profissional.

Índice

	Página
Índice	i
Nomenclatura	ii
Abreviações	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Capítulo 1: Introdução	1
1.1. Hipóxia tumoral	1
1.2. Métodos de medição de hipóxia tumoral	4
1.3. Radiotraçadores em hipóxia tumoral	6
Capítulo 2: Resultados e Discussão	16
2.1. Síntese de compostos do tipo cloronitroso	16
2.2. Síntese de aminas e respectivos precursores	19
2.2.1. Síntese de (1 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano	19
2.2.2. Síntese de (2 <i>S</i>)-2-(metoximetiloxi)-1,4-diaminobutano	19
2.2.3. Síntese de diaminas nitro-aromáticas	21
Síntese do 2-(4-nitrobenziloxi)-1,3-diaminopropano	22
Síntese do 2-(2-(4-nitro-1 <i>H</i> -imidazole-1-il)etoxi)-1,3-diaminopropano	25
Síntese de <i>N</i> -[2-(4-nitroimidazole)-etil]ciclo-hexilamina	26
Síntese de diaminas nitro-aromáticas derivadas de aminoácidos	27
2.3. Síntese de salens e salans	32
2.4. Síntese de diaminodioximas	34
Capítulo 3: Conclusões	37
Capítulo 4: Experimental	39
4.1. Aparelhagem	39
4.2. Purificação e secagem de solventes	40
4.3. Procedimento experimental	42
Bibliografia	56

Nomenclatura

Neste trabalho, a nomenclatura segue, regra geral, as normas IUPAC. No entanto, quando os compostos são conhecidos por designações triviais, estas foram adoptadas de modo a facilitar a sua compreensão e simplificar o texto.

Abreviações

ATP – Trifosfato de adenosina

BATO – Aduto de ácido borónico de dioxima de tecnécio (do inglês *boronic acid adducts of technetium dioximes*)

BNSA – *n*-butileno salicilamina

BOC – *tert*-butoxicarbonilo

DCM – Diclorometano

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMSA – 2,2. dimetilpropileno salicilamina

ENSA – Etileno salicilamina

IV – Espectroscopia de infravermelho

LC-MS ou HPLC-MS – Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (do inglês *liquid chromatography–mass spectrometry*)

Ms – Mesilo

PET – Tomografia de emissão de positrão (do inglês *positron emission tomography*)

P.f. – Ponto de fusão

PNSA – *n*-propileno salicilamina

η – Rendimento

SPECT – Tomografia de emissão de fóton único (do inglês *single photon emission computed tomography*)

THF – Tetraidrofurano (do inglês *tetrahydrofuran*)

TLC – Cromatografia de camada fina (do inglês *thin layer chromatography*)

Ts – Tosil

Utilizam-se as seguintes abreviaturas na descrição dos espectros de ressonância magnética nuclear:

RMN¹H – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear protónica

RMN¹³C – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13

d – dubleto

dd – duplo-dubleto

m – multiplete

q – quarteto

s – singuleto

sl – singuleto largo

t – tripleto

TMS – Tetrametilsilano

Resumo

A hipóxia é um estado de reduzida pressão parcial de oxigénio nas células e é uma característica típica de vários tumores. Verifica-se uma relação causa-efeito entre a carência de oxigénio nas células e a deficiente resposta aos tratamentos anti-cancerígenos. Consequentemente, torna-se muito importante o conhecimento exacto da sua extensão.

São vários os métodos capazes de detectar e caracterizar o estado de hipóxia, contudo, na sua maioria, são invasivos ou até irreprodutíveis. A excepção são as técnicas de medicina nuclear, mais propriamente a imagiologia que veio permitir o uso de radiotraçadores para a detecção de hipóxia.

Este projecto visava o desenvolvimento de diversos tipos de ligandos derivados de diaminas, tais como diaminodioximas, salens e salans. Estes, após complexação com tecnécio radioactivo, seriam utilizados em imagiologia funcional, de modo a permitir a detecção e quantificação não invasivas eficientes da hipóxia tumoral.

Efectivamente, sintetizaram-se dois compostos do tipo cloronitroso, 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano e 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutan-4-ol, e algumas diaminas tais como a (1R, 3S)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano e (2S)-2-(metoximetiloxi)-1,4-diaminobutano. Estes pretendiam-se utilizar para a síntese de algumas diaminodioximas, salens e salans. Obtiveram-se e caracterizaram-se, um salen derivado do (1R, 3S)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano e um novo ligando amínico nitro-aromático: *N*-[2-(4-nitroimidazole)-etil]ciclo-hexilamina.

Numa fase posterior, os ligandos obtidos serão testados quanto à complexação com tecnécio radioactivo e capacidade de marcação de células hipóxicas.

Abstract

Hypoxia is a state of reduced partial pressure of oxygen in cells and is a typical feature of many tumours. There is a cause-effect relation between the lack of oxygen in cells and poor response to anti-cancer treatments. Thus, it is very important to know its exact extent.

There are several methods to detect and characterize the state of hypoxia, however most of them are invasive or even irreproducible. The exception is the nuclear medicine techniques, particularly imaging, that allow the use of radiotracers for the detection of hypoxia.

The purpose of this work was the development of various types of ligands derived from diamines, such as diaminodioximes, salens and salans. These were complexed with radioactive technetium-99m and would be used in functional imaging, in order to allow efficient, non-invasive, detection and quantification of tumor hypoxia.

Indeed, two chloronitroso type compounds, 2-chloro-2-methyl-3-nitrosobutane and 2-chloro-2-methyl-3-nitrosobutan-4-ol, and some diamines, such as (1*R*,3*S*)-1,2,2-trimethylcyclopentane-1,3-diamine and (2*S*)-2-(methoxymethoxy)butane-1,4-diamine, were synthesized. These were to be used for the synthesis of some diaminodioximes, salens and salans. We obtained and characterized a salen derivative of (1*R*, 3*S*)-1,2,2-trimethylcyclopentane-1,3-diamine and a new nitro-aromatic amine-ligand: N-(2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethyl)cyclohexanamine.

At a later stage, the ligands obtained will be tested for complexation with radioactive technetium-99m and for the ability to trace hypoxic cells.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Hipóxia Tumoral

A hipóxia é o estado de reduzida pressão parcial de oxigénio nas células e é uma característica de várias condições patofisiológicas, como, por exemplo, o cancro, insuficiência respiratória e algumas doenças vasculares. Tipicamente, a hipóxia resulta de um fornecimento inadequado de oxigénio que pode ser causado por factores como: baixa pressão parcial de oxigénio no sangue arterial, fluxo de sangue inadequado aos tecidos ou deficiência circulatória, deficiente capacidade do sangue em transportar o oxigénio dos tecidos e acção de toxinas sobre as enzimas respiratórias [1]. O oposto, estado de hiperóxia, é o excesso de oxigénio nas células. A concentração intracelular de oxigénio deve ser mantida entre a hipóxia e a hiperóxia, de modo a que a actividade celular ocorra normalmente.

Dado que o oxigénio é um elemento essencial para o metabolismo oxidativo e para a cadeia de transporte de electrões nas mitocôndrias das células vivas, qualquer alteração dos seus níveis leva à ocorrência de uma série de mudanças fisiológicas e a privação deste poderá mesmo levar à morte celular. Ou seja, ao nível celular, a hipóxia causa, inicialmente, perda da fosforilação oxidativa e da produção de ATP pelas mitocôndrias, impedindo a célula de utilizar o seu principal meio de obtenção de energia, levando à sua morte [1,2].

A demonstração da presença de zonas hipóxicas em tumores humanos foi feita pela primeira vez na década de 50 do século passado e os resultados publicados em 1955 por Thomlinson and Gray. No referido estudo foi verificada a existência de zonas hipóxicas crónicas e até necróticas em carcinomas brônquicos, a cerca de 150 μm dos vasos sanguíneos, que é uma distância ligeiramente superior à de difusão do oxigénio solúvel nos tecidos. Tipicamente, para distâncias de difusão de oxigénio até 100 μm há uma boa oxigenação (normóxia), de 100 a 150 μm existem condições de hipóxia e acima dos 150 μm são ultrapassadas as distâncias limite de difusão, existindo anóxia

(pressão parcial de oxigénio é de 0 mmHg) e consequente necrose celular [1,3,4]. Na maioria dos tumores sólidos, a hipóxia desenvolve-se devido à incapacidade do sistema vascular fornecer quantidades adequadas de oxigénio para as massas tumorais.

Ao contrário do que ocorre nos tecidos normais, nos tumores as massas celulares vão crescendo. Numa primeira fase o abastecimento sanguíneo é feito através da vascularização existente na região, posteriormente, durante o crescimento do tumor, alguns dos vasos pré-existentes são comprimidos ou obstruídos, necessitando de um fornecimento adicional de oxigénio de modo a manter estas células vivas. Assim, de modo a satisfazer esta necessidade, é promovido o aparecimento de novos vasos sanguíneos [5]. Os novos vasos sanguíneos formam-se de um modo excessivo, são distorcidos e seguem direcções variadas e imprevisíveis. Consequentemente, a geometria da difusão sofre distorções nos tecidos neoplásicos, sendo pior que nos tecidos normais, o que impossibilita uma suficiente difusão do oxigénio. Esta particularidade leva a áreas bem irrigadas e a outras com pouca ou nenhuma vascularização, o que faz com que o transporte de oxigénio e nutrientes para algumas regiões do tumor seja muito menos eficiente do que nos tecidos normais. São estas características que levam a várias transformações nos tumores, tornando-os muito heterogéneos, com subpopulações celulares com diferentes proximidades vasculares e exibindo baixa tensão de oxigénio, baixo pH e concentrações de glicose reduzidas. Um micro-ambiente deste género induz uma variedade de mudanças biológicas nas células cancerígenas, incluindo mudanças metabólicas e de expressão genética [1,2,6].

Com base na hipóxia, muitos tratamentos anti-cancerígenos tinham como objectivo impedir o crescimento dos vasos sanguíneos nos tumores eliminando o seu suplemento de oxigénio e, consequentemente, provocando a sua morte. No entanto, estudos relativamente recentes contrariam o exposto anteriormente. Estes estudos demonstraram que as células tumorais que sobrevivem ao estado de hipóxia podem usar esta falta de oxigénio a seu favor, verificando-se, também, uma relação causa-efeito entre a hipóxia e a deficiente resposta aos tratamentos anti-cancerígenos [7].

Pennacchietti e colaboradores conseguiram mesmo relacionar a hipóxia e a progressão acelerada dos tumores por meio de uma via molecular precisa. Os baixos níveis de oxigénio permitem a activação de proteínas e enzimas específicas que, posteriormente, levam à estimulação da divisão celular, migração e mudanças morfológicas de vários tipos celulares. Tal pode tornar os tumores mais agressivos e capazes de invadir outros tecidos, formando metástases [7,8].

Ao longo da última década, o estado de oxigenação nos tumores sólidos tem sido objecto de estudo e tornou-se evidente que a hipóxia modifica os padrões da expressão genética de várias formas que alteram o potencial de malignidade dos tumores, levando a características mais agressivas de sobrevivência. Como resultado, tumores hipóxicos são mais difíceis de tratar, tendo maior resistência à terapia por radiação, à terapia fotodinâmica e a alguns sistemas de quimioterapia [9].

Os dois principais tratamentos do cancro utilizados, até ao momento, são a quimioterapia e a radioterapia. Porém, estas duas técnicas não se têm mostrado totalmente eficientes, devido à existência de regiões hipóxicas. Ou seja, a hipóxia está relacionada com a radiorresistência e com a ineficácia dos tratamentos, tal como condiciona o sucesso dos tratamentos pós-cirúrgicos e de alguns sistemas de quimioterapia.

O oxigénio deve estar presente durante a irradiação para que ocorram as reacções bioquímicas consequentes à acção física da radiação incidente, e em condições hipóxicas essas reacções são desfavorecidas. Em termos práticos, a hipóxia tumoral possui um efeito radioprotector, pois o oxigénio molecular é o factor biológico mais importante, influenciando o efeito das radiações ionizantes. O reconhecimento definitivo desta situação deu-se em 1936 pela publicação de Mottram e colegas, sendo o assunto generalizado a partir dos anos cinquenta, com as publicações de Read, Gray e respectivos colegas. Estas primeiras publicações chamaram a atenção para o facto de que, para uma morte celular equivalente, sob condições de hipóxia são necessárias doses superiores de radiação. Ou seja, para um mesmo efeito, em condições de hipóxia é necessária uma dose de irradiação 2,5 a 3,5 vezes superior à que seria necessária em condições de oxigenação normais. Apenas na última década foi possível demonstrar a nível clínico uma relação clara entre a hipóxia e a radiorresistência, pois, até então, a realização de medições em tecidos vivos num hospedeiro foram impossibilitados pela inexistência de instrumentos de medição adequados [10-12]. Células com oxigenação normal são mais sensíveis aos efeitos da radiação ionizante do que as células em condição de hipóxia, uma vez que as moléculas de oxigénio reagem facilmente com os radicais livres formados pela radiação, levando à origem de radicais muito reactivos. Este tipo de radicais é que permite a destruição das biomoléculas e consequente morte celular, ao contrário do que sucede em células tumorais hipóxicas, tornando-as mais resistentes à radioterapia em comparação com as células normóxicas [5,12,13].

Quanto à resistência dos tumores sólidos à quimioterapia, esta é explicada pela dificuldade do fármaco em alcançar as células hipóxicas, impossibilitando a presença destes em concentrações terapêuticas [5].

Estudos demonstram que a maioria (16 em 18) dos tumores na cabeça e pescoço com pressões de oxigénio compreendidas entre 11-30 mmHg apresentam resposta total à terapia por radiação. Em contrapartida, 10 em 13 dos tumores analisados com valores de pressão de oxigénio inferiores a 10 mmHg não apresentam nenhuma resposta à terapia [14]. Deste modo, o conhecimento da condição hipóxica e a quantificação dos níveis de oxigénio no tumor é fundamental no prognóstico do cancro, pois tem implicações na resposta às terapias, determinando o modo e tipo de terapia mais adequado.

1.2 Métodos de medição da hipóxia tumoral

Actualmente, é evidente que o estado de oxigenação das células nos tumores influencia a eficácia de tratamentos anti-cancerígenos. A hipóxia é um factor negativo para o sucesso da terapia por radiação e quimioterapia nos tumores, bem como está associada a uma instabilidade genética que leva, muitas vezes, a uma maior agressividade destes. Como tal, é necessário o conhecimento preciso dos níveis de oxigénio nos tecidos de interesse, de modo a entender o mecanismo patogénico e a desenvolver estratégias de correcção eficazes; o que requer métodos com boa resolução espacial e temporal que permitam obter medições repetidas da região de interesse, de modo a detectar mudanças na oxigenação, durante um período de tempo [1].

Vários métodos conseguem detectar a hipóxia tumoral e estes são escolhidos de acordo com a viabilidade das abordagens disponíveis, a invasão do método, grau de resolução necessária, necessidade de medição de parâmetros directos ou indirectos e de acordo com considerações financeiras [13]. A hipóxia pode ser avaliada por meio de vários métodos directos e indirectos: utilizando eléctrodos de oxigénio, traçadores imunohistoquímicos para os traçadores exógenos e endógenos de hipóxia ou por espectroscopia de ressonância magnética [9,15,16].

O uso de eléctrodos de oxigénio em Eppendorf, método polarográfico, tem sido considerado o método-padrão para medição da pressão parcial de oxigénio nos tumores. Esta tecnologia foi aplicada durante décadas e era a única que podia efectuar tais medições directamente,

contudo há variações na medição da pressão parcial de oxigénio e os resultados obtidos dependem de variáveis como o laboratório em que se realizam. Além do referido, esta técnica não consegue medir a oxigenação em determinadas micro-regiões, ao longo do tempo, uma vez que utiliza oxigénio no processo de medição, entre outras desvantagens. Os eléctrodos de Eppendorf constituem uma técnica de medição extracelular e, caso se pretenda informação intracelular, outros métodos terão que ser utilizados [1,15].

As técnicas imunohistoquímicas, no que diz respeito à sua aplicação na detecção de hipóxia tumoral, constituem um método que consegue distinguir o grau de hipóxia, tal como a fracção de células tumorais neste estado, e fornece, também, uma medida mais precisa da hipóxia. Contudo, a técnica é limitada quanto à identificação das células hipóxicas terapeuticamente relevantes e é uma técnica invasiva [1].

Como opção surge a coloração imunohistoquímica, que é uma técnica intracelular com resolução espacial. Neste método é usada coloração de marcadores de hipóxia endógenos (produtos de genes) e exógenos (químicos, fármacos), que têm a vantagem de fornecer informação da distribuição espacial da hipóxia nos tumores a um nível micro-regional. Em comparação com a sonda de Eppendorf, esta técnica fornece informação essencial do ambiente intracelular a um nível individual, enquanto que a sonda de Eppendorf dá informação relativamente a um volume de 500 células [1,17].

Todos os métodos atrás referidos são de carácter informativo mas, no entanto, são invasivos. A medição da hipóxia deverá ser rápida, económica, acessível, não invasiva e sem efeitos secundários e isto não tem acontecido até agora, uma vez que todos os métodos desenvolvidos necessitam de equipamento especializado, apresentam carácter invasivo e são dependentes de biopsia, pelo que são deficientes devido à heterogeneidade e à distribuição da hipóxia no tumor. Concludentemente, pode não haver reprodutibilidade do método [18].

Surgem, então, as técnicas imagiológicas que permitem uma avaliação da hipóxia de forma não invasiva, fornecendo, também, informação sobre a heterogeneidade do tumor. Em geral, estes métodos que permitem obter uma imagem da concentração de oxigénio nos tecidos podem ser classificados segundo diferentes grupos, nomeadamente: métodos ópticos, que incluem espectroscopia do infravermelho próximo e fosforescência; métodos baseados em ressonância magnética; tomografia computadorizada e métodos baseados em medicina nuclear [1].

São alguns os critérios que se devem verificar para o sucesso da imagiologia do grau de oxigenação em sistemas vivos, tais como: a técnica não ser invasiva, possibilitar medições repetidas, acessibilidade à região de interesse, resolução da imagem, profundidade da medição, precisão e robustez da medida, utilidade do parâmetro relatado e sua utilidade clínica, interferências na imagem, tempo de aquisição da imagem, disponibilidade da instrumentação, entre outros [19].

Relativamente a este projecto, a observação da extensão da hipóxia parte do desenvolvimento de técnicas de medicina nuclear.

Os procedimentos da medicina nuclear, incluindo emissão de positrão e emissão de fóton simples, utilizam fármacos que tenham sido marcados com radionuclídeos emissores de radiação (radiofármacos). Esta técnica difere dos outros métodos imagiológicos pois não fornece apenas informação da morfologia do órgão, fornece igualmente informação acerca da função fisiológica do órgão ou sistema sob investigação [1].

A tomografia de emissão de positrão (PET) é a que permite as medições *in vivo* e a quantificação de processos fisiológicos, por meio de radiofármacos emissores de positrões de tempo de vida curto. A PET permite, assim, localizar a região tumoral hipóxica *in vivo*, com uma resolução anatómica adequada, bem como possibilita a monitorização da terapia [19]. Nesta técnica têm sido utilizados vários radiotraçadores e biomarcadores para determinar a hipóxia tumoral [20]. Contudo, tem-se vindo a verificar que a tomografia de emissão de fóton simples (SPECT) tem vantagens sobre a PET, uma vez que está mais disponível e apresenta menores custos operacionais.

Os ligandos objecto deste estudo, pretendem ser utilizados em SPECT, uma técnica quantificadora, não invasiva e facilmente acessível.

1.3 Radiotraçadores em hipóxia tumoral

O desenvolvimento de técnicas de medicina nuclear veio permitir o uso de radiotraçadores para a detecção de hipóxia. Estes, ao serem incorporados em vias metabólicas específicas, interagem com espécies moleculares características de uma determinada situação patológica, permitindo obter informação funcional imagiológica, recorrendo à câmara gama, de forma não invasiva. Assim, evita-se a biopsia e todos os problemas de reprodutibilidade, pois analisa-se o tumor como um todo, obtendo-se informação sobre a sua heterogeneidade e extensão. Um bom marcador de hipóxia não é

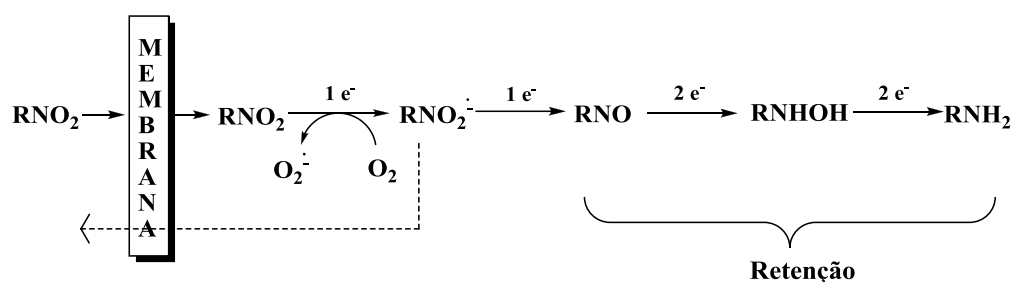
aquele que apenas detecta com sucesso a hipóxia tumoral, tem também que ser: estável quimicamente; facilmente depurado da corrente sanguínea e tecidos e deve apresentar um alto nível de excreção via renal [21].

Os radiofármacos que têm sido utilizados em SPECT para detecção da hipóxia são, na sua maioria, caracterizados por possuírem o radionuclídeo tecnécio (^{99m}Tc). Este elemento é um dos mais úteis em medicina nuclear, devido a diversas propriedades que o tornam um radionuclídeo bastante versátil. O tecnécio é obtido de um gerador $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, sob a forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{Tc}^{(\text{VII})}\text{O}_4$) e na presença de um agente redutor adequado, por exemplo cloreto estanhoso, forma-se a espécie $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{(\text{V})}\text{O}]^{3+}$. Neste estado de oxidação, o tecnécio complexa facilmente com quatro átomos dadores de electrões, formando um complexo que pode ser utilizado na detecção da hipóxia. Outros radionuclídeos como o ^{67}Ga e o ^{123}I também podem ser utilizados em SPECT; contudo, o ^{99m}Tc , usado em 80% dos testes de diagnóstico, possui várias características favoráveis levando a esta preferência. ^{99m}Tc tem emissão gama apropriada para SPECT, não emite partículas alfa nem beta, que originariam uma dose elevada de radiação para o paciente. Este radionuclídeo tem energia adequada para efeitos de visualização bem como para ser absorvido pela protecção de chumbo dos profissionais de saúde e possui tempo de meia-vida de 6 horas, o que é ideal tanto para a preparação do radiofármaco como para minimizar a dose de radiação no paciente a tratar [22-24].

A imagiologia com radionuclídeos emissores gama, para a detecção de tecidos hipóxicos, foi inicialmente sugerida por Chapman, em 1979, sendo, depois disto, desenvolvidos muitos outros radiotraçadores para o mesmo objectivo [25].

Historicamente, a maioria dos radiotraçadores que surgem na literatura com o objectivo de detectar a hipóxia tumoral, incluem um grupo nitro-aromático, o nitroimidazole, que se considera essencial para a incorporação do fármaco nos tecidos hipóxicos (esquema 1.1) [18]. Muitos organismos são capazes de reduzir compostos nitro-aromáticos, por meio de enzimas nitro-reductases, um metabolismo celular típico que nas devidas condições de oxigenação leva à posterior retenção destes nas células. Numa primeira etapa os compostos penetram nas células por difusão, tendo como factor determinante a lipofilicidade das moléculas. Posteriormente, a retenção destes é dependente do factor oxigénio. Em condições hipóxicas, o grupo nitroimidazole é reduzido sucessivamente dentro da célula, levando à formação de um anião radical nitro, bastante reactivo

perante o oxigénio, seguido dos respectivos compostos nitroso e hidroxilamina e, por fim, a respectiva amina. Os intermediários destas reduções têm maior afinidade pelas células hipóxicas do que pelas outras, levando a que os complexos de tecnécio sejam retidos selectivamente nestas células, permitindo a diferenciação, por imagiologia, entre zonas normóxicas e hipóxicas. Por oposição, em condições normóxicas (presença de oxigénio) o anião radical nitro é oxidado tornando o processo maioritariamente reversível, impedindo, assim, a retenção dos complexos na célula [14].



Esquema 1.1 – Representação das reduções do grupo nitro na célula que permite a sua retenção.

O estudo de complexos de tecnécio que contêm ligandos com nitroimidazole desenvolveu-se após se observar (Nakamura em 1955) que o 2-nitroimidazole (Azomicina) possuía actividade contra algumas infecções associadas a ambientes desprovidos de oxigénio [26]. Esta característica despertou não só a atenção para síntese de nitroimidazóis análogos, como o misonidazole, metronidazole e tinidazole, com aplicação em antibióticos, bem como para a aplicação de complexos de ligandos com nitroimidazole na detecção da hipóxia [12-14]. O misonidazole (figura 1.1), por exemplo, análogo ao 2-nitroimidazole, foi objecto de vastos estudos no que toca à sua capacidade de retenção nas células hipóxicas. Porém, verificou-se que, à medida que o seu potencial de redução na célula aumentava, a sua estabilidade química diminuía progressivamente [27].

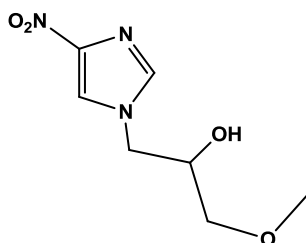
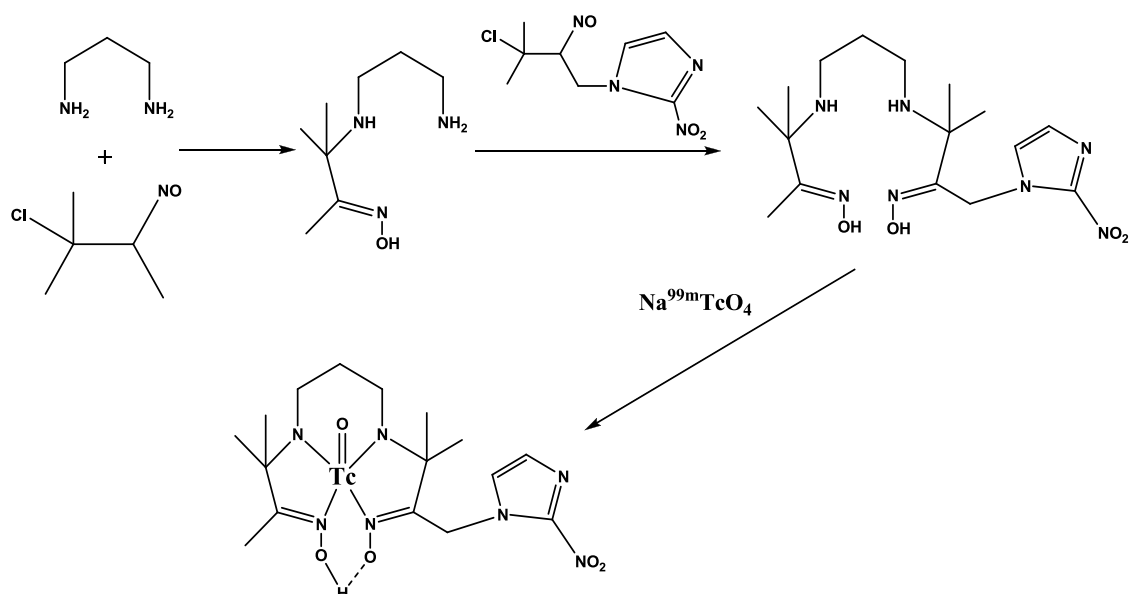


Figura 1.1 – Estrutura do ligando misonidazole.

Outros complexos, como o ^{18}F -fluoromisonidazole, ^{123}I -iodoazomicina arabinose e o ^{131}I -iodovinilmisonidazole, demonstraram-se promissores na avaliação não invasiva da hipóxia tumoral, estimulando o desenvolvimento de outros traçadores marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [1]. Este radionuclídeo não só é adequado às condições necessária de detecção, como é muito menos dispendioso e mais disponível, comparativamente aos halogenados [28]. Contudo, só recentemente é que as aplicações práticas destes compostos vieram a ser desenvolvidas [14,29].

O primeiro radiotraçador a ser testado como detector de hipóxia foi o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BATO (aduto de ácido borónico de dioxima de tecnécio), que resulta da reacção entre um derivado de ácido bórico, contendo um grupo nitroimidazole, e dioximas marcadas com tecnécio. No entanto, verificou-se um entrave: limitação na difusão deste tipo de complexos na membrana celular, o que impossibilitava o sucesso na detecção de células hipóxicas [14,30]. Efectivamente, o primeiro radiotraçador com resultados promissores a ser estudado, incorporando $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e um grupo nitroimidazole, foi o BMS-181321, mais propriamente, em casos de isquemia e de hipóxia no miocárdio [18,31].

O complexo BMS-181321 é sintetizado segundo a sequência apresentada no esquema 1.2, fazendo-se reagir 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano com 1,3-diaminopropano para formar uma mono-oxima. Seguidamente, o intermediário originado reage com 2-cloro-2-metil-3-(2-nitro-1H-imidazole-1-il)-3-nitrosobutano de modo a se obter o ligando pretendido. Posteriormente, este ligando é complexado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, obtendo-se, assim, um detector de hipóxia [14,18,32].



Esquema 1.2 – Procedimento sintético para o radiotraçador de hipóxia BMS-181321.

Os valores relativos de hipóxia/normóxia do BMS-181321 são bons, no entanto, este complexo possui uma elevada instabilidade e lipofilicidade, o que se traduz numa depuração muito lenta e numa elevada eliminação hepatobiliar.

Muitos outros complexos similares ao BMS-181321, incorporando um grupo nitroimidazole, foram sintetizados com o intuito de detectar a hipóxia e de alcançar melhores resultados no que toca à sua eliminação do organismo. A maioria destes difere do BMS-181321 na estrutura da unidade diamínica e/ou na posição de ligação do grupo nitroimidazole. Existem derivados de 1,4-diaminobutano e de 1,5-diaminopentano, possuindo uma ou duas unidades de nitroimidazole ligado ao esqueleto diamínico ou à unidade cloronitroso [33,34]. Um exemplo é o complexo BRU 59-21 também conhecido como BMS-194796, derivado do 1,3-diaminopropano, mas com um oxigénio em vez de um metileno na ponte propilénica, e com um grupo nitroimidazole ligado à unidade principal (figura 1.2).

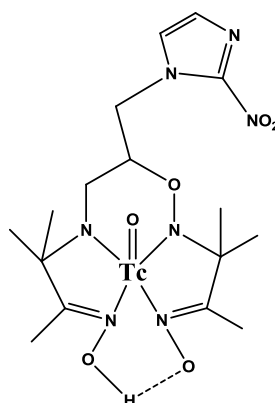


Figura 1.2 – Estrutura do radiotraçador de hipóxia BRU 59-21.

Segundo estudos *in vitro*, o BRU 59-21 comparado com o BMS-181321, possui maior estabilidade, maior capacidade de detecção e de captação da hipóxia celular, aparentemente por difusão passiva. Além do referido, os estudos *in vivo* demonstram que é rapidamente removido do sangue por excreção hepatobiliar, sendo apenas 10% do composto eliminado pelo sistema urinário [21,35].

Outro composto que contém o grupo nitroimidazole é um ligando denominado de Cyclam AK 2123, que após complexação com ^{99m}Tc também foi testado como radiotraçador da hipóxia. Com base na literatura, este complexo possui resultados promissores, tendo sido já utilizado numa fase primária de tratamento clínico de alguns tipos de cancro. Este complexo é considerado muito eficiente por imagiologia, sendo por si só radiotraçador; quando injectado e sujeito a radiação gama, observou-se apoptose em alguns tumores. Ligandos similares a este, com algumas variações estruturais, foram também estudados. Contudo, até agora, os resultados não são muito promissores [35,36].

Os salans são ligandos facilmente obtidos por redução dos correspondentes salens, que ao serem complexados com o ^{99m}Tc , poderão formar potenciais marcadores de hipóxia. Pillai *et al* sintetizaram uma série de ligandos tetradentados amino-fenólicos (figura 1.3), que após marcação com tecnécio formam complexos neutros, estáveis e bastante lipofílicos. Estes foram já avaliados quanto à sua distribuição e potencial para utilização como agentes imagiológicos em SPECT, exibindo retenção celular, no entanto a taxa de eluição do ^{99m}Tc no plasma, a partir das células marcadas, demonstrou-se inaceitavelmente elevada para a potencial utilização destes na geração de imagem [37].

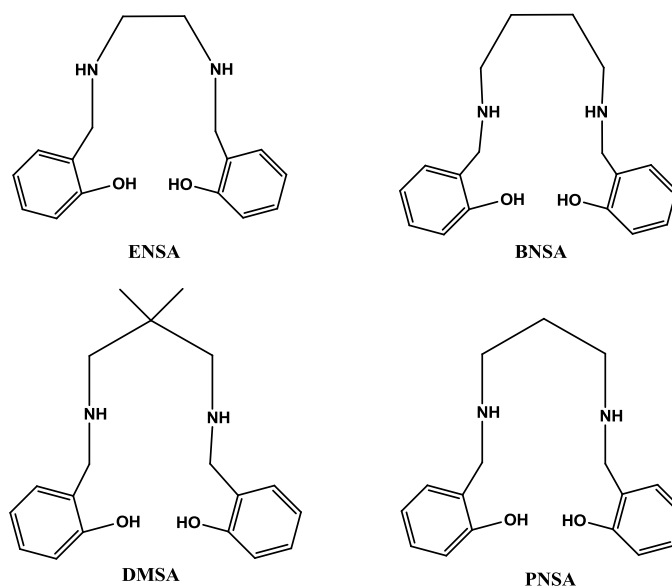


Figura 1.3 – Ligandos amino-fenólicos derivados de: etileno (ENSA), *n*-butileno (BNSA), 2,2-dimetilpropileno (DMSA), *n*-propileno (PNSA).

Ligandos pentadentados, imino e amino-fenólicos derivados de triaminas, foram igualmente estudados por Pillai *et al* e demonstraram excelentes resultados quanto à complexação com ^{99m}Tc . Indicando, assim, o potencial destes na aplicação como radiotraçadores ou agentes quelantes para marcação de biomoléculas [38,39].

Existem, também, já alguns trabalhos efectuados no grupo no sentido de sintetizar salens e salans para testar quanto à sua capacidade de complexação com o ^{99m}Tc , de modo a serem posteriormente analisados quanto à sua capacidade de detecção de células hipóxicas tumorais.

Um exemplo de um tipo de ligando salan, referido em bibliografia, como potencial marcador de hipóxia é o presente no complexo ^{99m}Tc -BAPN. O BAPN (figura 1.4) é um derivado de um bis(aminofenol) que inclui um grupo nitroimidazole [40].

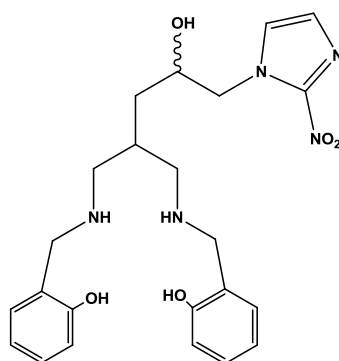


Figura 1.4 – Ligando BAPN.

Este ligando possui dois átomos quelantes de nitrogénio e outros dois de oxigénio, por onde é permitida a complexação com ^{99m}Tc . Existem estudos que referem que, apesar da potencial aplicação deste complexo na deteção da hipóxia tumoral, o ^{99m}Tc -BAPN comparativamente ao BMS – 181321 não é tão eficaz como radiotraçador [40].

Outro tipo de potenciais marcadores de hipóxia é um complexo de tecnécio derivado de um ligando análogo de salans, com quatro átomos quelantes de nitrogénio, em que os grupos substituintes ligados ao nitrogénio podem ser grupos carboxílicos ou fosfóricos, entre outros (figura 1.5) [41].

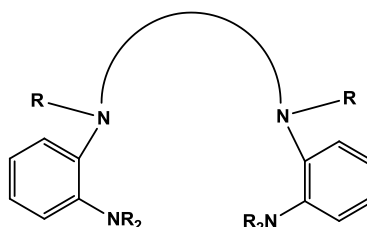


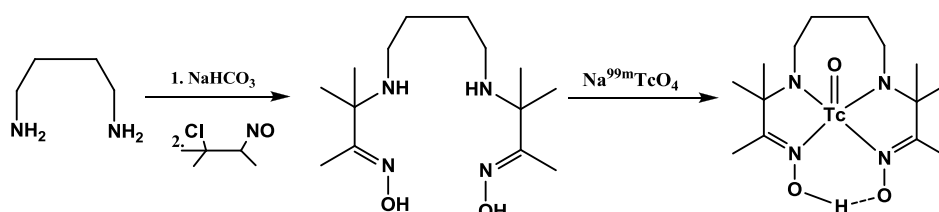
Figura 1.5 – Representação de um ligando potencial detector de hipóxia: salan (com R=H).

Apesar da potencialidade de deteção de células tumorais hipóxicas por imagiologia com compostos que contêm o nitroimidazole, existem já muitos outros sem este grupo, funcionando igualmente como marcadores de hipóxia [1].

Após vários esforços de se encontrar o melhor radiotraçador para visualização da hipóxia, alterando o ligando orgânico e retirando-se o grupo nitroimidazole, surge o ligando HL-91, um dos de maior relevo desta categoria. O complexo ^{99m}Tc -HL-91 e outros semelhantes são conhecidos por

possuírem propriedades bio-redutoras intrínsecas, permitindo a sua retenção nos tecidos hipóxicos. O mecanismo exacto de acção destes radiotraçadores ainda não é totalmente conhecido, mas estudos demonstraram que a sua acumulação é significativa nas áreas hipóxicas em detrimento das necróticas e das saudáveis. Este factor é de grande importância, uma vez que distingue os vários estados de oxidação das células tumorais [18,29,42].

A síntese deste complexo passa por uma reacção de 1,4-diaminobutano com o 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano, originando o ligando que posteriormente é complexado com ^{99m}Tc (esquema 1.3) [43].



Esquema 1.3 – Representação da síntese do radiotraçador ^{99m}Tc -HL-91.

O complexo ^{99m}Tc -HL-91 é, provavelmente, o radiofármaco mais citado na medicina nuclear para imagiologia com detectores de emissores de fóton simples. Também tem sido usado em estudos clínicos como um potencial detector de hipóxia no enfarte do miocárdio [1,42].

Este radiotraçador possui um ligando tetradentado de nitrogénio que apresenta uma baixa lipofilicidade e uma elevada estabilidade química, o que aumenta a sua actividade na relação hipóxia/normóxia em cerca de nove vezes e diminui o ciclo hepatobiliar. A baixa lipofilicidade favorece a sua rápida depuração sanguínea e dos restantes tecidos, apresentando aproximadamente 50% de excreção por via renal [29].

Segundo um estudo desenvolvido no grupo, relativo ao cancro colo-rectal, verificou-se que o ^{99m}Tc -HL-91 é absorvido preferencialmente nas células hipóxicas, sendo por isso um radiofármaco com características favoráveis à sua utilização na detecção de hipóxia tumoral [44]. Contudo, devido à sua alta hidroflicidade, é desfavorecida a sua permeabilidade nas membranas celulares. Tal conduziu ao desenvolvimento de alguns estudos relativos à modificação da estrutura do HL-91, de modo a torná-lo lipofílico o suficiente para favorecimento da sua permeabilidade nas células. A substituição do grupo metilo do HL-91 por um grupo etilo levou à formação de HL-91-Et, que

possui uma estrutura idêntica ao HL-91, mas com maior lipofilicidade. Esta modificação levou a um aumento da permeabilidade nas células, no entanto não levou ao aumento da selectividade pelas células hipóxicas [30].

Muitos trabalhos que estudam este tipo de radiotraçadores, demonstram que a estrutura do ligando orgânico influencia a actividade do traçador, mas que nenhum dos utilizados, até agora, apresenta as propriedades ideais para a visualização da hipóxia tumoral. Assim, torna-se essencial efectuar modificações na estrutura do ligando orgânico de modo a ser alcançado o ligando ideal: que seja de fácil preparação, fácil administração no sistema, passível de ser visualizado de forma não invasiva com os equipamentos habitualmente disponíveis nos hospitais, com alta resolução, permeabilidade na membrana celular, capacidade de absorção selectiva e de detecção das células hipóxicas, quimicamente estável e rapidamente depurado da corrente sanguínea e outros tecidos [45].

Capítulo 2

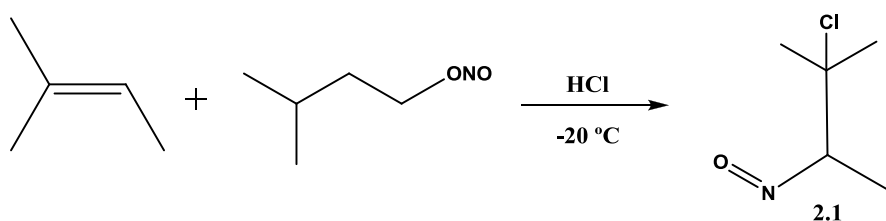
Resultados e Discussão

Este projecto iniciou-se com a síntese de alguns compostos do tipo cloronitroso e amínicos com o objectivo de obter diaminodioximas, salens e salans. A partir destes pretendia-se obter ligandos susceptíveis à complexação com ^{99m}Tc , avistando, assim, possíveis detectores de hipóxia tumoral.

2.1 Síntese de compostos do tipo cloronitroso

Conforme o observado na literatura [32], para o caso do BMS-1818321 (esquema 1.2), para se obter um potencial ligando marcador de hipóxia é necessário fazer reagir a diamina com um composto do tipo cloronitroso, para obter a diaminodioxima.

Como o 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano (**2.1**), um dos reagentes necessários para esta reacção não está disponível comercialmente, foi necessário proceder à sua síntese (esquema 2.1).

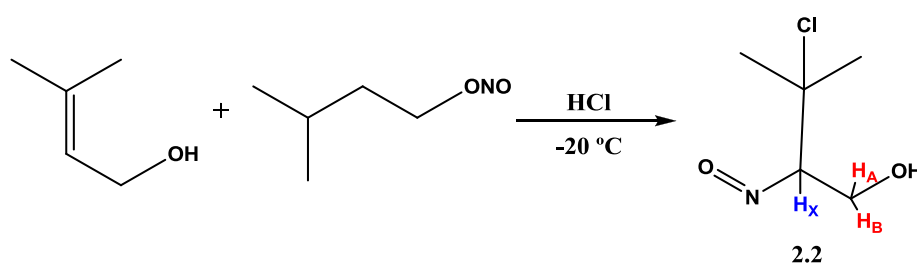


Esquema 2.1 – Síntese do composto cloronitroso **2.1**.

O 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano foi obtido sob a forma de um sólido por reacção do 2-metil-2-butenos com o nitrito de isopentilo, numa proporção de 1:1, por adição muito lenta de ácido clorídrico concentrado, a uma temperatura controlada de -20 °C, tendo por base o procedimento descrito por Nowotnik [46]. A velocidade de adição do ácido clorídrico é fundamental para o

sucesso da síntese de **2.1**, sendo para tal necessário utilizar um sistema de bomba de injeção que permite a adição do ácido a 0,05 mL/min. O produto **2.1** foi obtido com um rendimento de 77 %.

Existem diversos compostos do tipo cloronitroso [47], e assim, de modo a alcançarmos uma maior gama de ligandos, sintetizou-se ainda um outro composto deste tipo de estrutura análoga (**2.2**), assente no mesmo procedimento (esquema 2.2) [46].



Esquema 2.2 – Síntese do composto cloronitroso **2.2**.

O composto 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutan-4-ol (**2.2**) foi obtido sob a forma de um sólido, com um rendimento de 53 %, por meio da reacção entre o 3-metil-2-buten-1-ol e o nitrito de isopentilo.

Após síntese, analisou-se o produto por espectroscopia de RMN protónico, verificando-se efectivamente a presença dos sinais relativos aos protões que caracterizam **2.2**. Os protões relativos aos grupos metilo de **2.2** dão origem a um singuleto, com desvio químico de 1,59 ppm. No entanto, por observação da figura 2.1, referente ao espectro de **2.2**, observa-se que o protão do grupo CH (H_X) e os protões do grupo CH_2 (H_A e H_B) dão origem a sinais mais complexos do que o esperado (figura 2.2).

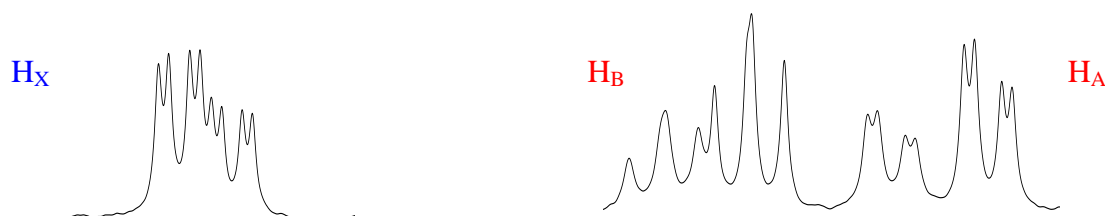


Figura 2.1 – Representação do espectro obtido relativo aos sinais dos protões H_X , H_A e H_B .

Tipicamente, prótons similares a estes originariam sinais característicos de um sistema ABX, apresentando um duplo duplete para cada um dos prótons, como estão representados aproximadamente na figura 2.2. H_X é desdobrado por H_A e H_B , pois estes não são equivalentes.



Figura 2.2 – Representação do acoplamento esperado para os prótons H_X , H_A e H_B .

Um sistema ABX é característico de um próton acoplado com dois vizinhos, ou seja, é um sistema de três spins em que dois têm um desvio químico próximo (H_A e H_B), mas significativamente diferente do terceiro (H_X) [48].

Num acoplamento de H_X com H_A e H_B , seria de esperar que os quatro picos do sistema AB fossem desdobrados em dupletos pelo H_X , enquanto que este dever-se-ia apresentar como um duplo duplete. Quanto ao espectro típico de um sistema ABX, enquanto que os sinais correspondentes a AB apresentam distorção, o relativo a X apresenta os quatro picos com a mesma intensidade.

No entanto, como se pode verificar na figura 2.1, mais perceptível em H_A e H_X , em vez dos sinais previstos, deparamo-nos com sinais replicados desses mesmos prótons. Este resultado levou-nos a considerar a possibilidade de estarmos na presença de isómeros rotacionais. Por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, quando a rotação em torno da ligação ocorre de uma forma lenta, os prótons não são equivalentes sendo por isso possível observar sinais deste género.

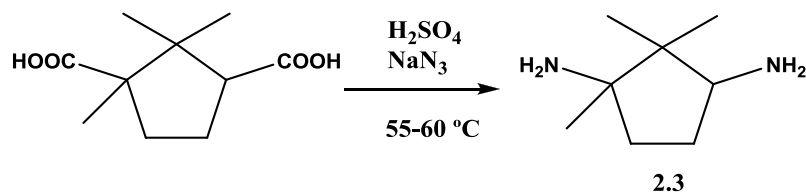
De modo a tentar confirmar esta hipótese, foi realizada, foi realizada uma análise adicional de 2.2 por RMN¹H a uma temperatura de 40 °C para aumentar a velocidade de rotação, situação em que os prótons já seriam equivalentes e o espectro seria simplificado. Contudo, houve degradação da amostra a esta temperatura, impossibilitando a obtenção do espectro. Pensamos, no entanto, estar perante o produto pretendido sob a forma de mistura de isómeros rotacionais.

2.2 Síntese de aminas e respectivos precursores

2.2.1 Síntese de (1*R*, 3*S*)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano

Propusemo-nos sintetizar um salan derivado do ácido canfórico para utilizar como ligando na detecção de hipóxia. Para tal, foi necessário proceder à síntese da diamina precursora, já explorada no grupo [49].

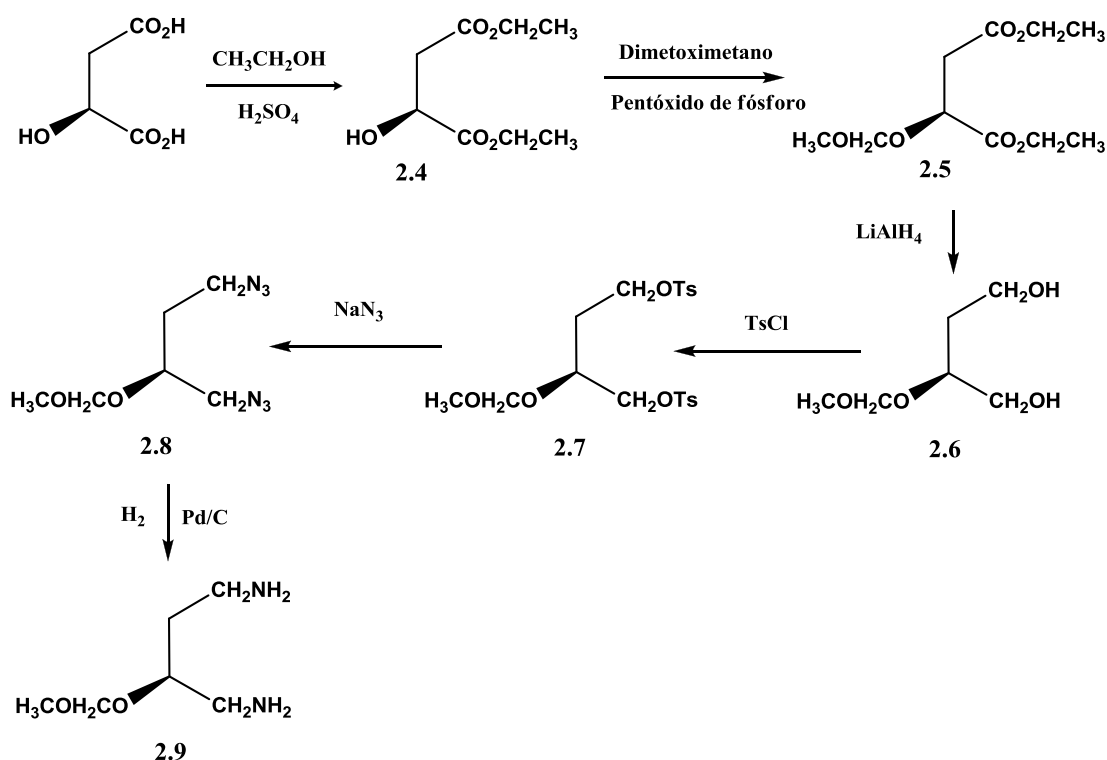
A diamina (**2.3**) derivada do ácido canfórico é obtida por tratamento deste com azida de sódio e ácido sulfúrico, denominada por reacção de Schmidt. O ácido canfórico é dissolvido em clorofórmio, na presença de ácido sulfúrico que actua como catalisador, e, a uma temperatura compreendida entre os 55 e 60 °C, é adicionada a azida de sódio em pequenas quantidades (esquema 2.3). A reacção termina quando cessa a evolução do gás. Após extracção com clorofórmio e isolamento, o produto **2.3** é obtido como um óleo acastanhado.



Esquema 2.3 – Representação da síntese de (1*R*, 3*S*)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano a partir do ácido canfórico.

2.2.2 Síntese de (2*S*)-2-(metoximetiloxi)-1,4-diaminobutano

Um dos compostos diamínicos sintetizados no âmbito deste trabalho foi o (2*S*)-2-(metoximetiloxi)-1,4-diaminobutano (**2.9**), derivado do ácido (*S*)-málico, segundo a sequência sintética apresentada no seguinte esquema.



Esquema 2.4 – Representação da síntese de 2.9 a partir do ácido málico.

O primeiro passo consiste na esterificação do ácido (*S*)-málico em refluxo de etanol, utilizando ácido sulfúrico como catalisador. Seguindo um procedimento descrito na literatura [50], obteve-se com sucesso o éster (*2S*)-malato de dietilo (2.4).

No segundo passo da síntese, efectuou-se a protecção do grupo hidroxilo do diéster (2.4) segundo o procedimento de Ballini [51]. Para tal são utilizados pentóxido de fósforo e dimetoximetano que actua como solvente e reagente. Obteve-se o produto pretendido, (*2S*)-2-(metoximetiloxi)-malato de dietilo (2.5), com bom rendimento, sendo o diéster uma mistura de diastereoisómeros. A protecção do grupo hidroxilo é necessária, uma vez que este poderá, posteriormente, intervir em reacções indesejadas, impedindo a formação do ligando diamínico pretendido.

O diol 2.6, (*2S*)-2-(metoximetiloxi)-1,4-di-hidroxibutano, obteve-se por redução do diéster 2.5, por meio do procedimento de Hungerbuhler [52]. Para tal, utilizou-se hidreto de alumínio e lítio em éter etílico seco, à temperatura ambiente.

Para obtenção do composto (2*S*)-2-(metoximetiloxi)-1,4-ditosiloxibutano (**2.7**) tratou-se **2.6** com cloreto de tosilo e piridina, em diclorometano, com adição a -20 °C e reacção à temperatura ambiente durante 20 horas, segundo o procedimento de Nagel [53]. Observou-se a formação de produto ditosilado (**2.7**), com um rendimento de 90 %. Este passo é necessário, pois o grupo tosiloxi é um melhor grupo abandonante do que o hidroxilo em substituições nucleofílicas, o que permitirá mais fácil a síntese posterior da diazida (**2.8**).

A diazida **2.8** (2*S*)-2-(metoximetiloxi)-1,4-diazidobutano é obtida por meio da substituição do grupo tosiloxi de **2.7** pelo grupo azida, utilizando azida de sódio, numa reacção de 18 horas a 90 °C, em DMF. Analisou-se o produto de reacção por TLC e purificou-se por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano 1:3.

No passo seguinte, o composto **2.8** é submetido a hidrogenólise, através de tratamento com hidrogénio molecular a pressão atmosférica e Pd/C, tendo-se obtido (2*S*)-2-(metoximetiloxi)-1,4-diaminobutano (**2.9**), confirmado por RMN¹H, com um rendimento de 94 %.

A diamina **2.9** obtida no fim desta sequência sintética (esquema 2.4) deverá ser utilizada para preparar novos ligandos, potenciais marcadores de hipóxia.

2.2.3 Síntese de diaminas nitro-aromáticas

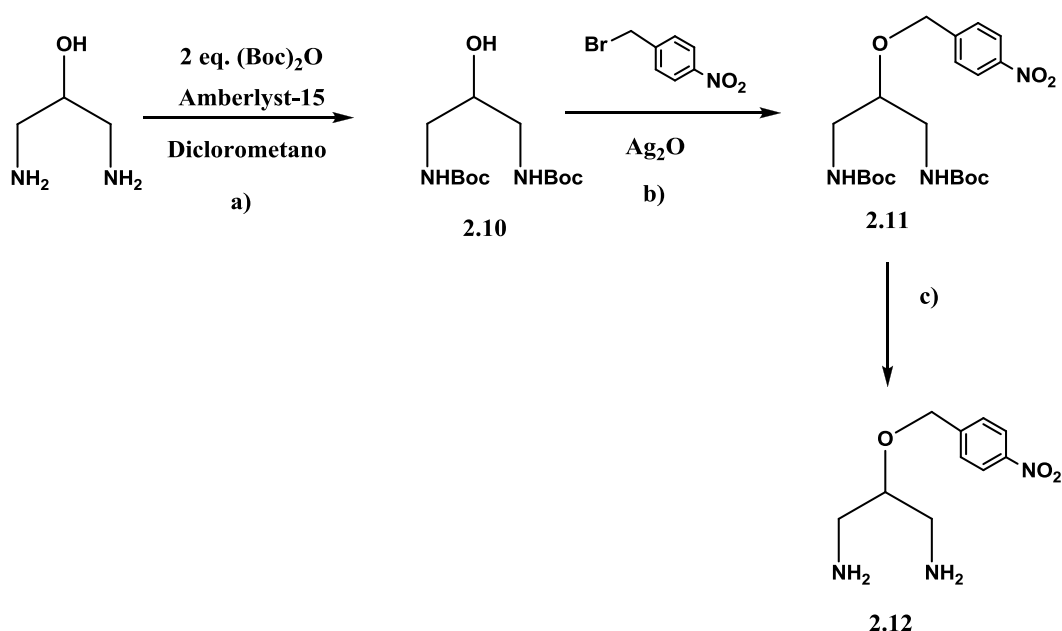
Como já referido, muitas aminas contendo grupos nitro incorporados foram testadas e observadas como promissores ligandos de radiotraçadores para a hipóxia tumoral.

Partindo de uma diamina disponível comercialmente (2-hidroxi-1,3-diaminopropano) a um preço e qualidade mais competitivos, quando comparado com os gastos implícitos na sua síntese, foram realizados ao longo deste trabalho diversos estudos sintéticos, com o intuito de incorporar nesta diamina um grupo nitro.

Após obtenção de diaminas nitro-aromáticas, pretendiam-se sintetizar diaminodioximas, por meio da reacção com compostos do tipo cloronitroso, ou salens e salans, pela reacção destas com aldeídos.

Síntese do 2-(4-nitrobenziloxi)-1,3-diaminopropano

Segundo trabalhos já realizados no grupo, não é possível sintetizar directamente o 2-(4-nitrobenziloxi)-1,3-diaminopropano (**2.12**) a partir da reacção directa do 1-bromometil-4-nitrobenzeno com o 2-hidroxi-1,3-diaminopropano, devido à reactividade característica dos grupos amina. Portanto, numa primeira etapa devem-se proteger os grupos amina (esquema 2.5–a), de seguida fazer reagir a diamina protegida (**2.10**) com o 1-bromometil-4-nitrobenzeno (esquema 2.5–b) e finalmente proceder à desprotecção dos grupos amina (esquema 2.5–c).



Esquema 2.5 – Representação da síntese de 2-(4-nitrobenziloxi)-1,3-diaminopropano **2.12**.

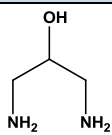
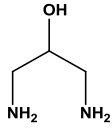
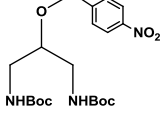
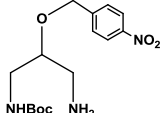
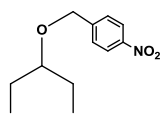
Tendo por base um procedimento descrito na literatura [54] que refere a protecção de diversas aminas com o grupo *tert*-butoxicarbonilo (BOC), fez-se reagir o 2-hidroxi-1,3-diaminopropano com dicarbonato de di-*tert*-butil em diclorometano, na presença da resina amberlyst-15, *overnight* (esquema 2.5–a). Após isolamento, obteve-se um sólido branco com 91% de rendimento, que por análise de RMN^1H se verificou ser o produto pretendido **2.10**.

A utilização da amberlyst-15, uma resina de troca catiónica, como catalisador deste tipo de protecção surge como um método mais sustentável quando comparada com a utilização clássica de ácidos de Lewis.

O 2-(4-nitrobenziloxi)-1,3-(*tert*-butoxicarbonilodiamino) propano (**2.11**) é obtido por meio da reacção entre a diamina protegida **2.10** e 1-bromometil-4-nitrobenzeno, a temperatura ambiente, durante 48 horas, utilizando Ag_2O que actua como catalisador da reacção (esquema 2.5–b) [55]. Após simples filtração e evaporação do solvente, obtém-se um sólido branco que, por análise de RMN^1H , se verificou ser o produto pretendido **2.11**.

Por fim, pretendia-se desproteger os grupos amina de **2.11**, de modo a tornarem-se susceptíveis a outras transformações (esquema 2.5–c). Realizaram-se vários ensaios em diversas condições reaccionais (tabela 2.1), contudo esta desprotecção não foi alcançada.

Tabela 2.1 – Condições reaccionais e resultados obtidos para a desprotecção de **2.11**.

Ensaio	Reagente	Solvente	Tempo (horas)	Temperatura (°C)	Produto
1	23 mmol de 2.11 Amberlyst-15	DCM	14	25	
2	23 mmol de 2.11 Amberlyst-15	DCM	4	25	
3	23 mmol de 2.11 Amberlyst-15	DCM	6	0	
4	0,20 mmol de 2.11 Excesso de K_2CO_3	MeOH	12	25	
5	0,14 mmol de 2.11 Excesso de K_2CO_3	MeOH	4	65	

A desprotecção de aminas com o grupo BOC é tipicamente alcançada por meio da utilização de ácidos fortes como o HCl e CF_3COOH . As tentativas de utilizar estas condições de reacção revelaram uma labilidade de **2.11** resultando na remoção do grupo 4-nitrobenzilo. Optou-se, então

por tentar desproteger os grupos amina utilizando condições de reacção mais suaves de modo a não levar à eliminação simultânea do grupo 4-nitrobenzilo.

Fundamentados num procedimento descrito na literatura [56], no qual é utilizada a amberlyst-15 para desprotecção e purificação de aminas protegidas com BOC, colocou-se a agitar **2.11** com a resina em diclorometano (DCM) durante 14 horas e à temperatura ambiente (tabela 2.1, ensaio **1**).

Numa primeira etapa, a resina captura selectivamente o produto pretendido, por meio de uma ligação covalente, isolando-o de outros reagentes ou produtos secundários. O isolamento é realizado numa segunda etapa que permite libertar o produto da resina, por agitação numa solução de amónia em metanol.

Após reacção e análise de RMN¹H do produto obtido verificou-se a ausência dos grupos protectores BOC, demonstrando que, nestas condições, ocorre desprotecção dos grupos amina de **2.11**. Contudo, não se obteve o produto pretendido **2.12**, uma vez que não se observavam os sinais protónicos relativos ao grupo 4-nitrobenziloxi, indicando a remoção do grupo 4-nitrobenzilo.

Devido à instabilidade observada do grupo 4-nitrobenzilo optou-se por utilizar condições de reacção ainda mais suaves. Numa primeira tentativa reduziu-se o tempo de reacção para aproximadamente 4 horas (tabela 2.1, ensaio **2**). A evolução da reacção foi acompanhada por observação de TLC, e, por análise de RMN¹H, verificou-se que **2.12** não foi obtido, alcançando resultados similares ao anterior (tabela 2.1, ensaio **1**). De seguida, optou-se por diminuir também a temperatura de reacção para 0°C (tabela 2.1, ensaio **3**). Por observação do espectro de RMN¹H, verificou-se a presença dos sinais protónicos relativos aos grupos BOC, demonstrando que nestas condições não ocorre desprotecção dos grupos amina. Numa nova tentativa, tomou-se como referência um método descrito na literatura relativo à remoção do grupo BOC no uracilo, por meio da utilização de carbonato de potássio em metanol [57]. Colocou-se a reacção a decorrer durante, aproximadamente 12 horas, à temperatura ambiente, e examinou-se o produto de reacção por RMN¹H, verificando que apenas se tinham desprotegido parte dos grupos amina (tabela 2.1, ensaio **4**). Considerando os resultados obtidos, repetiu-se o ensaio referido, em condições de refluxo durante aproximadamente 4 horas. Após tratamento e análise do produto de reacção, verificou-se novamente que apenas parte dos grupos amina de **2.11** se encontravam desprotegidos (tabela 2.1, ensaio **5**).

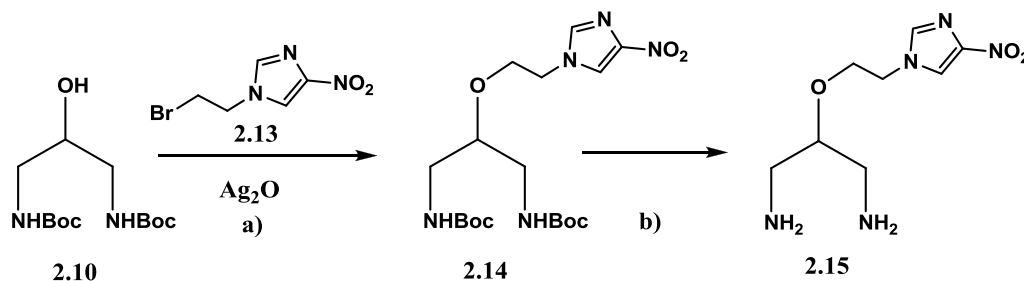
Com os diversos métodos utilizados verificou-se ser impossível remover a protecção dos grupos amina mantendo o grupo 4-nitrobenzilo intacto, o que tornou inviável a utilização desta sequência sintética.

Síntese do 2-(2-(4-nitro-1H-imidazole-1-il)etoxi)-1,3-diaminopropano

De modo a tentar obter um outro derivado menos lábil do 2-hidroxi-1,3-diaminopropano para permitir uma desprotecção eficiente dos grupos amina, procedeu-se à síntese de 2-(2-(4-nitro-1H-imidazole-1-il)etoxi)-1,3-diaminopropano (**2.21**), tendo por base os mesmos procedimentos (esquema 2.6).

À semelhança do referido para a síntese de **2.12**, partiu-se do composto **2.10** já sintetizado, que é colocado a reagir com 1-bromoetil-2-(4-nitroimidazole) (**2.13**), nas mesmas condições anteriormente utilizadas (esquema 2.6-a).

Obteve-se com sucesso o 2-(1-etiloxi-4-nitroimidazole)-1,3-(*tert*-butoxicarbonilodiamino) propano (**2.15**).



Esquema 2.6 – Representação da síntese de **2.15**.

O composto **2.13** foi sintetizado por nós, baseado num procedimento típico para uma substituição nucleofílica $\text{S}_{\text{N}}2$: refluxo num solvente polar aprótico na presença de um nucleófilo. O produto foi obtido com um rendimento de 31 %, por reacção de 4-nitroimidazole com 1,2-bromoetano, na presença de K_2CO_3 , após refluxo em acetona durante 24 horas.

Numa última fase pretendiam-se desproteger os grupos amina de **2.14**. No entanto, e à imagem do observado anteriormente com o derivado 4-nitrobenzílico, tal não foi possível, devido à labilidade demonstrada pelo grupo 4-nitroimidazole.

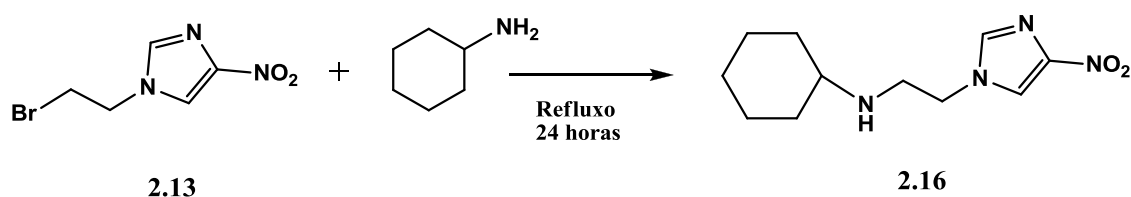
Concluímos que, em ambos os casos acabados de referir, a impossibilidade de obter o produto pretendido atribui-se à grande labilidade dos compostos, consequência da presença do grupo nitro.

Dado que os grupos nitro-aromáticos ligados ao hidroxilo complicam a desprotecção dos grupos amina, pensámos metilar o OH, ao invés do realizado até ao momento. Apesar deste modo, não levar à formação do tipo de diaminas pretendido, com um grupo nitro já incorporado, seria possível, numa fase posterior, incorporá-lo noutra ponto da molécula.

Síntese de *N*-[2-(4-nitroimidazole)-etil]ciclo-hexilamina

Por analogia ao misonidazole (figura 1.1), procedeu-se ao estudo da síntese de um novo ligando para a aplicação em complexos de ^{99m}Tc na detecção da hipóxia tumoral.

Para tal, o composto **2.13** já sintetizado e ciclo-hexilamina foram colocados em refluxo durante 24 horas (esquema 2.7).



Esquema 2.7 – Representação da síntese *N*-[2-(4-nitroimidazole)-etil]ciclo-hexilamina.

Num primeiro ensaio (tabela 2.2), obteve-se um óleo que se tentou purificar por cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e metanol 90:10. Porém, sendo o produto obtido é muito polar, ficou retido na sílica. Assim, após retirar por coluna o excesso de reagente, a sílica foi agitada em diclorometano, e após filtração o solvente foi evaporado. O produto puro **2.16** foi assim obtido sob a forma de um óleo.

Tabela 2.2 – Condições reaccionais e rendimentos na síntese de **2.16**.

Ensaio	Composto 2.13 (mmol)	Ciclo-hexilamina (mmol)	Solvente	Condições	η (%)
1	5	5	Acetona	Refluxo 24 horas K ₂ CO ₃	29
2	5	Excesso	Acetonitrilo	Refluxo 24 horas K ₂ CO ₃ NaI	39

Devido ao baixo rendimento obtido, fez-se outra tentativa de reacção, utilizando como solvente o acetonitrilo e utilizou-se um excesso de amina na presença de iodeto de sódio como catalisador da substituição. Como se pode observar na tabela 2.2, isto conduziu a uma melhoria de 10 % no rendimento.

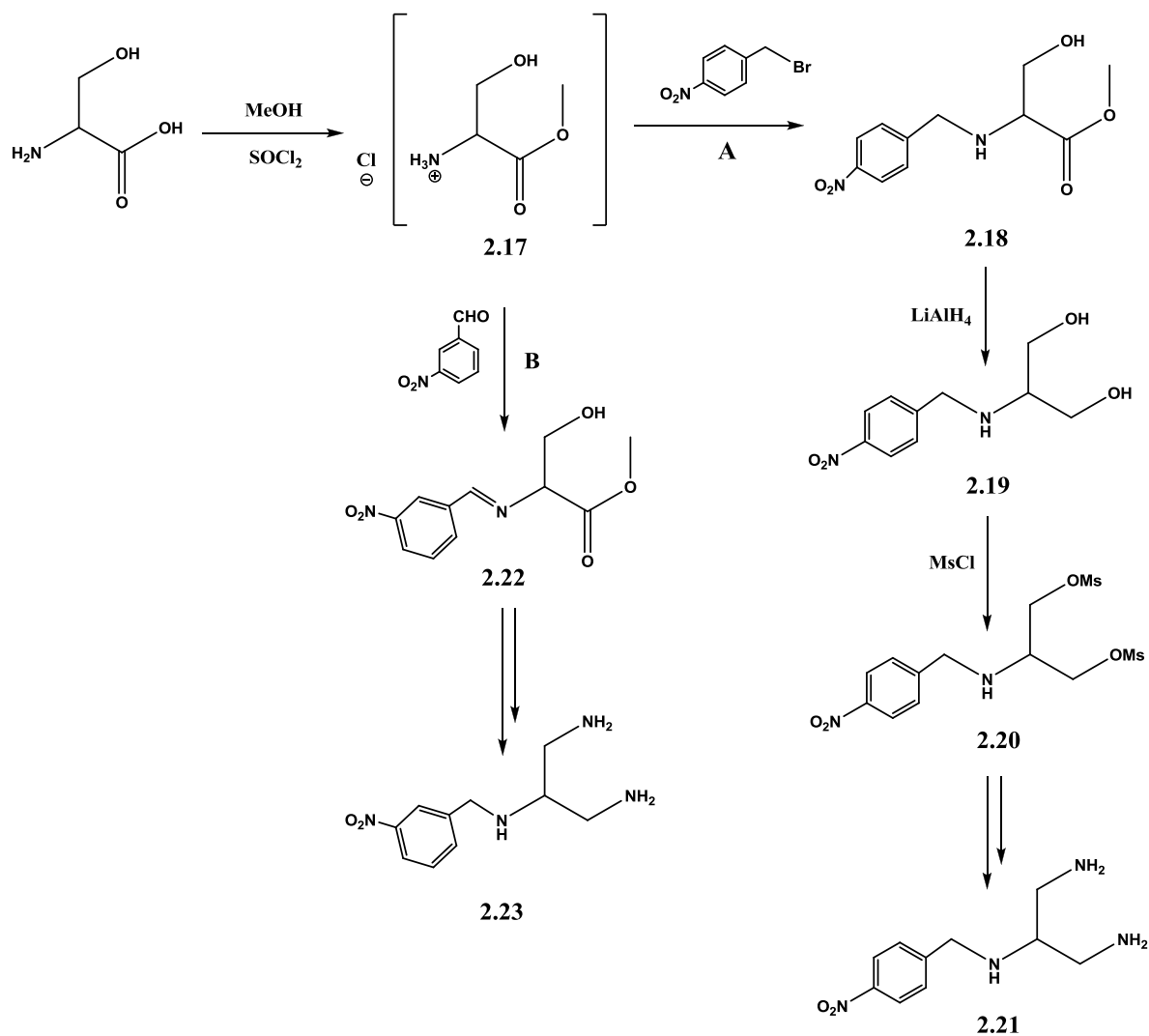
O produto de reacção foi analisado por espectroscopia de RMN¹H verificando efectivamente os sinais protónicos de **2.16**. Dado tratar-se de um novo ligando, não descrito na literatura, caracterizou-se, ainda, por espectroscopia de RMN¹³C, IV e LC-MS.

Síntese de diaminas nitro-aromáticas derivadas de aminoácidos

Os aminoácidos são compostos orgânicos que tipicamente contêm um grupo amina, um grupo carboxilo, um hidrogénio e um grupo característico de cada aminoácido ligados a um carbono α . Por estas características e por analogia aos ligandos diamínicos já analisados, optou-se por estudar a síntese de derivados de alguns aminoácidos, tais como da (*S*)-serina e do ácido (*S*)-aspártico.

Em traços gerais pretendia-se introduzir um grupo nitro-aromático no grupo amina e transformar os grupos carboxilos em grupos amina em cada um dos aminoácidos. De seguida, estes derivados de aminoácidos poderiam sofrer reacção com compostos do tipo cloronitroso de modo a obter ligandos capazes de complexar eficientemente com ^{99m}Tc.

Dado que a síntese de alguns derivados da serina já é conhecida de trabalhos anteriores realizados no grupo, objectivou-se desenvolvê-la de modo a se obterem ligandos precursores de radiotraçadores de hipóxia, o **2.21** e o **2.23**.



Esquema 2.8 – Síntese de **2.21** e **2.23** a partir da serina.

O primeiro passo da sequência sintética apresentada consiste numa esterificação da (*S*)-serina. Seguindo um método descrito na literatura [58], tratou-se a serina com cloreto de tionilo,

obtendo o respectivo cloreto de ácido. Este reage com metanol, formando o respectivo éster, com um rendimento quantitativo.

O grupo carboxilo tipicamente presente nos aminoácidos tem como característica ser pouco reactivo. Para torná-lo mais reactivo forma-se o cloreto de ácido correspondente, através da reacção com cloreto de tionilo. Os cloretos de ácido já possuem reactividade elevada permitindo-nos obter mais facilmente outros derivados

A partir do éster metílico da serina sintetizaram-se alguns derivados da serina com um grupo nitro, por reacção deste com 1-bromometil-4-nitrobenzeno (**A**) e com 3-nitrobenzaldeído (**B**).

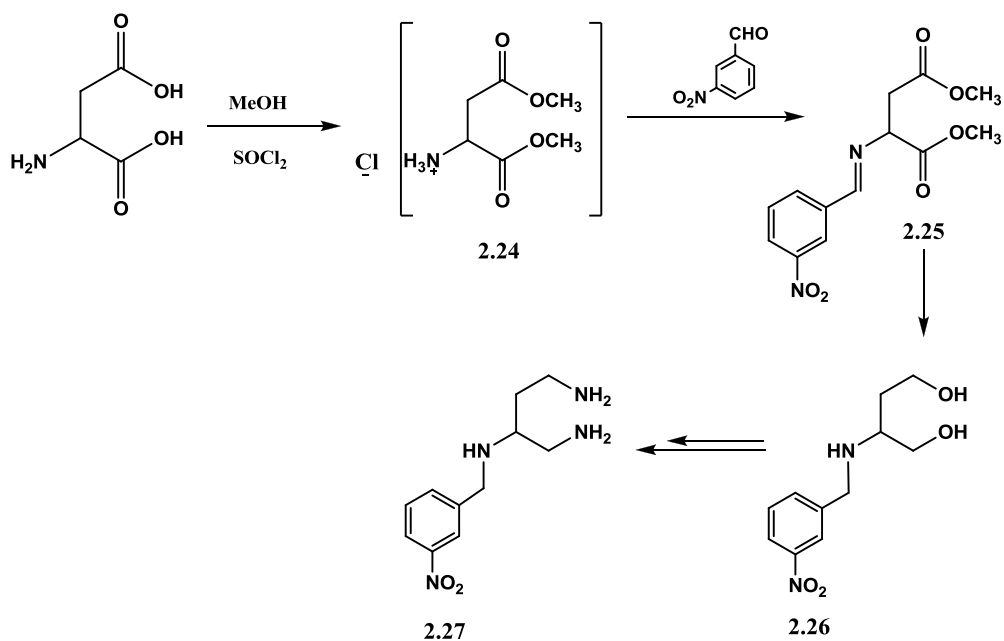
Seguindo pela via **A** (esquema 2.8), o composto **2.17** é colocado em refluxo de isopropanol, ao longo de 24 horas, com 1-bromometil-4-nitrobenzeno, na presença de trietilamina, que leva à sua neutralização. As condições reaccionais assentam tipicamente nas de substituição nucleofílica S_N1 : refluxo na presença de um solvente polar prótico. Mecanicamente ocorre eliminação do bromo (grupo abandonante) com a formação do carbocatião, seguido de ataque nucleofílico ao carbocatião. O produto de reacção (*S*)-3-hidroxi-2-(4-nitrobenzilamina) propanoato de metilo (**2.18**), confirmado por espectroscopia de RMN¹H foi isolado com 79 % de rendimento.

Após síntese do éster **2.18**, procedeu-se à redução deste ao respectivo diálcool **2.19**, pelo método habitual, no qual é adicionado um excesso de LiAlH₄ a uma solução de **2.18** em THF. Após isolamento do produto de reacção, analisou-se o espectro de RMN¹H verificando-se a presença de **2.19**, mas com algumas impurezas. Por estas não serem significativas, nem interfeririam com o passo seguinte, seguiu-se directamente para a mesilação. Procedeu-se à protecção dos grupos hidroxilo de **2.19** com cloreto de mesilo, de modo a estes não serem susceptíveis a reacções indesejáveis, através do procedimento habitual de mesilação. Ao analisar o produto de reacção, um óleo castanho muito escuro, por espectroscopia de RMN¹H, verificou-se que não tinha ocorrido mesilação. Observou-se um espectro muito complexo que sugeria a degradação do reagente. Mais uma vez, atribuímos este resultado à presença do grupo nitro, como já verificado nos casos anteriormente descritos.

Dados os resultados observados, pensou-se que talvez a utilização de um composto *meta* nitro-aromático seria mais auspiciosa. Como tal, depois de neutralizado o hidrocloreto de (*S*)-2-amino-3-hidroxi-propanoato de metilo, fez-se reagir o éster **2.17** com o 3-nitrobenzaldeído (esquema 2.8 –**B**), na presença de sílica activada, por meio de ultrasons, tendo por base um método referido na literatura [59]. O produto de reacção **2.22** foi confirmado por espectroscopia de RMN¹H e

constatou-se que continha algumas impurezas. Com o intuito de o purificar por coluna de sílica, fez-se um estudo por TLC de diversos eluentes. Analisaram-se vários eluentes, como misturas de acetato de etilo/hexano, diclorometano/metanol, acetato de etilo/metanol, metanol/amónia e etanol/amónia em diversas proporções. Contudo, verificou-se que tanto o produto, como as impurezas possuíam polaridades muito próximas, facto que não permitiu a sua separação. Consequentemente, devido a toda a reactividade secundária e/ou instabilidade dos produtos, considerámos que não seria viável sintetizar as diaminas **2.21** e **2.23** que pretendíamos a partir da serina.

Paralelamente ao estudo da tentativa de síntese de diaminas nitro-aromáticas derivadas da serina, fizeram-se estudos análogos com o ácido aspártico, que, para além de nos permitir obter uma diamina de estrutura diferente, também possibilitaria verificar se havia alguma influência da estrutura inicial no sucesso do procedimento sintético (esquema 2.9).



Esquema 2.9 – Síntese de **2.27** a partir do ácido aspártico.

De forma similar à serina, no primeiro passo da sequência sintética obteve-se o hidrocloreto de (*S*)-2-amino-1,4-butanodiato de dimetilo (**2.24**) com um rendimento quantitativo. Após neutralização, o **2.24** sofreu reacção com o 3-nitrobenzaldeído em refluxo de metanol, durante 5 horas. Após isolamento, o produto reaccional foi analisado por espectroscopia de RMN¹H, constatando-se a presença do produto pretendido **2.25** com um rendimento de 98 %.

A redução do diéster **2.25** ao respectivo diálcool **2.26** e consequente redução da imina a amina, mais uma vez não foi eficiente, mesmo após diversos ensaios variando condições de reacção (tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Condições reaccionais experimentadas para a redução de **2.25**.

Ensaio	Agente redutor	Solvente	Tempo (horas)	Temperatura (°C)	Composto 2.26
1	3,3 eq. LiAlH ₄	THF	12	25	-----
2	5 eq. NaBH ₄	MeOH	12	25	-----
3	5 eq. NaBH ₄	MeOH	5	25	-----
4	8 eq. NaBH ₄	MeOH	12	25	-----

No ensaio **1**, tabela 2.3, tentou-se reduzir o composto **2.25** a **2.26** com LiAlH₄, de forma semelhante à serina, mas por RMN¹H verificou-se que o produto não foi obtido, apenas produtos secundários. Assim, pensou-se que este agente redutor poderia ser demasiado activo, o que nos levou a optar pela utilização de um agente mais suave, como o NaBH₄ (ensaio **2**). Mantendo as condições do ensaio **1**, verificou-se a redução da imina a amina, e um dos grupos éster também parece ter sido reduzido a hidroxilo. Seguiram-se tentativas em que se aumentou a quantidade de agente redutor, mantendo a reacção durante 12 horas a 25 °C, de forma a reduzir os três grupos funcionais, contudo o produto continuava a ser a mistura observada anteriormente. Numa outra hipótese, reduziu-se o tempo de reacção para tentar reduzir apenas o grupo imina, reduzindo posteriormente os grupos éster com hidreto de alumínio e lítio, agente redutor mais forte e portanto

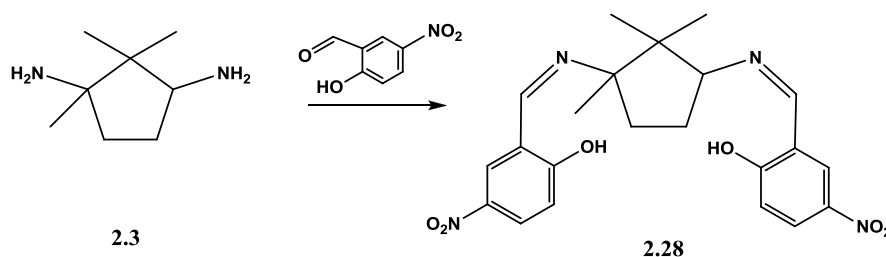
mais conveniente para esta situação. Contudo, obteve-se sempre uma mistura de produtos nos diversos casos estudados.

Estes resultados parecem confirmar a suspeita de que a presença do grupo nitro-aromático interfere de algum modo com a eficiente redução dos grupos éster dos aminoácidos estudados. Possivelmente, a presença deste grupo poderá contribuir para reacções secundárias, tais como a hidrólise da imina entre outras reacções indesejáveis, impedindo-nos de alcançar os produtos pretendidos.

2.3 Síntese de salens e salans

Tendo como referência um trabalho desenvolvido no grupo [59] que demonstrou a possibilidade e eficiência na utilização de ultrasons na síntese de salens quirais, experimentou-se sintetizar um novo tipo de salen a partir da diamina **2.3** por nós já sintetizada.

São referidos rendimentos entre 72-99 %, quando feita a reacção entre a diamina do ácido canfórico e um aldeído, em diclorometano ou etanol, na presença de sílica, durante aproximadamente 30 minutos. Os procedimentos clássicos envolvem refluxo em etanol ou metanol durante um tempo que pode variar de 2 a 24 horas, correspondendo a tempos de reacção maiores e maiores gastos energéticos. Portanto, este método mostrou-se susceptível à aplicação na reacção entre a diamina do ácido canfórico **2.3** e o 2-hidroxi-5-nitrobenzaldeído (esquema 2.10).



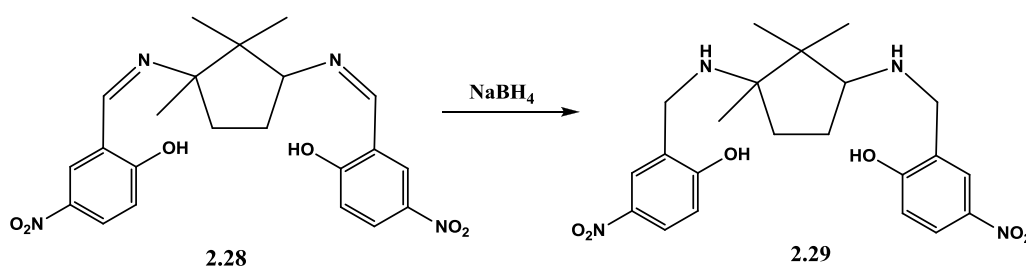
Esquema 2.10 – Representação da síntese de *N,N'*-bis[4-nitrofenol]-1,3-diimina-1,2,2-trimetilciclopentano (**2.28**).

Com irradiação por ultrasons, fizeram-se reagir a diamina **2.3** e o aldeído, em diclorometano, na presença de sílica, acompanhando a reacção por TLC (eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano 1:2). Decorridas 3 horas observava-se, por TLC, o produto e vestígios do aldeído, prosseguindo-se ao isolamento do produto. Contudo, a análise do espectro de RMN¹H mostrou a ausência de sinais relativos a protões, verificando-se que, devido à elevada polaridade do produto, contendo dois grupos amina, dois grupos nitro e dois hidroxilo, este tenha ficado retido na sílica, que apresentava uma tonalidade amarela.

Assim, optou-se por utilizar as condições clássicas, apesar dos seus inconvenientes. No decorrer do mesmo, ocorre precipitação de um sólido amarelo que é filtrado e lavado com éter etílico. O produto foi obtido com um rendimento de 77 % e foi analisado por espectroscopia de RMN¹H verificando-se a efectiva obtenção do salen *N,N'*-bis[4-nitrofenol]-1,3-diimina-1,2,2-trimetilciclopentano (**2.28**). Procedeu-se à caracterização completa deste novo composto, recorrendo a RMN¹³C, IV, LC-MS e ponto de fusão.

O salen obtido será testado quanto à sua eficiência de marcação com tecnécio radioactivo e, posteriormente, como marcador de hipóxia.

Obtido o salen **2.28**, que por sua vez já pode ser marcado e testado como radiotraçador de hipóxia, objectivou-se a redução deste ao respectivo salan *N,N'*-bis[4-nitrofenol]-1,3-diamina-1,2,2-trimetilciclopentano (esquema 2.11), de modo a obter um outro potencial ligando (**2.29**).



Esquema 2.11 – Representação da redução de **2.28** ao respectivo salan **2.29**.

A redução do salen derivado do ácido canfórico é tipicamente alcançada por meio da adição de um excesso NaBH_4 , e, tendo por base um procedimento na literatura, utilizou-se como solvente uma mistura de 1:1 de tolueno e metanol [60]. Findas 24 horas de reacção, à temperatura ambiente,

o produto de reacção foi isolado e analisado por espectroscopia de RMN¹H. Contudo, não se observaram sinais protónicos relativos ao composto **2.29**, apontando a possibilidade de degradação do produto. Portanto, ensaiaram-se outras condições (tabela 2.4).

Tabela 2.4 – Condições reaccionais aplicadas para redução de **2.28**.

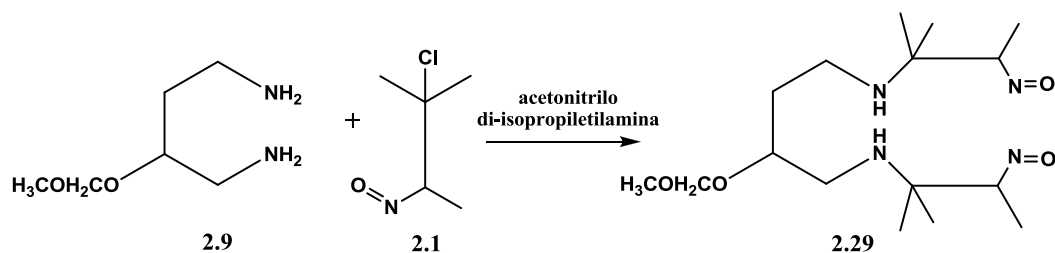
Ensaio	Salen 2.28 (mmol)	NaBH ₄	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Produto 2.38
1	0,34	Excesso	Tolueno/ MeOH	25	24	-----
2	0,34	Excesso	EtOH	25	24	-----
3	0,34	Excesso	EtOH	25	2,5	-----

Como se pode observar na tabela 2.4, no ensaio **2**, optou-se por alterar de solvente para etanol (EtOH), habitualmente utilizado em reacções de redução, e por se diminuir o tempo de reacção, de modo a suavizar as condições (ensaio **3**). Porém, por observação dos espectros de RMN¹H, o produto **2.28** não é obtido e a hipótese de ocorrência de degradação do produto permanece, sugerindo que tal se sucede devido à presença dos grupos nitro.

2.4 Síntese de diaminodioximas

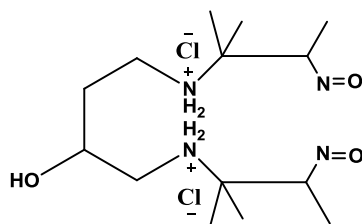
Um dos nossos objectivos era sintetizar algumas diaminodioximas a partir da diamina **2.9** e dos compostos tipo cloronitroso sintetizados (**2.1** e **2.2**).

A síntese da diaminodioxima derivada de (2*S*)-2-(metoximetiloxi)-1,4-diaminobutano foi realizada de acordo com um procedimento optimizado no grupo para a síntese do ligando HL-91 [47]. Faz-se a adição, a 0 °C, de uma solução da diamina **2.9** em acetonitrilo a outra de **2.1** e di-isopropiletilamina no mesmo solvente (esquema 2.12).

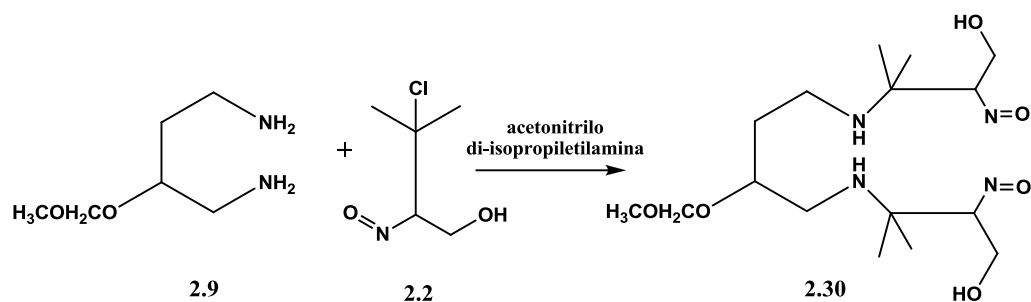
Esquema 2.12 – Síntese da diaminodioxima **2.29** derivada de **2.9**.

Após 24 horas de reacção, à temperatura ambiente, isolou-se o produto sob a forma de um sólido e após análise RMN¹H, observou-se que se encontrava muito contaminado com sais de di-isopropiletilamina e algumas impurezas. Foram feitas várias tentativas de purificação por recristalização em vários solventes, contudo sem sucesso.

Com base em trabalhos anteriores, pensou-se fazer a reacção na ausência de di-isopropiletilamina, obtendo-se o produto sob a forma de hidrocloreto. Fez-se então reagir a diamina **2.9** e o composto cloronitroso **2.1** de forma similar à anteriormente descrita, mas em THF e sem a di-isopropiletilamina. O produto foi recristalizado em metanol/éter etílico no frio, decantado e triturado repetidamente com éter etílico e evaporado. Após nova recristalização em metanol/éter etílico no frio, ocorreu precipitação de um sólido, que é e analisado por espectroscopia de RMN¹H, verificando-se ser a diaminodioxima, mas com o grupo hidroxilo desprotegido (figura 2.3).

Figura 2.3 – Diaminodioxima obtida após tentativas de purificação **2.29**.

De forma idêntica à síntese da diaminodioxima **2.29**, fez-se reagir a diamina **2.9** com o composto cloronitroso 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutan-4-ol (**2.2**) (esquema 2.12), tendo-se obtido, de forma semelhante ao caso anterior, o produto de reacção com algumas contaminações.



Esquema 2.12 – Síntese da diaminodioxima 2.30 derivada de 2.9.

As tentativas de recristalização e purificação por cromatografia em coluna de sílica deram origem à degradação do produto reaccional; possivelmente devido a eliminações e outras reacções indesejadas na presença da sílica.

Capítulo 3

Conclusões

Este projecto foi iniciado pela síntese de alguns compostos do tipo cloronitroso, 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano e 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutan-4-ol. Estes pretendiam-se fazer reagir com algumas diaminas de modo a obtermos diaminodioximas, potenciais marcadores de hipóxia. Efectuou-se também o desenvolvimento de alguns ligandos amínicos para utilização na síntese de alguns salens e salans.

Efectivamente, obtiveram-se algumas diaminas, tais como a (1*R*,3*S*)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano e (2*S*)-2-(metoximetiloxi)-1,4-diaminobutano. Procedeu-se, também, ao estudo da síntese de diaminas nitro-aromáticas derivadas do 2-hidroxi-1,3-diaminopropano e de alguns aminoácidos. Dos vários estudos efectuados com diferentes reagentes de partida, assim como diferentes condições de reacção, fomos levados a concluir que o insucesso na obtenção dos produtos finais pretendidos foi devido à presença do grupo nitro-aromático. Deste modo, partiu-se para a síntese de um outro tipo de ligando amínico contendo um grupo nitro-aromático: *N*-[2-(4-nitroimidazole)-etil]ciclo-hexilamina. A síntese deste novo ligando foi realizada com sucesso e optimizada, obtendo-se o produto pretendido com um rendimento de 39 %. Este ligando será utilizado em estudos de complexação com o ^{99m}Tc para detecção de hipóxia.

A partir da diamina (1*R*,3*S*)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano, obteve-se um salen novo com um rendimento de 77 %, que por sua vez está a ser testado quanto à capacidade de complexação e marcação.

Quanto à diamina derivada do ácido málico, (2*S*)-2-(metoximetiloxi)-1,4-diaminobutano, esta pretendia-se utilizar na reacção com ambos os compostos do tipo cloronitroso já sintetizados, de modo a obtermos dois tipos de dioximas. Contudo, devido a dificuldades no isolamento e purificação dos produtos, estas não foram obtidas como esperado, tendo-se observado a desprotecção indesejada do grupo hidroxilo.

Conclusões

A quantificação e detecção de hipóxia de forma não invasiva nos tumores revelam bastante interesse, uma vez que possibilita a melhoria dos tratamentos anti-cancerígenos. Deste modo, é de todo o interesse continuar o estudo da síntese de novos ligandos amínicos susceptíveis à complexação com tecnécio, de modo a alcançar os radiomarcadores eficientes para a detecção de hipóxia tumoral.

Capítulo 4

Experimental

Neste capítulo encontram-se descritos os vários procedimentos experimentais para a síntese dos compostos descritos ao longo deste projecto.

Os compostos sintetizados foram identificados e caracterizados por mais do que uma das seguintes técnicas: ponto de fusão, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), espectroscopia de infravermelho e cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa.

4.1 Aparelhagem

Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram determinados num microscópio Leitz Wetzlar modelo 799, de placa aquecida, e os seus valores não são corrigidos.

Espectros de Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram efectuados num espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR. Foram utilizadas pastilhas de KBr.

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram efectuados num espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz, usando como padrão interno TMS.

Ao longo deste projecto os desvios químicos são indicados em ppm e as constantes de acoplamento em Hz.

Espectros de massa

Os HPLC-MS foram obtidos num espectrómetro Fisons Instrument-Platform com sonda de APCI, acoplado a um cromatógrafo Thermo Separations, modelo Spectra Series P200

Cromatografia

Para as cromatografias em coluna foi utilizado gel de sílica 60 (0,040-0,063 mm) fornecido pela Merck ou Fluka.

Nas reacções cuja evolução foi seguida por cromatografia em camada fina (TLC) foram utilizadas placas de sílica gel 60 F₂₅₄, com suporte de alumínio, fornecidas pela Merck.

4.2 Purificação e secagem de solventes

Acetato de etilo

Este solvente foi refluxado na presença de K₂CO₃ durante 2h30.

Acetona

Este solvente foi usado directamente de uma garrafa selada.

Acetonitrilo

Este solvente foi refluxado na presença de pentóxido de fósforo ao longo de 2h30.

Cloreto de Tosilo

O composto foi dissolvido em clorofórmio, adicionando-se de seguida cinco vezes o volume de éter de petróleo. Filtraram-se os resíduos e reduziu-se o volume total da solução, a partir da qual cristalizou o composto puro.

Clorofórmio e diclorometano

Foram refluxados na presença de CaCl₂, destilados e guardados sobre peneiros moleculares 4 Å.

Cloreto de mesilo e dimetoximetano

Estes reagentes foram destilados e guardados sobre peneiros moleculares 4 Å.

DMF

Foi tratada durante 24 horas com óxido de cálcio previamente activado a 500 °C. Após decantação adicionou-se NaOH e agitou-se durante 1 hora. O solvente foi depois decantado, destilado e guardado sobre peneiros moleculares 4 Å.

Etanol e metanol

Este solvente foi seco pelo método de Lund e Bjerrum, sendo refluxado e posteriormente destilado a partir do respectivo alcóxido de magnésio. Após este tratamento, foi guardado sobre peneiros moleculares 4 Å.

Éter Etilico, hexano e THF

Foram secos por refluxo, na presença de fios de sódio e benzofenona, sendo posteriormente destilados e guardados sobre peneiros moleculares 4 Å.

Isopropanol

Este solvente foi refluxado com hidreto de cálcio, destilado e armazenado sobre peneiros moleculares 4 Å.

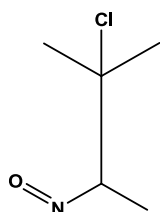
Trietilamina, piridina e ciclo-hexilamina

Os reagentes comerciais foram armazenados sobre palhetas de KOH.

Todos os outros reagentes e solventes utilizados foram adquiridos e usados directamente, sem qualquer purificação adicional.

4.3 Procedimento experimental

Síntese de compostos cloronitrosos



2.1

2-Cloro-2-metil-3-nitrosobutano

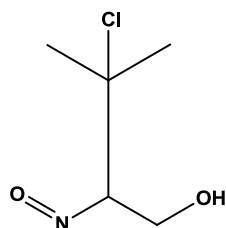
Num balão de duas tubuladoras, adicionar 0,1 mol de 2-metil-2-butenos (11 mL) a 0,1 mol de nitrito de isopentilo (13,5 mL). Colocar a solução a agitar num banho de gelo e ar líquido a uma temperatura de -20 °C. Por meio de uma bomba de injeção, adicionar 10 mL de HCl concentrado, a uma velocidade de 0,05 mL/min, à solução. Após adição deixar a agitar durante 2 horas a -20 °C. Filtrar o produto sólido e lavar com metanol seco e destilado. Colocar a solução no congelador e voltar a filtrar; recolher 3 ou 4 vezes. Os sólidos combinados são colocados no congelador a secar num exsiccador devidamente isolado. Retirar uma amostra e analisar o produto de reação por RMN¹H.

Obtém-se um sólido branco.

Rendimento: 77 %.

RMN¹H (CDCl₃): 1,49-1,50 (d, 3H); 1,65 (s, 3H); 1,68 (s, 3H); 5,93-5,98 (q, 1H, J 6,8).

Os restantes dados de caracterização dizem respeito a trabalhos já referidos na literatura [46]
ERROR: requested citation index out of range.



2.2

2-Cloro-2-metil-3-nitrosobutan-4-ol

Num balão de duas tubuladoras, adicionar 0,1 mol de 3-metil-2-buten-1-ol (10,2 mL) a 0,1 mol de nitrito de isopentilo (13,5 mL). Colocar a solução a agitar num banho de gelo e ar líquido a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por meio de uma bomba de injeção, adicionar 10 mL de HCl concentrado, a uma velocidade de 0,05 mL/min, à solução. Após adição deixar a agitar durante 2 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Filtrar o produto sólido e lavar com uma mistura fria de etanol/éter (1:1). Colocar a solução no frigorífico e voltar a filtrar; recolher o sólido formado mais 3 ou 4 vezes. Os sólidos combinados são colocados no congelador a secar num exsiccador devidamente isolado. Retirar uma amostra e analisar o produto de reacção por RMN¹H.

Obtém-se um sólido branco.

Rendimento: 53 %.

RMN¹H (CDCl₃) Mistura de isómeros rotacionais: 1,57 (s, 6H); 4,07-4,11 e 4,15-4,18 (dois dd, 1H, sist. ABX, J_{3,2}; 11,6); 4,25-4,37 (m, 1H); 6,06-6,10 e 6,11-6,14 (dois dd, 1H, sist. ABX, J_{3,2}; 10).

Síntese de aminas e respectivos precursores



2.3

(1R, 3S)-1,3-Diamino-1,2,2-trimetilciclopentano

Num balão de duas tubuladoras, equipado com condensador e agitação magnética, colocar 50 mmol de ácido canfórico (10,15 g), 100 mL de clorofórmio e 30 mL de ácido sulfúrico

concentrado. Muito lentamente e à temperatura de 55-60 °C, adicionar 143 mmol de azida de sódio (9,3 g). Deixar a reacção ocorrer até que cesse a evolução de gás. Após arrefecimento, verter a solução para um copo contendo uma mistura de água e gelo. À mistura resultante adicionar lentamente NaOH puro até pH=14. De seguida, extrair a solução com várias porções de clorofórmio e lavar a fase orgânica com água. Após extracção, secar a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Filtrar e evaporar a pressão reduzida.

Obtém-se um óleo acastanhado.

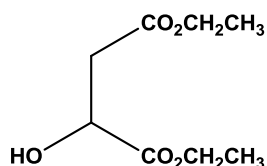
Rendimento: 74 %.

Uma amostra analítica é obtida sobre a forma de hidrocloreto, por tratamento da amina com HCl concentrado. Recristaliza em metanol/éter etílico.

P.f.: (dec.) ~ 240 °C.

RMN¹H (CD₃OD): 1,11 (s, 3H); 1,20 (s, 3H); 1,38 (s, 3H); 1,76-2,01 (m, 2H); 2,13-2,34 (m, 2H); 3,55 (t, 1H, J8,8).

Os restantes dados de caracterização dizem respeito a trabalhos já referidos na literatura [49].



2.4

(2*S*)-Malato de dietilo

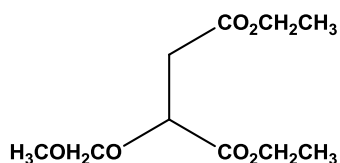
A uma solução de 13,4 g (0,1 mol) de ácido (*S*)-málico em 100 mL de etanol absoluto, adicionar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e colocar à temperatura de refluxo durante 5 h, com torre de secagem. Evaporar o etanol a pressão reduzida, juntar água e extrair várias vezes com acetato de etilo. Lavar as fases orgânicas com solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e água. Secar a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro, filtrar e evaporar o solvente a pressão reduzida.

Obtém-se um óleo.

Rendimento: 76 %.

RMN¹H (CDCl₃): 1,25-1,31 (m, 6H); 2,78 (dd, 1H, sist. ABX, J3,8; 9,6); 2,84 (dd, 1H, sist. ABX, J2,6; 9,6); 3,61 (sl, 1H); 4,17 (q, 2H, J4,2); 4,21-4,31 (m, 2H); 4,51 (sl, 1H, sist. ABX).

IV (cm⁻¹): 3505, 3485, 2984, 1373, 1737, 1180, 1027, 1107.



2.5

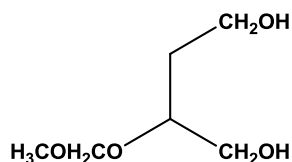
(2*S*)-2-(Metoximetiloxi)-malato de dietilo

Num balão adicionar 140 mL de dimetoximetano a 57 mmol de **2.4**. Arrefecer a solução em gelo e adicionar, ao longo de 1 hora, 20,1 g de peróxido de fósforo. Colocar a agitar em atmosfera inerte e deixar subir à temperatura ambiente durante 48 horas. Adicionar lentamente uma solução saturada de NaHCO₃ até reagir o excesso de peróxido. De seguida, juntar água e diclorometano e extrair com mais duas porções de diclorometano. Secar a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrar e evaporar a pressão reduzida.

Obtém-se um óleo.

Rendimento: 95 %.

RMN¹H (CDCl₃): 1,27 (t, 3H, J7,2); 1,29 (t, 3H, J7,2); 2,79-2,81 (m, 2H); 3,39 (s, 3H); 4,17 (q, 2H, J7,2); 4,22 (q, 2H, J7,2); 4,54 (aprox. t, 1H, J6,4); 4,71 (d, 1H, sist. AB, J7,0); 4,76 (d, 1H, sist. AB, J7,0).



2.6

(2*S*)-2-(Metoximetiloxi)-1,4-di-hidroxitano

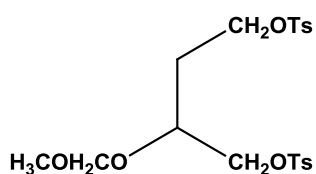
Arrefecer um balão contendo 91 mL de éter etílico seco à temperatura de -10 °C, numa mistura de gelo/sal. Adicionar, lentamente e em atmosfera inerte, 87 mmol de LiAlH₄ (3,3 g). À suspensão formada e em agitação, adicionar, gota-a-gota, uma solução de 54 mmol de **2.5** (12,6 g)

em 33 mL de éter etílico. Deixar subir à temperatura ambiente, reagindo durante 20 horas. Adicionar acetato de etilo lentamente, até reagir o excesso de LiAlH_4 . Adicionar, gota-a-gota, 3,3 mL de água, seguido de 3,3 mL de NaOH a 15 % e, finalmente, mais 9,9 mL de água. Agitar durante 15 minutos. Filtrar com celite. Os resíduos são agitados novamente em diclorometano, à temperatura de refluxo, durante 1 hora, e lavados com mais diclorometano. As fases orgânicas são secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e evaporadas a pressão reduzida.

Obtém-se um óleo.

Rendimento: 48 %.

RMN¹H (CDCl₃): 1,75-1,84 (m, 2H); 3,39-3,41 (m, 1H); 3,42 (s, 3H); 3,56-3,66 (m, 2H); 3,74-3,81 (m, 2H); 4,71(d, 1H, sist. AB, J5,6); 4,74 (d, 1H, sist. AB, J5,6).



2.7

(2*S*)-2-(Metoximetiloxi)-1,4-ditosiloxibutano

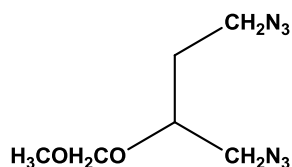
A uma mistura de 15 mL de piridina e 32 mL de diclorometano, adicionar 25 mmol de **2.6** (3,78 g). Arrefecer a -20 °C e adicionar lentamente uma solução de 12,7 g de cloreto de tosilo em 32 mL de diclorometano, em atmosfera inerte. Deixar a mistura a agitar, à temperatura ambiente, durante 20 horas.

A 0 °C, adicionar lentamente uma mistura de 4,4 mL de água e 67 mL de diclorometano. Verter a mistura para uma outra de 23 g de gelo e 8,2 mL de HCl concentrado. Separar a fase aquosa e extraí-la duas vezes com 32 mL de diclorometano. Os extractos orgânicos combinados são lavados com solução saturada de NaHCO_3 e água. Secar a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e vestígios de Na_2CO_3 . Filtrar e evaporar o solvente a pressão reduzida e à temperatura ambiente. Verificar a presença de piridina. De modo a eliminá-la, se necessário, repetir a extracção três vezes com diclorometano e uma solução de HCl (0,5 M). Secar com sulfato de sódio anidro. Filtrar e evaporar o solvente a pressão reduzida.

Obtém-se um óleo.

Rendimento: 90 %.

O produto obtido é utilizado directamente no passo seguinte.

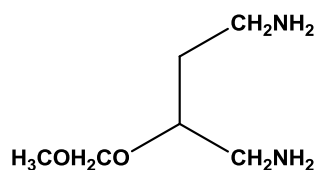
**2.8****(2S)-2-(Metoximetiloxi)-1,4-diazidobutano**

Dissolver 22,5 mmol de **2.7** em 100 mL de DMF seco. Adicionar 5,85 g de NaN_3 e aquecer a 90 °C em atmosfera inerte, durante aproximadamente 18 horas. Evaporar o DMF a pressão reduzida e tratar o resíduo com água e éter etílico. A fase aquosa é extraída com mais duas porções de éter etílico e as fases orgânicas combinadas são secas com sulfato de magnésio anidro. Filtrar e evaporar o solvente a pressão reduzida. Analisar a reacção por TLC, comparando o produto de reacção com **2.7**, na mesma placa, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano 1:3. Utilizar, na placa de TLC, o revelador 5% ácido sulfúrico/etanol e levá-la à placa de aquecimento. O produto obtido é purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano 1:3.

Obtém-se um óleo.

Rendimento: 74 %.

RMN¹H (CDCl₃): 1,64-1,92 (m, 2H); 3,32 (dd, 1H, J_{5,2}; 12,8); 3,43 (s, 3H); 3,44-3,46 (m, 2H); 3,47 (dd, 1H, J_{4,4}; 12,8); 3,79-3,84 (m, 1H); 4,69 (d, 1H, sist. AB, J_{7,0}); 4,75 (d, 1H, sist. AB, J_{7,0}).



2.9

(2*S*)-2-(Metoximetiloxi)-1,4-diaminobutano

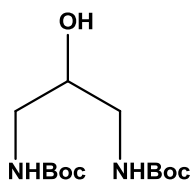
Num reactor de hidrogenação, colocar 16,6 mmol de (2*S*)-2-(metoximetiloxi)-diazidobutano e 0,40 g de Pd/C a 10 % em 25 mL de etanol seco. Colocar a hidrogenar *overnight*. Filtrar com celite e evaporar o solvente a pressão reduzida. Analisar o produto de reacção por RMN¹H e IV.

Obtém-se um óleo.

Rendimento: 94 %.

RMN¹H (CDCl₃): 1,54 (sl, 4H); 1,57-1,67 (m, 2H); 2,63 (dd, 1H, J_{5,6}; 13,4); 2,70-2,73 (m, 2H); 2,74 (dd, 1H, J_{4,4}; 13,4); 3,32 (s, 3H); 3,51-3,59 (m, 1H); 4,59 (d, 1H, sist. AB, J_{6,8}); 4,63 (d, 1H, sist. AB, J_{6,8}).

IV (cm⁻¹): 3376; 1580; 1484; 1321; 1146; 1033



2.10

2-Hidroxi-1,3-(*tert*-butoxicarbonilodiamino)propano

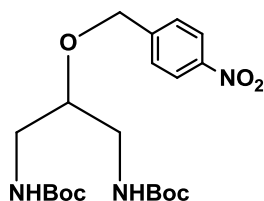
Num balão juntar 20 mmol de (Boc)₂O, Amberlyst-15 (15 % m/m), 10 mmol de 2-hidroxi-1,3-diaminopropano e 20 mL de diclorometano. Colocar a agitar à temperatura ambiente, *overnight*. Verificar se a reacção está completa por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano 1:3 e levando a placa de TLC ao revelador de iodo. Filtrar a Amberlyst-15 e lavar com três porções de diclorometano. Evaporar o solvente a pressão reduzida e isolar o produto por cristalização. O isolamento é realizado com hexano e éter etílico, seguido de evaporação a pressão reduzida. Retirar uma amostra e analisar o produto de reacção por RMN¹H.

Obtém-se um sólido branco.

Rendimento: 91 %.

RMN¹H (CDCl₃): 1,44 (s, 18H); 3,13-3,19 (m, 2H); 3,24-3,30 (m, 2H); 3,71-3,78 (m, 1H); 5,12 (sl, 2H).

Os restantes dados de caracterização dizem respeito a trabalhos já referidos na literatura [33].



2.11

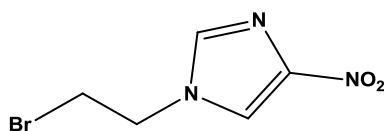
2-(4-Nitrobenziloxy)-1,3-(*tert*-butoxycarbonyl)propano

Num balão juntar 1 mmol de **2.10**, 1 mmol de 1-bromometil-4-nitrobenzeno e dissolver em 5 mL de diclorometano. Adicionar 1 mmol do catalisador Ag₂O. Colocar a agitar à temperatura ambiente, durante 48 horas. Acompanhar a reacção por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano 1:3. Filtrar o Ag₂O com celite, lavar com três porções de diclorometano e evaporar o solvente a pressão reduzida. Retirar uma amostra e analisar o produto de reacção por RMN¹H.

Obtém-se um sólido branco.

Rendimento: Quantitativo.

RMN¹H (CDCl₃): 1,45 (s, 18H); 3,12-3,18 (m, 2H); 3,25-3,31 (m, 2H); 3,72-3,76 (m, 1H); 4,52 (s, 2H); 5,06 (sl, 2H); 7,56 (d; 2H; J8,4); 8,21 (d; 2H; J8,4).



2.13

1-Bromoetil-2-(4-nitroimidazole)

Dissolver em 100 mL de acetona 0,1 mol de 4-nitroimidazole, adicionar 0,4 mol de 1,2-bromoetano e 5,4 g de carbonato de potássio. Colocar à temperatura de refluxo durante 24 horas. Evaporar o solvente a pressão reduzida e tratar o resíduo com NaCl, diclorometano e água. Extrair a fase aquosa com mais duas porções de diclorometano. Secar as fases orgânicas combinadas com

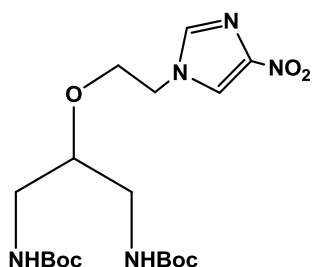
sulfato de sódio anidro, filtrar o agente secante e evaporar o solvente. Cristalizar o óleo em éter etílico e verificar por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano 3:1, a existência do produto. Retirar uma amostra e analisar o produto de reacção por RMN¹H.

Obtém-se um sólido branco.

Rendimento: 31 %.

RMN¹H (CDCl₃): 3,67 (t; 2H; J6); 4,46 (t; 2H; J6); 7,52 (s; 1H); 7,85 (s, 1H).

Os restantes dados de caracterização dizem respeito a trabalhos já referidos na literatura.



2.14

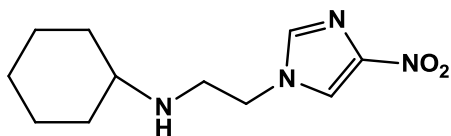
2-(1-Etiloxi-4-nitroimidazole)-1,3-(*tert*-butoxicarbonilodiamino) propano

Num balão juntar 1 mmol de **2.10** e 1 mmol de **2.13**. Dissolver em 5 mL de diclorometano. Adicionar 1 mmol do catalisador Ag₂O. Colocar a agitar à temperatura ambiente, durante 48 horas. Acompanhar a reacção por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano 3:1. Filtrar o Ag₂O com celite, lavar com três porções de diclorometano e evaporar o solvente a pressão reduzida. Retirar uma amostra e analisar o produto de reacção por RMN¹H.

Obtém-se um sólido branco.

Rendimento: Quantitativo.

RMN¹H (CDCl₃): 1,44 (s, 18H); 3,11-3,20 (m, 2H); 3,25-3,31 (m, 2H); 3,67 (t; 2H; J6); 3,72-3,76 (m, 1H); 4,46 (t; 2H; J6); 5,10 (sl; 2H); 7,53 (s; 1H); 7,86 (s, 1H).



2.16

N-[2-(4-Nitroimidazole)-etil]ciclo-hexilamina

Num balão dissolver 5 mmol de **2.13** (1,1001 g) em 20 mL de acetonitrilo. Adicionar 6 mmol de ciclo-hexilamina (0,7 mL), 0,7 g de carbonato de potássio e vestígios de iodeto de sódio. Colocar à temperatura de refluxo ao longo de 24 horas. Após arrefecimento, filtrar o excesso de carbonato de potássio e evaporar a pressão reduzida.

O óleo obtido é purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e metanol 90:10. Após retirado o excesso de reagente observado por TLC, a coluna é vertida para um erlenmeyer e colocada a agitar em diclorometano *overnight*, de modo a retirar todo o produto retido na mesma. Filtrar a sílica e lavar com diclorometano. Evaporar o solvente a pressão reduzida. Retirar uma amostra e analisar o produto de reacção por RMN¹H e RMN¹³C. Caracterizar, ainda, por espectroscopia IV e LC-MS.

Obtém-se um óleo castanho-escuro.

Rendimento: 39 %.

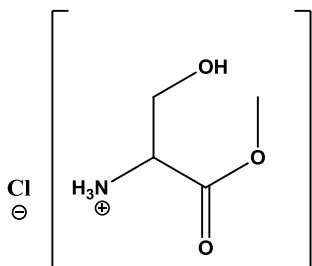
RMN¹H (CDCl₃): 0,99-1,06 (m, 2H); 1,13-1,29 (m, 2H); 1,59-1,62 (m, 2H); 1,70-1,73 (m, 2H); 1,82-1,85 (m, 2H); 2,37-2,44 (m, 1H); 3,04 (t, 2H, J5,8); 4,06 (t, 2H, J5,6); 7,52 (s, 1H); 7,89 (s, 1H).

RMN¹³C (CDCl₃): 24,88; 25,93; 33,62; 46,49; 49,34; 56,65; 119,66; 136,36; 148,13.

IV (cm⁻¹): 3293; 3146; 2928; 2852; 2362; 1542; 1490; 1446; 1404; 1380; 1335; 1289; 1130; 1044; 984; 892; 823; 755; 678; 668; 661.

LC-MS (m/z): 239 [(M+1)⁺, 100%].

LC-MS-MS (m/z): 126 (100%), 157 (13%).



2.17

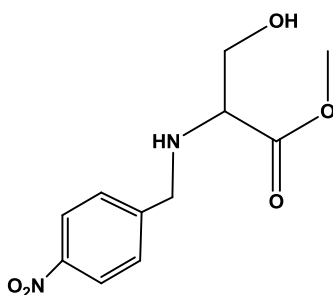
Hidrocloreto de (*S*)-2-amino-3-hidroxi-propanoato de metilo

Colocar num banho de gelo um balão com 50 mL de metanol e adicionar muito lentamente 20 mmol de cloreto de tionilo. Adicionar 20 mmol de serina e colocar à temperatura de refluxo aproximadamente 4 horas. Evaporar o solvente a pressão reduzida e isolar por recristalização com éter etílico. Retirar uma amostra e analisar o produto de reacção por RMN¹H.

Obtém-se um sólido branco.

Rendimento: Quantitativo.

RMN¹H (CDCl₃): 3,74 (s, 3H); 3,83 (sl, 2H), 4,09 (sl, 2H).



2.18

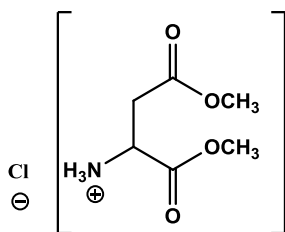
(*S*)-3-Hidroxi-2-(4-nitrobenzilamina) propanoato de metilo

Num balão com 50 mL de isopropanol, adicionar 10 mmol de **2.17**, 2,8 mL de trietilamina e 9 mmol de 1-bromometil-4-nitrobenzeno. Colocar à temperatura de refluxo ao longo de 24 horas. Evaporar o solvente a pressão reduzida e tratar com água e diclorometano. Extrair a fase aquosa com mais duas porções de diclorometano. Secar as fases orgânicas combinadas com sulfato de sódio anidro, filtrar o agente secante e evaporar o solvente. Retirar uma amostra e analisar o produto de reacção por RMN¹H.

Obtém-se um óleo amarelado.

Rendimento: 79 %.

RMN¹H (CDCl₃): 3,07-3,12 (dd, 1H, sist. ABX, J7,2; 14,4); 3,41-3,44 (dd, 1H, sist. ABX, J4,8; 5,6); 3,66-3,71 (dd, 1H, sist. ABX, J6,4;10,8); 3,78 (s, 3H); 3,83 (d, 1H, J13,6); 4,04 (d, 1H, J14,4); 7,52 (d, 2H, J8,4); 8,20 (d, 2H, J8,4).



2.24

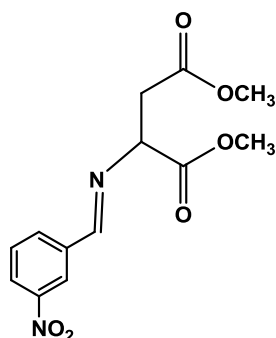
Hidrocloreto de (*S*)-2-amino-1,4-butanodiato de dimetilo

Colocar num banho de gelo um balão com 100 mL de metanol e adicionar muito lentamente 40 mmol de cloreto de tionilo. Adicionar 20 mmol de ácido aspártico e colocar à temperatura de refluxo aproximadamente 4 horas. Evaporar o solvente a pressão reduzida e isolar por recristalização com éter etílico. Retirar uma amostra e analisar o produto de reacção por RMN¹H.

Obtém-se um sólido branco.

Rendimento: Quantitativo.

RMN¹H (CDCl₃): 1,92 (sl, 3H); 3,22-3,28 (dd, 1H, sist. ABX, J4,4; 17,6); 3,33-3,39 (dd, 1H, sist. ABX, J3,2; 18); 3,76 (s, 3H); 3,85 (s, 3H); 4,56 (sl, 1H).

**2.25****(S)-2-(3-Nitrobenzilideno-amina)-1,4-butanodiato de dimetilo**

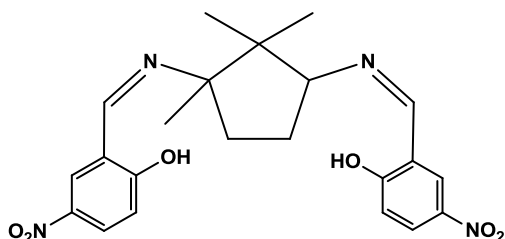
Num balão com 50 mL de metanol, adicionar 10 mmol de **2.23**. Colocar num banho de gelo com agitação, aproximadamente 10 minutos, juntar gota-a-gota 2,8 mL de trietilamina e deixar a agitar 30 minutos. Lentamente, adicionar 9 mmol de 3-nitrobenzaldeído e deixar a agitar 15 minutos. Colocar à temperatura de refluxo, aproximadamente, 4h30. Evaporar o solvente a pressão reduzida e tratar com água e diclorometano. Extrair a fase aquosa com mais duas porções de diclorometano. Secar as fases orgânicas combinadas com sulfato de sódio anidro, filtrar o agente secante e evaporar o solvente. Retirar uma amostra e analisar o produto de reacção por RMN¹H.

Obtém-se um óleo amarelado.

Rendimento: 98 %.

RMN¹H (CDCl₃): 2,90-2,96 (dd, 1H, sist. ABX, J8,2; 17); 3,15-3,21 (dd, 1H, sist. ABX, J5,6; 17); 3,68 (s, 3H); 3,77 (s, 3H); 4,53-4,57 (dd, 1H, sist. ABX, J5,6; 8); 7,61 (t, 1H, J8); 8,11 (d, 1H, J7,6); 8,30 (d, 1H, J8); 8,47 (s, 1H); 8,62 (s, 1H).

Síntese de salens



2.28

N,N'-bis[4-Nitrofenol]-1,3-diimina-1,2,2-trimetilciclopentano

Num balão dissolver 1 mmol de **2.3** (0,1486 g) e 1,8 mmol de 2-hidroxi-5-nitrobenzaldeído (0,3008 g) em 20 mL de etanol. Colocar em refluxo, aproximadamente 5 horas. O sólido obtido é filtrado e lavado com éter etílico. Colocar o sólido a secar na bomba de vácuo e retirar uma amostra para análise por RMN¹H. Caracterizar, ainda, por RMN¹³C, espectroscopia IV e ponto de fusão.

Obtém-se um sólido amarelo.

Rendimento: 77 %.

P.f.: 268 °C.

RMN¹H (CDCl₃): 1,00 (s, 3H); 1,04 (s, 3H); 1,56 (sl, 2H); 2,02-2,11 (m, 2H); 2,30-2,39 (m, 2H); 3,71 (t, 1H, J8); 6,97-7,01 (dd, 2H, J7,6; 8,8); 8,20-8,23 (dd, 2H, J2; 9, 2); 8,27-8,30 (dd, 2H, J2,6; 12,6); 8,39 (s, 2H).

RMN¹³C (CDCl₃): 18,91; 21,43; 23,51; 28,13; 34,49; 48,84; 70,90; 75,84; 116,68; 117,12; 118,60; 119,33; 127,96; 128,19; 128,39; 128,62; 138,69; 139,34; 160,85; 163,07; 168,04; 169,91.

IV (cm⁻¹): 3447; 2970; 1637; 1539; 1491; 1341; 1229; 1121; 1091; 939; 900; 840; 753; 732; 640.

LC-MS (m/z): 441 [(M+1)⁺, 100%], 292 (83 %).

LC-MS-MS (m/z): 275 (100%), 441 (43 %).

Bibliografia

- [1] A.M. Abrantes, M.E. Serra, D. Murtinho, A.R. Gonsalves, and M.F. Botelho, "An insight into tumoral hypoxia: the radiomarkers and clinical applications," *Oncol Rev*, vol. 3, 2009, pp. 3-18.
- [2] I. Papandreou, C. Krishna, and N. Denko, "Anoxia Is Necessary for Tumor Cell Toxicity Caused by a Low-Oxygen Environment," *Cancer Research*, vol. 65, 2005, pp. 3171-3178.
- [3] R.H. Thomlinson and L.H. Gray, "The histological structure of some human lung cancers and possible implications for radiotherapy," *Br J Cancer*, vol. 9, 1955, p. 539.
- [4] X. Zhang, T. Melo, and J.R. Ballinger, "Measurement of Tumor Oxygenation," *Radiation Oncology*, vol. 42, 1998, pp. 737-740.
- [5] R.B. Oliveira and R.J. Alves, "Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos," *Química Nova*, vol. 25, 2002, pp. 976-984.
- [6] S. Kisaka-Kondoh and H. Harada, "Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy," *Cancer Research*, vol. 48, 2003, pp. 2641-2658.
- [7] D. Bottaro and L. Liotta, "Out of air is not out of action," *Nature*, vol. 423, 2003, pp. 593-595.
- [8] S. Pennacchietti, "Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene," *Cancer Cell*, vol. 3, 2003, pp. 347-361.
- [9] P. Vaupel and L. Harrison, "Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response," *Oncologist*, vol. 9, 2004, pp. 4-9.
- [10] J. Read, "The effect of ionizing radiation on the broad beam root: the dependence of the x-ray sensitivity on dissolved oxygen," *Br J Radiol*, vol. 25, 1952, p. 89.
- [11] J.C. Mottram, "Factors of importance in radiosensitivity of tumors," *Br J Radiol*, vol. 9, 1936, p. 606.
- [12] L.H. Gray, A.D. Coger, and M. Ebert, "The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy," *Br J Radiol*, vol. 26, 1953, p. 638.
- [13] H.B. Stone, J.M. Brown, T.L. Philips, and R.M. Sutherland, "Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy," *Radiat Res*, vol. 136, 1992, pp. 422-434.

- [14] A. Nunn, K. Linder, and H.W. Strauss, "Nitroimidazoles and imaging hypoxia," *European Journal of Nuclear Medicine*, vol. 22, 1995.
- [15] J.M. Arbeit, J.M. Brown, and K.S. Chao, "Hypoxia: importance in tumor biology, non-invasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy," *Journal Radiation Biology*, vol. 82, 2006, pp. 699-757.
- [16] L. Goethals, A. Debucquoy, C. Perneel, K. Geboes, and N. Ectors, "Hypoxia in human colorectal adenocarcinoma: Comparison between extrinsic and potential intrinsic hypoxia markers," *International Journal Oncology Biology Physics*, vol. 65, 2006, pp. 246-254.
- [17] D. Hedley, M. Pintilie, and J. Woo, "Carbonic anhydrase IX expression, hypoxia, and prognosis in patients with uterine cervical carcinomas," *Clin Cancer Res*, vol. 9, 2003, pp. 5666-5674.
- [18] J.R. Ballinger, "Imaging hypoxia in tumors," *Seminars in Nuclear Medicine*, vol. 31, 2001, pp. 321-329.
- [19] D.S. Vikram, J.L. Zweier, and P. Kuppusamy, "Methods for noninvasive imaging of tissue hypoxia," *Antioxid Redox Signal*, vol. 10, 2007, pp. 1745-1755.
- [20] B.J. Krause, R. Beck, M. Souvatzoglou, and M. Piert, "PET and PET/CT studies of tumor tissue oxygenation," *QJ Nucl Med Mol Imaging*, vol. 50, 2006, pp. 28-43.
- [21] A.M. Abrantes, "Hipóxia tumoral em carcinoma colorectal," 2007.
- [22] D.E. Reichert, J.S. Lewis, and C.J. Anderson, "Metal complexes as diagnostic tools," *Coord Chem Rev*, vol. 184, 1999, pp. 3-66.
- [23] S.S. Jurisson and J.D. Lydon, "Potential technetium small molecule radiopharmaceuticals," *Chem Rev*, vol. 99, 1999, p. 2205-2218.
- [24] M. Méndez-Rojas, B. Kharisov, and A. Tsivadze, "Recent advances on technetium complexes: coordination chemistry and medical applications," *J Coord Chem*, 2006, pp. 1-63.
- [25] J.D. Chapman, "Current concepts in cancer. Hypoxia sensitizers – implications for radiation therapy," *Nuclear Eng J Med*, vol. 301, 1979, pp. 1429-1432.
- [26] S. Nakamura and H. Umezawa, "Structure of azomycin (2-nitro-imidazole)," *Antibiot (Tokyo)*, vol. 8, 1955, p. 66.
- [27] I.B. Chin and A.M. Rauth, "The metabolism and pharmacokinetics of the hypoxic cell radiosensitizer and cytotoxic agent, Misonidazole in C3H mice," *Radiat Res*, vol. 86, 1981, pp. 341-357.

- [28] X. Zhang, Z. Su, J.R. Ballinger, A.M. Rauth, A. Pollak, J.R. Thornback, I. Centre, and R. Pharmaceuticals, "Targeting Hypoxia in Tumors Using 2-Nitroimidazoles with Peptidic Chelators for Technetium-99m: Effect of Lipophilicity," *Bioconjugate Chem.*, vol. 11, 2000, pp. 401-407.
- [29] N. Raju, K. Ramalingam, and D.P. Nowotnik, "Syntheses of some nitroimidazole substituted boronic acids: precursors to technetium-99m complexes with potential for imaging hypoxic tissue," *Tetrahedron*, vol. 48, 1992, pp. 10233-10238.
- [30] C. Hsia, F. Huang, C. Lin, L. Shen, and H. Wang, "The preparation and biological characterization of a new HL91-derivative for hypoxic imaging on stroke mice," *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 68, 2010, pp. 1610-1615.
- [31] J.R. Ballinger, J. Wan, M. Kee, and A.M. Rauth, "In Vitro and In Vivo Evaluation of a Technetium- 99m-Labeled 2-Nitroimidazole (BMS181321) as a Marker of Tumor Hypoxia," *The Journal of Nuclear Med*, vol. 37, 1996, pp. 1023-1031.
- [32] K.E. Linder, Y.W. Chan, and J.E. Cyr, "⁹⁹TcO(PnAO-1-2-nitroimidazole) [BMS-181321], a new technetium-containing nitroimidazole complex for imaging hypoxia: synthesis, characterization and xanthine oxidase-catalyzed reduction," *J Med Chem*, vol. 37, 1993, pp. 9-17.
- [33] K. Ramalingam and N. Raju, "Synthesis of nitroimidazole substituted 3,3,9,9-tetramethyl-4,8-diazaundecane-2,10-dione dioximes (propylene amine oximes, PnAOs): Ligands for technetium-99m complexes with potential for imaging hypoxic tissue," *Tetrahedron*, vol. 51, 1995, pp. 2875-2894.
- [34] K.E. Linder, "Effect of substituents on physiochemical and biological behaviour of Tc-PnAO nitroimidazoles," *J Nucl Med*, vol. 35, 1994, p. 18P.
- [35] X. Zhang, T. Melo, A.M. Rauth, and J.R. Ballinger, "Cellular accumulation and retention of the technetium-99m-labelled hypoxia markers BRU59 -21 and butylene amine oxime," *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 28, 2001, pp. 949 -957.
- [36] X. Liang and P.J. Sadler, "Cyclam complexes and their applications in medicine," *Crit Rev*, vol. 33, 2004, pp. 246-266.
- [37] M.R. Pillai, M. Corlija, and W.A. Volkert, "Biocalization and cell labeling properties of neutral-lipophilic ^{99m}Tc-Amine-phenol chelates," *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 18, 1991, pp. 167-172.

- [38] M.R. Pillai and C.S. John, "Technetium complexes of pentadentate amine-phenol ligands," *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 20, 1993, pp. 211-216.
- [39] M.R. Pillai, K. Kothari, and S.S. Jurisson, "Pentadentate chiral amine-phenol ligands: synthesis and radiochemical studies with ^{99m}Tc ," *Applied Radiation and Isotopes*, vol. 46, 1995, pp. 923-927.
- [40] K. Ramalingam, N. Raju, and P.E. Nanjappan, "The synthesis and in vitro evaluation of a ^{99m}Tc -nitroimidazole complex based on a bis(amino-phenol) ligand: comparison to BMS-181321," *J Med Chem*, vol. 37, 1994, p. 4155-4163.
- [41] S. Kasina, "Bridged aromatic substituted amine ligands with donor atoms," 2007.
- [42] X. Zhang and T.E. Melo, "Studies of ^{99m}Tc -BnAO (HL-91): a non-nitroaromatic compound for hypoxic cell detection," *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, vol. 42, 1998, pp. 737-740.
- [43] C.M. Archer and J.F. Binke, "Radiometal complexes that localize in hypoxic tissue," 1999.
- [44] A.M. Abrantes, M. Elisa, S. Serra, J. Rio, M. Laranjo, A.B. Sarmento-ribeiro, and M.F. Botelho, "Hypoxia-induced redox alterations and their correlation with and," *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 37, 2010, pp. 125 - 132.
- [45] T. Melo, J. Duncan, J.R. Ballinger, and A.M. Rauth, "BRU59-21, a second generation ^{99m}Tc -labeled 2-Nitroimidazole for Imaging Hypoxia in Tumors," *J Nuclear Medicine*, vol. 41, 2000, pp. 169-176.
- [46] D.P. Nowotnik and L.R. Canning, "Complexes of technetium 99m with propylene amine oximes," 1989.
- [47] X. Sun, T. Chu, and X. Wang, "Preliminary studies of ^{99m}Tc -BnAO and its analogues: synthesis, radiolabeling and in vitro cell uptake," *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 37, 2010, pp. 117- 123.
- [48] A.M. Gonsalves and T.M. Melo, *Espectroscopia de ressonância magnética nuclear*, Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2006.
- [49] D.M. Murtinho, "Desenvolvimento de novos catalisadores quirais para alquilação e redução," 2006.
- [50] A.M. Gonsalves, M.E. Serra, and D. Murtinho, "Approach to a better understanding and modelling of Beta-pyrrolidinoalcohol ligands for enantioselective alkylation," *Journal of Molecular Catalysis*, vol. 250, 2006, pp. 104-113.

- [51] R. Ballini and E.E. Marcantoni, "A nitronone-based approach to the enantioselective total synthesis of (-)-Anisomycin," *Journal of Organic Chemistry*, vol. 57, 1992, pp. 1316-1318.
- [52] E. Hungerbühler, R. Naef, D. Wasmuth, and D. Seebach, "Synthese optisch aktiver 2-Methyl- und 2-Athyl-1,6-dioxaspiro [4,4]-nonan- und -[4,5]decan-pheromone aus einem gemeinsamen chiralen Vorläufer," *Helv. Chim. Acta*, vol. 63, 1980, pp. 1960-1970.
- [53] U. Nagel and H.G. Nedden, "Preparative and Structural Chemistry of Chiral 3-(Diphenylphosphanyl)-pyrrolidines and Their Palladium(II) Complexes," *Chem. Ber.*, vol. 130, 1997, pp. 385-397.
- [54] K.S. Kumar, J. Iqbal, and M. Pal, "Amberlyst-15: a mild, efficient and reusable heterogeneous catalyst for N-ter-butoxycarbonylation of amines," *Tetrahedron Letters*, vol. 50, 2009, pp. 6244-6246.
- [55] K. Fukase, H. Tanaka, and S.E. Torii, "4-Nitrobenzyl Group for protection of hydroxyl functions," *Tetrahedron Letters*, vol. 31, 1990, pp. 389-392.
- [56] Y. Liu and C.E. Zhao, "Simultaneous deprotection and purification of BOC-amines based on ionic resin capture," *Journal of Organic Chemistry*, vol. 63, 1998, pp. 3471-3473.
- [57] S. Jaime-Figueroa, A. Zamilpa, A. Guzman, and D.J. Morgans, "N-3-Alkylation of uracil and derivatives via N-1-BOC-protection," *Synthetic Communications*, vol. 31, 2001, p. 3739-3746.
- [58] R.G. Webb, M.W. Haskell, and C.H. Stammer, "A nuclear magnetic resonance method for distinguishing alpha-amino acids from Beta and Gamma isomers," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 34, 1969, pp. 576-580.
- [59] M.E. Serra, D. Murtinho, A. Goth, A.M. Gonsalves, P. Abreu, and A.A. Pais, "Ultrasound-Mediated Synthesis of Camphoric Acid-Based Chiral Salens for the Enantioselective Trimethylsilylcyanation of Aldehydes," *Chirality*, vol. 22, 2010, pp. 425-431.
- [60] C. Borriello, M.E. Cucciolito, A. Panunzi, and F. Ruffo, "Novel chiral diimines and diamines derived from sugars in copper-catalysed asymmetric cyclopropanation," *Tetrahedron*, vol. 12, 2001, pp. 2467-2471.



• C •

• U •