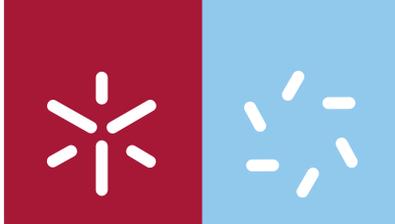




Universidade do Minho
Escola de Ciências

André Filipe Gomes Soares Fontes

**Complexos de Ga (III) de Ligandos
Macro-cíclicos Anfifílicos com Relevância
para Medicina Nuclear**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

André Filipe Gomes Soares Fontes

**Complexos de Ga (III) de Ligandos
Macrocíclicos Anfifílicos com Relevância
para Medicina Nuclear**

Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efectuado sob a orientação do
Doutor João Paulo Rodrigues Fernandes André

Anexo 3

DECLARAÇÃO

Nome

ANDRÉ FILIPE GOMES SOARES FONTES

Endereço electrónico: A.FONTES@HOTMAIL.COM Telefone: 253260925 / 916944204

Número do Bilhete de Identidade: 12993624

Título dissertação /tese

COMPLEXOS DE $Gd(III)$ DE LIGANDOS MACROCÍCLICOS AMPIFÍLICOS
COM RELEVÂNCIA PARA MEDICINA NUCLEAR

Orientador(es):

SJAJ PAUL RODRIGUES FERNANDES ANDRÉ

Ano de conclusão: 2009

Designação do Mestrado ou do Ramo de Conhecimento do Doutoramento:

MESTRADO EM QUÍMICA MEDICINAL

Nos exemplares das teses de doutoramento ou de mestrado ou de outros trabalhos entregues para prestação de provas públicas nas universidades ou outros estabelecimentos de ensino, e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito legal na Biblioteca Nacional e, pelo menos outro para a biblioteca da universidade respectiva, deve constar uma das seguintes declarações:

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.), APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, , MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, 12/10/2009

Assinatura: ANDRÉ FONTES

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, pois trouxeram-me até aqui, dando sempre o seu melhor para me providenciar a melhor vida e educação. É claro, ao meu irmão e à minha irmã, que muito me ensinaram ao longo dos anos.

Um especial agradecimento ao meu orientador, o Dr. João Paulo André, pela confiança depositada em mim, por ter acreditado nas minhas potencialidades, pelo apoio e aprendizagem transmitidos ao longo de todo o projecto.

À Dra. Paula Margarida, pela admirável contribuição prestada, sugestões científicas e auxílio na realização do trabalho.

À Dra. Isabel Prata, pela realização de todos os estudos com isótopos radioactivos no I.C.N.A.S., da universidade de Coimbra.

Ao pessoal do laboratório, passo a citar: o Arsénio, que muito me ajudou no decorrer de todo o trabalho; o Miguel, o meu comparsa nas discussões da “bola”; à Xana, a nossa “mãezinha” sempre bem-disposta e sorridente, à Andreia, pela algazarra que fazíamos no departamento e pelos almoços a ver séries; e ao Hélder, o nosso mais recente doutor, sempre com as suas ideias lunáticas.

Aos meus amigos, pois também fazem parte da minha família. Eles são os pilares que sustentam toda a minha vida, pois sem o seu apoio, companheirismo e diversão a vida tal como eu conheço seria impossível e ao mesmo tempo uma seca. Vocês sabem quem são 😊.

E claro ao Departamento de Química de Universidade do Minho pelas condições de acolhimento proporcionadas, aos seus docentes e funcionários com quem convivi no meu dia-a-dia.

Resumo

Neste trabalho foram sintetizados, purificados e caracterizados três ligandos macrocíclicos anfífilos, o DOTAC6 (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-octanóico-4,7,10-triacético), o DOTAC8 (ácido 1,4,7,10-Tetraazaciclododecano-1-decanóico-4,7,10-triacético) e o DOTAC14 (ácido 1,4,7,10-Tetraazaciclododecano-1-hexadecanóico-4,7,10-triacético). O péptido Gly-Arg-Gly-Asp-Gly (GRGDG) foi sintetizado em fase sólida e conjugado com os referidos ligandos, bem como com o ligando DOTAC4 (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexanóico-4,7,10-triacético), originando os bioconjugados DOTAC4-GRGDG, DOTAC6-GRGDG, DOTAC8-GRGDG e DOTAC14-GRGDG.

A determinação dos valores de LogP (1-octanol/água), permitiu verificar que o complexo Ga(DOTAC14) possui características acentuadamente hidrofóbicas, ao passo que os complexos Ga(DOTAC6) e Ga(DOTAC8) possuem características acentuadamente hidrofílicas.

As características hidrofóbicas do complexo Ga(DOTAC14) são igualmente evidenciadas pelo seu baixo valor de concentração micelar crítica (cmc), valor esse que vai aumentando com a diminuição do número de carbonos da cadeia alquílica dos restantes quelatos (cmc do Ga(DOTAC14) < cmc do Ga(DOTAC8) < cmc do Ga(DOTAC6)).

Os estudos efectuados em soro sanguíneo com o quelato Ga(DOTAC8) permitiram verificar que este tipo de quelatos é cineticamente bastante estável, não se dissociando em condições fisiológicas.

Nos ensaios realizados em ratos Wistar com quelatos marcados com ⁶⁷Ga verificou-se que o carácter apolar do quelato Ga(DOTAC14) leva a uma captação preferencial no fígado, enquanto que o carácter polar do quelato Ga(DOTAC8) conduz a uma captação preferencial nos rins, demonstrando uma rápida eliminação renal. Ambos os quelatos mostram captações significativas noutros tecidos, devido à elevada irrigação sanguínea dos mesmos e são completamente eliminados após 24 horas.

Abstract

In this work three amphiphilic macrocyclic ligands, DOTAC6 (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-octanoic-4,7,10-triacetic acid), DOTAC8 (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-decanoic-4,7,10-triacetic acid), DOTAC14 (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-hexadecanoic-4,7,10-triacetic acid), were synthesized, purified and characterized. The bioconjugates of those ligands with a Gly-Arg-Gly-Asp-Gly (GRGRG) peptide were also synthesized, as well as the DOTAC4 (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-hexanoic-4,7,10-triacetic acid)-GRGDG bioconjugate.

The LogP (1-octanol/water) values, allowed verifying that the Ga(DOTAC14) complex possesses hydrophobic characteristics, and on the other hand the Ga(DOTAC6) and Ga(DOTAC8) complexes possess hydrophilic characteristics.

The hydrophobic characteristics of the Ga(DOTAC14) chelate are also shown in its low critical micellar concentration (cmc) value. The cmc value increases with the decrease of the number of carbon atoms of the alkylic chain (cmc of Ga(DOTAC14) < cmc of Ga(DOTAC8) < cmc of Ga(DOTAC6)).

Kinetic stability studies in serum blood with the complex Ga(DOTAC8) showed that these kind of chelates are very stable, and do not dissociate under physiological conditions.

The studies with the chelates labeled with ⁶⁷Ga in Wistar rats showed that the hydrophobic nature of Ga(DOTAC14) leads to a preferential uptake in the liver, and on the other hand the hydrophilic nature of Ga(DOTAC8) leads to a preferential uptake in the kidneys, consistent with a fast renal clearance. Both chelates show significant uptake in other tissues, due to the high irrigation of those tissues, and they are completely removed from the system 24 hours after injection.

Abreviaturas e símbolos

- AC – Agentes de contraste
- ACN – Acetonitrilo
- AcOH – Ácido acético
- AF – Apolactoferrina
- ANS – Ácido sulfônico-8-anilino-1-naftaleno
- Arg – Arginina
- Asp – Ácido aspártico
- CE – Captura electrónica
- Ci – Curie
- cit – Citrato
- CMC – Concentração micelar crítica
- CT – Tomografia computadorizada
- DCM – Diclorometano
- DDM - Difenildiazometano
- DFO – Desferrioxamina-B
- DIC – *N,N*-diisopropilcarbodiimida
- DLS – *Dynamic light scattering*
- DIPEA – *N,N*-diisopropiletilamina
- DMA – *N,N*-dimetilacetamida
- DMF – *N,N*-dimetilformamida
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DOTA – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
- DOTAC4 - Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexanóico-4,7,10-triacético
- DOTAC6 - Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-octanóico-4,7,10-triacético
- DOTAC8 - Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-decanóico-4,7,10-triacético
- DOTAC14 - Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexadecanóico-4,7,10-triacético
- DOTAGA – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-glutárico-4,7,10-triacético
- DTPA – Ácido dietilenotriaminapentaacético
- EDTA – Ácido etilenodiaminatetraacético

- ESI – *Electrospray ionization* (ionização por electrospray)
- EtOH – Etanol
- eV – Electrão volt
- Fmoc – Fluorenilmetiloxycarbonil
- Gly – Glicina
- HBTU – Uroniuhexafluorofosfato de o-benzotriazola-*N,N,N',N'*-tetrametil
- HOBt – 1-Hidroxibenzotriazol
- HPLC – *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de elevada performance)
- LF – Lactoferrina
- MeOH – Metanol
- MRI – *Magnetic resonance imaging* (imagiologia de ressonância magnética)
- NET – Negro de eriocromo T
- NODAGA – Ácido 1,4,7-tetraazaciclononano-1-glutárico-4,7-diacético
- NOTA – Ácido 1,4,7-triazaciclononano-1-triacético
- Pbf – 5-sulfóxido-2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano
- PEG – Polietilenoglicol
- PET – *Positron emission tomography* (tomografia de emissão de positrões)
- RMN – Ressonância magnética nuclear
- RNA – Ácido ribonucleico
- SPECT – *Single photon emission computed tomography* (tomografia computadorizada de emissão de fóton único)
- t*Bu – *t*-Butilo
- TBTA – *t*-butiltricloroacetimidato
- TF – Transferrina
- TFA – Ácido trifluoracético
- TFE – 2,2,2-trifluoretanol
- TI – Transição isomérica
- TLC – *Thin layer chromatography* (cromatografia em camada fina)
- TNBS – Ácido 2,4,6-Trinitrobenzenosulfónico (TNBS)
- Tyr – Tirosina
- Val – Valina

Índice

1 – Introdução	1
1.1 – O papel biológico dos metais	3
1.2 – Os metais em medicina.....	4
1.3 – Iões metálicos	5
1.3.1 – Gálio.....	5
1.3.1.1 – Propriedades Químicas	5
1.3.1.2 – Comparação com outros metais.....	8
1.3.1.3 – Comportamento <i>in vivo</i>	9
1.3.1.4 – Radioisótopos e usos	11
1.4 – Ligandos: Propriedades físico-químicas e funcionalização.....	15
1.4.1 – Ligandos macrocíclicos	15
1.4.1.1 – DOTA.....	17
1.4.2 – Ligandos anfífilicos.....	19
1.4.3 – Ligandos bifuncionais.....	20
1.4.3.1 – Bioconjugados baseados no DOTA	22
1.4.3.1.1 – Bioconjugados de péptidos RGD.....	24
1.5 – Técnicas de diagnóstico	28
1.5.1 – Tomografia de emissão de positrões (PET).....	28
1.5.2 – Tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT)	32
1.5.3 – Imagem de ressonância magnética (MRI)	33
2 – Objectivos.....	4
3 – Parte Experimental	38
3.1 – Reagentes.....	41
3.2 – Instrumentos.....	41
3.3 – Síntese e purificação.....	42
3.3.1.1 – 2-bromo-hexadecanoato de <i>t</i> -butilo	42
3.3.1.2 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexadecanoato de <i>t</i> -butilo.....	43
3.3.1.3 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexadecanoato de <i>t</i> -butilo-4,7,10-triacetato de <i>t</i> -butilo	44
3.3.1.4 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexadecanóico-4,7,10-triacético	45
3.3.2 – Difenildiazometano (DDM)	46
3.3.3.1 – 2-bromo-hexanoato de benzidrilo.....	47

3.3.3.2 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexanoato de benzidrilo	48
3.3.3.3 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexanoato de benzidrilo-4,7,10-triacetato de <i>n</i> -butilo ..	49
3.3.3.4 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexanóico-4,7,10-triacetato de <i>n</i> -butilo	50
3.3.4.1 – 2-Bromooctanoato de benzidrilo	51
3.3.4.2 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-octanoato de benzidrilo	51
3.3.4.3 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-octanoato de benzidrilo-4,7,10-triacetato de <i>n</i> -butilo ...	52
3.3.4.4 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-octanóico-4,7,10-triacetato de <i>n</i> -butilo	53
3.3.4.5 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-octanóico-4,7,10-triacético.....	54
3.3.5.1 – 2-Bromodecanoato de benzidrilo	54
3.3.5.2 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-decanoato de benzidrilo	55
3.3.5.3 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-decanoato de benzidrilo-4,7,10-triacetato de <i>n</i> -butilo ..	56
3.3.5.4 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-decanóico-4,7,10-triacetato de <i>n</i> -butilo	57
3.3.5.5 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-decanóico-4,7,10-triacético.....	58
3.3.6.1 – 2-bromohexadecanoato de benzidrilo.....	58
3.3.6.2 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexadecanoato de benzidrilo.....	59
3.3.6.3 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexadecanoato de benzidrilo-4,7,10-triacetato de <i>n</i> -butilo	60
3.3.6.4 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexadecanóico-4,7,10-triacetato de <i>n</i> -butilo	61
3.3.7 – Complexação dos ligandos DOTAC6, DOTAC8 e DOTAC14 com Ga(III)	62
3.3.8 – Síntese em fase sólida do péptido Gly-Arg-Gly-Asp-Gly (GRGDG)	63
3.3.9.1,2,3,4 – Acoplamento dos agentes pró-quelantes ao péptido GRGDG	66
3.4 – Titulação dos ligandos.....	71
3.5 – Determinação do cmc	72
3.6 – Determinação dos coeficientes de partição octanol/água (LogP).....	72
3.7 – Estabilidade no soro sanguíneo.....	73
3.8 – Estudos de biodistribuição e imagem cintigráfica.....	73
4 – Resultados	75
4.1 – Determinação do cmc	77
4.2 – Determinação dos coeficientes de partição octanol/água (LogP).....	78
4.3 – Estabilidade no soro sanguíneo.....	78
4.4 – Biodistribuições	79
4.5 – Imagens cintigráficas	80
5 – Discussão	81

5.1 – Síntese dos ligandos e bioconjugados.....	83
5.2 – Determinação do cmc e dos coeficientes de partição octanol/água (LogP)	84
5.3 – Estabilidade no soro sanguíneo.....	85
5.4 – Biodistribuições e imagens cintigráficas.....	86
6 – Conclusão.....	87
Bibliografia.....	91
Anexos	97

1 – Introdução

1.1 – O papel biológico dos metais

A vida no planeta terra foi evoluindo ao longo de milhões de anos baseando o seu desenvolvimento na utilização de carbono e outros elementos tais como o hidrogénio, oxigénio ou azoto. Apesar da crosta terrestre ser rica em metais, como o alumínio (Al_2O_3 15,41%), cálcio (CaO 4,90%) e magnésio (MgO 4,36%), entre outros^[Clarke 1911], os sistemas biológicos possuem apenas uma pequena percentagem de iões metálicos na sua constituição.

O corpo humano possui menos de 1% de metais na sua constituição. Contudo, estes elementos possuem as mais diversas funções e fazem parte da maioria dos processos biológicos. Os metais essenciais aos bio-processos podem ser divididos em duas categorias, os metais fundamentais (*bulk metals*) e os metais vestigiais.

O sódio, o potássio e o cálcio são exemplos de metais fundamentais, onde se pode destacar a importância do sódio e do potássio que são responsáveis pelo balanço de cargas entre os vários meios celulares, transmissão de impulsos eléctricos e regulação da pressão osmótica^[Ronconi 2008], ao passo que o cálcio possui um papel fundamental a nível estrutural na rigidificação dos ossos, bem como no controlo da pressão sanguínea ou acção muscular^[Frausto da Silva 2001].

Quanto ao ferro, magnésio, zinco, cobalto, ou o cobre, estes constituem alguns exemplos de metais vestigiais. O ferro é um dos metais mais importantes a nível biológico pois é responsável pelo transporte de oxigénio no sangue e cerca de 70% deste metal pode ser encontrado na hemoglobina (grupo heme), enquanto os restantes 30% estão armazenados na medula óssea, baço, fígado e músculos^[Ronconi 2008]. O magnésio é um dos iões com maior concentração intracelular (cerca de 30 mM), nomeadamente nos ribossomas e a sua acção é vital na regulação das estruturas de tRNA e rRNA^[Lake 1985], sendo também fundamental como co-factor em muitas enzimas de processamento de RNA e DNA^[Linn 1993]. O zinco possui um papel catalítico, estrutural ou regulador em mais de 200 metaloenzimas, e estima-se que cerca de 3000 proteínas no corpo humano contenham iões zinco como grupo prostético, responsável pela formação dos denominados “dedos de zinco”^[Ronconi 2008]. Por sua vez o cobalto é dos metais com uma das menores abundâncias no corpo humano e só pode ser encontrado na família dos compostos B_{12} , sendo contudo um ião com um papel essencial pois é responsável pela catálise de uma variedade de processos relacionados com os ácidos nucleicos, proteínas e síntese de lípidos bem como a manutenção do normal funcionamento das células nervosas e epiteliais^{[Dolphin}

^{1982]}. Já o cobre pode ser encontrado em algumas proteínas de transporte (ceruloplasmina e cobre-albumina), proteínas de armazenamento (metalotioninas) e em algumas enzimas, tais como a citocromo c oxidase (produção de energia), superóxido dismutase (protecção antioxidante) ou dopamina hidroxilase (formação de colagénio e elastina)^[Ronconi 2008].

Grande parte destes metais (fundamentais e vestigiais), bem como outros metais que não se encontram em sistemas biológicos poderão ter aplicações terapêuticas e no diagnóstico médico pois possuem um comportamento físico e químico variado e podem-se associar com diferentes espécies químicas.

1.2 – Os metais em medicina

O desenvolvimento e uso de compostos contendo metais para o diagnóstico e tratamento médico tem vindo a aumentar ao longo das últimas décadas. O seu uso no tratamento de doenças tem sido documentado ao longo da história da humanidade. Na China antiga eram usadas amálgamas de ouro no tratamento das pessoas nobres e na Europa do século XV e XVI, o mercúrio era usado no tratamento da sífilis. No início do século XX, com o aumento dos meios tecnológicos e do rigor científico, iniciou-se o desenvolvimento racional destes compostos, de onde se pode salientar a utilização de complexos de ouro para o tratamento da artrite reumatóide ou o uso de isótopos radioactivos para o tratamento de doenças tumorais.

Apesar de a maior parte dos fármacos serem compostos orgânicos, existe uma enorme variedade de compostos metálicos a serem usados no tratamento e diagnóstico de patologias, tais como: complexos de platina para quimioterapia, carbonato de lítio para o tratamento de disfunções bipolares, complexos de ouro para o tratamento da artrite reumatóide, citratos de amónio, potássio e bismuto para o tratamento de úlceras gástricas ou como agentes antibacterianos, isótopos radioactivos (ex: ^{99m}Tc ou ⁶⁸Ga) usados em imagiologia médica (SPECT – tomografia computadorizada de emissão de fóton único e PET – tomografia de emissão de positrões) ou complexos de Gd(III) usados como agentes de contraste em imagem de ressonância magnética (MRI).

Devido aos diversos raios iónicos, estados de oxidação, propriedades magnéticas ou aos vários isótopos radioactivos que os diferentes metais podem possuir, estes constituem uma grande oportunidade para o desenvolvimento de novos fármacos. Porém, em muitos casos o seu

desenvolvimento terá que ser acompanhado pela síntese e estudo de agentes quelantes, diminuindo a sua toxicidade e impedindo que *in vivo* estes metais sofram uma alteração do seu estado de oxidação. A vectorização dos quelatos pode também fazer alterar a sua biodistribuição.

Neste trabalho iremos focar-nos em complexos metálicos com potencialidade para serem usados em PET (^{68}Ga) e SPECT (^{67}Ga), contudo os agentes quelantes aqui estudados também poderão ser usados em MRI (Gd(III)).

1.3 – Iões metálicos

1.3.1 – Gálio

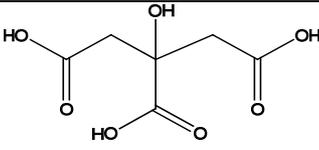
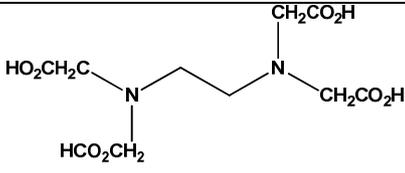
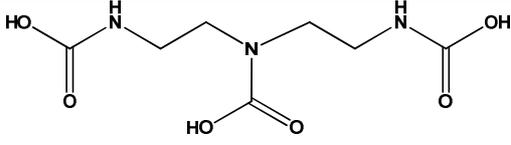
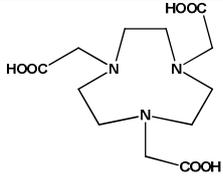
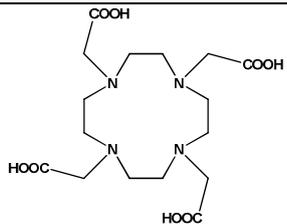
O gálio é um elemento metálico do grupo 13 (IIIA) da tabela periódica, que foi descoberto em 1875 por Lecoq de Boisbaudran. Este elemento é relativamente pouco abundante, constituindo somente 0,0015% da massa da crosta terrestre e pode ser encontrado na natureza associado a metais como o zinco e o germânio.

Não se conhece nenhum papel biológico essencial do gálio, contudo sabe-se que este pode ser absorvido no tracto intestinal e estudos de activação de protões mostraram que este elemento está presente nos tecidos humanos com uma concentração variável entre 10^{-4} e 10^{-3} ppm^[Hayes 1988].

1.3.1.1 – Propriedades Químicas

Em solução aquosa, o gálio encontra-se na forma de ião trivalente (Ga(III)), com uma configuração electrónica $3d^{10}$ ^[Baes 1976]. Segundo a classificação de Pearson^[Pearson 1967], o Ga(III) é um ácido duro e como tal liga-se mais fortemente a bases de Lewis duras, particularmente ao ião hidróxido (OH^-). O ião gálio também tem uma forte tendência para formar quelatos com ligandos com átomos dadores de oxigénio e numa menor extensão com átomos de azoto. Em contraste, este ião metálico forma quelatos pouco estáveis com ligandos macios (com átomos dadores de enxofre ou fósforo). Na tabela 1 mostram-se algumas constantes de estabilidade de quelatos de Ga(III) com diferentes ligandos.

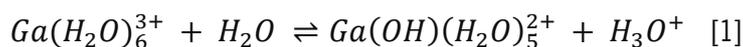
Tabela 1 – Constantes de estabilidade de alguns complexos de Ga(III) a 25°C.

Ligando	Estrutura	logK
Ácido Cítrico		10,02 ^[Martell 1974]
EDTA		21,70 ^[Harris 1976]
DTPA		23,32 ^[Harris 1976]
NOTA		30,98 ^[Clarke 1991(a)]
DOTA		21,33 ^[Clarke 1991(b)]

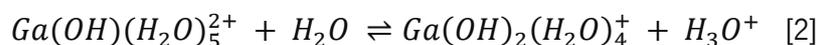
O Ga(III) possui preferencialmente um número de coordenação seis e pode complexar com ligandos tri, tetra, penta, hexacoordenados ou de denticidade superior. Estudos realizados com ligandos tetra, penta e hexadentados do género $N_2S_2O_x$ ($x = 0,1$ ou 2) mostraram que os complexos hexacoordenados são termodinamicamente mais favoráveis do que os tetra ou pentacoordenados^[Sun 1996]. Após a realização de estudos com uma variedade considerável de ligandos, chegou-se à conclusão que nos complexos hexacoordenados, o Ga(III) possui um ambiente octaédrico ou octaédrico distorcido e apresenta uma configuração electrónica d^{10} , proporcionando uma excelente estabilidade termodinâmica a estes quelatos^[Bandoli 2009]. Os complexos com locais de coordenação disponíveis, tais como pentacoordenados (geometria piramidal quadrada e bipiramidal trigonal) ou tetracoordenados (geometria tetraédrica) são mais sensíveis a ataques nucleofílicos, especialmente em meios fisiológicos, devido a razões estereoquímicas e electrónicas^[Bandoli 2009].

Em solução aquosa, o gálio possui uma predisposição para facilmente formar espécies estáveis com o ião hidróxido, numa gama elevada de valores de pH. A pH baixo, o Ga(III) está solvatado com seis moléculas de água (hexa-aqua ião), apresentando uma geometria de coordenação octaédrica. As moléculas de água vão sendo substituídas uma a uma por grupos hidroxilo, libertando-se iões hidrónio. A pH superior a dois forma-se uma fase amorfa, dando origem a precipitados de $Ga(OH)_3$ (Eq. 3.1), enquanto o restante gálio hidrolisa segundo a equação 3.2^[Baes 1976]. Se as soluções ácidas de gálio forem neutralizadas todo o gálio dissolvido vai precipitar sob a forma de $Ga(OH)_3$.

O precipitado de $Ga(OH)_3$ converte-se na fase estável cristalina de $GaO(OH)$, que é menos solúvel em condições neutras do que o $Ga(OH)_3$, mas é solúvel em condições básicas com a formação de $Ga(OH)_4^-$ (ião galato)^[Baes 1976]. A pH 7,4 e 25 °C somente 1 μM de gálio se encontra dissolvido, onde 98,4% do gálio dissolvido se encontra na forma de galato e os restantes 1,6% se encontram na forma hidratada de $Ga(OH)_3$ ^[Baes 1976, Harris 1983].



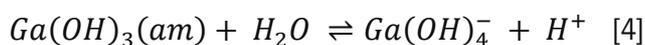
$$\log K_1 = -2,6 \quad [1A]$$



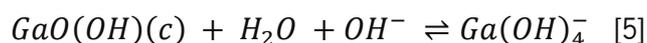
$$\log K_2 = -3,3 \quad [2A]$$



$$\log K_3 = -4,4 \quad [3.2A]$$



$$\log K_4 = -6,3 \quad [4A]$$



$$\log K_4 = 0,33(5) \quad [5A]$$

O $Ga(OH)_3$ e o $GaO(OH)$ evidenciam as propriedades anfotéricas do gálio, proporcionando baixa solubilidade tanto a valores de pH altos e baixos, onde se pode verificar o

mínimo de solubilidade a pH 5,2 ($10^{-7,2}$ M). Mesmo a pH 2, o total de solubilidade do gálio é somente de 10^{-2} M e a pH 10 e de $10^{-3,3}$ M^[Baes 1976]. A baixa solubilidade do gálio em meio aquoso numa grande gama de valores de pH poderá estar relacionada com a sua baixa bio-disponibilidade, aliando-se ao facto deste elemento formar quelatos extremamente insolúveis com fosfatos a pH fisiológico (solubilidade do composto GaPO_4 é de 10^{-21} M)^[Martell 1974].

1.3.1.2 – Comparação com outros metais

Tal como o gálio, o alumínio e o índio situam-se no grupo 13 da tabela periódica e podem encontrar-se muitas semelhanças na química de solução e de coordenação destes três elementos, contudo é com o ferro que a química do gálio é mais semelhante.

A nível biológico, o comportamento destes dois elementos é bastante semelhante, particularmente na ligação a proteínas e outros quelatos, o que pode ser responsável por alguma actividade biológica associada ao gálio. Este elevado grau de semelhança existente no comportamento do Ga(III) e do Fe(III) pode ser atribuído em grande parte às semelhanças encontradas na relação carga/raio, na electronegatividade e nos potenciais de ionização dos dois iões (Tabela 2).

Tabela 2 – Propriedades químicas do Ga(III), Fe(III), Al(III) e In(III).

Parâmetro	Unidade	Ga(III)	Fe(III) Spin Alto	Al(III)	In(III)	Ref.
Raio iónico (octaédrico)	Å	0,620	0,645	0,535	0,800	Shannon 1976
Raio iónico (tetraédrico)	Å	0,47	0,49	0,39	0,62	Shannon 1976
3º potencial de ionização	eV	30,71	30,65	28,45	28,03	Pearson 1988
4º potencial de ionização	eV	64	54,8	119,99	54	Pearson 1988
Dureza absoluta (Pearson)	eV	17	12,08	45,77	13	Pearson 1988
Electronegatividade (Pauling)	Un. Pauling	1,81	1,83	1,61	1,78	Huheey 1993
Energia de dissociação metal-oxigénio	KJ.mol ⁻¹	353,5	390,4	511	320,1	Kerr 1996
Constante formação metal-hidróxido ($K_1 = [\text{MOH}^2]/[\text{M}^{3+}] [\text{OH}]$)	log K_1	11,4	11,81	9,01	10,0	Martell 1974
Tendência para ligação iónica	—	7,69	7,22	10,50	6,30	Hancock 1980

Apesar das inúmeras semelhanças entre o Ga(III) e o Fe(III), existem algumas diferenças relevantes tais como: (a) O Ga(III) é virtualmente não reduzido em condições fisiológicas, ao passo que o Fe(III) pode ser reduzido a Fe(II) e posteriormente reoxidado. O facto do Ga(III) se manter neste estado de oxidação em condições fisiológicas evita que este entre em moléculas como os grupos heme^[Logan 1981] e participe em reacções de oxidação-redução. (b) Em solução aquosa e a pH aproximadamente neutro, o Fe(III) não existe na sua forma livre, pois precipita e polimeriza na forma de FeO(OH) hidratado, limitando a sua solubilidade para apenas 10^{-18} M^[Weiner 1996]. A capacidade que o gálio tem em ser solúvel em pequenas quantidades no plasma (na forma de galato) pode permitir o transporte e consequentes reacções químicas, que não são possíveis para o Fe(III) que apenas existe no plasma ligado a proteínas ou a outros quelatos^[Weiner 1996].

1.3.1.3 – Comportamento *in vivo*

O sangue contém centenas de compostos dissolvidos incluindo proteínas, pequenas moléculas, complexos aniónicos e iões metálicos. Estudos com ⁶⁷Ga mostraram que praticamente todo o gálio no sangue se encontra no plasma, com alguns vestígios nos leucócitos^[Clausen 1974]. Esses mesmos estudos mostraram que no plasma, o gálio se liga à proteína do transporte de ferro, a transferrina (TF).

A transferrina é uma proteína com cerca de 79 KDa, que possui dois domínios homólogos, onde cada domínio pode ligar independentemente um ião Fe(III) ou Ga(III) juntamente com um ião carbonato ou bicarbonato^[Brittenham 1991]. A quantidade total de TF nos humanos é de aproximadamente 240 mg.Kg⁻¹ e a capacidade de ligação do ferro à TF é de aproximadamente 3,3 µg.ml⁻¹, denotando que só cerca de 33% dos locais de ligação da TF estão simultaneamente ocupados por ferro^[Brittenham 1991].

A transferrina transporta o metal para o interior das células através de um mecanismo mediado por um receptor de TF. Este receptor pode ligar duas moléculas de TF e liga-se mais fortemente à TF diférrica do que à TF monoférrica, e possui uma menor afinidade para a apotransferrina. O complexo formado aquando do acoplamento da transferrina ao receptor é transportado para dentro da célula por endocitose, o endossoma formado é então acidificado e o metal liberta-se (ocorre a pH inferior a 5,5), sendo a TF e o receptor de TF reutilizados^[Brittenham 1991].

Todas as células do corpo que possuem núcleo expressam receptores de TF, mas é nos hepatócitos, células de Kupffer, células da placenta, epiderme basal, pâncreas endócrino e epitélio mucosal que a sua concentração é mais elevada^[Gatter1983, Huebers 1987]. As células malignas normalmente também expressam uma quantidade enorme de receptores de TF, devido à elevada necessidade de ferro consequente do seu rápido metabolismo^[Gatter1983, Huebers 1987].

As constantes de estabilidade dos complexos Fe-TF, $\log K_1 = 22,8$ e $\log K_2 = 21,5$ são elevadas. Se tivermos em conta as constantes de estabilidade dos complexos de gálio com a TF verificamos que este ião também se liga com bastante estabilidade à proteína, visto as suas constantes de formação serem $\log K_1 = 20,3$ e $\log K_2 = 19,3$ com concentrações normais de bicarbonato no plasma^[Harris 1983]. Apesar da afinidade da transferrina para Fe(III) ser 400 vezes superior do que a afinidade para o Ga(III), a substituição do gálio por ferro mostrou ser bastante lenta, com um $t_{1/2}$ de 4,3 horas a 310 K, o que reflecte a elevada quantidade de energia necessária para “abrir” os locais de ligação da TF quando estes estão ocupados^[Kubal 1983].

Se compararmos os valores das constantes de estabilidade a pH fisiológico dos complexos de Ga-TF com os valores das constantes de estabilidade de complexos de gálio com ligandos mais pequenos, como o citrato ($\log K = 10,02$) ou o EDTA ($\log K = 21,70$) pode-se compreender a razão pela qual praticamente todo o gálio no plasma se encontra ligado à TF.

Além da ligação à transferrina, o gálio também se pode ligar a outras proteínas responsáveis pelo transporte de ferro, tais como: (a) a lactoferrina (LF), que possui actividade anti-microbiana^[Lonnerdal 1995] e pode remover o gálio da transferrina. A LF, tal como a TF, também possui dois locais de ligação e pode complexar Ga(III) com maior estabilidade que a TF ($\log K_1 = 21,43$ e $\log K_2 = 20,57$)^[Harris 1986]; (b) a apolactoferrina (AF), responsável por actividade anti-bacteriana e que está concentrada em muitas células epiteliais responsáveis por secreção de fluidos (ex: lágrimas ou fluidos nasais) com uma concentração típica de 0,5 a 1,0 mg.ml⁻¹^[Larson 1971]; ou (c) a ferritina, responsável pelo armazenamento de ferro e que se encontra principalmente nas células de Kupffer do fígado. Esta proteína é bastante grande e redonda (450 KDa) e pode armazenar até 4500 iões Fe(III)^[Brittenham 1991] sob a forma de óxido/hidróxido de ferro hidratado^[Crichton 1987].

1.3.1.4 – Radioisótopos e usos

O gálio possui dois isótopos naturais, o ^{69}Ga (60,5%) e o ^{71}Ga (39,5%) e 32 nuclídeos radioactivos. A tabela 3 mostra alguns dos isótopos radioactivos do gálio mais comuns e mais usados em medicina e ciência.

Tabela 3 – Exemplo de alguns isótopos radioactivos do gálio.

Isótopo	Tempo de meia-vida	Tipo de decaimento
^{61}Ga	0,15 s	EC (100%)
^{62}Ga	116,12 ms	EC (100%)
^{63}Ga	32,4 s	EC (100%)
^{64}Ga	2,627 min	EC (100%)
^{65}Ga	15,2 min	EC (100%)
^{66}Ga	9,45 h	EC (100%)
^{67}Ga	3,2616 d	EC (100%)
^{68}Ga	67,61 min	β^+ (89%), EC (11%)
^{70}Ga	21,14 min	β^- (99,59%); EC (0,41%)
^{72}Ga	14,10 h	β^- (100%)
^{73}Ga	4,86 h	β^- (100%)
^{74}Ga	8,12 min	β^- (100%)
^{m74}Ga	9,5 s	β^- ($\leq 50\%$); IT (75%)
^{75}Ga	126 s	β^- (100%)

Nota: EC = Captura electrónica, β^+ = Emissão de positrão, β^- = Emissão de electrão, IT = Transição Isomérica.

Adaptado de National Nuclear Data Center, Estados Unidos da América.

Após ter sido usado pela primeira vez em 1931 no tratamento da sífilis em coelhos^[Levaditi 1931], o Ga(III) tem mostrado actividade biológica e utilidade no tratamento de algumas patologias, aproveitando o facto de este não possuir a capacidade de inibir a reabsorção de cálcio por parte dos ossos^[Warrell 1989]. Este elemento é um efectivo supressor de reabsorção de cálcio por parte dos ossos e tem sido usado no tratamento de alguns tumores ósseos, hipercalcemia^[Warrell 1989], e doença de Paget^[Bockman 1989]. O gálio também tem mostrado eficiência clínica na supressão da osteólise e dor dos ossos associada a múltiplos mielomas e metástases^[Warrell 1987] e tem sido sugerido para o tratamento da osteoporose^[Warrell 1995]. Apesar da sua possível aplicação em tratamentos medicinais, o desenvolvimento e uso de gálio nos últimos anos tem-se centrado no diagnóstico médico, em medicina nuclear. Na década de 50 do século XX, o ^{72}Ga foi o primeiro radioisótopo de gálio a ser

usado na visualização e tratamento de metástases, nomeadamente no cancro ósseo^[Brunner 1953] e na década de 60 foi usado em imagiologia do cancro do pulmão; leucemia ou melanomas malignos^[Edwards 1969].

Existem vários isótopos com propriedades físicas adequadas para serem usadas em imagiologia, embora o ^{67}Ga e o ^{68}Ga tenham merecido uma maior atenção como agentes para diagnóstico. Ambos os isótopos possuem características apropriadas para uso medicinal, tais como: tempos de meia vida ($t_{1/2}$) convenientes para uso médico, isto é, suficientemente longos para se realizar o exame, mas suficientemente curtos para evitar problemas relacionados com o excesso de radioactividade. Apesar de o ^{67}Ga ser produzido em ciclotrão (possui a desvantagem de deslocação), o que torna a sua disponibilidade mais reduzida, este tem sido usado na detecção de lesões inflamatórias e de tumores em tecidos macios. O ^{68}Ga pode ser encarado como um isótopo mais promissor, pois este pode ser produzido num gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$; o longo tempo de vida do nuclídeo parente ^{68}Ge ($t_{1/2} = 270,95$ dias) permite o uso do gerador durante um a três anos, o que torna o uso do ^{68}Ga economicamente atractivo^[Kim 2007, Sandler 2003]. As diferenças entre as propriedades químicas entre o Ge(IV) e o Ga(III) permitem separar os dois iões de uma forma eficaz, evitando contaminações indesejáveis. Nos primeiros geradores, o $^{68}\text{Ga(III)}$ era purificado através de colunas com matrizes de Al_2O_3 e ZrO_2 ^[Greene 1961], sendo as colunas de ^{68}Ge eluídas com EDTA (5 mM), formando o complexo $^{68}\text{Ga(EDTA)}$, as quais foram posteriormente substituídas por matrizes de Sb_2O_5 , sendo eluídas com uma solução de EDTA e oxalato de sódio^[Ariño 1978]. Estes métodos, apesar da sua eficiência, possuíam a desvantagem de formar o complexo $^{68}\text{Ga(EDTA)}$, que ainda necessita ser dissociado antes de ser usado na síntese do radiofármaco final. Após vários anos de desenvolvimento, o gerador baseado em TiO_2 tornou-se comercialmente disponível (Cyclotron Co., Obninsk, Rússia) e é usado em todo o mundo com bastante sucesso. Este gerador produz ^{68}Ga com um rendimento na ordem dos 60% em 5 ml de HCl (0,1 M) no primeiro ano de utilização, decrescendo até aos 25% depois de 3 anos de utilização ou 200 eluições. Apesar de cerca de 50 centros em toda a Europa usarem este gerador, o elevado volume de HCl usado produz algumas impurezas tais como Zn(II), resultante do decaimento do ^{68}Ga , bem como o próprio titânio da coluna (Ti(IV)) e ainda Fe(III).

Apesar de o ^{68}Ga ser economicamente viável, possuir características atraentes e ser disponível através dos geradores, o seu uso em medicina como agente para tecidos específicos é bastante recente. Tirando partido da semelhança química entre os elementos do grupo 13 gálio e índio, têm sido desenhados e testados uma variedade de ligandos polidentados tendo em vista

a sua aplicação com gálio radioactivo. Existem dois requisitos fundamentais para se usar Ga(III) em complexos radiofarmacêuticos: ser estável à hidrólise, de modo a evitar a formação de hidróxidos ($[M(OH)_3]$) insolúveis; e inércia cinética na troca do metal entre o complexo e a transferrina, visto esta proteína se encontrar em grande concentração no plasma sanguíneo e o seus complexos com o Ga(III) possuírem elevadas constantes de estabilidade. De modo a providenciar uma plataforma sustentável para o desenvolvimento de novos agentes de contraste, têm sido realizados vários estudos de estabilidade termodinâmica do Ga(III) em complexos contendo ligandos poliaminopolicarboxilatos, hidroxiaromáticos e amino-tiol.

Uma das primeiras moléculas de pequenas dimensões a serem testadas na complexação do ^{67}Ga foi o ião tridentado citrato, para visualização de metástases. Como na maior parte dos casos envolvendo pequenos ligandos com uma denticidade inferior a seis, o complexo $[\text{Ga}(\text{cit})_2]^{3-}$ é pouco estável e a transmetalção do Ga(III) para a transferrina dá-se com relativa facilidade. Assim, o ião metálico acumula-se principalmente nos locais onde a concentração de ferro é maior, tais como: fígado, baço, rins, tumores de tecidos macios e lesões.

A facilidade com que o gálio pode ser captado pela transferrina e outras proteínas do sangue humano (ex: lactoferrina ou ferritina) ou ainda o facto de estas proteínas proporcionarem as reacções de transmetalção dos complexos de Ga(III), resultando em complexos Ga-proteína bastante estáveis, implica o uso de ligandos de denticidade elevada, visto formarem os complexos mais estáveis. O complexo formado por Ga(III) e DTPA, ligando do tipo N_3O_3 (Figura 1), possui elevada estabilidade e resistência à transmetalção, proporcionando um agente do tipo *blood pool*. Apesar de serem insolúveis em água, os complexos formados com oxinas mostraram possuir a capacidade de atravessar membranas devido à sua lipofilicidade e têm sido usados na marcação de hematócitos e leucócitos^[Jarrison 1993].

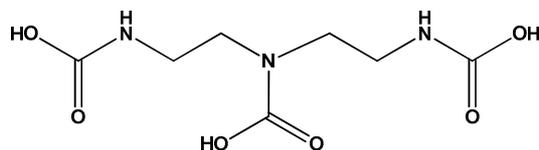


Figura 1 – DTPA, ligando do tipo N_3O_3 de cadeia aberta.

Embora alguns ligandos formem complexos termodinamicamente pouco estáveis, estes podem ser úteis a nível medicinal, pois proporcionam complexos do radioisótopo com uma inércia cinética tal que a velocidade de troca com a transferrina se torna muito lenta. Os ligandos

hexadentados do tipo N_2O_4 (Figura 2) são exemplos de moléculas capazes de complexar íons tripositivos (Ga ou Fe), podendo ser selectivos relativamente aos íons Ga(III) e In(III) e formando quelatos inertes^[Clarke 1991 (b)].

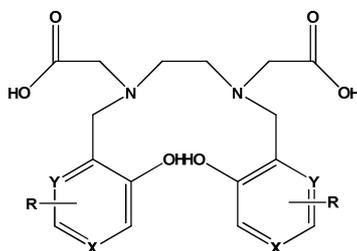


Figura 2 – Ligandos do tipo N_2O_4 , onde X e Y = N ou CH, e R = substituintes vários.

A estabilidade termodinâmica e cinética pode ser aumentada significativamente recorrendo ao efeito macrocíclico proporcionado por alguns ligandos do tipo N_3X_3 e N_4X_4 (Figura 3). Este tipo de ligandos pode encapsular vários tipos de metais, em particular os íons Ga(III), e formar complexos bastante estáveis do ponto de vista cinético e termodinâmico, pois o metal é isolado de moléculas competidoras existentes no meio. Dois exemplos destes ligandos macrocíclicos que têm sido amplamente estudados e servido de base de estudo para o desenvolvimento de novos agentes radiofarmacêuticos são o NOTA (N_3X_3 , X = COOH) e o DOTA (N_4X_4 , X = COOH). Os complexos resultantes destes ligandos com o Ga(III) possuem elevadas constantes de estabilidade ($\log_{\text{NOTA}} K = 30,98$ ^[Clarke 1991 (a)], $\log_{\text{DOTA}} K = 21,33$ ^[Clarke 1991 (b)]). Apesar do NOTA proporcionar um quelato de Ga(III) mais estável, o DOTA torna-se mais atraente visto possuir dois braços carboxílicos não complexados com o íon metálico, os quais podem ser usados para derivatizar a molécula, além de possuir uma cinética de complexação mais rápida que o NOTA.

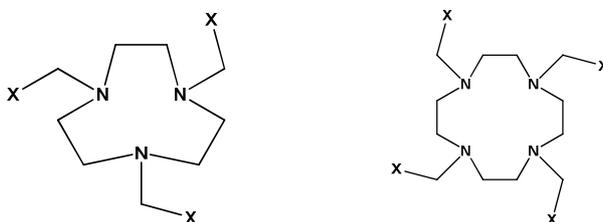


Figura 3 – Ligandos macrocíclicos do tipo N_3X_3 e N_4X_4 , onde X = CO_2H , PO_3H ou CH_2SH .

1.4 – Ligandos: Propriedades físico-químicas e funcionalização

Após a descoberta das propriedades anti-tumorais da cisplatina na década de 60 do século XX, o uso de metais em medicina tem progredido a um ritmo acelerado. Devido à enorme variedade de metais existentes, e dos seus isótopos com diferentes características físicas desenvolveu-se um esforço de modo a sintetizar radiofármacos para diagnóstico e terapia, com base nas propriedades emissoras dos metais radioactivos. Como foi referido anteriormente, um dos problemas principais associado ao uso destes metais reside na sua toxicidade *in vivo* quando se encontram no estado livre. Contudo, o facto de a maior parte dos quelatos não serem bioespecíficos para os tecidos levou a um desenvolvimento de bioconjugados com radioisótopos específicos para um determinado órgão, conjugados esses que incluem anti-corpos monoclonais que podem ligar-se a anti-genes tumorais^[McMurry 1992] ou resíduos peptídicos que se podem ligar a receptores celulares^[León-Rodríguez 2008].

1.4.1 – Ligandos macrocíclicos

Os compostos macrocíclicos têm sido alvo de estudo ao longo das últimas décadas devido à sua semelhança e relação com compostos naturais que se encontram em sistemas biológicos, como os grupos heme dos hematócitos, os citocromos ou as porfirinas existentes nos sistemas de fotossíntese. Apesar do interesse que suscitaram e das possíveis aplicações que estes podem possuir, até aos anos 60 do século XX existia pouca informação sobre estes compostos, devido principalmente à dificuldade em isolá-los ou em alternativa sintetizá-los. Um composto macrocíclico pode ser definido como um composto cíclico com nove ou mais membros e com três ou mais átomos dadores^[Melson 1979]. Actualmente podem-se sintetizar de uma forma relativamente simples ou encontrar comercialmente uma gama variada destes compostos, com as mais diversas propriedades, onde pode variar o número e o tipo de átomos dadores, a solubilidade, a especificidade para um dado metal.

O efeito de quelato é conhecido na química de coordenação por aumentar a estabilidade dos complexos, isto é, quando um ligando (L) complexa um metal (M^{n+}) o complexo resultante terá uma estabilidade tanto maior quanto maior o número de anéis, principalmente de cinco e/ou seis membros, formados entre o metal e o ligando^[Huheey 1983]. O aumento da entropia proporcionado pelo maior número de anéis de quelato e os ângulos de ligação oferecidos pelos

anéis de cinco ou seis membros, mais favoráveis em termos de tensão angular, podem explicar o aumento da estabilidade dos quelatos. Contudo, a diferença entre as constantes de estabilidade de ligandos semelhantes de cadeia aberta e fechada não pode ser explicada somente pelo efeito de quelato. Cabbiness e Margerum^[Cabbiness 1969] usaram ligandos análogos de cadeia aberta (2,3,2-tet) e de cadeia fechada (tet a) (Figura 4) nos seus estudos com Cu(II). Verificaram que o complexo cíclico de cobre era cerca de 10^4 vezes mais estável que o complexo acíclico e chegaram à conclusão que o grande aumento da estabilidade não se poderia atribuir ao efeito de quelato (factor entrópico dominante), pois ambos os complexos possuíam o mesmo número e tipo de ligações. Este efeito foi denominado *efeito macrocíclico*.

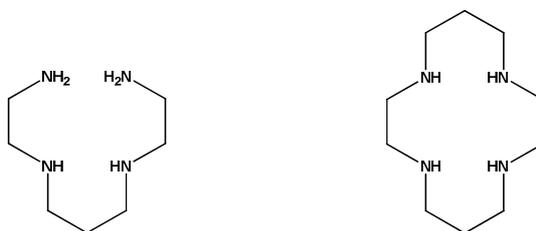


Figura 4 – Ligandos 2,3,2-tet e tet a respectivamente.

Actualmente ainda existe alguma controvérsia em torno da verdadeira natureza do efeito macrocíclico. É normalmente aceite que a conjugação de efeitos entálpicos e entrópicos esteja na base deste efeito, bem como uma maior sobreposição orbital entre o metal e o átomo dador no caso dos macrociclos. Contudo, alguns membros na comunidade científica defendem que o efeito entálpico é o principal contribuinte para a explicação deste fenómeno.

Como os ligandos macrociclos possuem uma geometria mais ou menos rígida e pré-organizada, estes possuem estruturas mais semelhantes aquelas que serão as estruturas dos complexos, logo não é necessário uma variação tão drástica das conformações do ligando para que se dê a complexação. Assim a variação entálpica associada ao fenómeno da complexação será menor no caso dos ligandos macrocíclicos.

Além da pré-organização dos ligandos cíclicos, o facto de estes possuírem um menor número de ligações inter-moleculares com o solvente (regra geral é a água) do que os ligandos acíclicos, permite que a dessolvatação do ligando cíclico se dê com um menor gasto energético. Assim, a pobre solvatação dos átomos dadores nas cavidades restritas dos ligandos macrocíclicos livres facilita a complexação dos metais^[Cabbiness 1969].

Apesar dos ligandos macrocíclicos serem pouco flexíveis, estes podem impor uma geometria de coordenação específica ao metal ao passo que os ligandos de cadeia aberta podem facilmente adaptar-se aos requisitos geométricos do metal. A estabilidade termodinâmica e a cinética de formação de complexos pode ser afectada por vários factores: as dimensões do metal e da cavidade do anel; a localização geométrica dos locais ligantes; o tipo de solvente e o grau de solvatação do metal e do ligando; o número e o tipo de átomos dadores do ligando; a existência de impedimento estereoquímico no macrociclo; a flexibilidade do macrociclo; a carga eléctrica do metal e do ligando; entre outros.

Actualmente os ligandos macrocíclicos e os seus complexos possuem uma variedade de aplicações nas mais diversas áreas. A área medicinal é uma daquelas em que estes compostos possuem mais aplicações, onde se pode salientar o uso de ligandos em quelatoterapia. Por sua vez, estes também podem ser usados na complexação de radioisótopos usados no tratamento e diagnóstico de patologias ou ainda na complexação de agentes de relaxação (Gd(III) ou Dy(III)) usados em imagiologia de ressonância magnética. O uso dos quelatos macrocíclicos também se estende a áreas como a electroquímica, onde podem ser usados como agentes fotoquímicos capazes de transformar energia solar em outras formas úteis de energia [Kumar 2006, Park 2008]; ou na área da bioquímica, onde podem ser usados como parte estrutural de metaloenzimas, necessárias à compreensão de certos sistemas biológicos.

1.4.1.1 – DOTA

O DOTA tem sido um dos ligandos macrocíclicos mais estudados ao longo das últimas décadas. Em 1984 apareceu na literatura científica o primeiro relato de uma estrutura cristalina de um quelato de Eu(III) [Spirlet 1984]. O trabalho realizado em torno deste ligando e dos seus complexos levou à sua aplicação, nomeadamente na imagiologia em diagnóstico médico. Este agente quelante é capaz de formar complexos com uma elevada estabilidade termodinâmica e inércia cinética em condições fisiológicas. Sendo um ligando poliaminopolicarboxilato do tipo N_4O_4 , o DOTA pode complexar uma enorme variedade de iões metálicos, originando complexos com as mais diversas geometrias (Tabela 4).

Tabela 4 – Dados cristalográficos e estruturais de alguns quelatos de DOTA.

Metal	Sistema Cristalográfico	Raio Iónico (Å)	Nº Coordenação	Geometria	Átomos dadores	Ref.
Ga(III)	Monoclínico	0,620	6	Octaédrica	N ₄ O ₂	Viola 2006
Fe(III)	Ortorrômbico	0,645	7	—	N ₄ O ₃	Chang 1993
Sc(III)	Tetragonal	0,745	8	Prismática quadrada	N ₄ O ₄	Benetollo 2003
Gd(III)	Triclínico	0,938	9	Antiprismática quadrada	N ₄ O ₄	Chang 1993

Como foi referido, o DOTA proporciona quelatos bastante estáveis do ponto de vista cinético e termodinâmico devido em grande parte ao efeito macrocíclico. Contudo, o número de ligações, os comprimentos e os ângulos de ligação obtidos para os diferentes complexos podem explicar algumas diferenças existentes no valor das constantes de estabilidade (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de constante de estabilidade, comprimento de ligação, ângulo de ligação e distância entre M e plano N₄ de alguns quelatos de DOTA.

Metal	logK	Comp. lig. médio M-N _{EQ.} (Å)	Ângulo M-O	Dist. entre M e plano N ₄ (Å)
Fe(III)	29,40 ^[Clarke 1991 (b)] ; 24,48 ^[Chaves 1992]	2,280	2,050	1,058
Cu(II)	22,72 ^[Clarke 1991 (c)] ; 22,25 ^[Clarke 1991 (b)]	2,107	1,966	0,916
Ga(III)	21,33 ^[Clarke 1991 (b)]	2,112	1,934	0,840
Co(II)	19,30 ^[Clarke 1991 (c)] ; 20,27 ^[Chaves 1992]	2,166	2,034	0,888
Zn(II)	18,70 ^[Clarke 1991 (c)] ; 21,10 ^[Chaves 1992]	2,171	2,037	0,891

A partir da tabela 5 pode-se verificar que a ordem de estabilidade termodinâmica é: Fe(III)>Cu(II)>Ga(III)>Co(II). O complexo de ferro é aquele com maior estabilidade devido aos três carboxilatos usados na complexação, ao contrário dos restantes que só complexam com dois carboxilatos. O complexo de ferro é também aquele que apresenta uma maior distância entre o metal e o azoto equatorial, provavelmente por ser um ácido duro e preferir a complexação com os átomos de oxigénio.

Os restantes complexos são hexacoordenados, e possuem geometria octaédrica. Se compararmos as distâncias entre o metal e os átomos dadores ocupando o plano equatorial do complexo de Cu(II) com a dos restantes complexos pode-se verificar que as distâncias são mais pequenas, resultando numa interacção electrostática maior o que leva a uma constante de estabilidade também maior. Por sua vez, o complexo de Zn(II) é o menos estável devido à

configuração electrónica d^{10} , isto, é, a configuração electrónica d^{10} impede que o zinco aceite transferências de carga de átomos dadores, diminuindo a estabilidade dos seus complexos.

1.4.2 – Ligandos anfífilicos

Ao longo das últimas décadas os compostos anfífilicos têm despertado bastante interesse na comunidade científica. Estes compostos são estruturalmente constituídos por duas partes com características antagónicas, isto é, possuem uma parte polar (hidrofílica) e uma parte apolar (hidrofóbica). Devido a esta característica, estes compostos possuem uma solubilidade numa variedade de solventes, visto poderem associar-se em micelas, onde a parte da molécula com hidrofílicidade semelhante ao solvente está virada para o exterior da micela, ao passo que a outra parte se encontra orientada para o interior da micela (Figura 5). Em alguns casos, devido ao tamanho e ao arranjo estrutural destes compostos, eles podem agrupar-se de forma a constituírem lipossomas ou emulsões capazes de encapsularem outras moléculas no seu interior.

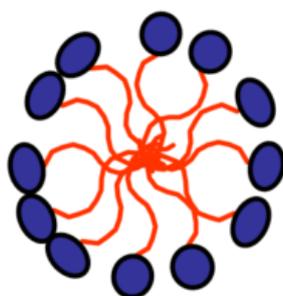


Figura 5 – Estrutura genérica de uma micela em solução aquosa.

Em particular, as metalomicelas têm sido alvo de alguma atenção pois estes compostos são responsáveis por vários processos de oxidação-redução em sistemas biológicos e já foram documentados casos de compostos promissores para actuarem como agentes antelmínticos^[Behm 1993], antiparasíticos^[Behm 1995] e antibióticos^[Ghirlanda 1998].

A possível utilização deste tipo de compostos no campo da imagiologia de ressonância magnética tem também sido bastante investigada^[André 1999, Torres 2008]. A maioria dos agentes de contraste para MRI que são sintetizados de modo a possuírem elevadas relaxividades baseiam-se em complexos macromoleculares de Gd(III). Este aumento da relaxividade deve-se aos elevados tempos de correlação rotacional (τ_R) dos complexos^[Geraldes 1987] organizados em micelas. Uma das

estratégias utilizadas para aumentar o τ_r do agente de contraste consiste no desenho de ligandos com longas cadeias alquílicas, proporcionando ao quelato resultante propriedades anfífilas^[André 1999, Torres 2008]. Esses quelatos poderão agregar-se em meio aquoso, resultando em micelas com uma velocidade de rotação mais baixa quando comparada com o complexo monomérico.

A introdução de longas cadeias alquílicas em ligandos como o DTPA ou o DOTA representa uma estratégia simples e prática para influenciar a relaxividade dos seus quelatos de íons metálicos paramagnéticos. Contudo, a formação de agregados micelares irá alterar a biodistribuição no meio fisiológico, devendo-se essa alteração ao tamanho e capacidade de interação desses agregados com as diferentes moléculas do meio.

Uma das consequências resultantes da micelização deste tipo de compostos consiste na captação destes por parte das células de Kupffer. Estas células são macrófagos residentes principalmente no fígado e no baço, representando um papel importante na normal fisiologia e funcionamento do fígado e baço, bem como na participação da resposta aguda e crónica do fígado a compostos tóxicos^[Roberts 2007]. A activação das células de Kupffer pode ser feita directa ou indirectamente por compostos tóxicos, resultando na libertação de uma grande quantidade de mediadores inflamatórios, factores de crescimento e espécies reactivas de oxigénio (originam radicais livres), podendo estes macrófagos actuar como alvo principal dos sinais tóxicos, bem como um auxiliar na resposta do fígado aos sinais tóxicos recebidos pelos hepatócitos. Devido ao seu potencial de rápida resposta à presença de compostos tóxicos, as células de Kupffer tornam-se alvos preferenciais de macromoléculas (ex: micelas) estranhas ao organismo, dando origem a uma resposta de eliminação.

1.4.3 – Ligandos bifuncionais

Os ligandos bifuncionais são moléculas orgânicas capazes de complexar eficientemente um determinado metal, possuindo ao mesmo tempo um grupo funcional capaz de ligar covalentemente a biomoléculas (ex: péptidos ou anti-corpos), dando ao quelato resultante a capacidade de ser reconhecido por um determinado tecido ou órgão específico (Figura 6). Estes ligandos devem possuir o número de átomos dadores e braços pendentos necessários a um processo de quelatação e conjugação eficaz, tendo sido desenvolvidos e testados um número diversificado de ligandos macrocíclicos com vários grupos funcionais.

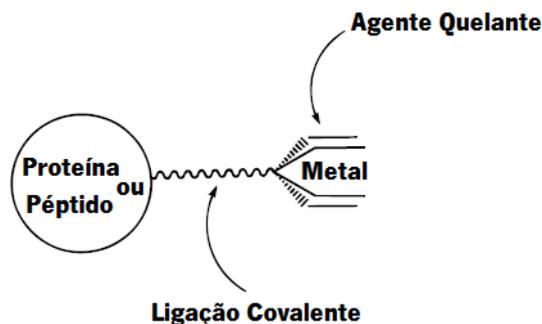


Figura 6 – Exemplo esquemático de um complexo de ligando bifuncional.

A escolha do agente quelante bifuncional deve ser feita criteriosamente, atendendo a aspectos como: (I) ser capaz de complexar o metal rapidamente mesmo estando ligado a uma macromolécula; (II) o quelato deve ser inerte no intervalo de pH entre 4-8, evitando a transmetalção; (III) o quelato deve ser termodinamicamente estável. Desta forma evita-se a complexação de outros metais que se encontram no sangue (Fe(III), Mg(II), Ca(II)).

Uma das primeiras moléculas a serem usadas na complexação de Ga(III) foi a desferrioxamina-B (DFO) (Figura 7), visto possuir uma elevada afinidade para o Fe(III) e ser usada no tratamento da talassemia^[Anderegg 1963, Moeschlin 1963]. Este agente quelante pode complexar rapidamente o Ga(III) através dos seus três grupos hidroxamato e ainda possui um grupo NH₂ capaz de ligar pequenas biomoléculas, como o folato^[Mathias 1996] ou o péptido octreótido derivado da somatostatina^[Smith-Jones 1994, Stolz 1994].

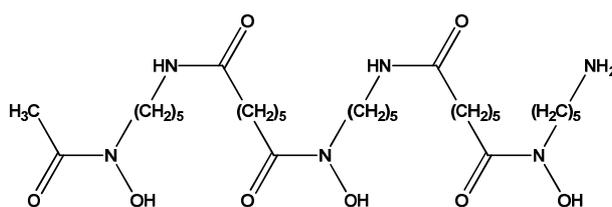


Figura 7 – Estrutura da Desferrioxamina-B.

Entre os agentes quelantes macrocíclicos, os ligandos triaza proporcionam uma boa selectividade para os iões gálio devido ao seu tamanho e conformação. Este tipo de ligandos, em especial aqueles que possuem três braços carboxilato pendentos (NOTA) forma complexos electricamente neutros que são menos sensíveis à dissociação promovida por protonação dos braços pendentos do que os complexos aniônicos. O NODAGA (Figura 8) é um bom exemplo de um ligando bifuncional capaz de formar complexos com Ga(III), em que a dissociação do

complexo promovida por catálise ácida só se verifica a valores de pH suficientemente diferentes do valor fisiológico.

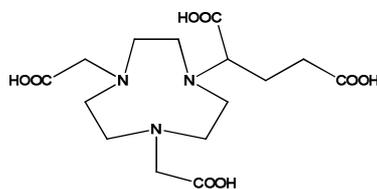


Figura 8 – Estrutura do ligando NODAGA.

Este ligando possui um carboxilato extra em relação ao NOTA capaz de se ligar a biomoléculas, dando origem a agentes com afinidade tumoral, como o NODAGA-Tyr3-Octreótido (NODAGA-TOC) (Figura 9)^[Eisenwiener 2002].

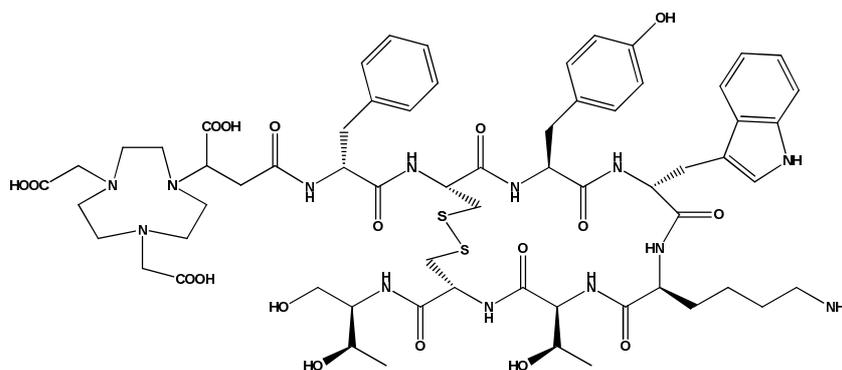


Figura 9 – Estrutura do ligando NODAGA-TOC.

1.4.3.1 – Bioconjugados baseados no DOTA

Após o aparecimento de um dos primeiros agentes de contraste usados em imagiologia por ressonância magnética, o Gd(DOTA) (DOTAREM®), o ligando DOTA tem sido usado extensivamente na tentativa de produzir novos quelatos para aplicação nas várias técnicas de diagnóstico médico. Este ligando é usado favoravelmente em imagiologia nuclear devido à sua compatibilidade com uma variedade de radiometais e às elevadas estabilidades dos seus complexos^[Loncin 1986, Cachetis 1987, Kumar 1989], bem como às propriedades favoráveis de eliminação dos complexos *in vivo*^[Byegard 1999].

O ligando DOTA tem sido conjugado com uma variedade enorme de biomoléculas tais como péptidos, proteínas, anticorpos ou oligonucleótidos, de forma a criar novos bioconjugados

com interesse médico. O derivado DOTA-TOC (Figura 10), tem mostrado resultados clínicos bastante promissores, quando complexado com ^{67}Ga e ^{68}Ga . Neste caso o resíduo peptídico [Tyr³]-octreótido foi conjugado com o DOTA, de modo a criar uma espécie química capaz de se ligar com bastante afinidade aos receptores de somatostatina, em particular para os receptores de somatostatina do subtipo 2, que são sobre-expressos em tumores neuroendócrinos, do pulmão, da mama e nalguns casos do sistema nervoso^[Maecke 2005].

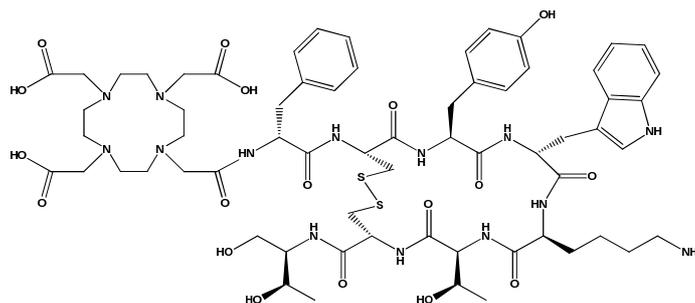


Figura 10 – Estrutura do conjugado DOTA-TOC.

A localização específica dos agentes radiofarmacêuticos conjugados com anticorpos para marcar tumores é outra possibilidade no diagnóstico em imagiologia nuclear^[Schubiger 1996]. Contudo, o uso dos anticorpos intactos possui algumas desvantagens indesejadas *in vivo*, tais como um tempo de vida prolongado e uma lenta remoção do sangue. Por outro lado, os fragmentos de anticorpo gerados enzimaticamente mostram uma maior captação nos alvos celulares desejados, mais especificidade e uma cinética de remoção mais rápida. Até à data, foram conjugados vários fragmentos de anticorpos com o DOTA, tais como o fragmento F(ab')_2 da herceptina^[Smith-Jones 2006], fragmento anti-carcinoembrionário antigene (CEA), denominado cT84.66^[Lewis 1994]; ou ainda os fragmentos de anticorpo das moléculas de adesão celular (CAM). Neste caso, o fragmento chCE7F(ab')₂ foi conjugado com dois derivados diferentes do DOTA, o NCS-DOTA e o tri-glicil NCS-DOTA, os quais possuem grupos isocianato bastante reactivos (Figura 11). A ligação tri-glicil foi introduzida de forma a prevenir uma acumulação desnecessária nos rins dos metabolitos resultantes da degradação do bioconjugado, normalmente observada após a degradação do fragmento no soro sanguíneo.

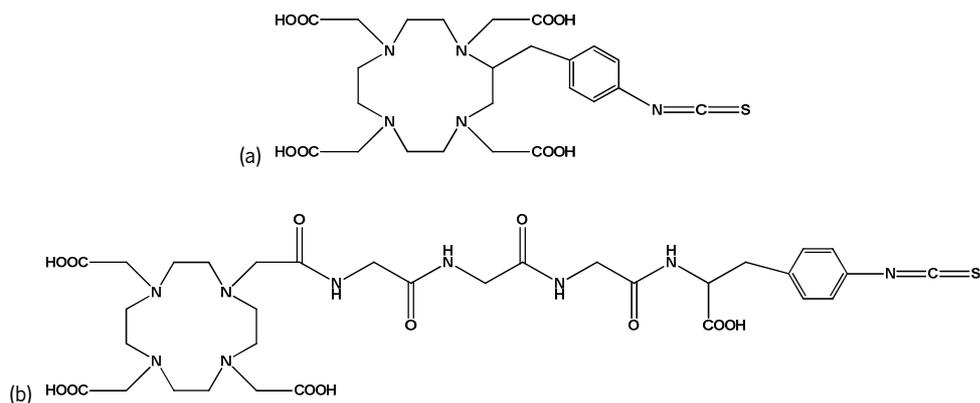


Figura 11 – Estrutura dos ligandos NCS-DOTA (a) e tri-glicil NCS-DOTA (b).

1.4.3.1.1 – Bioconjugados de péptidos RGD

Apesar de existirem inúmeras biomoléculas que poderão ser utilizadas para incutir bioespecificidade a um determinado agente radiofarmacêutico, a sua escolha deve ser feita com elevado rigor e critério. Os melhores agentes biosselektivos usados em medicina nuclear para diagnóstico do cancro ou outras patologias devem apresentar uma elevada e específica afinidade para os receptores alvo, os quais são sobre-expressos nas células tumorais ou poderão ser específicos para determinado tecido. Estes compostos também devem ser eficientemente internalizados pelas células alvo para alcançar uma rápida captação e adquirir concentrações adequadas, bem como ser lentamente externalizados por parte das mesmas. Além disso, os agentes devem ser rapidamente eliminados do sangue e exibir uma baixa captação no fígado e rins, pois um elevado tempo de residência leva a uma desnecessária exposição de radioactividade por parte do paciente.

Nos últimos anos, as integrinas têm sido um dos alvos principais contemplados no desenvolvimento de complexos radioactivos biosselektivos. Estas moléculas são glicoproteínas heterodiméricas transmembranares, que desempenham um papel importante nas interacções célula-célula ou célula-matriz. Elas pertencem a um grupo de moléculas de adesão celular, consistindo em duas subunidades transmembranares ligadas não-covalentemente com largos segmentos extracelulares que se ligam para criar heterodímeros com capacidades adesivas distintas (Figura 12)^[Ruoslahti 1996].

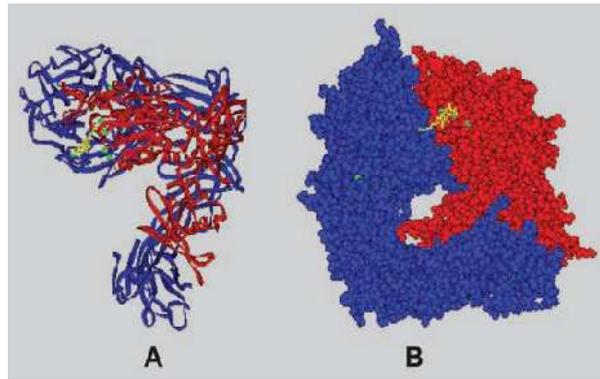


Figura 12 – Estrutura da integrina $\alpha\beta_3$. A subunidade α , está a azul e a β , está a vermelho.

Até 2002 tinham sido descritas 18 subunidades α e 8 subunidades β , que se agrupam em 24 receptores diferentes (Figura 13), desempenhando um papel importante na angiogénese e na metástase tumoral^[Hood 2002] e não sendo detectadas nos vasos sanguíneos em estado latente^[Ruoslahti 1996, Brooks 1994]. Estas moléculas, expressas em tumores, facilitam a formação de metástases, mediando a invasão das células tumorais e o movimento destas através dos vasos sanguíneos, devido ao facto de as integrinas expressas nas células endoteliais modularem a migração das células e a sua sobrevivência durante a cascata angiogénica.

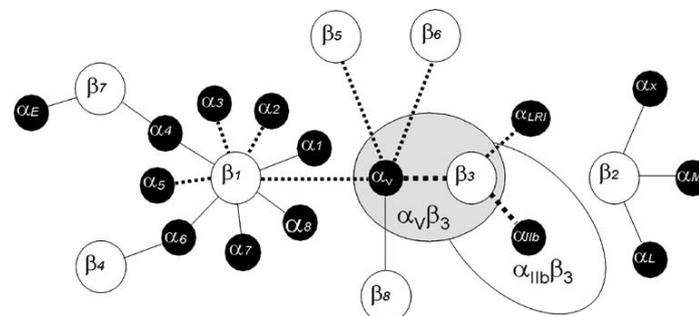


Figura 13 – Visão geral das diferentes α integrinas e subunidades β . As subunidades ligadas pelas linhas a tracejado ligam-se aos seus ligandos naturais via sequência RGD.

Uma característica comum de muitas integrinas como a $\alpha\beta_3$ reside na capacidade de se ligarem às proteínas da matriz extracelular através da sequência de três aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). A inibição da actividade da integrina $\alpha\beta_3$ através de péptidos RGD, nomeadamente péptidos RGD cíclicos, péptidomiméticos, e anticorpos monoclonais, pode induzir a apoptose celular e inibir a angiogénese^[Cai 2006]. Apesar de alguns estudos pré-clínicos terem indicado que existem outras integrinas que possuem um papel importante na regulação da angiogénese, como a $\alpha\beta_1$ e $\alpha\beta_5$ ^[Cai 2006], até à data a integrina $\alpha\beta_3$ continua a ser a mais

extensivamente estudada e é também o factor mais intensamente examinado no que diz respeito às estratégias de imagiologia para aplicação à angiogénese.

Recentemente foi sintetizado um derivado do DOTA conjugado com um péptido RGD cíclico (Figura 14), o qual foi complexado com ^{68}Ga e ^{111}In com vista à realização de vários estudos *in vivo* e *in vitro*^[Decristoforo 2008]. Neste caso, um dos braços pendentes do DOTA foi usado na ligação ao péptido através da cadeia lateral da lisina, ao passo que a D-fenilalanina foi usada como ligação entre as extremidades do péptido de forma a dar ao péptido uma estrutura cíclica.

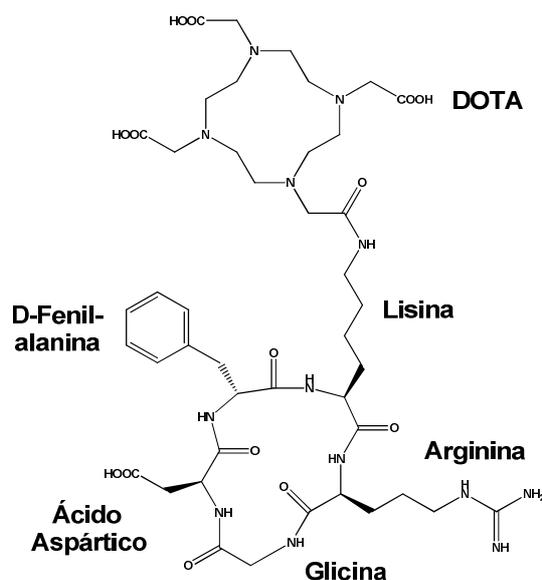


Figura 14 – Estrutura do conjugado ciclo(RGDfK(DOTA)).

No estudo da estabilidade no soro humano denotou-se uma elevada resistência de ambos os complexos às proteínases, uma vez que mais de 95% de ambos os complexos se encontravam intactos 120 minutos após a incubação. Além da resistência observada, o ^{68}Ga DOTA-RGD mostrou possuir uma elevada afinidade para se ligar a proteínas do sangue, com 10% do agente ligado a proteínas ao fim de 30 minutos e com 23% do agente ligado a proteínas ao fim de 180 minutos, valor esse que foi aumentando ao longo do tempo.

Os estudos de internalização celular com melanoma humano M21 ($\alpha_v\beta_3$ positivo) e com células M21-L ($\alpha_v\beta_3$ negativo) mostraram que o processo de internalização se verificou para ambos os complexos. No entanto, a internalização é menor no caso das células M21-L, devido à ausência de $\alpha_v\beta_3$; e quando administrado ciclo(Arg-Gly-Asp-DTyr-Val) em simultâneo com o complexo verifica-se uma diminuição da internalização devido à competição entre as duas moléculas. Apesar de a internalização ter sido pouco extensa quando comparada com a de

outros derivados peptídicos, provou-se que a internalização é mediada por receptores. A especificidade do receptor pela qual a internalização ocorre foi confirmada por estudos de biodistribuição *in vivo*, usando ratos com tumores $\alpha\beta_3$ positivos e $\alpha\beta_3$ negativos.

As imagens obtidas desses animais através de microPET puderam evidenciar uma elevada captação do [^{68}Ga]DOTA-RGD no tumor 1 hora após a injeção. Contudo, também foi encontrada uma elevada actividade noutros órgãos, revelando uma elevada concentração inicial no sangue, e uma consequente eliminação lenta.

Muitos outros agentes radiofarmacêuticos têm vindo a ser sintetizados e testados *in vitro* e *in vivo* com vista ao tratamento de vários tipos de cancro, entre eles o do pulmão, cérebro ou mama. Na Figura 15 pode-se observar um conjugado derivado do DOTA com potencialidade para PET, o qual é um forte agonista da integrina $\alpha\beta_3$, o c(RGDyK) (**1**), bem como alguns dos seus derivados (**2-6**).

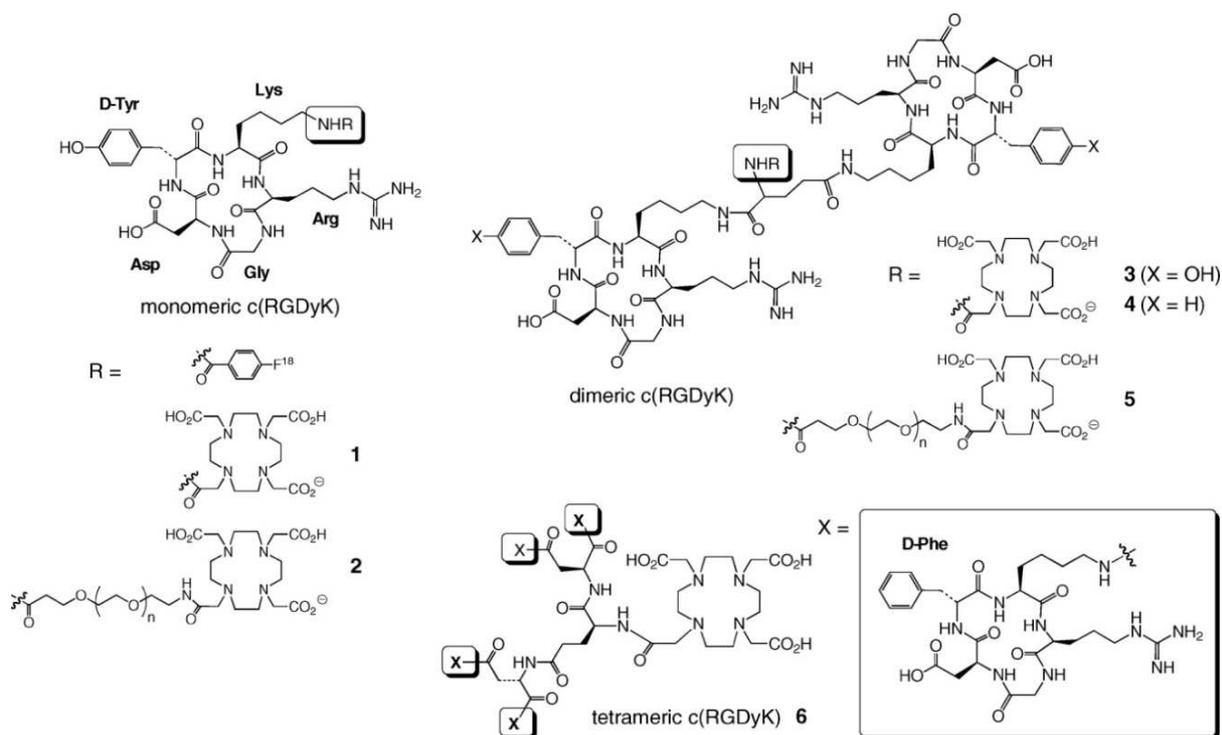


Figura 15 – Estrutura de conjugados DOTA-RGD que actuam como $\alpha\beta_3$ agonistas^[Taniaka 2008].

Nos estudos efectuados por microPET, o radioisótopo usado foi sempre o $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ e todos os agentes mostraram captação nas células tumorais através da internalização mediada por receptor específico. O conjugado DOTA-c(RGDyK) **1** mostrou uma retenção tumoral elevada no modelo de cancro de mama MDA-MB-435, em comparação com o derivado do [^{18}F]-benzoato (Figura 15). Contudo, possui uma velocidade de eliminação tumoral elevada e mostra uma

excreção hepatobiliar também elevada, resultando numa acumulação significativa na vesícula e intestinos^[Chen 2004 (a)]. De forma a reduzir a acumulação desnecessária do agente **1** no fígado e rins foram sintetizados e testados os péptidos diméricos DOTA-E[c(RGDyK)]₂ (**3**) e DOTA-E[c(RGDfK)]₂ (**4**)^[Chen 2004 (b)]. O agente **3** mostrou uma maior e mais específica captação no tumor, e uma melhor retenção tumoral do que o agente **1**, presumivelmente devido à sua bivalência e maior tamanho molecular. Este mesmo agente mostrou uma melhor cinética *in vivo* do que o derivado com fenilalanina **4**, provavelmente devido ao aumento da hidrofiliabilidade.

O derivado DOTA-PEG-c(RGDyK) (**2**) foi desenhado para melhorar a cinética *in vivo* de **1**, através da introdução de um espaçador de polietilenoglicol (PEG) entre o péptido e o DOTA^[Chen 2004 (c)]. Este agente foi testado em modelos de tumores cerebrais e mostrou melhores propriedades que **1**, entre as quais: rápida e elevada captação tumoral; rápida eliminação do sangue; redução da acumulação no fígado; e uma rápida eliminação renal. Visto a introdução do PEG ter melhorado a cinética do agente **2**, o ligando DOTA-PEG-E[c(RGDyK)]₂ (**5**) foi sintetizado, de modo a aproveitar a bivalência do agente **3**. O complexo **5** mostrou possuir melhores propriedades que o **3**, quando usado em imagiologia do cancro do pulmão^[Chen 2005], possuindo uma baixa acumulação no tecido normal dos pulmões e coração, tendo-se obtido imagens de elevada qualidade e resolução.

As vantagens dos efeitos de multivalência foram evidenciadas através dos testes realizados com o agente tetramérico DOTA-E-{E[c(RGDfK)]₂}₂ (**6**), visto a afinidade de ligação ao receptor ter aumentado significativamente quando comparada com os agentes **1** e **3**^[Wu 2005]. Este complexo também mostrou excelentes propriedades *in vivo* em testes com ratos possuindo glioma UG87MG, devido a uma rápida eliminação do sangue e excreção renal predominante.

1.5 – Técnicas de diagnóstico

1.5.1 – Tomografia de emissão de positrões (PET)

A tomografia por emissão de positrões é uma técnica desenvolvida nas décadas de 70 e 80 do século XX, e no final da década de 90 já tinha demonstrado ser uma das técnicas de imagiologia mais promissoras e com um enorme potencial de desenvolvimento no século XXI.

Esta técnica enquadra-se tradicionalmente no ramo da medicina nuclear e permite diagnosticar uma enorme variedade de patologias. A aquisição da imagem reside na deteção de

radiação γ , altamente penetrante. Os raios γ são gerados *in vivo* através da administração no organismo de isótopos emissores de positrões (partículas β^+), que ao interagirem com os electrões (partículas β^-) do meio envolvente produzem 2 fotões γ anti-paralelos de 511 KeV. A contínua emissão de partículas β^+ por parte do isótopo permite um fluxo constante de radiação γ , que ao ser detectada e analisada dá origem a uma imagem 3D. Dependendo da especificidade do exame, o radioisótopo pode ser injectado intravenosamente, inalado na forma de gás ou ainda tomado oralmente, conforme a área do corpo em que se pretende uma maior acumulação do agente radioactivo.

Actualmente o uso desta técnica começa a tornar-se mais generalizado pois as suas características permitem diagnosticar uma quantidade enorme de patologias, tais como carcinomas e as suas metástases, determinação dos danos provocados por um enfarte no músculo do miocárdio, determinação do fluxo sanguíneo em diversos tecidos (angiografia) ou ainda avaliar anomalias no córtex cerebral que resultam em distúrbios de memória ou de comportamento.

O equipamento para PET consiste num aparelho composto por duas secções principais. A primeira secção consiste numa mesa onde o paciente se deita. Esta mesa é móvel e permite ao técnico mover o paciente na horizontal de modo a colocar o corpo no local de interesse. A segunda secção consiste no detector de raios γ , mais conhecido como câmara γ ou sonda γ , que é constituída por sais de Na(Tl), BaF₂, LaBr₃, CsI(Tl), entre outros^[Semmler 2008], detectando a radiação γ e transformando-a em impulsos eléctricos por fotomultiplicadores. A câmara γ é tipicamente larga, com a forma de uma caixa quadrada com um orifício redondo ou um túnel no centro da caixa onde o paciente é introduzido (Figura 16). Como na maioria dos aparelhos de PET também se podem efectuar exames de tomografia computadorizada (CT), a câmara γ possui um tubo de raios X e um detector electrónico de raios X colocados em locais opostos num anel designado “gantry” (canteiro). Os dados são recolhidos e tratados computacionalmente por um técnico numa sala separada, que controla e monitoriza todo o exame.

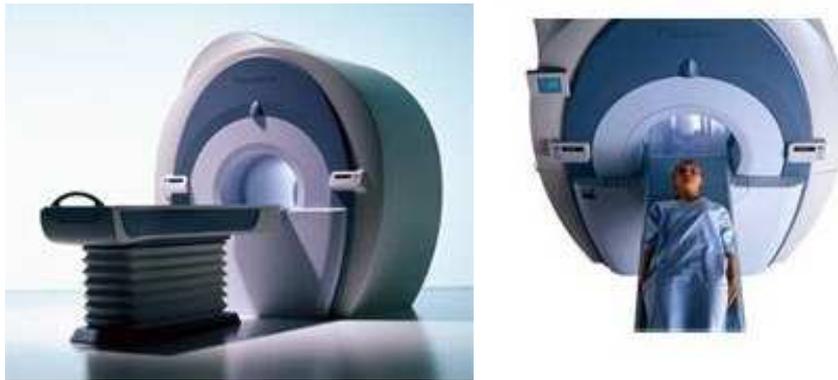


Figura 16 – Aparelho de tomografia de emissão de positrões (PET).

Num exame convencional por CT, a imagem é obtida através de um conjunto de raios X provenientes de uma fonte externa que atravessam o corpo e são detectados no local oposto à origem da radiação. Como na PET a radiação necessária à formação da imagem é gerada *in situ* (aniquilação β^+), esta permite visualizar os mesmos tecidos de uma forma diferente daquela obtida por CT. Como resultado, a combinação das duas técnicas permite criar imagens que oferecem um grau de detalhe mais elevado, tanto a nível estrutural como funcional dos diferentes órgãos e tecidos.

Ao contrário das outras técnicas de imagiologia, os estudos efectuados em medicina nuclear, mais concretamente em PET, são menos direccionados para a observação anatómica e estrutural e centram-se mais na descrição fisiológica de processos biológicos, tais como os ritmos metabólicos ou os níveis de certos compostos químicos. As áreas de grande intensidade, chamadas “pontos quentes” (“hot spots”) indicam onde estão acumulados elevadas quantidades de radioisótopo, que podem resultar de uma elevada actividade metabólica. Ao invés, as áreas de menor intensidade, (“pontos frios” ou “cold spots”) indicam menor concentração de radioisótopo e consequentemente, menor actividade química.

Como principais vantagens desta técnica podemos salientar a capacidade de se obterem imagens com uma elevada resolução espacial e um elevado potencial de quantificação, o que torna a informação obtida através deste exame única e inalcançável através de outras técnicas; é uma técnica bastante sensível, permitindo detectar um isótopo até 10^{-12} mol.dm⁻³[Fani 2008, Semmler 2008]; permite detectar mudanças no corpo a nível celular (ex: alteração de metabolismo), o que permite identificar certas doenças nos seus estados principais; em comparação com as técnicas invasivas, tais como cirurgia exploratória, esta técnica é menos dispendiosa e sobretudo menos dolorosa, pois é uma técnica não invasiva.

Como principais desvantagens desta técnica podemos salientar o facto de ser sempre necessária a administração de um agente radioactivo, o qual apesar de ser em doses muito pequenas pode afectar o normal “comportamento” celular; por vezes os pacientes podem sofrer uma exposição excessiva de radiação γ devido ao elevado $t_{1/2}$ dos radioisótopos utilizados; pode também acontecer o caso inverso, em que o $t_{1/2}$ dos radioisótopos é baixo e assim limita o tempo necessário para a aquisição da imagem; o procedimento pode consumir bastante tempo, pois pode demorar horas ou dias até que o elemento radioactivo se acumule na parte do corpo em estudo e como tal poderão ser necessárias várias horas para se realizar o exame; a PET poderá, em certas situações, não ser muito prática e ser dispendiosa, pois determinados isótopos usados no diagnóstico têm que ser gerados em reactores nucleares ou ciclotrões; em determinadas ocasiões, a injeção do agente radioactivo pode provocar dor, irritação na pele e em casos mais extremos pode mesmo provocar reacções alérgicas severas; o exame por PET pode dar resultados falsos se o balanço químico no corpo não for normal, especialmente nos casos dos doentes com diabetes ou nos pacientes que possam ter ingerido alimentos horas antes do exame, alterando a concentração de açúcar e insulina no sangue. Este tipo de anomalia está normalmente associada ao uso de agentes radiofármacos baseados na glucose e marcados com ^{11}C ou ^{18}F .

Radioisótopos como o ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ minutos), o ^{68}Ga ($t_{1/2} = 68$ minutos) ou o ^{55}Co ($t_{1/2} = 18,2$ horas) são excelentes emissores β^+ . O uso de ^{68}Ga ou ^{55}Co em detrimento do uso de elementos mais frequentes como o ^{18}F , ^{13}N , ^{15}C ou ^{11}C tem vindo a aumentar. O uso de iões metálicos é mais prático, pois estes podem ser rapidamente complexados com agentes quelantes, diminuindo o tempo de preparação do agente de imagem. Por seu lado, o uso de elementos orgânicos pressupõe a ligação covalente destes a uma molécula orgânica, desperdiçando o tempo de vida do isótopo, a que se pode juntar o facto de estes elementos possuírem um tempo de meia-vida pequeno, pelo que a maior parte das partículas emitidas são desperdiçadas visto a formação da ligação covalente necessitar de um período de tempo razoável. Outro dos inconvenientes relacionados com o uso de elementos orgânicos está relacionado com a sua produção em ciclotrão. Além dos inconvenientes mencionados, o facto de alguns radioisótopos metálicos não serem muito tóxicos na sua forma livre ou serem rapidamente complexados por moléculas do meio, como é o caso do Co(II) [Korf 1998], torna o seu uso ainda mais prático e acessível. Contudo, a complexação prévia dos metais é quase sempre mais

favorável, pois assim pode-se alterar a sua biodistribuição, ou seja, direccionar o isótopo para um órgão/tecido desejado.

1.5.2 – Tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT)

Tal como a técnica de PET, o SPECT é uma técnica usada em medicina nuclear e tem como base a detecção de radiação γ . Neste caso, é administrado um isótopo radioactivo emissor de radiação γ , que posteriormente será captada e analisada dando origem a uma imagem. Esta técnica foi desenvolvida nos anos 50 do século XX e serviu de “motor” ao desenvolvimento da PET, visto esta última ter surgido nas décadas posteriores como uma técnica mais afinada e apurada que a SPECT.

Nesta técnica são usados radioisótopos com diferentes energias de emissão, que variam entre os 70 KeV e os 360 KeV. O isótopo mais usado nesta técnica é o ^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6,03$ h; 140 KeV) que decai por transição isomérica (TI). Contudo, a maior parte dos outros isótopos usados em SPECT, tal como ^{67}Ga ($t_{1/2} = 3,26$ dias; 93, 183, 300 KeV), o ^{111}In ($t_{1/2} = 2,81$ dias; 172, 247 KeV) ou o ^{201}Tl ($t_{1/2} = 3,05$ dias; 68-80 KeV) decaem através de captura electrónica (CE).

Em termos instrumentais, os princípios e os métodos aplicados ao SPECT são bastante idênticos ao PET. Contudo, a técnica de SPECT possui algumas limitações em relação à PET, pois as câmaras detectoras usadas em PET possuem sistemas de detecção mais avançados e podem detectar radiação em simultâneo num ângulo de 360° , ao passo que as câmaras de SPECT necessitam de rodar em torno do objecto para uma detecção 3D. Apesar de ambas as técnicas serem bastante sensíveis, a SPECT é limitada a uma resolução espacial de 12-15 mm, enquanto o PET pode atingir uma resolução de 4-6 mm, além de ser necessário uma maior acumulação de isótopo em SPECT, visto ser dez vezes menos sensível que o PET. As desvantagens desta técnica são basicamente as referidas anteriormente para a técnica de PET, onde se pode salientar o facto de se usar um isótopo radioactivo, potencialmente prejudicial à saúde e por vezes economicamente não muito viável.

1.5.3 – Imagem de ressonância magnética (MRI)

A imagem de ressonância magnética foi desenvolvida nos anos 70 do século XX e no início da década de 80 estabeleceu-se definitivamente como uma das técnicas mais usadas no diagnóstico médico.

Esta técnica é baseada na interação dos núcleos atômicos dos tecidos com um campo magnético externo e radiofrequências, e como tal, é uma técnica não invasiva e de baixo risco pois não utiliza radiação ionizante^[Geraldès 1987]. A imagem por MRI está dependente da intensidade do sinal de RMN dos prótons das moléculas de água do corpo e a intensidade da imagem resulta das diferenças da quantidade de água nos tecidos, dos tempos de relaxação longitudinais (T_1) e transversais (T_2) dos prótons e do fluxo sanguíneo.

Apesar da MRI permitir uma fácil e boa visualização dos tecidos, nomeadamente os tecidos moles, o contraste nas imagens obtidas é normalmente baixo. Este facto é causado pela pequena diferença da densidade protónica existente entre os vários tecidos. O uso de agentes de contraste permite aumentar a qualidade das imagens e visualizar lesões indetectáveis sem o seu uso. Estes AC's são compostos paramagnéticos que reduzem os tempos de relaxação T_1 e T_2 através de interações dipolares entre os electrões desemparelhados dos compostos paramagnéticos e os núcleos dos átomos de hidrogénio da água^[Lauffer 1987, Aime 1998].

Íons com elevado momento magnético como o Gd(III) ou Mn(II) são óptimos agentes de relaxação nuclear, mas são tóxicos na sua forma livre. Assim, é necessário ligá-los a agentes quelantes, tais como ligandos macrocíclicos, reduzindo a sua toxicidade e ao mesmo tempo alterando a forma como são biodistribuídos e excretados.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de agentes de contraste para MRI tem sido baseado fundamentalmente em quelatos de gadolínio. O Gd(III) é visto como o íão de eleição pois possui um elevado momento magnético, um elevado tempo de relaxação de spin electrónico e número de coordenação nove, podendo formar complexos bastante estáveis com ligandos poliaminocarboxilatos octadentados^[Caravan 1999].

2 – Objetivos

Objectivos

Os objectivos deste trabalho consistem na síntese, purificação e caracterização de ligandos macrocíclicos anfífilos com potencialidade para uso em técnicas de imagiologia médica, em particular as técnicas usadas em medicina nuclear (PET e SPECT).

Pretende-se sintetizar e purificar ligandos derivados do DOTA com uma cadeia alquílica, DOTAC_n (Figura 17), a qual irá conferir ao ligando um carácter anfílico. Estes ligandos poderão ser complexados com uma enorme variedade de iões metálicos, no entanto pretende-se usar metais que possuam isótopos com características apropriadas para o uso em PET e SPECT, tais como o gálio, cobalto ou cobre. Procura-se também fazer uma caracterização físico-química dos ligandos e dos seus quelatos (ex: determinação do cmc dos complexos), bem como a realização de vários estudos dos complexos *in vitro* e *in vivo* com animais.

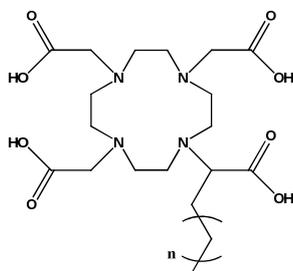


Figura 17 – Estrutura do ligando DOTAC_n, onde n representa o número de átomos de carbono da cadeia alquílica.

Igualmente se pretende sintetizar e purificar bioconjugados peptídicos (Figura 18), a partir dos ligandos anfífilos. Aproveitando o facto de se utilizar uma estratégia de síntese utilizando grupos protectores ortogonais, pretende-se sintetizar em fase sólida bioconjugados do DOTAC_n com o péptido GRGDG. Nesta abordagem também se procura fazer uma caracterização físico-química dos bioconjugados (ex: determinação do cmc dos complexos).

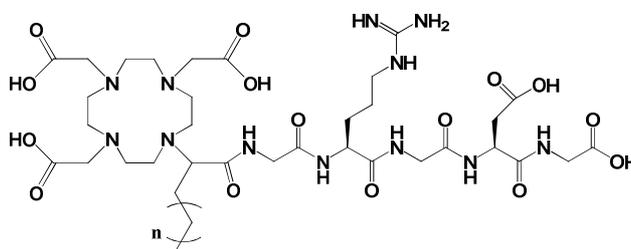


Figura 18 – Estrutura do bioconjugado DOTAC_n-GRGDG, onde n representa o número de átomos de carbono da cadeia alquílica.

3 – Parte Experimental

3.1 – Reagentes

Os solventes usados foram obtidos através das marcas Lab Scan, Fischer Scientific e Sigma-Aldrich. Os reagentes usados foram obtidos através das marcas Sigma-Aldrich, Merck, Fluka e Acros.

O citrato de $^{67}\text{Ga}(\text{III})$ usado nos estudos de biodistribuição e imagem cintigráfica em ratos foi adquirido através da empresa Mallinckrodt Med. (Petten, Holanda).

3.2 – Instrumentos

O pH foi medido recorrendo a um medidor do tipo Crison microTT 2050, montado com um eléctrodo de pH Mettler Toledo InLab[®] 422.

As análises por HPLC foram efectuadas recorrendo a um sistema constituído por um injector Rheodyne 7725i, um detector de UV/Visível Jasco UV-975; uma bomba Jasco PU-980; uma coluna Lichospher[®] 100, RP-18 (5 μM); e um registador Shimadzu C-R6A chromatopac.

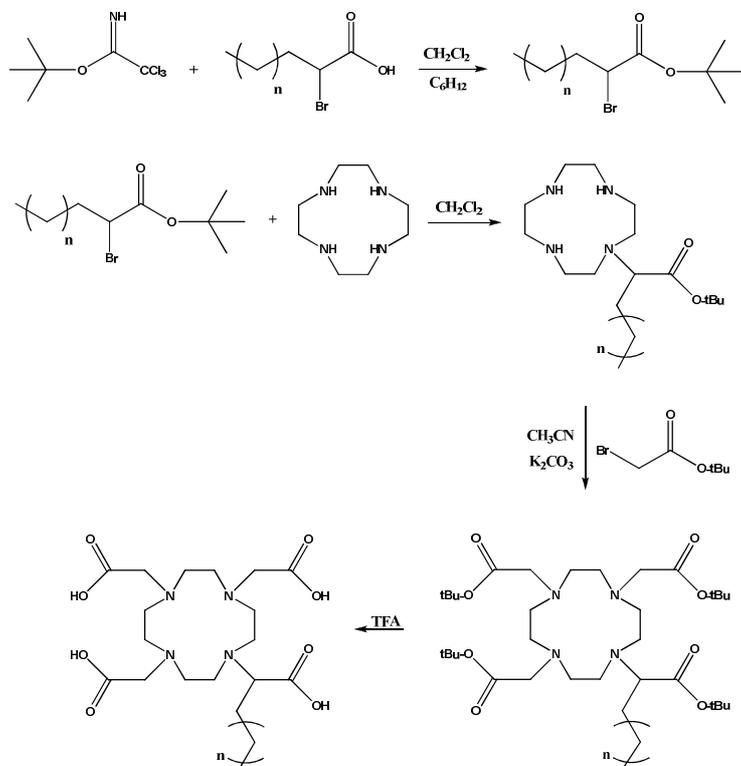
As purificações por HPLC foram efectuadas recorrendo a um sistema constituído por um injector Rheodyne 7725i, um detector de UV/Visível Jasco 875-UV; uma bomba Shimadzu LC-8A; uma coluna Chromolith[®] semiprep RP-18e (100-10 mm); e um registador Shimadzu C-R6A chromatopac.

As análises por fluorescência foram efectuadas recorrendo a um fluorímetro Biotek, modelo synergy[™] multi-detection microplate reader, ao passo que a aquisição dos dados foi efectuada recorrendo ao programa KCA[™].

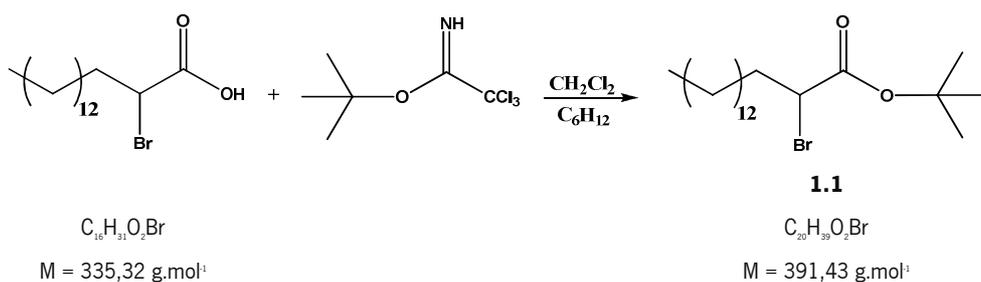
Na aquisição de imagens e pré-processamento utilizou-se um sistema câmara de raios gama - computador GE 400 GenieAcq da General Electric, Milwaukee, EUA. O processamento das imagens foi realizado num computador pessoal utilizando um programa desenvolvido no Serviço de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra a partir do programa IDL 5.2. A contagem de actividade nas amostras foi feita num contador de poço DPC-Gamma C₁₂, acoplado ao computador compatível Compaq DeskPro. A câmara de raios gama foi previamente calibrada para o radioisótopo adequado.

3.3 – Síntese e purificação

Esquema 1 – Esquema sintético geral usando grupos protectores *t*butilo.

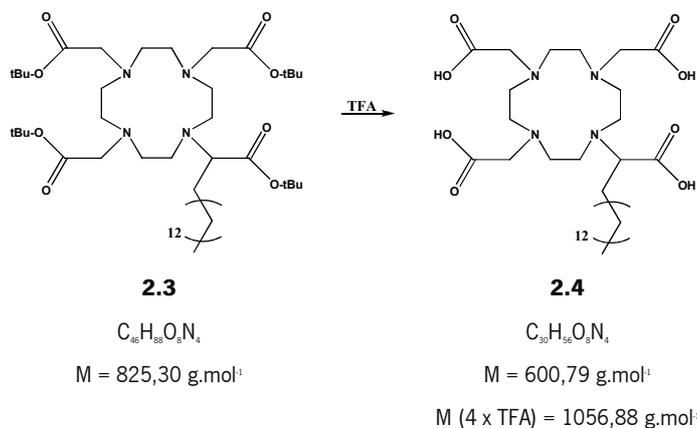


3.3.1.1 – 2-bromo-hexadecanoato de *t*butilo (1.1)



Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveram-se 1,92 g de ácido 2-bromohexadecanóico (5,72 mmol) em 15 ml de DCM. A esta solução foram adicionados gota a gota 5,0 g de TBTA (22,88mmol) dissolvido em 10 ml de ciclohexano. Durante a adição do TBTA formou-se um precipitado branco que foi dissolvido através da adição de 2,5 ml de DMA. Posteriormente adicionou-se 500 μl de trifluoreto de boroeterato (BF_3OEt) e a mistura reaccional ficou sob agitação à temperatura ambiente durante 72 horas.

3.3.1.4 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexadecanóico-4,7,10-triacético (1.4)

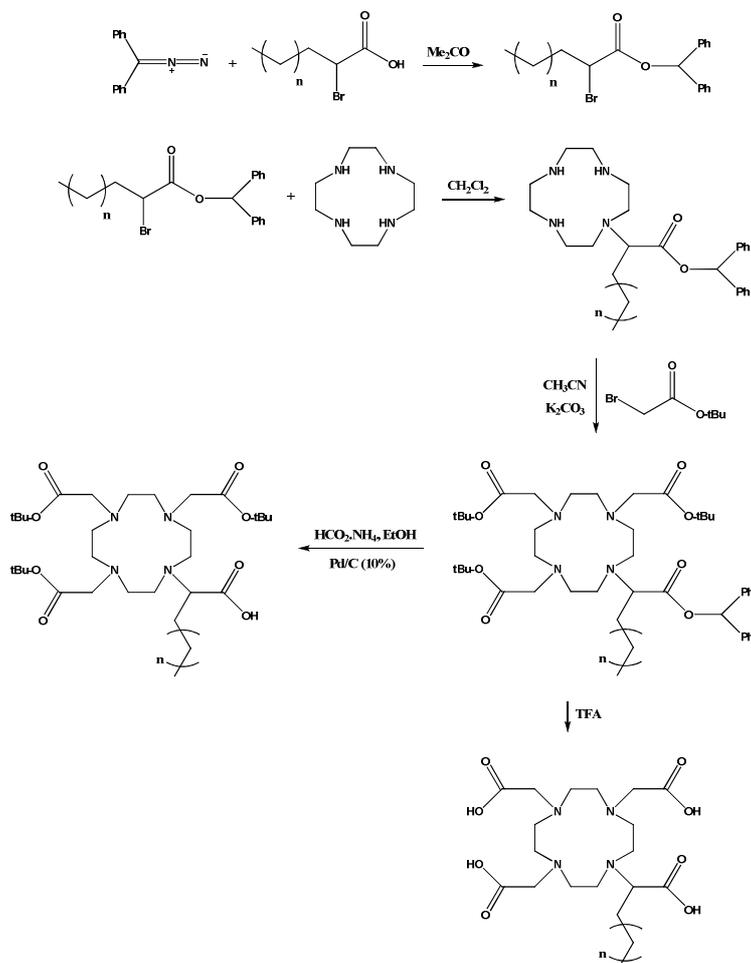


Num balão de fundo redondo de 25 ml dissolveram-se 320,9 mg do composto **1.3** (0,39 mmol) em 3,0 ml de TFA 98%. A mistura reaccional ficou sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. O TFA foi removido a pressão reduzida. O óleo castanho foi lavado com 30 ml de hexano, e removido a pressão reduzida. Posteriormente o óleo foi lavado com 20 ml de água, e removida a pressão reduzida.

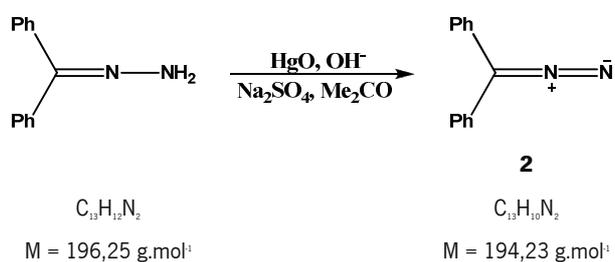
No final obteve-se 407,7 mg de um sólido cristalino castanho com um rendimento de 99,2%.

- MS(ESI): m/z (intensidade relativa): 601,42 (MH^+ , 100).

Esquema 2 – Esquema sintético geral usando grupos protectores *t*-butilo e benzidrilo.



3.3.2 – Difenildiazometano (DDM) (2)

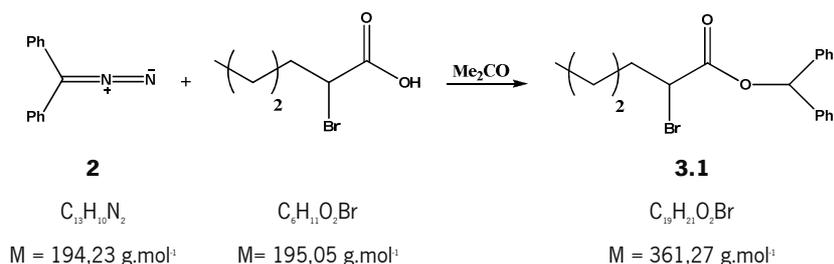


10,03 g de benzofenonahidrazona (51,1 mmol), 11,51 g de sulfato de sódio anidro, 26,91 g de óxido amarelo de mercúrio (124,2 mmol) e 3,8 ml de etanol saturado com hidróxido de sódio foram colocados num balão de fundo redondo de 1 L. Adicionaram-se 160 ml de éter etílico e a suspensão ficou com agitação, à temperatura ambiente durante 75 minutos.

A mistura reaccional foi filtrada por gravidade e o solvente removido a pressão reduzida. O óleo vermelho escuro formado foi dissolvido em éter de petróleo (40-60 °C) e foi novamente filtrado por gravidade. A solução foi concentrada a pressão reduzida e o óleo foi congelado, deixando-o aquecer espontaneamente à temperatura ambiente originando cristais vermelhos.

No final obteve-se 9,90 g de produto com um rendimento de 99,7%.

3.3.3.1 – 2-bromo-hexanoato de benzidrilo (3.1)



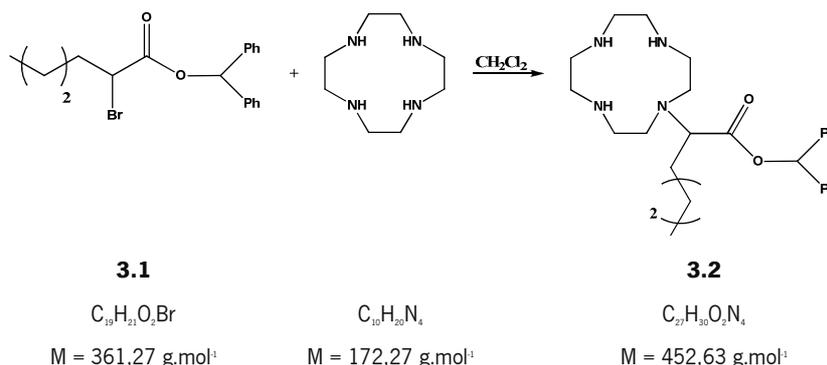
Num balão de fundo redondo de 500 ml dissolveram-se 3,7 ml de ácido 2-bromohexanoico (26,4 mmol) em 160 ml de acetona. A esta solução foram adicionadas gota a gota, durante 2 horas, 4,5 g de DDM (23,17 mmol) em 160 ml de acetona. A mistura reaccional ficou com agitação em banho de gelo durante 13 horas e à temperatura ambiente durante 10 horas.

O solvente foi removido a pressão reduzida e o óleo amarelo obtido foi purificado através de cromatografia em coluna com sílica gel 60 com ciclohexano/acetato de etilo (4:1).

No final obteve-se 7,82 g de um óleo amarelo claro com um rendimento de 93,2%. R_f ciclohexano/acetato de etilo (4:1) = 0,88.

- ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , SiMe_4 , δ): 0,88 (t, 3H, $J=6,9$ Hz, CH_3), 1,21-1,43 (m, 4H, CH_2), 1,96-2,18 (m, 2H, CHBr-CH_2), 4,33 (t, 1H, $J=7,4$ Hz, CHBr), 6,92 (s, 1H, CHPh_2), 7,27-7,39 (m, 10H, Ph_2).

3.3.3.2 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexanoato de benzidrilo (3.2)



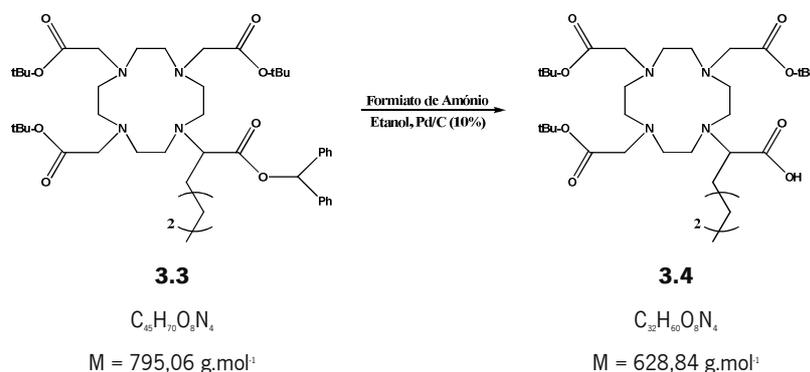
Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveram-se 402,1 mg de 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (2,32 mmol) em 10 ml de DCM. A esta solução foram adicionadas gota a gota, durante 1 hora e 40 minutos, 645,5 mg de 2-bromohexanoato de benzidrilo (1,79 mmol) dissolvido em 10 ml de DCM. A mistura reaccional ficou com agitação à temperatura ambiente durante 24 horas.

A mistura reaccional foi filtrada sob vácuo e o solvente removido a pressão reduzida. O óleo amarelo obtido foi purificado através de uma cromatografia em coluna com sílica gel 60 com DCM/EtOH (7:3) seguido de DCM/EtOH/amónia (7:3:0,5).

No final obteve-se 356,2 mg de um óleo amarelo com um rendimento de 44,1%. R_f DCM/EtOH (7:3) = 0,10.

- $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , SiMe_4 , δ): 0,78-0,94 (m, 3H, CH_3), 1,23-1,48 (m, 4H, CH_2), 1,78-1,94 (m, 2H, CHN-CH_2), 2,23-3,60 (m, 16H, NC/H_2), 4,18-4,22 (m, 1H, C/HN), 6,88 (s, 1H, C/HPh_2), 7,21-7,38 (m, 10H, Ph_2).

3.3.3.4 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexanóico-4,7,10-triacetato de *t*-butilo (3.4)



Num balão de fundo redondo de três bocas (100 ml) dissolveram-se 97,4 mg do composto **3.3** (0,13 mmol) em 18 ml de etanol e adicionou-se 100,2 mg de Pd/C (10%). A esta suspensão foram adicionados 43,6 mg de formiato de amônio (0,69 mmol) e a mistura reaccional ficou com agitação, em refluxo e sob atmosfera de azoto durante 1 hora e 25 minutos.

A mistura reaccional foi filtrada sobre celite, sendo esta posteriormente lavada com 100 ml de etanol. O solvente foi removido a pressão reduzida e o crude foi lavado com 1x40 ml e 4x10 ml de água, sendo esta filtrada através de uma membrana de celulose e posteriormente removida a pressão reduzida.

No final obteve-se 59,4 mg de um sólido creme com um rendimento de 75,1%. R_f DCM/EtOH (7:3) = 0,40.

- $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, D_2O , $SiMe_4$, δ): 0,89 (t, 3H, $J=7,1$ Hz, CH_3), 1,25-1,39 (m, 4H, CH_2), 1,55 (s, 27H, $C(CH_3)_3$), 1,48-1,74 (m, 2H, $CHN-CH_2$), 2,32-3,80 (m, 22H, NCH_2 , $CH_2-COOtBu$).

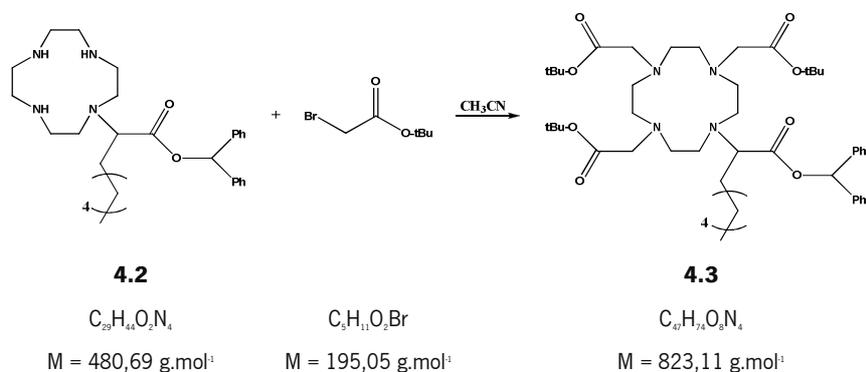
gota, durante 1 hora e 20 minutos, 347,3 mg de 2-bromo-octanoato de benzidrilo (0,89 mmol) dissolvido em 10 ml de DCM. A mistura reaccional ficou com agitação à temperatura ambiente durante 24 horas.

A mistura reaccional foi filtrada sob vácuo e o solvente removido a pressão reduzida. O óleo amarelo obtido foi purificado através de cromatografia em coluna com sílica gel 60 com DCM/EtOH (7:3) seguido de DCM/EtOH /amónia (7:3:0,5).

No final obteve-se 211,1 mg de um óleo amarelo com um rendimento de 49,9%. R_f DCM/EtOH (7:3) = 0,13.

- ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , SiMe_4 , δ): 0,83 (t, 3H, $J=6,8$ Hz, CH_3), 1,12-1,36 (m, 8H, CH_2), 1,74-1,89 (m, 2H, CHN-CH_2), 2,42-3,40 (m, 16H, NCH_2), 6,87 (s, 1H, $\text{C}^{\text{H}}\text{Ph}_2$), 7,19-7,36 (m, 10H, Ph_2).

3.3.4.3 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-octanoato de benzidrilo-4,7,10-triacetato de *t*butilo (4.3)



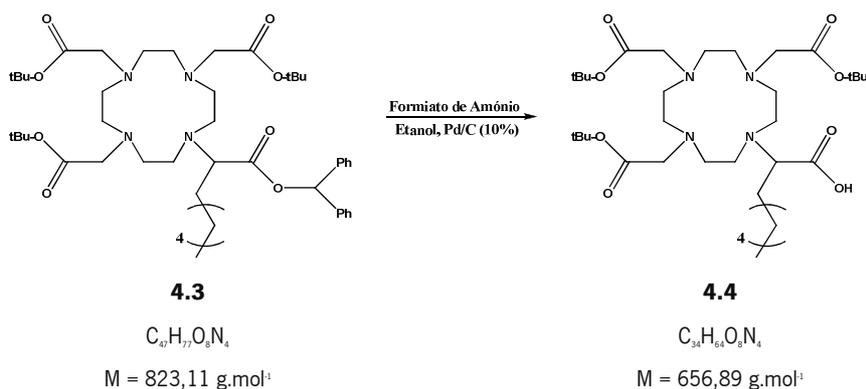
Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveram-se 211,1 mg do composto **4.2** (0,44 mmol) em 10 ml de ACN e adicionou-se 364,8 mg de carbonato de potássio (2,63 mmol). A esta suspensão foram adicionados 208 μl de bromoacetato de *t*butilo (1,41 mmol) e a mistura reaccional ficou com agitação, à temperatura ambiente durante 24 horas.

A mistura reaccional foi filtrada sob vácuo e o solvente removido a pressão reduzida. O óleo castanho claro obtido foi purificado através de cromatografia em coluna com sílica gel 60 com DCM/EtOH (7:3).

No final obteve-se 253,3 mg de um óleo castanho com um rendimento de 70,1%. R_f DCM/EtOH (7:3) = 0,98.

- ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, SiMe₄, δ): 0,77 (t, 3H, J=7,3 Hz, CH₃), 1,08-1,30 (m, 8H, CH₂), 1,39 (s, 27H, C(CH₃)₃), 1,55-1,71 (m, 2H, CHN-CH₂), 1,90-3,50 (m, 22H, NCCH₂CH₂-COOtBu), 6,78 (s, 1H, C=CHPh₂), 7,15-7,29 (m, 10H, Ph₂).

3.3.4.4 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-octanóico-4,7,10-triacetato de *t*-butilo (4.4)



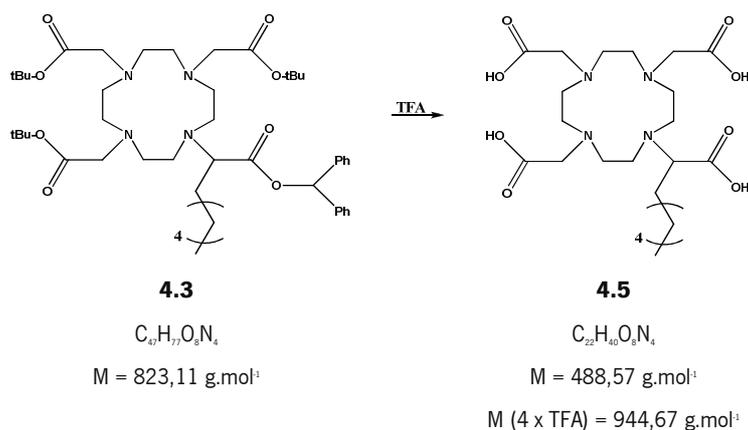
Num balão de fundo redondo de três bocas (100 ml) dissolveram-se 179,3 mg do composto **4.3** (0,22 mmol) em 30 ml de etanol e adicionou-se 181,2 mg de Pd/C (10%). A esta suspensão foram adicionados 76,1 mg de formiato de amônio (1,20 mmol) e a mistura reaccional ficou com agitação, em refluxo e sob atmosfera de azoto durante 1,5h.

A mistura reaccional foi filtrada sobre celite, sendo esta posteriormente lavada com 100 ml de etanol. O solvente foi removido a pressão reduzida e o crude foi lavado com 1x50 ml e 4x15 ml de água, sendo esta filtrada através de uma membrana de celulose e posteriormente removida a pressão reduzida.

No final obteve-se 103,3 mg de um sólido creme com um rendimento de 72,2%. R_f DCM/EtOH (7:3) = 0,49.

- ¹H RMN (300 MHz, D₂O, SiMe₄, δ): 0,88 (t, 3H, J=7,2 Hz, CH₃), 1,19-1,78 (m, 35H, CH₂, C(CH₃)₃), 1,97-2,21 (m, 2H, CHN-CH₂), 2,53-4,58 (m, 22H, NCCH₂CH₂-COOtBu).

3.3.4.5 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-octanóico-4,7,10-triacético (4.5)

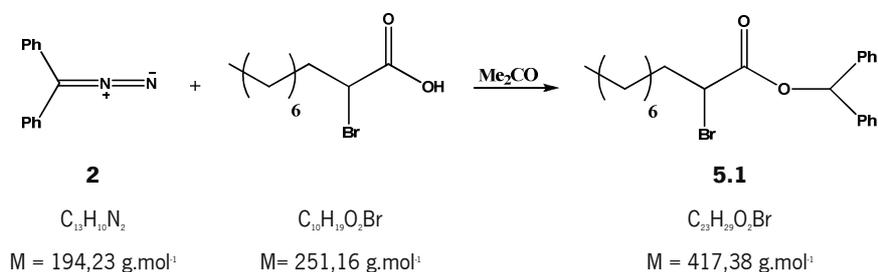


Num balão de fundo redondo de 100 ml dissolveram-se 253,3 mg do composto **4.3** (0,31 mmol) em 5,0 ml de DCM e 5,0 ml de TFA 98%. A mistura reaccional ficou com agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A solução foi concentrada a pressão reduzida e crude foi lavado com 3x70 ml de água, sendo esta filtrada através de uma membrana de celulose e posteriormente removida a pressão reduzida.

No final obteve-se 183,0 mg de um sólido cristalino castanho com um rendimento de 62,9%.

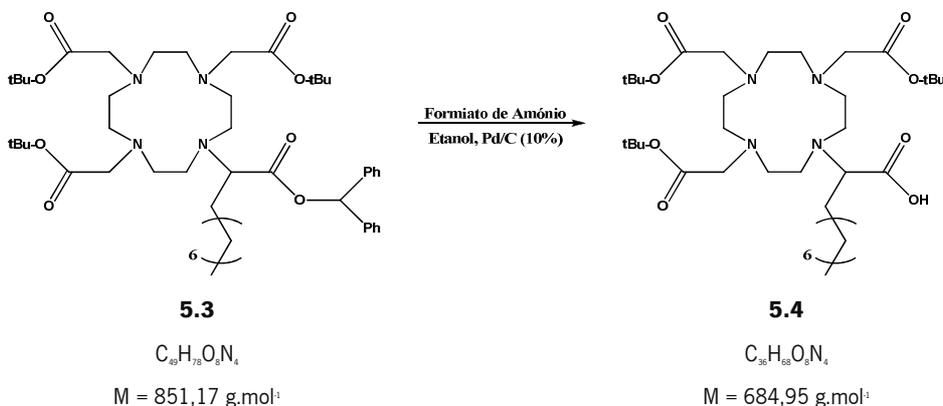
- MS(ESI⁺): m/z (intensidade relativa): 511,58 (MNa⁺, 100).

3.3.5.1 – 2-Bromodecanoato de benzidrilo (5.1)



Num balão de fundo redondo de 500 ml dissolveram-se 3,75 ml de ácido 2-bromo-decanóico (18,0 mmol) em 150 ml de acetona. A esta solução foram adicionadas gota a gota, durante 2 horas, 3,19 g de DDM (16,4 mmol) em 150 ml de acetona. A mistura reaccional ficou com agitação, em banho de gelo durante 13 horas e à temperatura ambiente durante 10 horas.

3.3.5.4 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-decanóico-4,7,10-triacetato de t-butilo (5.4)



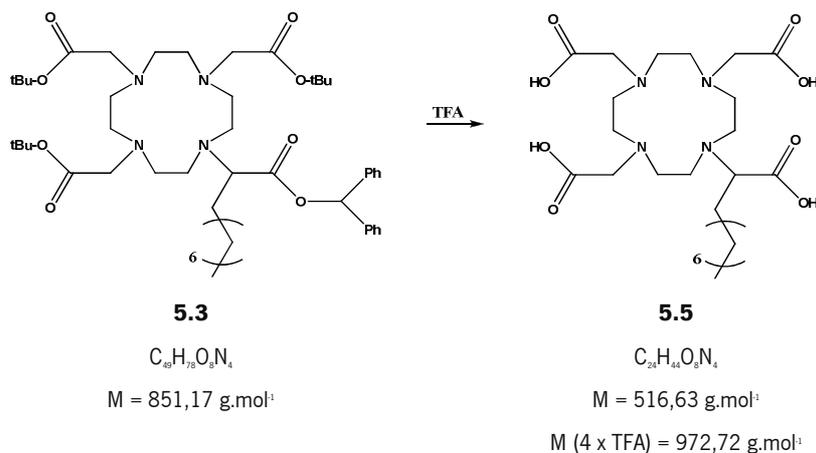
Num balão de fundo redondo de três bocas (250 ml) dissolveram-se 394,0 mg do composto **5.3** (0,46 mmol) em 70 ml de etanol e adicionou-se 394,5 mg de Pd/C (10%). A esta suspensão foram adicionados 176,4 mg de formiato de amônio (2,78 mmol) e a mistura reaccional ficou com agitação, em refluxo e sob atmosfera de azoto durante 1 hora e 25 minutos.

A mistura reaccional foi filtrada sobre celite, sendo esta posteriormente lavada com 100 ml de etanol. O solvente foi removido a pressão reduzida e o crude foi lavado com 1x60 ml e 4x20 ml de água, sendo esta filtrada através de uma membrana de celulose e posteriormente removida a pressão reduzida.

No final obteve-se 302,0 mg de um sólido amarelo claro com um rendimento de 95,2%.
 R_f diclorometano/etanol (7:3) = 0,47.

- ^1H RMN (300 MHz, D_2O , SiMe_4 , δ): 0,78-0,89 (m, 3H, CH_3), 1,14-1,39 (m, 12H, CH_2), 1,40-1,86 (m, 29H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, CHN-CH_2), 2,62-4,60 (m, 22H, NC-CH_2 , $\text{CH}_2\text{-COO}t\text{Bu}$).

3.3.5.5 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-decanóico-4,7,10-triacético (5.5)

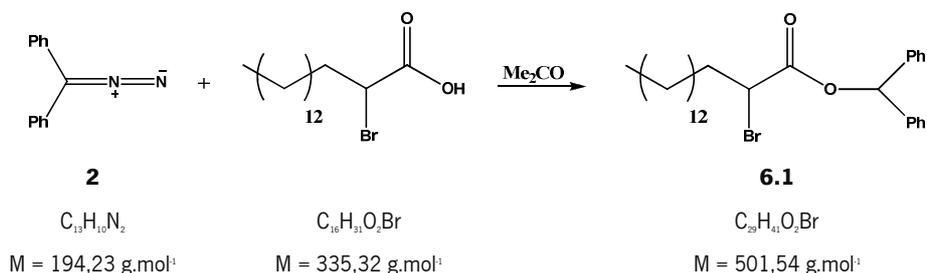


Num balão de fundo redondo de 250 ml dissolveram-se 591,0 mg do composto **5.3** (0,69 mmol) em 5,0 ml de DCM e 5,0 ml de TFA 98%. A mistura reaccional ficou com agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. A solução foi concentrada a pressão reduzida e o crude foi lavado com 3x70 ml de água, sendo esta filtrada através de uma membrana de celulose e posteriormente removida a pressão reduzida.

No final obteve-se 455,0 mg de um sólido cristalino castanho com um rendimento de 67,4%.

- MS(ESI): m/z (intensidade relativa): 517,58 (MH^+ , 100).

3.3.6.1 – 2-bromohexadecanoato de benzidrilo (6.1)



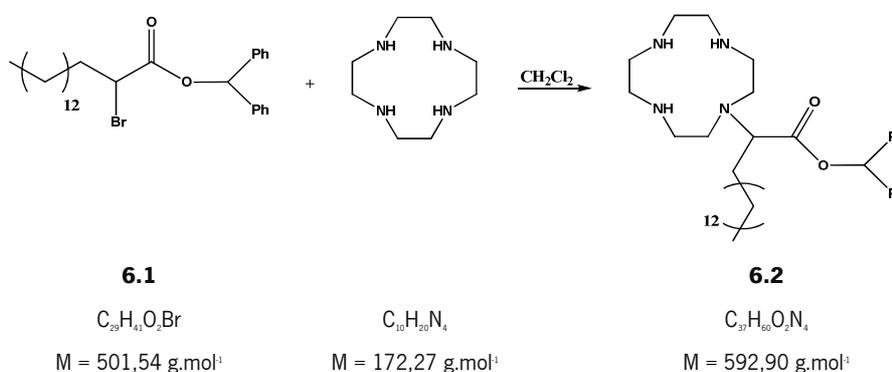
Num balão de fundo redondo de 500 ml dissolveram-se 4,75 g de ácido 2-bromo-hexadecanóico (14,2 mmol) em 100 ml de acetona. A esta solução foram adicionadas gota a gota, durante 2 horas, 2,49 g de DDM (12,7 mmol) em 100 ml de acetona. A mistura reaccional ficou com agitação em banho de gelo durante 13 horas e à temperatura ambiente durante 10 horas.

O solvente foi removido a pressão reduzida e o óleo amarelo obtido foi purificado através de cromatografia em coluna com sílica gel 60 com ciclohexano/acetato de etilo (4:1).

No final obteve-se 6,04 g de óleo amarelo claro com um rendimento de 94,0%. R_f ciclohexano/acetato de etilo (4:1) = 0,90.

- ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , SiMe_4 , δ): 0,93 (t, 3H, $J=6,8$ Hz, CH_3), 1,17-1,42 (m, 24H, CH_2), 1,98-2,20 (m, 2H, CHBr-CH_2), 4,35 (t, 1H, $J=7,4$ Hz, CHBr), 6,94 (s, 1H, $\text{C}=\text{HPh}_2$), 7,30-7,43 (m, 10H, Ph_2).

3.3.6.2 – 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexadecanoato de benzidrilo (6.2)

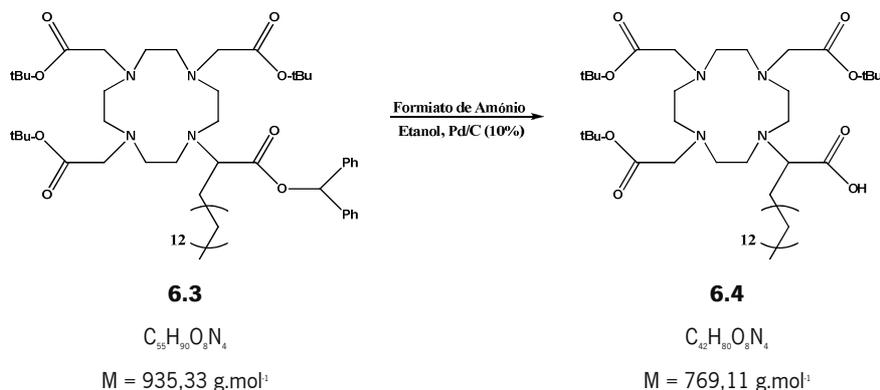


Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveram-se 246,2 mg de 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (1,44 mmol) em 10 ml de DCM. A esta solução foram adicionadas gota a gota, durante 1 hora e 20 minutos, 556,1 mg de 2-bromohexadecanoato de benzidrilo (1,12 mmol) dissolvido em 10 ml de DCM. A mistura reaccional ficou com agitação à temperatura ambiente durante 24 horas.

A mistura reaccional foi filtrada sob vácuo e o solvente removido a pressão reduzida. O óleo obtido foi purificado através de cromatografia em coluna com sílica gel 60 com DCM/EtOH (7:3).

No final obteve-se 279,4 mg de um óleo amarelo com um rendimento de 42,5%. R_f DCM/EtOH (7:3) = 0,31.

3.3.6.4 – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-hexadecanóico-4,7,10-triacetato de t-butilo (6.4)



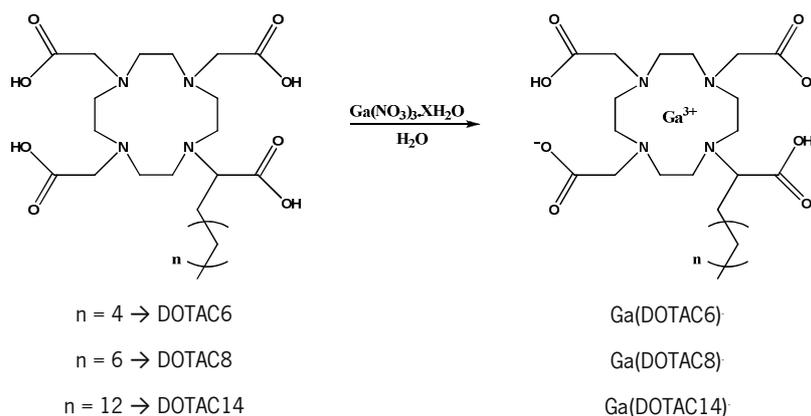
Num balão de fundo redondo de três bocas (100 ml) dissolveram-se 359,7 mg do composto **6.3** (0,39 mmol) em 40 ml de etanol e adicionou-se 181,2 mg de Pd/C (10%). A esta suspensão foram adicionados 194,0 mg de formiato de amónio (3,01 mmol) e a mistura reaccional ficou com agitação, em refluxo e sob atmosfera de azoto durante 1 hora e 25 minutos.

A mistura reaccional foi filtrada sobre celite, de modo a remover o carvão, sendo a celite posteriormente lavada com 100 ml de etanol. O solvente foi removido a pressão reduzida e o crude foi lavado com 3x70 ml de água, sendo esta filtrada através de uma membrana de celulose e posteriormente removida a pressão reduzida.

No final obteve-se 290,1 mg de um sólido amarelo claro com um rendimento de 98,1%.
 R_f DCM/EtOH (7:3) = 0,55.

- ^1H RMN (300 MHz, D_2O , SiMe₄, δ): 0,84-0,96 (m, 3H, CH₃), 1,15-1,43 (m, 24H, CH₂), 1,15-1,90 (m, 29H, C(CH₃)₃, CHN-CH₂), 2,40-4,40 (m, 22H, NC-CH₂, CH₂-COO*t*Bu).

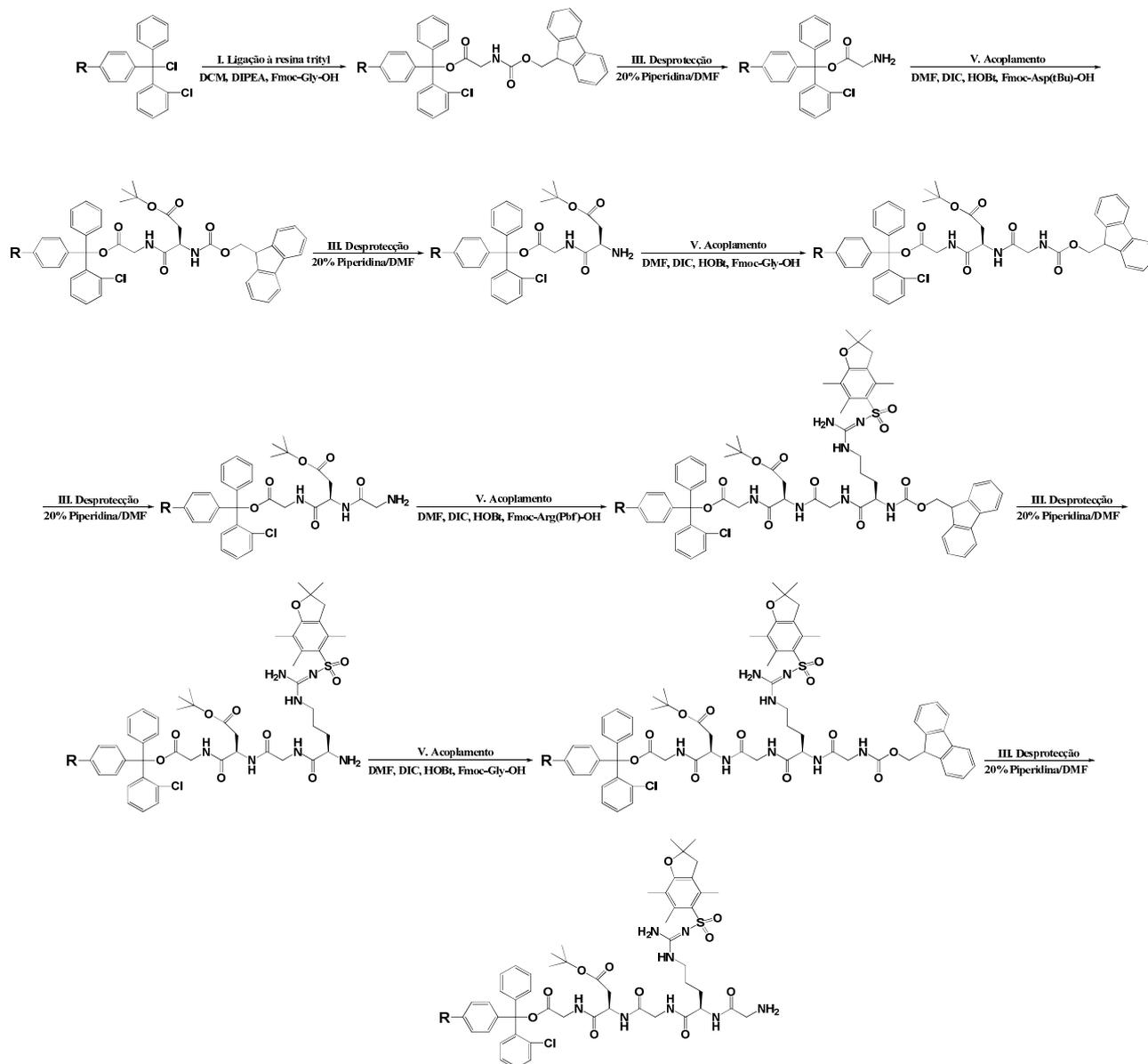
3.3.7 – Complexação dos ligandos DOTAC6, DOTAC8 e DOTAC14 com Ga(III)



Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveu-se 1 equivalente do respectivo ligando em cerca de 8 ml de água destilada. A esta solução foi adicionado 1 equivalente de nitrato de gálio hidratado e o pH foi ajustado para 3, com uma solução de hidróxido de potássio 1 M. A solução foi aquecida até cerca dos 80 °C durante 1 hora, o pH foi novamente ajustado com uma solução de hidróxido de potássio 1M para o valor de 6 e posteriormente o solvente foi removido através do processo de liofilização. No final obteve-se um sólido branco/amarelado.

3.3.8 – Síntese em fase sólida do péptido Gly-Arg-Gly-Asp-Gly (GRGDG)

O péptido foi sintetizado em fase sólida a partir do terminal C, através da técnica de Fmoc e de acordo com o esquema seguinte:



Esquema 3 – Síntese em fase sólida do péptido GRGDG.

I. Ligação à resina

- 1) Pesou-se cerca de uma 1,0 g de resina 2-clorotritilcloreto PS (2-Cl(Trt)-Cl, 1,0 mmol.g⁻¹) e deixou-se a resina juntamente com o material de vidro no exsiccador durante 24 horas. O exsiccador deve estar sob vácuo e conter lentilhas de KOH;

Parte Experimental

- 2) Dissolveu-se num balão de fundo redondo de 50 ml 1,2 equivalentes de Fmoc-aa-OH (357,3 mg e 360,8 mg) e 4,0 equivalentes de DIPEA (830 μ l) em 10 ml de diclorometano seco;
- 3) Adicionou-se a resina à solução e deixou-se reagir durante 2 horas;
- 4) Filtrou-se a mistura sob vácuo, usando um filtro de cerâmica nº 4 e lavou-se a resina com 3x10 ml de uma solução de DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), 3x10 ml de DCM, 2x10 ml de DMF e 2x10 ml de DCM (todas as lavagens devem ter a duração de cerca de 2 minutos);
- 5) Secou-se a resina no exsiccador.

II. Determinação da quantidade de aminoácido que se ligou à resina

- 1) Preparou-se 25 ml de uma solução de 20% (v/v) de piperidina em DMF;
- 2) Colocou-se cerca de 3 ml da solução numa cuvete de quartzo e mediu-se a absorvância da solução anterior a 290 nm no espectrómetro de U.V./Visível;
- 3) Pesou-se cerca de 1 μ mol de resina ligada ao aminoácido (aproximadamente 1 mg), adicionou-se 3 ml da solução de piperidina e agitou-se cerca de 3 minutos;
- 4) Deixou-se a resina assentar no fundo da cuvete e mediu-se a absorvância a 290 nm;
- 5) Estimou-se a quantidade de aminoácido ligado à resina através da seguinte equação:

$$\text{Aminoácido acoplado (mmol.g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorvância}_{\text{Amostra}}}{1,65 \times \text{mg (resina)}}$$

Obteve-se um grau de acoplamento de 0,485 mmol.g⁻¹ e 0,517 mmol.g⁻¹.

III. Clivagem do grupo Fmoc

- 1) Lavou-se a resina com 2x10 ml de DMF durante 2 minutos;
- 2) Lavou-se a resina com 1x10 ml de uma solução de 20% (v/v) piperidina em DMF durante 3 horas;
- 3) Lavou-se a resina com 2x10 ml de DMF durante 2 minutos;
- 4) Lavou-se a resina com 2x10 ml de 2-propanol durante 2 minutos;

- 5) Repetiram-se os passos 3) e 4).

IV. Teste do Ácido 2,4,6-Trinitrobenzenesulfónico (TNBS)

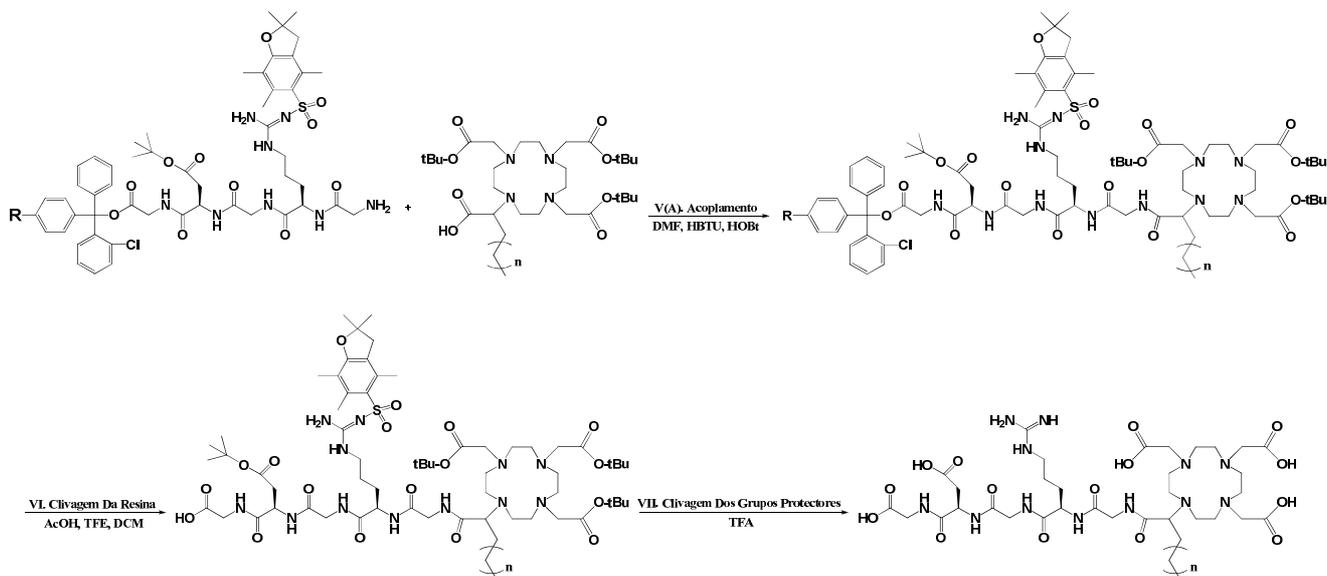
O teste do TNBS foi efectuado de acordo com o método 14 do catálogo da Novabiochem (p S23).

- 1) Retiraram-se algumas pérolas de resina, que foram colocadas num frasco de amostra e lavadas 3 vezes com DMF;
- 2) Adicionaram-se 2 gotas de uma solução 10% (v/v) de DIPEA em DMF, 2 gotas de uma solução 1% (v/v) de TNBS em DMF;
- 3) Passados 5 minutos verificou-se que a resina possuía uma cor vermelha, que indicava que o terminal amina estava livre.

V. Acoplamento dum aminoácido protegido com o grupo Fmoc

- 1) Num balão de fundo redondo de 100 ml dissolveram-se 4 equivalentes de Fmoc-aa-OH (1,92 mmol e 2,07 mmol), 4 equivalentes de HOBt e 4 equivalentes de DIC em 10 ml de DMF (os equivalentes são relativos ao nível de acoplamento à resina determinado em II);
- 2) Transferiu-se a solução para o recipiente de reacção que continha a resina e deixou-se a agitar durante 20 horas à temperatura ambiente;
- 3) Filtrou-se a resina e lavou-se com 3x10 ml de DMF e 3x10 ml de DCM (todas as lavagens devem ter a duração de cerca de 2 minutos);
- 4) Determinou-se a ocorrência da reacção através do teste do TNBS, onde se obteve sempre uma resina com cor amarela, significando que o terminal amina não estava livre;
- 5) Os procedimentos III), IV) e V) repetiram-se com os diferentes aminoácidos até a sequência peptídica estar terminada.

3.3.9.1,2,3,4 – Acoplamento dos agentes pró-quelantes ao péptido GRGDG



Esquema 4 – Acoplamento do agente pró-quelante ao péptido GRGDG.

V(A). Acoplamento do agente pró-quelante

- 1) Num balão de fundo redondo de 100 ml dissolveram-se 2,1 e 2,0 ($n=2 \rightarrow 0,095$ mmol e 0,216 mmol); 1,6 ($n=4 \rightarrow 0,157$ mmol); 2,0 ($n=6 \rightarrow 0,441$ mmol) ou 2,0 ($n=12 \rightarrow 0,423$ mmol) equivalentes (os equivalentes são relativos ao grau de acoplamento à resina determinado em II) de agente pró-quelante, 8 equivalentes de HOBt e 4 equivalentes de HBTU em 10 ml de DMF (os equivalentes são relativos ao agente pró-quelante);
- 2) Deixou-se a solução a agitar à temperatura ambiente durante 45 minutos, adicionou-se 1 equivalente de trietilamina (relativos ao nível de acoplamento determinado em II) à solução e transferiu-se a solução para o recipiente de reacção que continha a resina e deixou-se a agitar durante 2 dias à temperatura ambiente;
- 3) Filtrou-se a resina e lavou-se com 3x10 ml de DMF e 3x10 ml de DCM (todas as lavagens devem ter a duração de cerca de 2 minutos);
- 4) Determinou-se a ocorrência da reacção através do teste do TNBS, onde se obteve sempre uma resina com cor amarela, significando que o terminal amina não estava livre.

VI. Clivagem da resina

- 1) Lavou-se a resina com 20 ml de uma mistura de AcOH/TFE/DCM (1:1:3) durante 2 horas à temperatura ambiente;
- 2) Transferiu-se a solução para um balão de fundo redondo de 100 ml e concentrou-se a pressão reduzida;
- 3) Lavou-se a resina com 3x10 ml da mesma solução, combinaram-se as soluções de lavagem no mesmo balão de fundo redondo e voltou-se a concentrar a pressão reduzida;

VII. Clivagem dos grupos protectores

- 1) Ao balão de fundo redondo mencionado anteriormente adicionou-se 1 ml de TFA e deixou-se reagir à temperatura ambiente durante 5 horas;
- 2) Concentrou-se a solução a pressão reduzida;
- 3) Adicionou-se um pouco de éter etílico ao balão (o conjugado precipitou) e colocou-se no frigorífico durante 30 minutos;
- 4) A suspensão foi filtrada sob vácuo numa placa de cerâmica e o sólido foi lavado com éter etílico;
- 5) No final obteve-se 28,2 mg e 63,9 mg (n=2); 57,9 mg (n=4); 41,6 mg (n=6) e 70,4 mg (n=12) de um sólido amarelo claro.

Cada uma das amostras dos bioconjugados, assim como uma amostra do péptido foram analisadas através de espectrofotometria de ^1H RMN, HPLC e espectrometria de massa (ESI^+).

^1H RMN:

Nas análises de ^1H RMN, as amostras foram dissolvidas em DMSO deuterado e TFA. Apesar de se terem obtido os espectros bidimensionais do péptido GRGDG, a atribuição de cada um dos sinais ao respectivo protão não foi completamente possível, pois alguns sinais encontravam-se sobrepostos e com falta de resolução. Assim, em certos casos não se fez a atribuição ou a atribuição foi feita a um conjunto de sinais e não ao sinal individual, tendo em conta o desvio químico em que se encontrava(m) o(s) sinal(ais) e a integração que possuía(m). A atribuição está descrita no parágrafo seguinte, ao passo que o espectro se encontra no anexo 2.

- ^1H RMN (300 MHz, DMSO, SiMe_4 , δ): 1,39-1,88 (m, 4H, H9 e H10), 2,35-2,76 (m, 2H, H4), 2,90-3,23 (m, 2H, H11), 3,46-3,94 (m, 6H, H1, H6 e H13), 4,21-4,47 (m, 1H, H8), 4,47-4,67 (m, 1H, H3), 7,58-8,10 (m, 1H, H2), 8,10-8,36 (m, 1H, H5), 8,36-8,54 (m, 1H, H7), 8,63-8,82 (m, 1H, H12).

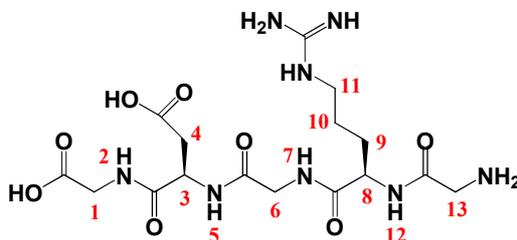


Figura 19 – Estrutura do GRGDG.

No caso dos bioconjugados, a atribuição ainda se tornou mais complexa devido ao facto de haver mistura de bioconjugado e péptido livre na amostra. Como tal, a presença do bioconjugado na amostra foi detectada através da comparação dos espectros do péptido e do bioconjugado, diferenças essas que residem na integração dos sinais dos protões das ligações amida; no aparecimento de um tripleto entre 0,75 e 0,95 ppm, respeitante ao CH_3 da cadeia alquílica; e de um aglomerado de sinais entre 2,50 e 4,00 ppm, respeitante aos protões etilénicos e do cicleno (Consultar anexo 3).

HPLC:

Nas análises realizadas no HPLC analítico, as amostras foram dissolvidas numa solução de 0,1% de TFA em água/ACN (9:1), onde a fase móvel era constituída pela mesma solução. Os ensaios foram realizados com injecções de 10 µl, a um fluxo de fase móvel de 0,8 ml.min⁻¹ e com a detecção a 230 nm.

Nas purificações realizadas no HPLC preparativo, as amostras foram dissolvidas em água e o pH foi posteriormente acertado para um valor próximo de 8 com uma solução aquosa de KOH (1 M), onde a fase móvel era constituída por uma solução de 0,1% de TFA em água/ACN (9:1). Os ensaios foram realizados com injecções de 20 a 30 µl, a um fluxo de fase móvel de 1,0 ml.min⁻¹ e com a detecção a 230 nm.

Tabela 6 – Valores dos tempos de retenção e percentagem na amostra obtidos através da análise por HPLC em cada uma das amostras antes da purificação.

Amostra	Péptido (min.) / % relativa	Bioconjugado (min.) / % relativa
GRGDG	4,075 (100)	0
DOTAC4-GRGDG	4,106 (< 1)	7,239 (> 99)
DOTAC6-GRGDG	4,081 (< 10)	7,679 (≈ 85)
DOTAC8-GRGDG	4,136 (≈ 20)	7,654 (≈ 65)
DOTAC14-GRGDG	4,205 (≈ 25)	7,649 (≈ 50)

Através da análise dos tempos de retenção e das percentagens relativas (Tabela 6) pode-se verificar que em todas as amostras analisadas de bioconjugado, estas possuem uma percentagem considerável do respectivo bioconjugado. Contudo, pode-se verificar que à medida que o tamanho da cadeia lateral aumenta, a percentagem de bioconjugado diminui e a percentagem de péptido livre aumenta.

Ao introduzirem-se as diferentes amostras no HPLC preparativo não se conseguiu purificar uma quantidade suficiente de cada um dos bioconjugados para fazer análises por ¹H RMN e espectrometria de massa credíveis e que conseguissem comprovar uma purificação eficaz. Esta ineficácia na purificação poderá estar relacionada com as semelhanças entre os tempos de retenção dos bioconjugados e do péptido. Outro factor que contribuiu para uma má purificação dos conjugados está relacionado com as dificuldades encontradas no manuseamento do equipamento, pois existiam fugas de fase móvel no injector, levando a uma perda de amostra

e a uma variação da pressão na coluna; e ainda um fluxo por vezes inconstante devido a problemas na bomba.

Espectrometria de massa:

Nas análises de espectrometria de massa (ESI⁺), as amostras foram dissolvidas em 1 ml de ACN e 10 µl de TFA.

Tabela 7 – Valores dos picos de massa obtidos na análise de massa de cada uma das amostras antes da purificação e respectivas massas exactas.

Amostra	m/z (intensidade relativa)	Massa exacta
GRGDG	461,21 (MH ⁺ , 100)	460,20
DOTAC4-GRGDG	461,21 (MH ⁺ , 43,2); 903,46 (MH ⁺ , 32,6)	902,45
DOTAC6-GRGDG	461,21 (MH ⁺ , 100); 931,49 (MH ⁺ , 22,6)	930,48
DOTAC8-GRGDG	461,21 (MH ⁺ , 100); 480,24 (MH ₂ ²⁺ , 6,8)	958,51
DOTAC14-GRGDG	461,21 (MH ⁺ , 100); 522,31 (MH ₂ ²⁺ , 5,3)	1042,60

Através da análise da área dos picos e da intensidade relativa (Tabela 7) pode-se verificar que em todas as amostras analisadas de bioconjugado, estas possuem uma percentagem do respectivo bioconjugado. Contudo, pode-se verificar que à medida que o tamanho da cadeia lateral aumenta, a percentagem de bioconjugado diminui. Estes dados estão em concordância com os dados recolhidos nas análises por HPLC, mas também se pode verificar que a intensidade relativa dos picos é bastante menor. Esta diminuição da intensidade relativa pode estar relacionada com o facto de no final da purificação não se ter obtido uma quantidade suficiente de cada um dos bioconjugados para fazer análises por ¹H RMN e espectrometria de massa que conseguissem comprovar uma purificação eficaz, isto é, a quantidade real de bioconjugado existente em cada amostra era menor do que o esperado, e por consequência, a quantidade de conjugado obtido no final da purificação mostrou ser muito reduzida.

3.4 – Titulação dos ligandos

Devido ao último passo da síntese dos agentes quelantes (remoção dos grupos protectores com TFA), estes compostos ficam na forma de sal de TFA em que o número de unidades de TFA por agente quelante pode ser variável. De modo a conhecer quantidade real (mol) de agente quelante por unidade de massa (mg), foi feita a aferição de cada um dos agentes quelantes.

O método utilizado na aferição encontra-se descrito na literatura^[Basset 1978]. Em cada ensaio pesou-se com exactidão cerca de 10 mg de ligando, que foram dissolvidos num pequeno volume de água. Adicionou-se 5 ml de uma solução aferida de Al(III) (7,46 mM), acertou-se o pH para o valor de 4 com uma solução de amónia (1 M) e aqueceu-se a cerca de 80 °C durante uma hora. Posteriormente adicionou-se 5 ml de uma solução tampão amónia/amónio (pH =10) e 25 ml de uma solução aferida de EDTA (4,89 mM), de modo a complexar o Al(III) em excesso, e aqueceu-se a solução a cerca de 80 °C durante 30 minutos. Esta solução foi retrotitulada com uma solução padrão de Ca(II) (7,11 mM), usando como indicador o negro de eriocromo T (NET)^[Skog 1991].

A solução de Al(III) foi preparada a partir do sal de nitrato de alumínio nona hidratado ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) e padronizada através do método referido anteriormente, isto é, a 5 ml de solução de Al(III) adicionaram-se 5 ml de uma solução tampão amónia/amónio (pH =10) e 25 ml de uma solução aferida de EDTA (4,89 mM), e aqueceu-se a solução a cerca de 80 °C durante 30 minutos. Esta solução foi titulada com uma solução padrão de Ca(II) (7,11 mM), usando como indicador o negro de eriocromo T (NET).

A solução de EDTA foi preparada a partir do sal de EDTA na forma dissódica ($\text{EDTANa}_2\text{H}_2$) e padronizada através duma titulação volumétrica com a solução padrão de Ca(II).

A solução padrão de cálcio foi preparada a partir de carbonato de cálcio de elevado grau de pureza (> 99%).

No anexo 1 encontra-se uma tabela com os valores das massas de ligando e volumes de solução padrão de Ca(II) usados em cada ensaio, bem como os valores das massas molares teóricas obtidas a partir da titulação dos ligandos. Salienta-se a utilização de valores médios das massas de ligando e de volume de solução de Ca(II) utilizados nos cálculos.

3.5 – Determinação do cmc

A agregação e formação de micelas por parte dos compostos anfífilicos ocorre acima de uma concentração micelar crítica. O valor de CMC dos complexos Ga(DOTAC6), Ga(DOTAC8) e Ga(DOTAC14) pode ser determinado por um método de fluorescência através da utilização do ácido sulfónico-8-anilino-1-naftaleno (ANS) como sonda fluorescente. Esta molécula aromática possui propriedades fluorescentes consoante a polaridade do meio em que se encontra, isto é, em meios polares como a água não floresce, ao passo que em meios apolares como o interior das micelas é bastante fluorescente^[Birdi 1979].

As intensidades de emissão do ANS foram obtidas a 25 °C, em microplacas optimizadas para fluorescência, onde o comprimento de onda de excitação usado foi de 350 nm, ao passo que o comprimento de emissão registado foi de 480 nm. As medições foram efectuadas em solução tampão fosfato 1 M (pH = 7,4), em que cada poço da microplaca continha uma quantidade conhecida de quelato e 1×10^{-5} M de ANS. Os valores de CMC foram determinados através do ajuste linear (recta de regressão) aos pontos obtidos no gráfico da intensidade da fluorescência a 480 nm em função da concentração de quelato anfífilico^[Birdi 1979, De Vendittis 1981].

3.6 – Determinação dos coeficientes de partição octanol/água (LogP)

O coeficiente de partição do complexo $^{67}\text{Ga}(\text{DOTAC8})$ foi determinado através do método “shake-flask”. Para tal, foi preparada uma solução aquosa de $^{67}\text{Ga}(\text{DOTAC8})$ através da dissolução do ligando DOTAC8 e citrato de ^{67}Ga em água destilada numa proporção de 10:1, sendo posteriormente o pH ajustado para 7 através da adição de uma solução de NaOH (0,1 M).

Num tubo de ensaio contendo 1,0 ml de uma solução salina e 1,0 ml de 1-octanol foram adicionados 25 µl de solução previamente preparada. O tubo foi mantido em agitação durante 1 hora e posteriormente centrifugado durante 3 minutos a 3000 rot.min⁻¹. Após a centrifugação foram recolhidos 100 µl de cada uma das fases e mediu-se a radioactividade com um contador de poço. Repetiu-se este procedimento cinco vezes. A razão entre a actividade presente na fase orgânica e na fase aquosa permite determinar o coeficiente de partição, sendo o desvio padrão < 0,01.

3.7 – Estabilidade no soro sanguíneo

A 3 ml de soro humano fresco, previamente equilibrado a 37 °C em ambiente de 5% de CO₂ e 95% de ar, foi adicionado 5 Ci de solução de ⁶⁷Ga(DOTAC8), sendo a mistura posteriormente encubada a 37 °C em ambiente de 5% de CO₂ e 95% de ar. Em períodos de tempo apropriados (0 min, 30 min, 1 h e 3 h) foram retiradas três amostras de 100 µl da solução anterior, tratadas com 200 µl de etanol, arrefecidas até 4 °C e centrifugadas durante 15 minutos a 500 g e 4 °C para precipitar as proteínas do soro. Foram retirados 100 µl do sobrenadante resultante para medição da actividade, sendo a actividade resultante da radioactividade medida com um contador de poço. O sedimento foi lavado 2 vezes com 1 ml de etanol e a actividade novamente medida. A actividade do sobrenadante foi comparada com a actividade no sedimento para dar a percentagem do quelato ligada às proteínas.

3.8 – Estudos de biodistribuição e imagem cintigráfica

As imagens γ foram obtidas em ratos Wistar com pesos aproximados de 200 a 300 g tendo sido utilizados em cada experiência grupos de três a seis animais. Utilizaram-se indiferentemente machos e fêmeas. Todas as experiências com animais foram realizadas de acordo com as normas nacionais para este tipo de experiências. Os ratos, desde que conscientes, tiveram sempre livre acesso a comida e a água. Para a obtenção de imagens os ratos foram anestesiados com ketamina (50mg/ml) /clorpromazina (2.5%) (10:3).

Consoante as experiências, os animais foram injectados na veia da cauda ou na veia femoral (neste caso cateterizada) com doses médias de cerca de 150 µCi dos diferentes complexos radioactivos. Os animais foram colocados em *decubitus* dorsal ou ventral sobre o detector, consoante o local de injeção tivesse sido a veia femoral ou da cauda. Utilizou-se um colimador convergente. A aquisição das imagens iniciou-se imediatamente antes da injeção do radiofármaco. Obtiveram-se sequências de 180 imagens (de 10 segundos cada) em matrizes 64 x 64. Dependendo das experiências, foram obtidas, com os mesmos animais, imagens estáticas às 24, 48 e por vezes 72 h. As aquisições estáticas foram realizadas durante 10 minutos em matrizes de 124 x 124.

A aquisição dinâmica permitiu-nos analisar o transporte e biodistribuição dos radiofármacos em função do tempo. Desenharam-se nos ficheiros de imagens regiões de

interesse correspondentes a órgãos ou a zonas do corpo do animal (e.g. tórax, fígado, rim etc.). A partir destas RIs foi possível obter curvas regionais actividade/tempo utilizando um programa adaptado no Serviço de Biofísica da FMUC de um programa IDL (Interactive Data Language, Research Systems, Boulder, CO, USA). Este *software* permite o desenho das regiões de interesse e o cálculo da actividade por pixel em função do tempo.

4 – Resultados

4.1 – Determinação do cmc

Nas figuras 20, 21 e 22 estão ilustrados os valores de intensidade de fluorescência do ANS na presença dos complexos Ga(DOTAC6), Ga(DOTAC8) e Ga(DOTAC14), bem como as rectas de regressão linear obtidas para a determinação do cmc.

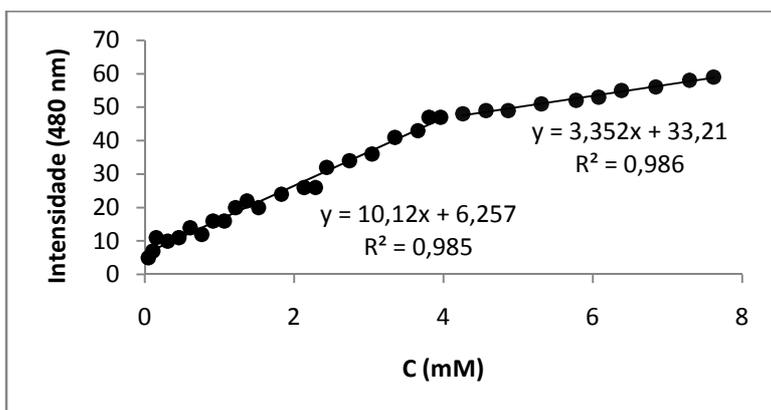


Figura 20 – Intensidade da fluorescência do ANS a 480 nm em função da concentração de Ga(DOTAC6).

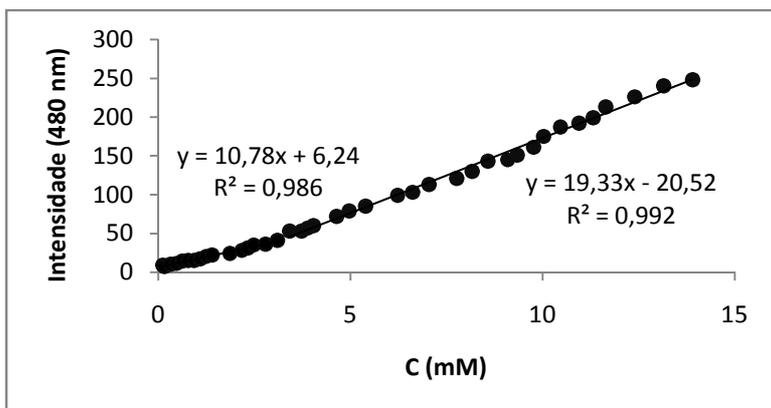


Figura 21 – Intensidade da fluorescência do ANS a 480 nm em função da concentração de Ga(DOTAC8).

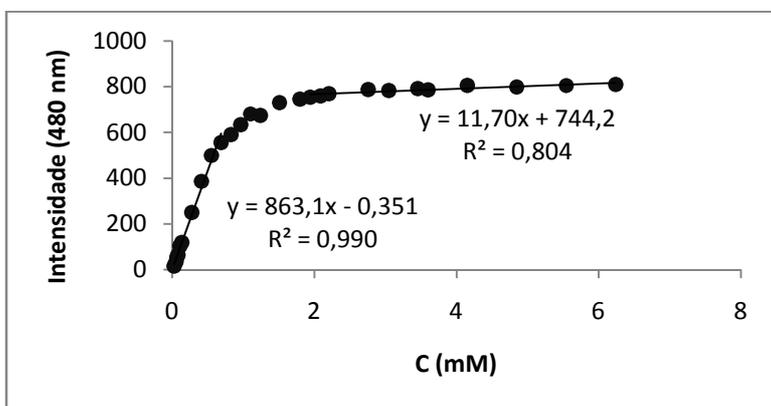


Figura 22 – Intensidade da fluorescência do ANS a 480 nm em função da concentração de Ga(DOTAC14).

Os resultados obtidos para cálculo dos valores de cmc através do ajuste linear aos pontos obtidos no gráfico da intensidade da fluorescência a 480 nm em função da concentração encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 – Valores de cmc calculados para cada um dos quelatos de Ga(III).

Quelato	cmc (mM)
Ga(DOTAC6)	3,98
Ga(DOTAC8)	3,13
Ga(DOTAC14)	0,87

4.2 – Determinação dos coeficientes de partição octanol/água (LogP)

Na tabela 9 encontram-se os valores obtidos no cálculo do coeficiente de partição octanol/água para os quelatos Ga(DOTAC6), Ga(DOTAC8) e Ga(DOTAC14).

Tabela 9 – Valores de Log(p) dos complexos de Ga³⁺.

Quelato	LogP
Ga(DOTAC6)	-2,83
Ga(DOTAC8)	-1,50
Ga(DOTAC14)	0,27

4.3 – Estabilidade no soro sanguíneo

Na figura 23 está ilustrada a percentagem de actividade ⁶⁷Ga(DOTAC8) em proteínas do soro humano em função do tempo.

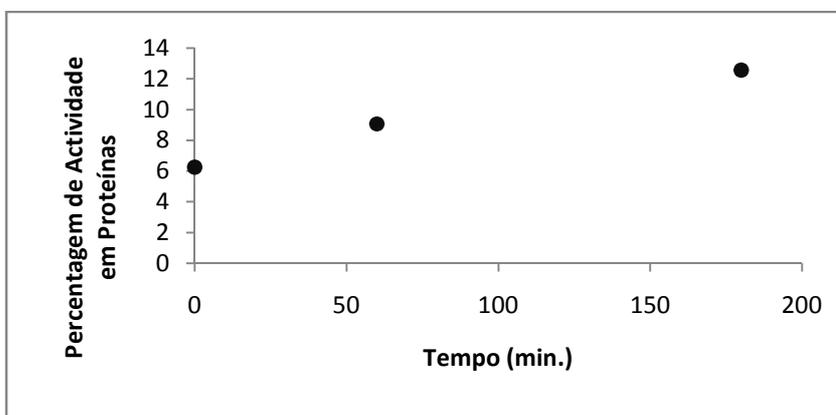


Figura 23 – percentagem de actividade ⁶⁷Ga(DOTAC8) em proteínas do soro humano em função do tempo.

A actividade presente no sobrenadante ao fim de 180 minutos foi analisada através de TLC e verificou-se que o quelato permanecia na sua forma intacta, ou seja, não se deu o fenómeno de transmetalacão.

4.4 – Biodistribuições

Nas figuras 24 e 25 pode observar-se a biodistribuição dos complexos $^{67}\text{Ga}(\text{DOTAC8})$ e $^{67}\text{Ga}(\text{DOTAC14})$ nos diversos órgãos de ratos Wistar.

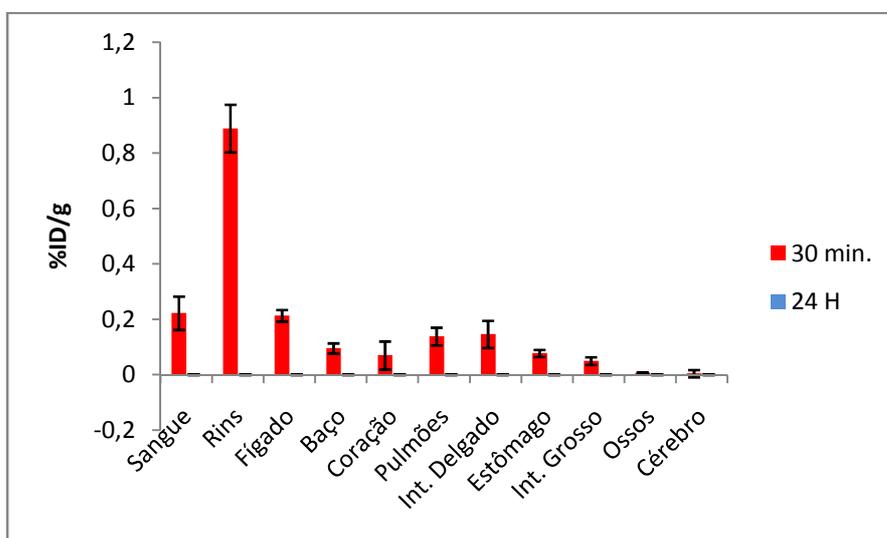


Figura 24 – Biodistribuição do $^{67}\text{Ga}(\text{DOTAC8})$, % de dose injectada por grama de órgão (%ID/g) 30 minutos e 24 horas após a injeção intra-venosa em ratos Wistar.

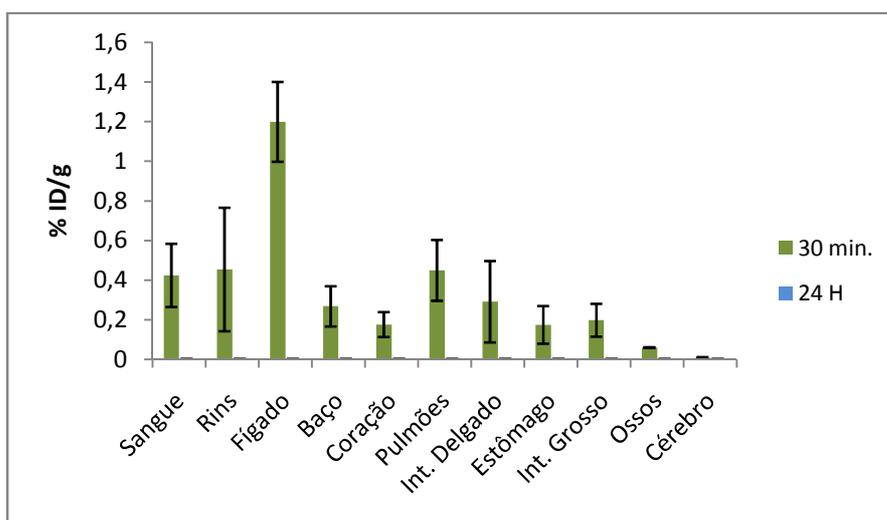


Figura 25 – Biodistribuição do $^{67}\text{Ga}(\text{DOTAC14})$, % de dose injectada por grama de órgão (%ID/g) 30 minutos e 24 horas após da injeção intra-venosa em ratos Wistar.

4.5 – Imagens cintigráficas

A figura 26 representa as imagens cintigráficas obtidas através da injeção do complexo $^{67}\text{Ga}(\text{DOTAC8})$ em ratos Wistar.

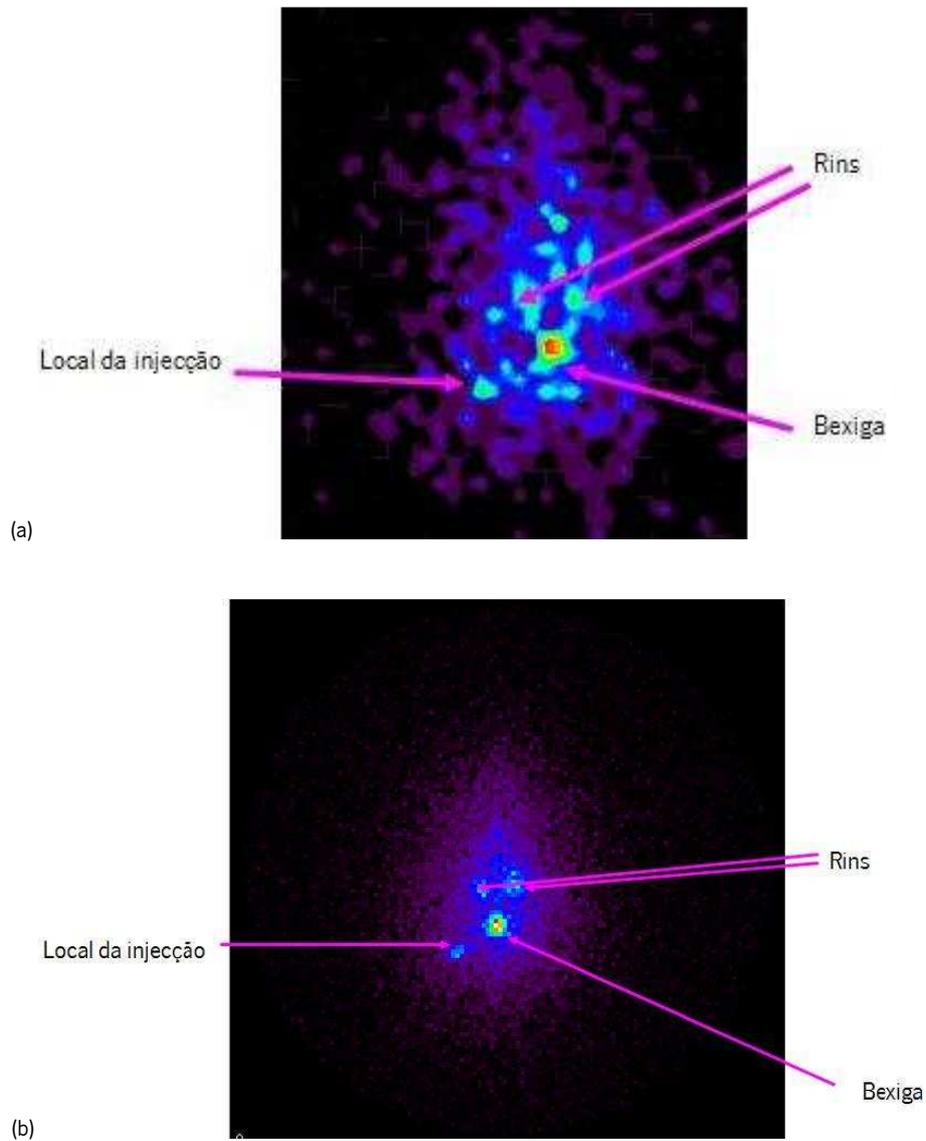


Figura 26 – Imagem cintigráfica de um rato Wistar injectado com $^{67}\text{Ga}(\text{DOTAC8})$, (a) 30 minutos após a injeção, (b) 24 horas após a injeção.

5 – Discussão

5.1 – Síntese dos ligandos e bioconjugados

Inicialmente os ligandos do tipo DOTACn foram concebidos para a complexação de Gd(III) de modo a potencialmente serem usados em MRI, visto a formação de micelas aumentar o tempo de correlação rotacional (τ_r) do agente de contraste, aumentando a sua relaxividade^[Nicolle 2002].

No presente estudo, a síntese dos vários ligandos baseou-se parcialmente nos métodos utilizados por Nicolle et al^[Nicolle 2002] e os resultados obtidos do ponto de vista de rendimento não diferiram muito daqueles referidos na literatura. O único passo onde os rendimentos obtidos foram significativamente inferiores (cerca de 30 a 40%) foi o passo da mono-alquilação do ciclono. Estes resultados poderão ser explicados pela diminuição do excesso de ciclono em relação à quantidade de éster, isto é, o excesso de ciclono usado neste passo (excesso de 0,3 equivalentes) foi inferior ao valor reportado na literatura, originando uma quantidade superior de produto di-alquilado.

Uma das diferenças apresentadas na síntese dos agentes quelantes residiu no facto de também se ter substituído o grupo protector *t*-butilo pelo grupo protector benzidrílo. Esta substituição tornou-se numa vantagem significativa pois permitiu a síntese de agentes pró-quelantes protegidos ortogonalmente, isto é, em termos práticos poderiam desproteger-se todos os grupos protectores em simultâneo em condições ácidas ou poderia clivar-se somente o éster benzidrílico utilizando condições redutoras (hidrogénio). A obtenção de um agente pró-quelante mono-desprotegido permite o acoplamento a uma biomolécula.

Entre as várias biomoléculas com interesse médico, optou-se pela síntese e acoplamento de um péptido derivado do RGD, o GRGRD, visto os conjugados baseados em RGD's serem actualmente uma família de biomoléculas que estão na base de vários estudos *in vitro* e *in vivo* com resultados positivos. A síntese deste péptido foi totalmente efectuada em fase sólida, bem como o seu acoplamento ao agente pró-quelante. Apesar dos dados obtidos por ¹H RMN, espectrometria de massa e HPLC apontarem para um acoplamento eficaz, foi impossível isolar de uma forma pura os bioconjugados do péptido, e como tal determinar o grau de acoplamento destes. Através da análise desses mesmos dados pode-se observar uma diminuição da percentagem de agente pró-quelante ligado ao péptido, à medida que o tamanho da cadeia alquílica do agente pró-quelante aumentava. Este fenómeno provavelmente deverá ocorrer

devido ao impedimento estereoquímico que o aumento da cadeia alquílica impõe, dificultando a aproximação dos centros reactivos.

5.2 – Determinação do cmc e dos coeficientes de partição octanol/água (LogP)

Os valores de LogP e de cmc são parâmetros indicadores da hidrofiliicidade/lipofiliicidade de uma molécula. O valor de LogP permite medir a quantidade de molécula dispersa entre dois solventes com polaridades opostas. O valor de CMC consiste na concentração mínima em que um composto anfífilico começa a agregar-se em micelas. Neste estudo usaram-se compostos anfífilicos com partes polares idênticas (ligandos tetraazapolicarboxilato complexados com Ga(III)), onde as diferenças observadas residiam no comprimento da cadeia alquílica. Assim, seria de esperar que quanto maior fosse o tamanho da cadeia carbonada, menor seria a concentração necessária para que os complexos se agreguem em micelas, isto é, menor seria o valor do CMC do complexo.

Ao analisarem-se os resultados obtidos na determinação do LogP (1-octanol/água) verificou-se que o aumento da cadeia carbonada origina um aumento dos valores de LogP, isto é, os valores passam de negativos para positivos. Estes resultados seriam de esperar, pois significa que os complexos têm maior tendência a permanecer na fase orgânica à medida que a cadeia alquílica aumenta, denotando uma diminuição da hidrofiliicidade. Aliás, os complexos Ga(DOTAC6) e Ga(DOTAC8) possuem valores de LogP negativos, indicando que a maioria destas partículas se distribuem pela fase aquosa, ao passo que o complexo Ga(DOTAC14), possuindo um valor de LogP positivo, tem uma distribuição maioritária na fase orgânica.

Se analisarmos os resultados obtidos na determinação do cmc verifica-se a tendência evidenciada anteriormente, isto é, o valor de cmc é tanto menor quanto maior o tamanho da cadeia alquílica. Apesar destes três complexos serem estruturalmente muito idênticos, o seu comportamento em solução aquosa parecer possuir algumas diferenças. Seria de esperar que antes de se atingir o valor de cmc, a intensidade de fluorescência aumentasse pouco com o aumento da concentração de complexo. Por outro lado, após o valor de cmc a intensidade de fluorescência deveria aumentar bastante com o aumento da concentração, tal como acontece com o quelato Ga(DOTAC8). Este comportamento seria o mais previsível, pois a partir do valor de cmc, o número de micelas no meio é maior e como tal a quantidade de ANS encapsulado no

interior das micelas também é maior. Contudo, os complexos Ga(DOTAC6) e Ga(DOTAC14) mostraram um comportamento contraditório daquele esperado, aliás no caso do Ga(DOTAC14), a intensidade da fluorescência aumenta bastante antes do valor de cmc, e após o cmc os valores da intensidade praticamente não sofrem alterações. Como as amostras não foram sonificadas antes dos ensaios, esta diferença na variação da intensidade de fluorescência com a concentração do quelato pode ser explicada por alguma agregação pré-micelar dos diferentes complexos, isto é, poderá existir uma interacção entre as diferentes partículas originando agregados supramoleculares^[Torres 2008] que podem encapsular o ANS. Esta sugestão só poderia ser confirmada através de dados recolhidos por DLS em amostras com e sem sonificação, de modo a determinar o tamanho das partículas.

Ao comparar-se o valor de cmc obtido para o complexo Ga(DOTAC14) com o valor obtido por Nicolle et al^[Nicolle 2002] para o complexo de Gd(DOTAC14) verifica-se que o valor é exactamente igual (CMC = 0,87 mM). Estes resultados foram encarados como algo surpreendentes devido ao facto do Gd(III) ser um ião nonacoordenado. A diferença do número de coordenação existente entre os dois iões metálicos origina complexos de carga eléctrica diferentes, porque no caso do gadolínio todos os carboxilatos são usados na coordenação, ao passo que no caso do gálio só são usados dois. À partida os dois carboxilatos livres podem interagir de uma forma mais forte com as moléculas de solvente no meio, o que levaria a um valor de cmc diferente, devido às diferenças nas interacções inter-moleculares que os dois complexos podem possuir. Por outro lado, nestes dois estudos foram usadas técnicas de determinação do cmc diferentes (relaxometria para o Gd(DOTAC14)), pelo que os respectivos valores de cmc não são directamente comparáveis.

5.3 – Estabilidade no soro sanguíneo

O estudo de estabilidade do quelato Ga(DOTAC8) no soro sanguíneo foi realizado de modo a determinar se este quelato se liga ou não às componentes proteicas do soro e de modo a perceber se os complexos do tipo Ga(DOTACn) são inertes em condições biológicas.

Verifica-se que a quantidade de complexo Ga(DOTAC8) ligado às proteínas do sangue vai aumentando com o tempo. Contudo, o facto de passadas três horas só uma pequena fracção de quelato se encontrar ligado às proteínas significa que a sua afinidade para estas moléculas não é muito elevada. Os dados obtidos por TLC revelaram que o quelato presente no sobrenadante se

mantém intacto passadas três horas, revelando uma elevada estabilidade cinética por parte do complexo. Contudo, seriam precisos mais estudos para confirmar a inércia do quelato, nomeadamente estudos na presença de excesso de um ligando competitivo ou na presença de gálio frio de modo a determinar o grau de troca do ião metálico.

5.4 – Biodistribuições e imagens cintigráficas

Estudos de biodistribuição realizados com os quelatos Ga(DOTAC8) e Ga(DOTAC14) revelaram resultados bastantes distintos.

Para o quelato Ga(DOTAC14), a maior captação aos 30 minutos após a injeção ocorreu no fígado, o que pode ser atribuído ao seu carácter lipofílico. Contudo, outros tecidos também apresentaram uma captação considerável, tais como os pulmões, sangue, baço e rins. O facto de todos os órgãos mencionados possuírem uma alta taxa de irrigação sanguínea pode explicar a captação do agente nestes tecidos. A partir da análise dos resultados de Torres et al.^[Torres 2008], onde também foram estudados complexos anfífilicos, seria de esperar que a acumulação deste quelato fosse mais elevada nos pulmões. Segundo Torres et al.^[Torres 2008], quando os ensaios foram realizados sem sonificação e abaixo do CMC, formavam-se agregados pré-micelares que ficavam retidos nos capilares pulmonares. Este fenómeno parece não ocorrer no caso do Ga(DOTAC14). Contudo, esta hipótese só poderia ser testada com dados adquiridos por DLS, de modo a determinar o tamanho dos agregados e compará-lo com a espessura dos capilares.

Em relação ao quelato Ga(DOTAC8), a maior captação aos 30 minutos após a injeção ocorreu nos rins. Isto demonstra que o agente é eliminado principalmente por via renal, o que pode ser explicado pela sua maior hidrofiliabilidade relativamente ao quelato Ga(DOTAC14). Apesar do Ga(DOTAC8) possuir alguma captação no fígado, esta é inferior e é comparável com aquela apresentada no sangue e noutros órgãos. As imagens cintigráficas deste agente vêm comprovar a sua baixa utilidade clínica, pois aos 30 minutos não se conseguem visualizar zonas ou órgãos específicos e as únicas áreas que se conseguem visualizar 24 horas após a injeção são os rins e a bexiga, órgãos esses envolvidos na sua excreção.

De notar que passadas 24 horas, ambos os agentes são completamente eliminados do sistema, o que seria de esperar, principalmente para o Ga(DOTAC8).

6 – Conclusão

Este trabalho teve como objectivo a síntese e o estudo de ligandos e quelatos macrocíclicos anfífilicos da família DOTAC_n, bem como dos seus bioconjugados com o péptido GRGDG. No presente caso, os ligandos DOTAC6, DOTAC8 e DOTAC14 foram sintetizados, purificados e caracterizados com sucesso.

A determinação do LogP (1-octanol/água) dos complexos de Ga(III) dos ligandos mencionados permitiu verificar que o quelato Ga(DOTAC14) possui características hidrofóbicas (LogP positivo), ao passo que os dois restantes quelatos de Ga(III) possuem características hidrofílicas (LogP negativo).

Na determinação do cmc verificou-se que à medida que o número de carbonos na cadeia lateral aumenta, o valor da concentração micelar crítica diminui. O Ga(DOTAC14) é o quelato com menor valor de cmc, sendo este valor igual ao valor reportado na literatura para o complexo de gadolínio do mesmo ligando.

Na comparação entre as biodistribuições obtidas 30 minutos após a injeção dos complexos Ga(DOTAC8) e Ga(DOTAC14) verifica-se que este último possui uma maior captação no fígado, devido ao seu maior carácter lipofílico, ao passo que o Ga(DOTAC8) é captado preferencialmente nos rins, o que demonstra o seu elevado carácter hidrofílico, sendo eliminado rapidamente. Ambos os agentes possuem acumulações significativas noutros tecidos, devido à elevada irrigação sanguínea dos mesmos e são completamente eliminados do sistema passadas 24 horas. Apesar de ambos os complexos possuírem propriedades que não são as mais indicadas para serem usados em imagiologia, o quelato Ga(DOTAC14) possui algumas características interessantes que podem ser exploradas quando este estiver acoplado com o GRGDG. A sua menor hidrofilicidade poderá evitar uma fácil eliminação do bioconjugado quando este estiver presente em sistemas biológicos, e o seu menor CMC poderá permitir a formação de micelas a uma concentração compatível com aquela usada na administração de agentes para imagiologia.

Os bioconjugados DOTAC4-GRGDG, DOTAC6-GRGDG, DOTAC8-GRGDG, DOTAC14-GRGDG foram sintetizados, no entanto a sua purificação e caracterização não foi possível. Os dados obtidos por espectrometria e espectrofotometria parecem evidenciar um acoplamento mais facilitado quando se utiliza um pró-ligando com um menor número de carbonos na cadeia lateral.

Bibliografia

1. Aime S., Botta M., Fasano M., Terreno E., *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 19.
2. Anderegg G., L'Eplattenier F., Schwarzenbach G., *Helv. Chim. Acta.*, **1963**, 46, 1400.
3. André J.P., Toth E., Fischer H., Seelig A., Macke H.R., Merbach A.E., *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 2977.
4. Arino H., Skraba W.J., Kramer H.H., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **1978**, 29, 117.
5. Baes C.F., R.E. Mesmer, "*The Hydrolysis of Cations*", Wiley, New York, **1976**.
6. Bandoli G., Dolmella A., Tisato F., Porchia M., Refosco F., *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, 253, 56.
7. Bassett J., Denney R.C., Jeffery G.H., Mendham J., "*Titrimetric and Gravimetry*" em Vogel's: Textbook of Quantitative Inorganic Analysis, Longman, **1978**, New York
8. Behm C.A., Creaser I.I., Korybot-Daszkiwicz B., Geue R.J., Sargeson A.M., Walker G.W., *J. Chem. Soc.*, **1993**, 24, 19844.
9. Behm C.A., Boreham P.F.L., Creaser I.I., Korybot-Daszkiwicz B., Maddalena D.J., Sargeson A.M., Snowdown G.M., *Aust. J. Chem.*, **1995**, 48, 1009.
10. Benetollo F., Bombieri G., Calabi L., Aime S., Botta M., *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 148.
11. Birdi K.S., Singh H.N., Dalsager S.U., *J. Phys. Chem.*, **1979**, 83, 2733.
12. Bockman R.S., Warrell R.P., Bosco B., Weinerman S., Lane J., *J. Bone Miner. Res.*, **1989**, 4, S167.
13. Brittenham G.M., "*Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload*", em "*Hematology, Basic Principles and Practice*" (R. Hoffman, E.J. Benz, S.J. Shattil, B. Furie, H.J. Cohen), pp 327-349, Churchill Livingstone, New York, **1991**.
14. Brooks P.C., Clark R.A., Cheresh D.A., *Science*, **1994**, 264, 569.
15. Brucer M., G.A. Andrews, Bruner H.D., *Radiology*, **1953**, 61,534.
16. Byegard J., Skarnemark G., Skalberg M., *J. Radioanal. Nuc. Chem. Commun.*, **1999**, 241, 281.
17. Cabiness D.K., Margerum D.W., *J. Am. Soc.*, **1969**, 91, 6540.
18. Cacheris W.P., Nickle S.K., Sherry A.D., *Inorg. Chem.*, **1987**, 26, 958.
19. Cai W., Chen X., *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.*, **2006**, 6, 407.
20. Caravan P., Ellison J.J., McMurry T.J., Lauffer R.B., *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293.

21. Chang C.A., Francesconi L.C., Malley M.F., Kumar K., Gougoutas J.Z., Teewdle M.F., Lee D.W., Wilson L.J., *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 3501.
22. Chaves S., Delgado R., Frausto da Silva J.J.R., *Talanta*, **1992**, 39, 249.
23. Chen X., Park R., Tohme M., Shahinian A.H., Bading J.R., Conti P.S., *Bioconjugate Chem.*, **2004 (a)**, 15, 41.
24. Chen X., Liu S., Hou Y., Tohme M., Park R., Bading J.R., Conti P.S., *Mol. Imaging Biol.*, **2004 (b)**, 6, 350.
25. Chen X., Hou Y., Tohme M., Park R., Khankaldyyan V., Gonzales-Gomez I., Bading J.R., Laug W.E., Conti P.S., *J. Nuc. Med.*, **2004 (c)**, 45, 1776.
26. Chen X., Sievers E., Hou Y., Tohme M., Park R., Bart R., Bremner R., Bading J.R., Conti P.S., *Neoplasia*, **2005**, 7, 271.
27. Clarke E.T., Martell A.E., *Inorg. Chim. Acta.*, **1991 (a)**, 181, 273.
28. Clarke E.T., Martell A.E., *Inorg. Chim. Acta.*, **1991 (b)**, 190, 37.
29. Clarke E.T., Martell A.E., *Inorg. Chim. Acta.*, **1991 (c)**, 190, 27.
30. Clarke F.W., "Petrology", *Encyclopedia Britannica*, 11^a Ed., **1911**.
31. Clausen J., Edeling C.J., Fogh J., *Cancer. Res.*, **1974**, 34, 1931.
32. Crichton R.R., Charlotiaux-Wauters M., *Eur. J. Biochem.*, **1987**, 164, 485.
33. De Vendittis E., Palumbo G., Parlato G., Bocchini V., *Anal. Biochem.*, **1981**, 115, 278.
34. Decristoforo C., Gonzalez I.H., Carlsen J., Rupprich M., Huisman M., Virgolini I., Wester H.J., Haubner R., *Eur. J. Med. Mol. Imaging*, **2008**, 35, 1507.
35. Dolphin D., *B₁₂*, John Wiley and Sons, New York, **1982**.
36. Edwards C.L., Hayes R.L., *J. Nuc. Med.*, **1969**, 10, 103.
37. Eisenwiener K.P., Prata M.I.M., Buschmann I., Zhang H.W., Santos A.C., Wenger S., Reubi J.C., Macke H.R., *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 530.
38. Fani M., André J.P., Maecke H.R., *Contrast Media Mol. Imaging*, **2008**, 3, 67.
39. Fraústo da Silva J.J.R., Williams R.J.P., "Biological Chemistry Of Elements", Oxford University Press, Oxford, **2001**.
40. Gatter K.C., Brown G., Trowbridge I.S., Woolston R., Mason D.Y., *J. Clin. Pathol.*, **1983**, 36, 539.
41. Geraldés C.F.G.C., Gil V.M.S., "Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações", Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, **1987**.
42. Ghirlanda G., Scrimin P., Tecilla P., Toffoletti A., *Langmuir*, **1998**, 14, 1646.

43. Greene M., Tucker W., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **1961**, 12, 62.
44. Hancock R.D., Marsicano F., *Inorg. Chem.*, **1980 (a)**, 19, 2709.
45. Harris W.R., Martell A.E., *Inorg. Chem.*, **1976**, 15, 713.
46. Harris W.R., Pecoraro V.L., *Biochemistry*, **1983**, 22, 292.
47. Harris W.R., *Biochemistry*, **1986**, 25, 803.
48. Hayes R.L., "Handbook of Toxicity of Inorganic Compounds"; H.G. Seiler, H. Sigel and A. Sigel Ed., Marcel Dekker, New York, **1988**, 297.
49. Hood J.D., Cheresch D.A., *Nature Reviews Cancer*, **2002**, 2, 91.
50. Huebers H.A., C.A. Finch, *Physiol. Rev.*, **1987**, 67, 520.
51. Huheey J.E., "Principles of Structures and Reactivity", 3^a ed., Harper and Row, Cambridge, **1983**.
52. Huheey J.E., Keiter E.A., Keiter R.L., "Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity", 4^a ed., HarperCollins, New York, **1993**.
53. Jurrison S., Berning D., Jia W., Ma D., *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1137.
54. Kerr J.A., "Strengths of chemical bonds, CRC handbook of chemistry and physics", pp 9-51, CRC Press, Boca Raton, **1996**.
55. Kim E.E., Mar M.V., Inoue T., "Sectional Anatomy: PET/CT and SPECT/CT", Springer, Berlin, **2007**.
56. Korf J., Veenma-van der Duin L., Brinkman-Medema R., Niemarkt A., de Leij L.F.M.H., *J. Nuc. Med.*, **1998**, 5, 836.
57. Kubal G., Mason A.B., Patel S.U., Sadler P.J., Woodworth R.C., *Biochemistry*, **1983**, 32, 3387.
58. Kumar K., Magerstadt M., Gansow O.A., *J. Chem. Soc. Commun.*, **1989**, 145-146.
59. Kumar S., *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 83.
60. Lake J., *Annu. Rev. Biochem.*, **1985**, 54, 507.
61. Larson S.M., Schall G.L., *J. Am. Med. Assoc.*, **1971**, 218, 257.
62. Lauffer R.B., *Chem. Rev.* **1987**, 87, 901.
63. León-Rodríguez L.M., Kovacs Z., *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 391.
64. Levaditi C., Bardet J., Tchakirian A., Vaisman A., *Compt. Ren. Acad. Sci. Ser. D*, **1931**, 192, 1142.
65. Lewis M.R., Raubitschek A., Shively J.E., *Bioconjugate Chem.*, **1994**, 5, 565.
66. Ley J.A., Sánchez G.R.E., Arias J.L.R., *Acta Médica Grupo Ángeles*, **2005**, 3, 179.

67. Linn S.M., Roberts R.J., *"Nucleases"*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1993**.
68. Logan K.J., Turner C.J., R.P. Schmidt, Terner U.K., Lentle B.C., Noujaim A.A., *Int. J. Nuc. Med. Biol.*, **1981**, 8, 271.
69. Loncin M.F., Desreux J.F., Merciny E., *Inorg. Chem.*, **1986**, 25, 2646.
70. Lonnerdal B., Iyer S., *Ann. Rev. Nutri.*, **1995**, 15, 93.
71. Maecke H.R., Hofmann M., Haberkorn U., *J. Nuc. Med.*, **2005**, 46, 172S.
72. Martell A.E., Smith R.M., *"Critical Stability Constants"*, Plenum Press, New York, **1974**.
73. Mathias C.J., Wang S., Lee R.J., Waters D.J., Low P.S., Green M.A., *J. Nuc. Med.*, **1996**, 37, 1003.
74. McMurry T.J., Brechbiel M., Kumar K., Gansow O.A., *Bioconjugate Chem.*, **1992**, 3, 108.
75. Melson G.A., *"Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds"*, Plenum Press, New York, **1979**.
76. Moeschlin S., Schnider U., *New Eng. J. Med.*, **1963**, 269, 57.
77. Nicolle G.M., Toth E., Eisenwiener K.P., Maecke H.M., Merbach A.E., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**, 7, 757.
78. Park J.K., Lee H.R., Chen J.P., Shinokubo H., Osuka A., Kim D., *J. Phys. Chem. C*, **2008**, 42, 16691.
79. Pearson R.G., *Chem. Brit.*, **1967**, 3, 103.
80. Pearson R.G., *Inorg. Chem.*, **1988**, 27, 734.
81. Roberts R.A., Ganey P.E., Ju C., Kamendulis L.M., Rusyn I., Klaunig J.E., *Toxicological Sciences*, **2007**, 96, 2.
82. Ronconi L., Sadler P.J., *Coord. Chem. Rev.* **2008**, 252, 2269.
83. Ruoslahti E., *Annual Reviews of Cell and Development Biology*, **1996**, 12, 697.
84. Sandler M.P., R.E. Coleman, Patton J.A., *"Diagnostic Nuclear Medicine"*, 4^a ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, **2003**.
85. Schubiger P.A., Alberto R., Smith A., *Bioconjugate Chem.*, **1996**, 7, 165.
86. Semmler W., Schwaiger M., *"Handbook of Experimental Pharmacology"*, Vol. I, pp. 54-73, 1^a ed., Springer-Verlag, Berlin, **2008**.
87. Shannon R.D., *Acta Crystallographica*, **1976**, A32, 751.

88. Skoog, West, Holler, *"Fundamentals of Analytical Chemistry"*, 7^a ed., Saunders College Publishing, **1991**.
89. Smith-Jones P.M., Stolz B., Bruns C., Albert R., Reist H.W., Fridrich R., Macke H.R., *J. Nuc. Med.*, **1994**, 35, 317.
90. Smith-Jones P.M., Solit D., Afroze F., Rosen N., Larson S.M., *J. Nuc. Med.*, **2006**, 47, 793.
91. Spirlet M.R., Rebizant J., Desreux J.F., Loncin M.F., *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 359.
92. Sun Y, Anderson C.J., Pajeau T.S., D.E. Reichert, Hancock R.D., Motekaitis R.J., Martell A.E., Welch M.J., *J. Med. Che.*, **1996**, 39, 458.
93. Stolz B., Smith-Jones P.M., Albert R., Reist H.W., Macke H.R., Bruns C., *Horm. Metab. Res.*, **1994**, 26, 452.
94. Tanaka K., Fukase K., *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2008**, 6, 815.
95. Torres S., Prata M.I.M., Santos A.C., André J.P., Martins J.A., Helm L., Toth E., Garcia-Martin M.L., Rodrigues T.B., López-Larrubia P., Cerdán S., Geraldes C.F.G.C., *NMR Biomed.*, **2008**, 21, 322.
96. Viola N.A., Rarig R.S., Ouellete W., Doyle R.P., *Polyhedron*, **2006**, 25, 3457.
97. Warrell R.P., Alcock N.W., Bockman R.S., *J. Clin. Oncol.*, **1987**, 5, 292.
98. Warrell R.P., Bockman R.S., *"Important Advances in Oncology"*, pp. 205-220, J.B. Lippincott, Philadelphia, **1989**.
99. Warrell R.P., *"Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids"*, pp. 1253-1265, Marcel Dekker, New York, **1995**.
100. Weiner R.E., *Nuc. Med. Biol.*, **1996**, 23, 745.
101. Wu Y., Zhang X., Xiong Z., Cheng Z., Fisher D.R., Liu S., Gambhir S.S., Chen X., *J. Nuc. Med.*, **2005**, 46, 1707.

Anexos

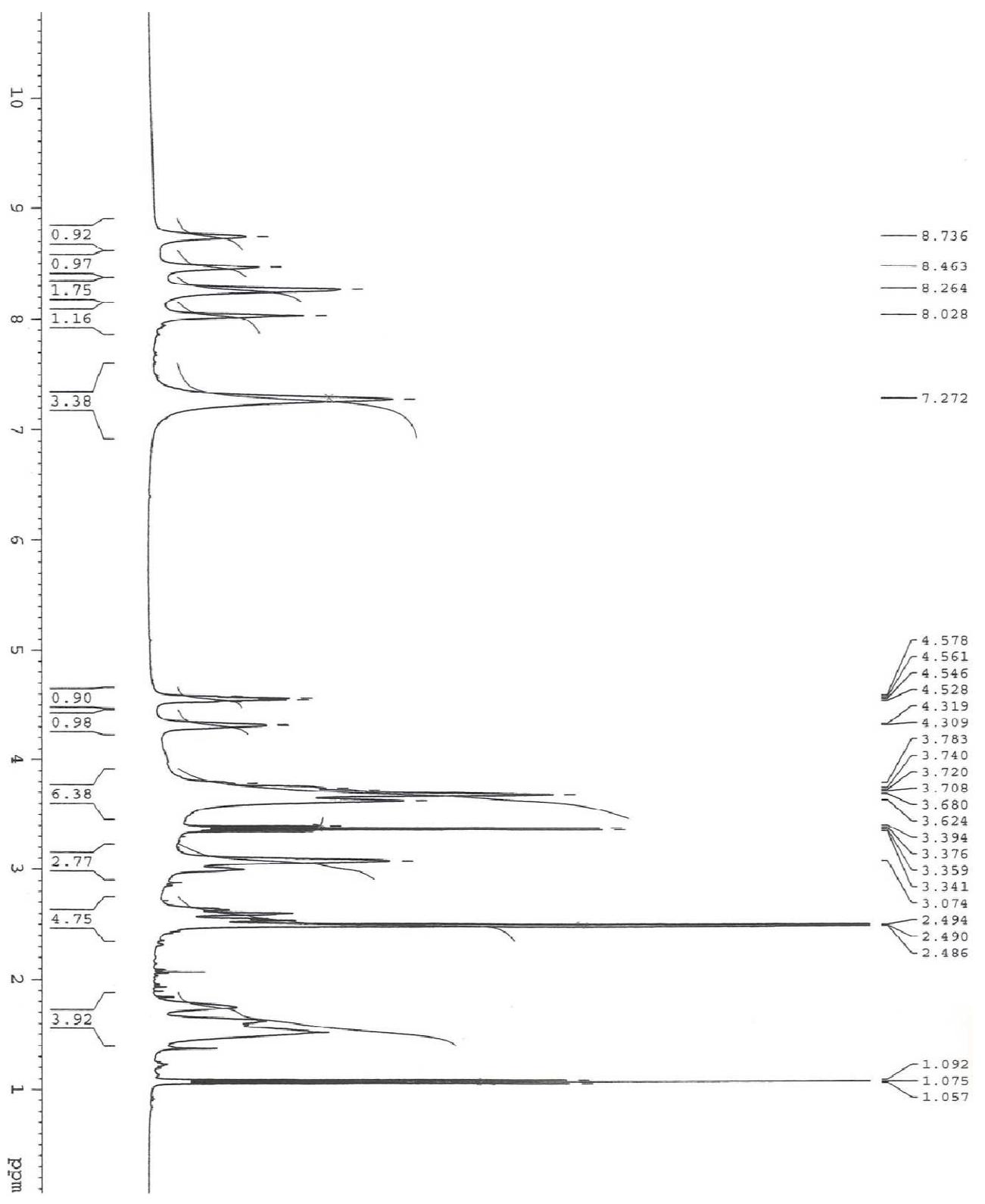
Anexo 1

Tabela 10 – Massas de ligando, volumes de solução padrão de Ca(II) usados em cada ensaio e massas molares obtidas a partir da titulação dos ligandos.

Quelato	Massa (mg)	Volume Ca²⁺ (ml)	Massa molar (M)
DOTAC6	9,5	14,15	619,70
	9,5	14,10	
DOTAC8	9,6	14,20	629,46
	9,7	15,05	
	10,0	13,85	
	9,5	13,45	
DOTAC14	9,4	13,75	763,82
	9,4	14,10	
	9,6	13,60	
	10,0	13,50	

Anexo 2

- Espectro de ^1H RMN do GRGDG



Anexo 3

- Espectro de ^1H RMN do DOTAC6-GRGDG

