

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG

FACULDADE DE FARMÁCIA

ANDRÉ LUÍS BRANCO DE BARROS

**SÍNTESE DE LIGANTE PARA TECNÉCIO-99m DERIVADO DA D-
GLICOSE E AVALIAÇÃO COMO MARCADOR TUMORAL**

Belo Horizonte

2007

ANDRÉ LUÍS BRANCO DE BARROS

**SÍNTESE DE LIGANTE PARA TECNÉCIO-99m DERIVADO DA D-
GLICOSE E AVALIAÇÃO COMO MARCADOR TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Alves

Co-orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Colaboradoras: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Fontes Prado

Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Belo Horizonte

2007

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, a minha mãe e meus irmãos pelo carinho e apoio incondicional durante toda minha vida.

À Flaviana pelo incentivo, amor e companheirismo em todos os momentos.

Ao Ricardo, meu orientador, pela confiança depositada, pelos muitos ensinamentos e conselhos.

Ao Valbert, meu co-orientador, pelo incentivo e ensinamentos.

À Mônica pelo apoio e por ceder o laboratório para a realização de parte dos estudos.

Aos professores Ricardo, Valbert, Rosimeire, Rossimirian, Dora pelos conhecimentos passados nas excelentes aulas.

Aos professores dos laboratórios de Química Farmacêutica e Radioisótopos, Dora, Taís, Basílio e Simone pelo apoio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos do laboratório de Química Farmacêutica e de Radioisótopos Daniel, Diogo, Renato, Magno, Marilda, Rozângela, Daniele, Paola, Rute, Luciene, Raphael, Luís Paulo, Simone, Mirelle, Rosana pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao Diogo pelas aulas, pelo incentivo e pela amizade.

À Rute pelos ensinamentos, apoio e amizade.

À Luciene pela ajuda com os estudos de biodistribuição e pela amizade.

Ao Cléber pela ajuda com as análises estatísticas.

À Elaine pela ajuda com os experimentos para inoculação do tumor.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 CÂNCER.....	20
2.2 MÉTODOS DE DIAGNÓTICO.....	23
2.3 O ISÓTOPO TECNÉCIO-99m.....	27
2.4 AGENTES QUELANTES PARA O TECNÉCIO-99m.....	28
3 OBJETIVOS.....	31
4 JUSTIFICATIVA.....	32
PARTE I – SÍNTESE DO LIGANTE DERIVADO DA D-GLICOSE.....	33
5 PLANO DE SÍNTESE.....	34
5.1 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA.....	34
5.2 ROTA DE SÍNTESE.....	35
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
6.1 MÉTODOS GERAIS.....	37
6.1.1 APARELHAGEM UTILIZADA.....	37
6.1.2 SOLUÇÕES REVELADORAS.....	38
6.2 SÍNTESE DE 1,2,3,4,6-PENTA-O-ACETIL- β -D-GLICOPIRANOSE (2).....	39

6.3 SÍNTESE DE BROMETO DE 2, 3, 4, 6-TETRA-O-ACETIL- α -D-GLICOPIRANOSILA (3)	41
6.4 SÍNTESE DE 2, 3, 4, 6-TETRA-O-ACETIL- β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-NITROFENILA (4).....	43
6.5 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-NITROFENILA (5).....	46
6.6 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-AMINOFENILA (6).....	48
6.7 SÍNTESE DE CLOROACETILGLICILGLICILGLICINA (8).....	49
6.8 SÍNTESE DE BENZOIL-MERCAPTOACETILGLICILGLICILGLICINA (9).....	51
6.9 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-N-[N ³ -(BENZOIL-MERCAPTOACETIL)GLICILGLICILGLICIL]AMINOFENILA (10).....	53
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
7.1 SÍNTESE DE 1,2,3,4,6-PENTA-O-ACETIL- β -D-GLICOPIRANOSE (2).....	56
7.2 SÍNTESE DE BROMETO DE 2, 3, 4, 6-TETRA-O-ACETIL- α -D-GLICOPIRANOSILA (3).....	62
7.3 SÍNTESE DE 2, 3, 4, 6-TETRA-O-ACETIL- β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-NITROFENILA (4).....	67
7.4 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-NITROFENILA (5).....	71
7.5 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-AMINOFENILA (6).....	75
7.6 SÍNTESE DE CLOROACETILGLICILGLICILGLICINA (8).....	76
7.7 SÍNTESE DE BENZOIL-MERCAPTOACETILGLICILGLICILGLICINA (9).....	81
7.8 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-N-[N ³ -(BENZOIL-MERCAPTOACETIL)GLICILGLICILGLICIL]AMINOFENILA (10).....	86
PARTE II – ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO.....	98
8 MATERIAIS E MÉTODOS.....	99
8.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	99
8.2 MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99m (^{99m} Tc).....	100
8.3 CONTROLE DE PUREZA RADIOQUÍMICA (PR).....	101
8.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS MARCADOS.....	102

8.5 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO DE $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ EM ANIMAIS SADIOS	103
8.6 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR DE EHRLICH E ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO.....	104
8.7 IMAGENS CINTILOGRÁFICAS.....	106
8.8 ANÁLISE DE RESULTADOS.....	107
9 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
9.1 RENDIMENTO DE MARCAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ E $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	108
9.2 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO DO $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ E DO $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ EM ANIMAIS SADIOS.....	110
9.3 BIODISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS COM TUMOR DE EHRLICH.....	115
9.4 IMAGENS CINTILOGRÁFICAS.....	117
10 CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXO.....	131
APÊNDICE.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
ϕ	Ângulo diedro
σ^*	Orbital molecular antiligante
Ac	Acetila
Bz-MAG ₃	Benzoil-mercptoacetilglicilglicilglicina
Bz-MAG ₃ -G	Glicopiranosídeo de 4- <i>N</i> -[<i>N</i> ³ -(benzoil-mercptoacetil)glicilglicilglicil]aminofenila
CCD	Cromatografia em camada delgada
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
cpm	Contagens por minuto
d	duplete
dd	duplete duplo
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
dl	duplete largo
DMF	<i>N, N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilssulfóxido
EDAC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> '-etilcarbodiimida
FM	Fórmula Molecular
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlations</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlations</i>
I.V.	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento

keV	Kilo-elétron-volt
MBq	Megabecquerel
MHz	Mega hertz
MM	Massa molar
$\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$	Pertecnetato de sódio
NHS	<i>N</i> -hidroxissuccinimida
p.	Página
PET	Tomografia por emissão de pósitron
PF	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
RIs	Regiões de Interesse
s	simpleto
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnécio-99m
$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$	MAG_3 radiomarcado com tecnécio-99m
$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	$\text{MAG}_3\text{-G}$ radiomarcado com tecnécio-99m
$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	Tecnécio-99m hidrolizado
$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	Tecnécio-99m livre
t	tripleto
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo celular.....	21
Figura 2 - Estrutura da D-glicose e do [¹⁸ F]FDG.....	25
Figura 3 - Síntese do [¹⁸ F]FDG a partir da D-manose.....	26
Figura 4 - Exemplos de marcadores com tecnécio-99m.....	27
Figura 5 - Seqüência de reações para a formação do ^{99m} Tc-MAG ₃	28
Figura 6 - Derivado da D-glicosamina acoplado ao MAG ₃ e marcado com ^{99m} Tc.....	29
Figura 7 - Radiofármaco potencial marcado com tecnécio-99m.....	31
Figura 8 - Análise retrossintética proposta para a síntese de (10)	34
Figura 9 - Rota de síntese para o derivado da D-glicose (6)	35
Figura 10 - Rota de síntese para o derivado da glicilglicilglicina (9)	36
Figura 11 - Rota de síntese para o ligante para o tecnécio-99m (10)	36
Figura 12 - Condições para formação de peracetilado da D-glicose (STICK, 2001).....	56
Figura 13 - Mecanismo geral para a acetilação de álcoois com anidrido acético.....	57
Figura 14 - Curva de Karplus-Conroy e relação da constante de acoplamento vicinal $J_{H-H'}$ com o ângulo diedro ϕ (HALL, 1964).....	58
Figura 15 - Relação entre ângulo diedro (ϕ) e conformação dos anômeros α e β	58
Figura 16 - Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ , δ) de (2)	59
Figura 17 - Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃ , δ) de (2)	60
Figura 18 - Espectro no infravermelho (ν , cm ⁻¹) de (2)	61
Figura 19 - Proposta de mecanismo para reação de formação de (3)	62
Figura 20 - Interações dos pares de elétrons não ligantes (1) e influencia da eletronegatividade (2a e 2b) no favorecimento do anômero α (STICK, 2001).....	63

Figura 21 - Interação entre o par de elétrons axial do oxigênio e o orbital antiligante da ligação C ₁ -X (COLLINS; FERRIER, 1995).....	64
Figura 22 - Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ , δ) de (3)	65
Figura 23 - Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃ , δ) de (3)	66
Figura 24 - Ligação glicosídica.....	67
Figura 25 - Proposta mecanística para a formação do glicosídeo (4)	67
Figura 26 - Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ , δ) de (4)	68
Figura 27 - Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃ , δ) de (4)	69
Figura 28 - Espectro no infravermelho (ν, cm ⁻¹) de (4)	70
Figura 29 - Proposta de mecanismo da transesterificação pelo método de Zemplén (COLLINS; FERRIER, 1995).....	71
Figura 30 - Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆ , δ) de (5)	72
Figura 31 - Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, DMSO-d ₆ , δ) de (5)	73
Figura 32 - Espectro no infravermelho (ν, cm ⁻¹) de (5)	74
Figura 33 - Etapas envolvidas na reação de Schotten-Baumann (STEIGER, 1944)..	76
Figura 34 - Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, D ₂ O, δ) de (8)	78
Figura 35 - Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, D ₂ O, δ) de (8)	79
Figura 36 - Espectro no infravermelho (ν, cm ⁻¹) de (8)	80
Figura 37 - Reação para a formação de Bz-MAG ₃ (9)	81
Figura 38 - Espectro de RMN de ¹ H (200MHz, DMSO-d ₆ , δ) de (9)	82
Figura 39 - Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, DMSO-d ₆ , δ) de (9)	83
Figura 40 - Sub-espectro DEPT 135 (50 MHz, DMSO-d ₆ , δ) de (9)	84
Figura 41 - Espectro no infravermelho (ν, cm ⁻¹) de (9)	85
Figura 42 - Esquema de síntese de (10) utilizando DCC como agente de acoplamento.....	87

Figura 43 - Esquema de síntese de (10) utilizando EDAC como agente de acoplamento.....	88
Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ) de (10) (Ampliação 1).....	89
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ) de (10) (Ampliação 2).....	90
Figura 46 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ) de (10) (Ampliação 3).....	91
Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ) de (10) (Ampliação 4).....	92
Figura 48 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6 , δ) de (10)	94
Figura 49 - Sub-espectro DEPT 135 (50 MHz, DMSO- d_6 , δ) de (10)	94
Figura 50 - Mapa de correlação COSY (400 MHz, DMSO- d_6 , δ) de (10)	95
Figura 51 - Mapa de correlação HMQC (100 MHz, DMSO- d_6 , δ) de (10)	95
Figura 52 - Mapa de correlação HMBC (100MHz, DMSO- d_6 , δ) de (10)	96
Figura 53 - Espectro no infravermelho (ν , cm^{-1}) de (10)	97
Figura 54 - Fórmula para a obtenção da relação %dose/g.....	103
Figura 55 - Perfil de biodistribuição do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no sistema urinário.....	112
Figura 56 - Perfil de biodistribuição do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no sangue.....	113
Figura 57 - Perfil de biodistribuição do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no fígado.....	113
Figura 58 - Perfil de biodistribuição do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no coração.....	114
Figura 59 - Perfil de biodistribuição do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no pulmão.....	114

Figura 60 - Imagens cintilográficas de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	118
Figura 61 - Imagens cintilográficas de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$	119
Figura 62 - Região de interesse (RIs) nas patas posteriores direita (alvo) e esquerda (não-alvo).....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de (2)	40
Tabela 2 - Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de (2)	40
Tabela 3 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de (2)	40
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de (3)	42
Tabela 5 - Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de (3)	42
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de (4)	44
Tabela 7 - Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de (4)	44
Tabela 8 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de (4)	45
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6 , δ) de (5)	47
Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6 , δ) de (5)	47
Tabela 11 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de (5)	47
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H (200 MHz, D_2O , δ) de (8)	49
Tabela 13 - Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, D_2O , δ) de (8)	50
Tabela 14 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de (8)	50
Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6 , δ) de (9)	52
Tabela 16 - Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6 , δ) de (9)	52
Tabela 17 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de (9)	52
Tabela 18 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6 , δ) de (10)	54
Tabela 19 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6 , δ) de (10)	55
Tabela 20 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de (10)	55
Tabela 21 - Rendimento de marcação do MAG_3 e do $\text{MAG}_3\text{-G}$ com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ antes da purificação por coluna.....	109

Tabela 22 - Rendimento de marcação do MAG_3 e do $\text{MAG}_3\text{-G}$ com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ após purificação por coluna de Florisil.....	109
Tabela 23 - Biodistribuição $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ em animais sadios (%dose/g).....	110
Tabela 24 - Biodistribuição $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em animais sadios (%dose/g).....	111
Tabela 25 - Biodistribuição no sistema urinário de $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ em animais sadios e com tumor (%dose/g).....	115
Tabela 26 - Biodistribuição no sistema urinário de $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em animais sadios e com tumor (%dose/g).....	116
Tabela 27 - Relação Alvo/Não-Alvo de $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	116
Tabela 28 - Relação Alvo/Não-Alvo de $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ obtida por imagens em câmara de cintilação a raios gama (%dose/ cm^2).....	120
Tabela 29 - Relação Alvo/Não-Alvo apresentada pelo $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ nos estudos de biodistribuição (%dose/g) e imagens cintilográficas (%dose/ cm^2).....	120
Tabela 30 - Relação Alvo/Não-Alvo apresentada pelo $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ nos estudos de biodistribuição (%dose/g) e imagens cintilográficas (%dose/ cm^2).....	121
Tabela 31 - Biodistribuição $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ em animais com tumor (%dose/g).....	133
Tabela 32 - Biodistribuição $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em animais com tumor (%dose/g)....	133

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte na atualidade, e por isso, tem-se a busca incessante por técnicas de diagnóstico precoce que facilitem o tratamento, aumentando as chances de cura. Uma técnica que está sendo muito utilizada em medicina nuclear, atualmente, é a cintilografia realizada em câmaras de tomografia por emissão de pósitron (PET) utilizando o 2-fluoro-2-desoxi-D-glicose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$). Essa técnica baseia-se no fato de que células de tumores em estágios iniciais apresentam metabolismo acelerado e, conseqüentemente, maior avidez por glicose. Porém, esta técnica apresenta baixa disponibilidade na rotina clínica devido ao seu alto custo.

Na grande maioria dos procedimentos em medicina nuclear convencional são utilizados átomos de tecnécio-99m como emissores das radiações que irão gerar as imagens cintilográficas, pois este apresenta adequada meia-vida (6,01 h), emissão γ de baixa energia (140 keV), além de um custo relativamente baixo. Buscam-se, então, substâncias que, complexadas ao tecnécio-99m, seriam capazes de detectar tumores em estágios iniciais.

Com base no exposto realizou-se a síntese, em oito etapas, de β -D-glicopiranosídeo de 4-N-[N^3 -(benzoil-mercaptopetil)glicilglicilglicil]aminofenila (Bz-MAG₃-G), um derivado da D-glicose. Inicialmente, realizou-se a síntese de mercaptopetilglicina (MAG₃), um agente complexante para o tecnécio-99m, e a síntese de β -D-glicopiranosídeo de 4-aminofenila. Em seguida, acoplou-se o derivado glicosídico ao MAG₃ em presença de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-

etilcarbodiimida (EDAC) em DMF, com rendimento de 32%. O derivado de carboidrato sintetizado foi estruturalmente caracterizado por espectroscopia no infravermelho e por espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Os produtos Bz-MAG₃ e Bz-MAG₃-G foram convertidos nos correspondentes complexos com tecnécio-99m e, em seguida, realizaram-se os estudos comparativos de biodistribuição em camundongos SWISS, machos. Inicialmente os estudos foram realizados em camundongos saudáveis. Os complexos $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ apresentaram padrões de biodistribuição diferentes, observando-se o perfil de depuração bifásica para o $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ que é ausente no derivado sacarídico. Em seguida, realizaram-se os estudos de biodistribuição em camundongos com tumor de Ehrlich implantados na pata posterior direita. O derivado da D-glicose apresentou concentração cerca de duas vezes maior no tumor em relação à pata posterior esquerda (controle) para todos os tempos analisados (5, 30, 120 e 240 minutos). Tal característica não foi observada para o $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$.

ABSTRACT

Cancer is one of the principal causes of death nowadays and there is a restless search for methods for early diagnosis in order to determine the proper treatment and increase the chances of cure. Positron emission tomography (PET), a method based on the radioactive tracer 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) is used in nuclear medicine to detect solid tumors. The rationale for the use of $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ relies in the fact that in the early stage of a solid tumor development the cancer cells usually have accelerated metabolism and, in consequence, enhanced glucose uptake. Nevertheless, widespread use of this method is hampered by its high cost.

In the vast majority of conventional nuclear medicine procedures $^{99\text{m}}\text{Tc}$ is used as the radiotracer, since this radioactive atom has appropriate half-life (6.01 hour), is low γ -energy radiator (140 keV) and it's cheap and readily available. Thus, there is an increasing search for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -based complexes for the detections of solid tumors.

With these considerations in mind, the synthesis of 4-*N*-[*N*³-(benzoylmercaptoacetyl)glycylglycylglycyl]aminophenyl β -D-glucopyranoside (Bz-MAG₃-G), a D-glucose derivative was undertaken. Thus, *N*³-(benzoylmercaptoacetyl)riglycine (Bz-MAG₃), a protected form of MAG₃, a known complexing agent for $^{99\text{m}}\text{Tc}$, and 4-aminophenyl β -D-glucopyranoside, were prepared according to literature procedures. Coupling of Bz-MAG₃ with the glucoside in DMF, in the presence of *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDAC) was achieved in 32 % yield. Bz-MAG₃-G was fully characterized using infrared, RMN ¹H and RMN ¹³C spectrometry.

Bz-MAG₃ and Bz-MAG₃-G were converted, into the corresponding ^{99m}Tc complexes for comparative biodistribution studies using male SWISS mice. First, the studies were performed in healthy mice. Different biodistribution patterns were observed for the two compounds. The ^{99m}Tc-MAG₃ complex showed a biphasic clearance profile, not shown by the D-glucose-based complex. Next, the biodistribution study of the complexes was performed in mice bearing Ehrlich tumor implanted into the posterior right paw. The concentration of the D-glucose-based complex in the tumor was twofold compared to that of the posterior left paw (control), for all the times measured (5, 30, 120 and 240 minutes). This profile was not observed for ^{99m}Tc-MAG₃ complex.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de morte na atualidade, portanto, têm-se buscado meios de diagnóstico precoce que irão favorecer a terapêutica aumentando a sobrevida dos pacientes e, até, possibilitando a cura dos mesmos.

Sendo assim, muito se tem buscado para produção de novos agentes de diagnóstico em diversas áreas. Dentre elas, a medicina nuclear que vem se tornando uma ferramenta poderosa para a detecção de diversas doenças, inclusive o câncer, pois enquanto as demais técnicas avaliam alterações anatômicas a cintilografia é capaz de detectar alterações bioquímicas e fisiológicas no órgão estudado, e assim, identificar a doença em seu estágio inicial.

As imagens por tomografia por emissão de pósitron (PET) fornecidas pela ^{18}F Fluordesoxiglicose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) estão sendo muito utilizadas para detecção de tumores, devido às células tumorais apresentarem maior avidéz por glicose. Porém, apresentam um custo alto, reduzindo a sua disponibilidade para a aplicação clínica.

O radionuclídeo mais utilizado em medicina nuclear é o tecnécio-99m, pois apresenta características ideais para sua utilização na produção de imagens cintilográficas, além de um custo relativamente menor. Desse modo, a alternativa mais viável seria a produção de substâncias que pudessem ser marcadas com tecnécio-99m, contribuindo para a redução dos custos e, desta forma, tornando a técnica acessível a todos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O câncer está entre as causas mais comuns de morte no mundo. De acordo com a organização mundial de saúde o câncer foi a causa de 13% (7,6 milhões) de todas as morte ocorridas no mundo durante o ano 2005. As células cancerosas são formadas quando células normais perdem os mecanismos regulatórios que controlam o seu crescimento e multiplicação (PATRICK, 2005).

Em uma célula normal o estímulo inicial da divisão celular é dado por fatores de crescimento que se ligam aos seus receptores na superfície da membrana celular. Assim, a mensagem de crescimento é levada ao núcleo da célula através de uma cascata de reações bioquímicas. Uma vez no núcleo os fatores de transcrição ligam-se ao DNA e promovem a produção de proteínas envolvidas no crescimento e divisão celular (RANG *et al.*, 2004).

O DNA contém informações genéticas que codificam proteínas envolvidas no metabolismo celular. Se um gene é danificado a codificação destas proteínas pode ser afetada. Danos em genes que codificam proteínas relacionadas ao crescimento celular como oncogenes, genes supressores de tumor e genes reparadores de DNA podem gerar alterações que irão desencadear o câncer (PAUWELS *et al.*, 1998).

A célula tumoral apresenta transformações em decorrência de alterações em seu DNA que podem ser produzidas por diversos fatores como, vírus, bactéria, parasitas,

agentes químicos e radiação. Esses agentes carcinogênicos podem atuar de duas maneiras, primeiro causando danos aos genes que controlam a proliferação e migração celular. E segundo, promovendo o crescimento das células tumorais. Isso gera modificações nas funções celulares ocasionando modificações nas propriedades de membrana, nas interações célula-célula e no metabolismo celular (PAUWELS *et al.*, 1998).

Toda célula eucariótica apresenta um ciclo celular, como o mostrado na figura 1, composto por quatro etapas: G_1 (fase na qual a célula está aumentando de tamanho e se preparando para a cópia do material genético em resposta a fatores de crescimento e sinais internos), S (etapa de replicação do DNA), G_2 (preparação da célula para a mitose) e M (mitose celular). Há, ainda, uma quinta fase (G_0) que é considerada como um estado de repouso. Células nesta fase podem entrar no ciclo após indução (KENNY *et al.*, 2004).

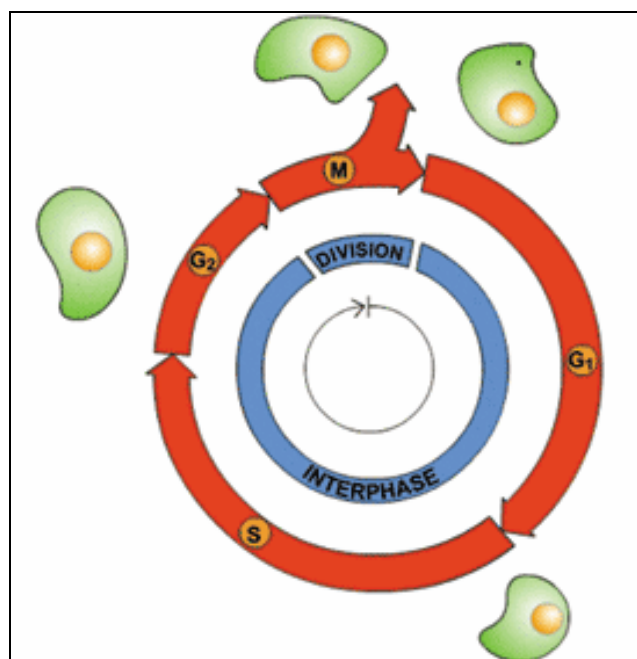


Figura 1 - Ciclo celular.

Normalmente, o ciclo celular é regulado pelo equilíbrio entre células em estado de proliferação e células em repouso. A perda dessa regulação é determinante para o desenvolvimento do câncer. Durante o crescimento da massa tumoral, grande parte das células tumorais encontra-se na fase S do ciclo celular. Com o maior número de células nessa fase, o tecido necessita de mais material energético para manter a produção de DNA (BELKACÉMI *et al.*, 2007).

A glicose, então, assume papel fundamental como fonte de energia para as células tumorais. O aumento da captação de glicose por estas células é devido ao seu metabolismo acelerado e a maior expressão de transportadores para glicose (GLUT) em células malignas (PAUWELS *et al.*, 1998; GU *et al.*, 2006; CELEN *et al.*, 2007).

Sete tipos de transportadores de glicose são conhecidos (GLUT 1-7) sendo todos compostos por uma cadeia similar de polipeptídeo contendo 492 a 524 aminoácidos. Essas isoformas estão distribuídas nos diversos tecidos, sendo o GLUT-1 o mais abundante em células eucarióticas e neoplásicas. A glicose se liga à parte externa do transportador que, por meio de alterações em sua conformação permite a passagem da molécula de glicose para dentro do citoplasma por um processo estereoespecífico e sem gasto de energia (PAUWELS *et al.*, 1998; SAMIH *et al.*, 2003; OHTSUBO *et al.*, 2005).

2.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A proliferação celular desordenada é fundamental para o desenvolvimento do câncer. Para a determinação dessa proliferação são utilizadas técnicas de diagnóstico que necessitam de amostras de tecido para a sua realização, como: imuno-histoquímica, citometria de fluxo e contagem do número de mitoses visíveis. No entanto, estas técnicas apresentam algumas limitações, por exemplo, a biópsia pode não ser representativa de todo o tumor devido à sua heterogeneidade, biópsias podem ser difíceis de serem realizadas dependendo da profundidade do tumor e, além disso, pode haver diferenças entre o tumor primário e metástases (KENNY *et al.*, 2004).

Outros meios de avaliação da proliferação tumoral se baseiam em mudanças anatômicas observadas em exames clínicos, raios-X, ultra-sonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear, que permitem avaliar alterações no tamanho do tumor. Essas mudanças, no entanto, podem tardar semanas ou meses para serem observadas e avaliadas, dificultando o tratamento (SHIELDS *et al.*, 1998).

Em medicina nuclear a imagem do corpo é obtida através da captação da radioatividade emitida pelo radiotraçador administrado. Os radiotraçadores são administrados, em sua maioria, por via endovenosa e o diagnóstico é baseado em alterações bioquímicas e fisiológicas do órgão em exame, sem a necessidade de alterações anatômicas, fornecendo o diagnóstico da doença em um estágio inicial (CONTI *et al.*, 1996; THRALL; ZIESSMAN, 2003).

Radiofármacos são compostos radioativos usados no diagnóstico e no tratamento de doenças. Em medicina nuclear cerca de 95% dos radiofármacos são utilizados para fins de diagnósticos. A maioria destes radiofármacos é uma combinação de um componente radioativo (radionuclídeo), que permite a detecção externa da fisiologia e/ou anatomia do órgão em exame, e um componente químico (ligante orgânico), que é responsável pelo direcionamento no organismo. Essas substâncias não apresentam ação farmacológica, pois são administradas em doses extremamente baixas. O radionuclídeo deve emitir uma radiação que será facilmente detectável por um instrumento nuclear e a dose dessa radiação para o paciente deverá ser mínima (SAHA, 1998; THRALL; ZIESSMAN, 2003).

Existe uma grande variedade de radionuclídeos usados em medicina nuclear como: iodo-131 (^{131}I), índio-111 (^{111}In), Tálcio-201 (^{201}Tl), Flúor-18 (^{18}F), Tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Gálio-67 (^{67}Ga), entre outros (SAHA, 1998).

Em oncologia, o agente de imagem tumoral mais usado é o 2- ^{18}F fluoro-2-desoxi-D-glicose (^{18}F FDG) (CELEN *et al.*, 2007). O flúor-18 é produzido em ciclotron, tem meia-vida física de 109 minutos e decai por emissão de pósitron (radiação β^+) que ao interagir com um elétron do meio se aniquila gerando dois fótons gama de 511 keV num ângulo de 180° , que serão detectados por tomografia por emissão de pósitron (PET)-(THRALL; ZIESSMAN, 2003).

O ^{18}F FDG é um análogo da D-glicose, como mostrado na figura 2, e sua aplicação baseia-se na maior atividade glicolítica das células tumorais malignas (CONTI *et al.*, 1996). O ^{18}F FDG penetra na célula por difusão facilitada através dos

transportadores para glicose (GLUT-1), que, conforme já explicitado, também apresentam maior expressão em células tumorais (SCHIBLI *et al.*, 2005), (LOVE *et al.*, 2005), é fosforilado pela enzima hexoquinase, como ocorre normalmente com a D-glicose, gerando o [^{18}F]FDG-6-fosfato (GU *et al.*, 2006). O segundo passo na glicólise seria a isomerização da glicose-6-fosfato a frutose-6-fosfato pela enzima fosfoexose isomerase, porém para a formação da frutose-6-fosfato é necessária a presença do oxigênio em C-2, que está ausente no [^{18}F]FDG. Portanto, a partir desse ponto, o [^{18}F]FDG fosforilado não pode prosseguir no caminho metabólico normal da glicose, ficando retido no interior da célula de maneira proporcional a atividade glicolítica desta célula (PAUWELS *et al.*, 1998; BOS *et al.*, 2002).

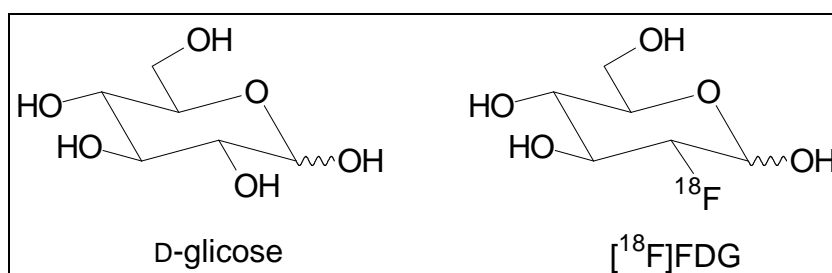


Figura 2 - Estrutura da D-glicose e do [^{18}F]FDG.

O uso do [^{18}F]FDG na rotina clínica é, ainda, limitado devido a sua baixa disponibilidade e o custo relativamente alto, tanto em sua produção (ciclotron) como na detecção das imagens (câmara PET), além da necessidade de uma síntese rápida (figura 3) devido ao baixo tempo de meia-vida física do flúor-18 (109 minutos). Assim, seria de grande valia o desenvolvimento de agentes de diagnóstico baseados em isótopos emissores de radiação gama, direcionados à produção de imagens em câmaras de cintilação convencionais (CHEN *et al.*, 2006).

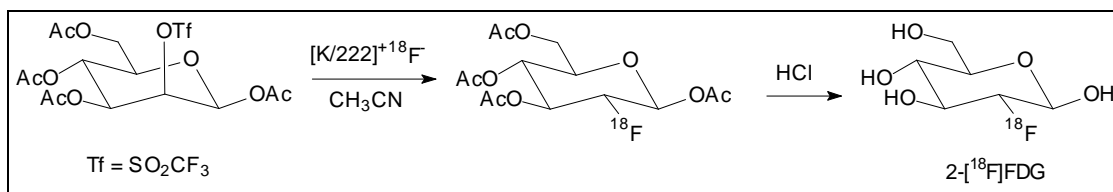


Figura 3 - Síntese do [¹⁸F]FDG a partir de derivado da D-manose.

2.3 O ISÓTOPO TECNÍCIO-99m

O ^{99m}Tc é o radionuclídeo mais usado em medicina nuclear, por apresentar propriedades físicas e químicas ideais para um radioisótopo, tais como: meia-vida física de 6,01 horas, emissão gama de baixa energia (140 keV), alta disponibilidade do radioisótopo a partir de um sistema gerador de Molibdênio-99/Tecnício-99m (⁹⁹Mo/^{99m}Tc), além de apresentar um custo relativamente baixo (JURISSON, 1993; JONES, 1995; MARQUES *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2003).

O tecnício é um metal de transição da família VII B e tem número atômico 43, podendo existir em oito estados de oxidação (-1 a +7). A estabilidade desses estados de transição depende do tipo de ligação e do ambiente químico. Os estados +7 e +4 são mais estáveis e são representados em óxidos, sulfetos, haletos e pertecnetatos (DEWANJEE, 1990; SAHA, 1998).

O íon pertecnetato, ^{99m}TcO₄⁻, tem estado de oxidação +7 para o ^{99m}Tc, isso o torna uma espécie não reativa e incapaz de ligar a algum composto, sendo necessária a redução do tecnício, do estado +7 para um estado de oxidação menor. O cloreto de estanho II (SnCl₂ • 2H₂O) é o agente redutor mais comum usado na preparação de compostos ligados ao ^{99m}Tc (NOWOTNIK, 1990; SAHA, 1998).

O ^{99m}Tc reduzido é uma espécie quimicamente reativa e combina com uma grande variedade de agentes quelantes. O agente quelante geralmente é doador de elétrons e forma uma ligação covalente coordenada com o ^{99m}Tc reduzido. (SAHA, 1998).

2.4 AGENTES QUELANTES PARA O TECNÉCIO-99m

Existem muitos compostos capazes de se ligar ao tecnécio-99m, sendo usados em medicina nuclear para avaliar a função e/ou a morfologia de um órgão, determinando o estado patológico do paciente (JURISSON, 1993; TISATO *et al.*, 2006). São exemplos desses compostos o ^{99m}Tc -HMPAO (marcador cerebral), ^{99m}Tc -MAG₃ (marcador renal), ^{99m}Tc -ECD (marcador para imagem cerebral), ^{99m}Tc -HIDA (marcador adequado para imagens do sistema hepatobiliar), ^{99m}Tc -DMSA (agente de marcação renal). As estruturas dos complexos citados acima são mostradas na figura 4.

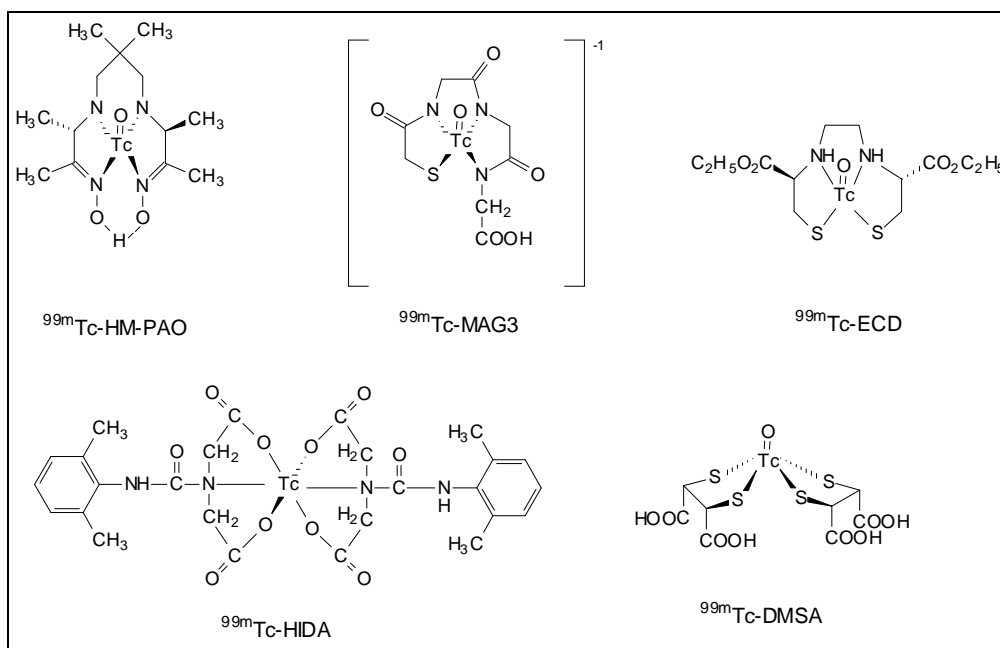


Figura 4 - Exemplos de ligantes complexados com tecnécio-99m.

O MAG₃, mercaptoacetilglicilglicilglicina, é um ligante N₃S, que ao ser marcado com tecnécio-99m apresenta uma pureza radioquímica superior a 90% (ROBLES *et al*, 2003). É capaz de formar um complexo estável, e carregado negativamente com tecnécio (VANBILLOEN *et al.*, 1995; YAMAMURA, 1999; OKARVI, 2004).

O primeiro passo para a formação do radiofármaco ^{99m}Tc-MAG₃, consiste na formação de um complexo do ^{99m}Tc com um ligante fraco em meio aquoso. Esse complexo reage, em seguida, com um segundo ligante (MAG₃), que forma um complexo mais estável. Ligantes fortes, como o MAG₃, são menos solúveis em meio aquoso e necessitam de aquecimento ou longo tempo para dissolverem. Inicialmente é preparado o complexo ^{99m}Tc-tartarato ou ^{99m}Tc-gluconato por redução do ^{99m}TcO₄⁻ com íon estanoso em presença de tartarato de sódio ou gluconato de sódio, seguido de aquecimento com MAG₃, resultando no ^{99m}Tc-MAG₃, como esquematizado na figura 5 (BORMANS *et al.*, 1995; SAHA, 1998).

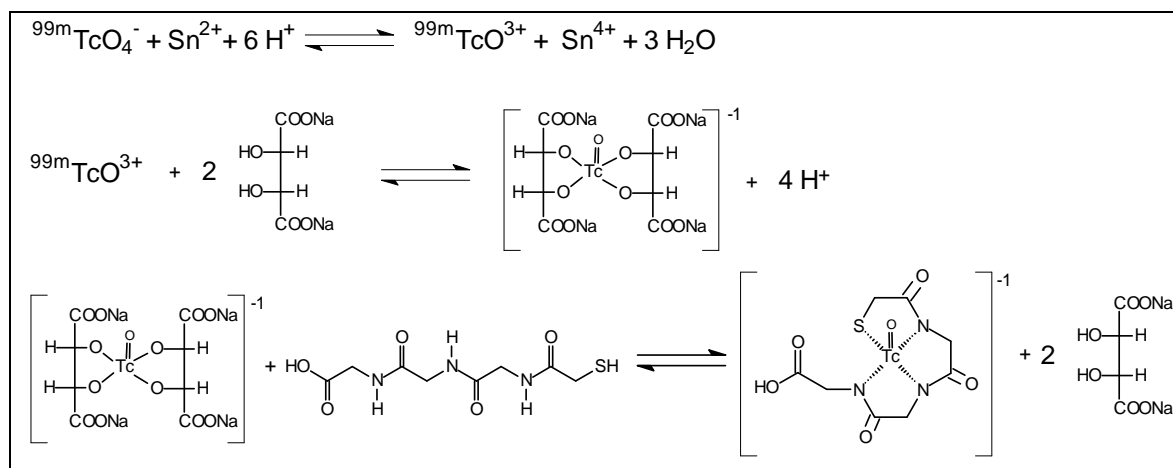


Figura 5 - Sequência de reações para a formação do ^{99m}Tc-MAG₃.

O ^{99m}Tc-MAG₃ é usado como marcador da função tubular renal. Apresenta alta ligação a proteínas plasmáticas, cerca de 90%, que confere a ele uma pequena taxa

de filtração glomerular (menor que 3%). Após administração por via intravenosa, sua depuração sangüínea é rápida e bifásica, sendo rapidamente excretado por secreção tubular renal (FRITZBERG, 1986; ESHIMA, 1992; SAHA, 1998; THRALL; ZIESSMAN, 2003).

São descritos vários estudos que utilizam o MAG_3 como agente quelante para o tecnécio-99m ligado a diversas substâncias, como carboidratos (figura 6), peptídeos, ácidos desoxirribonucléicos e anticorpos, que irão conferir ao composto final um novo direcionamento dentro do organismo possibilitando o estudo e diagnóstico de diversas doenças, entre elas, o câncer (LEI *et al.*, 1996; WINNARD *et al.*, 1997; HNATOWICH *et al.*, 1998; VERA *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006).

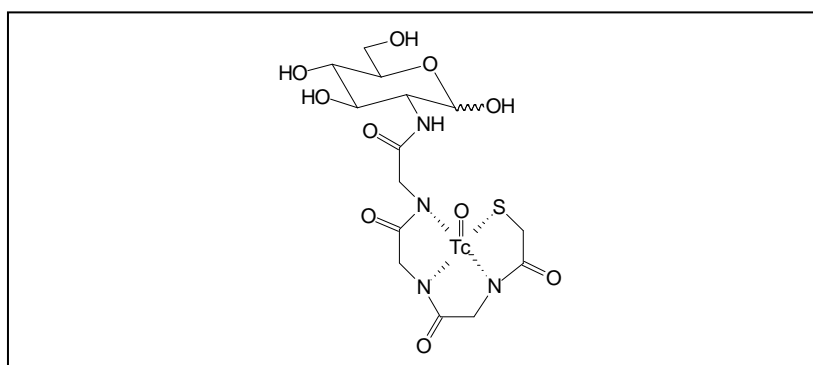


Figura 6 - Derivado da D-glicosamina acoplado ao MAG_3 e marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Para o estudo de marcação de tumores, além de derivados da D-glicose (CHEN *et al.*, 2006), está sendo testada uma grande variedade de substâncias que atuam de diferentes modos, como os marcadores de hipoxia tumoral (derivados do imidazol) que apresentam seletividade a tecidos com baixos níveis de oxigênio e são usados para identificar células em hipóxia que poderão desenvolver resistência durante os processos de radio- e quimioterapia (CHU *et al.*, 2004), precursores de DNA (timidina, desoxiuridina e seus análogos) que se incorporam ao material genético no

processo de síntese do DNA refletindo a taxa de proliferação celular (CELEN *et al.*, 2007; TENG *et al.*, 2007), e aminoácidos (metionina e tirosina) que participam da síntese de proteínas e em alguns casos são considerados mais sensíveis na determinação da taxa de proliferação celular que o [¹⁸F]FDG, como no diagnóstico de tumores de pulmão e gliomas (BELKACÉMI *et al.*, 2007).

3 OBJETIVOS

Planejou-se, neste trabalho, a síntese de um derivado da D-glicose acoplado à mercaptoacetilglicilglicina (MAG₃), um agente quelante para o tecnécio-99m (^{99m}Tc), marcação do produto sintetizado com o ^{99m}Tc e o estudo de sua biodistribuição em animais sadios e com tumor de Ehrlich. Objetivou-se o desenvolvimento de um radiofármaco que possibilite uma forma de diagnóstico simples, eficiente, e sobretudo, de baixo custo que possa ser usado em substituição ao [¹⁸F]FDG. A estrutura química do radiofármaco potencial ligado ao ^{99m}Tc é mostrada na figura 7.

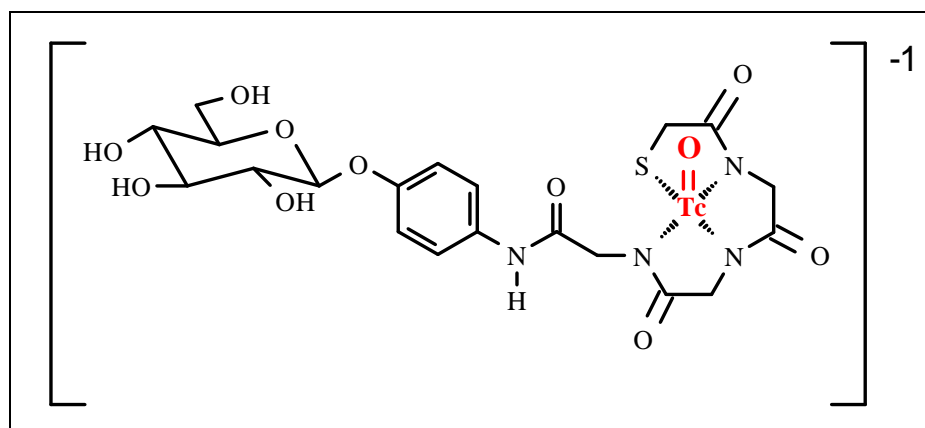


Figura 7 - Radiofármaco potencial marcado com tecnécio-99m.

4 JUSTIFICATIVA

A busca por novos meios de diagnóstico precoce de doenças com alta incidência e elevada mortalidade é muito visada nos dias atuais, principalmente se tais meios apresentarem boa sensibilidade e um custo relativamente baixo, quando comparados aos métodos de diagnóstico utilizados atualmente, tornando-se técnicas de fácil acesso que poderão ser utilizadas na rotina clínica.

PARTE I – SÍNTESE DO LIGANTE DERIVADO DA D-GLICOSE

5 PLANO DE SÍNTESE

5.1 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA

Para a síntese de **(10)** estabeleceu-se a análise retrossintética mostrada abaixo na figura 8.

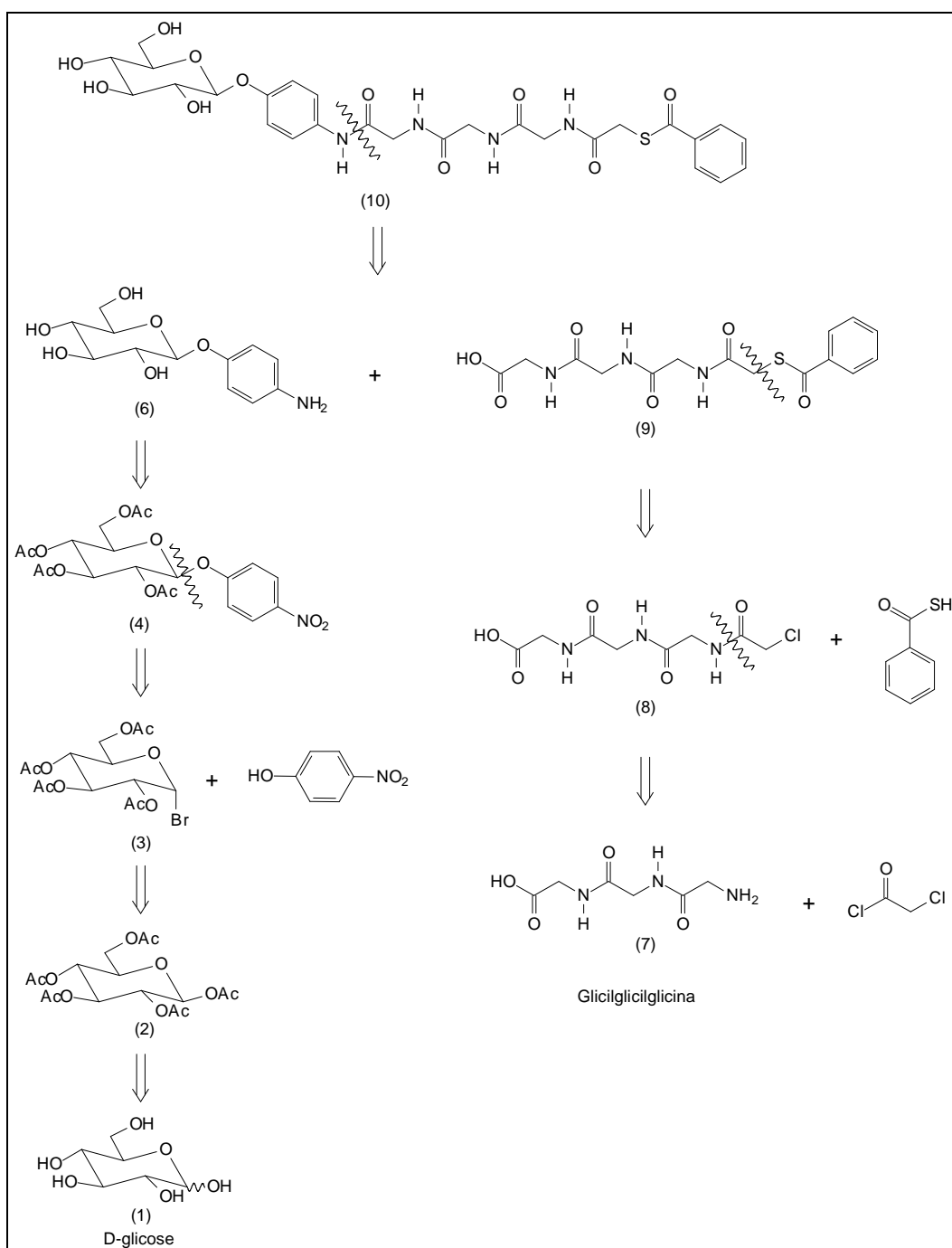


Figura 8 - Análise retrossintética proposta para a síntese de **(10)**.

5.2 ROTA DE SÍNTESE

Com base na análise retróssintética, propôs-se o plano de síntese de **(6)**, **(9)** e **(10)** conforme mostrado nas figuras 9, 10 e 11, respectivamente.

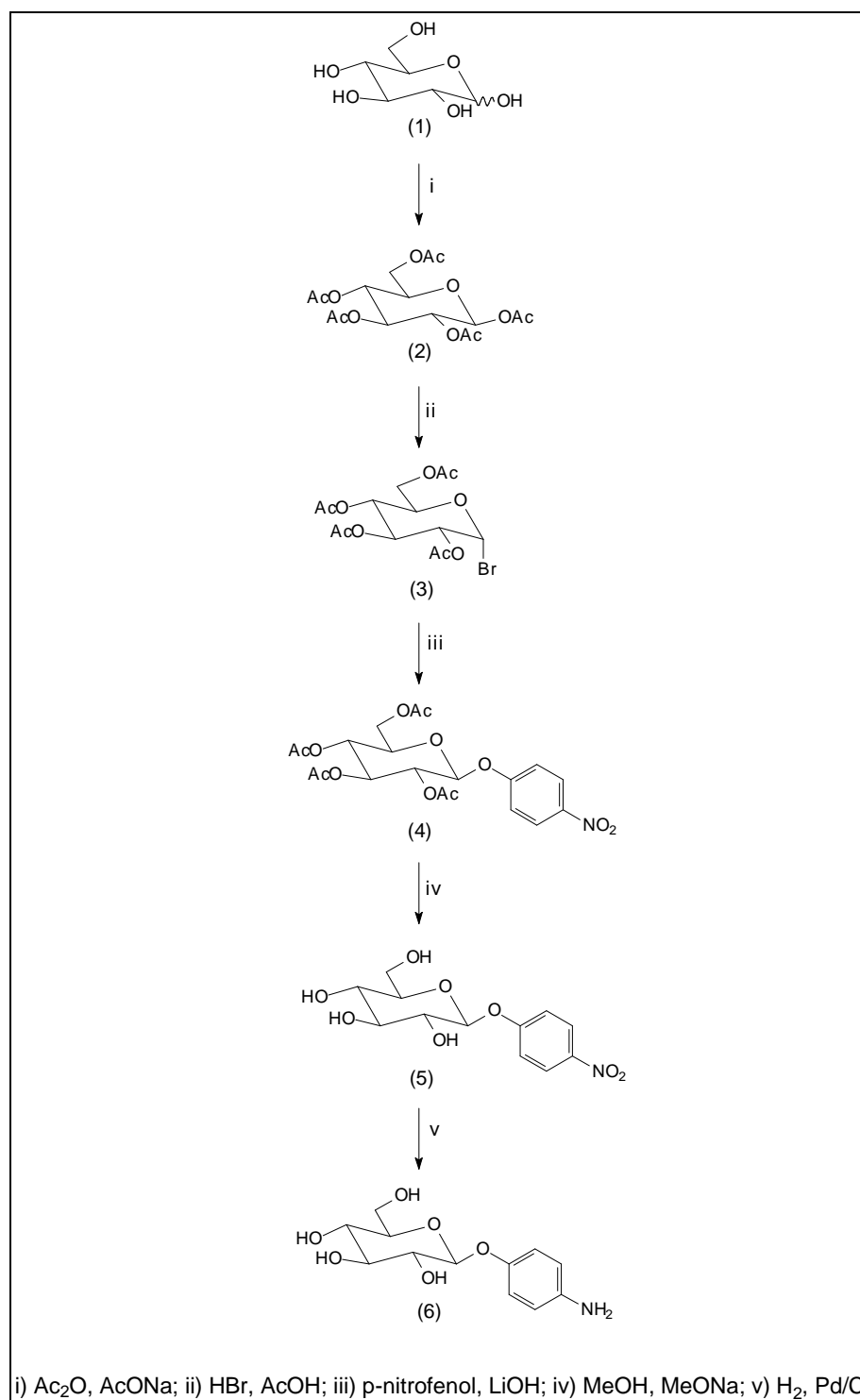


Figura 9 - Rota de síntese para o derivado da D-glicose **(6)**.

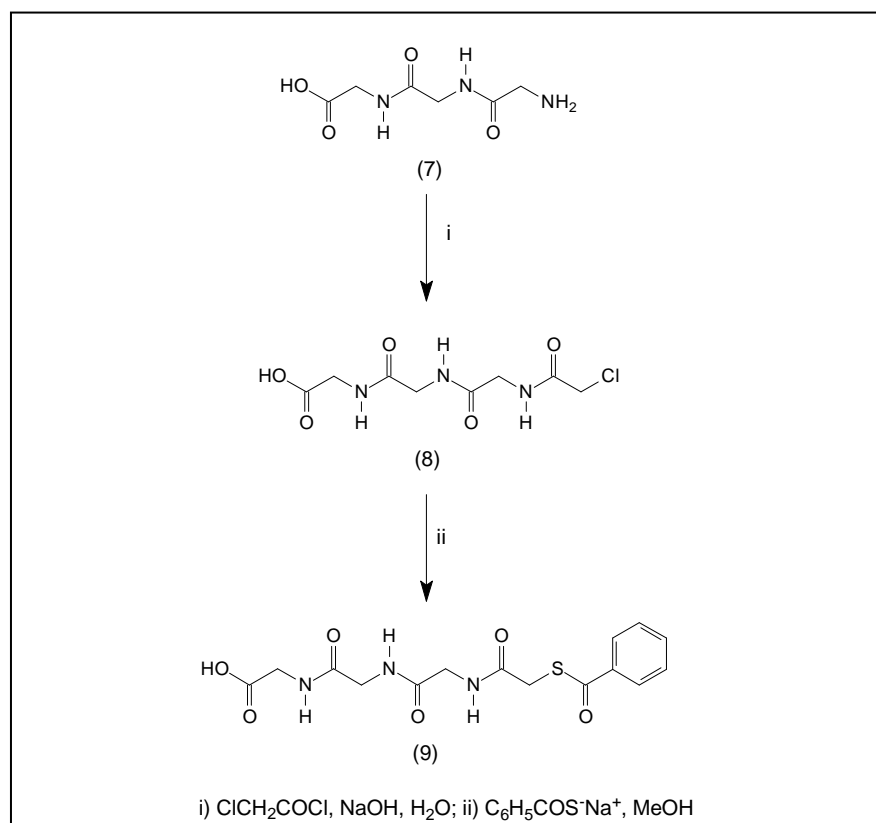


Figura 10 - Rota de síntese para o derivado da glicilglicilglicina (9).

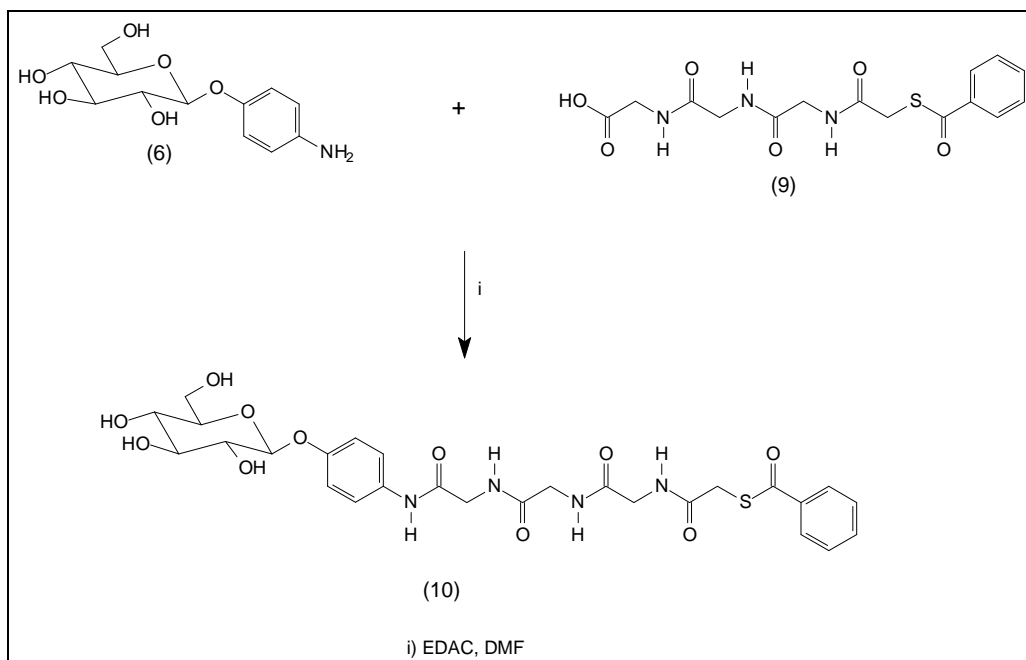


Figura 11 - Rota de síntese para o ligante para o tecnécio-99m (10).

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. MÉTODOS GERAIS:

6.1.1. APARELHAGEM UTILIZADA

Os pontos de fusão foram determinados em aparelhos Silbron-Thermolyne MP-12516 (Laboratório de Química Farmacêutica, FAFAR, UFMG), e não foram corrigidos.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram registrados em aparelho Bruker AVANCE DPX200 (Laboratório de Ressonância magnética de Alta Resolução – LAREMAR, Departamento de Química, ICEX, UFMG). Os deslocamentos químicos (δ) são em ppm, em relação ao tetrametilsilano, utilizado como padrão interno.

Para cromatografia em camada delgada utilizou-se sílica gel 60 G Merck. A espessura da camada de sílica foi de 0,25 mm.

Os espectros no infravermelho foram efetuados em espectrofotômetro com transformada de Fourier Perkin-Elmer, modelo Spectrum One, do laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

O poder rotatório específico foi medido em polarímetro Bellingham + Stanley ADP 220 do laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

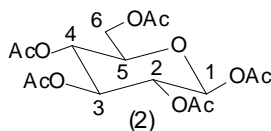
6.1.2. SOLUÇÕES REVELADORAS

Solução de ácido sulfúrico: solução a 15% v/v de ácido sulfúrico concentrado em etanol.

Solução de ninidrina: solução a 0,5% m/v de ninidrina em etanol.

Vapores de iodo.

6.2 SÍNTESE DE 1, 2, 3, 4, 6-PENTA-O-ACETIL- β -D-GLICOPIRANOSE (**2**)



A um balão de fundo redondo de 500 mL foram adicionados 20,0 g (110 mmol) de D-glicose e 16,0 g (200 mmol) de acetato de sódio anidro. A mistura foi dissolvida em 100 mL (108 g, 1058,8 mmol) de anidrido acético. Ao balão foi acoplado um condensador de refluxo equipado com um tubo de cloreto de cálcio. Aqueceu-se a mistura reagente em banho de óleo a 100 °C, com agitação magnética, durante 40 minutos. O acompanhamento da reação foi feito por CCD (eluente: diclorometano/acetato de etila 7:3 v/v; revelador: solução de ácido sulfúrico e aquecimento a 120°C). Ao final da reação a mistura reagente foi vertida em gelo pilado, ocorrendo a formação de um precipitado branco que foi recolhido por filtração a vácuo e, em seguida, recristalizado em etanol. Foram obtidos 34,19 g (87,67 mmol, 78,9%) de (**2**).

Quantidades adicionais de (**2**) (25,37 g, 58,6%) foram obtidas pela mesma técnica.

{F.M.:C₁₆H₂₂O₁₁; M.M.: 390 g/mol; P.F.: 119,3-121,9 °C [P.F._{Lit.}: 131-132 °C]
(DARROW *et al.*, 1996)}

Tabela 1 - Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de (2)

Atribuição	Multiplicidade	Integral	δ (ppm)	J (Hz)
H-1	d	1	5,71	$J_{1,2}=7,80$
H-2, H-3, H-4	m	3	5,25-5,08	
H-5	m	1	3,86-3,83	$J_{5,6}=4,00$
H-6	dd	1	4,29	$J_{6,6'}=12,00$
H-6'	dl	1	4,10	
CH_3	s	15	2,17-2,01	

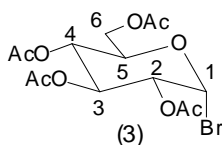
Tabela 2 - Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de (2)

Atribuição	Número de carbonos	δ (ppm)
C-1	1	91,8
C-2	1	70,4
C-3, C-5	2	72,9
C-4	1	67,9
C-6	1	61,6
CH_3	5	20,9-20,7
C=O	5	170,7-169,0

Tabela 3 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de (2)

ν (cm^{-1})	Atribuição
2969	Deformação axial de C-H de carbono sp^3
1738	Deformação axial de C=O de éster
1368	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp^3
1218	Deformação axial assimétrica de C-C((C=O)-O) de éster
1065-1033	Deformação axial assimétrica de C-C-O e C-O-C de açúcar

6.3 SÍNTESE DE BROMETO DE 2, 3, 4, 6-TETRA-O-ACETIL- α -D-GLICOPIRANOSILA (3)



Em um balão de fundo redondo de 250 mL preparou-se uma solução de ácido bromídrico em ácido acético pela adição gota a gota de 12,5 mL de ácido bromídrico 48% p/p a 50 mL de anidrido acético, resfriado em banho de gelo.

Em outro balão de 250 mL solubilizaram-se 5,0 g (12,81 mmol) de **(2)** em 31 mL de diclorometano. A solução foi resfriada, e, em seguida, adicionou-se, gota a gota, sob agitação magnética, a solução de ácido bromídrico em ácido acético. Deixou-se a mistura reagente sob agitação magnética à temperatura ambiente por 80 minutos. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: diclorometano/acetato de etila 9:1 v/v; revelador: solução de ácido sulfúrico e aquecimento a 120°C).

Verteu-se a mistura reagente em um erlenmeyer com gelo pilado, transferiu-se a solução resultante para um funil de separação e extraiu-se com duas porções de 50 mL de diclorometano. A fase orgânica foi lavada com três porções de 40 mL de uma solução saturada de bicarbonato de sódio resfriada, e com quatro porções de 40 mL de água destilada até pH neutro. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. A fase orgânica foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Foi obtido um óleo que solidificou com a adição de éter de petróleo formando um sólido branco. Foram obtidos 4,42 g (10,75 mmol, 84%) de **(3)**.

Quantidades adicionais de **(3)** (11,21 g, 78,5%) foram obtidas pela mesma técnica.

{F.M.:C₁₄H₁₉O₉Br; M.M.: 411 g/mol; P.F. 84,9-86,1 °C [P.F. Lit.: 88-89 °C] (DARROW *et al.*,1996)}

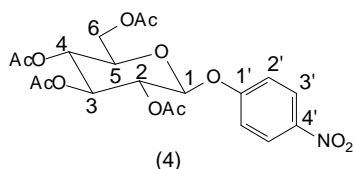
Tabela 4 - Dados de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) de **(3)**

Atribuição	Multiplicidade	Integral	δ (ppm)	J (Hz)
H-1	d	1	6,62	J _{1,2} = 4,00
H-2	dd	1	4,84	J _{2,3} = 9,80
H-3	t	1	5,56	J _{3,4} = 9,80
H-4	t	1	5,17	
H-5 e H-6	m	2	4,38-4,29	
H-6'	m	1	4,17-4,10	
<u>CH</u> ₃	s	12	2,11-2,04	

Tabela 5 - Dados de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) de **(3)**

Atribuição	Número de carbonos	δ (ppm)
C-1	1	86,8
C-2	1	70,4
C-3	1	72,3
C-4	1	67,4
C-5	1	70,8
C-6	1	61,1
<u>CH</u> ₃	4	20,8-20,7
C=O	4	170,6-169,6

6.4 SÍNTESE DE 2, 3, 4, 6-TETRA-O-ACETIL- β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-NITROFENILA (4)



Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram colocados 4,6 g (33 mmol) de *p*-nitrofenol, 1,38 g (33 mmol) de LiOH · H₂O e 9,5 mL de água. Colocou-se o balão sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após 15 minutos adicionaram-se 4,4 g (11 mmol) de **(3)** dissolvido em 15 mL de acetona. O balão foi deixado sob agitação magnética e à temperatura ambiente por 120 minutos. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: diclorometano/acetato de etila 3:1 v/v; revelador: solução de ácido sulfúrico e aquecimento a 120°C).

Verteu-se a mistura reagente em uma cápsula de porcelana e a acetona foi evaporada com ar comprimido. Formou-se um precipitado marrom, que foi transferido para um funil de separação utilizando-se três porções de 40 mL de água e três porções de 40 mL de diclorometano alternadamente. A fase aquosa foi extraída com três porções de 50 mL de diclorometano. As fases orgânicas reunidas foram extraídas com quatro porções de 50 mL de uma solução de NaOH 1 mol/L. Lavou-se a fase orgânica com água até pH 6. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio, e evaporou-se o solvente em evaporador rotatório fornecendo um sólido amarelo claro que foi recristalizado em álcool isopropílico. Foram obtidos 1,9 g (4,05 mmol, 38%) de **(4)**.

Quantidades adicionais de **(4)** (1,83 g, 37%) foram obtidas pela mesma técnica.

{F.M.:C₂₀H₂₃O₁₂N; M.M.: 469 g/mol; P.F.: 168,2-170,1 °C [P.F._{Lit.}: 177-178,5 °C]

(TEMERIOUSK *et al.*, 2005)}

Tabela 6 - Dados de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) de **(4)**

Atribuição	Multiplicidade	Integral	δ (ppm)	J (Hz)
H-1, H-2, H-3, H-4	m	4	5,28-5,15	
H-5	m	1	3,95	
H-6, H-6'	m	2	4,25-4,12	
H-2'	d	2	7,06	J _{2',3} = 8,2 Hz
H-3'	d	2	8,18	
CH ₃	s	12	2,14-2,04	

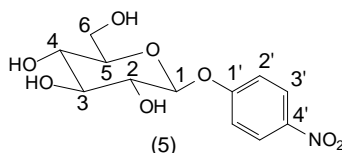
Tabela 7 - Dados de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) de **(4)**

Atribuição	Número de carbonos	δ (ppm)
C-1	1	98,0
C-2	1	70,9
C-3, C-5	2	72,3
C-4	1	68,0
C-6	1	61,7
C-1'	1	161,1
C-2'	2	116,5
C-3'	2	125,7
C-4'	1	143,2
CH ₃	4	20,4
C=O	4	170,3-169,0

Tabela 8 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de (4)

ν (cm^{-1})	Atribuição
1753 e 1730	Deformação axial de C=O de éster
1613-1494	Deformação axial de C=C do anel aromático
1520	Deformação axial assimétrica de NO_2
1341	Deformação axial simétrica de NO_2
1057-1036	Deformação axial assimétrica de C-C-O e C-O-C de açúcar
862	Deformação angular de C-H fora do plano de anel aromático 1,4 dissustituído

6.5 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-NITROFENILA (5)



Em um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados 20 mL de metanol anidro. Ao balão foi acoplado um tubo de cloreto de cálcio. Colocou-se o balão em banho de gelo e sob agitação magnética. Adicionou-se quantidade catalítica de sódio metálico. Após a dissolução de todo o sódio adicionou-se 1,0 g (2,13 mmol) do glicosídeo (4). O balão foi mantido sob agitação magnética por 1 hora e 40 minutos. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: diclorometano/acetato de etila 7:3 v/v; revelador: solução de ácido sulfúrico e aquecimento a 120°C).

Adicionou-se resina ácida Amberlite IRA-120 a mistura reagente até pH 6. A mistura reagente foi filtrada e lavada com metanol. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório e obteve-se 0,54 g (1,79 mmol, 84%) de (5).

Quantidades adicionais de (5) (0,46 g, 72%) foram obtidas pela mesma técnica.

{F.M.:C₁₂H₁₅O₈N; M.M.: 301 g/mol; P.F.: 158,2-160,0 °C [P.F.Lit.: 165-168 °C]
(ALDRICH, 2003-2004)}

Tabela 9 - Dados de RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆, δ) de (5)

Atribuição	Multiplicidade	Integral	δ (ppm)	J (Hz)
H-1, 2 OH	m	3	5,18-5,10	
H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'	m	6	3,77-3,33	
OH	m	1	5,49	
C-6-OH	m	1	4,62	
H-2'	d	2	7,25	J _{2',3'} = 9,00 Hz
H-3'	d	2	8,23	

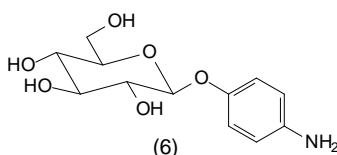
Tabela 10 - Dados de RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆, δ) de (5)

Atribuição	Número de carbonos	δ (ppm)
C-1	1	99,9
C-2	1	73,1
C-3	1	77,2
C-4	1	69,5
C-5	1	76,5
C-6	1	60,6
C-1'	1	162,4
C-2'	2	116,6
C-3'	2	125,7
C-4'	1	141,7

Tabela 11 - Dados do espectro no Infravermelho (ν, cm⁻¹) de (5)

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3285	Deformação axial de O-H
1593-1493	Deformação axial de C=C do anel aromático
1515	Deformação axial assimétrica de NO ₂
1342	Deformação axial simétrica de NO ₂
1064-1046	Deformação axial assimétrica de C-C-O e C-O-C de açúcar
851	Deformação angular de C-H fora do plano de anel aromático 1,4 dissustituído

6.6 SÍNTESE DE β-D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-AMINOFENILA (6)

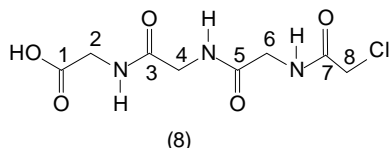


Dissolveu-se 0,2 g (0,6 mmol) de **(5)** em 5 mL de água quente. Após resfriamento, 50 mg de paládio/carvão foram adicionados e a mistura foi mantida por 2 horas sob agitação magnética e atmosfera de hidrogênio, em hidrogenador Parr. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 3:1 v/v; revelador: solução de ácido sulfúrico e aquecimento a 120 °C ou ninidrina e aquecimento a 120 °C).

Ao término da reação, o catalisador foi removido por filtração e o solvente removido em evaporador rotatório. O produto bruto foi usado imediatamente na etapa seguinte.

{F.M.:C₁₂H₁₇O₆N; M.M.: 271 g/mol}

6.7 SÍNTESE DE CLOROACETILGLICILGLICILGLICINA (8)



Em um balão bitubulado de 250 mL foram adicionados 500 mg (2,6 mmol) de glicilglicilglicina solubilizados em 15 mL de solução de hidróxido de sódio 1 mol/L. O balão foi mantido em banho de gelo. Conectou-se ao balão um funil de adição contendo 20 mL da solução de hidróxido de sódio 1 mol/L e outro funil de adição contendo 1,8 mL (23 mmol) de cloreto de cloroacetila dissolvidos em 20 mL de éter etílico. Adicionou-se gota a gota, simultaneamente, todo o conteúdo dos funis. Após a adição, o meio apresentou pH 4. A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética por 7 horas a 0 °C. A reação foi guardada em freezer por 12 horas.

Adicionou-se à mistura reagente HCl concentrado até pH 2 (foram gastos 2 mL). A mistura foi vertida em uma cápsula e os solventes eliminados com ar comprimido. O produto bruto obtido foi usado diretamente na etapa seguinte.

{F.M.: C₈H₁₂O₅N₃Cl; M.M.: 265,5 g/mol}

Tabela 12 - Dados de RMN de ¹H (200 MHz, D₂O, δ) de (8)

Atribuição	Multiplicidade	Integral	δ (ppm)	J (Hz)
H-2, H-4, H-6	s	3	4,07-3,97	
H-8	s	1	4,24	

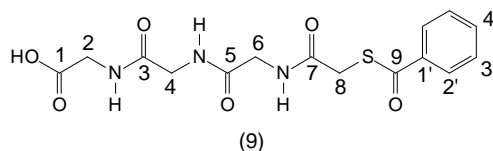
Tabela 13 - Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, D_2O , δ) de **(8)**

Atribuição	Número de carbonos	δ (ppm)
C-2, C-4, C-6, C-8	4	43,3-41,6
C=O	4	173,8-171,1

Tabela 14 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de **(8)**

ν (cm^{-1})	Atribuição
3274	Deformação axial de N-H
1716	Deformação axial de C=O de ácido
1645	Deformação axial de C=O de amida

6.8 SÍNTESE DE BENZOIL-MERCAPTOACETILGLICILGLICILGLICINA (9)



Adicionou-se 0,123 g (5,35 mmol) de sódio metálico a 15 mL de metanol anidro. Após dissolução do metal, adicionou-se 0,65 mL (5,57 mmol) de ácido tiobenzóico.

A cloroacetilglucilglucilglucina bruta foi dissolvida em 210 mL de metanol anidro. Em seguida, adicionou-se, sobre esta, a solução de tiobenzato de sódio, previamente preparada. A reação foi mantida sob refluxo por 2 horas. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: metanol 100%; revelador: iodo).

A mistura reagente foi resfriada e adicionaram-se 20 g de resina ácida Amberlite IRA-120 mantendo-se a mistura reagente sob agitação magnética por 20 minutos. Filtrou-se a mistura, o filtrado foi transferido para uma cápsula e o solvente foi removido por evaporação com ar comprimido. Obteve-se o produto como um sólido amarelado. Este foi transferido para um balão de 125 mL e adicionaram-se 10 mL de acetona e 80 mL de éter etílico para a remoção do excesso de ácido tiobenzóico. O balão foi deixado em repouso para a sedimentação do produto e filtrou-se o conteúdo do balão obtendo um sólido branco. Foram obtidos 0,760 g (78%).

Quantidades adicionais de **(9)** (2,00 g, 60%) foram obtidas pela mesma técnica.

{F.M.:C₁₅H₁₇O₆N₃S; M.M.: 367 g/mol; P.F.: 188,2-193,5 °C [P.F.Lit.: 195-196 °C]
(FRITZBERG *et al.*, 1986)}

Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6 , δ) de **(9)**

Atribuição	Multiplicidade	Integral	δ (ppm)	J (Hz)
H-2, H-4, H-6, H-8	m	8	3,90-3,61	
N-H	m	1	8,59	
N-H	m	2	8,36-8,17	
H-2'	d	2	7,93	$J_{2',3'}=7,20$
H-3'	t	2	7,56	$J_{3',4'}=7,35$
H-4'	t	1	7,71	

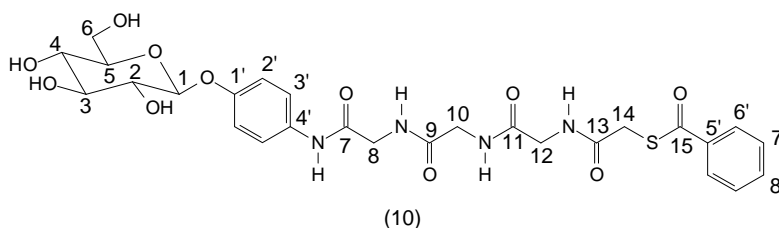
Tabela 16 - Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6 , δ) de **(9)**

Atribuição	Número de carbonos	δ (ppm)
C-1, C-3, C-5, C-7	4	171,1-167,3
C-2, C-4, C-6	3	42,6-40,7
C-8	1	32,5
C-9	1	190,4
C-1'	1	136,0
C-2'	2	129,2
C-3'	2	126,9
C-4'	1	134,1

Tabela 17 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de **(9)**

ν (cm^{-1})	Atribuição
3600-2600	Deformação axial de O-H
3287	Deformação axial de N-H
3083	Deformação axial de C-H de carbono sp^2
1703	Deformação axial de C=O de ácido
1640	Deformação axial de C=O de amida

6.9 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-N-[N³-(BENZOIL-MERCAPTOACETIL)GLICILGLICILGLICIL]AMINOFENILA (10)



Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram dissolvidos 180 mg (0,66 mmol) do glicosídeo (**6**) em 5 mL de DMF. Em seguida, adicionaram-se 363 mg (0,99 mmol) de (**9**) e com agitação magnética até a dissolução dos reagentes. Adicionaram-se 193 mg (0,99 mmol) de EDAC e manteve-se a mistura sob agitação magnética à temperatura ambiente por 20 horas. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 8:2 v/v; revelador: solução de ácido sulfúrico e aquecimento a 120 °C ou ninidrina e aquecimento a 120°C).

Verteu-se a mistura reagente em uma cápsula e removeu-se o solvente com ar comprimido. O resíduo formado foi lavado com água destilada e centrifugado a 3000 xg. Retirou-se o sobrenadante e ao precipitado formado, adicionou-se água. A mistura foi levada à fervura e filtrada à quente. Obteve-se (**10**) como sólido de cor bege. Foram obtidos 0,13 g (0,21 mmol, 31,5%).

{F.M.:C₂₇H₃₂O₁₁N₄S; M.M.: 620 g/mol; P.F.: 213,2-214,4 °C; [α]_D²⁵ -21,7 (c 2,5, DMSO)}

Tabela 18 - Dados de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ) de **(10)**

Atribuição	Multiplicidade	Integral	δ (ppm)	J (Hz)
H-1	d	1	4,78	$J_{1,2}=7,20$
H-2, H-3, H-4, H-5	m	4	3,32-3,12	
H-6 ^a	m	1	3,50-3,46	
H-6b	m	1	3,71-3,67	
OH	d	1	5,28	$J= 5,2$
OH	d	1	5,05	$J= 4,4$
OH	d	1	4,99	$J= 5,2$
C-6-OH	t	1	4,55	$J= 6,00$
H-8, H-10, H-12	3d	6	3,87-3,77	$J= 5,83,$ $J= 5,83,$ $J=5,63$
H-14	s	2	3,88	
Ar-NH	s	1	9,67	
NH	t	1	8,50	
NH	t	1	8,28	
NH	t	1	8,21	
H-2'	d	2	6,98	$J_{2',3'}= 9,20$ Hz
H-3'	d	2	7,50	
H-6'	d	2	7,93	$J_{6',7'}=7,70$ Hz
H-7'	t	2	7,57	$J_{7',8'}=7,60$ Hz
H-8'	t	1	7,70	

Tabela 19 - Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6 , δ) de **(10)**

Atribuição	Número de carbonos	δ (ppm)
C-1	1	100,8
C-2	1	73,3
C-3	1	77,0
C-4	1	69,8
C-5	1	76,7
C-6	1	60,8
C-7, C-9, C-11, C-13	4	169,4-167,2
C-8, C-10, C-12	3	42,6-42,2
C-14	1	32,5
C-15	1	190,4
C-1'	1	153,4
C-2'	2	116,5
C-3'	2	120,5
C-4'	1	133,0
C-5'	1	136,0
C-6'	2	126,9
C-7'	2	129,2
C-8'	1	134,1

Tabela 20 - Dados do espectro no Infravermelho (ν , cm^{-1}) de **(10)**

ν (cm^{-1})	Atribuição
3272	Deformação axial de O-H e N-H
3081	Deformação axial de C-H de carbono sp^2
2928	Deformação axial de C-H de carbono sp^3
1638	Deformação axial de C=O de amida
1074-1019	Deformação axial assimétrica de C-C-O e C-O-C de açúcar

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 SÍNTESE DE 1, 2, 3, 4, 6-PENTA-O-ACETIL- β -D-GLICOPIRANOSE (2)

Primeiramente, realizou-se a per-O-acetilação da D-glicose (1) obtendo-se o 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-acetil- β -D-glicopiranoose (2). Esta acetilação tem como objetivo proteger os grupos hidroxilas do açúcar e, com isso, introduzir, seletivamente, grupos em determinadas posições. O carbono anomérico é o mais reativo (MISRA *et al.*, 2004). A acetilação reduz a polaridade do carboidrato permitindo o uso de solventes orgânicos (STICK, 2001).

A peracetilação pode ser conseguida utilizando-se três condições diferentes, dependendo do tipo de anômero que se deseja obter, como se observa na figura 12 (CONCHIE; LEVVY, 1957).

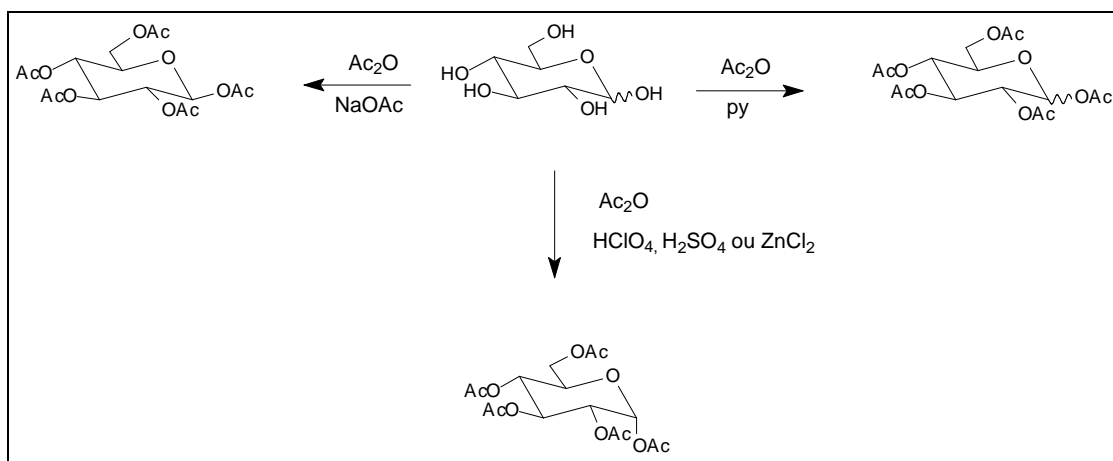


Figura 12 - Condições para formação de peracetilado da D-glicose (STICK, 2001).

Neste trabalho, o método de escolha foi aquele utilizando acetato de sódio como catalisador em presença de anidrido acético, fornecendo o anômero β que apresenta

maior reatividade facilitando a execução das etapas de síntese posteriores (STICK, 2001), a proposta mecanística para essa reação é mostrada na figura 13.

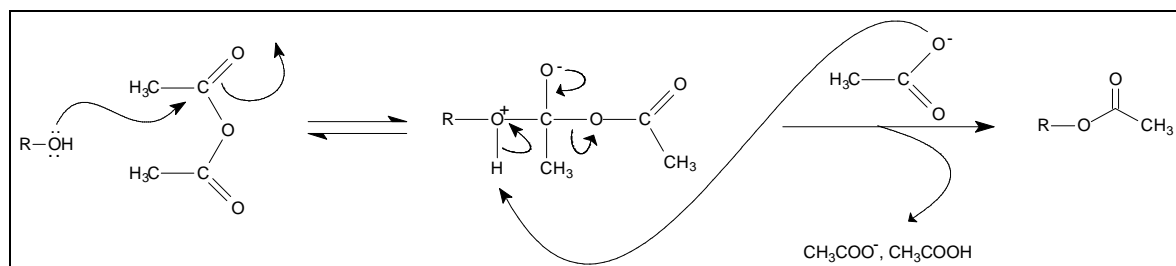


Figura 13 - Mecanismo geral para a acetilação de álcoois com anidrido acético.

O derivado **(2)** foi obtido com rendimento médio de 69%, e caracterizado por espectroscopia no infravermelho, espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e ponto de fusão.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H é possível determinar a posição do hidrogênio anomérico (α ou β), devido à relação existente entre as constantes de acoplamento dos hidrogênios vicinais e o ângulo diedro (ϕ) entre estes hidrogênios. Esta relação segue a curva de Karplus-Conroy que é representada na figura 14 (HALL, 1964).

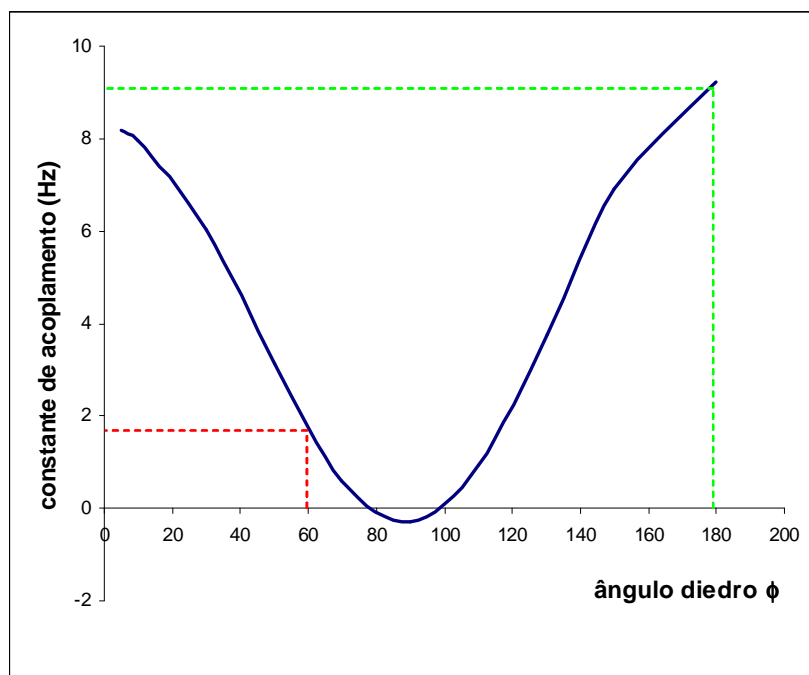


Figura 14 - Curva de Karplus-Conroy e relação da constante de acoplamento vicinal J_{H-H} com o ângulo diedro ϕ (HALL, 1964).

Portanto, é possível identificar a posição anomérica do açúcar relacionando as constantes de acoplamento de dois hidrogênios vicinais com seu ângulo diedro, como mostrado na figura 15.

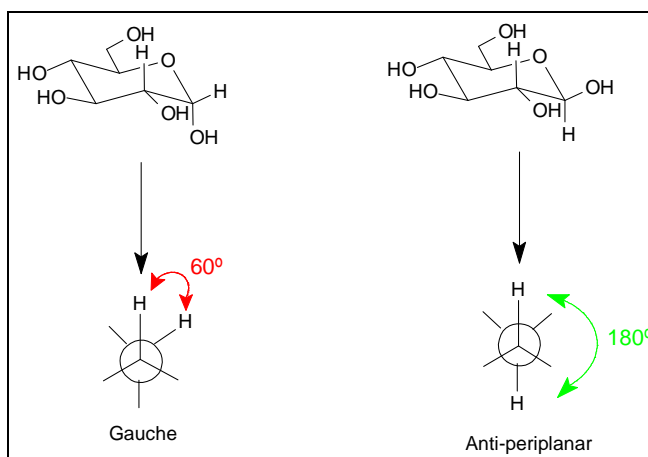
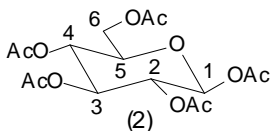


Figura 15 - Relação entre ângulo diedro (ϕ) e conformação dos anômeros α e β .



No espectro de RMN de ^1H de **(2)**, mostrado na figura 16, o duplete centrado em δ 5,71 foi atribuído a H-1, acoplado com H-2 com constante $J^B = 7,80$ Hz, confirmando a posição anomérica β . É o sinal mais distante do TMS devido ao efeito retirador de elétrons dos oxigênios. O multiplete entre δ 5,25 e δ 5,08 com integral para três hidrogênios foi atribuído a H-2, H-3 e H-4. O duplete duplo centrado em δ 4,29 foi atribuído ao sinal de H-6, acoplado com H-6' e H-5 com constantes de 12,40 Hz e 4,00 Hz, respectivamente. O duplete largo em δ 4,10 foi atribuído ao sinal de H-6' acoplado com H-6. O multiplete entre δ 3,86 e δ 3,83 foi atribuído a H-5. Os sinais de ressonância dos hidrogênios dos grupos metila apresentam-se como simpletos entre δ 2,17 e δ 2,01.

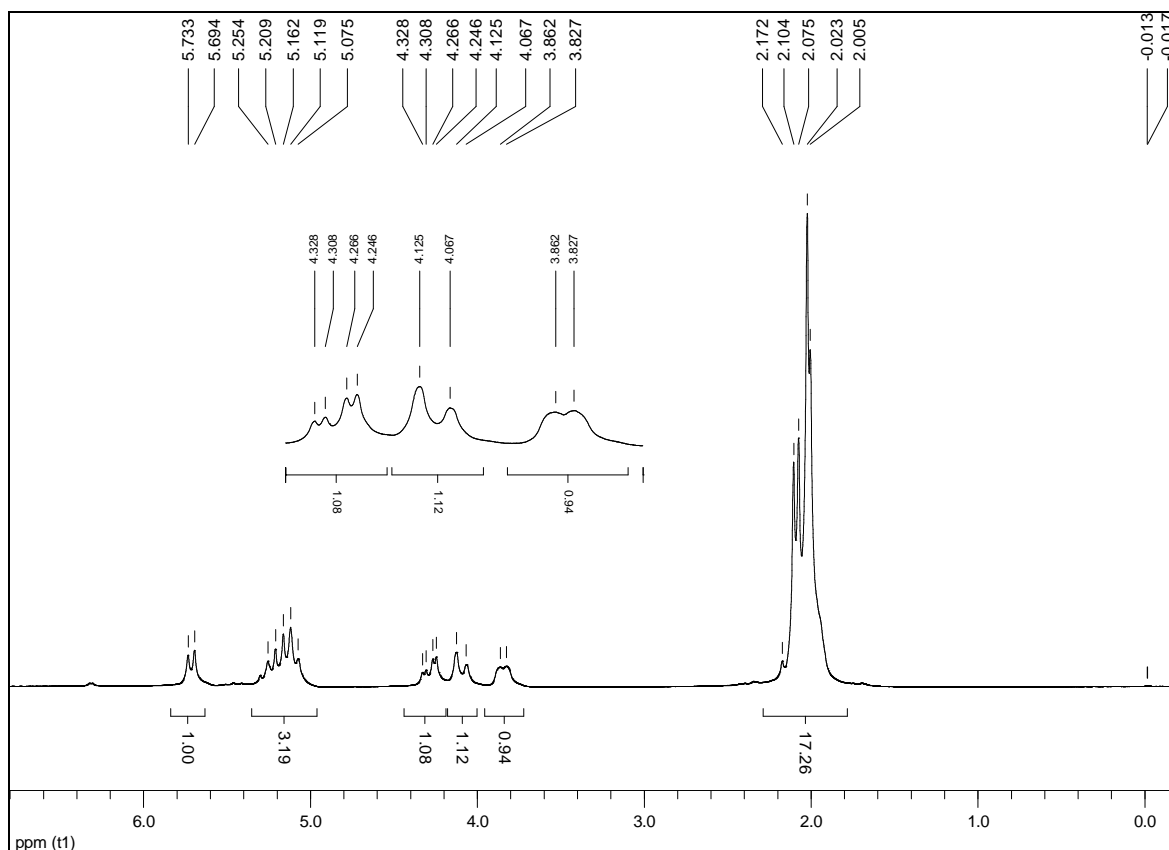


Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de **(2)**

No espectro de RMN de ^{13}C de **(2)**, mostrado na figura 17, é possível observar cinco sinais de ressonância de carbono entre δ 170,7 e δ 169,0, correspondentes às carbonilas dos grupos acetila. O sinal em δ 91,8 foi atribuído ao carbono anomérico (C-1). Os sinais de C-3 e C-5 estão sobrepostos em δ 72,9. Observa-se um sinal em δ 70,4 relativo à C-2, um sinal em δ 67,9 atribuído a C-4 e um sinal em δ 61,6 relativo à C-6. Os sinais dos grupos metila foram atribuídos aos sinais entre δ 20,9 e δ 20,7.

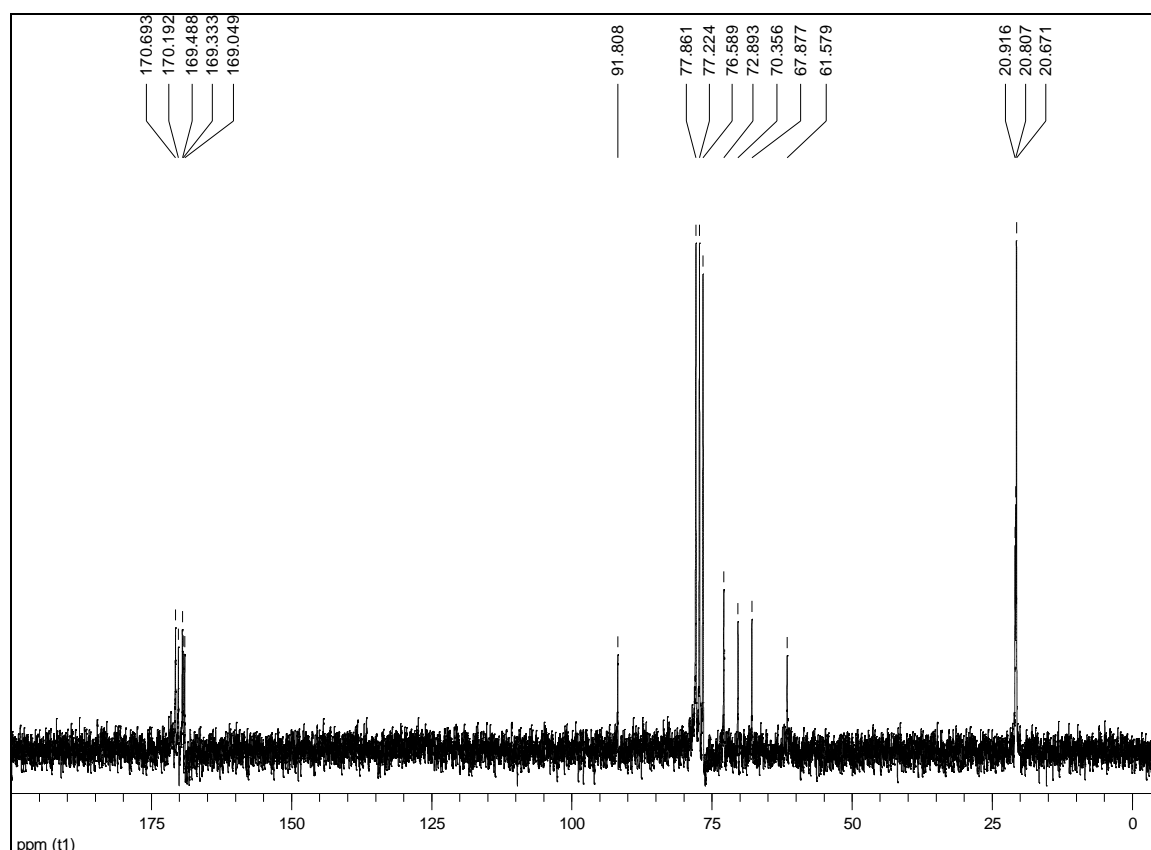


Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de **(2)**

No espectro na região do infravermelho de **(2)**, mostrado na figura 18, observou-se uma banda em 2969 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação C-H de carbono sp^3 e outra em 1368 cm^{-1} referente a deformação angular da ligação C-H de carbono sp^3 . A banda em 1738 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de ligação C=O de éster, indicando a acetilação do açúcar, que foi confirmada pela presença da banda em 1218 cm^{-1} decorrente da deformação axial da ligação C-(C=O)-O de éster. Observaram-se, ainda, duas bandas, em 1065 e 1033 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C-O-C e C-C-O do açúcar, respectivamente.

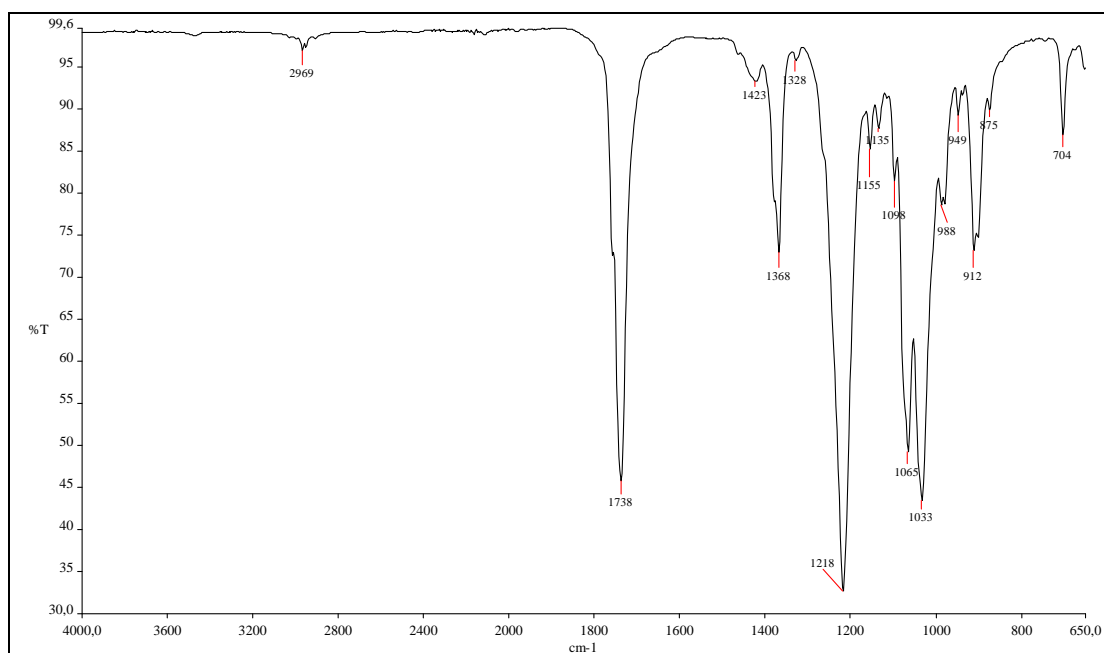


Figura 18 - Espectro no infravermelho (ν , cm^{-1}) de **(2)**.

7.2 SÍNTESE DE BROMETO DE 2, 3, 4, 6-TETRA-O-ACETIL- α -D-GLICOPIRANOSILA (3)

Nesta etapa, efetuou-se a substituição do grupo acetoxila do carbono anomérico por um átomo de bromo, pela reação da D-glicose peracetilada (2) com anidrido acético e ácido bromídrico 48% p/p numa proporção de 4:1 (CONCHIE *et al.*, 1957).

Haleto de glicopiranosila são muito utilizados como intermediários para a síntese de glicosídeos, sendo os brometos mais utilizados, pois são mais reativos que os cloretos e mais estáveis que os iodetos (HUNSEN *et al.*, 2005; JACOBSSON *et al.*, 2006).

O derivado (3) foi obtido com rendimento médio de 81%, e caracterizado por espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e ponto de fusão. O mecanismo proposto para a formação de (3) está ilustrado na figura 19.

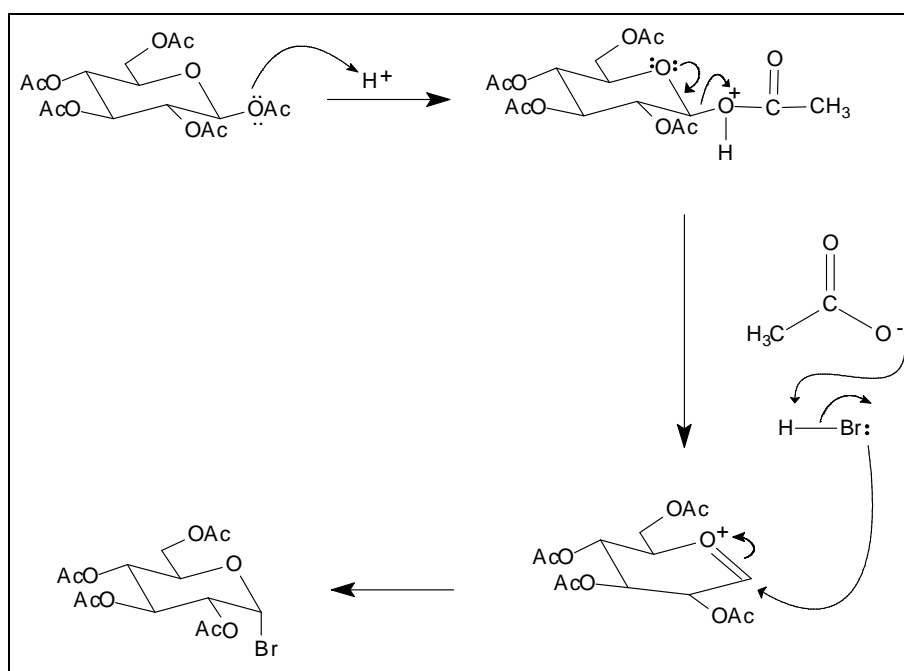


Figura 19 - Proposta de mecanismo para reação de formação de (3).

O brometo de glicosila **(3)** é formado preferencialmente na forma do anômero α , contrariando o normalmente esperado por questões estéricas. Esta preferência foi primeiramente notada por Edward, e posteriormente Limieux a denominou efeito anomérico (STICK, 2001; TIMMONS; JAKEMAN, 2007).

O efeito anomérico é inversamente proporcional à polaridade do solvente e diretamente proporcional a eletronegatividade do substituinte (COLLINS; FERRIER, 1995) e pode ser explicado por diversas maneiras como pela repulsão dos pares de elétrons não ligantes do oxigênio do anel piranosídico com os elétrons não ligantes do átomo eletronegativo em C-1 que desfavorece a formação do anômero β pelo alinhamento desfavorável dos dipolos, ou pela eletronegatividade do substituinte e do oxigênio que, novamente desfavorece o anômero β (STICK, 2001), como mostrado na figura 20.

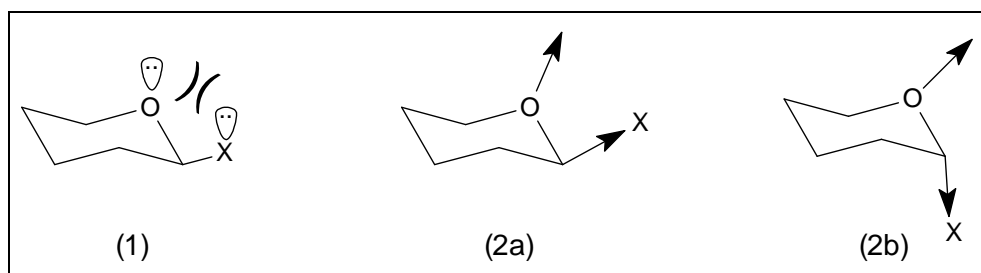


Figura 20 - Interações dos pares de elétrons não ligantes (1) e influência da eletronegatividade (2a e 2b) no favorecimento do anômero α (STICK, 2001).

No entanto, a proposta mais aceita envolve a interação entre um par de elétrons não ligantes do oxigênio piranosídico, posicionado axialmente, e o orbital molecular antiligante (σ^*) da ligação C₁-X no anômero α . Assim ocorre a superposição destes orbitais, ocasionando o encurtamento da ligação O₅-C₁ e alongamento da ligação

C₁-X, gerando aumento de densidade eletrônica em X (COLLINS; FERRIER, 1995; STICK, 2001), como mostrado abaixo na figura 21.

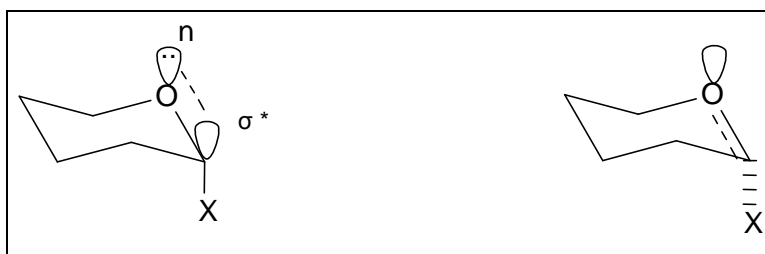
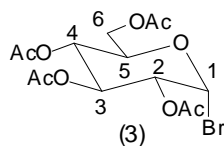


Figura 21 - Interação entre o par de elétrons axial do oxigênio e o orbital antiligante da ligação C₁-X (COLLINS; FERRIER, 1995).



No espectro de RMN de ^1H de **(3)**, mostrado na figura 22, o sinal em δ 6,62 é referente a H-1, com constante de acoplamento $J^\beta = 4,00$ Hz, confirmando a configuração α . Os sinais dos doze hidrogênios metílicos apresentam-se como simpletos entre δ 2,11 e δ 2,04.

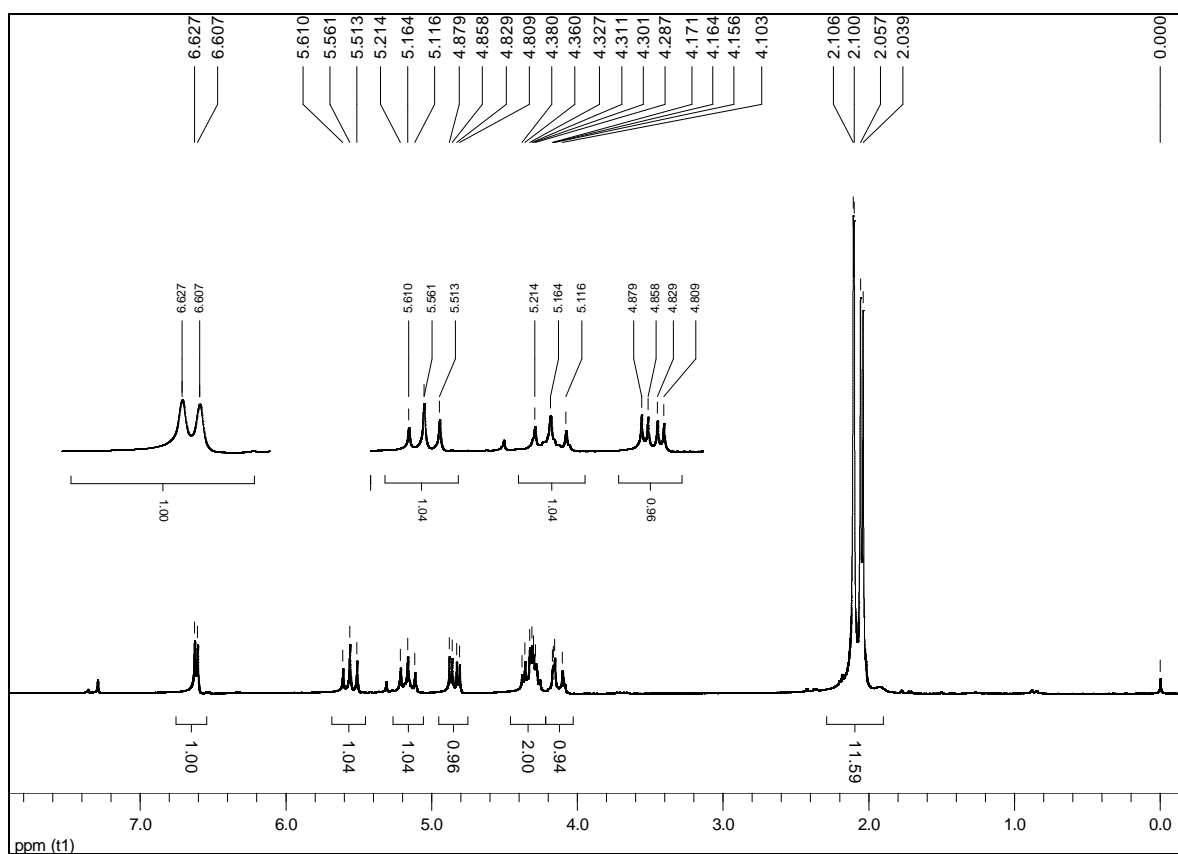


Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de **(3)**

No espectro de RMN de ^{13}C de **(3)**, mostrado na figura 23, foram observados quatro sinais referentes às carbonilas dos grupos acetila entre, δ 170,6 e δ 169,6. O sinal em δ 86,8 foi atribuído ao carbono anomérico e apresenta-se mais próximo do TMS devido ao efeito do átomo pesado (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). Os sinais dos carbonos dos grupos metila são observados entre δ 20,8 e δ 20,7.

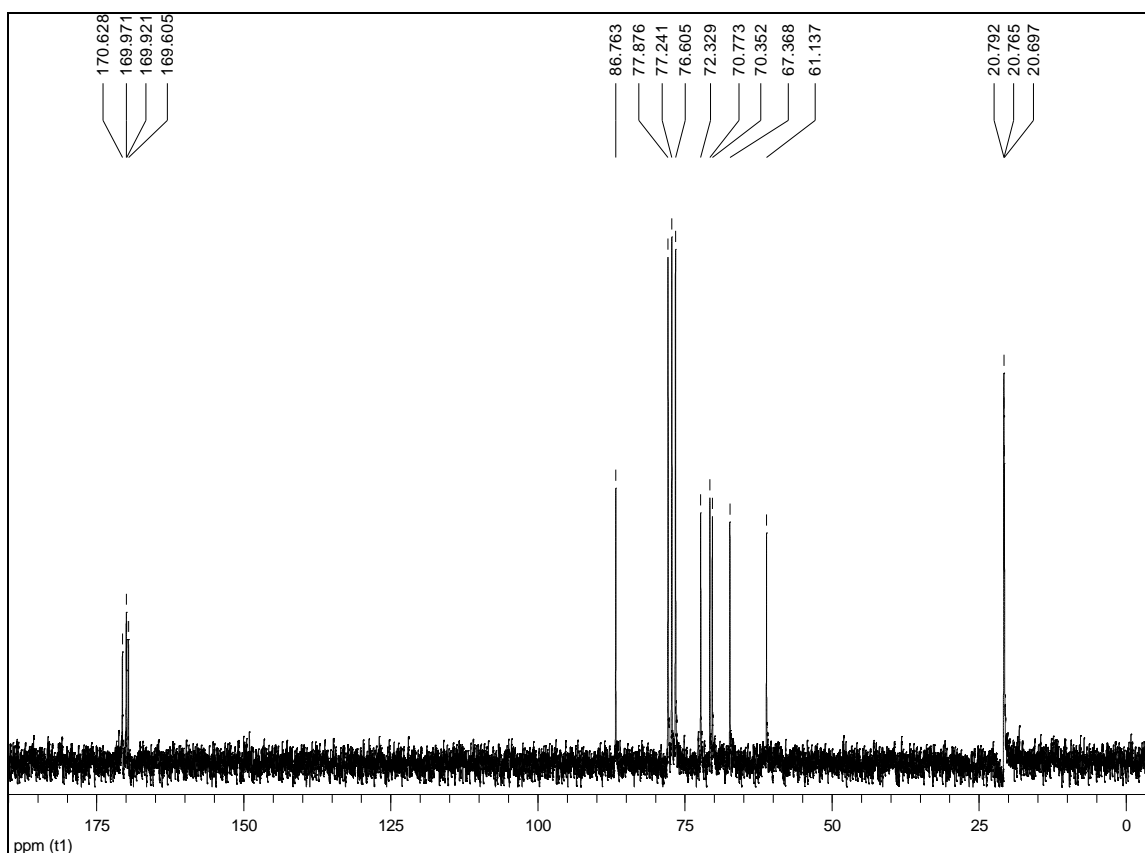


Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de **(3)**

7.3 SÍNTESE DE 2, 3, 4, 6-TETRA-O-ACETIL-β-D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-NITROFENILA (4)

A síntese de glicosídeos de arila tem, historicamente, atraído interesse devido a estas substâncias serem amplamente distribuídas na natureza (DESS *et al.*, 1981; ROY; TROPPER, 1990). Glicosídeos apresentam em sua estrutura uma porção contendo o carboidrato (unidade glicosídica) e outra porção, não-glicosídica, denominada aglicona ligada ao oxigênio de C-1 (STICK, 2001), como mostrado na figura 24.

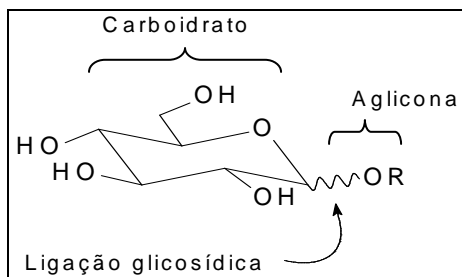


Figura 24 - Ligação glicosídica.

O glicosídeo (4) foi obtido com rendimento médio de 38%, pela reação do brometo de glicosila (3) com 4-nitrofenol, na presença de hidróxido de lítio (FISCHER; MECHEL, 1916; CONCHIE, 1957). Inicialmente, formou-se o íon fenóxido pela adição de 4-nitrofenol a uma solução contendo hidróxido de lítio. O fenóxido, então, ataca o carbono anomérico de (3) liberando o átomo de bromo para o meio, fornecendo o derivado (4), conforme demonstrado na figura 25. O derivado (4) foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e ponto de fusão.

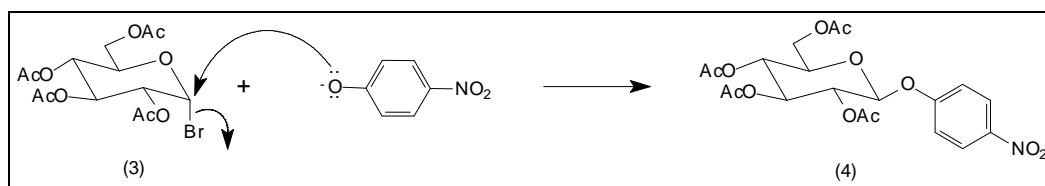
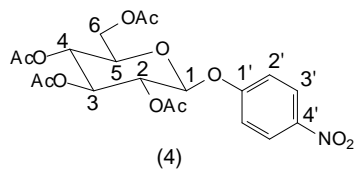


Figura 25 - Proposta mecanística para a formação do glicosídeo (4).



No espectro de RMN de ^1H de **(4)**, mostrado na figura 26, o duplete com integral para dois átomos de hidrogênio centrado em δ 8,18 é referente ao sinal de H-3' acoplado com H-2' com $J^{\beta} = 8,2$ Hz, e o duplete com integral também para dois átomos de hidrogênio centrado em δ 7,06 é referente ao sinal de H-2'. O sinal de H-1 está superposto com os sinais de H-2, H-3 e H-4 no multiplete entre δ 5,28 e δ 5,15. Os sinais dos hidrogênios metílicos apresentam deslocamento químico entre δ 2,14 e δ 2,04.

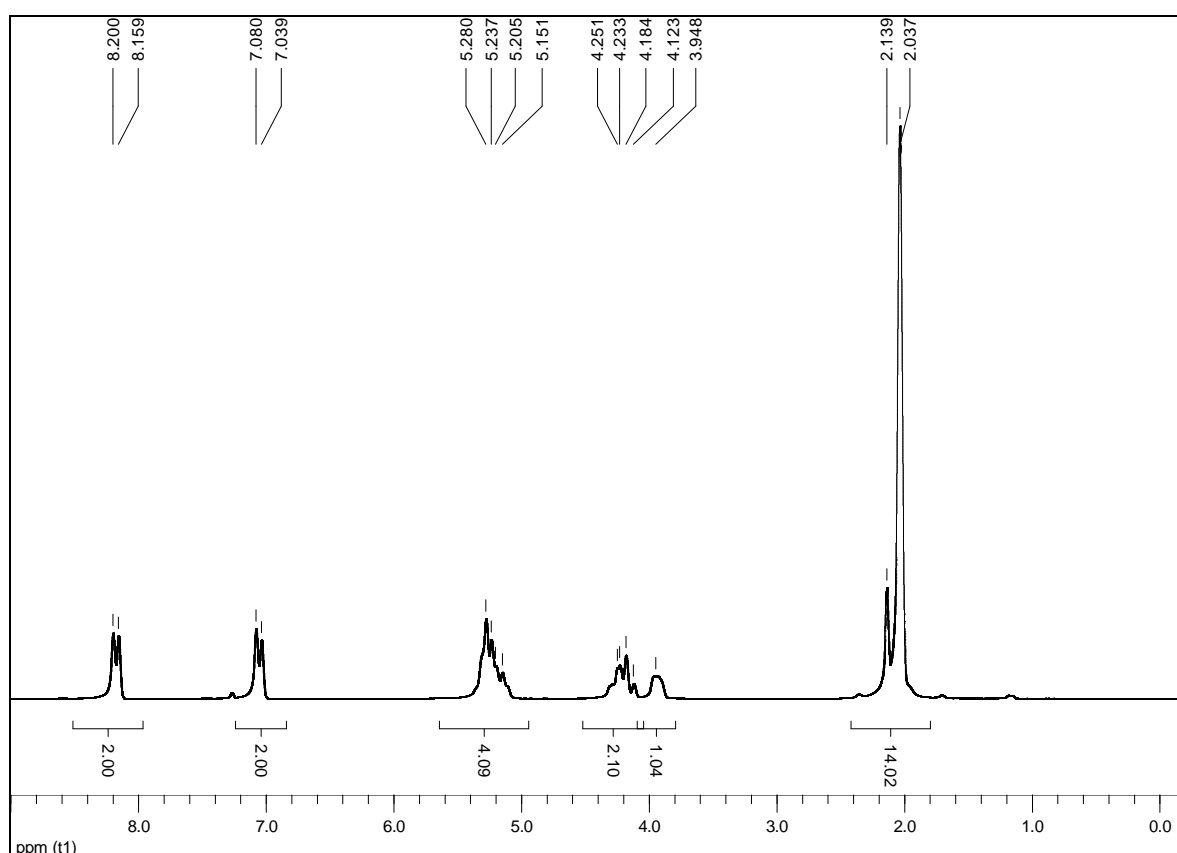


Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de **(4)**

No espectro de RMN de ^{13}C de **(4)**, mostrado na figura 27, os quatro sinais entre δ 170,3 e δ 169,0 ppm são referentes aos carbonos carbonílicos. O carbono aromático mais desprotegido é C-1', seguido por C-4', C-3' e C-2' que apresentam sinais de ressonância em δ 161,1, δ 143,2, δ 125,7 e δ 116,5, respectivamente. O sinal de C-1 encontra-se em δ 98,0. Os carbonos dos grupos metila apresentam sinais em δ 20,4.

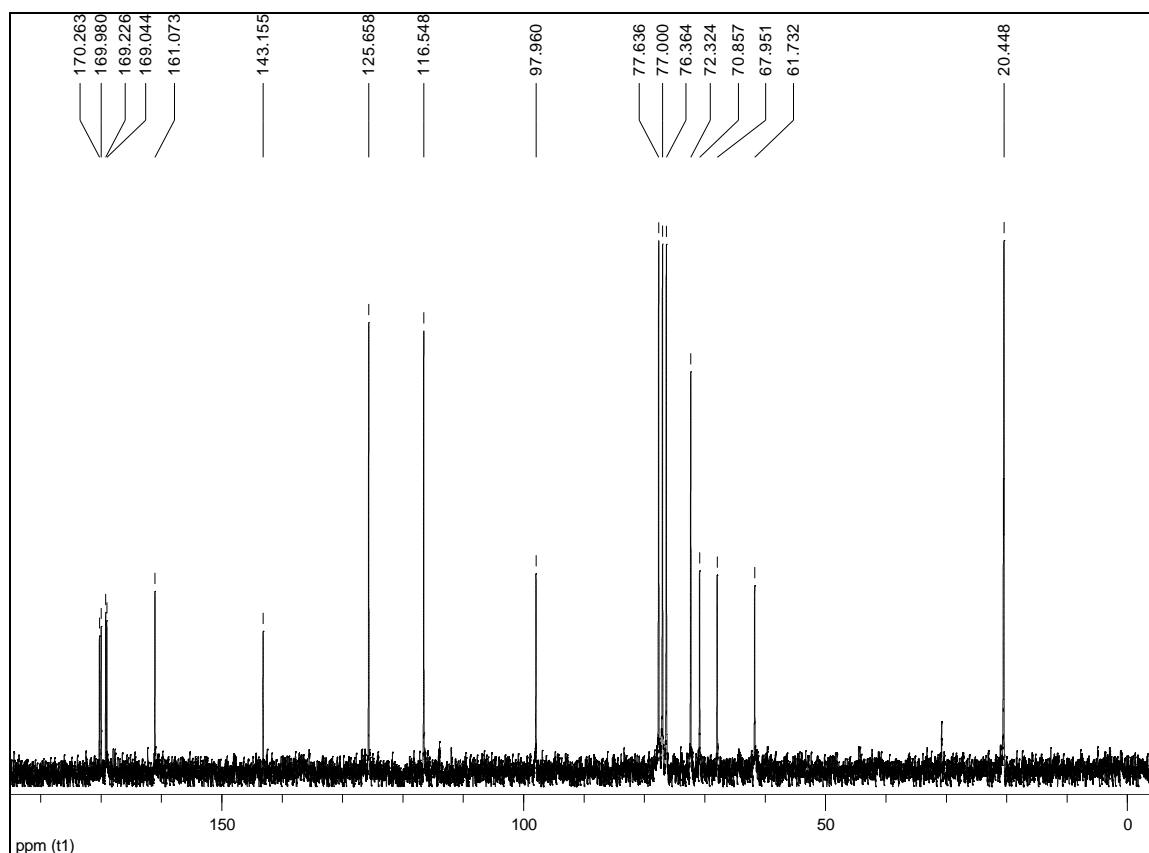


Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de **(4)**

No espectro no infravermelho de **(4)**, mostrado na figura 28, entre outras bandas, observou-se três bandas na região entre 1613 cm^{-1} e 1494 cm^{-1} , referentes à deformação axial de C=C do anel aromático, além de duas bandas decorrentes da deformação axial de NO_2 em 1520 cm^{-1} e 1341 cm^{-1} . Observa-se, ainda a banda em 862 cm^{-1} , referente à deformação angular de C-H fora do plano, característica de anel aromático 1,4-dissubstituído.

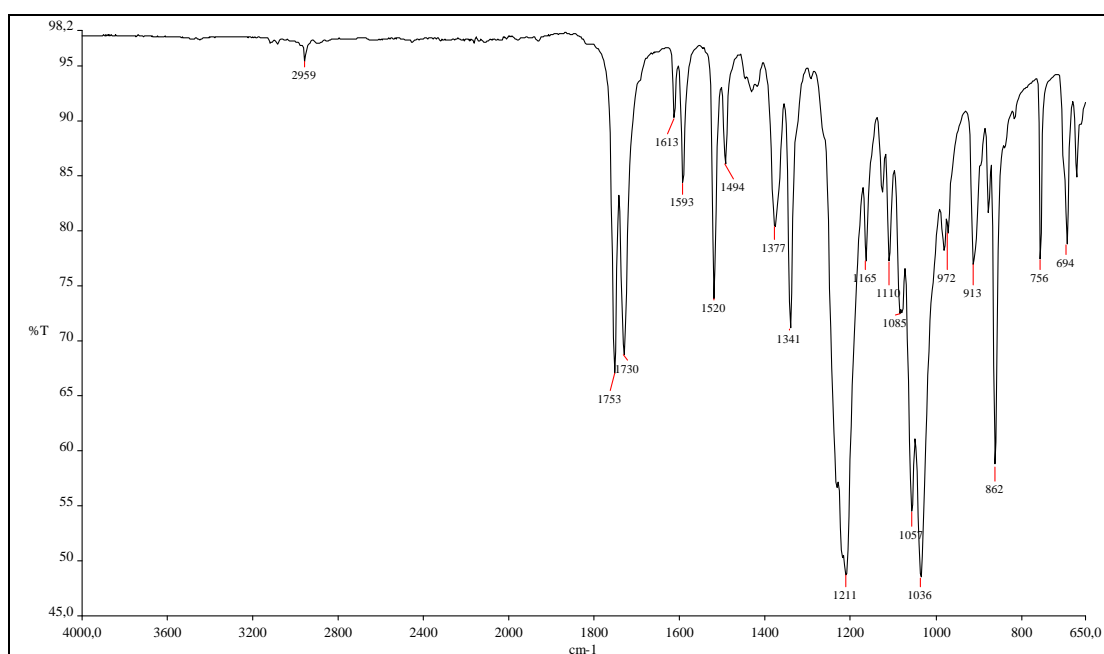


Figura 28 - Espectro no infravermelho (ν , cm^{-1}) de **(4)**.

7.4 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-NITROFENILA (5)

Para a desacetilação utilizou-se o método de Zemplén (ROY; TROPPER, 1990). Neste método, o açúcar acetilado é desprotegido em poucos minutos com quantidades catalíticas de metóxido de sódio, que é regenerado ao final do processo (CONCHIE *et al.*, 1957), (COLLINS; FERRIER, 1995), conforme mostrado na figura 29.

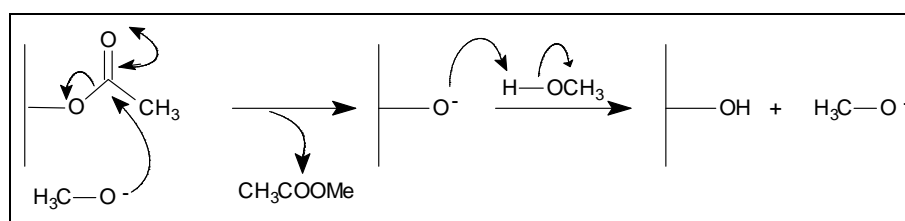
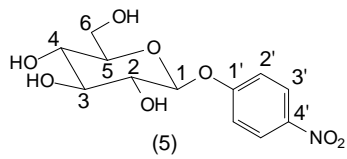


Figura 29 - Proposta de mecanismo da transesterificação pelo método de Zemplén (COLLINS; FERRIER, 1995).

Existem outros métodos de catálise da reação de transesterificação como o uso de resinas de troca iônica, amônia ou cianeto de potássio em metanol e mistura de trietilamina, metanol e água, porém o método de Zemplén foi o de escolha devido a sua praticidade na execução, além de apresentar bons rendimentos (COLLINS; FERRIER, 1995; STICK, 2001).

O glicosídeo (5) foi obtido com 78% de rendimento médio e caracterizado por espectroscopia no infravermelho, espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e ponto de fusão.



No espectro de RMN de ^1H de **(5)**, mostrado na figura 30, são observados os sinais dos grupos hidroxila e a ausência dos sinais dos grupos acetila indicando a retirada do grupo protetor. Observam-se dois dupletos em δ 8,23 e δ 7,25 referentes aos hidrogênios aromáticos. Além disso, observam-se também os sinais dos hidrogênios do açúcar entre δ 5,18 e δ 3,33.

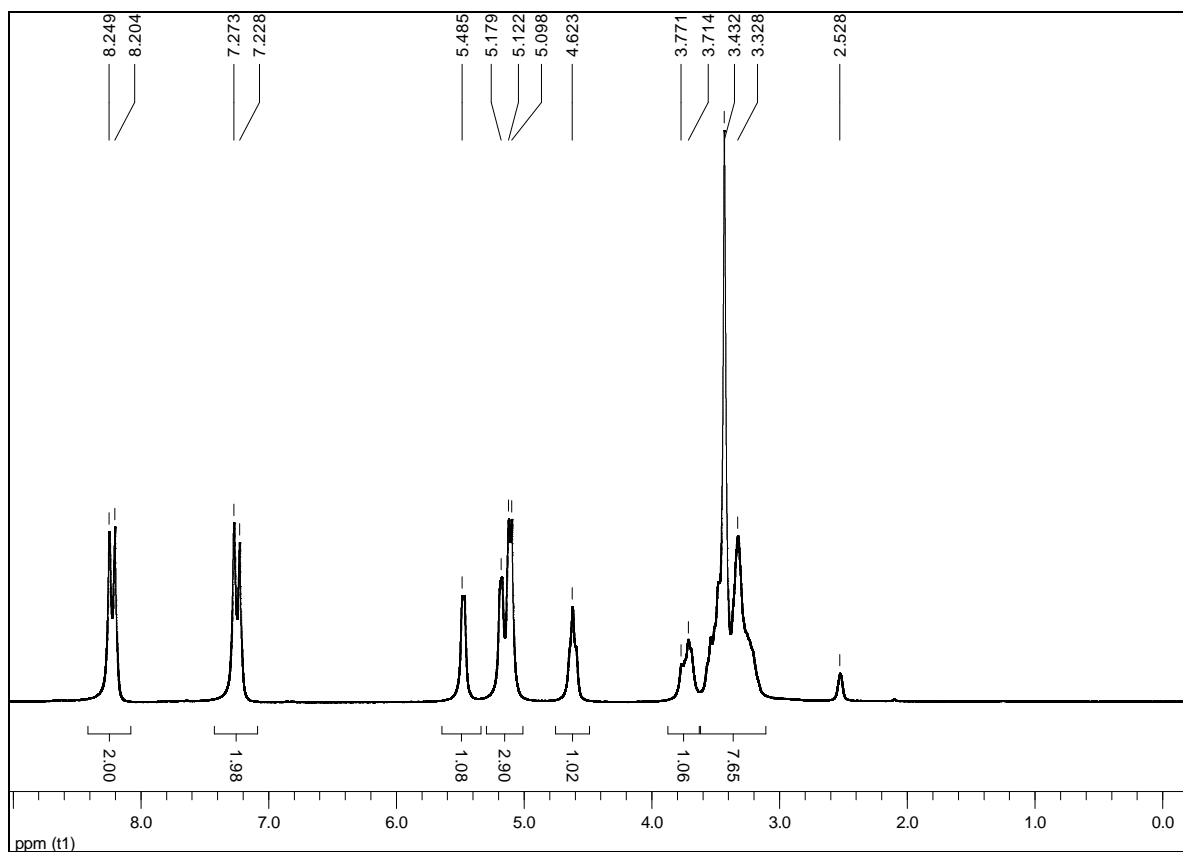


Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6 , δ) de **(5)**.

No espectro de RMN de ^{13}C de **(5)**, mostrado na figura 31, observaram-se apenas os sinais referentes aos carbonos aromáticos e do açúcar e, como esperado, os sinais de carbonos carbonílicos e metílicos estão ausentes.

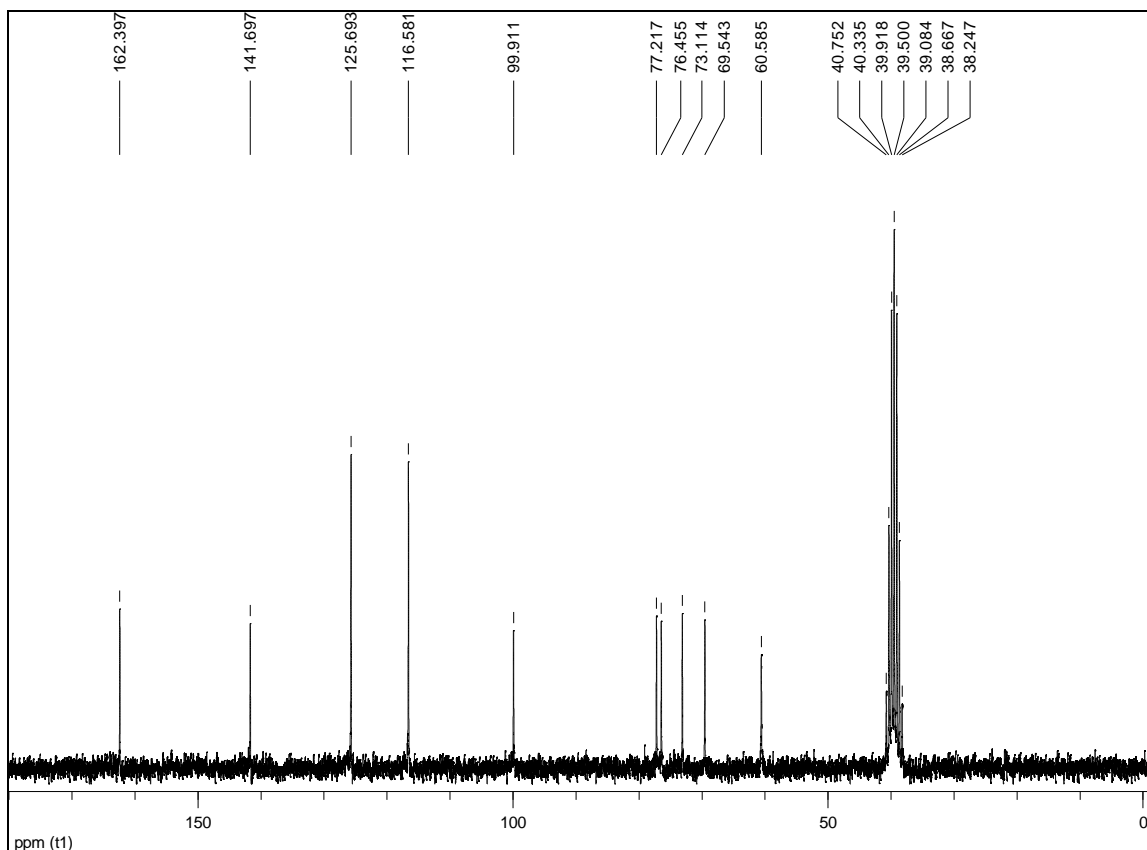


Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6 , δ) de **(5)**.

No espectro no infravermelho de **(5)**, mostrado na figura 32, entre outras bandas, observa-se um banda larga centrada em 3285 cm^{-1} referente à deformação axial de ligação O-H. As bandas referentes à deformação axial de carbonila de éster estão ausentes como esperado.

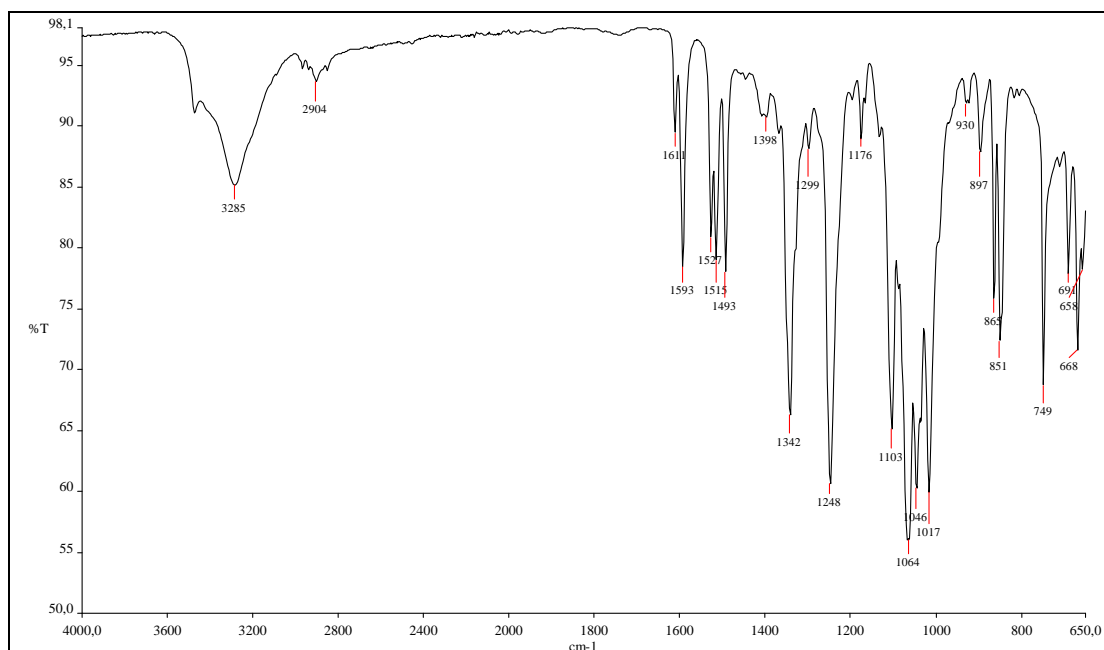
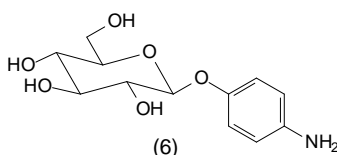


Figura 32 - Espectro no infravermelho (ν , cm^{-1}) de **(5)**.

7.5 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-AMINOFENILA (6)



A redução de grupos nitro aromáticos é um dos métodos mais comuns para a obtenção de aminas aromáticas (LIU; LU, 2004), pois estes são facilmente hidrogenados (RYLANDER, 1988; DOWNING *et al.*, 1997). O grupo amino, frequentemente, é usado como sítio para futuras reações (KUMAR *et al.*, 2001).

Vários metais podem ser usados como catalisador para reduções de grupos nitro a grupos amino, como paládio, platina e níquel. A escolha depende das funções presentes e do produto desejado (RYLANDER, 1988). O paládio é um dos melhores catalisadores para a redução de compostos nitro aromáticos (FIGUERAS; COQ, 2001).

O glicosídeo (6) foi obtido com rendimento bruto de 100% pela redução de (5) por hidrogenação do grupo nitro sob catálise de paládio sobre carvão. Esse glicosídeo é instável (RYLANDER, 1988) e, por isso não é isolado. Ao término da reação é, imediatamente, utilizado na etapa seguinte da rota sintética.

7.6 SÍNTESE DE CLOROACETILGLICILGLICILGLICINA (8)

A reação de aminoácidos com cloretos de ácidos, em solução aquosa, na presença de base, é bastante conhecida. O hidróxido de sódio é normalmente usado como base para neutralizar o HCl formado, como mostrado na figura 33. Este processo é conhecido como reação de Schotten-Baumann (STEIGER, 1944; NIKTENKO *et al.*, 2001; MANGELINCKX *et al.*, 2005).

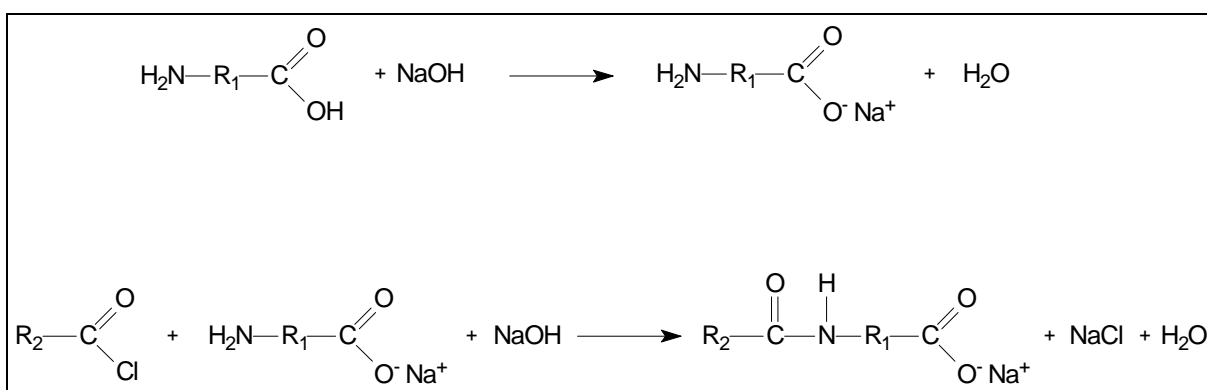


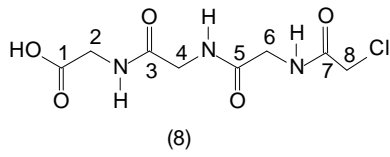
Figura 33 - Etapas envolvidas na reação de Schotten-Baumann (STEIGER, 1944).

Para a síntese de **(8)** utilizou-se adaptação de metodologia descrita na literatura (FRITZBERG *et al.*, 1986), que consiste na reação da glicilglicilglicina **(7)** com cloreto de cloroacetila em presença de hidróxido de sódio, em uma reação do tipo Schotten-Baumann.

A princípio tentou-se obter a cloroacetilglicilglicilglicina **(8)** utilizando-se a seguinte elaboração: após o término da reação, mediu-se o volume da mistura de reação em uma proveta e verteu-se a mistura reagente em uma cápsula de porcelana para evaporação do solvente. Retomou-se o volume a 1/3 do volume inicial com água. O conteúdo da cápsula de porcelana foi filtrado e obteve-se um sólido branco, mas que

ainda continha uma quantidade significativa de cloreto de sódio gerado na reação. À medida que se adicionava mais água ocorria a solubilização do sal (NaCl), porém parte do produto também era solubilizado, e, com isto o rendimento da reação não era satisfatório.

Deste modo, utilizou-se o produto bruto da reação (produto **(8)** + NaCl) na etapa seguinte.



No espectro de RMN de ^1H de **(8)**, mostrado na figura 34, observam-se quatro simples, devido ao uso de D_2O como solvente, referentes aos sinais dos hidrogênios metilênicos, sendo o simples em δ 4,24 referente a H-8.

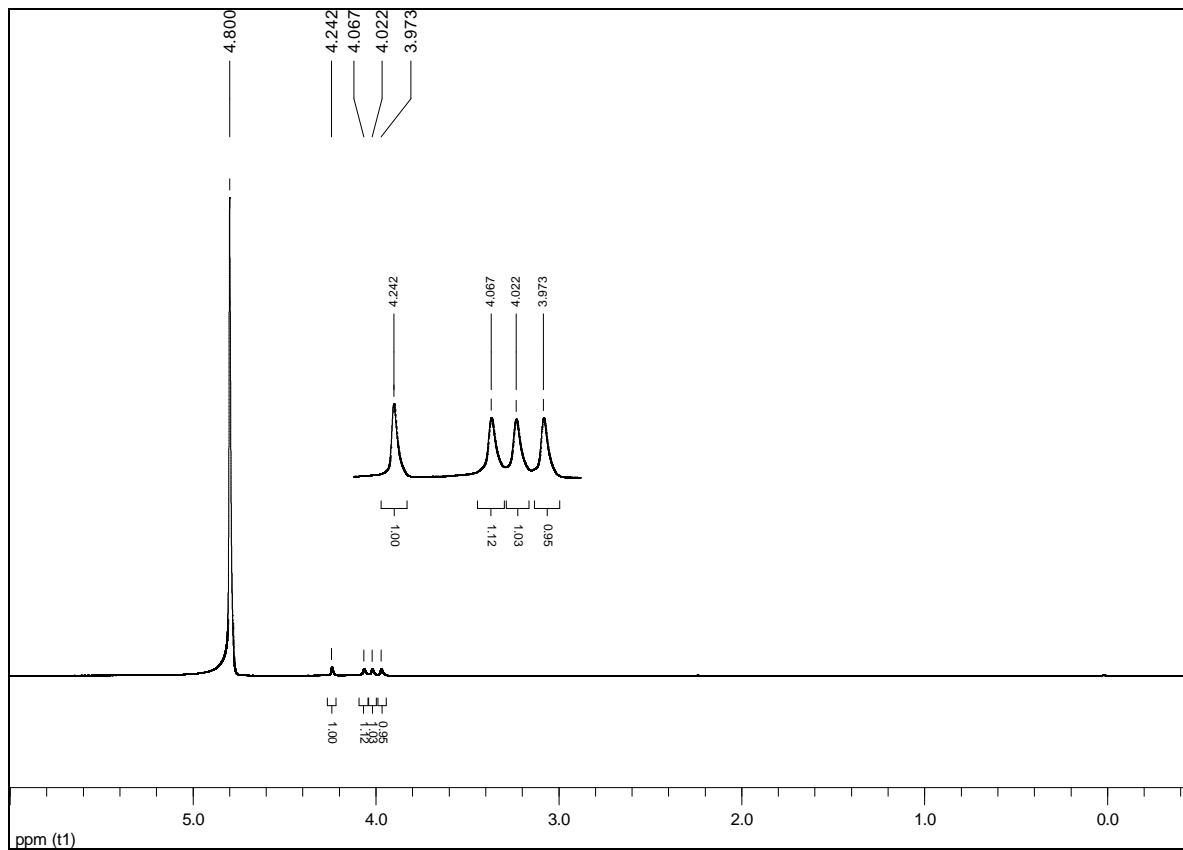


Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, D_2O , δ) de **(8)**.

No espectro de RMN de ^{13}C de **(8)**, mostrado na figura 35, observam-se quatro sinais entre δ 173,8 e δ 171,1, referentes aos carbonos carbonílicos e quatro sinais entre δ 43,3 e δ 41,6 referentes aos carbonos metilênicos.

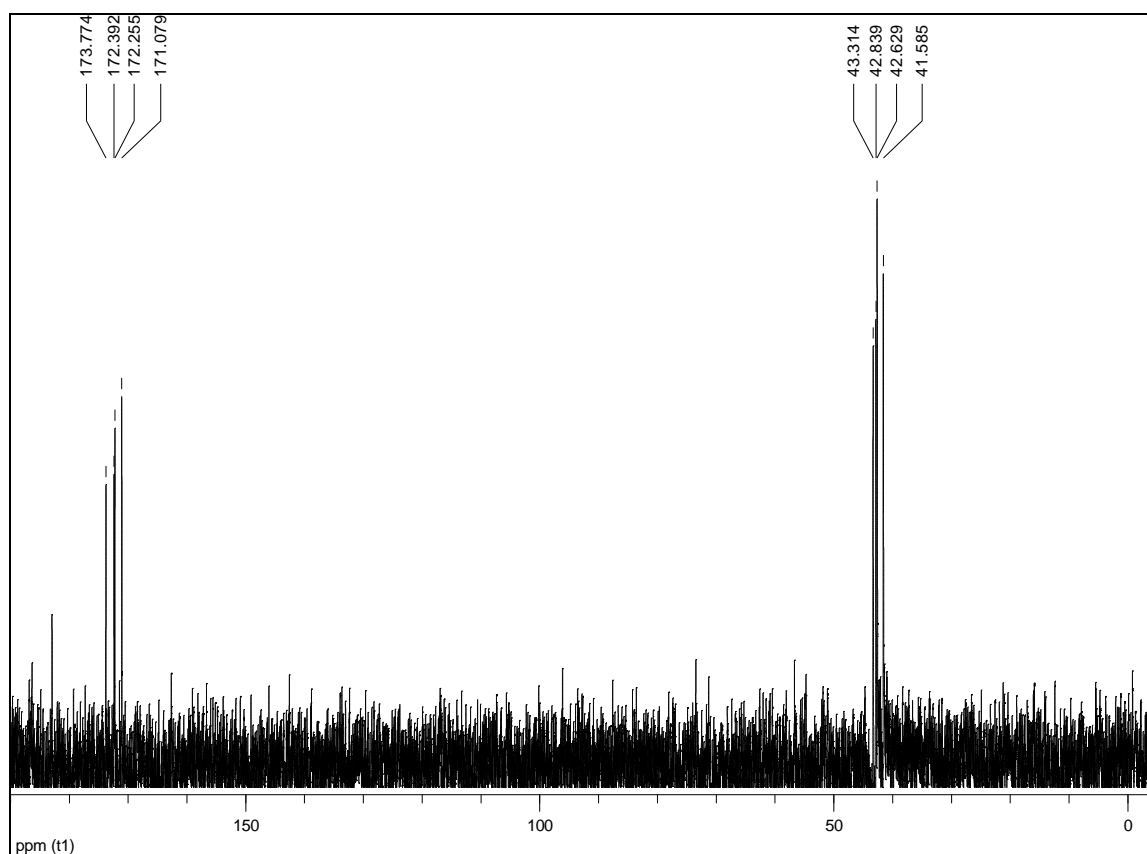


Figura 35 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, D_2O , δ) de **(8)**.

No espectro no infravermelho de **(8)**, mostrado na figura 36, observa-se uma banda em 3274 cm^{-1} referente à deformação axial de N-H, além das bandas em 1716 cm^{-1} e em 1645 cm^{-1} , atribuídas à deformação axial da ligação C=O de ácido e de amida, respectivamente.

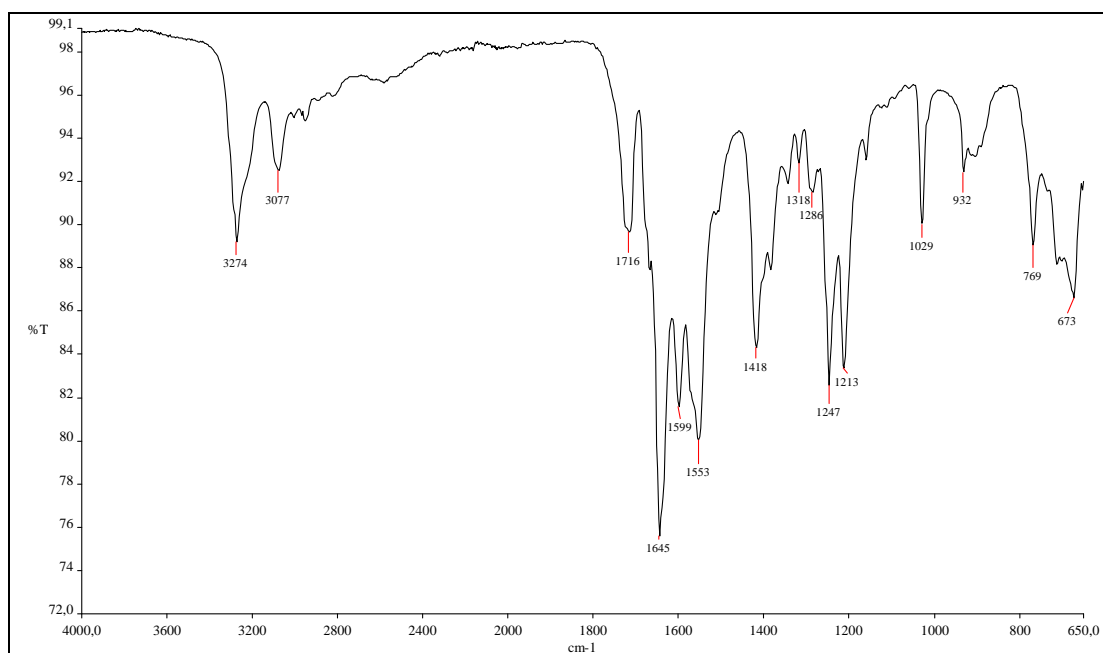


Figura 36 - Espectro no infravermelho (ν , cm^{-1}) de **(8)**.

7.7 SÍNTESE DE BENZOIL-MERCAPTOACETILGLICILGLICILGLICINA (**9**)

Considerando 100% de rendimento na etapa anterior, efetuou-se a síntese de benzoil-mercaptoacetilglicilglicilglicina (**9**) (FRITZBERG *et al.*, 1986), em que o átomo de enxofre, que é um bom nucleófilo (CLAYDEN *et al.*, 2000; INGEBRIGTSEN; LEJON, 2006), ataca o carbono parcialmente positivo, devido à ligação C-Cl, de (**8**) e por uma reação tipo S_N2 fornece o Bz-MAG₃ (**9**), conforme ilustrado na figura 37.

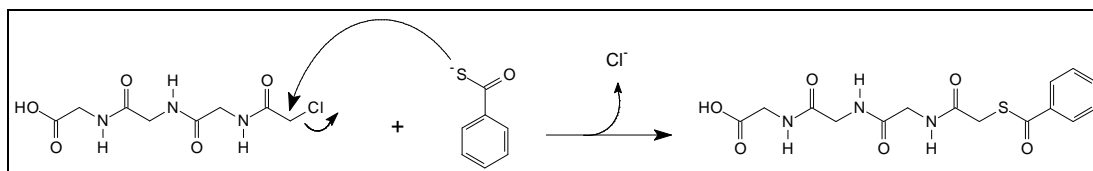
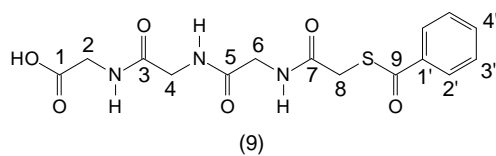


Figura 37 – Reação de formação de Bz-MAG₃ (**9**).

Após o término da reação, adicionou-se à mistura reagente quantidade suficiente de resina de troca iônica Amberlite IRA-120, com o propósito de captar o cátion sódio e liberar H⁺, formando HCl no meio. A massa de resina a ser utilizada foi calculada com base na quantidade total de cloreto de sódio formado nas duas etapas de síntese, e foi utilizada a proporção de dois equivalentes de resina para cada equivalente de NaCl. Desta maneira, após evaporação do solvente e do HCl obteve-se (**9**) com rendimento médio de 69%.



No espectro de RMN de ^1H de **(9)**, mostrado na figura 38, foi realizado em DMSO-d_6 , com isso foi possível observar os multipletos entre δ 8,59 e δ 8,17 referentes aos hidrogênios do grupo N-H. O duplete centrado em δ 7,93 foi atribuído a H-2' acoplado com H-3' com constante $J^{\beta} = 7,20$ Hz. O triplo centrado em δ 7,71 é referente à H-4', acoplado com H-3' com constante $J^{\beta} = 7,35$ Hz. O triplo em δ 7,56 é atribuído a H-3' acoplado com H-2' e H-4'. Os hidrogênios metilênicos estão presentes no multiplo entre δ 3,90 e δ 3,61.

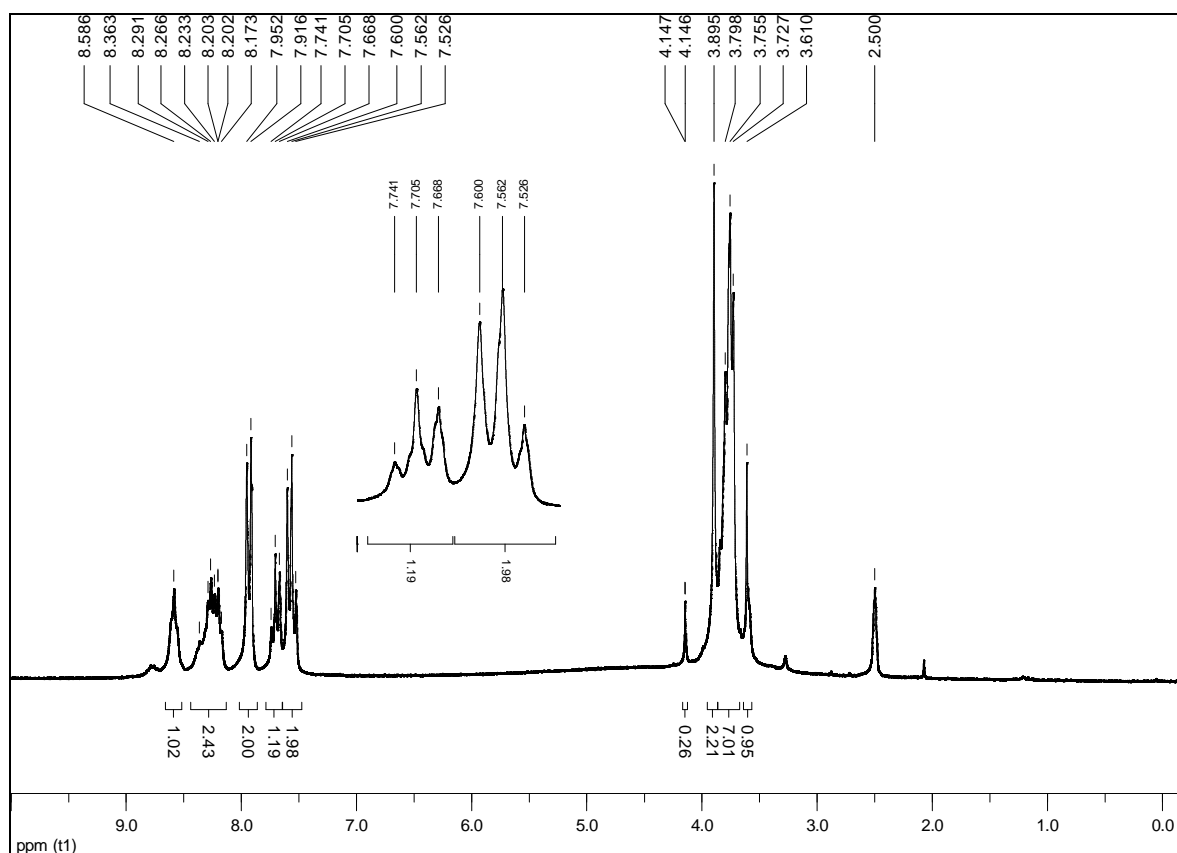


Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (200MHz, DMSO-d_6 , δ) de **(9)**.

No espectro de RMN de ^{13}C de **(9)**, mostrado na figura 39, o sinal em δ 190,4 é atribuído a C-9, pois o enxofre não protege a carbonila. Os demais carbonos carbonílicos (C-1, C-3, C-5, C-7) estão presentes entre δ 171,1 e δ 167,3. O sinal em δ 136,0 é referente à C-1' e foi confirmado pela ausência do sinal no sub-espectro DEPT 135, mostrado na figura 40. O sinal em δ 134,1 é referente à C-4'. Os demais carbonos aromáticos (C-2' e C-3') apresentam deslocamento entre δ 129,2 e δ 126,9. O sinal em δ 32,5 é referente à C-8, confirmado pela análise do sub-espectro DEPT 135 (figura 40). Os outros três carbonos metilênicos estão presentes entre δ 42,6 e δ 40,7 e foram confirmados pela análise do sub-espectro DEPT 135 (figura 43).

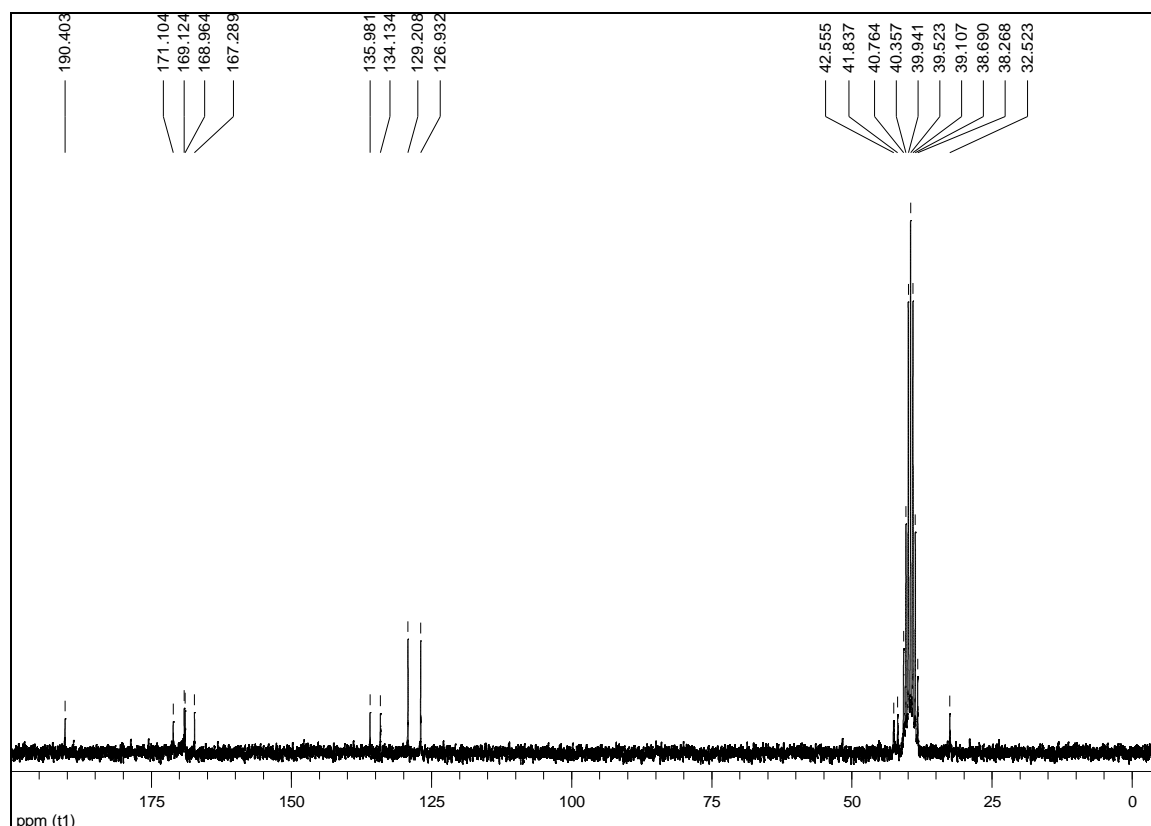


Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6 , δ) de **(9)**.

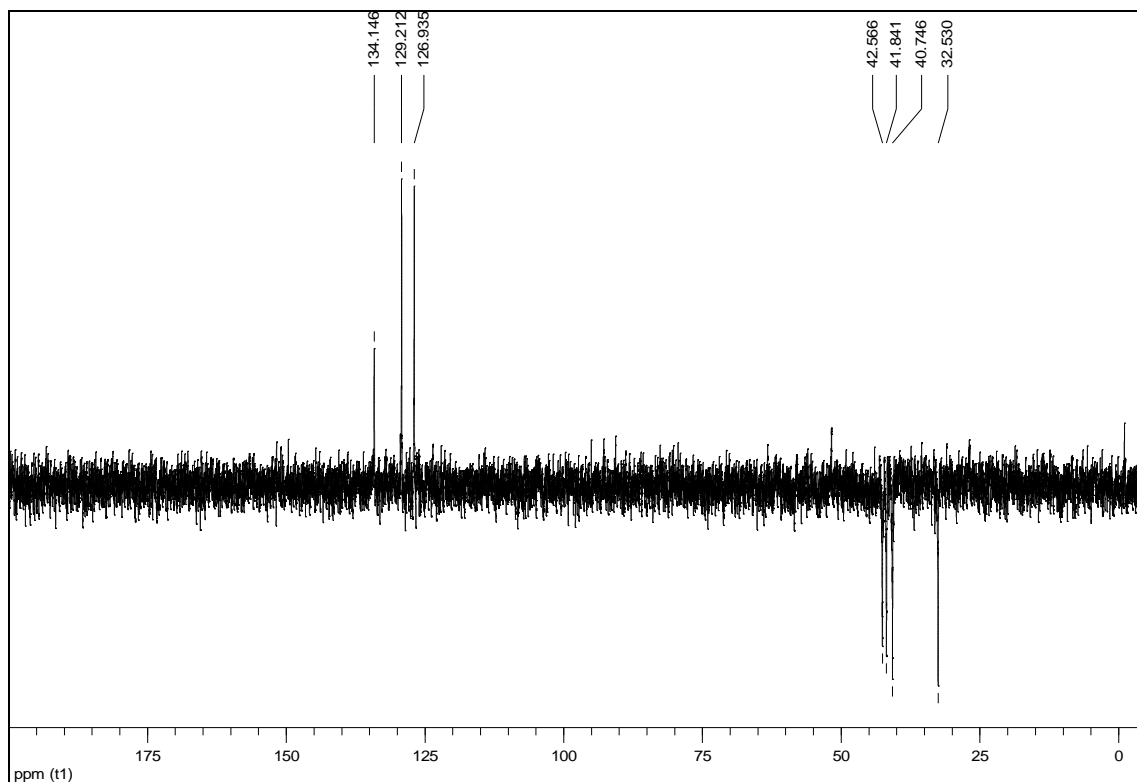


Figura 40 - Sub-espectro DEPT 135 (50 MHz, DMSO-d₆, δ) de **(9)**.

No espectro no infravermelho de **(9)**, mostrado na figura 41, foi possível observar uma banda larga entre 3600 e 2600 cm^{-1} referente à deformação axial de O-H de ácido carboxílico. Sobrepostas a esta, estão as bandas em 3287 cm^{-1} de deformação axial de N-H e em 3083 cm^{-1} da deformação axial de C-H de carbono sp^2 . As bandas de deformação axial de C=O de ácido e de amida encontram-se em 1703 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} , respectivamente.

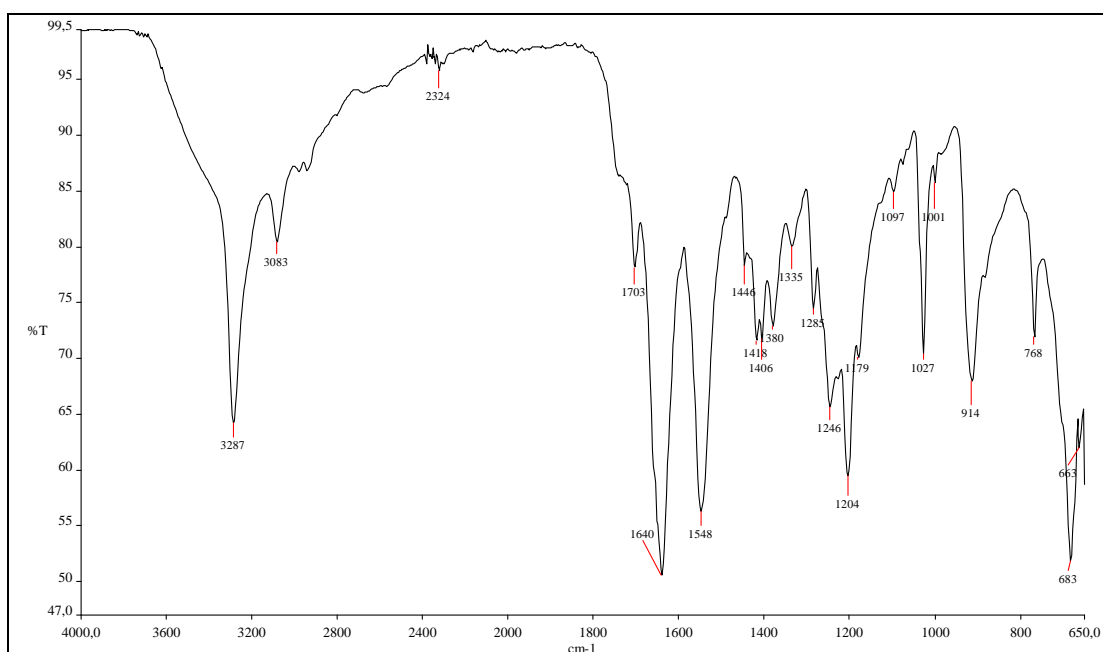


Figura 41 - Espectro no infravermelho (ν , cm^{-1}) de **(9)**.

7.8 SÍNTESE DE β -D-GLICOPIRANOSÍDEO DE 4-N-[N³-(BENZOIL-MERCAPTOACETIL)GLICILGLICILGLICIL]AMINOFENILA (10)

Nesta etapa realizou-se o acoplamento do derivado sacarídico (6) com o Bz-MAG₃ (9) para fornecer o produto de acoplamento Bz-MAG₃-G (10) para utilização nos estudos de biodistribuição, pois apresenta em sua estrutura o agente complexante para o tecnécio-99m (MAG₃) e o carboidrato de interesse (D-glicose) na forma de glicosídeo.

Derivados de aminoácidos são pouco reativos, sendo necessária sua ativação para que a reação de acoplamento com compostos aminados ocorra. Para tal, são utilizados agentes de acoplamento, como a dicicloexilcarbodiimida (DCC) e a *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida (EDAC), que ao reagirem com a porção ácida do derivado de aminoácido geram bons grupos abandonadores, favorecendo a reação para a formação da amida esperada (CLAYDEN *et al.*, 2000).

Foram utilizados dois métodos para a reação de formação de (10), com o objetivo de avaliar a melhor técnica a ser seguida. No primeiro, cujo esquema é mostrado na figura 42, utilizou-se como agente de acoplamento a DCC juntamente com a *N*-hidroxissuccinimida (NHS), além do Bz-MAG₃ (10) e do glicosídeo reduzido (6), todos na mesma proporção.

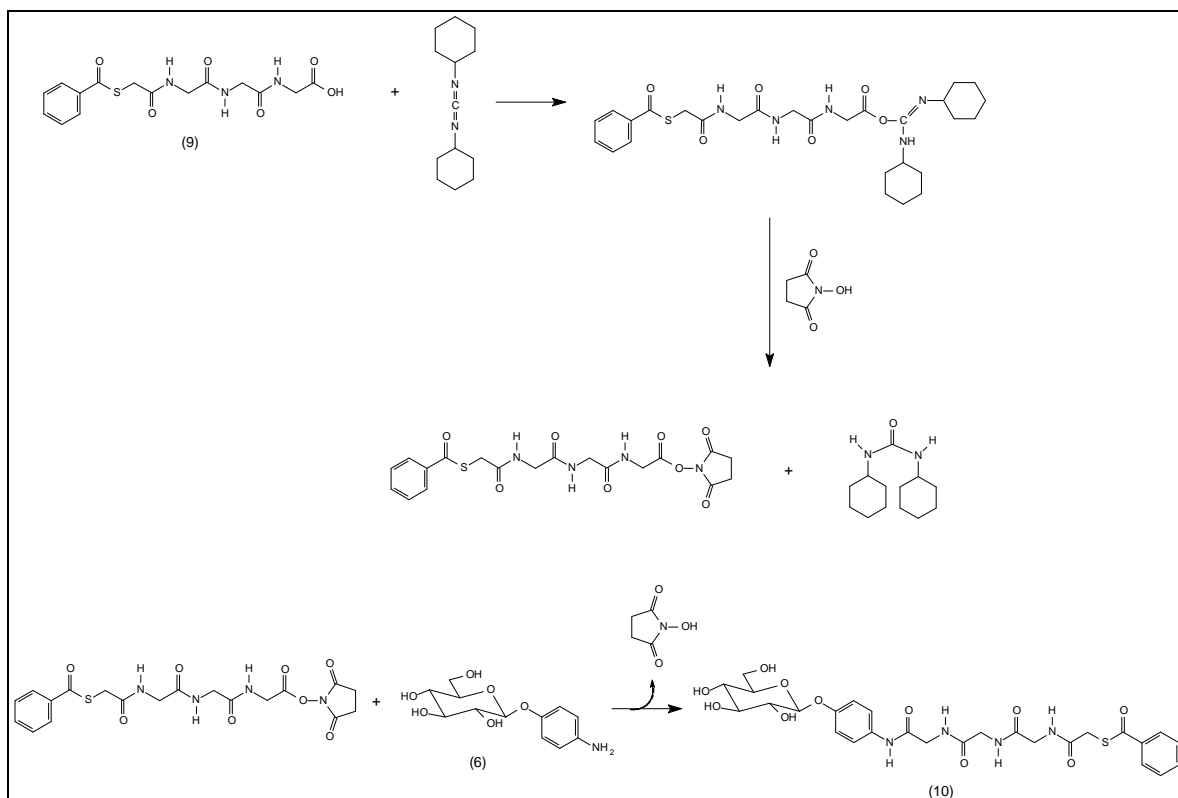


Figura 42 - Esquema de síntese de **(10)** utilizando DCC como agente de acoplamento.

Utilizando-se este método, obteve-se o produto de acoplamento com 6% de rendimento.

No segundo método, cujo esquema é mostrado na figura 43, utilizou-se, além do glicosídeo reduzido **(6)** e do Bz-MAG₃ **(9)**, EDAC como agente de acoplamento. Foi usado excesso de EDAC e de Bz-MAG₃ na proporção de 1,5 para 1. O produto **(10)** foi obtido com rendimento de 31,5%.

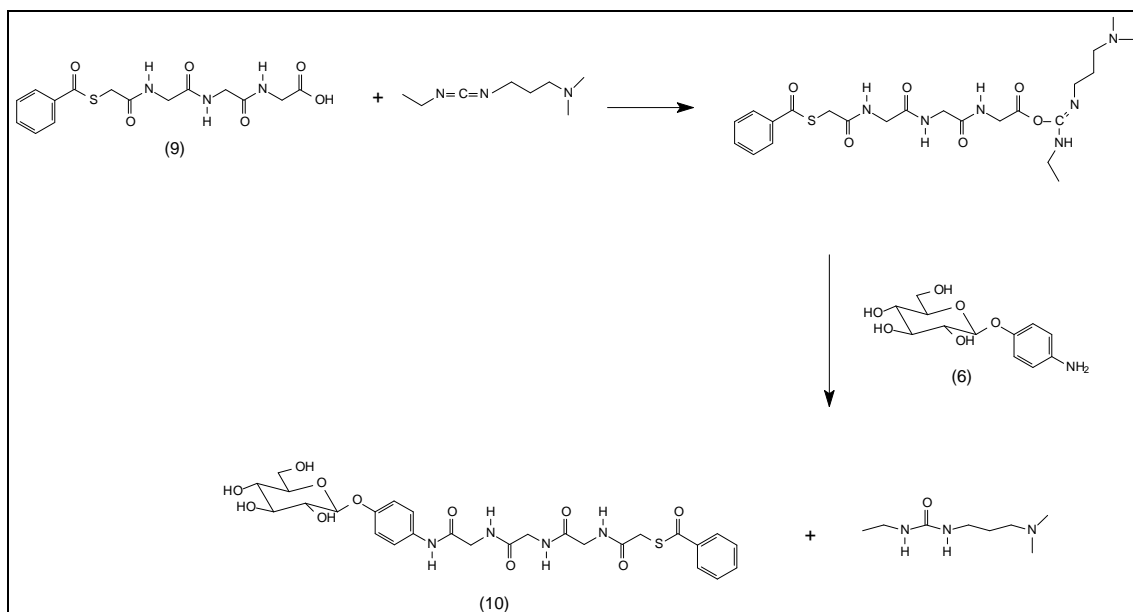
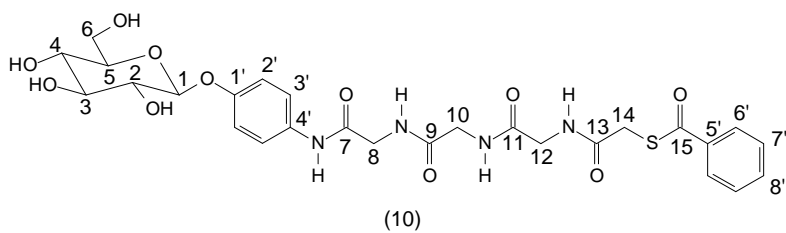


Figura 43 - Esquema de síntese de **(10)** utilizando EDAC como agente de acoplamento.

Com base no rendimento obtido nos dois diferentes métodos, o de escolha foi aquele em que se utiliza EDAC como agente de acoplamento.



Para melhor visualização dos sinais, o espectro de RMN de ^1H de **(10)** foi fragmentado em quatro ampliações demonstradas nas figuras 44, 45, 46 e 47.

Na primeira ampliação (figura 44), observa-se um simpleto em δ 9,67 referente ao hidrogênio do grupo N-H ligado ao anel aromático (Ar-NH). Os três tripletos entre δ 8,51 e δ 8,19 são referentes aos hidrogênios dos outros grupos N-H acoplado com os respectivos hidrogênios metilênicos. O duplete centrado em δ 7,93 foi atribuído a H-6' acoplado com H-7' com constante $J^{\beta} = 7,75$ Hz. O sinal de H-7' apresenta-se como um tripleto centrado em δ 7,57, acoplado com H-6' e H-8' com constante $J^{\beta} = 7,60$ Hz. O sinal de H-8' apresenta-se como um tripleto centrado em δ 7,70. Os dupletos centrados em δ 7,50 e δ 6,98 foram atribuídos a H-3' e H-2', respectivamente, acoplado entre si com constante $J^{\beta} = 9,20$ Hz. Tais dados foram confirmados pelas manchas de correlação C-1' X H-3', C-1' X H-2', C-3' X Ar-NH, no mapa de correlação HMBC (p. 96), e, pelas manchas de correlação C-3' X H-3' e C-2' X H-2' no mapa de correlação HMQC (p. 95).

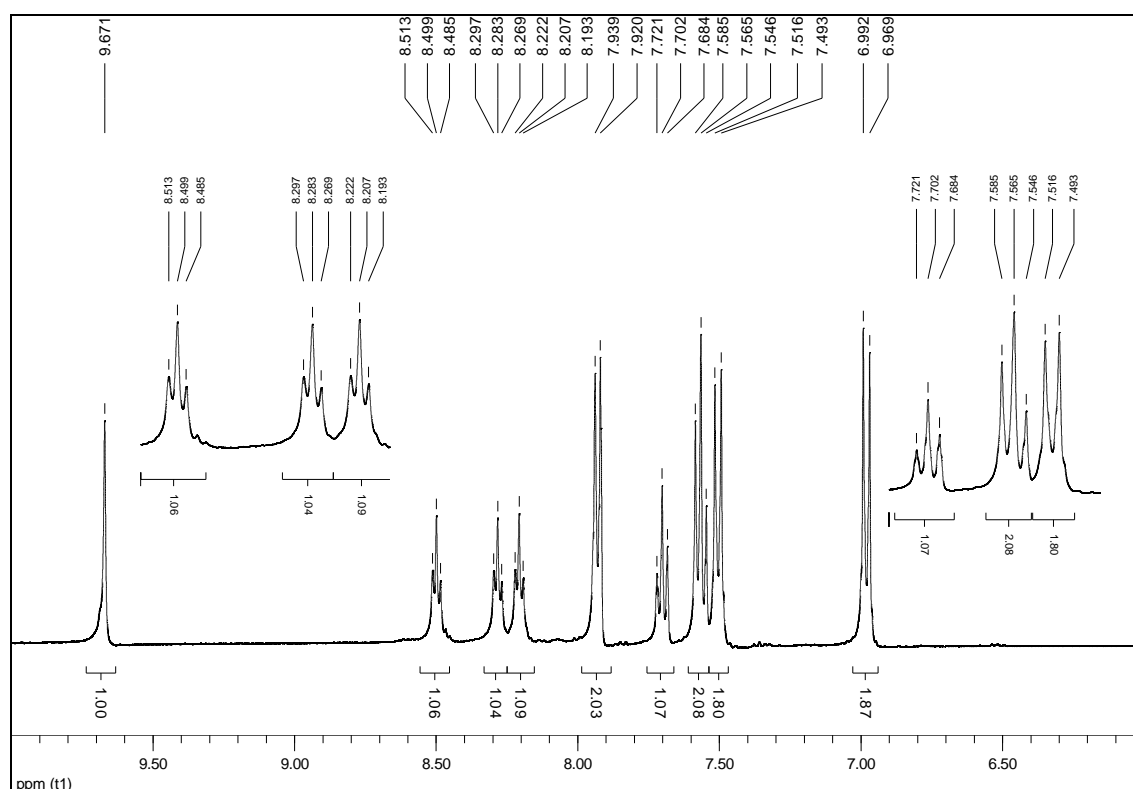


Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6 , δ) de (**10**) (Ampliação 1).

Os três dupletos entre δ 5,28 e δ 4,98, observados na figura 45, são referentes aos hidrogênios das hidroxilas de C-2, C-3 e C-4. O tripleto centrado em δ 4,55 é referente ao hidrogênio da hidroxila de C-6, acoplado com o hidrogênio de C-6. O duplete centrado em δ 4,78 foi atribuído a H-1 acoplado com H-2 com constante $J_{\beta}=7,20$ Hz. Foram observadas correlações C-1 X H-1 no HMQC (p.95) e C-1' X H-1 no mapa de correlação HMBC (p. 96) que confirmaram a atribuição.

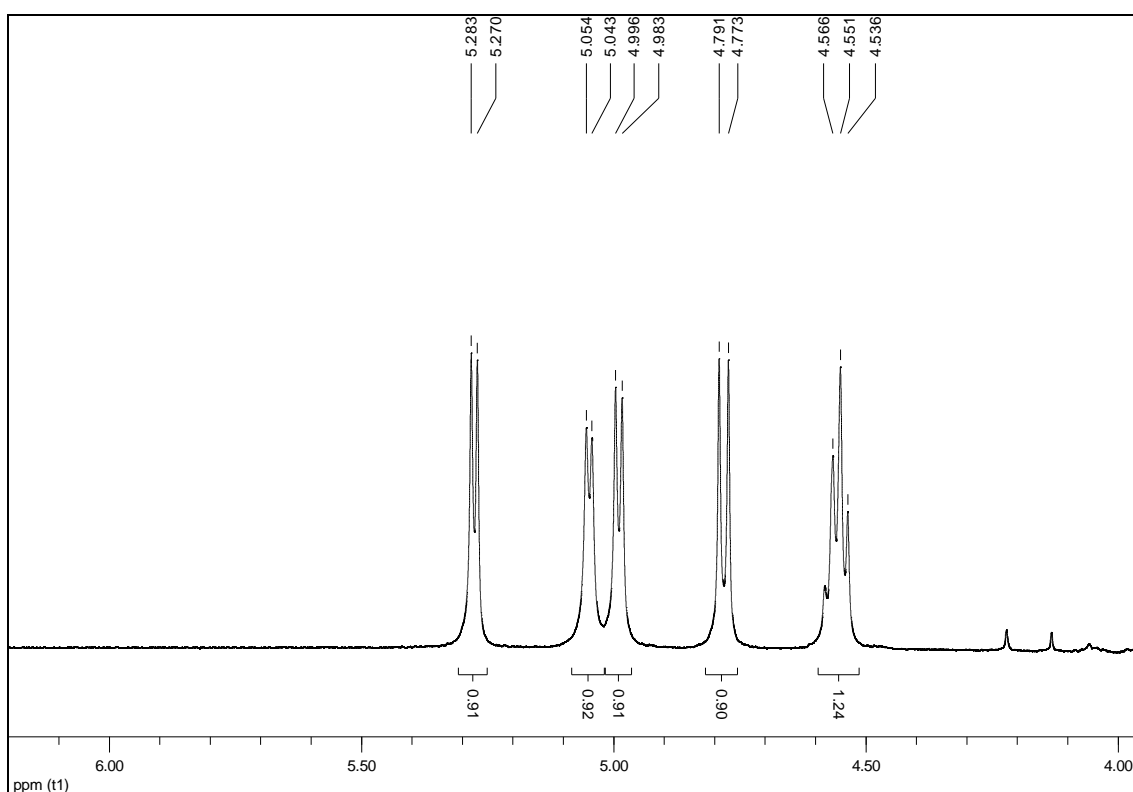


Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6 , δ) de **(10)** (Ampliação 2).

Na figura 46, observa-se um simpleto em δ 3,88 que foi atribuído a H-14, e apresenta a correlação C-14 X H-14 no mapa de correlação HMQC (p. 95) e C-15 X H-14 no mapa de correlação HMBC (p. 96). Os três dupletos entre δ 3,87 e δ 3,77 são referentes aos demais hidrogênios metilênicos (H-8, H-10, H-12), que apresentaram manchas de correlação com os respectivos hidrogênios amídicos no mapa de correlação COSY (p. 95), além das correlações H-8 X C-8, H-10 X C-10, H-12 X C-12 no mapa de correlação HMQC (p. 95). Os multipletos entre δ 3,71-3,67 e δ 3,50-3,46, ambos com integral para um átomo de hidrogênio, foram atribuídos aos sinais de H-6a e H-6b com manchas de correlação H-6a, H-6b X C-6-O-H no mapa de correlação COSY (p. 95).

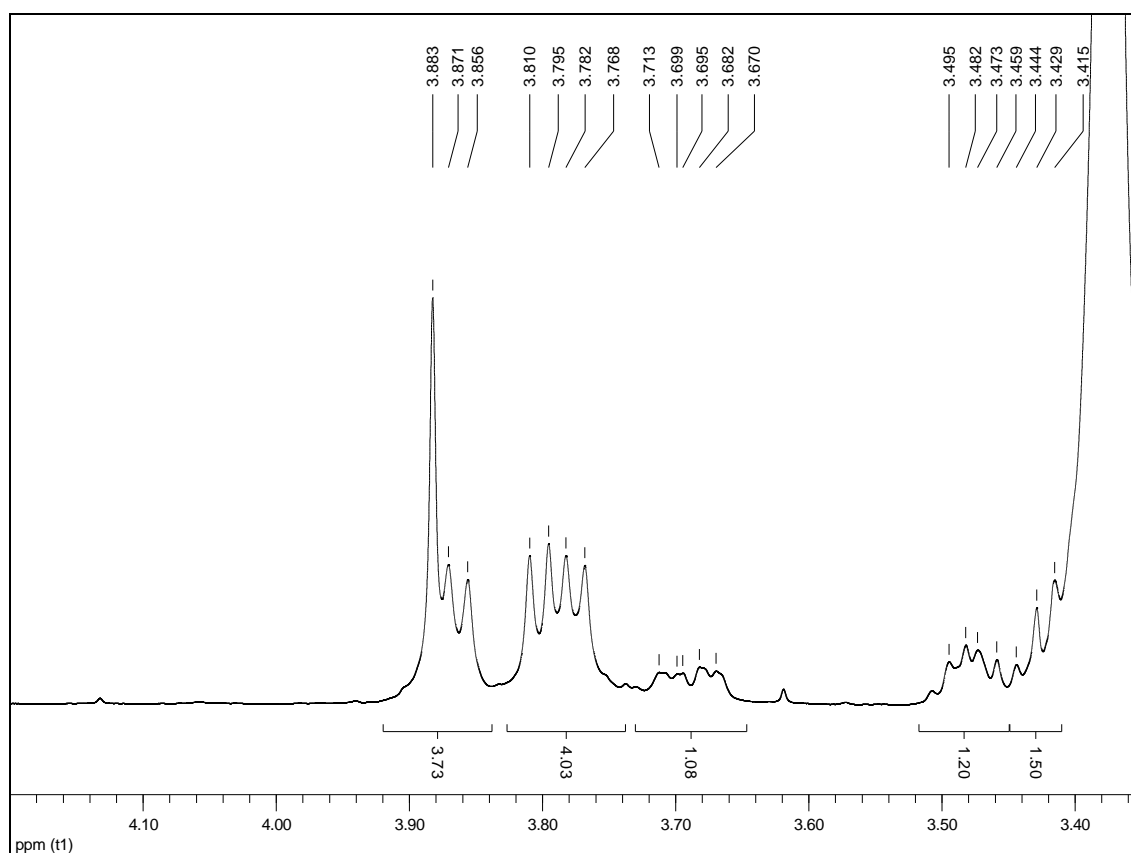


Figura 46 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6 , δ) de (**10**) (Ampliação 3).

O multiplete entre δ 3,32-3,12, mostrado na figura 47, foi atribuído aos sinais dos demais hidrogênios do açúcar (H-2, H-3, H-4, H-5), que foi confirmado pelas correlações com C-2, C-3, C-4 e C-5 no mapa de correlação HMQC (p. 95).

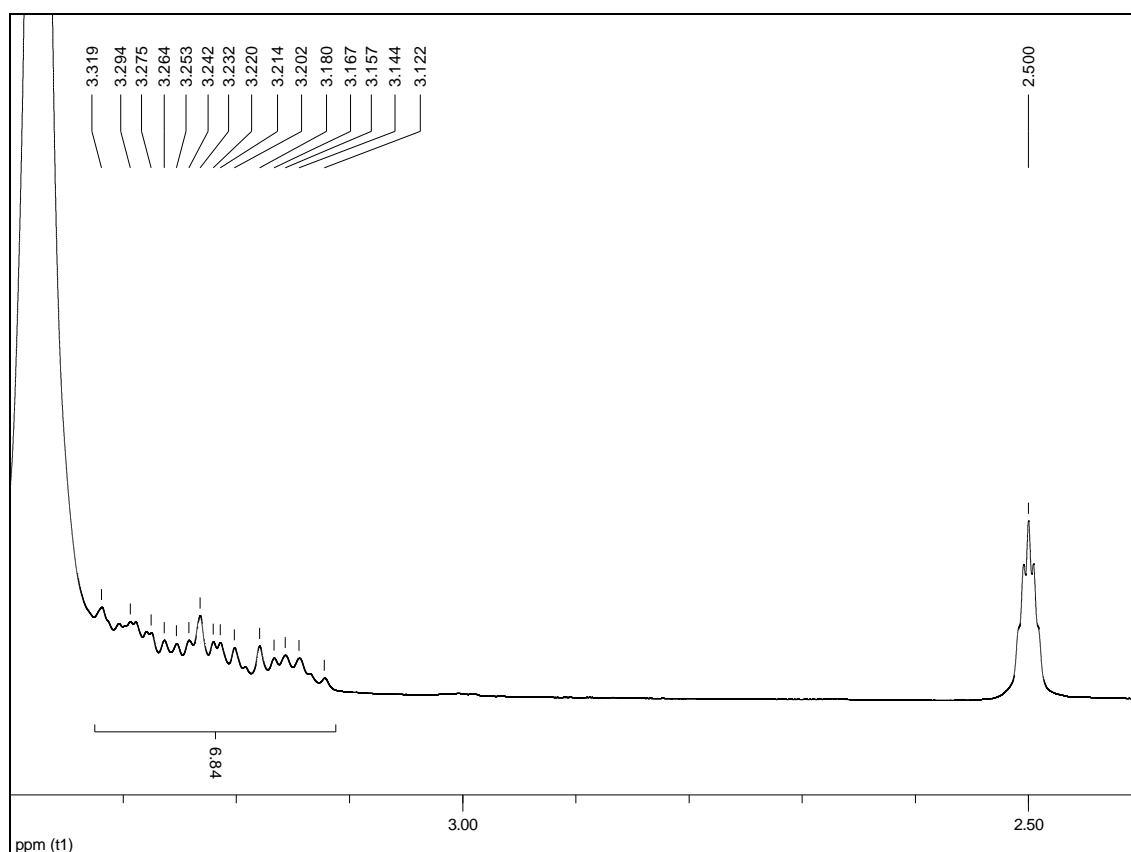


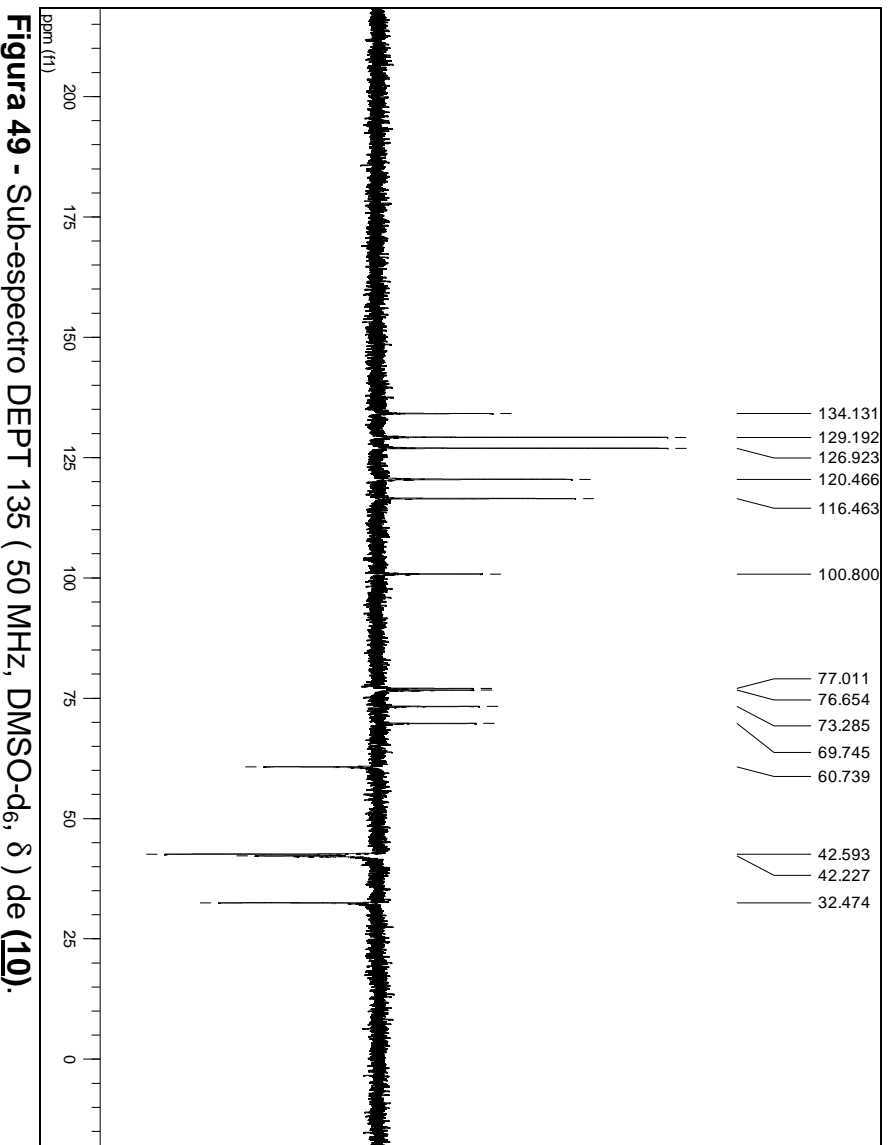
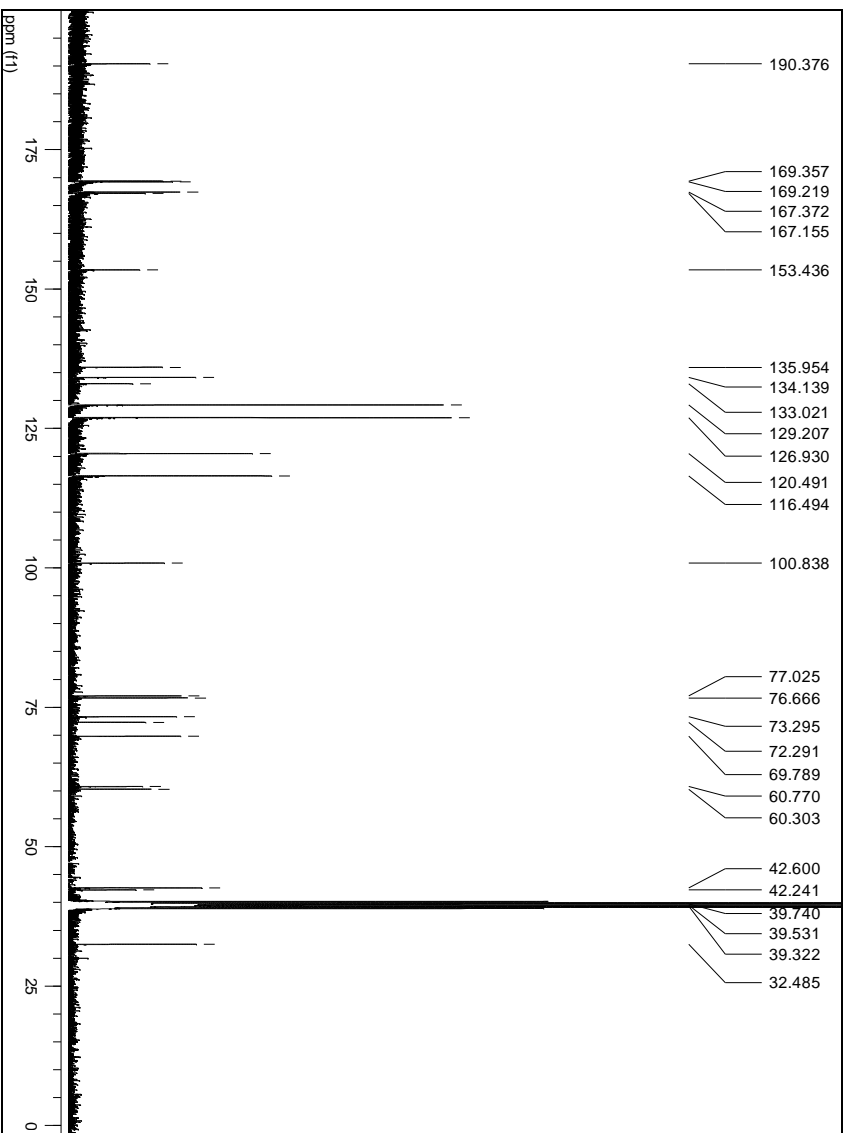
Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6 , δ) de **(10)** (Ampliação 4).

No espectro de RMN de ^{13}C de **(10)**, mostrado na figura 48, o sinal em δ 190,4 é atribuído a C-15, pois não é protegido pelo enxofre. Os outros quatro carbonos carbonílicos (C-7, C-9, C-11 e C-13) apresentam deslocamento químico entre δ 169,4 e δ 167,2. O sinal em δ 153,4 é atribuído a C-1' e confirmado pelas correlações C-1' X H-3' e C-1' X H-2' presentes no mapa de correlação HMBC (p. 96) e pela ausência de sinal no sub-espectro DEPT 135 (p. 94). O sinal em δ 135,9 é referente à C-5', confirmado pelas correlações C-5' X H-6' e C-5' X H-7' presentes no mapa de correlação HMBC (p. 96) e também pela ausência de sinal no sub-espectro

DEPT 135 (p. 94). O sinal em δ 134,1 é referente à C-8', que apresenta correlação C-8' X H-8' no mapa de correlação HMQC (p. 95). O sinal em δ 133,0 foi atribuído a C-4', também confirmado pela ausência de sinal no sub-espectro DEPT 135 (p. 94). Os sinais em δ 129,2 e δ 126,9 são devidos aos sinais de ressonância de C-7' e C-6', respectivamente. Além disso, apresentam correlações no mapa de correlação HMQC (p. 95) (C-7' X H-7' e C-6' X H-6'). Os dois sinais em δ 120,5 e δ 116,5 são referentes à C-3' e C-2', respectivamente. O sinal relativo a C-3' foi confirmado pela correlação C-3' X Ar-NH no mapa de correlação HMBC (p. 96) e C-3' X H-3' no mapa de correlação HMQC (p. 95) e C-2' pela correlação C-2' X H-2' no mapa de correlação HMQC (p. 95).

O sinal em δ 100,8 é referente ao carbono anomérico (C-1), que apresenta correlação C-1 X H-1 no mapa de correlação HMQC (p. 95), confirmando a atribuição. O sinal em δ 60,8 é referente à C-6, que é confirmado pelo sinal para baixo no sub-espectro DEPT 135 (p. 94), indicando carbono metilênico, e pelas correlações C-6 X H-6 e C-6 X H-6' no mapa de correlação HMQC (p. 95). Os sinais dos demais carbonos do açúcar (C-2, C-3, C-4, C-5) estão presentes entre δ 77,0 e δ 69,8 e apresentam manchas de correlação no mapa de correlação HMQC (p. 95) com os átomos de hidrogênios correspondentes.

O sinal em δ 32,5 foi atribuído a C-14, pelo fato de ser o carbono metilênico mais protegido, por estar ligado diretamente ao átomo de enxofre que é menos eletronegativo e confirmado na análise do sub-espectro DEPT 135 (sinal para baixo) (p. 94) e pela correlação C-14 X H-14 no HMQC (p. 95). Os demais carbonos metilênicos (C-8, C-10 e C-12) apresentam deslocamento químico entre δ 42,6 e δ 42,2.



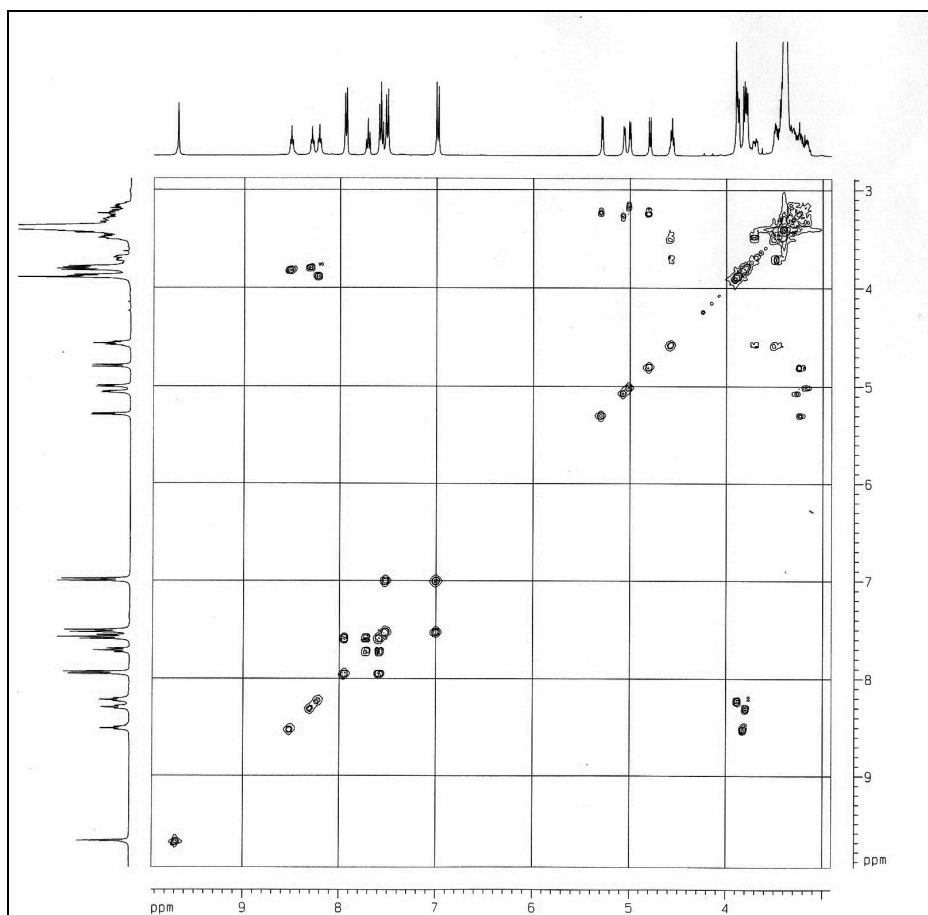


Figura 50 - Mapa de correlação COSY (400 MHz, DMSO-d₆, δ) de **(10)**.

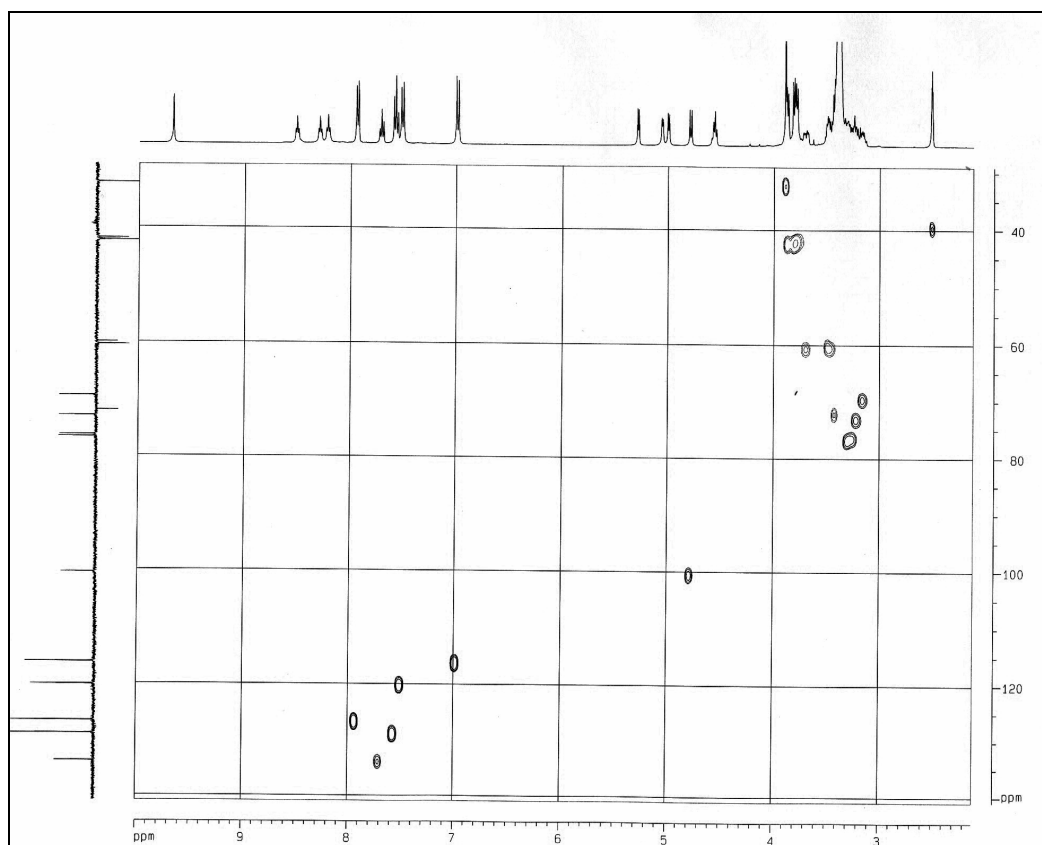


Figura 51 - Mapa de correlação HMBC (100 MHz, DMSO-d₆, δ) de **(10)**.

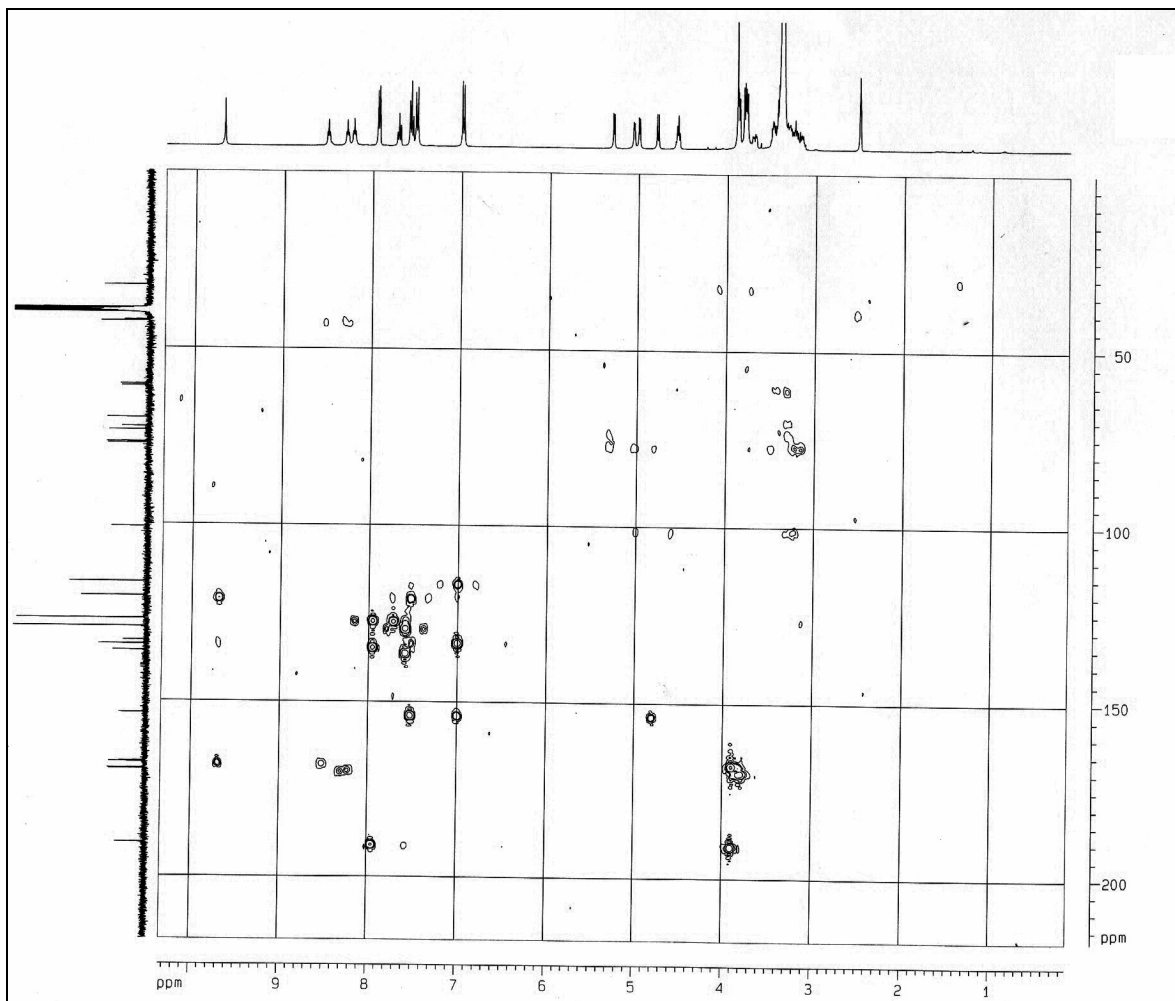


Figura 52 - Mapa de correlação HMBC (100MHz, DMSO-d₆, δ) de **(10)**.

No espectro no infravermelho de **(10)**, mostrado na figura 53, foram observadas bandas correspondentes a deformação axial das ligações O-H e N-H sobrepostas e centradas em 3272 cm^{-1} . As bandas referentes a deformação axial de C-H de carbono sp^2 e sp^3 encontram-se em 3081 cm^{-1} e 2928 cm^{-1} , respectivamente. A banda forte em 1638 cm^{-1} é referente à deformação axial da ligação C=O de amida. As bandas em 1074 cm^{-1} e 1019 cm^{-1} são referentes à deformação axial de C-O-C e C-C-O do açúcar.

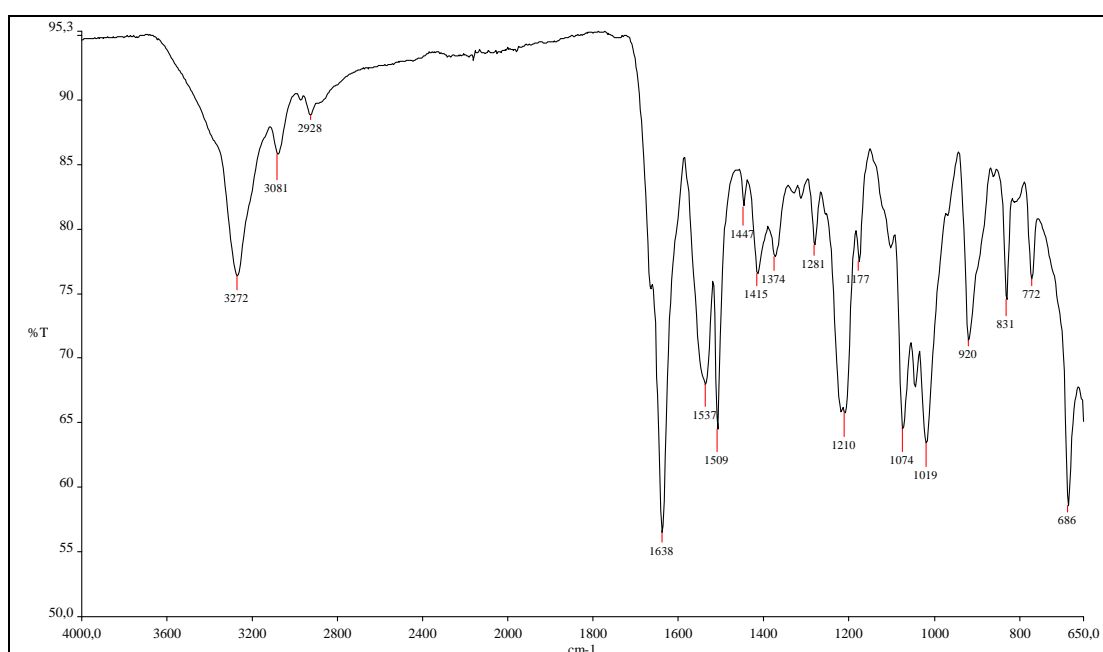


Figura 53 - Espectro no infravermelho (ν , cm^{-1}) de **(10)**.

**PARTE II – MARCAÇÃO DOS LIGANTES COM TECNÉCIO-99m E
ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO**

8 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Radioisótopos e no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG, sendo respeitadas todas as exigências descritas nas Normas da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN, 1996), e com aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (p. 131).

8.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Contador gama de poço ANSR, Abbot/ EUA

Câmara de cintilação a raios gama NUCLIDE TH/22 MEDISO

Calibrador de doses Capintec CRC-15R, Capintec/ EUA

Placa de cromatografia de sílica gel 60; Merck/ Alemanha

Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, IPEN- CNEN/ São Paulo

8.2 MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99m (^{99m}Tc)

Realizou-se a marcação de Bz-MAG₃ (**9**) e de Bz-MAG₃-G (**10**) utilizando-se frasco âmbar contendo 1 mg do composto a ser marcado, 40 mg de tartarato de sódio e 0,1 mL de HCl 0,25 mol/L contendo 0,2 g de cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Ajustou-se o pH para 6 a 8 com uma solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L. O frasco foi lacrado e realizou-se vácuo para evitar a oxidação do estanho. Ao frasco adicionou-se 0,1 mL de solução de pertecnetato de sódio com atividade de 37 MBq. O frasco com a solução foi mantido em banho-maria fervente por 20 minutos. Após este período a solução foi deixada à temperatura ambiente por 10 minutos para o resfriamento da mesma.

O ^{99m}Tc se complexa com os derivados (**9**) e (**10**) através dos três átomos de nitrogênio e do átomo de enxofre, que é desprotegido após o aquecimento (WINNARD *et al.*, 1997), fornecendo o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ que serão utilizados nos estudos de biodistribuição.

8.3 CONTROLE DE PUREZA RADIOQUÍMICA (PR)

A pureza radioquímica foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel 60. Inicialmente, realizaram-se as CCD das impurezas comumente encontradas nos processos de marcação, $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$, empregando-se solução salina a 0,9% e acetona como eluentes. O $^{99m}\text{TcO}_2$ foi obtido tratando-se o pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) com agente redutor (cloreto estanoso) por 10 minutos. Aplicou-se uma gota da solução em uma tira de CCD para a realização da cromatografia com os eluentes já citados. A cromatografia com pertecnetato foi realizada diretamente com a solução eluída do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$.

Cada placa de CCD foi preparada nas dimensões de 10 cm de comprimento por 1 cm de largura. Após a eluição de cada solvente, as placas foram secadas, cortadas em fragmentos de 1 cm de comprimento cada e, em seguida, a radioatividade foi determinada em um contador gama.

Após definidos os valores de R_f das impurezas acima citadas, realizaram-se as cromatografias dos produtos sintetizados **(9)** e **(10)** marcados com ^{99m}Tc , também utilizando tiras de CCD (sílica gel 60) e, como eluentes, acetona e solução salina a 0,9%.

8.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS MARCADOS

Após o processo de marcação os complexos obtidos foram purificados por coluna utilizando silicato de magnésio (Florisil 60-100 mesh) como fase estacionária e, inicialmente, acetona como fase móvel para a remoção do pertecnetato em excesso, seguida pela utilização de solução salina a 0,9% para a retirada do produto marcado, ficando o $^{99m}\text{TcO}_2$ retido na coluna. Retirou-se 30 alíquotas de, aproximadamente, 0,25 mL com cada eluente e contou-se a radioatividade destas alíquotas, determinando as frações com maior atividade, onde o produto eluído estaria em maior concentração.

8.5 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO DE $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ EM ANIMAIS SADIOS

Alíquotas das frações eluídas da coluna contendo 370 KBq de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ ou $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ foram injetadas por via endovenosa, em camundongos SWISS, machos, pesando de 25 a 30 gramas, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Para cada estudo foram utilizados 20 animais divididos em 4 grupos de 5 camundongos cada. Após a administração dos produtos marcados os camundongos foram anestesiados, por via intraperitoneal, com solução de Ketamine/Xylazine em dose de 40 mg/Kg e 5 mg/Kg, respectivamente. Nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos os animais foram sacrificados. Fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue e bexiga foram retirados, pesados e colocados em contador gama de poço para determinação da radioatividade. Para correção do decaimento radioativo do tecnécio- 99m utilizou-se um padrão de dose contendo a mesma atividade e o mesmo volume da dose injetada nos animais.

A radioatividade contida em cada órgão estudado foi dividida pela massa desse órgão, conseguindo-se, assim, a medida em cpm por grama tecidual (cpm/g). Este procedimento teve como finalidade a padronização dos experimentos, de maneira a evitar a interferência das diferentes massas dos órgãos. O valor em cpm obtido para o padrão de dose foi considerado como 100%, obtendo-se ao final a relação %dose/g como demonstrada na figura 54:

$$\% \text{dose/grama} = \frac{\text{cpm/g (órgão)}}{\text{cpm do padrão de dose}} \times 100$$

Figura 54 - Fórmula para a obtenção da relação %dose/g.

8.6 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR DE EHRLICH E ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO

Os experimentos de implantação de células de tumor de Ehrlich foram realizados no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Inicialmente, células de tumor de Ehrlich foram implantadas, intraperitonealmente, em camundongos SWISS, machos, pesando 25 a 30 g, com o intuito de produzir um foco de tumor ascítico. Utilizaram-se para este experimento oito animais que após 8 dias do implante foram anestesiados, intraperitonealmente, com solução de Ketamine/Xylazine em dose de 40 mg/Kg e 5 mg/Kg, respectivamente. Em seguida, os animais foram sacrificados. Retirou-se o líquido ascítico contendo células tumorais viáveis, que foram transferidas para um tubo Falcon estéril de 50 mL. Centrifugou-se o líquido ascítico a 3000 x g por 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado com solução salina a 0,9%. Esse processo foi repetido e, em seguida, as células foram coradas com solução de Tripán 0,4% e contadas em microscópio com aumento de 400x com o auxílio de uma câmara de Newbawer e a concentração foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Nº células/mL} = \bar{X} \times \text{FD} \times 10^4$$

Onde, \bar{X} é a média do número de células contadas nos quatro quadrantes da câmara de Newbawer e FD é o fator de diluição utilizado.

A solução contendo as células de tumor de Ehrlich foi novamente centrifugada e o sobrenadante (salina) foi retirado. O sedimento contendo as células tumorais foi ressuspensionado, utilizando o mesmo volume do sobrenadante retirado, com meio para congelamento contendo soro fetal bovino inativado a 57 °C por 1 hora e

dimetilsulfóxido na proporção de 9:1. As células foram aliqüotadas em criotubos de 1,5 mL com concentração de 10^8 células/mL sendo posteriormente armazenadas em nitrogênio.

O procedimento acima descrito foi realizado para obtenção de células viáveis que foram utilizadas na implantação do tumor sólido.

Para os estudos de biodistribuição em animais com tumor sólido, foram utilizados 20 camundongos SWISS, machos, pesando 25 a 30 g, para cada experimento (Bz-MAG₃ **(9)** e o Bz-MAG₃-G **(10)** marcados com ^{99m}Tc) divididos em 4 grupos de 5 animais cada. Implantou-se, via subcutânea, na coxa posterior direita o volume de 0,1 mL de solução salina a 0,9% contendo, aproximadamente, 10^6 células tumorais. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG por 15 a 20 dias sem restrição de alimento e água. Administraram-se, então, os derivados **(9)** e **(10)** radiomarcados. Os camundongos foram anestesiados, por via intraperitoneal, com solução de Ketamine/Xylazine em dose de 40 mg/Kg e 5 mg/Kg respectivamente, e sacrificados nos tempos de 5, 30, 120 e 240 minutos após a administração. Fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, tumor (coxa posterior direita) e músculo controle (coxa posterior direita) foram retirados, pesados e colocados em um contador gama de poço para a determinação da radioatividade, bem como o padrão de dose relativo ao experimento.

8.7 IMAGENS CINTILOGRÁFICAS

Para o estudo cintilográfico os produtos Bz-MAG₃ (**9**) e Bz-MAG₃-G (**10**) foram radiomarcados com uma alíquota da solução de pertecnetado de sódio com atividade de 185 MBq, afim de se obter atividade suficiente para aquisição das imagens. As imagens foram obtidas em uma gama câmara, com colimador low energy high resolution (LEHR), matriz 256x256x16 e tempo de aquisição de 600 segundos. Foram utilizados 3 animais, com tumor de Ehrlich implantado na coxa posterior direita, para cada experimento (^{99m}Tc-MAG₃ e o ^{99m}Tc-MAG₃-G) e as imagens foram adquiridas nos tempos de 5, 30, 120 e 240 minutos após a administração de 1,48 MBq dos produtos radiomarcados. Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com solução de Ketamine/Xylazine em dose de 40 mg/Kg e 5 mg/Kg respectivamente, e em seguida, posicionados sobre uma mesa em posição de decúbito ventral, de modo que o detector ficasse posicionado sobre a região posterior do animal.

8.8 ANÁLISE DE RESULTADOS

Os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas foram comparados quantitativamente pelo teste t e/ou pelo teste de Tukey-Kramer. Um nível de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk, e a análise de homogeneidade das variâncias pelo teste Brown-Forsythe. Os dados que não apresentaram variâncias homogêneas foram logaritmizados, para posterior análise.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 RENDIMENTO DE MARCAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ E $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$

O rendimento de marcação para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ foram determinados com base nos valores obtidos por CCD. Pelos dados obtidos por CCD, utilizando acetona como eluente, foi possível determinar o percentual de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($6,02 \pm 1,15$), ou seja, dos átomos de tecnécio que não foram reduzidos. Utilizando-se salina como eluente, encontrou-se o percentual de aproximadamente $40,28 \pm 4,62$ de $^{99m}\text{TcO}_2$, sendo este percentual relativo aos átomos de tecnécio-99m hidrolizados. Portanto, os dois produtos testados, inicialmente, não apresentaram rendimento de marcação satisfatório, como mostrado na tabela 21. De acordo com a literatura, o rendimento de marcação recomendado de um produto para estudos de biodistribuição deve ser superior a 90% (THEOBALD, 1990). Impurezas radioquímicas resultam em imagens de baixa qualidade devido a alta radiação de fundo ao redor dos tecidos e no sangue, além de expor o paciente a uma dose desnecessária de radiação (SAHA, 1998; TRHALL; ZIESSMAN, 2003). Desta forma, para atender os objetivos propostos tornou-se necessário a purificação dos produtos marcados, ou seja, a retirada das impurezas radioquímicas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$.

Tabela 21 - Rendimento de marcação do MAG_3 e do $\text{MAG}_3\text{-G}$ com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ antes da purificação por coluna

Composto testado	Rendimento de marcação
$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$	$52,4 \pm 4,8$
$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	$42,2 \pm 4,9$

Os valores são expressos em média \pm desvio padrão ($n=9$)

Com a proposta de retirar as impurezas ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$), testou-se inicialmente uma purificação utilizando uma coluna de Sephadex G10, entretanto, os resultados não foram satisfatórios. Assim, utilizou-se uma coluna contendo silicato de magnésio (Florisil 60-100 mesh). As alíquotas eluídas foram testadas utilizando CCD, conforme descrito no item 8.3. Os resultados mostraram que as impurezas radioquímicas foram removidas (tabela 22).

Tabela 22 - Rendimento de marcação do MAG_3 e do $\text{MAG}_3\text{-G}$ com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ após purificação por coluna de Florisil

Compostos testados	% Produto marcado
$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$	$94,4 \pm 3,8$
$^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	$93,9 \pm 3,0$

Os valores são expressos em média \pm desvio padrão ($n=7$)

9.2 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO DO $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ E DO $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ EM ANIMAIS SADIOS

Observa-se pela tabela 23 que no decorrer dos experimentos os órgãos que apresentaram maior captação de radioatividade foram os rins e a bexiga. Isto evidencia eliminação renal do produto $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$. Sabe-se pela literatura (FRITZBERG *et al.*, 1986; ROBLES *et al.*, 2003), que o MAG_3 que se encontra disponível, comercialmente, apresenta alta afinidade pelo sistema urinário (rins e bexiga). Portanto, os dados obtidos de biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$, sintetizado nesse trabalho, encontram-se respaldados pela literatura.

Tabela 23 - Biodistribuição $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ em animais sadios (%dose/g).

Tecido	5 min	15 min	30 min	60 min
Fígado	5,78 ± 0,99	5,28 ± 0,54	14,29 ± 1,68	10,54 ± 1,09
Baço	1,63 ± 0,25	1,85 ± 0,05	3,85 ± 0,50	3,18 ± 0,17
Rins	6,99 ± 1,64	6,06 ± 0,45	13,74 ± 1,96	9,03 ± 1,66
Estômago	0,69 ± 0,12	0,91 ± 0,13	2,43 ± 0,33	2,06 ± 0,29
Coração	1,34 ± 0,14	1,00 ± 0,14	2,34 ± 0,27	1,78 ± 0,24
Pulmão	2,96 ± 0,44	2,37 ± 0,34	7,91 ± 0,70	5,41 ± 0,34
Sangue	2,86 ± 0,15	1,60 ± 0,28	3,27 ± 0,21	1,98 ± 0,25
Bexiga	27,70 ± 2,27	33,99 ± 3,84	85,25 ± 3,75	90,63 ± 6,41

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=5$).

A biodistribuição do derivado sacarídico ($^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$) mostra uma eliminação renal mais rápida para este complexo. Observa-se pelas tabelas (23, 24) e pela figura 55, que nos tempos de 5 e 15 min após a administração uma excreção renal estatisticamente superior do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$, 64% e 80%, respectivamente, quando comparada com aquela observada para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$, 34% e 40%. Isto provavelmente pode ser explicado pelo fato da glicose ter contribuído para aumentar a hidrossolubilidade da molécula favorecendo a eliminação renal. CHEN *et al.*, 2006 mostraram que o MAG_3 acoplado a molécula de glicose apresentou um valor de log

P, coeficiente de partição, de - 2,19 sugerindo um caráter hidrofílico para essa molécula. Além disto, dados da literatura mostram que moléculas hidrosolúveis são eliminadas mais rapidamente pelo sistema renal (RANG *et al.*, 2004). Portanto, os resultados obtidos para o $^{99m}\text{Tc-MAG-G}$ estão de acordo com os dados da literatura, atestando mais rápida eliminação renal desse produto.

Tabela 24 - Biodistribuição $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em animais sadios (%dose/g).

Tecido	5 min	15 min	30 min	60 min
Fígado	8,77 ± 1,22	5,29 ± 0,68	2,33 ± 0,17	1,82 ± 0,15
Baço	0,99 ± 0,14	0,97 ± 0,05	0,42 ± 0,05	0,33 ± 0,04
Rins	22,97 ± 3,91	8,06 ± 1,39	2,95 ± 0,41	1,24 ± 0,16
Estômago	1,74 ± 0,14	1,46 ± 0,20	0,77 ± 0,10	0,51 ± 0,06
Coração	1,66 ± 0,24	1,06 ± 0,13	0,53 ± 0,07	0,34 ± 0,04
Pulmão	2,11 ± 0,27	1,70 ± 0,20	0,75 ± 0,12	0,63 ± 0,08
Sangue	3,28 ± 0,21	1,80 ± 0,21	0,76 ± 0,10	0,57 ± 0,06
Bexiga	41,17 ± 5,40	71,30 ± 5,85	95,54 ± 3,05	94,24 ± 4,19

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=5$).

De uma maneira geral, observam-se pelas tabelas 23 e 24 que os níveis de radioatividade presentes no estômago e baço, durante todo o período, não ultrapassaram a 7%. Este dado reveste de grande importância, pois sugere que o teor de impurezas radioquímicas ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$) presentes nas preparações injetadas estão dentro dos limites preconizados. Sabe-se pela literatura que o TcO_4^- uma vez presente na solução injetada é captado preferencialmente pelo estômago, enquanto que o TcO_2 é captado pelo baço (THRALL; ZIESSMAN, 2003).

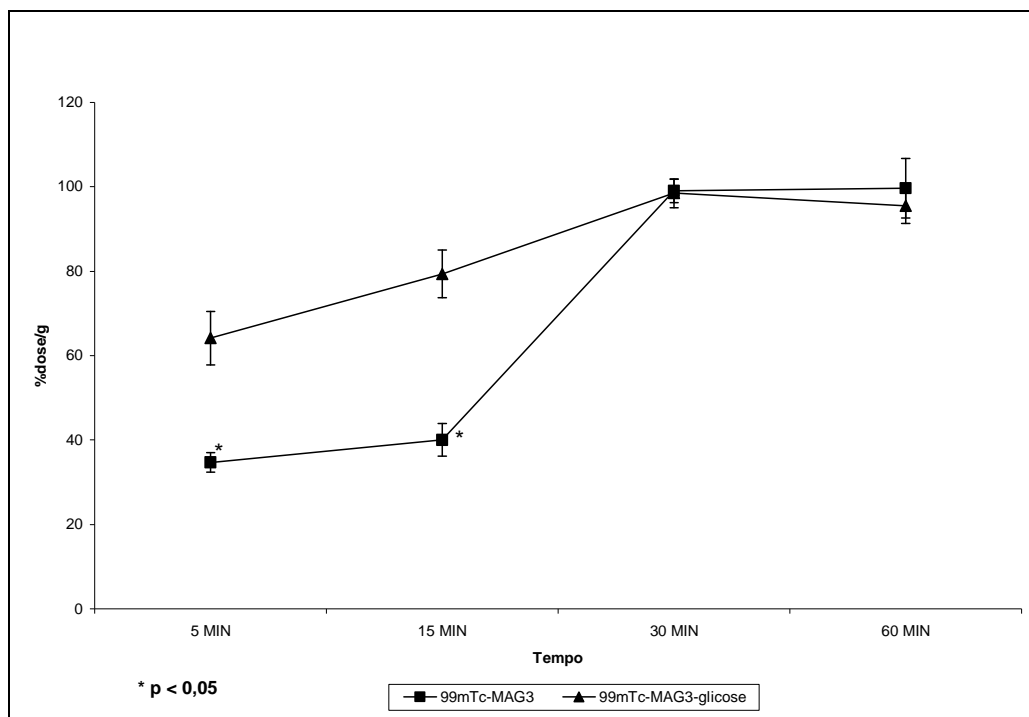


Figura 55 - Perfil de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no sistema urinário (rins e bexiga).

Os resultados de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$, sintetizado neste trabalho, no sangue mostraram um perfil de depuração bifásico (figura 56). Este mesmo perfil encontra-se descrito na literatura para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ encontrado comercialmente e disponível para os exames de medicina nuclear (SAHA, 1998). Esse dado corrobora para o sucesso da síntese do mercaptoacetiltriglicina (MAG_3) obtida nesse trabalho. Outro aspecto que merece destaque é que quando a molécula de glicose encontra-se ligada na estrutura do MAG_3 , o composto $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ apresenta um perfil de biodistribuição monofásico no sangue. Esses comportamentos distintos foram reproduzidos nos órgãos que apresentam maior aporte sangüíneo, como fígado (figura 57), coração (figura 58) e pulmão (figura 59). Esses resultados mostraram de forma inequívoca que a presença da molécula de glicose ligada ao MAG_3 modifica a biodistribuição do mesmo. Portanto, trata-se de produtos distintos apresentando perfis de biodistribuição característicos, o que, aliás, está de acordo com dados apresentados por KIM *et al.*, 2002 e CHEN *et al.*, 2006.

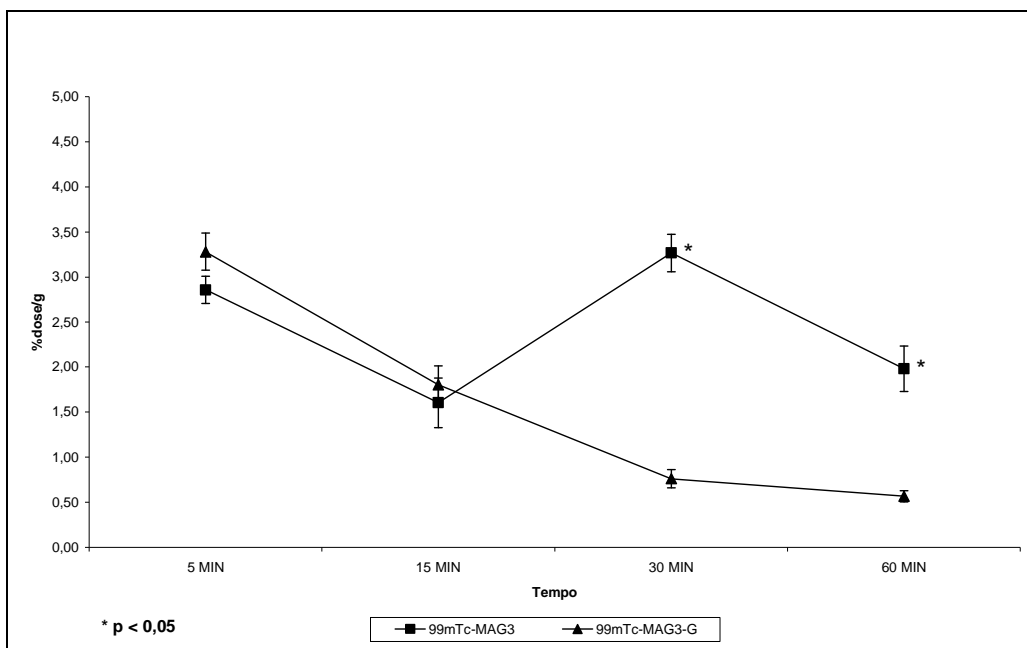


Figura 56 - Perfil de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no sangue.

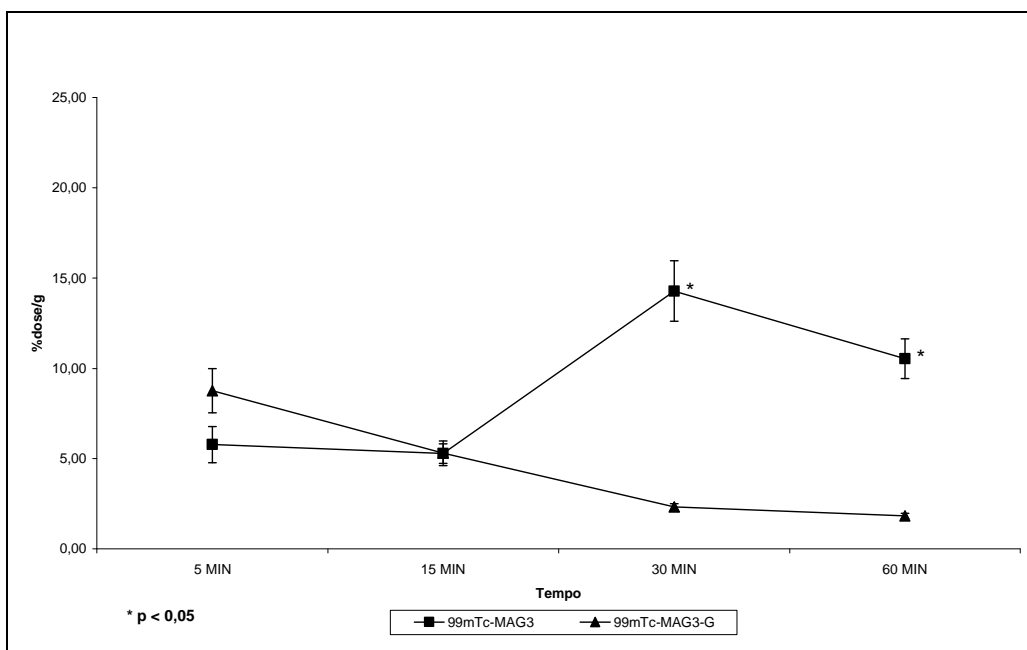


Figura 57- Perfil de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no fígado.

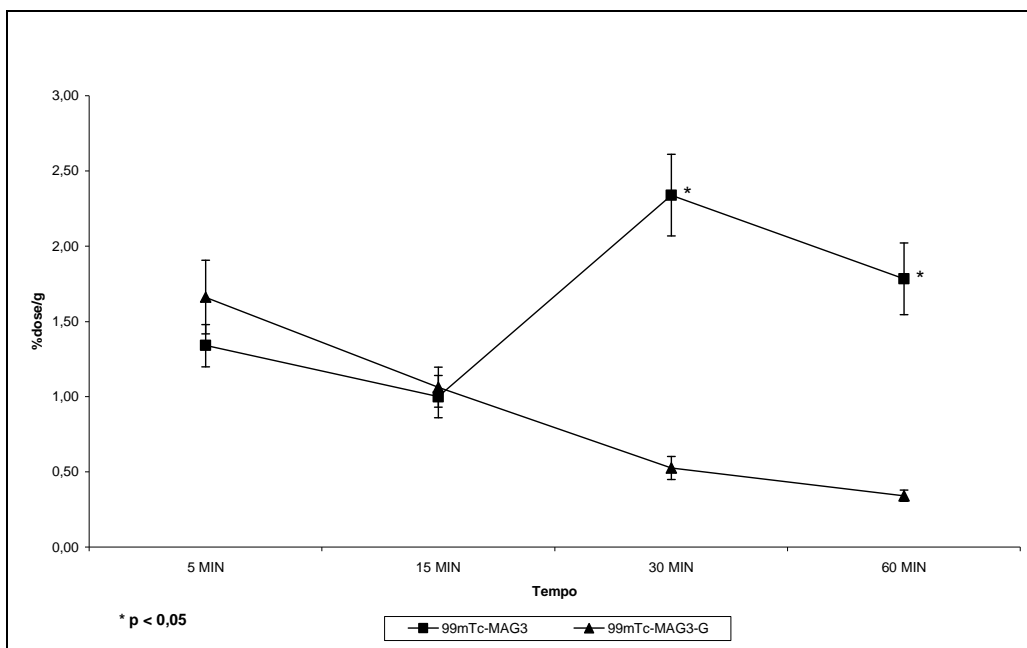


Figura 58 - Perfil de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no coração.

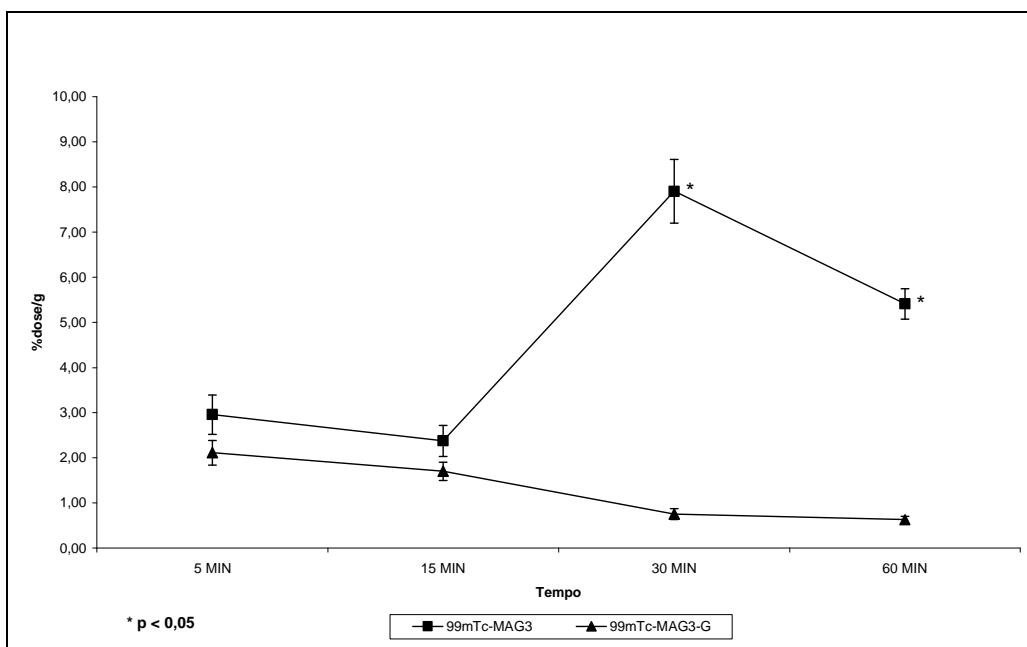


Figura 59 - Perfil de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ no pulmão.

9.3 BIODISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS COM TUMOR DE EHRLICH

Células de tumor de Ehrlich são células transplantáveis, provenientes de adenocarcinoma mamário, de camundongos fêmeas que se desenvolvem rapidamente. Tais células têm sido utilizadas como modelo no estudo de diversas substâncias, como agentes terapêuticos e agentes de diagnóstico (SEGURA *et al.*, 2000; OLORIS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007).

Os estudos de biodistribuição dos compostos marcados ($^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$) em animais, portadores de tumores, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o sistema urinário (rins e bexiga), quando comparado com aqueles obtidos em animais saudáveis (tabelas 25 e 26). Portanto, a presença do tumor não alterou o tropismo dos compostos marcados pelo sistema renal, mantendo o alto nível de excreção renal verificado para os radiofármacos testados.

Tabela 25 - Biodistribuição no sistema urinário de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ em animais saudáveis e com tumor (%dose/g)

Animais	5 min	30 min
Saúdes	34,69 ± 2,30	98,99 ± 2,75
Tumor	40,17 ± 6,94	96,68 ± 6,19

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=5$). Os valores apresentados não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

Tabela 26 - Biodistribuição no sistema urinário de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em animais sadios e com tumor (%dose/g)

Animais	5 min	30 min
Sadios	64,14 ± 6,36	98,49 ± 3,40
Tumor	58,87 ± 6,61	99,66 ± 12,97

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=5$). Os valores apresentados não são estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

Avaliou-se, também, a radioatividade presente no tecido tumoral (pata posterior direita) e no tecido muscular (pata posterior esquerda). Desta maneira, puderam-se expressar os resultados em forma da relação alvo/não alvo. Sabendo-se que, o músculo da pata posterior esquerda foi considerado a região não alvo. Os dados da tabela 27 com relação ao $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ mostraram relação superior a 2,0 para todos os tempos investigados. Isto sugere que este radiotraçador foi, no mínimo, 100% mais captado pelo tumor do que o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$. Segundo PHILLIPS, 1999, substâncias que apresentarem relação alvo/não alvo maior que 1,5 (captação 50% maior no tecido alvo) podem ser consideradas como potenciais agentes de diagnóstico. Portanto, os dados obtidos sugerem que o complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ pode ser empregado para a identificação de tumor de Ehrlich e, provavelmente, para outros tipos de tumores.

Tabela 27 - Relação Alvo/Não-Alvo de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$

Derivado testado	5 min	30 min	120 min	240 min
$^{99m}\text{Tc-MAG}_3$	1,22 ^a ± 0,14	1,22 ^a ± 0,10	1,16 ^a ± 0,08	1,10 ^a ± 0,11
$^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	2,05 ^b ± 0,25	2,22 ^b ± 0,24	2,13 ^b ± 0,12	2,10 ^b ± 0,24

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=5$). Os valores foram avaliados pelo teste Tukey-Kramer. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

9.4 IMAGENS CINTILOGRÁFICAS

A obtenção de imagens cintilográficas para os compostos $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ foi realizada em uma gama câmara, para cada composto investigado utilizaram-se 03 camundongos. Observa-se pela figura 60, maior captação de radioatividade na coxa posterior direita (CPD), região do tumor, em comparação a coxa posterior esquerda, quando o complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ é utilizado, porém esta diferença não é observada quando o complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ é testado (figura 61). Após a realização das imagens, determinou-se a radioatividade na região de interesse (RIs) nas coxas posteriores direita (alvo) e esquerda (não-alvo), como mostrado na figura 62. Os resultados obtidos, neste procedimento, mostraram valores da relação alvo/não alvo sempre superiores a 1,5 quando o complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ foi injetado, o mesmo não aconteceu após a injeção do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ cujos valores não ultrapassaram a 1,23 (tabela 28). Esses resultados são muito importantes, já que reforçam os dados obtidos pelos estudos de biodistribuição (tabela 27), mostrando mais uma vez que o complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ apresenta maior afinidade pelo tumor. Conforme citado anteriormente, a relação quando apresenta valores maiores do que 1,5 é indicativo de um bom radiotraçador para a identificação de tumores, ou seja, apresenta no mínimo 50 % mais radioatividade no tumor em relação ao controle (pata posterior esquerda), o que pode traduzir em uma imagem positiva para a região da lesão (PHILLIPS *et al.*, 1999).

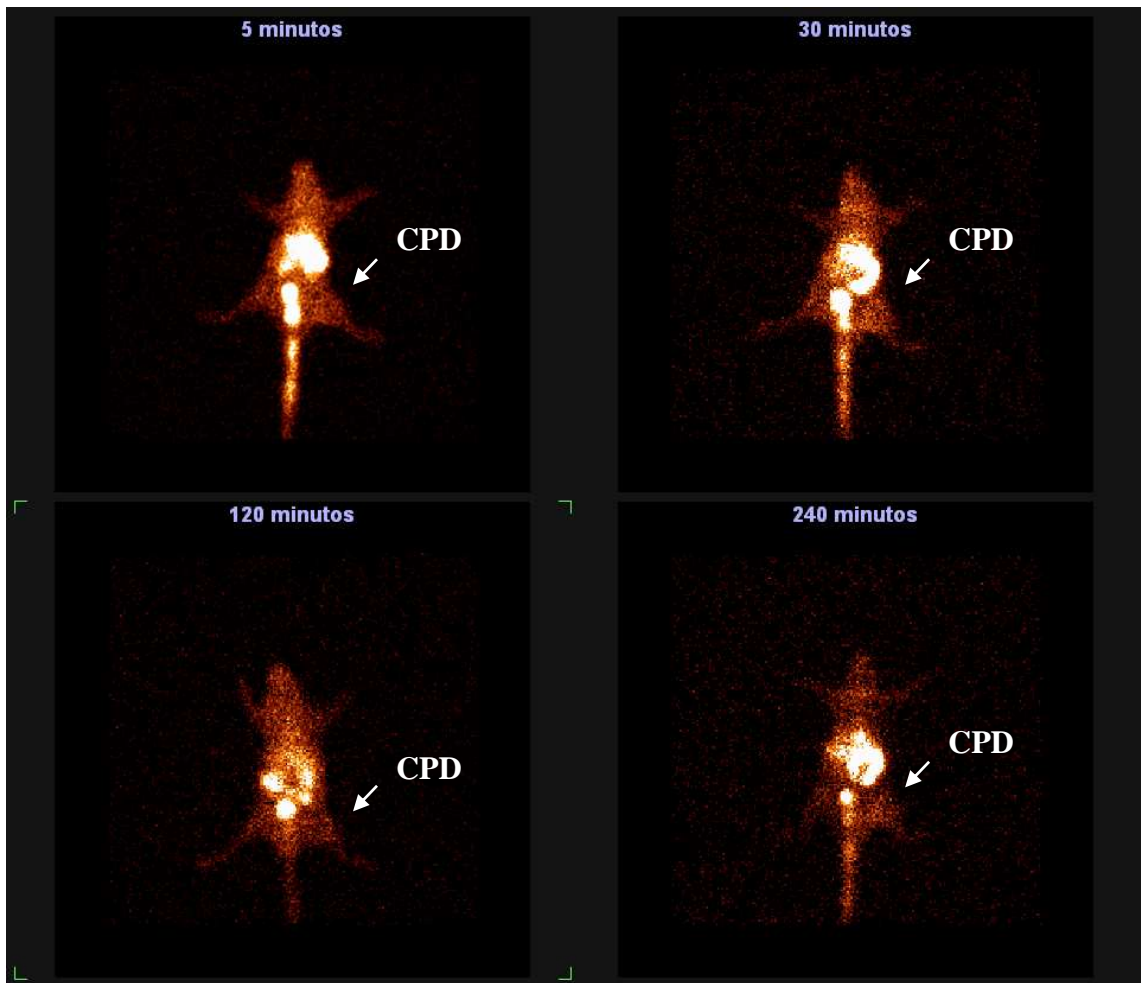


Figura 60 - Imagens cintilográficas de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$.

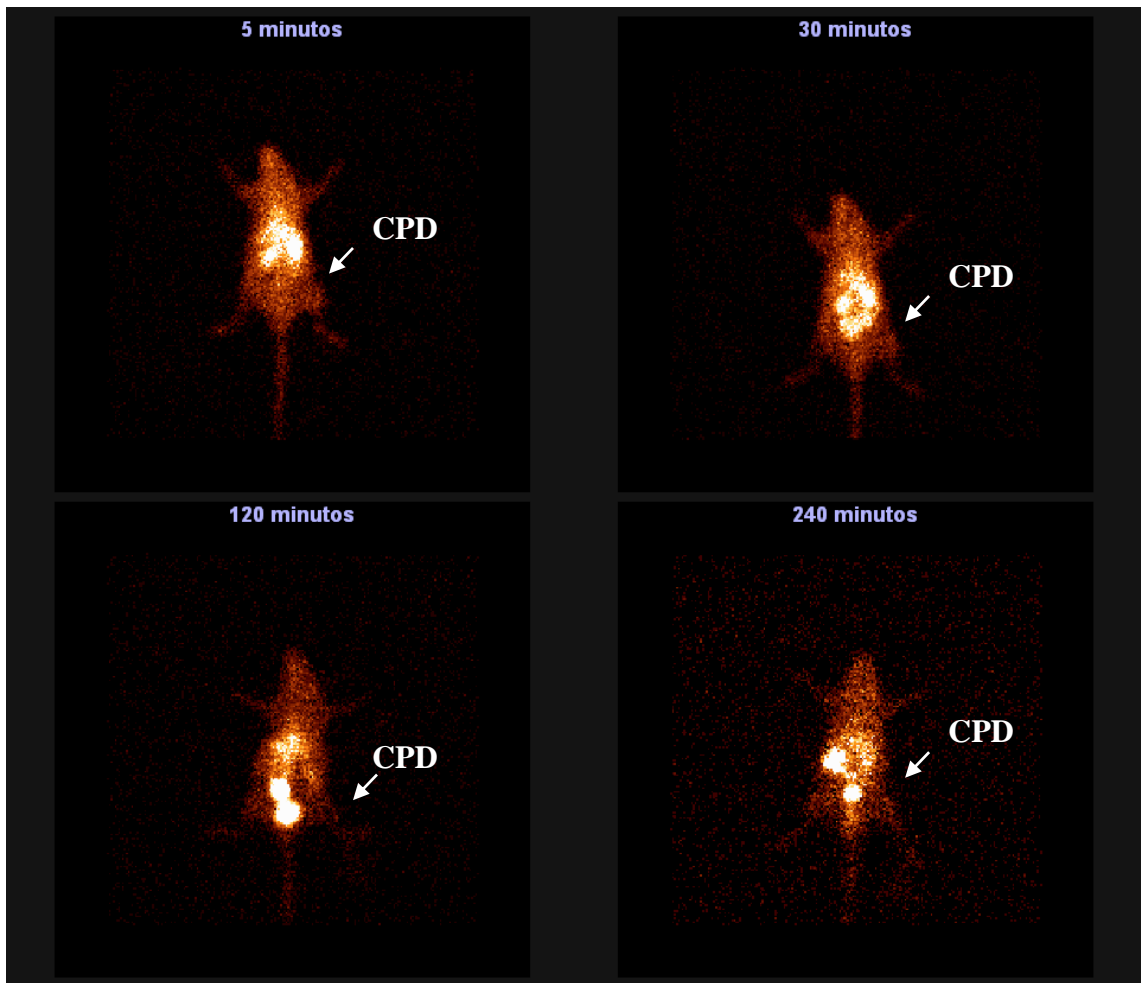


Figura 61 - Imagens cintilográficas de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$.

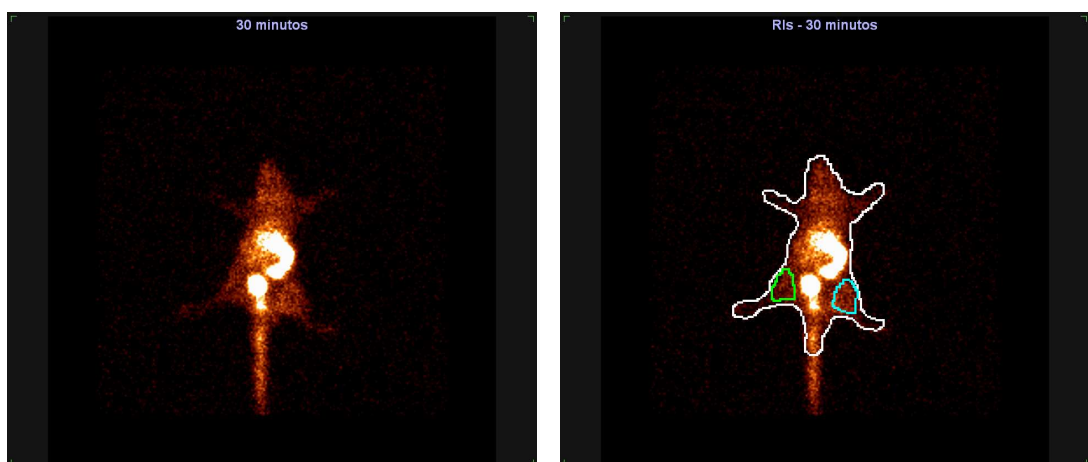


Figura 62 - Região de interesse (RIs) nas coxas posteriores direita (alvo) e esquerda (não-alvo).

Tabela 28 - Relação Alvo/Não-Alvo de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ obtida por Imagens na gamacâmara (%dose/cm²).

Derivado testado	5 min	30 min	120 min	240 min
$^{99m}\text{Tc-MAG}_3$	1,23 ^a ± 0,02	1,09 ^a ± 0,07	1,18 ^a ± 0,12	1,13 ^a ± 0,13
$^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$	1,80 ^b ± 0,10	2,02 ^b ± 0,09	1,95 ^b ± 0,12	1,93 ^b ± 0,06

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=3$). Os valores foram avaliados pelo teste Tukey-Kramer.

Observa-se pelas tabelas 29 e 30, que os valores das relações alvo/não alvo para os complexos $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tipos de análises utilizados.

Tabela 29 - Relação Alvo/Não Alvo apresentada pelo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ nos estudos de biodistribuição (%dose/g) e imagens cintilográficas (%dose/cm²)

Tipos de análises	5 min	30 min	120 min	240 min
Biodistribuição ($n=5$)	1,22 ± 0,14	1,22 ± 0,10	1,16 ± 0,08	1,10 ± 0,11
Imagens ($n=3$)	1,23 ± 0,02	1,09 ± 0,07	1,18 ± 0,12	1,13 ± 0,13

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os valores foram avaliados pelo teste t ($p>0,05$).

Tabela 30 - Relação Alvo/Não-Alvo apresentada pelo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ nos estudos de biodistribuição (%dose/g) e imagens cintilográficas (%dose/cm²)

Tipos de análises	5 min	30 min	120 min	240 min
Biodistribuição (n=5)	2,05 ± 0,25	2,22 ± 0,24	2,13 ± 0,12	2,10 ± 0,24
Imagens (n=3)	1,80 ± 0,10	2,02 ± 0,09	1,95 ± 0,12	1,93 ± 0,06

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os valores foram avaliados pelo teste t (p>0,05).

Os estudos de biodistribuição foram realizados utilizando um cintilador de poço equipado com uma válvula fotomultiplicadora, enquanto que as imagens foram obtidas em uma gama câmara que possui 22 válvulas fotomultiplicadoras, contribuindo para aumentar a sensibilidade deste equipamento. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores determinados pelos dois sistemas. Isto reforça a acurácia dos dados obtidos da biodistribuição para os órgãos investigados e para os tumores. Dado a congruência dos dados, pode-se pensar também que os valores reproduzem com fidelidade a captação da radioatividade nos estudos realizados. Portanto, os dados obtidos mostram que o complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ apresentou maior captação pelo tumor de Ehrlich quando comparado com o complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e, provavelmente, poderá ser empregado para a localização de outros tipos de tumores. Para tanto, novos estudos utilizando outras linhagens de células tumorais são necessários.

10 CONCLUSÕES

O presente trabalho possibilitou a obtenção de um derivado da D-glicose, o β -D-glicopiranosídeo de 4-N-[N^β-(benzoil-mercaptoacetil)glicilglicilglicil]aminofenila (**10**) (Bz-MAG₃-G), inédito, que foi complexado com o tecnécio-99m para a realização dos estudos de biodistribuição em camundongos.

A utilização da coluna de silicato de magnésio (Florisil 60-100 mesh) promoveu o aumento da porcentagem de produto marcado possibilitando os estudos posteriores.

O Benzoil-mercaptoacetilglicilglicilglicina (**9**) (Bz-MAG₃) sintetizado apresentou características semelhantes às descritas na literatura com relação a sua seletividade ao sistema urinário. Tal preferência foi notada nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas.

O derivado (**10**) radiomarcado apresentou padrão de distribuição distinto do ^{99m}Tc-MAG₃ quando comparado o perfil de depuração sanguínea das duas substâncias.

O ^{99m}Tc-MAG₃-G apresentou maior captação pelo tecido tumoral, evidenciado pela maior relação alvo/não-alvo.

A relação Alvo/Não-Alvo apresentado por (**10**) manteve-se acima de 1,5 em todos os tempos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRICH; Handbook of fine chemicals and laboratory equipment. São Paulo: Sigma-Aldrich Brasil, 2003-2004. (Catálogo de informações técnicas).

ASHTON, P. R.; HOUNSELL, E. F.; JAYARAMAN, N.; NILSEN, T. M.; SPENCER, N., STODDART, J. F.; YOUNG, M. Synthesis and biological evaluation of α -D-mannopyranoside-containing dendrimers. **Journal Organic Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 3429-3437, 1998.

BELKACÉMI, Y.; TSOUTSOU, P.; MAGNÉ, N.; CASTADOT, P.; AZRIA, D. Metabolic functional imaging for tumor radiosensitivity monitoring. **Clinical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 62, p. 227-239, 2007.

BERTOZZI, C. R.; KIESSLING, L. L. Chemical glycobiology. **Science**, v. 291, p. 2357-2363, 2001.

BORMANS, G.; CLEYNHENS, B.; ADRIAENS, P.; VANBILLOEN, H.; ROO, M.; VERBRUGGEN, P. Investigation of the labeling characteristics of ^{99m}Tc -mercaptoacetyltriglycine. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 22, n. 3, p. 339-349, 1995.

BOS, R.; HOEVEN, J. J. M.; WALL, E.; GROEP, P.; DIEST, P. J.; COMANS, E. F. J.; SEMENZA, G. L. Biological correlates of ^{18}F fluorodesoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 2, p. 379-387, 2002.

CELEN, S.; GROOT, T.; BALZARINI, J.; VUNCKY, K.; TERWINGHE, C. Synthesis and evaluation of a ^{99m}Tc -MAMA-propyl-thymidine complex as a potential probe for *in vivo* visualization of tumor cell proliferation with SPECT. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 34, p. 283-291, 2007.

CHEN, X.; LI, L.; LIU, F.; LIU, B. Synthesis and biological of technetium-99m-labeled deoxyglucose derivatives as imaging agents for tumor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 5503-5506, 2006.

CHU, T.; LI, R.; HU, S.; LIU, X.; WANG, X. Preparation and biodistribution of technetium-99m-labeled 1-(2-nitroimidazole-1-yl)-propanhydroxy-iminoamida (N2IPA) as tumor hypoxia marker. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 31, p. 199-203, 2004.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. New York: Oxford University Press, 2001. 1392 p.

CNEN (Comissão Nacional De Energia Nuclear). Norma 3.05 de abril de 1996. Referente aos requisitos de radioproteção e segurança para serviços de medicina nuclear. Rio de Janeiro: CNEN, p. 1-10, 1996.

COLINS, P. M.; FERRIER, R. J. **Monosaccharides: Their roles in natural products**. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. 574 p.

CONCHIE, J.; LEVVY, G. A.; MARSH, C. A.. Methyl and phenyl glycosides of the common sugars. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 12, p. 157-179, 1957.

CONTI, P. S.; LILIEN, D. L.; HAWLEY, K.; KEPLER, J.; GRAFTON, S. T.; BADING, J. R. PET and [¹⁸F]-FDG in oncology: A clinical uptake. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 23, p. 717-735, 1996.

DARROW, J. W.; DRUECKMMER, D. G. A cyclic phosphoramidate analogue of glucose as a selective inhibitor of inverting glycosidases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 8, p. 1341-1348, 1996.

DESS, D.; KLEINE, H. P.; WEINBERG, D. V.; KAUFMAN, R. J.; SIDHU, R. S. Phase-transfer catalyzed synthesis of acetylated aryl β-D-glucopyranosides and aryl β-D-galactopyranosides. **Synthesis**, v. 11, p. 883-885, 1981.

DEWANJEE, M. K. The chemistry of ^{99m}Tc-labeled radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 20, n. 1, p. 5-27, 1990.

DOWNING, R. S.; KUNKELER, P. J.; VAN BEKKUM, H. Catalytic synthesis of aromatic amines. **Catalysis Today**, v. 37, p. 121-136, 1997.

DURETTE, P. L.; HORTON, D. Conformation of sugars and their derivatives. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 26, p. 103-107, 1971.

ESHIMA, D.; TAYLOR, A. Technetium-99m (^{99m}Tc) Mercaptoacetyltriglycine: Update on the new ^{99m}Tc renal tubular function agent. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 22, n. 2, p. 61-73, 1992.

FERREIRA, E.; SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; GOMES, M. G.; CASSALI, G. D. Ehrlich tumor as model to study artificial hyperthyroidism influence on breast cancer. **Pathology: Research and practice**, v. 203, p. 39-44, 2007.

FIGUERAS, F.; COQ, B. Hydrogenation and hydrogenolysis of nitro-, nitroso-, azo-, azoxy- and other nitrogen-containing compounds on palladium. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 173, p. 223-230, 2001.

FISCHER, E.; MECHEL, L. Zur synthese der phenol-glucoside. **Berichte der Deutschen**, v. 49, n. 2, p. 2813-2820, 1916.

FRITZBERG, A. R.; KASINA, S.; ESHIMA, D.; JOHNSON, D. L. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG3 as a Hippuran replacement. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 27, n. 1, p. 111-116, 1986.

GU, J.; YAMAMOTO, H.; FUKUNAGA, H.; DANNO, K.; TAKEMASA, I.; IKEDA, M. ; TATSUMI, M.; SEKIMOTO, M. Correlation of GLUT-1 overexpression, tumor size, and depth of invasion with ^{18}F -2-fluoro-2-desoxy-D-glucose uptake by positron emission tomography in colorectal cancer. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, p. 2198-2205, 2006.

GUGGENBERG, E.; PENZ, B.; KEMMPLER, G.; VIRGOLINI, I.; DESCRISTOFORO, C. Comparison of different methods for radiochemical purity testing of [^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-D-Phe¹, Tyr³]-octreotide. **Applied Radiation and isotopes**, n. 64, p. 194-200, 2006.

HALL, L. D. Nuclear magnetic resonance. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 19, p. 51-91, 1964.

HNATOWICH, D. J.; QU T.; CHANG, F.; LEY, A. C.; LADNER, R. C.; RUSCKOWSKI, M. Labeling peptides with technetium-99m using a bifunctional chelator of a N-hydroxysuccinimide ester of mercaptoacetyltriglycine. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 39, n. 1, p. 56-64, 1998.

HUNSEN, M.; LONG, D. A.; D'ARDENNE, C. R.; SMITH, A. L. Mild one-pot preparation of glycosyl bromides. **Carbohydrates Research**, v. 340, p. 2670-2674, 2005.

INGEBRIGTSEN, T.; LEJON, T. Ring opening of aziridines by aromatic thiols followed by amino-substitution. **Tetrahedron Letters**, v. 47, p. 3949-3951, 2006.

JACOBSSON, M.; MALMBERG, J.; ELLERVIK, U. Aromatic O-glycosylation. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 1266-1281, 2006.

JONES, A. G. Technetium in nuclear medicine. **Radiochimica Acta**, v. 70/71, p. 289-297, 1995.

JURISSON, S.; BERNING, D.; JIA, W.; DANGSHE, M. Coordination compounds in nuclear medicine. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 3, p. 1137-1156, 1993.

KENNY, L. M.; ABOAGYE, E. O.; PRICE, P. M. Positron emission tomography imaging of cell proliferation in oncology. **Clinical Oncology**, v. 16, p. 176-185, 2004.

KIM, I.; KOBAYASHI, H.; YOO, T. M.; KIM, M.; LE, N.; HAN, E.; WANG, Q-C.; PASTAN, I.; CARRASQUILLO, J. A.; PAIK, C. H. Lowering of pI by acylation improves the renal uptake of ^{99m}Tc-labeled anti-Tac ds Fv: effect of different acylating reagents. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 29, p. 795-801, 2002.

KUMAR, J. S. D.; HO, M. M.; TOYOKUNI, T. Simple and chemoselective reduction of aromatic nitro compounds to aromatic amines: reduction with hydriodic acid revisited. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 5601-5602, 2001.

LEI, K.; RUSCKOWSKI, M.; CHANG, F. Q.; MARDIROSSIAN, G.; HNATOWICH, D. J. Technetium-99m antibodies labeled with MAG₃ and SHNH: An in vitro and animal in vivo comparison. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 23, n. 7, p. 917-922, 1996.

LIU, G.; DOU, S.; HE, J.; VANDERHEYDEN, J.; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J.; Preparation and properties of ^{99m}Tc(CO)₃⁺-labeled N,N-Bis(2-pyridylmethyl)-4-aminobutyric acid. **Bioconjugate Chemistry**, v. 15, p. 1441-1446, 2004.

LIU, X.; LU, S. Selective formation of aromatic amines by selenium-catalyzed reduction of aromatic nitro compounds with CO/H₂O under atmospheric pressure. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 212, p. 127-130, 2004.

LOVE, C.; TOMAS, M. B.; TRONCO, G. G.; PALESTRO, C. J. FDG PET of infection and inflammation. **Radiographics**, v. 25, n. 5, p. 1357-1368, 2005.

MANGELINCKX, S.; BOEYKENS, M.; VLIEGEN, M.; EYCKEN, J.; KIMPE, N. Synthesis of new 3, 3-dimethoxyazetidone-2-carboxylic acid derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 525-529, 2005.

MARCH, J. Oxidations and Reductions. In: **Advanced Organic Chemistry**. 4. ed. New York: Wiley-Interscience publication, 1992. Cap. 9, p. 1219-1220.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiologia Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 233-239, 2001.

MISRA, A. K.; TIWARI, P.; MADHUSUDAN, S. K. HClO₄-SiO₂ catalyzed per-O-acetylation of carbohydrates. **Carbohydrates Research**, v. 340, p. 325-329, 2005.

NIKITENKO, A. A.; RAIFELD, Y. E.; WANG, T. Z. The discovery of RFI-641 as a potent and selective inhibitor of the respiratory syncytial virus. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 1041-1044, 2001.

NOWOTNIK, D. P. Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. In: SAMPSON, C. B. **Textbook of radiopharmacy theory and practice**. V.3. Gordon and Breach Science Publishers S.A., 1990. Cap. 3, p. 53-72.

OFEK, I.; KAHANE, I.; SHARON, N. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 297-299, 1996.

OHTSUBO, K.; TAKAMATSU, S.; MINOWA, M. T.; YOSHIDA, A.; TAKEUCHI, M.; MARTH, I. D. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. **Cell**, v. 123, p. 1307-1321, 2005.

OKARVI, S. M. Synthesis, radiolabeling and in vitro and in vivo characterization of a technetium-99m-labeled alpha-M2 peptide as a tumor imaging agent. **Journal Peptide Research**, v. 63, p. 460-468, 2004.

OLORIS, S. C. S.; DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L. Effect of β -carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Science**, v. 71, p. 717-724, 2002.

PATRICK, G. L. AntiCancer Agents. In: **An introduction to medicinal chemistry**. 5. ed. New York: Oxford University Press, 2005. Cap. 18, p. 489-557.

PAUWELS, E. K. J.; RIBEIRO, M. J.; STOOT, J. H.; MCCREADY, V. R.; BOURGUIGNON, M.; MAZIERE, B. FDG accumulation and tumor biology. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 25, p. 317-322, 1998.

PHILLIPS, W.T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. **Advanced drug delivery reviews**, v. 37, p. 13-32, 1999.

PIETERS, R., J.; ANDRÉ, S.; VRASIDAS, I.; KALTNER, H.; KUWABARA, I.; LIU, F.; LISKAMP, R. M. J.; GABIUS, H. Wedgelike glycodendrimers as inhibitors of binding of mammalian galectins to glycoproteins, lactose maxiclusters, and cell surface glycoconjugates. **ChemBioChem**, v. 2, p. 822-830, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Mecanismos celulares: proliferação celular e apoptose. In: **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 5, p. 77-89.

ROBLES, B. R.; HERRERA, J.; CABALLERO, J.; OTERO, M. Purificación del benzoil-mercaptoacetil triglicina complementado con evaluaciones biológicas. **Alasbimn Journal**. v. 5, n. 21, 2003.

ROY, R.; TROPPER, F. Stereospecific synthesis of aril β -D-N-acetylglucopyranosides by phase transfer catalysis. **Synthetic Communications**, v. 20, n. 14, p. 2097-2102, 1990.

RUSCKOWSKI, M.; QU T.; PULLMAN, J.; MARCEL, R.; LEY, A. C.; LADNER, R. C.; HNATOWICH, D. J. Inflammation and infection imaging with a ^{99m}Tc -neutrophil elastase inhibitor in monkeys. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 41, n. 2, p. 363-374, 2000.

RYLANDER, P. N. Hydrogenation Methods. In: **Best Synthetic Methods**. 2. ed. Burry St. Edmunds: St. Edmundsbury Press United, 1988. p. 104-106.

SAHA, G. B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998a. 358 p.

SCHIBLI, R.; DUMAS, C.; PETRIG, J.; SPADOLA, L.; SCAPOZZA, L.; GARCIA-GARAYOA, E.; SCHUBIGER, P. A. Synthesis and *in vitro* characterization of

organometallic rhenium and technetium glucose complexes against GLUT-1 e hexokinase. **Bioconjugate Chemistry**, v. 16, p. 105-112, 2005.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L; G.; MARQUEZ. J. Ehrlich ascites tumor imbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters**, v. 74, p. 111-115, 2000.

SHIELDS, A. F.; GRIERSON, J. R.; DOHMEN, B. M.; MACHULLA, H.; STAYANOFF, J. C.; OBRADOVICH, J. E. Imaging proliferation *in vivo* with [F-18] FLT and positron emission tomography. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1334-1336, 1998.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; FERREIRA, E.; MORAES, J. R. C.; OCARINO, N. M.; CASSALI, G. D. Efeito do hipertiroidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 48, n. 6, p. 867-874, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 459 p.

STEIGER, R. E. Benzoylation of amino acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 9, p. 396-400, 1944.

STICK, R. V. The Reactions of Monosaccharides. In: **Carbohydrates: The Sweet Molecules of Life**. San Diego: Academic Press, 2001. Cap. 7, p. 67-112.

SZAREK, W. A.; ACHMATOWICZ, O.; PLENKIEWICZ, J.; RADATUS, B. K. Investigation of the dual behavior formation of a reversible intermediate and chain degradation. **Tetrahedron**, v. 34, n. 10, p. 1427-1433, 1978.

TEMERIUZ, A.; GUBICA, T.; ROGOWSKA, P.; PARADOWSKA, K.; CYRANSKI, M. K. Crystal structure and solid state ¹³C NMR analysis of nitrophenyl 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl-β-D-gluco and galactopyranoside. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 6, p. 1175-1184, 2005.

TENG, B.; BAI, Y.; CHANG, Y.; CHEN, S.; LI, Z. Technetium-99m-labeling and synthesis of thymidine analogs: Potencial candidates for tumor imaging. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 3440-3444, 2007.

THEOBALD, A. E. Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. In: SAMPSON, C. B. **Textbook of radiopharmacy theory**

and practice. V.3. Gordon and Breach Science Publishers S.A., 1990. Cap. 7, p. 115-148.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 408.

TIMMONS, S. C.; JAKEMAN, D. L. Stereoselective chemical synthesis of sugar nucleotides via direct displacement of acylated glycosyl bromides. **Organic Letters**, v. 9, n. 7, p. 1227-1230, 2007.

TISATO, F.; PORCHIA, M.; BOLZATI, C.; REFOSCO, F.; VITTADINI, A. The preparation of substitution-inert ^{99}Tc metal-fragments: Promising candidates for the design of new $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radiopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 250, p. 2034-2045, 2006.

VANBILLOEN, H. P.; BORMANS, G. N.; ROO, M. J.; VERBRUGGEN, A. N. Complexes of technetium-99m with tetrapeptides, a new class of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled agents. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 22, n. 3, p. 325-338, 1995.

VERA, D. R.; WALLACE, A. M.; HOH, C. K. [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]MAG₃-mannosyl-dextran: a receptor-binding radiopharmaceutical for sentinel node detection. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 28, p. 493-498, 2001.

WINNARD, P. Jr; CHANG, F.; RUSCKOWSKI, M.; MARDIROSSIAN, G.; HNATOWICH, D. J. Preparation and use of NHS-MAG₃ for Technetium-99m labeling of DNA. **Nuclear Medicine & Biology**, v. 24, n. 5, p. 425-432, 1997.

YAMAMURA, N.; MAGATA, Y.; ARANO, Y.; KAWAGUCHI, T.; OGAWA, K.; KONISHI, J.; SAJI, H. Technetium-99m-labeled medium-chain fatty acid analogues metabolized by α -oxidation: radiopharmaceutical for assessing liver function. **Bioconjugate Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 489-495, 1999.

YANG, D. J.; KIM, C.; SCHECHTER, N. R.; AZHDARINIA, A.; YU, D.; OH, C., BRYANT, J. L.; WON, J.; KIM, E. E.; PODOLOFF, D. A. Imaging with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. **Radiology**, p. 465-473, 2003.

ZANINI, D.; ROY, R. Novel dendritic α -sialosides: synthesis of glycodendrimers based on a 3, 3' -iminibis (propylamine) core. **Journal Organic Chemistry**, v. 61, n. 21, p. 7348-7354, 1996.

ZHU, Z.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, G.; LIU, N.; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J. A novel and simplified route to the synthesis of N3S chelators for ^{99m}Tc labeling. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 28, n. 6, p. 703-708, 2001.

ANEXO

ANEXO A - Carta de aprovação do comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Dados de biodistribuição de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em animais com tumor de Ehrlich.

Tabela 31 - Biodistribuição $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ em animais com tumor (%dose/g)

Tecido	5 min	30 min	120 min	240 min
Fígado	7,62 ± 1,02	2,24 ± 0,19	1,58 ± 0,30	1,39 ± 0,15
Baço	2,33 ± 0,50	0,46 ± 0,08	0,32 ± 0,07	0,29 ± 0,07
Rins	20,43 ± 2,15	4,99 ± 1,35	2,64 ± 0,64	2,16 ± 0,44
Estômago	1,69 ± 0,39	2,08 ± 0,25	0,68 ± 0,12	1,43 ± 0,33
Coração	3,31 ± 0,74	0,76 ± 0,15	0,47 ± 0,10	0,39 ± 0,08
Pulmão	4,25 ± 0,89	1,03 ± 0,11	0,68 ± 0,08	0,59 ± 0,12
Sangue	7,53 ± 0,45	1,05 ± 0,14	0,71 ± 0,17	0,74 ± 0,17
Bexiga	19,74 ± 5,06	91,69 ± 5,64	51,96 ± 9,29	73,52 ± 6,55
Tumor	1,80 ± 0,42	0,68 ± 0,11	0,39 ± 0,09	0,38 ± 0,07
Músculo	1,47 ± 0,22	0,55 ± 0,05	0,34 ± 0,06	0,35 ± 0,07

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=5$)

Tabela 32 - Biodistribuição $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-G}$ em animais com tumor (%dose/g)

Tecido	5 min	30 min	120 min	240 min
Fígado	7,03 ± 1,07	3,69 ± 0,86	2,05 ± 0,46	2,23 ± 0,52
Baço	1,77 ± 0,26	0,80 ± 0,06	0,33 ± 0,03	0,29 ± 0,04
Rins	14,62 ± 4,50	3,72 ± 0,61	2,15 ± 0,40	2,54 ± 0,33
Estômago	3,46 ± 0,47	5,71 ± 0,20	4,24 ± 0,57	2,69 ± 0,51
Coração	2,37 ± 0,25	0,85 ± 0,10	0,40 ± 0,07	0,28 ± 0,04
Pulmão	3,82 ± 0,21	1,35 ± 0,12	0,45 ± 0,10	0,42 ± 0,03
Sangue	6,09 ± 0,70	1,89 ± 0,37	0,72 ± 0,10	0,49 ± 0,07
Bexiga	44,25 ± 8,87	93,95 ± 12,97	37,14 ± 8,10	55,83 ± 11,85
Tumor	2,25 ± 0,22	1,37 ± 0,11	0,50 ± 0,04	0,45 ± 0,04
Músculo	1,11 ± 0,13	0,63 ± 0,10	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,03

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=5$)