Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

HENRIQUE KOCH CHAVES

**“Complexos derivados do fragmento *fac*-[M(CO)₃L] (M = Re e Tc)
com ligantes multidentados como novos agentes para radioterapia
e radiodiagnóstico”**

São Carlos

2016

Henrique Koch Chaves

**“Complexos derivados do fragmento *fac*-[M(CO)₃L] (M = Re e Tc)
com ligantes multidentados como novos agentes para radioterapia
e radiodiagnóstico”**

**Tese apresentada ao Instituto de Química de São
Carlos, da Universidade de São Paulo como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor
em Ciências**

**Área de Concentração: Química Analítica e
Inorgânica**

Orientador: Prof. Dr. Victor M. Deflon

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me abençoado até aqui.

Aos meus pais, Diana e Cláudio, por terem me ajudado a realizar os meus sonhos. Se cheguei até aqui, foi porque vocês sempre acreditaram em mim! Amo muito vocês!!!

À minha irmã, Cláudia, pelo carinho de sempre e por me apoiar, seja pessoal ou profissionalmente, em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Victor Marcelo Deflon, pela amizade, orientação e pelas oportunidades concedidas durante o período do doutorado.

Ao pessoal do meu grupo (GQIEB): André, Pedro, Carolina, Viviana, Murilo, Rafaela, Zumira, Vanessa, Amandha, Jocely, Mônica, Otávio, Rafael e Nemer, gostaria de agradecer pelo companheirismo durante o período de doutorado. Foi uma caminhada difícil.... Sem o apoio de vocês, os dias seriam mais difíceis ainda.

Ao pessoal do Centro de Medicina Nuclear, do Hospital das Clínicas de São Paulo (Dr. Fábio Navarro Marques, Dra. Daniele, Aline, Carol, Malu e Josy), pela ajuda nos experimentos de marcação com ^{99m}Tc e pelos bons momentos que passei com vocês. Um agradecimento em especial ao Dr. Fábio, pela amizade e pela confiança depositada em mim. Você é uma inspiração pra gente que quer seguir carreira acadêmica! Espero poder fazer muitas parcerias com você ainda!

A Silvana e André da CAQUI (IQSC) pela amizade e carinho durante todo o período do doutorado. Vocês me ajudaram muito a concluir essa etapa; principalmente na hora de explicar os “morretos” que apareciam constantemente nos meus espectros. Obrigado mesmo!!!

À Sílvia, Andréia, Gustavo, Verô, Cláudia e Gisley da pós-graduação, pelo carinho e suporte que me deram durante o mestrado e doutorado. Sem o apoio de vocês, seria muito difícil concluir mais essa etapa. Vocês são demais!!!

Aos amigos da Valdolândia (Xorão, Pantera, Dr. B e Taba) pelos bons momentos e boas conversas em quase um ano de convívio.

Aos amigos Cássio e André, pelos momentos divertidíssimos que passamos juntos nesses anos. Só tenho uma coisa a dizer pra vocês: “Girls, start your engines and may the best woman win!!!!”

Aos outros amigos que conheci desde que cheguei aqui em Sanca (Henrique, Ricardo, Afrânio, Ricky e Evaldo) pelo apoio, saídas e bons momentos tanto aqui, quanto em outras cidades.

Aos amigos da minha cidade, que mesmo de longe, sempre estiveram na torcida por mim e me dando suporte em todos os momentos: Day Paula, Aline, Bruno, Jorge, Richard e Tia Rozânia.

Ao pessoal do Bar Empório (Nice, Stephanie, Ivy, Lica, Ari, Selma, Naty, Gustrans, Rodrigo, Matheus, Tóia, Juliano, Gah, Jacque, Laura, Fernando, Marco, Guilherme, Laurinha, Eliana, Eli, Roberta, Isa e Thaís) pelos momentos divertidos (Blow's e cachaçadas) e também por escutarem minhas lamentações nos momentos de desespero...rsrsrs.... Em especial ao amigo de todas horas, Dirso, por tudo que fez por mim e pelo companheirismo nas mais diversas situações. Vocês são demais!!!

Ao pessoal do meu antigo laboratório (Química Analítica e Inorgânica): Magão, Zé, Tiaguinho, Dani (Bolina), Camila, Evânia, Larissa, Laís, Gustavo, Nalberth, Dani Truzzi, Augusto, Andressa, Boi, Aline Tavares (Sul), Maicon, pela amizade durante todo o tempo que passei aqui. Ao pessoal do Laboratório da Cachaça (Itapira, Natália, Felipão, Japa, Peter Coyote e Regina) pelos bons momentos que passamos, principalmente fora do IQSC.

Ao Prof. Alzir Batista e os seus alunos pelo apoio e pelas análises realizadas. À Lu Vizzoto (UFSCar) pela grande ajuda com os RMN's e pelo carinho.

Ao Prof. Benedito dos Santos Lima Neto, o qual tive a oportunidade de aprender muita Química Inorgânica (reatividade) no período em que foi meu orientador de mestrado. Vlw Dito!!!

Ao Cristovam, pela amizade e companheirismo. Foram bons momentos e momentos muito difíceis desde que chegamos a São Carlos... Mas sobrevivemos... Concluimos os nossos objetivos. Que venham dias melhores!!!

EPÍGRAFE

“Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.”

(Trecho do Livro “O Pequeno Príncipe, Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Esta tese apresenta a síntese e a caracterização de novos complexos de rênio e tecnécio utilizando como agentes complexantes ligantes assimétricos do tipo base de Schiff e ligantes triaminas derivadas da dietilenotriamina. Os ligantes assimétricos foram sintetizados através de reações de condensação entre 2,2'-dihidroxibenzofenona e as aminas alifáticas etilenodiamina e dietilenotriamina, formando, respectivamente, os ligantes 2,2'-(((2-aminoetil)imino)metileno)difenol (**HL**¹) e 2,2'-(((2-((2-aminoetil)amino)etil)imino) metileno)difenol (**HL**²). Os ligantes simétricos foram sintetizados através de reações de condensação entre benzaldeído, 4-hidroxibenzofenona e 3- e 4-metoxibenzaldeído com a amina alifática dietilenotriamina, formando, respectivamente, os ligantes simétricos tridentados triclórato de *N*¹-benzil-*N*²-(2-(benzilamino)etil)etano-1,2-diamina (**HL**³), 4,4'-(((azanodilbis(etano-2,1-diil))bis- (azanedil))bis(phenilmetileno))difenol (**HL**⁴), triclórato de *N*¹-(4-metoxibenzil)-*N*²-(2-((4-metoxibenzil)amino)etil) etano-1,2-diamina (**HL**⁵) e triclórato de *N*¹-(3-metoxibenzil)-*N*²-(2-((3-metoxibenzil)amino)etil)etano-1,2-diamina (**HL**⁶). Reações de complexação foram conduzidas com os precursores metálicos de Re^I e Tc^I. O complexo [Re(CO)₅Br] foi utilizado como precursor de Re^I. Foi obtido o complexo neutro do tipo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)] e complexos catiônicos do tipo *fac*-[Re(CO)₃(**HL**^{2,3,4,5,6})]Br. Os ligantes e complexos foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar (CHN), espectroscopia de absorção na região do infravermelho, espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, espectrometria de massas (MS-ESI) e, no caso dos complexos com os ligantes **HL**^{1,2,5,6}, difração de raios X pelo método do monocristal.

Foi realizada a marcação do ligante **HL**³ com o complexo *fac*-[[^{99m}Tc](H₂O)(CO)₃]⁺, formando o complexo *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(**HL**³)]Br e outras espécies em solução, que foram separadas por HPLC. Adicionalmente, realizou-se um estudo comparativo entre o método convencional de síntese (aquecimento) com o método de síntese no qual microondas são utilizadas. O complexo de tecnécio foi caracterizado por HPLC e eletroforese em papel. Foram realizados testes de estabilidade em cisteína, histidina e tampão PBS. Os testes de estabilidade mostraram que o complexo apresenta boa estabilidade por período de 3 horas. Foi determinado o coeficiente de partição desse complexo, tendo sido observado o

caráter lipofílico do mesmo. Foram também realizados testes biológicos *in vitro* de captação e extrusão com células B16F10 (melanoma murino), onde as células captaram o complexo **fac-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br**, em torno de 4,2%, e mantiveram retidas em seu interior cerca de 20% do complexo, após 60 minutos de incubação. O teste de viabilidade celular por azul de Tripán, mostrou estabilidade das células, durante os experimentos de captação e extrusão, frente às espécies radioativas, apresentando uma viabilidade celular superior a 90% em todos os casos.

ABSTRACT

This thesis presents the synthesis and characterization of novel rhenium and technetium complexes using as complexing agents asymmetric ligands (Schiff's bases type ligands) and triamines ligands derived from diethylenetriamine. The asymmetric ligands were synthesized by condensation reactions between 2,2'-dihydroxybenzophenone and the aliphatic amines ethylenediamine and diethylenetriamine, giving rise, respectively, to the ligands 2,2'-(((2-aminoethyl)imino)methylene)diphenol (**HL**¹) and 2,2'-(((2-((2-aminoethyl)amino)ethyl)imino)methylene)diphenol (**HL**²).

The symmetrical ligands were synthesized by condensation reactions between benzaldehyde, 4-hydroxybenzophenone and 3- and 4-methoxybenzaldehyde with the aliphatic amine diethylenetriamine, resulting in the formation, respectively, of the symmetrical tridentated ligands trihydrochloride *N*¹-benzyl-*N*²-(2-(benzylamino)ethyl)ethane-1,2-diamine (**HL**³), 4,4'-(((azanodibis(ethane-2,1-diyl))bis(azanediil))bis(phenylmetileno))diphenol (**HL**⁴), trihydrochloride *N*¹-(4-methoxybenzyl)-*N*²-(2-((4-methoxybenzyl)amino)ethyl)ethane-1,2-diamine (**HL**⁵) and trihydrochloride *N*¹-(3-methoxybenzyl)-*N*²-(2-((3-methoxybenzyl)amino)ethyl)ethane-1,2-diamine (**HL**⁶).

Complexation reactions were carried out using Re^I and Tc^I as metal precursors. The complex [Re(CO)₅Br] was used as Re^I precursor. Neutral complexes of the type **fac**-[Re(CO)₃(L¹)] and cationic complexes of the type **fac**-[Re(CO)₃(**HL**^{2,3,4,5,6})]Br were obtained. The ligands and complexes were characterized by melting point, elemental analysis (CHN), infrared absorption spectroscopy, UV-visible absorption spectroscopy, ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry (MS-ESI) and for the complexes with the ligands **HL**^{1,2,5,6}, single crystal X ray diffraction method.

Labeling studies were carried out for the **HL**³ ligand with the complex **fac**-[[^{99m}Tc](H₂O)(CO)₃]⁺, forming the complex **fac**-[[^{99m}Tc](CO)₃(**HL**³)]Br and other species in solution, which were separated by high performance liquid chromatography (HPLC). Additionally, a comparative study was done between the conventional (heating) and the synthesis method using microwaves. The technetium complex was characterized by HPLC and electrophoresis on paper. Stability tests were conducted on cysteine, histidine and PBS buffer.

The stability tests showed that the compound presents good stability over a 3 hour period. The lipophilic character of the complex was confirmed by the determination of the partition coefficient. In addition, *In vitro* biological tests of captation and influx were performed on B16F10 cells (murine melanoma). The cells captured around 4.2% of the complex ***fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br** and retained 20% of the amount inside after 60 minutes of incubation. The Trypan blue exclusion test of cell viability showed stability of the cells during the influx and captation experiments, front of the radioactive species, showing cell viability greater than 90% in all cases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de radiação: a) partículas α e β e b) raios γ .	1
Figura 2. Ilustração do poder de penetração das partículas α , β e dos raios γ .	2
Figura 3. Ligantes bifuncionais DTPA, DOTA e SAR utilizados com ^{99m}Tc na síntese dos radiofármacos da segunda geração.	4
Figura 4. Representação esquemática de um radiofármaco da 3ª geração (BFC = agente quelante bifuncional).	5
Figura 5. Exemplos de imagens obtidas por tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (MRI), ultra-som, tomografia de emissão de pósitron (PET), tomografia mediada por fluorescência (FMT), microscopia de fibra óptica e tomografia de emissão de fóton único (SPECT).	7
Figura 6. Planos do corpo humano.	9
Figura 7. Representação de uma imagem gerada por SPECT e PET.	10
Figura 8. Diagrama de decaimento do ^{99}Mo a ^{99m}Tc .	14
Figura 9. Produção do radiofármaco através dos "instant kits".	14
Figura 10. Radiofármacos de ^{99m}Tc da primeira geração: (A) Cardiolite®; (B) Ceretec®; (C) Technescan®.	16
Figura 11. Esquema de reação do do composto $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$.	17
Figura 12. Estrutura geral de uma Base de Schiff.	18
Figura 13. Exemplo de complexo de tecnécio com base de Schiff tetradentada: $^{99m}\text{Tc}(\text{III})$ -furifosmin.	19
Figura 14. Exemplos de reações de bioconjugação: (A) reação de acoplamento de peptídeo padrão entre um ácido carboxílico e uma amina primária com um reagente de acoplamento; (B e C) reações de acoplamento peptídico entre ésteres ativados de tetrafluorofenilo (TFP) ou N-hidroxissuccinimida (NHS) e uma amina primária; (D) formação da ligação da tiouréia entre o isotiocianato e uma amina primária; (E) formação da ligação do tioéter entre a maleimida e um tiol; (F) Cu (I) catalizando a cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, entre uma azida e um alcino ("reação clique"); e (G) "reação click" de deformação promovida Diels-Alder" entre um e tetrazina e o transcicloocteno.	22
Figura 15. Esquema de reação do complexo de ^{188}Re com o ligante MAG3 e o anticorpo monoclonal (MAb).	23

Figura 16. Comparação qualitativa do tamanho entre o precursores organometálicos $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (esquerda) e o Tc-MAG3 (direita). (Roxo = Tc, vermelho = oxigênio, Cinza = carbono, azul = nitrogênio, amarelo = enxofre. Os hidrogênios foram omitidos).....	24
Figura 17. Síntese do ligante HL^1	29
Figura 18. Síntese do ligante HL^2	29
Figura 19. Síntese do ligante HL^3	31
Figura 20. Síntese do ligante HL^4	32
Figura 21. Síntese dos ligantes HL^5 e HL^6	33
Figura 22. Síntese do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$	34
Figura 23. Síntese do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$	35
Figura 24. Síntese do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$	36
Figura 25. Síntese do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$	36
Figura 26. Síntese dos complexos $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ e $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$	37
Figura 27. Ilustração de um hematocítômetro, no qual são contadas as células presentes apenas nos quadrantes vermelhos.....	43
Figura 28. Visor do aparelho de microondas (Discover, CEM Focused Microwave TM Synthesis System) mostrando os ciclos de aquecimento durante a síntese.....	45
Figura 29. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante HL^1 (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$ (azul).....	51
Figura 30. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante HL^2 (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ (azul).....	53
Figura 31. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante HL^3 (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ (azul).....	54
Figura 32. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante HL^4 (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ (azul).....	55
Figura 33. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante HL^5 (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ (azul).....	56

Figura 34. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante HL ⁶ (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ (azul).....	57
Figura 35. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL ¹ e do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$ em metanol à 25 °C.	60
Figura 36. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$ na concentração $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.....	61
Figura 37. a) Espectros de absorbância vs. comprimento de onda do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$ em diferentes concentrações em metanol; b) Curva de regressão linear para determinação do coeficiente de absortividade molar do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$ em metanol com $\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ nm}$ e caminho óptico de 1 cm à 25 °C.	61
Figura 38. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL ² e do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ em etanol à 25 °C.....	62
Figura 39. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ na concentração $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.....	62
Figura 40. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL ³ e do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ em etanol/água (1:1) à 25 °C.....	64
Figura 41. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ na concentração $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol/água à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.....	64
Figura 42. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL ⁴ e do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ em metanol à 25 °C.	65
Figura 43. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ na concentração $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.....	65
Figura 44. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL ⁵ e do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ em água à 25 °C.....	66
Figura 45. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ na concentração $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em água à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.....	66
Figura 46. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL ⁶ e do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ em água à 25 °C.....	67

Figura 47. Ampliação do espectro de absorvância vs. comprimento de onda do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br na concentração 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em água à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.....	67
Figura 48. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o ligante HL ¹ : (–) experimental e (–) simulado.	69
Figura 49. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o ligante HL ² : (–) experimental e (–) simulado.	69
Figura 50. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o ligante HL ³ : (–) experimental e (–) simulado.	70
Figura 51. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o ligante HL ⁴ : (–) experimental e (–) simulado.	70
Figura 52. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o ligante HL ⁵ : (–) experimental e (–) simulado.	71
Figura 53. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o ligante HL ⁶ : (–) experimental e (–) simulado.	71
Figura 54. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)]: (–) experimental e (–) simulado.....	72
Figura 55. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br: (–) experimental e (–) simulado.	72
Figura 56. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br: (–) experimental e (–) simulado.....	73
Figura 57. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br: (–) experimental e (–) simulado.....	73
Figura 58. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br: (–) experimental e (–) simulado.....	74
Figura 59. Espectro de massas ESI-MS [M+H] ⁺ para o complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br: (–) experimental e (–) simulado.	74
Figura 60. Ligante HL ⁴ (simétrico) e fragmento assimétrico com m/z = 286,19095. .	75
Figura 61. Estrutura molecular do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)].....	76
Figura 62. Estrutura molecular do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br.....	81
Figura 63. Estrutura molecular do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br.....	81
Figura 64. Ligações de hidrogênio presentes na estrutura cristalina do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br.....	82
Figura 65. Estrutura molecular do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br.....	83

Figura 66. Ligações de hidrogênio presentes na estrutura cristalina do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br.	83
Figura 67. Espectro de RMN ¹ H do ligante HL ¹ em CD ₃ OD, 400 MHz.	85
Figura 68. Espectro de RMN ¹ H do ligante HL ² em CD ₃ OD, 400 MHz.	86
Figura 69. Espectro de RMN ¹ H do ligante HL ³ em D ₂ O, 400 MHz.	87
Figura 70. Espectro de RMN ¹ H do ligante HL ⁴ em DMSO, 400 MHz.	88
Figura 71. Espectro de RMN ¹³ C do ligante HL ⁴ em DMSO, 400 MHz.	89
Figura 72. Espectro de DEPT 90 do ligante HL ⁴ em DMSO, 400 MHz.	91
Figura 73. Espectro de DEPT 135 do ligante HL ⁴ em DMSO, 400 MHz.	92
Figura 74. Espectro de RMN ¹ H do ligante HL ⁵ em D ₂ O, 500 MHz.	93
Figura 75. Espectro de RMN ¹ H do ligante HL ⁶ em D ₂ O, 500 MHz.	94
Figura 76. Espectro de RMN de ¹ H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)] em CD ₃ OD, 400 MHz.	96
Figura 77. Espectro de RMN de ¹³ C dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)] em CD ₃ OD, 400 MHz.	97
Figura 78. Expansão do espectro de massa ESI(+) do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)].	99
Figura 79. Expansão do espectro de massa ESI(+) do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)].	99
Figura 80. Exemplos de complexos diméricos de Re(I).	100
Figura 81. Representação Estrutural dos complexos diméricos (1d-4d) e monoméricos (1m-4m) investigados no estudo de Zhao <i>et al.</i> , 2013.	101
Figura 82. Complexo dimérico de Re(I) obtido com o ligante 5-fluoro-8-quinolino em tolueno.	101
Figura 83. Proposta de fórmula estrutural do dímero do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)].	102
Figura 84. Espectro de RMN de ¹ H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br em CD ₃ OD, 500 MHz.	103
Figura 85. Espectro de RMN de ¹³ C dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br em CD ₃ OD, 500 MHz.	104
Figura 86. Expansão do espectro de massa ESI(+) do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br.	105
Figura 87. Expansão do espectro de massa ESI(+) do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br.	106
Figura 88. Espectro de RMN de ¹ H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br em CD ₃ OD, 400 MHz.	107

Figura 89. Espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br em CD ₃ OD, 400 MHz.	108
Figura 90. Espectro de RMN de ^1H do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br em CD ₃ OD, 500 MHz.	110
Figura 91. Espectro de RMN de ^{13}C do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br em CD ₃ OD, 500 MHz.	111
Figura 92. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)] em CD ₃ OD à -10, 25 e 60 °C.	113
Figura 93. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)] em CD ₃ OD à -10, 25 e 60 °C na região dos aromáticos.	114
Figura 94. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br em CD ₃ OD à -10, 25 e 60 °C.	115
Figura 95. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br em CD ₃ OD à -10, 25 e 60 °C na região dos aromáticos.	115
Figura 96. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br em CD ₃ OD à -10, 25 e 60 °C na região dos metilenos.	116
Figura 97. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br em CD ₃ OD à -10, 25 e 60 °C.	117
Figura 98. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br em CD ₃ OD à -10, 25 e 60 °C na região dos aromáticos.	117
Figura 99. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br em CD ₃ OD à -10, 25 e 60 °C na região dos metilenos.	118
Figura 100. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br em CD ₃ OD à -10, 25 e 60 °C.	119
Figura 101. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br em CD ₃ OD à -10, 25 e 60 °C na região dos aromáticos.	119
Figura 102. Espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br em DMSO, 400 MHz.	121
Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br em DMSO, 400 MHz.	123
Figura 104. Espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br em DMSO, 500 MHz.	124
Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br em DMSO, 400 MHz.	126

Figura 106. Ilustração dos cortes realizados nas fitas cromatográficas de papel Whatman 1 e TLC-Al ₂ O ₃ e da cuba cromatográfica.	128
Figura 107. Radiocromatogramas: a) [^{99m} Tc]O ₄ ⁻ e b) <i>fac</i> -[[^{99m} Tc](H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺ por CLAE, utilizando coluna de C18 (4,6x250 mm, 4 µm) da Phenomenex com fase móvel composta de (A) solução aquosa de TFA 0,05 % e (B) acetonitrila, utilizando o seguinte processo: 80 % da fase (A) de 0 a 1 minuto, gradiente linear de 1 a 10 minutos, partindo de 80 % da fase (A) até atingir a proporção 20:80 % (A:B), depois segue em modo isocrático de 10 a 25 minutos com a mesma proporção, e de 25 a 30 minutos retorna à condição inicial, com fluxo de 1 mL/min.	130
Figura 108. Radiocromatograma por CLAE para o complexo <i>fac</i> -[[^{99m} Tc](CO) ₃ (HL ³)]Br, utilizando coluna de C18 (4,6x250 mm, 4 µm) da Phenomenex com fase móvel composta de (A) solução aquosa de TFA 0,05 % e (B) acetonitrila, utilizando o seguinte processo: 80 % da fase (A) de 0 a 1 minuto, gradiente linear de 1 a 10 minutos, partindo de 80 % da fase (A) até atingir a proporção 20:80 % (A:B), depois segue em modo isocrático de 10 a 25 minutos com a mesma proporção, e de 25 a 30 minutos retorna à condição inicial, com fluxo de 1 mL/min.	133
Figura 109. Representação do complexo <i>mer,cis</i> -[Re(tpy-κ ³ N)(CO) ₂ Cl], onde tpy = terpiridina.....	134
Figura 110. Imagem especular de um complexo octaédrico de Tc "quiral". A face octaedral definido pelos três grupos CO aparece em cinza e a centróide destacada como um pequeno círculo.	135
Figura 111. Complexo contendo o fragmento <i>fac</i> -[[^{99m} Tc] ^I (CO) ₃ L], com L = derivado do feniltropano.....	136
Figura 112. Possíveis arranjos espaciais para o complexo <i>fac</i> -[[^{99m} Tc](CO) ₃ (HL ³)]Br.	136
Figura 113. Estereoquímica dos diastereoisômeros para complexos do tipo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ L], com L = moléculas derivadas da histidina.	137
Figura 114. Análise por CLAE da injeção simultânea dos complexos: a) <i>fac</i> -[[^{99m} Tc](CO) ₃ (HL ³)]Br e b) <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br com detecção no ultravioleta (256 nm) e no contador de cintilação, respectivamente.	138
Figura 115. Perfil eletroforético do complexo aniônico de [^{99m} Tc]O ₄ ⁻ obtidos de corrida em papel Whatman 1, em solução eletrolítica de metanol: PBS 0,025 M, pH=7,5 (1:1) submetido à tensão de 264 V por 2 horas.....	139

Figura 116. Perfil eletroforético da espécie 1, espécie 2 e do complexo <i>fac</i> - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ obtidos de corrida em papel Whatman 1, em solução eletrolítica de metanol: PBS 0,025 M, pH=7,5 (1:1) submetido à tensão de 264 V por 2 horas.	140
Figura 117. Estrutura química dos aminoácidos cisteína e histidina e do peptídeo glutathiona.....	143
Figura 118. Radiocromatogramas: a) complexo marcado com histidina, <i>fac</i> - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{his})]^+$; complexo <i>fac</i> - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ incubado em presença de histidina por: b) 1 hora, c) 3 horas e d) 6 horas.	145
Figura 119. Radiocromatogramas: a) complexo marcado com a cisteína, <i>fac</i> - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{cys})]^+$; complexo <i>fac</i> - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ incubado em presença de cisteína por: b) 1 hora, c) 3 horas e d) 6 horas.....	146
Figura 120. Radiocromatogramas do complexo <i>fac</i> - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ incubados em PBS por: a) 1 hora, b) 3 horas e c) 6 horas.	148
Figura 121. Avaliação da captação: a) espécie 1 e b) complexo <i>fac</i> - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ em células B16F10 em meio de cultura, mantidas a 37 °C, em função do tempo.....	150
Figura 122. Avaliação da efluxo: a) espécie 1 e b) complexo <i>fac</i> - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{L}^3)]$ em células B16F10 em meio de cultura com SFB, mantidas a 37 °C em função do tempo.	151
Figura 123. Radiocromatogramas do complexo <i>fac</i> - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ sintetizado em microondas por: a) 1 minuto, b) 3 minutos e c) 5 minutos.....	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características relevantes de algumas técnicas de imagem disponíveis	6
Tabela 2. Principais radionuclídeos usados em SPECT e PET ¹⁸	8
Tabela 3. Principais radionuclídeos usados em terapia	12
Tabela 4. Estado físico, cor, rendimento e ponto de fusão dos ligantes e complexos	47
Tabela 5. Análise elementar (CHN) dos ligantes e complexos.....	48
Tabela 6. Atribuição-tentativa para as bandas nos espectros na região do infravermelho em cm ⁻¹ para os ligantes e os seus respectivos complexos feitas em pastilhas de KBr[71–81]	50
Tabela 7. Máximos de absorção na região do ultravioleta-visível e coeficientes de extinção molar calculados para o ligante e o seu respectivo complexo e atribuições-tentativas para as transições eletrônicas de acordo com a literatura[73–77,79–81].	59
Tabela 8. Valores de m/z (calculado e experimental) dos ligantes e complexos de rênio	68
Tabela 9. Comprimentos de ligação selecionados (Å) e ângulos (°) em <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)].....	77
Tabela 10. Dados cristalográficos de raios X e resultados dos refinamentos das estruturas dos complexos <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)], <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br, <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br e <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br	78
Tabela 11. Comprimentos de ligação selecionados (Å) e ângulos (°) em <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br.....	81
Tabela 12. Comprimentos de ligação selecionados (Å) e ângulos (°) em <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br.....	82
Tabela 13. Comprimentos de ligação selecionados (Å) e ângulos (°) em <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br.....	84
Tabela 14. Informações do espectro de RMN de ¹ H do ligante HL ¹ em CD ₃ OD, 400 MHz.....	85
Tabela 15. Informações do espectro de RMN de ¹ H do ligante HL ² em CD ₃ OD, 400 MHz.....	86
Tabela 16. Informações do espectro de RMN de ¹ H do ligante HL ³ em D ₂ O, 400 MHz	87

Tabela 17. Informações do espectro de RMN de ^1H do ligante ligante HL^4 em DMSO, 400 MHz.....	88
Tabela 18. Informações do espectro de RMN de ^{13}C do ligante HL^4 em DMSO, 400 MHz.....	90
Tabela 19. Informações do espectro de DEPT 90 do ligante HL^4 em DMSO, 400 MHz	91
Tabela 20. Informações do espectro de DEPT 135 do ligante HL^4 em DMSO, 400 MHz.....	92
Tabela 21. Informações do espectro de RMN de ^1H do ligante ligante HL^5 em D_2O , 500 MHz.....	94
Tabela 22. Informações do espectro de RMN de ^1H do ligante ligante HL^6 em D_2O , 500 MHz.....	95
Tabela 23. Informações do espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$ em CD_3OD , 400 MHz.....	96
Tabela 24. Informações do espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$ em CD_3OD , 400 MHz.....	98
Tabela 25. Informações do espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ em CD_3OD , 500 MHz.....	103
Tabela 26. Informações do espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ em CD_3OD , 500 MHz.....	105
Tabela 27. Informações do espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ em CD_3OD , 400 MHz.....	107
Tabela 28. Informações do espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ em CD_3OD , 400 MHz.....	109
Tabela 29. Informações do espectro de RMN de ^1H do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ em CD_3OD , 500 MHz.....	110
Tabela 30. Informações do espectro de RMN de ^{13}C do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ em CD_3OD , 500 MHz.....	112
Tabela 31. Informações do espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$, 400 MHz	121
Tabela 32. Informações do espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ em DMSO, 400 MHz.....	123
Tabela 33. Informações do espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ em DMSO, 500 MHz.....	125

Tabela 34. Informações do espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo <i>fac</i> - $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ em DMSO, 400 MHz.....	126
Tabela 35. Porcentagem das espécies radioativas nos cortes das fitas analisadas detector de radiação do tipo poço.	129
Tabela 36. Tempos de retenção (rf) e concentração das espécies radioativas dos complexos $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ e <i>fac</i> - $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$	131
Tabela 37. Porcentagem das espécies radioativas nos cortes das placas de TLC-SG analisadas no detector de radiação do tipo poço	132
Tabela 38. Tempos de retenção (rf) e concentração das espécies radioativas dos complexos	133
Tabela 39. Valores dos coeficientes de partição (logP), como média $\pm$ desvio padrão (DP) das três amostras	142
Tabela 40. Porcentagem de células viáveis (células B16F10) nos experimentos de captação e efluxo frente à espécie 1 e ao complexo <i>fac</i> - $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$	152

LISTA DE ABREVIATURAS

HL¹	2,2'-(((2-aminoetil)imino)metileno)difenol
HL²	2,2'-(((2-((2-aminoetil)amino)etil)imino)metileno)difenol
HL³	Tricloridrato de <i>N</i> ¹ -benzil- <i>N</i> ² -(2-(benzilamino)etil)etano-1,2-diamina
HL⁴	4,4'-(((azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(azanedil))bis(phenilmetileno))difenol
HL⁵	Tricloridrato de <i>N</i> ¹ -(4-metoxibenzil)- <i>N</i> ² -(2-((4-metoxibenzil)amino)etil)etano-1,2-diamina
HL⁶	Tricloridrato de <i>N</i> ¹ -(3-metoxibenzil)- <i>N</i> ² -(2-((3-metoxibenzil)amino)etil)etano-1,2-diamina
PET	Tomografia por emissão de pósitron (do inglês, <i>Position Emission Tomography</i>)
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (do inglês <i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>)
UV-vis	Espectroscopia de absorção eletrônica da região do ultravioleta visível
RMN	Ressonância magnética nuclear
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
DRX	Difração de raios X em monocristal
MS-ESI	Espectrometria de massas com ionização eletrospray
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CCD	Cromatografia em camada delgada
s	Simpleto
J	Constante de acoplamento escalar
v	Vibração de estiramento
δ	Deformação angular
ε	Coeficiente de extinção molar
RPMI	Meios Roswell Park Memorial Institute (meios para culturas <i>in vitro</i> de células humanas saudáveis e neoplásicas)
PBS	Tampão fosfato (Phosphate buffered saline)

LET	Energia de transferência linear (Linear Energy Transfer)
BFC's	Agente quelantes bifuncionais (bifunctional chelators)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Medicina Nuclear: Radiação, Radionuclídeos e Radiofármacos.....	1
1.2 Diagnóstico <i>versus</i> terapia.....	5
1.3 Rênio e Tecnécio	12
1.4 Bases de Schiff e ligantes triaminas	18
1.5 Bioconjugação.....	20
2 OBJETIVOS	25
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.1 Reagentes.....	26
3.2 Instrumentação	26
3.2.1 Análise Elementar (C, H, N).....	26
3.2.2 Espectroscopia de Absorção na região do infravermelho (IV)	27
3.2.3 Espectroscopia de Absorção na região do UV-vis	27
3.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	27
3.2.5 Difração de Raios X em Monocristal.....	27
3.2.6 Espectrometria de Massas	28
3.3 Sínteses dos Compostos	28
3.3.1 Síntese dos ligantes.....	28
3.3.1.1 Síntese do ligante assimétrico HL ¹	28
3.3.1.2 Síntese do ligante assimétrico HL ²	29
3.3.1.3 Síntese do ligante simétrico HL ³	30
3.3.1.4 Síntese do ligante simétrico HL ⁴	31
3.3.1.5 Síntese dos ligantes simétricos HL ⁵ e HL ⁶	32
3.3.3 Síntese dos complexos contendo <i>fac</i> -{Re(CO) ₃ } ⁺	34
3.3.3.1 Síntese do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)]	34
3.3.3.2 Síntese do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br	35
3.3.3.3 Síntese do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br	35

3.3.3.4 Síntese do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br	36
3.3.3.5 Síntese do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br e <i>fac</i> - [Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br	37
3.3.4 Síntese dos complexos de ^{99m} Tc	37
3.3.4.1 Síntese do complexo precursor [^{99m} Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺	37
3.3.4.2 Síntese do complexo <i>fac</i> -[[^{99m} Tc](CO) ₃ (HL ³)]Br	38
3.3.5 Avaliação da eficiência de marcação e da pureza radioquímica	38
3.3.5.1 Cromatografia camada delgada (CCD) e de papel para o complexo precursor e dos complexos marcados com ^{99m} Tc	38
3.3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	39
3.3.6 Eletroforese em papel do complexo <i>fac</i> -[[^{99m} Tc](CO) ₃ (HL ³)]Br	40
3.3.7 Determinação do coeficiente de partição	40
3.3.8 Avaliação da estabilidade <i>in vitro</i> do complexo <i>fac</i> -[[^{99m} Tc](CO) ₃ (HL ³)]Br em presença de cisteína ou histidina	40
3.3.9 Avaliação da estabilidade <i>in vitro</i> do complexo <i>fac</i> -[[^{99m} Tc](CO) ₃ (HL ³)]Br em presença do tampão PBS	41
3.3.10 Avaliação <i>in vitro</i> da captação celular do complexo <i>fac</i> -[[^{99m} Tc](CO) ₃ (HL ³)]Br	41
3.3.10.1 Cultura de células B16F10	41
3.3.10.2 Captação em células B16F10	42
3.3.10.3 Efluxo em células B16F10	42
3.3.11 Viabilidade celular por azul de Tripán	43
3.3.12 Síntese do complexo <i>fac</i> -[[^{99m} Tc](CO) ₃ (HL ³)]Br por microondas	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Síntese e caracterização dos ligantes e complexos de rênio	46
4.1.1 Características dos compostos, rendimento e ponto de fusão	46
4.1.2 Análise Elementar	47
4.1.3 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho	48
4.1.4 Espectroscopia eletrônica na região do UV-visível	57
4.1.5 Espectrometria de massas	68
4.1.6 Difração de Raios X em Monocristal	76

4.1.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	84
4.1.7.1 RMN ^1H dos ligantes.....	84
4.1.7.2 RMN de ^1H e ^{13}C dos complexos.....	95
4.2 Síntese, caracterização e testes biológicos com o complexo <i>fac</i> - [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](CO) $_3$ (HL 3)]Br	127
4.2.1 Síntese do complexo precursor <i>fac</i> -[[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](H $_2$ O) $_3$ (CO) $_3$] $^+$ e avaliação da pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	127
4.2.2 Avaliação da eficiência de marcação do complexo <i>fac</i> - [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](CO) $_3$ (HL 3)]Br por CCD e CLAE	131
4.2.3 Eletroforese em papel do complexo <i>fac</i> -[[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](CO) $_3$ (HL 3)]Br	138
4.2.4 Determinação do coeficiente de partição do complexo <i>fac</i> - [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](CO) $_3$ (HL 3)]Br	141
4.2.5 Estabilidade <i>in vitro</i> dos complexos <i>fac</i> -[[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](CO) $_3$ (HL 3)]Br na presença de cisteína ou histidina	142
4.2.6 Estabilidade <i>in vitro</i> do complexo <i>fac</i> -[[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](CO) $_3$ (HL 3)]Br na presença de tampão PBS.....	147
4.2.7 Captação do complexo <i>fac</i> -[[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](CO) $_3$ (HL 3)]Br em células B16F10	149
4.2.8 Efluxo do complexo <i>fac</i> -[[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](CO) $_3$ (HL 3)]Br em células B16F10.....	150
4.2.9 Viabilidade celular por azul de tripan	152
4.2.10 Avaliação da eficiência de marcação do complexo <i>fac</i> - [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](CO) $_3$ (HL 3)]Br por microondas.....	153
5 CONCLUSÕES	156
6 REFERÊNCIAS.....	158

1 INTRODUÇÃO

1.1 Medicina Nuclear: Radiação, Radionuclídeos e Radiofármacos

A Medicina Nuclear consiste numa especialidade médica que utiliza radionuclídeos para os procedimentos de imagens e terapia[1]. Entende-se por nuclídeo um átomo caracterizado pelo seu número de prótons e nêutrons no seu núcleo[2]. Se for levado em conta os isótopos dos 103 elementos presentes na tabela periódica, o número total de nuclídeos ultrapassa 1900; sendo que desses, apenas 266 são estáveis[2]. Quando um nuclídeo é instável, o mesmo decai espontaneamente para uma forma mais estável, emitindo certa quantidade de radiação, na forma de partículas α , β , raios γ , neutrinos, nêutrons e pósitrons[3–5]. Nesse caso, esse nuclídeo passa a ser designado por radionuclídeo (**Figura 1**).

Figura 1. Tipos de radiação: a) partículas α e β e b) raios γ .

Fonte: Adaptado de <<http://scienceblogs.com/startswithabang/2013/11/13/binding-energy-nuclear-physics-and-radiation-poisoning/>> Acesso em 17 de novembro de 2015.
<<http://revisionworld.com/gcse-revision/physics/radioactivity/alpha-beta-and-gamma>> Acesso em 17 de novembro de 2015.

A radiação pode ser definida como a propagação da energia através do espaço, podendo ser particulada (partículas α e β) ou eletromagnética (raios γ e raios X)[2]. Esses tipos de radiação podem penetrar os materiais de diferentes maneiras. Quanto mais espesso é o material, mais radiação é absorvida[6], mas a espessura e tipo de material absorvente a ser utilizado, vai depender do tipo de radiação.

Uma partícula alfa é uma partícula “pesada”, constituída de dois prótons e dois nêutrons, semelhante ao núcleo do átomo de hélio duplamente ionizado (**Figuras 1a**)[2,6]. Ela possui uma velocidade média lenta (20 000 km/s, ou seja, 5% da velocidade da luz), o que justifica, em parte o seu baixo poder de penetração, não atravessando nem mesmo uma folha de papel, roupas ou pele (**Figura 2**)[6,7]. Devemos lembrar ainda, que como possui carga positiva, vai interagindo (ionizando) com moléculas constituintes da atmosfera e perdendo energia cinética.

Figura 2. Ilustração do poder de penetração das partículas α , β e dos raios γ .

Fonte: <http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/aqa_pre_2011/radiation/radioactiver-ev3.shtml> Acesso em agosto de 2014.

As partículas β são elétrons emitidos em grande velocidade pelo núcleo de átomos instáveis, sendo que as partículas carregadas negativamente são chamadas de *négatron*s e as carregadas positivamente são chamadas de *pósitron*s (**Figura 1b**)[2,7]. Esse tipo de radiação tem um poder de penetração intermediário, atingindo velocidade entre 100.000 e 290.000 km/s (95% da velocidade da luz), podendo ser interrompida por uma folha fina de alumínio ou acrílico[6,7]. Todavia, o pósitron, com sua carga positiva, ao chocar-se com um elétron durante sua trajetória, faz com que as duas partículas (e^-/e^+) sejam aniquiladas e emitam radiação gama, sendo

necessário utilizar blocos de chumbo para barrar a radiação. Assim, os átomos que emitem nêutron são utilizados para fins terapêuticos, enquanto os emissores de pósitron são utilizados para diagnóstico.

Já os raios gama são radiações eletromagnéticas emitidas por radionuclídeos imediatamente após a saída das partículas α ou β , não possuindo massa ou carga (**Figura 1c**)[2,7]. A radiação γ é a mais penetrante, pois como não possui carga elétrica, não sofre interferência dos elétrons e prótons dos átomos dos materiais que atravessa, podendo ser parada por vários centímetros de chumbo ou por muitos metros de concreto[2,6,7].

Quando radionuclídeo são incorporados à moléculas ou usados na sua forma elementar, mas apresentam características que permitam ser administrada em seres humanos, essas espécies são chamadas de radiofármacos. O mecanismo de ação depende do fator decaimento, que vai permitir utilizar o radiofármaco para fins diagnóstico e terapêutico, enquanto a molécula orgânica ou a forma elementar em que se encontra o radionuclídeo vai direcionar para qual órgão ou sistema biológico as moléculas serão direcionadas [4,8,9]. Dentre os radionuclídeos existentes, poucos combinam as características de decaimento físicas com as características biológicas desejáveis para se tornarem radiofármacos[10].

Alguns fatores devem ser considerados no desenvolvimento de um novo radiofármaco, tais como: relação estequiométrica entre radiometal e ligante, carga e tamanho da molécula, ligação com as proteínas, solubilidade, estabilidade e biodistribuição[4]. Dependendo dos critérios de concepção e biodistribuição, os radiofármacos até hoje desenvolvidos são classificados em três gerações. Os agentes de primeira geração eram moléculas simplesmente marcadas entregues à órgãos alvos específicos por um mecanismo de localização do substrato não-específico ou partículas que podiam explorar processos fisiológicos normais no corpo[9]. Por isso, os radiofármacos da primeira geração são conhecidos como *essenciais*, pois os sistemas ligantes eram biologicamente inativos sem o centro metálico[11]. Como exemplo podemos citar os complexos de tecnécio marcado com o ligantes MIBI (metoxiisobutylisonitrila) e HMPAO (hexametilpropilenoaminooxima), que possuem os nomes comerciais, respectivamente, Cardiolite® e Ceretec®, utilizados como agentes de imagem para o coração e fluxo sanguíneo no cérebro[11].

Na década de 80, surgiram os radiofármacos da segunda geração. Nessa classe de radiofármacos, a biodistribuição era determinada principalmente pelas suas propriedades físico-químicas, tais como lipofilicidade, massa molecular, forma e carga total[9,11]. Assim, através desses trabalhos surgiu o conceito de agentes quelantes bifuncionais (BFC's) no qual os ligantes não apenas se ligavam ao radionuclídeo, mas também poderiam ser modificados com grupos funcionais com o objetivo de controlar a biodistribuição[9]. Como exemplos de radiofármacos da segunda geração podemos citar os compostos contendo os núcleos de Tc(V)-oxo, que podiam ser modificados para influenciar a localização específica do local *in vivo*[9]. Nas últimas décadas, têm sido reportado um grande número de ligantes contendo ácidos poliaminopolicarboxílicos cíclicos e acíclicos para síntese de radiofármacos da primeira e segunda gerações[11]. Dentre os radiofármacos de tecnécio da segunda geração mais utilizados, podemos citar os complexos de ^{99m}Tc com os ligantes bifuncionais DTPA, DOTA e SAR (**Figura 3**)[11,12].

Figura 3. Ligantes bifuncionais DTPA, DOTA e SAR utilizados com ^{99m}Tc na síntese dos radiofármacos da segunda geração.

Fonte: Kühn *et al.*, 2014, p. 86.

Já os radiofármacos da terceira geração incorporam uma biomolécula com alta especificidade com o intuito de direcionar o radionuclídeo para o tecido ou órgão alvo, tanto para a terapia quanto para o diagnóstico[9,11]. Esse radiofármaco é elaborado através da chamada "abordagem bifuncional" e é composto de três partes: o radionuclídeo, a molécula bifuncional (BFC = bifunctional chelator) e o fragmento bioativo (**Figura 4**)[9,11,13]. O BFC fica entre o radionuclídeo e a biomolécula, coordenado-se fortemente ao íon metálico e liga-se covalentemente ao biovetor e, em alguns casos, pode ter um espaçador ou linker, que conecta o agente quelante à biomolécula[14]. Nesse caso, o biovetor atuará como um sistema de

entrega que transportará o radionuclídeo para o sítio receptor na célula doente^{5,7}. Como exemplos de biomoléculas podemos citar os anticorpos, peptídeos, proteínas e análogos de DNA[9,11,13].

Figura 4. Representação esquemática de um radiofármaco da 3ª geração (BFC = agente quelante bifuncional).

Fonte: Adaptado de Ramogida & Orvig, 2013, p.4723.

1.2 Diagnóstico *versus* terapia

Na medicina nuclear, a escolha do radionuclídeo é de fundamental importância, uma vez que são as suas características nucleares que determinam a sua aplicação para terapia ou diagnóstico[4]. Como parâmetros, podemos citar a natureza da radiação e/ou partículas emitidas, a sua energia, o período de semi-desintegração ($t_{1/2}$), a pureza radionuclídica com que podem ser obtidos e o seu custo/disponibilidade[4]. Na medicina nuclear, a maior parte dos radiofármacos (cerca de 95%) são utilizados no diagnóstico de doenças, enquanto o restante é usado para a terapia[2,4].

Em geral, os radiofármacos destinados para o diagnóstico são predominantemente complexos metálicos que possuem um agente quelante orgânico e que podem ter ainda uma biomolécula conjugada para direcionar o mesmo para um alvo específico[15]. Esses radiofármacos são utilizados em concentrações muito baixas (10^{-6} a 10^{-8} M) e proporcionam um método não-invasivo de avaliar o estágio da doença assim como monitorar o efeito do tratamento, sem possuir qualquer efeito farmacológico[15]. Uma das grandes vantagens da imagiologia molecular *in vivo* é sua capacidade de caracterizar tecidos doentes sem

biópsias invasivas ou procedimentos cirúrgicos, permitindo planejar um tratamento personalizado a ser aplicado no paciente[16].

Nos últimos anos, a Medicina Nuclear vem ganhando mais importância, principalmente no âmbito da imagiologia médica, no qual os vários sistemas de imagem diferem em cinco pontos principais:

- a energia utilizada para obter informações visuais, dependendo de qual componente do espectro de radiação eletromagnética é utilizada na geração de imagens (raios X, pósitrons, fótons ou ondas sonoras);
- a resolução espacial que é alcançada (macroscópico, mesoscópico ou microscópica);
- o tipo de informação que é obtida (anatômica, fisiológica, celular ou molecular).
- a profundidade da penetração;
- a disponibilidade das sondas moleculares injetáveis /biocompatíveis[17,18]. Algumas dessas informações estão agrupadas na
- **Tabela 1.**

Tabela 1. Características relevantes de algumas técnicas de imagem disponíveis

Técnica	Faixa do espectro eletromagnético usado na geração da imagem	Resolução Espacial	Profundidade	Quantidade da sonda molecular a ser utilizada	Alvo
PET	alta energia, raios γ	2 – 4 mm	sem limites	nanogramas	fisiológico e molecular
SPECT	baixa energia, raios γ	6 – 8 mm	sem limites	nanogramas	fisiológico e molecular
Ressonância Magnética (MRI)	ondas de rádio	25 - 100 μm	sem limites	microgramas a miligramas	anatômico, fisiológico e molecular
Tomografia Computadorizada (TC)	Raios X	50 - 200 μm	sem limites	não-aplicável	anatômico e fisiológico
Ultra-som	alta frequência sonora	50 - 500 μm	milímetros a centímetros	microgramas a miligramas	anatômico e fisiológico

Fonte: Adaptado de: Weissleder & Pittet, 2008, p. 582; Massoud, 2003, p. 550.

Em relação aos sistemas de imagem macroscópicos, no qual é possível obter informações anatômicas e fisiológicas e que têm o seu uso clínico e pré-clínico bem difundido, podemos citar a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética (MRI) e o ultra-som[17] (**Figura 5**). Já em relação aos sistemas que obtêm informações moleculares e que ainda estão em desenvolvimento, somente alguns estão em uso clínico e pré-clínico, no qual podemos citar a tomografia de emissão de pósitron (PET), tomografia de emissão de fóton único (SPECT), tomografia mediada por fluorescência (FMT) e microscopia de fibra óptica, dentre outras[17] (**Figura 4**).

Figura 5. Exemplos de imagens obtidas por tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (MRI), ultra-som, tomografia de emissão de pósitron (PET), tomografia mediada por fluorescência (FMT), microscopia de fibra óptica e tomografia de emissão de fóton único (SPECT).

Fontes: Adaptado de: Weissleder & Pittet, 2008, p. 581; Dilworth & Parrott, S, 1998, p. 48.

Devido a capacidade de gerar imagens assim como monitorar a progressão do câncer de maneira não-invasiva, na medicina nuclear são utilizadas principalmente duas técnicas para a aquisição de imagem: a SPECT e a PET[14]. Em ambas as técnicas, o radionuclídeo é administrado no paciente, no qual a parte radioativa está ligada a um fragmento que o direcionará ao local do tumor[14]. O uso clínico da SPECT e PET depende de vários fatores, como o custo, a sensibilidade e resolução da técnica e da disponibilidade do radionuclídeo[14]. Para essas técnicas,

é desejável que o radionuclídeo possua algumas características, dentre as quais podemos citar:

- Mínimo de emissões de partículas;
- Energia dos fótons primários entre 50 e 500 keV;
- Meia-vida física maior do que o tempo necessário para preparar o material injetável e maior do que o tempo de exame;
- Forma química adequada e reatividade;
- Baixa toxicidade;
- Estabilidade ou quase estabilidade do produto[19].

Algumas dessas características estão dispostas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Principais radionuclídeos usados em SPECT e PET¹⁸

	Símbolo	$t_{1/2}$ (tempo de meia-vida)	Energia Aproximada
Radionuclídeos emissores de fótons para SPECT			Gama (keV)
Tecnécio-99m	$^{99m}_{43}\text{Tc}$	6 h	140
Iodo-131	$^{131}_{53}\text{I}$	8 dias	364
Galio-67	$^{67}_{31}\text{Ga}$	78.3	93, 184, 296, 388
Índio-111	$^{111}_{49}\text{In}$	67 h	173, 247
Radionuclídeos emissores de pósitrons para PET			Positron (MeV)
Carbono-11	$^{11}_6\text{C}$	20,3 min	0,960
Nitrogênio-13	$^{13}_7\text{N}$	10 min	1,198
Oxigênio-15	$^{15}_8\text{O}$	124 s	1,730
Fluor-19	$^{18}_9\text{F}$	110 min	0,634

Fonte: Adaptado de Metler *et al.*, 2013, p. 8.

Tanto na PET quanto na SPECT, é possível construir imagens no computador de cortes dos órgãos na transversal, sagital e no plano coronal, possibilitando visualizar o órgão em três dimensões (**Figura 6**)[2,20]. Ambas as técnicas utilizam detectores sensíveis capazes de coletar os raios emitidos pelos radiofármacos

injetados nos pacientes para criar mapas de distribuição celular e funcional[21]. Apesar da resolução espacial da ressonância magnética (MRI) e da tomografia computadorizada (CT) ser mais elevada, a sensibilidade de detecção de SPECT e PET é significativamente maior, podendo detectar as concentrações do marcador na escala nano ou até picomolar[22]. Outra vantagem é que é possível obter informações sobre a localização e a quantidade de receptores específicos ou locais de ligação no cérebro humano, o que não é possível por outras técnicas como por exemplo a ressonância magnética (MRI) e a tomografia computadorizada (CT)[21].

Figura 6. Planos do corpo humano.

Fonte: Adaptado de <http://es.slideshare.net/rosaitzelflores/biomecnica-38711943>. Acesso em 24 de maio de 2016.

A técnica SPECT requer radionuclídeos emissores de radiação γ , cujas emissões são registradas pelas câmeras gama (**Figura 7**). As câmeras gama são projetadas para detectarem a radiação em uma janela de energia específica (100 - 250 keV), sendo que os raios γ com energias que não estiverem nessa faixa de energia produzirão imagens de má qualidade[14]. Normalmente, as câmeras gama utilizadas na SPECT conseguem detectar os radioisótopos no interior do corpo em concentrações em torno de 10^{-6} M, embora os instrumentos mais modernos apresentem uma maior sensibilidade, detectando os mesmos em escala nano e até picomolar[14].

Figura 7. Representação de uma imagem gerada por SPECT e PET.

Fonte: Adaptado de Ramogida & Orvig, 2013, p. 4721.

Já a técnica PET requer um radionuclídeo emissor de pósitrons (β^+). O nuclídeo ao decair ejeta um pósitron do seu núcleo, que viaja uma curta distância antes de colidir com um elétron[14]. Ao colidirem, o pósitron e o elétron se aniquilam liberando dois fótons de radiação de aniquilamento na faixa dos raios γ , em direções opostas com uma energia de 511 keV (**Figura 5**)[14]. Em seguida, os raios γ irão viajar até encontrarem os detectores coincidentes do PET scanner, que ficam dispostos em um arranjo circular[14]. Para que a imagem seja gerada, os detectores coincidentes devem ser alcançados simultaneamente (essa faixa de coincidência vai de 5 a 15 ns)[14]. Os dados recolhidos nos diversos ângulos ao redor do eixo do corpo do paciente são utilizados para reconstruir a imagem da distribuição de atividade na parte analisada[4].

A PET apresenta uma resolução espacial maior (2 a 4 mm) que a SPECT (6 a 8 mm) e uma maior sensibilidade (maior que 10^{-12} M, quando comparado com a SPECT que é 10^{-6} M)[14,23]. A sensibilidade menor da SPECT pode ser explicada pela necessidade de colimadores no equipamento, a fim de rejeitar os fótons que estejam fora do ângulo de incidência[23]. Em compensação, devido ao tempo de

meia-vida mais longo dos radionuclídeos utilizados na SPECT, a técnica apresenta uma maior janela de observação, permitindo-se observar processos biológicos *in vivo* várias horas ou dias após a administração do radiofármaco[23].

Quando o objetivo é a terapia, o efeito da radiação é utilizado para destruir células tumorais[24,25]. A radionuclideoterapia envolve o uso de um radiofármaco que seletivamente se acumula no tecido canceroso, destruindo-o através da emissão de uma partícula α , β ou um elétron Auger[24]. Essas partículas possuem um pequeno poder de penetração, mas apresentam uma alta energia[24]. É desejável que o radiofármaco se acumule seletivamente no tecido doente, para que essas partículas não lesionem o tecido sadio[8]. A escolha dos radionuclídeos para aplicações terapêuticas é feita seguindo certos critérios, tais como a energia e o tipo da emissão de partículas, a atividade específica, o custo e a disponibilidade do radioisótopo e, principalmente, a meia-vida física[8].

A meia-vida física e a farmacocinética do radiofármaco devem coincidir, de tal maneira que se maximize a dose para o tecido doente e minimize a dose para o tecido saudável[8]. Em relação ao tipo e a energia da partícula a ser utilizada na terapia, pode-se dizer que a mesma esteja associada principalmente ao tamanho da lesão ou tumor[8]. Para tumores menores, radionuclídeos emissores β^- de baixa energia, como o ^{177}Lu , podem ter uma resposta melhor, enquanto para tumores maiores, emissores β^- de mais alta energia, como o ^{166}Ho , são mais indicados[8].

Dentre os radionuclídeos destinados à terapia, a maioria dos atualmente utilizados no tratamento do câncer são os radioisótopos emissores de radiação α e β , sendo os emissores β os mais utilizados[24,26]. Os nuclídeos emissores de radiação β possuem baixos valores de energia de transferência linear (LET) e uma faixa de penetração no tecido que vai de 1 a 10 mm, podendo assim serem aplicados no tratamento de pequenos até mesmo grandes aglomerados de células tumorais[24]. Uma vez que os radiofármacos se acumulem no tecido tumoral, os elétrons β ejetados interagem com os átomos, em especial com as moléculas de água, onde irão perder a sua energia, gerando átomos excitados e ionizados e também radicais livres[26]. São essas espécies formadas que irão causar danos no DNA das células, através de quebras da fita simples do DNA[26].

Já os nuclídeos emissores de radiação α apresentam características interessantes na sua aplicação como radionuclideoterápicos em lesões cancerosas pequenas e cânceres micrometastáticos[24]. Esses nuclídeos apresentam um tempo

de meia-vida curto e uma alta LET (80 keV/ μm), com uma limitada faixa de penetração nos tecidos que vai de 50 a 100 μm [24,26]. Devido a alta LET, os radiofármacos com radionuclídeos emissores α , precisam ser mais específicos que os emissores de β , para não irradiar tecidos saudáveis, e também entrar no interior das células, e não só no tecido celular pois o alcance das partículas é pequeno e as mesmas induzem a um quantidade maior de quebras irreparáveis da fita dupla do DNA e danos cromossômicos mais profundos do que os nuclídeos emissores β [26]. Alguns dos radioisótopos emissores de radiação α e β com aplicações terapêuticas na oncologia estão dispostos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Principais radionuclídeos usados em terapia

Radionuclídeos	Tipo de Emissão	$t_{1/2}$ (tempo de meia-vida)	E_{max} (keV)	Faixa de penetração
^{186}Re	β, γ (9,4%)	89,2 h	β : 1069	Máximo (5 mm)
^{188}Re	β, γ (15,1%)	17,0 h	β : 2120	Máximo (11 mm)
^{166}Ho	β, γ (6,7%)	26,9 h	β : 1853	Máximo (10,2 mm)
^{89}Sr	β	52,7 dias	1463	Máximo (3 mm)
^{32}P	β	14,3 dias	1710	Máximo (8,7 mm)
^{90}Y	β	64,1 h	2280	Máximo (12 mm)
^{225}Ac	α	10 dias	5830, 5792, 5790, 5732	40 – 80 mm
^{211}At	α	7,2 h	5870	60 – 80 mm
^{213}Bi	α	45,7 min	5869	50 – 80 mm

Fonte: Adaptada de Kamleh *et al.*, 2008, p. 1332.

1.3 Rênio e Tecnécio

Nas últimas décadas, drogas contendo metais de transição com atividade antitumoral têm desempenhado um papel importante como agentes terapêuticos em quimioterapia[27]. Dentre as drogas contendo metais de transição, a cisplatina e outros complexos contendo Pt^{II} continuam sendo as mais usadas e mais efetivas,

utilizadas em tratamentos, mas outros metais de transição têm também recebido especial atenção[27].

Dentre os metais do grupo 7 da tabela periódica, os elementos de número atômico 43 (tecnécio) e 75 (rênio) possuem uma rica química de coordenação, apresentando até oito diferentes estados de oxidação[28]. Os compostos com esses dois metais apresentam vários sistemas ligantes, alcançando desde doadores de elétrons, como os ligantes oxo ou imido, até sistemas com pronunciadas propriedades retrodoadoras como as carbonilas ou isocianatos[28]. Atualmente, o interesse na química de coordenação do tecnécio e do rênio é devido ao uso generalizado do radionuclídeo ^{99m}Tc em diagnóstico na medicina nuclear e também ao potencial dos radioisótopos ^{186}Re e ^{188}Re na radionuclideoterapia[29].

Quando se fala em radioisótopos com aplicação em diagnóstico de cânceres, o ^{99m}Tc é, sem sombra de dúvidas, o “carro-chefe” na medicina nuclear, sendo utilizado na SPECT[28]. O seu uso se deve principalmente às suas propriedades nucleares, pois como dito anteriormente, o ^{99m}Tc é um radioisótopo emissor de radiação γ , com uma energia de 140 keV e um $t_{1/2}$ de 6,01 h⁴.

O ^{99m}Tc é obtido através do decaimento do seu isótopo pai, o ^{99}Mo , que é um radioisótopo emissor β , com meia-vida de 66 horas, o qual decai por emissão de partículas β e raios γ de alta energia (740 keV), gerando o ^{99m}Tc (87 %) e o isômero ^{99}Tc (13 %), este último um emissor de radiação β , mas com um $t_{1/2}$ tão grande ($2,5 \times 10^5$ anos) que nas concentração injetadas nos pacientes não apresentam efeito terapêutico (**Figura 8**)[28]. A separação do ^{99m}Tc e ^{99}Tc , a partir do ^{99}Mo , é feita em um sistema chamado gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Figura 9). O dispositivo é um sistema fechado que possui uma coluna cromatográfica de óxido de alumínio (Al_2O_3), na qual é depositada uma quantidade conhecida ^{99}Mo , que se desintegra gerando o ^{99m}Tc [25]. É passada através dessa coluna uma solução salina estéril (solução de NaCl 0,9%), onde o ^{99}Mo ficará adsorvido à coluna de alumina e somente o ^{99m}Tc será coletado no eluente na forma de pertecnetato de sódio $\text{Na}[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4$ [25]

O ^{99m}Tc o apresenta duas características que o tornam interessante para ser aplicado em imagiologia médica: o seu $t_{1/2}$ e a energia liberada pelo seu decaimento[28]. A transição entre o ^{99m}Tc e o seu estado fundamental é de 6 h, sendo essa faixa de tempo suficiente para estudos no diagnóstico de doenças[28]. Ao decair, o ^{99m}Tc libera uma energia de 140 keV, que é suficientemente baixa para evitar uma dose elevada no paciente, mas alta o bastante para penetrar nos tecidos

biológicos e emergir dos órgãos internos e ser captada pelas câmeras γ [28]. Outros fatores que o tornam interessante para o uso no diagnóstico incluem a praticidade da obtenção do radioisótopo a partir do sistema gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ e os diversos estados de oxidação e possibilidades de coordenação, possibilitando dessa maneira a síntese de vários radiofármacos através dos “instant kits”[25].

Figura 8. Diagrama de decaimento do ^{99}Mo a $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Fonte: Marques *et al.*, 2001, p. 234.

A preparação dos radiofármacos de tecnécio ou rênio é muito semelhante, envolvendo as mesmas etapas. Para o preparo do radiofármaco são utilizados os chamados “kits instantâneos”, no qual certos volumes das soluções dos radionuclídeos $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ ou $^{186,188}\text{ReO}_4^-$ são adicionados à uma mistura contendo os ligantes, redutores, estabilizadores e catalisadores, conforme pode ser visto na **Figura 9**[28].

Figura 9. Produção do radiofármaco através dos “instant kits”.

Fonte: Adaptado de Abram & Alberto, 2006, p.1488.

Na preparação dos radiofármacos, a solução contendo pertecnetato $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$, com Tc no estado de oxidação VII, é adicionada ao kit e o metal é reduzido por um agente redutor, geralmente o SnCl_2 , para estados de oxidação mais favoráveis à coordenação do metal por uma ou mais moléculas do ligante[28]. O ligante tem as funções de estabilizar os estados de oxidação mais baixos do metal e também determinar a biodistribuição do radiofármaco[28]. É desejável que essa reação seja otimizada para que haja reprodutibilidade no seu rendimento e também na pureza (em torno de 95%)[28].

Já os agentes estabilizantes são utilizados para sequestrar os ânions ou radicais livres que podem decompor o agente redutor[30]. Como exemplos de estabilizantes podemos citar o ácido ascórbico, o ácido gentísico e o azul de metileno[30]. Após formado o radiofármaco de interesse, o mesmo deverá ser controlado por cromatografia (planar ou HPLC) antes da utilização em pacientes[28]. No caso dos radiofármacos de ^{99m}Tc , a grande maioria ou pelo menos aqueles que estão em uso comercial, não necessitam de purificação adicional antes de ser utilizado para o diagnóstico. Dentre os vários estados de oxidação do Tc, o estado de oxidação V é o mais desenvolvido na química desse elemento[31]. Uma vez reduzido o $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ pelo SnCl_2 , são gerados centros metálicos do tipo $\{\text{Tc}=\text{O}\}^{3+}$ ou $\{\text{O}=\text{Tc}=\text{O}\}^+$, nos quais os sítios de coordenação são geralmente ocupados por ligantes tetradentados com uma mistura de átomos O, N, ou S-doadores[31].

Os primeiros trabalhos com ^{99m}Tc para imagiologia médica começaram em 1961 com a utilização de $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ para imagem da tireóide, baseando-se no princípio que o ânion pertecnetato teria um comportamento parecido com o iodeto que é absorvido pela tireóide[28,32]. Esses compostos eram os radiofármacos da primeira geração, sendo por isso chamados de compostos de “tecnécios essenciais”[32]. Foram realizados diversos trabalhos com esses complexos de ^{99m}Tc da primeira geração, apresentando sucesso na imagiologia de órgãos tais como o fígado, os rins, ossos, coração ou cérebro[28].

Um dos primeiros radiofármacos de uma série de compostos da primeira geração foram os compostos de ^{99m}Tc com gluconatos e glucoheptonatos, com o objetivo de estudar a desobstrução dos rins[32]. Outro exemplo é complexo catiônico de ^{99m}Tc com o MIBI (methoxiisobutilisonitrila), que tem o nome comercial

Cardiolite[®], utilizado para a imagem do miocárdio (**Figura 10**)[11,28]. Esse complexo apresenta grande estabilidade em relação à perda dos seus ligantes ou à oxidação, a qual pode ser explicado pela configuração eletrônica do centro metálico (d^6 de baixo spin)[11]. Nesse caso, o metal, que está em um baixo estado de oxidação, Tc^I , é estabilizado pelo alto potencial de redução dos ligantes isonitrila[11].

Figura 10. Radiofármacos de ^{99m}Tc da primeira geração: (A) Cardiolite[®]; (B) Ceretec[®]; (C) Technescan[®].

Fonte: Kühn *et al.*, 2014, p. 85.

Existem também compostos de tecnécio da primeira geração com centros metálicos do tipo $\{Tc=O\}^{3+}$ são os complexos com os ligantes HMPAO (hexametilpropileneamineoxima) e MAG3 (mag – mercaptoacetilglicina), que têm respectivamente os nomes comerciais Ceretec[®] e Technescan[®]. O Ceretec[®] é utilizado para a imagiologia do miocárdio enquanto o Technescan[®] é utilizado para obtenção de imagens do fluxo sanguíneo do cérebro (**Figura 8**)[11,32].

Na realização de trabalhos de síntese e caracterização, o ^{99}Tc , que é β -emissor, é frequentemente substituído pelo seu congênere da terceira linha da tabela periódica, o rênio não radioativo (uma mistura isotópica de ^{185}Re e ^{187}Re), o qual é mais barato e fácil de manipular[33]. O tecnécio e o rênio apresentam similaridade em suas propriedades, as quais surgem da sua posição na tabela periódica, combinado com a contração lantanídica, que fazem com que esses dois elementos tenham raios atômicos quase idênticos[33].

Além disso, ainda há a vantagem de se poder contar com os radionuclídeos ($^{186/188}Re$) que podem dar origem a radiofármacos para terapia, como o o complexo

$[^{186/188}\text{ReO}(\text{DMSA})_2]$ (DMSA = meso-2,3-dimercaptosuccinico, utilizado para carcinomas na tireóide medular e outros tumores[31].

Apesar das características estruturais dos compostos de rênio e tecnécio, existem diferenças substanciais em sua química, o que torna a marcação do rênio mais difícil do que com tecnécio[31]. Por exemplo, na redução padrão de MO_4^- com SnCl_2 , é observada uma reação imediata para o $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4^-$, enquanto para o $^{188}\text{ReO}_4^-$ são necessárias condições mais severas ou tempos de reação mais longos [31].

Em relação aos complexos de rênio de baixa valência, como os complexos contendo o cerne $\{\text{M}(\text{CO})_3\}^+$, a preparação dos kits com tecnécio são realizadas em um único passo em condições mais brandas, enquanto que para os compostos de rênio são necessárias duas etapas em condições mais severas e maiores tempos de reação[31].

Compostos de rênio e tecnécio com o cerne *fac*- $\{\text{M}(\text{CO})_3\}^+$ têm chamado a atenção na medicina nuclear devido às propriedades interessantes que esse tipo de composto possui, como o seu preparo e os possíveis ligantes (mono, bi e tridentados) capazes de se coordenar ao centro metálico[11]. Em 1998 foi introduzido pela primeira vez por Alberto *et al.* a síntese do composto $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ a partir do íon pertecnetato, que pode ser sintetizado conforme reação abaixo[34,35]:

Figura 11. Esquema de reação do do composto $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$.

Fonte: Adaptado de Alberto *et al.*, 2007, p. 1182.

A maioria dos complexos com o cerne *fac*- $\{\text{M}(\text{CO})_3\}^+$ apresentam grande estabilidade no soro humano ou *in vivo*, o que pode ser explicado pela sua configuração eletrônica (d^6 de baixo spin), sendo esse sistema cineticamente inerte[11]. Outro fator que torna o complexo $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ interessante são os

tipos de ligantes coordenados ao metal: enquanto as carbonilas estão fortemente ligadas ao metal devido à retrodoação, os ligantes H_2O são facilmente substituídos nas reações, permitindo a síntese de uma gama de novos compostos com fragmento central $\text{fac-}\{\text{M}(\text{CO})_3\}^+$ [11], sendo bom material de partida para síntese de novos compostos bioorganometálicos com aplicação na medicina nuclear[35]. Além disso, a presença das três moléculas de H_2O ajudam na solubilidade do complexo, um vez que os complexos contendo só grupos carbonila são pouco solúveis em H_2O [35].

1.4 Bases de Schiff e ligantes triaminas

As bases de Schiff são compostos formados através da condensação entre aminas primárias e compostos de carbonílicos (aldeídos e cetonas), formando dessa maneira o grupo imínico ou azometino[36–40]. Essa classe de compostos foi primeiramente relatada pelo químico alemão Hugo Schiff em 1864, vindo daí o nome em homenagem ao seu descobridor[40]. A característica estrutural comum destes compostos é o grupo imínico ou azometino com uma fórmula geral $\text{RHC}=\text{N-R}_1$, o qual R e R_1 são alquil, aril, cicloalquil ou grupos heterocíclicos, que podem ser diversamente substituídos (**Figura 12**)[36–40].

Figura 12. Estrutura geral de uma Base de Schiff.

R_1 , R_2 e/ou R_3 = alquil, aril ou cicloalquil

As bases de Schiff são ligantes versáteis para o estudo da química de coordenação de metais de transição, especialmente em função dos seus átomos doadores (oxigênio, nitrogênio e enxofre) oriundos dos aldeídos e cetonas utilizadas nas reações de condensação, possibilitando dessa maneira sintetizar complexos de rênio e tecnécio com propriedades biológicas interessantes[41]. São encontrados na

literatura vários estudos de bases de Schiff com esses metais, principalmente em relação às bases de Schiff derivadas do salicilaldeído, formando ligantes bi, tri e tetradentados [42–44]. Outro destaque dessa classe de ligantes é a facilidade de síntese (através da condensação de um aldeído/cetona com uma amina), multidenticidade (formando ligantes mono a hexadentados) e possíveis combinações de átomos doadores (geralmente através da coordenação da imina e outros átomos como oxigênio, enxofre ou nitrogênio)[45].

Têm sido encontrados na literatura vários exemplos de ligantes que estabilizam o pequeno fragmento $\{\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$, tais como as isonitrilas, tiouréias e os seus derivados, tiofosforilo amidas, ciclopentadieno, ditioéters e fosfinas solúveis em água[46–52]. São encontrados ainda vários outros exemplos de ligantes contendo átomos de nitrogênio que reagem facilmente com o complexo precursor *fac*- $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ formando complexos estáveis, tais como a histamina, imidazol, histidina e bases de Schiff[41,45,47,53].

Desde que Wilkinson publicou em 1979 complexos com base de Schiff, um grande número de compostos com bases de Schiff polidentadas têm sido estruturalmente caracterizados e extensivamente explorados para o desenvolvimento de radiofármacos de rênio e tecnécio[54,55]. Inicialmente as pesquisas eram voltadas para complexos de rênio e tecnécio com ligantes tetradentados contendo os átomos doadores oxigênio, nitrogênio e enxofre, para que mais tarde, fosse explorada a química desses metais com bases de Schiff bi e tridentadas[54,55]. Como exemplo podemos citar o agente de perfusão $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -furifosmin, que é um complexo de Tc(III) com uma base de Schiff tetradentada [(1,2-bis-dihidro-2,2,5,5-tetrametil-3(2H)-furanona-4-metileneamino)etano] ocupando o plano equatorial e duas fosfinas [tris(3-metoxi-propil)fosfina] ocupando os dois eixos trans restantes do octaedro (**Figura 13**).

Figura 13. Exemplo de complexo de tecnécio com base de Schiff tetradentada: $^{99m}\text{Tc(III)}$ -furifosmin

Fonte: Adaptado de Jurisson & Lydon, 1999, p.2207

Outra classe de ligantes estudados para marcar complexos de tecnécio são os compostos derivados de aminas acíclicas, como a etilenodiamina e dietilenotriamina. Como exemplo podemos citar o complexo ^{99m}Tc -DTPA, utilizado para imagem de perfusão renal e perfusão pulmonar, no qual o ligante DTPA (ácido dietilenetriamina pentaacético) é um ligante octadentado derivado da dietilenotriamina.

Em Schibli *et al.* (2000) encontra-se o primeiro e sistemático estudo realizado *in vitro* e *in vivo* com complexos contendo o fragmento $\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$ com ligantes bi e tridentados contendo os átomos doadores N,O, que acabou resultando em complexos neutros[56,57]. Foi observado que os complexos com ligantes bidentados apresentaram alta retenção nos rins e fígado, possivelmente devido à substituição da molécula de água restante nesses compostos por grupos funcionais das proteínas plasmáticas[56,57]. Já os complexos com os ligantes tridentados formaram complexos neutros ou aniônicos, com boa estabilidade *in vivo* e rápida liberação nos órgãos, tecidos e sangue. Como pode ser observado na literatura, ligantes triaminas acíclicas formam complexos catiônicos com fragmento *fac*- $\{^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$, justificando essa classe de ligante como agente complexante para esse tipo de complexo[56,57].

1.5 Bioconjugação

Anticorpos, esteróides e peptídeos marcados com isótopos radioativos, são conhecidos na literatura devido a sua utilização na imagiologia médica *in vivo* e também na terapia[58]. Ligantes derivados de aminoácidos e peptídeos têm atraído considerável atenção devido ao seu potencial para fornecer novos agentes de

tecnécio ou rênio para medicina nuclear[59]. Esses tipos de ligantes são conhecidos como agentes quelantes bifuncionais (BFC's), que são quelantes com grupos funcionais reativos ao quais podem ser acoplados covalentemente (conjugada) a biomoléculas (peptídeos, nucleotídeos, anticorpos , nanopartículas)[60]. Esse tipo de reação para a formação dos BFC's é então conhecida como **bioconjugação**.

As atividades dos compostos marcados dependem das interações específicas e da alta afinidade que eles exibem para diferentes alvos expressos em células tumorais como, por exemplo, receptores, antígenos e na sua capacidade de transportar o radioisótopo para o alvo[58]. Para realizar a bioconjugação, é necessário que os agentes quelantes possuam grupos funcionais tais como ácidos carboxílicos ou ésteres ativados (por exemplo, N-hidroxissuccinimida NHS-éster, TFP-tetrafluorofenil éster) para acoplamentos de amida, isotiocianatos para acoplamentos de tiouréia e maleimidas para acoplamentos de tiol, conforme pode ser visto na **Figura 14**[60].

Figura 14. Exemplos de reações de bioconjugação: (A) reação de acoplamento de peptídeo padrão entre um ácido carboxílico e uma amina primária com um reagente de acoplamento; (B e C) reações de acoplamento peptídico entre ésteres ativados de tetrafluorofenilo (TFP) ou N-hidroxissuccinimida (NHS) e uma amina primária; (D) formação da ligação da tiouréia entre o isotiocianato e uma amina primária; (E) formação da ligação do tioéter entre a maleimida e um tiol; (F) Cu (I) catalizando a cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, entre uma azida e um alcino ("reação clique"); e (G) "reação click" de deformação promovida Diels-Alder entre um e tetrazina e o transcicloocteno.

Um dos mais importantes pré-requisitos no design dessas novas classes de ligantes, é que os complexos de tecnécio e rênio sejam estáveis e que seja possível a elucidação da sua estrutura[59]. Como exemplo de bioconjugação (**Figura 15**), podemos citar a síntese do complexo de rênio com o ligante MAG₃, no qual foi feita a bioconjugação de um anticorpo monoclonal:

Figura 15. Esquema de reação do complexo de ^{188}Re com o ligante MAG3 e o anticorpo monoclonal (MAb).

Fonte: Alessio, 2011, p. 266.

Como dito anteriormente, o ânion $^{188}\text{ReO}_4^-$ é mais difícil de ser reduzido que o seu análogo $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, sendo necessário inicialmente a síntese do complexo com o ligante em condições mais severas (tempo e temperatura), para que somente no último passo seja acoplado o anticorpo[31]. Devido ao longo tempo de meia-vida desses metais, o radiofármaco então sintetizado é purificado e em seguida feito o controle de qualidade antes da sua administração no paciente[31].

Um dos núcleos de complexos organometálicos mais promissores e desenvolvidos para a marcação com biomoléculas são os complexos de rênio e tecnécio com carbonilas com fragmento central *fac*- $\{\text{M}(\text{CO})_3\}^+$ [61]. O centro metálico é inerte, devido ao seu baixo estado de oxidação (+I) e também é compacto, com uma forma quase esférica (**Figura 16**)[61]. Se um sistema ligante adequado fecha a esfera de coordenação, o centro metálico estará eficientemente protegido contra novos ataques de ligantes ou mesmo à reoxidação[61].

Figura 16. Comparação qualitativa do tamanho entre o precursor organometálico $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (esquerda) e o Tc-MAG3 (direita). (Roxo = Tc, vermelho = oxigênio, Cinza = carbono, azul = nitrogênio, amarelo = enxofre. Os hidrogênios foram omitidos).

Fonte: Schibli & Schubiger, 2002, p. 1531.

Aliando as propriedades do rênio e tecnécio com os ligantes na esfera de coordenação, assim como no acoplamento de biomoléculas aos complexos, é possível obter compostos com propriedades interessantes para o uso na química radiofarmacêutica. Para isso, é necessário um maior conhecimento da química de coordenação desses metais de transição frente à tais ligantes, para que as abordagens sintéticas empregadas na química do rênio possam ser aplicadas na síntese de novos complexos de tecnécio, obtendo-se assim novos candidatos a radiofármacos para o diagnóstico de doenças.

2 OBJETIVOS

- Sintetizar ligantes quelantes a fim de gerar complexos octaédricos contendo o fragmento $fac\text{-}\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^+$, com modo de coordenação facial;
- Sintetizar complexos de rênio com os novos ligantes preparados anteriormente;
- Caracterizar os ligantes e complexos por: espectroscopia de absorção na região do infravermelho e do UV-visível, análise elementar de C, H e N, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas;
- Obter cristais dos complexos e realizar a determinação de estrutura cristalina e molecular, por difração de raios X em monocristal;
- Realizar a marcação dos ligantes com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e caracterizar os produtos por CLAE, CCD e eletroforese;
- Realizar testes biológicos com os complexos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (captação, extrusão, viabilidade celular e imagiologia por SPECT).

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Os solventes utilizados nas sínteses (metanol, etanol, diclorometano e hexano) foram adquiridos da Synth, Merck, Vetec e Reagen, e utilizados sem purificação prévia. Os solventes deuterados utilizados no preparo das amostras de RMN ^1H (metanol, clorofórmio e acetona) foram adquiridos da Cambridge Isotopes Laboratories e da Deutero.

Os reagentes de partida utilizados na síntese dos ligantes e complexos (2,2'-dihidroxibenzofenona, etilenodiamina, dietilenotriamina, $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$, 4-hidroxibenzofenona, benzaldeído) foram adquiridos da Sigma-Aldrich sem purificações adicionais.

Nos experimentos de marcação do ligante **HL**³ com o $^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{I}}$, foram utilizados os reagentes: cisteína cloridrato monohidratada (InLab), L-histidina cloridrato monohidratada (Merck), ácido trifluoroacético e acetonitrila grau HPLC (EM), borohidreto de sódio, Aldrich, Carbonato de sódio (Baker), tartarato duplo de sódio e potássio (QEEL), ácido clorídrico fumegante (Nuclear), meio de cultura RPMI-1640 (Cultilab, Brasil), solução de Tripsina/EDTA (Invitrogen[®]), corante Azul de Tripán 0,4% (Invitrogen[®]) e n-octanol (Merck).

3.2 Instrumentação

3.2.1 Análise Elementar (C, H, N)

As microanálises de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos compostos sintetizados foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos utilizando o equipamento CHNS modelo EA 1108 da FISONs.

3.2.2 Espectroscopia de Absorção na região do infravermelho (IV)

Utilizou-se o espectrofotômetro FTIR Shimadzu na região de 4000 a 400 cm^{-1} para obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho mostrados neste trabalho. As amostras foram medidas em pastilhas com de KBr, na proporção 1:150 mg (amostra:KBr).

3.2.3 Espectroscopia de Absorção na região do UV-vis

Os espectros de absorção de absorção eletrônica foram obtidos em um espectrofotômetro de feixe duplo da Shimadzu, modelo UV-1800. Utilizou-se nos experimentos cubetas de quartzo de 10 mm de caminho ótico e 4 mL de capacidade.

3.2.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos foram obtidos em três equipamentos:

- Bruker, modelo Avance III, frequência de 399,95 MHz para ^1H e campo de 9,4 T, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).
- Agilent Technologies, modelos 400/54 e 500/54 Premium Shield nas frequências de 400 e 500 MHz respectivamente.

Todos os deslocamentos químicos (δ) são dados em unidades de ppm usando-se como referência os sinais de hidrogênio do grupo metílico do tetrametilsilano (TMS).

3.2.5 Difração de Raios X em Monocristal

Os dados de difração de raios X foram coletados em um difratômetro BRUKER APEX II Duo, equipado com duas micro fontes, de cobre e molibdênio, utilizando a radiação $\text{Mo-K}\alpha$ ($\lambda = 0,71073$), e sistema OXFORD de baixa temperatura, localizado na CAQUI (Central Analítica Química) do IQSC/USP.

Procedimentos padronizados foram aplicados para a redução dos dados e correção de absorção (multiscan). As soluções e refinamentos das estruturas foram realizados utilizando-se os programas SHELXS97 e SHELXL97. As posições dos átomos de hidrogênio foram calculadas em posições idealizadas e tratadas com a opção “ridingmodel” do programa SHELXL97.

3.2.6 Espectrometria de Massas

Os espectros de massa com ionização em modo positivo e negativo (ESI-MS) foram medidos com um equipamento Agilent 6210 ESI-TOF da Central de Análises Químicas do IQSC-USP (CAQI). Os dados dos espectros de massa são apresentados da seguinte forma: m/z , atribuição.

3.3 Sínteses dos Compostos

A síntese dos ligantes simétricos e assimétricos foram feitas com base em procedimentos já publicados[62–66]. Os complexos sintetizados são inéditos, e para as sínteses, foram utilizados procedimentos experimentais semelhantes aos encontrados na literatura para complexos de Re^I[67,68].

3.3.1 Síntese dos ligantes

3.3.1.1 Síntese do ligante assimétrico HL¹

Inicialmente foram dissolvidos 0,16 mL (2,3 mmol) da amina alifática etilenodiamina em 10 mL de etanol e, em seguida, foi adicionado 0,5 g (2,3 mmol) da cetona 2,2'-dihidroxibenzofenona, deixando a solução sob refluxo e agitação constante. Após 4 horas, o aquecimento foi desligado e a solução foi mantida sob agitação até que atingisse a temperatura ambiente, obtendo-se um sólido amarelo. O sólido obtido foi filtrado em funil de placa sinterizada e lavado com éter e seco sob vácuo, obtendo-se um rendimento de 88%.

Figura 17. Síntese do ligante HL¹.

3.3.1.2 Síntese do ligante assimétrico HL²

Adicionou-se 0,25 mL (2,3 mmol) de dietilenotriamina em 10 mL de tolueno e, em seguida, foi dissolvido 0,5 g (2,3 mmol) da cetona 2,2'-dihidroxibenzofenona à solução. A mistura reacional foi deixada sob refluxo e agitação constante por 4 horas. Após esse período, o aquecimento foi desligado e a solução foi mantida sob agitação até que atingisse a temperatura ambiente, formando-se um precipitado amarelo. Filtrou-se o composto como auxílio de um funil de placa sinterizada e em seguida lavou-se o mesmo com tolueno e éter. O produto foi seco à vácuo, obtendo-se no final um rendimento de 71%.

Figura 18. Síntese do ligante HL².

3.3.1.3 Síntese do ligante simétrico HL³

Para a síntese do ligante **HL³** foram dissolvidos 0,265 mL (2,46 mmol) da amina alifática dietilenotriamina em 5 mL de etanol. Em seguida, foram dissolvidos 0,500 mL (4,96 mmol) do benzaldeído. Deixou-se a solução sob refluxo e agitação constante por 24 horas, não sendo observada a formação de nenhum precipitado. Rotaevaporou-se a solução, restando no balão um óleo marrom. Em seguida, esse óleo foi solubilizado em 5 mL de metanol e deixou-se sob agitação em banho de gelo, sendo em seguida adicionado três equivalentes de NaBH₄ (0,279 g; 7,38 mmol). A solução ficou sob agitação constante por 12 horas à temperatura ambiente, não sendo observada a formação de nenhum precipitado ao término da reação. Rotaevaporou-se a solução, sobrando no balão um óleo marrom, que em seguida foi solubilizado em diclorometano. Em seguida adicionou-se uma solução saturada com Na₂CO₃. Verteu-se em seguida essa solução em um funil de separação e fez-se uma extração, adicionando-se três vezes 30 mL de diclorometano ao funil contendo a mistura reacional. À solução coletada na extração foi adicionado MgSO₄ anidro. Filtrou-se e rotaevaporou-se a solução, sobrando no balão um óleo marrom. Com o objetivo de se obter um composto sólido, foi utilizado o procedimental experimental semelhante ao encontrado na literatura[69]. Solubilizou-se esse óleo em metanol e colocou-se o mesmo em banho de gelo. Em seguida foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico, no qual o composto precipitou formando um sólido marrom claro. Filtrou-se em seguida e lavou-se com éter, obtendo-se 0,687 g do composto (77% de rendimento). O esquema de reação encontra-se descrito abaixo:

Figura 19. Síntese do ligante HL³.

3.3.1.4 Síntese do ligante simétrico HL⁴

O ligante HL⁴ foi sintetizado utilizando 0,244 mL (2,27 mmol) da amina alifática dietilenotriamina solubilizada em 5 mL de acetonitrila. Em seguida, foram dissolvidos 0,900 g (4,54 mmol) da cetona 4-hidroxibenzofenona. Deixou-se a solução sob refluxo e agitação constante por 12 horas, sendo observada a formação de um precipitado branco após 5 horas de reação. Filtrou-se o precipitador e lavou-se com éter, obtendo-se no final 0,500 g desse composto (48% de rendimento). Assim como feito com o ligante HL³, foi realizada uma reação de redução do produto obtido inicialmente. Para tal, solubilizou-se 0,350 g (0,756 mmol) do composto obtido em 5 mL de metanol e deixou-se sob agitação constante em banho de gelo. Em seguida foram adicionados três equivalentes de NaBH₄ (0,086 g; 2,27 mmol), deixando a solução sob agitação constante por 12 horas à temperatura ambiente. Não foi observada a formação de nenhum precipitado ao término da reação. Rotaevaporou-se a solução sobrando no balão um óleo amarelo claro. O óleo obtido foi solubilizado em diclorometano e em seguida adicionou-se uma solução saturada com Na₂CO₃, deixando essa solução sob agitação constante por 10 minutos. Em seguida essa solução foi vertida em um funil de separação e fez-se uma extração, através da adição de 30 mL de diclorometano (3 vezes) ao funil contendo a mistura

reacional. À solução coletada na extração foi adicionado MgSO_4 anidro. Filtrou-se a solução e em seguida rotaevaporou-se, sobrando um óleo amarelo claro. Adicionou-se diclorometano e hexano e formou-se um precipitado branco (0,222 g; 63% de rendimento). O composto foi filtrado em funil de placa sinterizada e em seguida seco à vácuo. O esquema de reação encontra-se descrito abaixo:

Figura 20. Síntese do ligante HL^4 .

3.3.1.5 Síntese dos ligantes simétricos HL^5 e HL^6

Os ligantes HL^5 e HL^6 foram cedidos pelo Dr. Fábio Navarro Marques, pesquisador do Centro de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas de São Paulo, utilizando metodologia já descrita na literatura[70]. Uma vez que esses ligantes já tinham sido marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{I}}$, fez-se então essa parceria com o nosso laboratório com o objetivo de sintetizar o complexo análogo de Re^{I} , para que em seguida fosse realizada a co-injeção desse complexo no HPLC com o complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{I}}$. Inicialmente 0,265 mL (2,46 mmol) da amina alifática dietilenotriamina em 5 mL de metanol. Em seguida, foram dissolvidos 0,675 g (4,96 mmol) do aldeído de interesse (3-metoxibenzaldeído e 4-metoxibenzaldeído). Deixou-se a solução sob agitação por 30 minutos até o aparecimento de um precipitado branco. Em seguida a

solução foi deixada sob refluxo e agitação constante por 3 horas. Filtrou-se a mistura reacional em um funil de placa sinterizada, sendo em seguida seco à vácuo.

Dando continuidade à síntese, solubilizou-se o composto em 5 mL de metanol e deixou-se sob agitação em banho de gelo, sendo em seguida adicionado três equivalentes de NaBH_4 (0,280 g; 7,38 mmol). A solução ficou sob agitação constante por 12 horas à temperatura ambiente. O sistema foi acidulado com 0,6 mL de ácido acético, neutralizado com 15 mL de solução NaOH 1,5 M e extraída com 3 porções de 30 mL de CH_2Cl_2 . Rotaevaporou-se a solução sobrando no balão um sólido, que em seguida foi solubilizado em diclorometano. Em seguida adicionou-se uma solução saturada com Na_2CO_3 . Verteu-se em seguida essa solução em um funil de separação e fez-se uma extração, adicionando-se três vezes 30 mL de diclorometano ao funil contendo a mistura reacional. À solução coletada na extração foi adicionado MgSO_4 anidro. Filtrou-se a solução e em seguida rotaevaporou-se, sobrando no balão um óleo marrom. Solubilizou-se o composto em etanol e colocou-se o mesmo em banho de gelo. Em seguida foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico, no qual o composto precipitou formando um sólido bege. Filtrou-se e lavou-se o sólido obtido com etanol e secou-se à vácuo, obtendo-se 0,687 g do composto (77% de rendimento). O esquema de reação encontra-se descrito abaixo:

Figura 21. Síntese dos ligantes HL^5 e HL^6 .

3.3.3 Síntese dos complexos contendo *fac*-{Re(CO)₃}⁺

3.3.3.1 Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)]

Inicialmente, solubilizou-se 50 mg (0,12 mmol) do complexo precursor [Re(CO)₅Br] em 5 mL de tolueno e deixou-se a solução sob refluxo até que o composto solubilizasse. Em seguida, adicionou-se 32 mg (0,12 mmol) do ligante **HL¹**, obtendo-se uma solução amarela. Deixou-se a mistura reacional sob refluxo por 12 horas. Não foi observada a formação de precipitado nesse período. Dando prosseguimento à síntese, a solução foi rotaevaporada, restando no balão um óleo amarelo. Em seguida, foi adicionado diclorometano para solubilizar o óleo e hexano, sendo observada a formação de um sólido amarelo. Filtrou-se então o composto obtido em um funil de placa sinterizada e lavou-se o mesmo e éter. Em seguida, secou-se o composto à vácuo à temperatura ambiente.

As análises de RMN ¹H mostravam que haviam impurezas no sólido obtido. Com o objetivo de obter um sólido mais puro, foi utilizada outra metodologia (**Figura 19**). Solubilizou-se 50 mg (0,12 mmol) do precursor [Re(CO)₅Br] em 5 mL de metanol e deixou-se a solução sob refluxo até que o composto solubilizasse. Em seguida, adicionou-se 32 mg (0,12 mmol) do ligante **HL¹**, e deixou-se a solução sob refluxo por 2 horas. Em seguida adicionou-se 5 mL de água destilada e observou-se a formação de um sobrenadante amarelo na solução. Filtrou-se a mistura reacional e secou-se à vácuo, obtendo-se um rendimento de 53%.

Com o objetivo de obter cristais, solubilizou-se o composto em etanol e deixou-se a solução em um béquer. Após 4 dias, através da evaporação lenta do solvente, obteve-se pequenos cristais amarelos (5 mg).

Figura 22. Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)].

3.3.3.2 Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL²)]Br

Adicionou-se em 50 mg (0,12 mmol) do precursor [Re(CO)₅Br] em etanol e colocou-se a solução sob refluxo. Após o composto ter sido completamente solubilizado, adicionou-se 37 mg (0,12 mmol) do ligante **HL²**, obtendo uma solução amarela que foi mantida sob refluxo por 12 horas, não sendo observado nenhum precipitado. Rotaevaporou-se o etanol e observou-se a formação de um óleo amarelo no fundo do balão. Adicionou-se diclorometano e hexano e o composto precipitou, formando um precipitado amarelo (83% de rendimento). O sólido obtido foi colocado em éter e colocado na geladeira. Após 10 dias foram obtidos pequenos cristais amarelos (3 mg).

Figura 23. Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL²)]Br.

3.3.3.3 Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL³)]Br

Inicialmente, adicionou-se 50 mg (0,123 mmol) do complexo precursor [Re(CO)₅Br] em 5 mL de metanol e deixou-se sob refluxo até que o mesmo fosse solubilizado. Em seguida adicionou-se 48 mg (0,123 mmol) do ligante **HL³** em 5 mL de água destilada. O ligante, que estava na forma de um sal tricloridrato, foi neutralizado através da adição de uma solução de K₂CO₃, passando o pH da solução para 7,5. Prontamente adicionou-se a solução do ligante ao balão contendo o complexo precursor e colocou-se a mesma sob refluxo. Após 3 horas de reação já era observado a formação de um sólido marrom claro na solução. Passadas 12 horas, a solução foi filtrada em um funil de placa sinterizada e lavada com metanol e

éter gelado. Em seguida o produto foi seco à vácuo à temperatura ambiente, obtendo-se no final 26 mg do composto (38% de rendimento).

Figura 24. Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL³)]Br.

3.3.3.4 Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁴)]Br

Em um balão de 50 mL, adicionou-se 50 mg (0,12 mmol) do precursor [Re(CO)₅Br] em etanol e deixou-se a solução sob refluxo até que o composto fosse completamente solubilizado. Adicionou-se 58 mg (0,12 mmol) do ligante HL⁴, e deixou-se a solução sob refluxo por 12 horas, não sendo observado nenhum precipitado.

Em seguida rotaevaporou-se a solução, sobrando no fundo do balão um óleo amarelo claro. Adicionou-se diclorometano e prontamente formou-se um sólido amarelo claro. Filtrou-se e lavou-se o composto com diclorometano e éter gelado, sendo em seguida seco à vácuo à temperatura ambiente. Obteve-se no final 67 mg do composto (66% de rendimento).

Figura 25. Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁴)]Br.

3.3.3.5 Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br e *fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br

Foram adicionados 50 mg (0,123 mmol) do complexo de partida [Re(CO)₅Br] em 5 mL de metanol e deixou-se sob refluxo até que solubilizasse. Com o objetivo de neutralizar o ligante, solubilizou-se 48 mg (0,123 mmol) do ligante de interesse (HL⁵ ou HL⁶) em 5 mL de água destilada e ajustou-se o pH da solução para 7,5 através da adição de Na₂CO₃. Em seguida, adicionou-se a solução do ligante ao balão contendo o complexo precursor, deixando o mesmo sob refluxo por 12 horas. Após esse período não foi observada a formação de nenhum precipitado. Tirou-se a solução do balão e colocou-se em um béquer. Deixou-se o béquer tampado na bancada por 2 dias, para evaporação lenta do solvente, tendo sido observada a formação de cristais transparentes em ambos os casos. Obteve-se para os complexos *fac*-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br e *fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br um rendimento de, respectivamente, 30 e 55%.

Figura 26. Síntese dos complexos *fac*-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br e *fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br.

3.3.4 Síntese dos complexos de ^{99m}Tc

3.3.4.1 Síntese do complexo precursor [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺

Para preparação do complexo precursor [^{99m}Tc](H₂O)₃(CO)₃⁺, utilizou-se metodologia já bem descrita na literatura[34]. Esse tipo de composto foi inicialmente proposto por Roger Alberto *et al.*, para sintetizar complexos do tipo *fac*-[^{99m}Tc](CO)₃(R)_x⁺[34,35].

Em um frasco de vidro do tipo penicilina foram adicionados 4 mg de carbonato de sódio e 20 mg de tartarato duplo de sódio e potássio. A mistura foi diluída em 0,5

mL de água purificada, previamente nitrogenada por 30 minutos. Em seguida, essa solução foi adicionada em outro frasco, contendo 5,5 mg de NaBH_4 . Esse frasco foi fechado com rolha de borracha e lacrado com cinta de alumínio. Através de um sistema de agulhas, o frasco foi saturado com monóxido de carbono (CO) por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, com o auxílio de uma seringa de 1 mL, pegou-se um volume (0,2 a 0,3 mL) uma solução de $\text{Na}[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4$, de tal maneira que a sua atividade estivesse na faixa entre 30 e 40 mCi. Completou-se o volume da seringa até 0,5 mL com uma solução de NaCl 0,9 % e a solução foi adicionada ao frasco lacrado em atmosfera de CO , seguido de aquecimento a $75\text{ }^\circ\text{C}$, por 30 minutos. Após esse tempo, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e foi adicionado 1 mL de solução de HCl (0,1 M) para diminuir o pH do meio reacional de 11 para 9.

3.3.4.2 Síntese do complexo *fac*- $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$

Em um frasco contendo 1 mg do ligante HL^3 , adicionou-se 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 M, com $\text{pH} = 7,4$. A esse frasco, adicionou-se 0,2 mL de tampão NaHCO_3 0,1 M, com $\text{pH} = 8,2$. Com o auxílio de uma micropipeta de 1 mL, adicionou-se a esse frasco 0,4 mL da solução contendo o *fac*- $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. A mistura foi aquecida por 30 minutos à $75\text{ }^\circ\text{C}$, sendo em seguida resfriada à temperatura ambiente.

3.3.5 Avaliação da eficiência de marcação e da pureza radioquímica

3.3.5.1 Cromatografia camada delgada (CCD) e de papel para o complexo precursor e dos complexos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$

A pureza da radioquímica do complexo precursor *fac*- $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ foi determinada por dois sistemas de cromatografia planar ou cromatografia em camada delgada (CCD): TLC- Al_2O_3 e papel Whatman 1, utilizando como fase móvel uma solução 95% de metanol e 5% HCl 6 M. Para o complexo *fac*- $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ foi utilizado o sistema cromatográfico TLC-SG, utilizando como fase móvel uma solução 75% de clorofórmio e 25% de metanol.

Uma amostra da solução contendo o complexo precursor foi retirada do frasco reacional e diluída em água purificada de tal maneira que a atividade final fosse de, no máximo, 100 $\mu\text{Ci}/1\text{ mL}$. Com o auxílio de uma seringa de insulina com agulha de calibre 0,5 x 15 mm, uma gota da solução do complexo radioativo foi depositada a 1,0 cm da margem inferior da fita cromatográfica (8 cm de comprimento e 1 cm de largura). Este foi colocado em uma cuba contendo aproximadamente 1 mL da fase móvel, onde o solvente percorreu 6,0 cm a partir do ponto em que foi aplicada a gota. Após a corrida, as fitas foram secas com o auxílio de uma pistola de ar quente e em seguida cortadas em seis pedaços. A radioatividade nos seguimentos foi determinada em um detector de radiação gama, tipo poço, e a porcentagem em cada seguimento foi determinada dividindo o valor de cada parte pela soma do valor das partes.

3.3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A solução para controle de qualidade para a CCD, também foi utilizada no controle por CLAE. Em seguida as amostras dos complexos foram injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, controlado por software Class-VP, equipado com detector de UV (Shimadzu) um analisador de cintilação, em fluxo, Perkin Elmer Radiomatic 610TR, controlado pelo software ProFSA. Utilizou-se para as corridas uma coluna analítica Synergi-hydro RPC18 (4,6x250 mm, 4 μm), da Phenomenex. Foram utilizadas as fases móveis: (A) Solução aquosa de TFA 0,05 % e (B) acetonitrila, utilizando o seguinte processo: 80 % da fase (A) de 0 a 1 minuto, gradiente linear de 1 a 10 minutos, partindo de 80 % da fase (A) até atingir a proporção 20:80 % (A:B), depois seguindo em modo isocrático de 10 a 25 minutos com a mesma proporção, e de 25 a 30 minutos retornou-se à condição inicial. O fluxo foi mantido a 1 mL/min durante a análise.

Nos casos em que foi necessário purificar as amostras (mais de um sinal no radiocromatograma), utilizou-se nas corridas uma coluna de C18 (10x250 mm, 4 μm) da Phenomenex. As eluições foram realizadas nas mesmas condições utilizadas com a coluna analítica.

3.3.6 Eletroforese em papel do complexo *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br

A eletroforese foi realizada em uma cuba para eletroforese horizontal previamente lavada com água purificada e preenchida em solução eletrolítica de tampão PBS (50 mM, pH 7,4) e metanol (1:1). Foram utilizadas fitas de papel Whatman nº1 com 1,5 x 28 cm, sendo as mesmas umedecidas no próprio tampão e fixadas na cuba. Foi depositada uma gota do complexo radioativo no meio da fita à uma tensão de 275 V, sendo assim mantida por 2 horas. Com o auxílio de um soprador térmico, as fitas foram secas e cortadas em segmentos de 1,0 cm e a radioatividade foi medida em contador de radiação gama, tipo poço. Os resultados são apresentados como porcentagem da radioatividade total/cm.

3.3.7 Determinação do coeficiente de partição

Com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados 2,9 mL de tampão PBS e 3,0 mL de n-octanol em tubos de ensaio e em seguida foi adicionado 0,1 mL da solução do complexo *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br. Em seguida, os tubos foram tampados e agitados em vortex por 1 minuto e deixados em repouso de 15 a 20 minutos. Alíquotas de 1,0 mL de cada fase foram retiradas e a atividade foi medida em um curiômetro ou calibrador de doses. O coeficiente foi determinado dividindo o valor da atividade encontrada na fase orgânica (n-octanol) pelo valor da atividade na fase aquosa (água), sendo expresso como o valor logarítmico deste cociente (LogP).

3.3.8 Avaliação da estabilidade *in vitro* do complexo *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br em presença de cisteína ou histidina

Em frascos de vidro tipo penicilina, foram adicionados 0,1 mL do complexo *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br e 0,9 mL de solução de cisteína (1 mM) ou histidina (1 mM). As soluções foram incubadas a 37 °C por 1, 3 e 6 horas. A transquelação da cisteína ou histidina com o radiofármaco foram avaliadas por CLAE nas mesmas condições de análise descritas no item 3.3.5.2.

3.3.9 Avaliação da estabilidade *in vitro* do complexo *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br em presença do tampão PBS

Em frascos de vidro tipo penicilina, foram adicionados 0,1 mL do complexos *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br e 0,9 mL do tampão PBS. As soluções foram incubadas a 37 °C por 1, 3 e 6 horas. Em cada tempo, alíquotas da solução contendo o radiofármaco foram retiradas e avaliadas por CLAE, nas mesmas condições de análise descritas no item 3.3.5.2.

3.3.10 Avaliação *in vitro* da captação celular do complexo *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br

3.3.10.1 Cultura de células B16F10

Células de melanoma murino foram cultivadas em garrafas plásticas de 150 cm² em 10 mL de meio de cultura RPMI* suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e umidade controlada. Em média, a cada dois dias, o meio contido na garrafa foi descartado em um béquer e a garrafa foi lavada com 10 mL de solução PBS, o qual também foi descartado. Em seguida, foram adicionados 3,5 mL de solução de tripsina e a garrafa foi levada novamente a estufa por cerca de 2 minutos. Com o auxílio de um microscópio, foi verificado o desprendimento total das células, no qual em seguida foram acrescentados 6,5 mL de meio de cultura suplementado com SFB, para inibir o efeito da tripsina. A suspensão de células foi aspirada utilizando pipeta sorológica de 10 mL e transferida para um tubo do tipo Falcon de 15 mL. Este tubo, devidamente fechado, foi centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em um meio suplementado com SFB.

*Meio RPMI: Os Meios Roswell Park Memorial Institute (RPMI) são uma série de meios desenvolvidos por Moore *et al* para culturas in vitro de células humanas saudáveis e neoplásicas. É uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular. O meio RPMI 1640 é o meio mais comumente usado da série. Atualmente, o meio é amplamente utilizado para uma vasta gama de linhagens de células ancoradas. O meio precisa ser suplementado com 5 a 20% de soro fetal bovino. O meio também é conhecido por permitir o crescimento de células na ausência de soro.

Fontes: <http://www.biosystems.com.br/produto/1490/os-meios-roswell-park-memorial-institute-rpmi-sao-uma-serie-de-meios> e http://www.vitrocell.com.br/vitrocell_bularpmi.html

3.3.10.2 Captação em células B16F10

Em placas de cultura com 4 poços foram adicionados, por poço, aproximadamente 5×10^5 células de B16F10 suspendidas em 10 mL de meio de cultura RPMI. Em seguida, adicionou-se 10 μ L das soluções do complexo **fac-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br** de modo que grupos de células, em quadruplicata, ficassem expostas aos compostos radioativos por 15, 30, 60 em estufa mantida à temperatura ambiente (37 °C). Ao final de cada tempo, foi retirado o meio de cultura e cada poço foi lavado com o tampão PBS; as células foram retiradas com tripsina e a viabilidade foi verificada através do azul de tripan. O meio de cultura, o PBS e as células foram levadas à um contador de radiação gama, tipo poço. A porcentagem de captação dos complexos foi determinada pela razão entre a contagem dos tubos das soluções contendo células, pela soma das contagens dos tubos contendo os sobrenadantes e os tubos contendo as células.

3.3.10.3 Efluxo em células B16F10

Para o ensaio de efluxo, foi utilizada 1 placa com 4 poços, de forma semelhante ao que foi feito para o ensaio de captação. Porém, após a adição do radiofármaco aos poços, as placas voltaram à estufa para um tempo máximo de captação de 60 minutos. Após esse período, o meio dos poços foi retirado e os poços foram lavados com o tampão PBS. Em seguida, as soluções foram colocadas em tubos para contagem da radiação. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio e as células foram incubadas por 15 minutos. Após esse tempo, o meio foi retirado novamente, os poços lavados com o tampão PBS e levados à contagem radioativa, sendo os poços completados com mais meio de cultura. O mesmo procedimento foi

repetido nos tempos de 30 e 60 minutos. Após o último tempo de extrusão, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados com PBS. Em seguida, as células foram tripsinizadas e levadas à contagem radioativa em contador gama tipo poço.

3.3.11 Viabilidade celular por azul de Tripan

O número total de células foi determinado utilizando o método do azul de Tripan. Foram adicionados 10 μL de solução de azul de Tripan Blue 0,2 % à 10 μL de uma suspensão de células B16F10 (utilizadas nos experimentos de captação e extrusão). Em seguida, a mistura foi homogeneizada e aproximadamente 10 μL foram transferidos para um hemocitômetro, até preencher todo o seu espaço. O hemocitômetro foi levado ao microscópio óptico e foram contadas as células dos 4 quadrantes laterais (quadrantes em vermelho na **Figura 27**), tendo sido consideradas as células posicionadas sobre as linhas de borda superior e esquerda e desconsideradas as posicionadas sobre as linhas de borda inferior e direita. A viabilidade celular foi determinada através da razão entre células vivas e células mortas (coradas em azul). O resultado foi corrigido para o volume total da suspensão, e o fator de diluição foi calculado para o ensaio desejado.

Figura 27. Ilustração de um hematocitômetro, no qual são contadas as células presentes apenas nos quadrantes vermelhos.

Fonte: Adaptado de

<http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/Como-contar-celulas-con-camara-de-Neubauer-Paso1.php> e

<http://www.molecularlab.it/protocolli/protocol.asp?id=57> Acesso em 03 de novembro de 2015

A média foi calculada utilizando (Soma das células dos quatro quadrantes divididos por 4) a equação $m = x \div 4$, onde x = somatório do número de células dos quatro quadrantes. O número de células, em mL, foi calculado segundo a **Equação 1**, onde: fd = fator de diluição (= 2, pois a suspensão é misturada com o Tripan em igual proporção, 1:1) e fc = fator de correção (= 10^4 , valor convencionado).

Equação 1:
$$\frac{\text{Número de células}}{\text{mL}} = m \cdot fd \cdot fc$$

A viabilidade celular foi determinada através da razão entre as células vivas e mortas (coradas em azul pelo azul de tripan). O resultado foi, então, corrigido para o volume total da suspensão e o fator de diluição foi calculado para o ensaio realizado.

3.3.12 Síntese do complexo *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br por microondas

Foi realizada a síntese utilizando o aparelho de microondas Discover (CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System), com o intuito de comparar a eficiência de marcação entre o método de síntese convencional (aquecimento em banho-maria) com a síntese utilizando as microondas. Para isso, adicionou-se 1 mg do ligante **HL³** ao recipiente específico do microondas de 10 mL e em seguida adicionou-se 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 M, com pH = 7,4. A esse frasco, adicionou-se 0,2 mL de tampão NaHCO₃ 0,1 M, com pH = 8,2. Com o auxílio de uma micropipeta de 1 mL, adicionou-se a esse frasco 0,4 mL da solução contendo o *fac*-[[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺. Lacrou-se o frasco e colocou-se o mesmo no aparelho de microondas. O aquecimento foi feito utilizando-se os seguintes parâmetros: iniciou-se o aquecimento em 55 °C por 60 segundos utilizando uma potência de 20 W até chegar aos 75 °C. Em seguida, o sistema foi resfriado por 30 segundos até chegar à temperatura de 55 °C. Esses ciclos foram repetidos por 3 vezes, como pode ser observado na **Figura 28**.

Figura 28. Visor do aparelho de microondas (Discover, CEM Focused Microwave™ Synthesis System) mostrando os ciclos de aquecimento durante a síntese.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ligantes sintetizados nesse trabalho foram do tipo base de Schiff, formados através da condensação entre uma amina primária e uma cetona, podendo os produtos atuarem como ligantes tri e tetradentados. Os ligantes e os complexos foram devidamente caracterizados por ponto de fusão, espectrofotometria de absorção na região do infravermelho, RMN ^1H e microanálises (C, H e N). Os complexos foram caracterizados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C e difração de raios X em monocristal, os quais serão discutidos nos próximos tópicos.

4.1 Síntese e caracterização dos ligantes e complexos de rênio

4.1.1 Características dos compostos, rendimento e ponto de fusão

Inicialmente, os ligantes e complexos foram caracterizados por ponto de fusão, com o objetivo de verificar a pureza dos compostos. Os ligantes **HL**³ e **HL**⁵ não fundiram, mas degradaram, respectivamente, à 154 °C e 251 °C. Já o ligante **HL**⁴ degradou à 66 °C e fundiu-se à 100 °C (**Tabela 4**).

Tabela 4. Estado físico, cor, rendimento e ponto de fusão dos ligantes e complexos

Compostos	Estado físico	Cor	Rendimento (%)	Ponto de fusão (° C)
HL ¹	sólido	amarelo claro	88	201 - 204
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)]	sólido	amarelo claro	53	-
HL ²	sólido	amarelo claro	71	155 - 157
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br	sólido	amarelo claro	83	219 - 222
HL ³	sólido	bege	77	-
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ³)]	sólido	marrom claro	38	238 - 241
HL ⁴	sólido	bege	63	100 - 102
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br	sólido	branco	66	179 - 181
HL ⁵	sólido	branco	82	-
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br	sólido	branco	30	254 - 256
HL ⁶	sólido	branco	63	254 - 257
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br	sólido	branco	55	253 - 256

(-) compostos que degradaram, mas não fundiram.

4.1.2 Análise Elementar

As análises elementares de todos os compostos serão repetidas, uma vez que as mesmas apresentaram valores diferentes do esperado (**Tabela 5**).

Tabela 5. Análise elementar (CHN) dos ligantes e complexos

Compostos	Teórico/Experimental		
	C	H	N
HL ¹	70,29/70,93	6,29/6,57	10,93/10,76
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)]	40,9/44,24	3,43/3,07	5,30/5,07
HL ²	68,2/68,39	7,07/7,59	14,04/14,88
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br	36,81/34,79	3,71/3,92	6,44/7,93
HL ³	55,04/58,56	7,19/8,41	10,70/11,71
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br	45,39/34,23	4,90/3,65	7,56/5,15
HL ⁴	77,06/79,77	7,11/8,50	8,99/8,38
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br	48,29/46,55	4,42/4,19	5,12/5,87
HL ⁵	53,05/53,30	7,12/9,03	9,28/10,63
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br	39,65/44,75	4,63/4,93	6,03/6,55
HL ⁶	53,05/53,79	7,12/8,27	9,28/10,25
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br	39,65/43,28	4,63/5,24	6,03/6,62

4.1.3 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

As principais bandas de absorção vibracionais dos ligantes e complexos sintetizados encontram-se na **Tabela 6** e nos espectros vibracionais que serão discutidos a seguir (**Figuras 29 a 35**).

As vibrações de estiramento axial das hidroxilas (OH) aparecem normalmente na região entre 3700 a 3200 cm⁻¹. Nas moléculas nas quais a hidroxila não faz ligações de hidrogênio intermoleculares, observa-se essa banda entre 3700 a 3585 cm⁻¹[71,72]. Já em moléculas nas quais a hidroxila faz ligações de hidrogênio intermoleculares, observa-se o aparecimento de uma banda alargada adicional em uma frequência menor, na faixa de 3550 a 3200 cm⁻¹[71,72]. Tanto nos espectros dos ligantes HL^{1,2,4} quanto dos seus respectivos complexos, foram observadas bandas alargadas nessa região, devido à ligações de hidrogênio intermoleculares

entre o grupo fenol com as amins. Nos espectros, essa banda aparece ainda sobrepostas com as bandas das amins primárias e secundárias, que serão discutidas a seguir (**Figuras 29, 30 e 32**).

De acordo com a literatura, as amins primárias apresentam duas bandas entre 3400-3300 e 3330-3250 cm^{-1} que correspondem, respectivamente, aos modos de estiramento axial assimétricos e simétricos da ligações N-H[71,72]. Já as amins secundárias apresentam apenas uma banda fraca entre 3350-3310 cm^{-1} [71]. Os ligantes **HL**¹ e **HL**² são assimétricos e possuem um grupo NH₂ em uma das extremidades da molécula, apresentando as bandas características de amins primárias, conforme pode ser observado nos espectros (**Figuras 29 e 30**). Para o ligante **HL**² e para o seu respectivo complexo é observada uma banda fraca em 3326 cm^{-1} , correspondendo a banda de estiramento axial de N-H da amina secundária presente no meio da molécula. Para os ligantes **HL**³⁻⁶, são observadas somente bandas de amins secundárias nessa mesma região. No complexo **fac-[Re(CO)₃(L¹)]**, essas bandas aparecem mais bem definidas e com poucos deslocamentos em relação ao ligante livre. Já no complexo **fac-[Re(CO)₃(HL²)]Br**, devido às ligações de hidrogênio do grupo fenol e das amins do ligante, essa banda aparece alargada sobrepondo com as bandas das amins.

Tabela 6. Atribuição-tentativa para as bandas nos espectros na região do infravermelho em cm^{-1} para os ligantes e os seus respectivos complexos feitas em pastilhas de KBr[71–81]

Composto	Bandas (cm^{-1})									
	$\delta_{\text{oop}}(\text{C-H})_{\text{anel}}$	$\nu(\text{C-O-C})_{\text{éter}}_{\text{sim}}$	$\nu(\text{C-O-C})_{\text{éter}}_{\text{ass}}$	$\nu(\text{C-O})_{\text{fenol}}$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{CO})_{\text{carbonilas}}$	$\nu(\text{NH})_{\text{sim}}$	$\nu(\text{NH})_{\text{ass}}$	$\nu(\text{NH})_{\text{sec}}$	$\nu(\text{O-H})$
HL ¹	756	-	-	1261	1605	-	3287	3344	-	3690 a 3375
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)]	758	-	-	1240	1605	2012, 1892 1886	3285	3338	-	3650 a 3200
HL ²	758	-	-	1259	1605	-	3252	3393	-	3700 a 3360
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br	758	-	-	1290	1605	2023, 1896	3124	3198	-	3700 a 3200
HL ³	744	-	-	-	-	-	-	-	~3040	-
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br	744	-	-	-	-	2017, 1909, 1890	-	-	3095	-
HL ⁴	700	-	-	1248	-	-	-	-	3282	3700 a 3100
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br	700	-	-	1261	-	2027, 1917, 1890	-	-	3132	3700 a 3000
HL ⁵	820	1254	1034	-	-	-	-	-	~3010	-
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br	845	1250	1032	-	-	2023, 1910, 1894	-	-	3059	-
HL ⁶	781	1267	1045	-	-	-	-	-	~3050	-
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br	799	1265	1040	-	-	2021, 1906, 1888	-	-	3078	-

Figura 29. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante HL^1 (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$ (azul).

Nos ligantes $\text{HL}^{3,5,6}$, que estão isolados na forma de um sal cloridrato, são observadas múltiplas bandas com fortes absorções na região de 2700 a 2330 cm^{-1} . Essas bandas são comuns em sais de aminas terciárias e ocorrem devido às vibrações envolvendo os estiramentos e sobreposições da ligação $\text{N}^+\text{-H}$ ou ainda à combinação de bandas na ressonância de Fermi[82]. A ressonância de Fermi é o deslocamento das energias e intensidades das bandas de absorção observado tanto na espectroscopia de absorção na região do infravermelho quanto no Raman. Esse efeito acontece quando duas bandas vibracionais têm quase a mesma energia e simetria, resultando na separação dessas bandas no espectro. Dessa maneira, são

observadas duas bandas fortes no espectro, ao invés de uma banda forte e outra fraca[83]. Devido à intensidade e alargamento dessas bandas, as bandas de estiramento axial das aminas secundárias aparecem sobrepostas com as mesmas.

O arranjo facial dos grupos carbonílicos nos complexos sintetizados com os ligantes **HL**¹⁻⁶ foram confirmados pela presença das fortes bandas de estiramento C≡O características desse tipo de composto, que aparecem entre 2028 e 1886 cm⁻¹. Comparando-se o espectro do complexo precursor [Re(CO)₅Br] com os complexos sintetizados nesse trabalho, pôde-se observar que os estiramentos axiais das bandas das carbonilas aparecem deslocadas para números de onda inferiores. Tal fato sugere que a ligação C≡O no complexo precursor ser mais forte do que nos complexos sintetizados, o que resulta em uma retrodoação π do metal mais forte para esses complexos do que no precursor. Outra explicação é o caráter σ-doador dos ligantes quelados nos complexos, que aumentam a densidade eletrônica no centro metálico. Uma vez que o complexo precursor possui 5 carbonilas coordenadas ao átomo de rênio, há uma maior competição dessas carbonilas pela retrodoação π do centro metálico do que nos complexos sintetizados, necessitando de mais energia para que ocorram os estiramentos nas ligações das carbonilas. Como consequência, as bandas das carbonilas aparecem em números de onda maiores[71,72].

Seguindo para a próxima faixa do espectro vibracional, é observada uma banda intensa em 1605 cm⁻¹ tanto nos complexos quanto nos ligantes,. Esse estiramento é referente à ligação C=N do grupo imínico da base de Schiff dos ligantes. Essa banda é um dos principais indicativos da formação da imina, pois, comparando os espectros dos reagentes de partida com o ligante formado, é observado o desaparecimento da banda C=O da cetona ou do aldeído (que geralmente aparece em maiores números de onda) e o aparecimento da banda C=N em comprimentos de onda menores. Nos complexos **fac-[Re(CO)₃(L¹)]** e **fac-[Re(CO)₃(HL²)]Br** essas bandas não sofrem nenhum deslocamento em relação ao ligante livre. Uma vez que os ligantes **HL**³⁻⁶ não possuem mais o grupo azometino, essa banda não é observada no espectro.

Ainda na mesma faixa espectral são observadas, tanto nos ligantes como nos seus respectivos complexos, bandas referentes às bandas de estiramento axial dos anéis aromáticos. Essas bandas costumam aparecer em pares entre 1600 e 1475 cm⁻¹[71]. Essa bandas permanecem praticamente inalteradas nos complexos. Nos

ligantes **HL**^{1,2} e nos seus complexos essas bandas aparecem sobrepostas com as bandas do grupo azometino.

Figura 30. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante **HL**² (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ (azul).

Na região espectral de 1260 a 1000 cm^{-1} , é observada uma banda intensa de estiramento axial relativos à ligação simples C-O dos álcoois[71,72]. Em alguns casos, as absorções da ligação C-O podem estar acopladas com as vibrações das ligações C=C[72]. Dessa maneira é possível, através da posição da banda da carbonila, atribuir se o álcool na molécula é primário, secundário, terciário ou ainda, se o composto é um fenol[72]. Essa banda aparece deslocada em maiores números de onda na seguinte ordem: fenóis > álcool terciário > álcool secundário > álcool primário[72]. Nos ligantes é observada uma banda intensa em torno de 1260 cm^{-1}

referente as ligações C-O dos fenóis. Após complexados, são observados nos espectros dos complexos com os ligantes **HL**^{3,5,6} deslocamentos acima de 20 cm⁻¹ para essa banda.

Figura 31. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm⁻¹) do ligante **HL**³ (preto), [Re(CO)₅Br] (vermelho) e do complexo *fac*-[Re(CO)₃(**HL**³)]Br (azul).

Ainda na mesma faixa do espectro, são observadas as bandas de estiramento axial assimétrica e simétrica da ligação C-O-C dos éteres. Em alquil-aril éteres, as bandas de estiramento simétrico e assimétrico costumam aparecer, respectivamente, entre 1275 a 1200 cm⁻¹ e 1075 a 1020 cm⁻¹[71]. Nos ligantes **HL**⁵ e **HL**⁶, as bandas de estiramento assimétricas aparecem, respectivamente, em 1254 e 1267 cm⁻¹,

enquanto as assimétricas aparecem em 1034 e 1045 cm^{-1} . Uma vez que o éster nesses ligantes estão na posição *para* e *meta* no anel, não são observados grandes deslocamentos dessas bandas no espectro.

Figura 32. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante HL⁴ (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ (azul).

Figura 33. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante HL^5 (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ (azul).

Tanto nos espectros dos complexos quanto dos ligantes, aparece em torno de 756 cm^{-1} uma banda intensa, que pode ser atribuída a banda de deformação angular fora do plano da ligação C-H do anel, que aparece frequentemente entre 900 e 675 cm^{-1} . Essa absorção é muito intensa e é resultante de um forte acoplamento da ligação C-H com os outros átomos de hidrogênio adjacentes no anel[72]. Dessa maneira, através da posição dessa banda no espectro, é possível atribuir as posições dos substituintes no anel aromático[71,72]. Para anéis aromáticos dissustituídos essa banda costuma aparecer em torno de 750 cm^{-1} . Foram observados deslocamentos dessa banda somente nos complexos **fac-**

$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ e *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$, que apresentou, respectivamente, um deslocamento de 25 e 18 cm^{-1} .

Figura 34. Comparação dos espectros vibracionais (Transmitância x Número de onda cm^{-1}) do ligante HL^6 (preto), $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}]$ (vermelho) e do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ (azul).

4.1.4 Espectroscopia eletrônica na região do UV-visível

Para efeito de comparação, foram realizados os espectros eletrônicos na região do ultravioleta visível tanto dos ligantes quanto dos seus respectivos complexos. Conforme é conhecido na literatura, o anel benzênico apresenta três transições eletrônicas características em 184, 204 e 256 nm, que são relacionadas

às transições $\pi \rightarrow \pi^*$, nas quais as substituições no anel por grupos cromóforos ou auxocromos podem causar deslocamentos dessas bandas para o vermelho[71,72,74–76]. Já as bandas referentes às transições $n \rightarrow \pi^*$ ($C=N$) normalmente ocorrem entre 270 e 300 nm, podendo-se deslocar quando os cromóforos na molécula estão em sistemas conjugados[72,74]. Grupos eletrônicos doadores no anel aromático geralmente ocasionam um deslocamento batocrômico nos espectros[76].

São observadas nos espectros tanto dos ligantes quanto dos complexos as bandas referentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ ($C=C$) dos anéis aromáticos (**Figuras 35 a 46**). É possível observar ainda nos espectros dos ligantes **HL¹** e **HL²**, bem como nos seus respectivos complexos, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ ($C=N$) e $n \rightarrow \pi^*$ ($C=N$) referentes ao grupo imínico (**Figuras 35 e 38**). No espectro do complexo **fac-[Re(CO)₃(HL²)]Br** é observado o desaparecimento da transição $n \rightarrow \pi^*$ ($C=N$) do ligante livre em 400 nm (**Figura 38**). Os coeficientes de absorvidade molar das bandas dos ligantes e complexos foram obtidos através dos cálculos de regressão linear utilizando quatro concentrações diferentes dos mesmos (**Figura 37-a e b e Tabela 7**).

As transições $n \rightarrow \pi^*$ do cromóforo $C=N$ envolvem a promoção de um dos pares de elétrons do átomo de nitrogênio para o orbital π^* do grupo imínico[73]. Geralmente, nas transições eletrônicas envolvendo átomos de nitrogênio, as bandas $n \rightarrow \pi^*$ aparecem menos intensas e com menores energias em relação às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ [73]. Nos ligantes **HL³⁻⁶** e nos seus respectivos complexos não são observadas as transições eletrônicas do grupo cromóforo $C=N$, uma vez que nessas moléculas o grupo azometino foi reduzido.

Comparando o ligante **HL¹** com o seu respectivo complexo, pôde-se observar que no espectro do complexo todas as outras bandas sofreram deslocamentos hipsocrômicos, com exceção da banda mais deslocada para o azul (222 nm). Já o complexo **fac-[Re(CO)₃(HL²)]Br** apresentou comportamento contrário, sendo observado um deslocamento batocrômico em todas as suas bandas. Uma vez que as transições d-d são bandas com baixos valores de ϵ , foi realizada a medida dos complexos na concentração da ordem de 10^{-3} mol.L⁻¹. As bandas d-d são proibidas pela regra de Laporte e costumam ser pouco intensas, diferentemente das bandas de transições dos ligantes e das bandas de transferência de carga, que são permitidas e muito intensas[84]. Os espectros apresentando essas transições

aparecem ampliado abaixo dos espectros dos ligantes/complexos para que fossem melhor visualizadas.

Tabela 7. Máximos de absorção na região do ultravioleta-visível e coeficientes de extinção molar calculados para o ligante e o seu respectivo complexo e atribuições-tentativas para as transições eletrônicas de acordo com a literatura[73–77,79–81]

Compostos	λ (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Transições eletrônicas
HL¹	214	63400	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	258	18400	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	280	11300	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	319	7200	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=N)
	400	3400	$n \rightarrow \pi^*$ (C=N)
fac-[Re(CO)₃(L¹)]	222	19300	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	240	21500	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	274	11700	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	308	7400	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=N)
	390	1800	$n \rightarrow \pi^*$ (C=N)
HL²	217	24700	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	256	8800	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	279	6200	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	317	3200	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=N)
	400	2400	$n \rightarrow \pi^*$ (C=N)
fac-[Re(CO)₃(HL²)]Br	217	25700	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	260	9100	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	282	7400	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	306	5300	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=N)
HL³	251	282	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	256	356	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	261	340	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	267	228	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
fac-[Re(CO)₃(HL³)]Br	252	5300	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	258	5600	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
HL⁴	205	61200	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	231	29500	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	280	4600	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)

Continuação da Tabela 7.

Compostos	λ (nm)	ε (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Transições eletrônicas
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br	240	20100	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	283	4100	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
HL ⁵	218	12000	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	271	1400	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	277	1200	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br	227	5800	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	261	2100	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	280	1900	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
HL ⁶	218	10200	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	274	3000	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	280	2700	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br	227	3500	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)
	261	940	$\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C)

Figura 35. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL¹ e do complexo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)] em metanol à 25 °C.

Figura 36. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)] na concentração 10⁻³ mol L⁻¹ em metanol à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.

Figura 37. a) Espectros de absorbância vs. comprimento de onda do complexo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)] em diferentes concentrações em metanol; b) Curva de regressão linear para determinação do coeficiente de absorvância molar do complexo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)] em metanol com $\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ nm}$ e caminho óptico de 1 cm à 25 °C.

Figura 38. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL^2 e do complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^2)]Br$ em etanol à 25 °C.

Figura 39. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^2)]Br$ na concentração $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.

Para que fosse possível comparar os espectros do ligante **HL**³ com o seu complexo, foi utilizada uma mistura equivalente de solventes (água e metanol), uma vez que o ligante não era solúvel em metanol e o complexo não era em água. Como pode ser observado na **Figura 40**, o ligante **HL**³ quando livre apresenta 4 bandas, com baixos valores de ϵ . Após a complexação, é observado o desaparecimento das 2 bandas do ligante mais deslocadas para o vermelho (261 e 267 nm), enquanto que as bandas mais deslocadas no azul permanecem praticamente inalteradas. O valor do coeficiente de extinção molar para esse ligante é bem baixo em todas as bandas, como pode ser observado na **Tabela 7**.

Os ligantes **HL**⁴⁻⁶ apresentam três bandas quando estão na sua forma livre, referentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C) dos anéis aromáticos (**Figuras 42, 44 a 46**). Após complexados, é observado o desaparecimento de uma dessas bandas em relação ao ligante livre nos complexos **fac-[Re(CO)₃(HL⁴)]Br** e **fac-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br**.

Nos complexos **fac-[Re(CO)₃(L¹)]** e **fac-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br**, a banda mais deslocada para o azul (222 e 227 nm, respectivamente) aparece na forma de um ombro, tornando difícil uma avaliação mais detalhada do espectro. Após a complexação, foi observado nos espectros dos complexos com os ligantes **HL**^{1,4,5,6} uma diminuição no valor do coeficiente de extinção molar para a banda mais próxima do azul (em torno de 210 nm), caindo em alguns casos para quase um terço do valor em relação ao ligante está livre. Ainda em relação aos complexos, outro fato observado é que em nenhum dos espectros foi possível observar as transições d-d dos mesmos.

Figura 40. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL^3 e do complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^3)]Br$ em etanol/água (1:1) à 25 °C.

Figura 41. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^3)]Br$ na concentração $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol/água à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.

Figura 42. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL^4 e do complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^4)]Br$ em metanol à 25 °C.

Figura 43. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^4)]Br$ na concentração $10^{-3} mol L^{-1}$ em metanol à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.

Figura 44. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL^5 e do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ em água à 25 °C.

Figura 45. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ na concentração $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em água à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.

Figura 46. Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Visível do ligante HL^6 e do complexo $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ em água à 25 °C.

Figura 47. Ampliação do espectro de absorbância vs. comprimento de onda do complexo $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ na concentração $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em água à 25 °C para melhor visualização da banda d-d.

4.1.5 Espectrometria de massas

A técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray ESI-MS foi realizada com o objetivo de confirmar a composição química dos compostos sintetizados nesse trabalho. No processo de análise das amostras foi utilizando como solvente o metanol, uma vez que é um solvente que apresenta um ponto de ebulição moderado, sem que haja a necessidade da utilização de altas temperaturas.

Esta técnica foi realizada no modo positivo tanto para os ligantes quanto para os complexos, apresentando o pico do íon molecular, assim como a sua distribuição isotópica. Em todos os casos, os espectros dos compostos analisados (linha preta) foram comparados com os espectro simulados (linha vermelha) (**Figuras 48 a 59** e Tabela 8). Para os espectros teóricos foi utilizada a ferramenta da web (www.sisweb.com/mstools/isotope.htm), na qual a distribuição isotópica foi calculada baseada na massa molar dos compostos.

Tabela 8. Valores de m/z (calculado e experimental) dos ligantes e complexos de rênio

Compostos	Calculado* (m/z)	Experimental (m/z)
HL ¹	257,12902	257,12799
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)]	527,06172	527,05963
HL ²	300,17121	300,17099
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br	570,10392	570,10
HL ³	284,21267	284,21164
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ³)]Br	554,14538	554,14441
HL ⁴	468,26511	468,26358
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁴)]Br	738,19781	738,19611
HL ⁵	344,23381	344,23270
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br	614,16652	614,16431
HL ⁶	344,23381	344,23245
<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br	614,16652	614,16791

*(www.sisweb.com/mstools/isotope.htm)

Figura 48. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o ligante HL¹: (–) experimental e (–) simulado.

ENF+ 151113144604 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 4.16E9
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-600.00]

Figura 49. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o ligante HL²: (–) experimental e (–) simulado.

DNF+ 151108171220 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 4.32E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-400.00]

Figura 50. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o ligante HL³: (–) experimental e (–) simulado.

BDALR+_151113141356 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.34E9
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-600.00]

Figura 51. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o ligante HL⁴: (–) experimental e (–) simulado.

BDHBR+_151113112822 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 5.10E9
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-600.00]

Figura 52. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o ligante HL⁵: (–) experimental e (–) simulado.

P-EPX+_151113144604 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 2.80E9
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-700.00]

Figura 53. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o ligante HL⁶: (–) experimental e (–) simulado.

M-EPX+_151113144604 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.87E9
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-1000.00]

Figura 54. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o complexo $fac-[Re(CO)_3(L^1)]$: (—) experimental e (—) simulado.

henrique1+_140801111624 #3 RT: 0.09 AV: 1 NL: 1.23E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

Figura 55. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^2)]Br$: (—) experimental e (—) simulado.

henrique2+_140801111624 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.48E9
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

Figura 56. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^3)]Br$: (–) experimental e (–) simulado.

Re-BDAZ+_151113144604 #3 RT: 0.09 AV: 1 NL: 7.81E9
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-1000.00]

Figura 57. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^4)]Br$: (–) experimental e (–) simulado.

Re-BDHBR+_151113111012 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.71E9
T: FTMS + p ESI Full ms [300.00-1000.00]

Figura 58. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^5)]Br$: (–) experimental e (–) simulado.

Re-PEPX+_151113144604 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 8.34E9
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-800.00]

Figura 59. Espectro de massas ESI-MS $[M+H]^+$ para o complexo $fac-[Re(CO)_3(HL^6)]Br$: (–) experimental e (–) simulado.

Re-MEPX+_151113144604 #2 RT: 0.06 AV: 1 NL: 4.67E9
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-800.00]

Nas reação de complexação com o centro metálico de rênio, o ligante **desprotonou**, gerando dessa maneira um complexo neutro. Foi observado no complexo **fac-[Re(CO)₃(L¹)]** o pico do íon molecular protonado com valores de m/z de 527,05963, apresentando a distribuição isotópica de acordo com a esperada. Uma vez que os outros complexos são catiônicos, foram observados nos espectros o pico do íon molecular com a massa relativa à parte catiônica dos mesmos.

Foram observados tanto no espectro do ligante **HL⁴**, como no complexo formado com o mesmo, dois picos de maior intensidade. Como será discutido nos próximos tópicos, os espectros de RMN de H e ¹³C e os dados de análise elementar mostram que esse ligante é simétrico, pois formou-se a base de Schiff dos dois lados da dietilenotriamina. Foi observado no espectro desse ligante um pico de menor intensidade com valor de m/z de 286,19095. Uma possibilidade para explicar tal fato, seria a quebra desse ligante em um dos lados durante a análise, formando dessa maneira um ligante assimétrico (**Figura 60**). O espectro de massas do complexo com esse ligante apresentou também dois sinais com valores de m/z de 556,12299 e 738,19611(**Figura 57**). Uma hipótese para tal fato seria a fragmentação do ligante durante a análise ou, ainda, durante a reação de complexação com o centro metálico de Re(I). Dessa maneira, o sinal de menor valor seria relativo ao fragmento catiônico do complexo com essa molécula assimétrica.

Figura 60. Ligante HL⁴ (simétrico) e fragmento assimétrico com m/z = 286,19095.

4.1.6 Difração de Raios X em Monocristal

Dentre os seis complexos sintetizados nesse trabalho, conseguiu-se obter cristais de quatro destes, que foram os complexos ***fac*-[Re(CO)₃(L¹)]**, ***fac*-[Re(CO)₃(HL²)]Br**, ***fac*-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br** e ***fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br** (Figuras 61 a 66). O complexo ***fac*-[Re(CO)₃(L¹)]** cristalizou-se em um sistema monoclinico, com grupo espacial P2₁/_n (Figura 61). O átomo de rênio no complexo ***fac*-[Re(CO)₃(L¹)]** apresenta-se hexacoordenado com três carbonilas em modo facial com o ligante HL¹ desprotonado, coordenado também em modo facial N,N',O, formando um anel quelato de cinco e outro de seis membros.

Figura 61. Estrutura molecular do complexo ***fac*-[Re(CO)₃(L¹)]**.

Os comprimentos de ligação do átomo de rênio(I) aos átomos de carbono das carbonilas (1,901–1,930 Å) aparecem na faixa observada para complexos similares (1,90 – 1,92 Å)¹⁵. Já o comprimento de ligação para os átomos na ligação **Re-N2** de 2,1447Å é típico para ligações de Re-N_(imina) para bases de Schiff coordenadas ao rênio[68]. Alguns comprimentos de ligação e ângulos para esse complexo são mostrados na **Tabela 9** e os dados cristalográficos dos cristais medidos estão dispostos na **Tabela 10**. Foi observado ainda para o complexo ***fac*-[Re(CO)₃(L¹)]**

que o átomo que ocupa a posição axial do octaedro *trans* à uma das carbonilas é o átomo de oxigênio. A distorção da idealidade octaédrica resulta principalmente dos ângulos *trans*, que caem numa faixa de 170,94 a 176,15^{o15}. Dentre as três carbonilas ligadas ao átomo de rênio, é observado um maior ângulo *trans* para aquela que está *trans* ao átomo de oxigênio do ligante.

Tabela 9. Comprimentos de ligação selecionados (Å) e ângulos (°) em *fac*-[Re(CO)₃(L¹)]

Re–C15	1,930(2)	O5–C17	1,163(3)	C17–Re–O1	93,29(7)
Re–C16	1,908(2)	Re–O1	2,1196(14)	C15–Re–N2	170,94(7)
Re–C17	1,901(2)	Re–N2	2,1447(16)	C16–Re–O1	176,15(7)
O3–C15	1,154(3)	Re–N3	2,2368(18)	C17–Re–N3	174,13(8)
O4–C16	1,158(3)	C17–Re–C16	88,40(8)	C16–Re–N3	93,95(8)

Tabela 10. Dados cristalográficos de raios X e resultados dos refinamentos das estruturas dos complexos *fac*-[Re(CO)₃(L¹)], *fac*-[Re(CO)₃(HL²)]Br, *fac*-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br e *fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br

	<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)]	<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br	<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br	<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br
Fórmula Molecular	C ₁₈ H ₁₅ N ₂ O ₅ Re	C ₂₄ H ₃₃ BrN ₃ O ₇ Re	C ₂₃ H ₂₉ BrN ₃ O ₅ Re	C ₂₃ H ₂₉ BrN ₃ O ₅ Re
Massa Molecular	525,52	741,64	693,60	693,60
Temperatura	203(2) K	296(2) K	100(2) K	296(2) K
Comprimento da radiação	0,71073 Å	0,71073 Å	0,71073 Å	0,71073 Å
Sistema Cristalino	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo Espacial	P2 ₁ /n	P $\bar{1}$	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n
Parâmetros da Cella Unitária	a = 7,7659(2) Å	a = 8,6596(3) Å	a = 10,8884(7)	a = 15,1702(3)
	b = 11,6083(2) Å	b = 12,6528(4) Å	b = 7,5018(5)	b = 16,8677(3)
	c = 18,9195(4) Å	c = 14,7087(5) Å	c = 31,0552(19)	c = 20,9469(4)
	α = 90°	α = 67,4090(10)°	α = 90°	α = 90°
	β = 92,4320(10)°	β = 75,7490(10)°	β = 95,918(2)	β = 107,7590(10)°
	γ = 90°	γ = 76,3060(10)°	γ = 90°	γ = 90°
Volume	1704,04(6) Å ³	1423,84(8) Å ³	2523,1(3) Å ³	5104,61(17) Å ³
Z	4	2	4	4

Continuação da Tabela 10

	<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (L ¹)]	<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ²)]Br	<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁵)]Br	<i>fac</i> -[Re(CO) ₃ (HL ⁶)]Br
Densidade (calculada)	2,048 Mg/m ³	1,730 Mg/m ³	1,826 Mg/m ³	1,805 Mg/m ³
Coeficiente de Absorção	7,164 mm ⁻¹	5,715 mm ⁻¹	6,437 mm ⁻¹	6,363 mm ⁻¹
Alcance de θ para coleta de dados	2,06 to 30,40°	1,77 to 25,12°	2,41 to 25,08°	1,58 to 25,39°
Índices (h, k, l)	-10<= h <=3, -14<= k <=16, -26<= l <=23	-10<= h <=9, -15<= k <=14, -17<= l <=17	-12<= h <=12, -8<= k <=4, -36<= l <=33	-18<= h <=18, -17<= k <=25, -25<= l <=25
Reflexões Coletadas	13799	17324	13201	43358
Reflexões Independentes	4567 [R(int) = 0.0158]	5040 [R(int) = 0,0191]	4350 [R(int) = 0,0383]	9376 [R(int) = 0.0341]
Método de Refinamento	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²	Full-matrix least-squares on F ²
Dados/restrições/parâmetros	4567 / 0 / 238	5040 / 3 / 347	4350 / 18 / 294	9376 / 2 / 607
“Qualidade de ajuste” sobre F ²	1,028	1,086	1,046	1,042
Fatores de R finais [$l > 2\sigma(l)$]	R ₁ = 0,0150, wR ₂ = 0,0339	R ₁ = 0,0458, wR ₂ = 0,1390	R ₁ = 0,0596, wR ₂ = 0,1683	R ₁ = 0,0518, wR ₂ = 0,1709

Diferentemente do complexo discutido anteriormente com o ligante **HL¹**, os ligantes **HL^{2,5,6}** coordenam-se ao átomo de rênio em modo facial *N,N,N''*. O complexo **fac-[Re(CO)₃(HL²)]Br** cristalizou-se em um sistema triclinico com grupos espacial $P\bar{1}$ (**Figura 52**). Já os complexos **fac-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br** e **fac-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br** cristalizaram-se em um sistema monoclinico com grupos espaciais, respectivamente, $P2_1/c$ e $P2_1/n$ (**Figuras 53 e 55**). A análise estrutural de raios X confirma que o átomo de rênio nesses três complexos está hexacoordenado, possuindo em uma das faces do pseudo-octaedro três carbonilas e na outra o ligante tridentado.

O três complexos em questão são catiônicos, possuindo como contra-íon o íon brometo labilizado do complexo precursor durante as sínteses. Após complexado, o ligante forma em torno do centro metálico dois anéis quelatos de cinco membros. Para os complexos **fac-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br** e **fac-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br**, é possível ainda observar na estrutura cristalina as ligações de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio do ligante com os átomos de nitrogênio e oxigênio do próprio ligante, assim como com o contra-íon bromo do complexo (**Figuras 62 e 64**).

Em complexos de Re^I com ligantes derivados da dietilenotriamina, os comprimentos de ligação do átomo de Re^I aos átomos de carbono das carbonilas caem na faixa de 1,90 a 1,92 Å. No complexo obtido, os comprimentos dessas ligações estão na faixa de 1,899 a 1,927 Å, que são condizentes com os valores encontrados na literatura[85–87]. Os desvios da idealidade octaédrica podem ser observados nos ângulos ao redor do átomo de rênio. Devido a diferença dos ligantes, os ângulos *cis* na molécula apresentam grandes desvios (76,5 a 103,6°), que fogem da idealidade da geometria octaédrica. São observadas também distorções nos ângulos *trans* formados entre os átomos das carbonilas e do ligante (170,1 a 175,1°). Alguns comprimentos de ligação e ângulos são mostrados nas **Tabelas 11, 12 e 13**.

Figura 62. Estrutura molecular do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL²)]Br.

Tabela 11. Comprimentos de ligação selecionados (Å) e ângulos (°) em *fac*-[Re(CO)₃(HL²)]Br

Re(1)-C(1)	1,899(9)	Re(1)-N(3)	2,215(7)	C(1)-Re(1)-N(3)	172,6(3)
Re(1)-C(3)	1,894(9)	C(3)-Re(1)-C(1)	90,0(4)	C(26)-Re(1)-N(2)	173,8(3)
Re(1)-C(26)	1,926(10)	C(3)-Re(1)-C(26)	84,7(4)	C(3)-Re(1)-N(1)	171,1(3)
Re(1)-N(1)	2,211(7)	C(1)-Re(1)-C(26)	89,6(4)	C(1)-Re(1)-N(1)	93,1(3)
Re(1)-N(2)	2,197(7)	C(3)-Re(1)-N(2)	94,8(4)	C(26)-Re(1)-N(1)	103,6(3)

Figura 63. Estrutura molecular do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br.

Figura 64. Ligações de hidrogênio presentes na estrutura cristalina do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br.

Tabela 12. Comprimentos de ligação selecionados (Å) e ângulos (°) em *fac*-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br

Re(1)-C(1)	1,925(12)	Re(1)-N(3)	2,255(9)	C(2)-Re(1)-N(2)	175,1(4)
Re(1)-C(2)	1,918(11)	C(2)-Re(1)-C(3)	86,7(4)	C(3)-Re(1)-N(3)	173,1(4)
Re(1)-C(3)	1,919(11)	C(2)-Re(1)-C(1)	88,7(4)	O(1)-C(1)-Re(1)	176,9(9)
Re(1)-N(1)	2,194(8)	C(3)-Re(1)-C(1)	89,1(5)	O(2)-C(2)-Re(1)	177,6(9)
Re(1)-N(2)	2,232(9)	C(1)-Re(1)-N(1)	172,3(4)	O(3)-C(3)-Re(1)	176,8(10)

Figura 65. Estrutura molecular do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br.

Figura 66. Ligações de hidrogênio presentes na estrutura cristalina do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br.

Tabela 13. Comprimentos de ligação selecionados (Å) e ângulos (°) em *fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br

Re(1)-C(1A)	1,914(10)	Re(1)-N(3A)	2,247(7)	C(2A)-Re(1)-N(3A)	172,2(4)
Re(1)-C(2A)	1,912(10)	O(1A)-C(1A)-Re(1)	176,4(9)	C(3A)-Re(1)-N(1A)	173,8(3)
Re(1)-C(3A)	1,927(11)	O(3A)-C(3A)-Re(1)	176,0(8)	C(1A)-Re(1)-N(1A)	96,2(4)
Re(1)-N(1A)	2,195(7)	O(2A)-C(2A)-Re(1)	179,6(10)	C(2A)-Re(1)-N(2A)	93,9(3)
Re(1)-N(2A)	2,267(7)	C(1A)-Re(1)-N(2A)	174,8(4)	C(3A)-Re(1)-N(2A)	98,8(3)

Nos complexos *fac*-[Re(CO)₃(L¹)] e *fac*-[Re(CO)₃(HL²)]Br, aminas primárias e secundárias aparecem coordenadas simultaneamente ao átomo de rênio. Comparando os comprimentos de ligação entre o átomo de nitrogênio dos ligantes e o de rênio nesses complexos, é observada uma maior distância entre esses átomos na amina primária do que na secundária. Os comprimentos de ligação entre esses dois átomos na amina primária são consistentes com o tipo de hibridização sp³ dos átomos doadores de nitrogênio[85]. Devido aos tipos de hibridização dos átomos de nitrogênio, é conhecido na literatura que átomos de nitrogênio em hibridização sp² podem formar ligações menores entre os átomos de rênio e nitrogênio hibridizados em sp³[87–89].

4.1.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

4.1.7.1 RMN ¹H dos ligantes

Através dos espectros de RMN de ¹H dos ligantes foi possível observar os sinais característicos dos mesmos, complementando dessa maneira as outras análises realizadas. Uma vez que o ligante HL⁴ é inédito, além do RMN de ¹H, foram realizados experimentos de RMN de ¹³C e DEPT 90 e 135 para caracterizá-lo. A tentativa-atribuição dos sinais nos espectros foi feita através da comparação do espectro simulado pelo programa Chemdraw Ultra 12 com o espectro obtido experimentalmente.

Para o ligante HL¹, foi observado um conjunto de sinais correspondentes aos metilenos da etilenodiamina, na região entre 2,99 e 3,53 ppm, e outro conjunto de

sinais referentes aos átomos de hidrogênio aromáticos entre 6,58 e 7,37 ppm (Figura 67 e Tabela 14).

Figura 67. Espectro de RMN ^1H do ligante HL^1 em CD_3OD , 400 MHz.

Tabela 14. Informações do espectro de RMN de ^1H do ligante HL^1 em CD_3OD , 400 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, b, c,			
d, e, f,	8 H	6,58 – 7,43	m
g, h			
i	2H	3,53	s
j	2 H	2,99	s

Para o ligante HL^2 foi observado um conjunto de sinais correspondentes aos oito átomos de hidrogênio metilênicos da dietilenotriamina, entre 2,69 e 3,62 ppm. Devido ao momento de quadrupolo do átomo de nitrogênio, os sinais dos átomos de hidrogênio dos metilenos próximos aos átomos de nitrogênio da amina e imina não aparecem bem definidos, sendo por isso impossível determinar com exatidão a sua multiplicidade. Em campo mais baixo são observados os sinais referentes aos

átomos de hidrogênio aromáticos entre 6,53 e 7,34 ppm, com integração para oito átomos ((**Figura 68** e **Tabela 15**).

Figura 68. Espectro de RMN ^1H do ligante HL^2 em CD_3OD , 400 MHz.

Tabela 15. Informações do espectro de RMN de ^1H do ligante HL^2 em CD_3OD , 400 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, b, c, d, e, f, g, h	8 H	6,53 – 7,34	m
i, j	4 H	3,60 – 3,47	m
k, l	4 H	2,99 – 2,69	m

O espectro de RMN de ^1H do ligante HL^3 ((**Figura 69** e **Tabela 16**) apresenta dois multipletos em campo mais alto: um entre 3,12 e 3,15 ppm e outro entre 3,20 e 3,25 ppm, correspondendo a oito átomos de hidrogênio metilênicos da dietilnotriamina. Em 4,16 ppm é observado um simpleto referente a quatro átomos

de hidrogênio dos metilenos ligados ao anel aromático, provenientes da redução da base de Schiff precursora. Entre 7,34 e 7,36 ppm aparece um multipeto referente aos átomos de hidrogênio aromáticos. No espectro não foi possível observar os átomos de hidrogênio das aminas secundárias.

Figura 69. Espectro de RMN ^1H do ligante HL^3 em D_2O , 400 MHz.

Tabela 16. Informações do espectro de RMN de ^1H do ligante HL^3 em D_2O , 400 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, a' b, b' c, c' d, d' e, e'	10 H	7,34 – 7,39	m
f, f'	4 H	4,16	s
g, g', h, h'	4 H	3,12 – 3,15	m
	4 H	3,20 – 3,25	m

Já o espectro de RMN de ^1H do ligante HL^4 apresenta dois conjuntos de sinais: um entre 2,41 e 2,48 ppm e outro entre 2,55 e 2,58 ppm correspondendo a oito átomos de hidrogênio metilênicos da dietilnotriamina (**Figura 70 e Tabela 17**). O

sinal de N-H aparece em 3,36 ppm como um simpleto de baixa intensidade alargado e em 5,74 ppm aparece um simpleto agudo, atribuído aos átomos de hidrogênio das hidroxilas dos grupos fenóis. Em 4,65 ppm é observado um multipletto referente a dois átomos de hidrogênio provenientes da redução da base de Schiff precursora do ligante. Entre 7,34 e 7,36 ppm aparece um multipletto referente aos átomos de hidrogênio aromáticos.

Figura 70. Espectro de RMN ^1H do ligante HL^4 em DMSO, 400 MHz.

Tabela 17. Informações do espectro de RMN de ^1H do ligante HL^4 em DMSO, 400 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, a' b, b' c, c', d, d', e, e', f, f', g, g', h, h', i, i', j, j'	10 H	6,58 - 7,37	m
j, j'	4 H	4,65 – 4,66	m
k, k', l, l'	8 H	2,42 – 2,58	m

O espectro de RMN de ^{13}C corrobora com o de ^1H , confirmando a estrutura proposta. Uma vez que a molécula é simétrica, no espectro aparecem apenas um sinal para os átomos de carbono que estão no mesmo ambiente químico, conforme pode ser observado no espectro a seguir (**Figura 71**). São observados em 47,14 e 48,72 ppm os sinais referentes a quatro átomos de carbono metilênicos do ligante (**Tabela 18**). Em 66,02 ppm aparece o sinal do átomo de carbono quartenário **Ci**. De acordo com a simetria da molécula, são observados oito sinais referentes a doze átomos de carbono aromáticos, devido ao fato dos pares de átomos de carbono **Cc** e **Cc'**, **Cd** e **Cd'**, **Ce** e **Ce'** e **Cg** e **Cg'** estarem em ambiente químico igual, resultando em apenas um sinal para cada par de carbonos. Ainda nessa região do espectro, o átomo **Ch** aparece mais desblindado em relação aos outros átomos de carbono do anel aromático, devido ao fato de estar diretamente ligado à hidroxila.

Figura 71. Espectro de RMN ^{13}C do ligante HL⁴ em DMSO, 400 MHz.

Tabela 18. Informações do espectro de RMN de ^{13}C do ligante HL⁴ em DMSO, 400 MHz

Grupo	δ (ppm)
a	156,02
h	145,36
b	2,42 – 2,58
d, d'	128,14
e, e'	127,97
f	126,90
c, c'	126,36
g, g'	114,93
i	66,02
j	48,72
k	47,14

Para confirmar a atribuição dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C , foram realizados os experimentos de DEPT 90 e DEPT 135. Enquanto no espectro de DEPT 90 os únicos sinais observados são os picos de CH, no espectro de DEPT 135 são observados os picos de CH e CH_3 , que aparecem para cima, e os de CH_2 que aparecem para baixo[72].

No espectro de DEPT 90 do ligante HL⁴ aparecem os sinais dos átomos de carbono do tipo CH aromáticos: **Cc** e **Cc'**, **Cd** e **Cd'**, **Ce** e **Ce'**, Cf, **Cg** e **Cg'** (Figura 72 e Tabela 19). Em 66,02 ppm foi observado o sinal do átomo **Ci**, proveniente da redução da base de Schiff precursora. Já no espectro de DEPT 135, além dos átomos já descritos para o experimento de DEPT 90, foram observados também os átomos **Cj** e **Ck**, metilênicos, que aparecem em campo mais alto do espectro (Figura 73 e Tabela 20).

Figura 72. Espectro de DEPT 90 do ligante HL⁴ em DMSO, 400 MHz.

Tabela 19. Informações do espectro de DEPT 90 do ligante HL⁴ em DMSO, 400 MHz

Grupo	δ (ppm)
d, d'	128,14
e, e'	127,97
f	126,90
c, c'	126,36
g, g'	114,93
i	66,02

Figura 73. Espectro de DEPT 135 do ligante HL⁴ em DMSO, 400 MHz.

Tabela 20. Informações do espectro de DEPT 135 do ligante HL⁴ em DMSO, 400 MHz

Grupo	δ (ppm)
h	145,36
d, d'	128,14
e, e'	127,97
f	126,90
c, c'	126,36
g, g'	114,93
i	66,02
j	48,72
k	47,14

Os espectros de RMN de ^1H dos ligantes **HL**^{5,6} são bem semelhantes, apresentando conjuntos análogos de sinais (**Figuras 74 e 75 e Tabelas 21 e 22**). Em campo mais baixo são observados os sinais para oito átomos de hidrogênio metilênicos da dietilnotriamina. Em torno de 3,70 ppm aparece um multipeto referente às metilas dos grupos metóxidos ligados aos anéis, com integração para seis átomos de hidrogênio. Os sinais referentes aos metilenos ligados ao anel aromático, provenientes da redução da base de Schiff precursora, aparecem em 4,10 e 4,18 ppm, na forma de multipletos, para **HL**⁵ e **HL**⁶, respectivamente. Em ambos os espectros, os sinais dos átomos de hidrogênio aromáticos aparecem na forma de dois sinais separados. No ligante **HL**⁵, esses sinais aparecem na forma de dois multipletos, com integração para quatro átomos de hidrogênio para cada sinal. Já no ligante **HL**⁶, esses átomos de hidrogênio aparecem na forma de dois multipletos: um com integração para dois átomos e outro com integração para seis átomos. No espectro do ligante **HL**⁵ é observado ainda um simpleto de baixa intensidade alargado em 4,64 ppm. Esse sinal é atribuído aos hidrogênios das aminas secundárias do ligante.

Figura 74. Espectro de RMN ^1H do ligante **HL**⁵ em D_2O , 500 MHz.

Tabela 21. Informações do espectro de RMN de ^1H do ligante ligante HL⁵ em D₂O, 500 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, a' b, b' c, c', d, d'	4 H	7,26 – 7,31	m
	4 H	6,89 – 6,94	m
f, f'	3 H	4,12	s
	1 H	4,10	s
e, e'	6 H	3,70 – 3,71	m
g, g', h, h'	8 H	3,27 – 3,33	m

Figura 75. Espectro de RMN ^1H do ligante HL⁶ em D₂O, 500 MHz.

Tabela 22. Informações do espectro de RMN de ^1H do ligante HL⁶ em D₂O, 500 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, a' b, b' c, c', d, d'	4 H	7,32 – 7,35	m
	4 H	6,97 – 7,00	m
f, f'	4 H	4,18 – 4,20	m
e, e'	6 H	3,74 – 3,75	m
g, g', h, h'	8 H	3,38 – 3,43	m

4.1.7.2 RMN de ^1H e ^{13}C dos complexos

Foram também realizadas as análises de RMN ^1H e ^{13}C , em soluções preparadas a partir de cristais isolados dos complexos sintetizados nesse trabalho, com exceção do complexo **fac**-[Re(CO)₃(HL⁴)]Br, para o qual a solução foi preparada a partir do pó isolado da reação.

O espectro de RMN de ^1H para o complexo **fac**-[Re(CO)₃(L¹)] apresentou o conjunto de sinais condizentes com a estrutura determinada por difração de raios X (**Figura 76**) e corroborada por espectrometria de massas. Foram observados três conjuntos de sinais correspondentes aos metilenos do ligante, entre 2,64 e 3,16 ppm, e outro conjunto de sinais referentes aos átomos de hidrogênio aromáticos, entre 6,49 e 7,36 ppm. São observados ainda dois sinais, em 5,38 e 2,83 ppm, os quais foram atribuídos aos átomos de hidrogênio da amina primária. As atribuições dos sinais nos espectros dos complexos, assim como a suas respectivas multiplicidades estão indicadas nos espectros e nas tabelas a seguir.

Figura 76. Espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*-[Re(CO) $_3$ (L 1)] em CD $_3$ OD, 400 MHz.

Tabela 23. Informações do espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*-[Re(CO) $_3$ (L 1)] em CD $_3$ OD, 400 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, b, c, d, e, f, g, h	8 H	6,46 – 7,36	m
i	2 H	3,74 – 3,92	m
j	1 H	3,09 – 3,21	m
	1 H	2,60 – 2,70	m

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta, entre 199,63 e 196,78, os três sinais característicos das carbonilas desse tipo de complexo. Foram observados ainda sinais de carbono a mais do que o esperado para o composto (**Figura 77**). Alguns sinais apareceram duplicados no espectro. Por exemplo, esperavam-se dois sinais para os metilenos do ligante **HL** 1 . Mas para cada sinal, apareceu um segundo sinal,

próximo, com menor intensidade. Na região dos aromáticos foi observado o mesmo comportamento. Uma possibilidade para explicar essa duplicação de sinais seria a formação de outras espécies em solução, como isômeros ou dímeros. Para averiguar isso, foram utilizados os espectros de massas desses compostos, buscando-se verificar sinais adicionais presentes nos mesmos.

Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$ em CD_3OD , 400 MHz.

Tabela 24. Informações do espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)] em CD₃OD, 400 MHz

Grupo	δ (ppm)
a, b, c	199,63; 197,35; 196,7
p	171,40
i	170,66
o	169,95
d, e, f, g, h, j, k, l, m, n	134,29; 134,10; 133,09; 132,95; 132,38; 132,25; 131,14; 130,10; 129,83; 124,31; 123,33; 120,76; 120,56; 120,51; 120,37; 117,40; 117,15; 116,69
q	63,02; 61,89
r	46,07; 45,48

O rênio é encontrado na natureza em duas formas isotópicas não radioativas: ^{185}Re e ^{187}Re , sendo o último isótopo o mais abundante. No espectro de massas, pôde-se observar dois sinais referentes ao complexo *fac*-[Re(CO)₃L¹]. A espécie mais abundante é aquela com o ^{187}Re (MM = 526 g.mol⁻¹) (**Figura 78**). O espectro de massas mostrou que a espécie majoritária presente na amostra era condizente com aquela obtida no cristal, com massa molecular igual a 526 g.mol⁻¹. Como o complexo é neutro e a análise foi feita no módulo positivo do equipamento, a massa do complexo aparece com um próton a mais. Foram observados no espectro também outros sinais, com intensidade relativa em torno de 10% e com o dobro da massa do complexo obtido (**Figura 79**).

Figura 78. Expansão do espectro de massa ESI(+) do complexo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)].

henrique1+_140801111624 #2 RT: 0.05 AV: 1 NL: 1.34E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

Figura 79. Expansão do espectro de massa ESI(+) do complexo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)].

henrique1+_140801111624 #2 RT: 0.05 AV: 1 NL: 1.87E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

Figura 80. Exemplos de complexos diméricos de $\text{Re}(\text{I})$.

São encontrados na literatura ainda casos em que a mudança do complexo precursor de Re^{I} , assim como o solvente utilizado na síntese, influenciam na formação de espécies monoméricas ou diméricas. Em Zhao *et al.* (2013), é feito um estudo com várias moléculas derivadas do 8-oxiquinolinato, no qual, com o mesmo ligante, se formavam duas espécies, dependendo do complexo precursor e do solvente utilizado (**Figura 81**)[94]. Nesse estudo foi observado que solventes com pontos de ebulição elevados favoreciam a formação da espécie dimérica. Quando se utilizava o complexo precursor comercial $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$ em m-xileno, que tem o ponto

de ebulição de 139 °C, obtinha-se somente espécies diméricas. Para que fosse obtida somente a espécie monomérica, a estratégia utilizada foi realizar a síntese em metanol utilizando o complexo precursor *fac*-[Re(CH₃CN)(CO)₃Cl]. Esse complexo precursor era obtido através do refluxo do complexo [Re(CO)₅Cl] em acetonitrila sob atmosfera de argônio. Foi observado ainda nesse estudo a formação de um outro tipo de dímero, quando se utilizava como solvente o tolueno, que tem a ponto de ebulição de 110,6 °C, uma temperatura intermediária entre o metanol e o m-xileno, que foi utilizado nas outras sínteses (**Figura 82**).

Figura 81. Representação Estrutural dos complexos diméricos (1d-4d) e monoméricos (1m-4m) investigados no estudo de Zhao *et al.*, 2013.

Fonte: Adaptado de Zhao *et al.*, 2013, p. 1833.

Figura 82. Complexo dimérico de Re(I) obtido com o ligante 5-fluoro-8-quinolino em tolueno.

Fonte: Adaptado de Zhao *et al.*, 2013, p. 1834.

Uma vez que os complexos sintetizados com os ligantes **HL**^{1,2,4} possuem hidroxilas livres, ou seja, que não estão coordenadas ao centro metálico de rênio, espécies minoritárias diméricas poderiam estar sendo formadas em solução durante o experimento de RMN, o que justificaria os sinais adicionais nos espectros de RMN de ¹³C dos cristais dos complexos. Baseado nisso, é proposta a seguinte estrutura para a espécie dimérica do complexo sintetizado com o ligante **HL**¹ (**Figura 83**):

Figura 83. Proposta de fórmula estrutural do dímero do complexo *fac*-[Re(CO)₃(L¹)].

O espectro de RMN de ¹H para o complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL²)]Br apresentou 5 multipletos correspondentes a oito átomos de hidrogênio metilênicos do ligante, entre 3,94 e 2,77 ppm (**Figura 84** e **Tabela 25**). Em campo mais baixo são observados dois multipletos referentes a oito átomos de hidrogênio dos fenóis, entre 6,49 e 7,36 ppm. Entre 4,21 e 4,14 ppm aparece um multipeto de baixa intensidade, atribuído ao átomos de hidrogênio da amina primária do ligante. São observados ainda dois sinais de baixa intensidade, em 2,16 e 1,99 ppm, os quais foram atribuídos às hidroxilas nos grupos fenólicos do ligante.

Figura 84. Espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ em CD_3OD , 500 MHz.

Tabela 25. Informações do espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ em CD_3OD , 500 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, a', b,	4 H	6,46 – 7,38	m
b', c, c'	4 H	6,83 – 7,06	m
d, d'	1 H	3,85 – 3,94	m
e, f	1 H	3,73 – 3,79	m
	1 H	3,54 – 3,68	m
	1 H	3,35 – 3,40	m
	1 H	3,35 – 3,40	m
g, h	4 H	2,77 – 3,11	m

O espectro de RMN de ^{13}C do complexo $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ apresenta três sinais, entre 194,82 e 191,78 ppm, referentes às carbonilas do complexo. Assim

como foi observado no espectro de RMN de ^{13}C do complexo anterior, foram observados sinais adicionais também neste caso (**Figuras 85 e Tabela 26**). Ao lado dos sinais de maior intensidade, são observados sinais de menor intensidade. Através da difração de raios X, pôde-se constatar que o complexo é catiônico, possuindo o brometo como contra-íon, labilizado pelo complexo precursor de rênio. Pelo espectro de massas, pode-se inferir que a espécie majoritária presente na amostra é monomérica, condizente com a estrutura cristalina, com massa molecular igual a 649 g.mol^{-1} (**Figuras 86 e 87**). O padrão de distribuição isotópica verificado no espectro de massas está de acordo com o esperado, com contribuições significativas das formas isotópicas do rênio e do bromo (^{79}Br e ^{81}Br) (**Figura 86**). Foram observados também no espectro de massas sinais com o dobro da massa da espécie monomérica. Tal fato sugere a formação de espécies diméricas em solução, ao longo do experimento (**Figura 87**).

Figura 85. Espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ em CD_3OD , 500 MHz.

Tabela 26. Informações do espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ em CD_3OD , 500 MHz

Grupo	δ (ppm)
a, b, c	194,82; 193,75; 191,78
j	181,10
d, d'	151,43; 150,68
e, e', f, f', g, g', h, h', i, i'	131,67; 131,56; 131,48; 131,36; 131,00; 130,76; 127,84; 127,44; 126,52; 126,30; 125,80; 120,64; 120,06; 119,83; 119,62; 119,37; 116,16; 115,74; 115,58
k, l, m, n	57,31; 56,95; 56,18; 52,87; 52,74; 52,10; 51,63; 51,16; 42,78

Figura 86. Expansão do espectro de massa ESI(+) do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$.

henrique2+_140801111624 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.51E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

Figura 87. Expansão do espectro de massa ESI(+) do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL²)]Br.

henrique2+_140801111624 #3 RT: 0.09 AV: 1 NL: 1.89E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

O espectro de RMN de 1H para o complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL³)]Br apresenta os sinais de 1H esperados para o composto, de acordo com as outras técnicas de análise utilizadas (**Figura 88 e Tabela 27**). Foram observados quatro conjuntos de sinais correspondentes a oito átomos de hidrogênio metilênicos provenientes da dietilenotriamina, entre 2,64 e 3,45 ppm. O multipletto entre 3,45 e 3,55 ppm, com integração para 1 átomo para um dos hidrogênios metilênicos, aparece no espectro sobreposto ao sinal do metanol. Já os metilenos provenientes da redução da base de Schiff precursora aparecem no espectro entre 3,90 e 4,53 ppm. Entre 7,36 e 7,61 ppm são observados dois multipletos referentes aos dez átomos de hidrogênio aromáticos.

Figura 88. Espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ em CD_3OD , 400 MHz.

Tabela 27. Informações do espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ em CD_3OD , 400 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, a', b, b', c, c' d, d', e, e'	3 H	7,52 – 7,61	m
	7 H	7,33 – 7,47	m
	1 H	4,52 – 4,55	m
f, f'	1 H	4,25 – 4,40	m
	1 H	4,10 – 4,13	m
	1 H	3,94 – 4,01	m
	1 H	3,35 – 3,45	m
g, g', h, h'	1 H	3,23 – 3,29	m
	1 H	2,97 – 3,13	m
	1 H	2,64 – 2,96	m

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou o mesmo problema citado anteriormente para os outros complexos (**Figura 89** e **Tabela 27**). Foram observados, entre 192,12 e 195,25, cinco sinais para as carbonilas, ao invés dos três sinais esperados para a estrutura proposta do complexo. Uma vez que o ligante é simétrico, esperavam-se quatro sinais para os carbonos dos anéis aromáticos, mas foram observados nove sinais. Da mesma maneira, foram observados para os carbonos metilênicos oito sinais ao invés de dois sinais esperados (um sinal para os quatro átomos de carbono oriundos da dietilenotriamina e outro sinal para os átomos de carbono das ligações C-N). Espécies diméricas poderiam estar sendo formadas em solução, o que justificaria os sinais a mais observados no espectro de RMN de ^{13}C .

Figura 89. Espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL³)]Br em CD₃OD, 400 MHz.

Tabela 28. Informações do espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL³)]Br em CD₃OD, 400 MHz

Grupo	δ (ppm)
a, b, c	195,25; 194,70; 194,46; 194,01; 192,19
d, d', e, e', f, f', g, g', h, h', i, i'	136,51; 135,95; 135,86; 129,92; 129,32; 129,19; 128,57; 128,32; 128,25
j, j', k, k', l, l'	151,43; 150,68

O espectro de RMN de ^1H para o complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁴)]Br apresenta dois multipletos com integração para dezoito átomos aromáticos (**Figura 90** e **Tabela 29**). Em 6,35 ppm aparece um simpleto alargado com integração para um átomo, o qual foi atribuído ao átomo de hidrogênio das aminas secundárias presentes no ligante HL⁴. Em torno de 4,98 ppm aparece um multipeto com integração para dois átomos. Esse sinal é referente aos dois átomos de hidrogênio do carbono ligado à amina secundária. Entre 2,61 e 3,29 ppm aparecem dois multipletos correspondentes aos oito átomos de hidrogênio metilênicos.

Figura 90. Espectro de RMN de ^1H do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ em CD_3OD , 500 MHz.

Tabela 29. Informações do espectro de RMN de ^1H do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ em CD_3OD , 500 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, a', b, b', c, c' d, d', e, e', f, f', g, g', h, h', i, i'	14 H	7,12 – 7,79	m
j, j'	2 H	4,95 – 5,02	m
k, k', l, l'	7 H	2,81 – 3,08	m

O espectro de RMN de ^{13}C do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ apresenta em campo mais baixo três sinais para as carbonilas (**Figura 91** e **Tabela 30**). Esses sinais no espectro apareceram com intensidade muito baixa, como pode ser visto na

expansão do espectro. É observado no espectro, tanto na região dos aromáticos, quanto dos metilenos, sinais a mais do que o esperado para os carbonos. O espectro de massas desse complexo apresentou dois sinais mais intensos com valores de m/z iguais a 556,12299 e 738,19611 (**Figura 57**). Conforme discutido anteriormente, uma possibilidade para explicar tal fato seria a quebra do ligante em um dos lados durante a síntese, formando dessa maneira dois complexos: um com o ligante simétrico ($m/z = 738,19611$) e outro com o ligante fragmentado em um dos lados ($m/z = 556,12299$) (**Figura 60, ítem 4.1.5**). Uma outra possibilidade consistiria na formação de espécies diméricas em solução através dos átomos de oxigênio da hidroxila nos anéis aromáticos, o que justificaria os sinais adicionais observados no espectro de RMN de ^{13}C .

Figura 91. Espectro de RMN de ^{13}C do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁴)]Br em CD₃OD, 500 MHz.

Tabela 30. Informações do espectro de RMN de ^{13}C do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁴)]Br em CD₃OD, 500 MHz

Grupo	δ (ppm)
a, b, c	194,49; 194,40; 194,31
d, d', e, e', f, f', g, g', h, h', i, i'	157,16; 157,02; 156,88; 156,84; 156,76; 142,98; 142,76; 142,08; 141,30; 133,87; 133,72; 133,66; 132,27; 129,01; 128,97; 128,86; 128,72; 128,67; 128,61; 128,08; 128,05; 127,91; 127,42; 127,15; 126,63; 126,60; 126,50; 115,78; 115,74; 115,60; 115,36; 115,27
j, j'	78,05; 76,81; 76,75; 76,69; 75,81
k, k', l, l'	52,84; 52,69; 51,70; 51,20; 51,11; 51,02; 50,93; 50,86; 49,81; 49,69; 49,42

De modo a ter uma melhor compreensão sobre os processos dinâmicos em que se encontram envolvidos os complexos com os ligantes **HL**¹⁻⁴, foram realizados experimentos variando a temperatura entre -10, 25 e 60 °C, semelhante ao que foi realizado em Moura *et al.* (2012) com complexos de Re^I[95]. Os estudos de RMN a temperatura variável, apontados nesta referência, confirmaram que os processos dinâmicos observados para o composto envolviam a interconversão entre duas espécies em solução. A temperaturas baixas esta interconversão era lenta suficientemente para poder distinguir essas espécies por RMN de ^1H . À medida que se aumentava a temperatura, essa interconversão tornava-se mais rápida. Mas mesmo assim não foi possível no citado estudo atingir um regime de troca rápida mesmo à temperatura de 60 °C para identificar as duas espécies. Da mesma

maneira como foi observado em Moura *et al.* (2012), o espectro dos complexos com os ligantes **HL**¹⁻⁴ apresentaram uma melhora na multiplicidade dos sinais à -10 °C: os sinais aparecem nos espectros mais bem definidos, mudando até a sua multiplicidade (**Figuras 92 a 101**). Para o complexo **fac-[Re(CO)₃(L¹)]** foi observado um multipletto em torno de 6,82 ppm. Ao descer a temperatura a -10 °C, esse sinal torna-se mais estreito e bem definido (**Figura 93**). Aumentando a temperatura para 60 °C, esse sinal torna-se ainda mais complexo, sendo sua multiplicidade atribuída como um multipletto.

Figura 92. Comparação entre os espectros de RMN de ¹H dos cristais do complexo **fac-[Re(CO)₃(L¹)]** em CD₃OD à -10, 25 e 60 °C.

Figura 93. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}^1)]$ em CD_3OD à -10, 25 e 60 °C na região dos aromáticos.

Comportamento semelhante ao complexo descrito anteriormente foi encontrado para o complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$. Na região dos aromáticos, os sinais à -10 °C aparecem muito mais definidos, perdendo totalmente a sua definição à 60 °C (**Figura 95**). Foi observado ainda para esse complexo, entre 4,2 e 4,4 ppm, pequenos sinais alargados que desapareceram à temperatura de 60 °C (**Figura 96**). Uma possibilidade é que esses sinais sejam das aminas primárias do ligante.

Figura 94. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ em CD_3OD à -10, 25 e 60 °C.

Figura 95. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ em CD_3OD à -10, 25 e 60 °C na região dos aromáticos.

Figura 96. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^2)]\text{Br}$ em CD_3OD à -10, 25 e 60 °C na região dos metilenos.

Já o espectro do composto *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ apresentou dois pequenos sinais alargados na região dos aromáticos à -10 °C que, ao subir a temperatura para 25 °C, transforma-se em apenas 1 sinal, o qual some à 60 °C (**Figura 98**). Como discutido para o complexo anterior, uma possibilidade para explicar esses sinais consistiria na sua atribuição como átomos de hidrogênio provenientes das aminas secundárias do ligante, devido à troca rápida entre esses hidrogênios com o solvente. Na região dos metilenos é observada uma melhora na multiplicidade do sinal de um desses hidrogênios: enquanto à 25 e 60 °C esse sinal aparece como um multipletto, ao descer a temperatura para -10 °C, esse sinal aparece como um pseudo-duplo dupletto (**Figura 99**).

Figura 97. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ em CD_3OD à -10, 25 e 60 °C.

Figura 98. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ em CD_3OD à -10, 25 e 60 °C na região dos aromáticos.

Figura 99. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ em CD_3OD à -10, 25 e 60 °C na região dos metilenos.

O espectro do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ teve um comportamento diferente dos outros complexos na região dos aromáticos. Não houve melhora significativa na multiplicidade dos sinais, mas a -10 °C aparecem dois sinais alargados de baixa intensidade em torno de 7,0 e 6,4 ppm que parecem se deslocar para campo mais alto no espectro quando se aumenta a temperatura (**Figura 101**). Um desses sinais chega a desaparecer à 60 °C. Esses sinais podem ser das aminas secundárias do ligante, que não são tão facilmente detectadas no espectro, cuja integral fica razoável para um átomo hidrogênio.

Figura 100. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ em CD_3OD à -10, 25 e 60 °C.

Figura 101. Expansão dos espectros de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^4)]\text{Br}$ em CD_3OD à -10, 25 e 60 °C na região dos aromáticos.

Dentre os complexos sintetizados nesse trabalho, os complexos com os ligantes $\text{HL}^{5,6}$ apresentaram espectros de RMN mais limpos e concordantes com os

resultados obtidos por espectrometria de massas e por difração de raios X pelo método do monocristal. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C indicam que os complexos catiônicos ***fac*-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br** e ***fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br** conservam, em solução, as estruturas verificadas no estado sólido.

O espectro de RMN de ^1H para o complexo ***fac*-[Re(CO)₃(HL⁵)]Br** apresenta dois multipletos com integração para oito átomos de hidrogênio aromáticos em 7,51 e 7,53 ppm e 6,95 e 6,97 ppm (**Figura 102 e Tabela 31**). O multipletto que aparece em torno de 6,96 ppm aparece no espectro mais blindado em relação ao outro dupletto devido ao fato desses hidrogênios estarem mais próximos ao oxigênio do grupo metóxido. São observados ainda nessa região em 7,12 e 6,16 ppm, respectivamente, um simpleto alargado e um multipletto de baixa intensidade com integração para 1 e 2 hidrogênios, o qual foi atribuído aos hidrogênios das aminas secundárias presentes no ligante **HL⁵**. Em 4,32 e 3,98 ppm aparecem dois multipletos, com integração para dois átomos de hidrogênio para cada sinal, o qual foi atribuído aos metilenos ligados ao anel aromático, provenientes da redução da base de Schiff precursora. Em campo mais alto, são observados quatro multipletos com integração para dois átomos para cada sinal, correspondentes aos oito átomos de hidrogênio metilênicos oriundos da triamina presente no ligante.

Figura 102. Espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ em DMSO, 400 MHz.

Tabela 31. Informações do espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$, 400 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
a, a', b, b',	4 H	7,51 – 7,53	m
c, c' d, d'	4 H	6,95 – 6,97	m
f, f'	2 H	4,30 – 4,34	m
	2 H	3,95 – 4,01	m
e, e'	6 H	3,76	s
	2 H	3,34 – 3,37	m
g, g', h, h'	2 H	3,13 – 3,21	m
	2 H	2,91 – 2,99	m
	2H	2,75 – 2,82	m

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou dois sinais, em 196,30 e 195,39, para as carbonilas, ao invés dos três sinais esperados para o fragmento *fac*- $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^+$ (**Figura 103** e **Tabela 32**). Tal comportamento é encontrado na literatura e é explicado por simetria. A altura dos sinais das carbonilas no espectro aparecem numa proporção de 2:1, sugerindo dessa maneira que dois grupos CO são magneticamente equivalentes devido à simetria especular ao longo do eixo formado pelo centro metálico de Re com um grupo CO, resultando assim em apenas dois sinais[96]. Na região dos aromáticos, foram observados quatro sinais para o complexo. Dentre os átomos presentes no anel aromático, o carbono **Cc** aparece mais desblindado em relação aos demais. Tal comportamento pode ser explicado devido ao fato desse carbono estar diretamente ligado ao oxigênio do grupo metóxido. Ainda na região dos aromáticos, são observados mais três sinais, sendo um sinal para o carbono **Ce** e mais um sinal para cada par de carbonos (**Cd** e **Cd'** e **Cf** e **Cf'**). Uma vez que o ligante **HL**⁵ é simétrico, aparece no espectro apenas um sinal para os átomos que estão no mesmo ambiente químico, conforme pode ser observado no espectro e na figura com a tentativa-atribuição dos sinais. Em campo mais alto do espectro aparecem quatro sinais: um sinal referente às duas metilas do grupo metóxido (61,27 ppm) e três sinais referentes aos átomos de carbono metilênicos do ligante (55,11; 50,69 e 48,83 ppm).

Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ em DMSO, 400 MHz.

Tabela 32. Informações do espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$ em DMSO, 400 MHz

Grupo	δ (ppm)
a, b	196,30; 195,39
c	159,07
d, d'	131,04
e	129,09
f, f'	113,79
g	61,27
h	55,11
i	50,69
i	48,83

O espectro de RMN de ^1H para o complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br apresenta quatro multipletos na região dos aromáticos (**Figura 104 e Tabela 33**). Esses sinais tiveram uma integração para dois átomos, com exceção do multipletto em 7,15 ppm, que teve uma integração para três átomos. Os átomos de hidrogênio das aminas secundárias podem estar sobrepondo com esse último sinal, resultando em uma integração com um átomo a mais do que o esperado. Entre 6,50 e 6,59 ppm aparece um multipletto com integração para dois átomos, o qual foi atribuído aos átomos de hidrogênio das aminas secundárias. Em 7,15 e 6,91 ppm aparecem dois multipletos com integração para átomos para cada sinal, referentes aos metilenos ligados aos anéis aromáticos, provenientes da redução da base de Schiff precursora. Entre 3,18 e 2,51 ppm são observados quatro multipletos com integração para dois átomos para cada sinal, correspondentes aos oito átomos de hidrogênio metilênicos oriundos da triamina presente no ligante. O multipletto que aparece em campo mais alto (2,55 a 2,51 ppm), referente a 2 átomos de hidrogênio metilênicos, aparece sobreposto com o sinal do DMSO no espectro.

Figura 104. Espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*-[Re(CO)₃(HL⁶)]Br em DMSO, 500 MHz.

Tabela 33. Informações do espectro de RMN de ^1H dos cristais do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ em DMSO, 500 MHz

Grupo	integral	δ (ppm)	Multiplicidade
	2 H	7,36 – 7,37	m
a, a', b, b',	2 H	7,28 – 7,31	m
c, c' d, d'	2 H	7,14 – 7,16	m
	2 H	6,53 – 6,57	m
f, f'	2 H	4,34 – 4,38	m
	2 H	4,02 – 4,07	m
e, e'	6 H	3,80	s
	2 H	3,15 – 3,21	m
g, g', h, h'	2 H	2,99 – 3,05	m
	2 H	2,80 – 2,86	m
	2H	2,53 – 2,55	m

O espectro de RMN de ^{13}C do complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ apresentou comportamento semelhante ao complexo *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^5)]\text{Br}$: foram observados dois sinais para as carbonilas, em 196,24 e 195,28 ppm, ao invés dos três sinais esperados para o fragmento *fac*- $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^+$ (**Figura 105** e **Tabela 34**). Os argumentos para os mesmos são os mesmos discutidos anteriormente. Uma vez que o ligante HL^6 é simétrico, aparece no espectro apenas um sinal para os átomos de carbono que estão no mesmo ambiente químico, tanto os metilênicos quanto os aromáticos, conforme pode ser observado na **Figura 105** com a tentativa-atribuição dos sinais. Na região dos aromáticos foram observados seis sinais (**Cc** a **Ch**). Uma vez que o grupo metóxido está na posição *meta* no anel aromático, isso faz com que os seis átomos do anel estejam em ambientes químicos diferentes, gerando dessa maneira seis sinais no espectro. Assim como descrito para o complexo anterior, o átomo na região dos aromáticos que aparece mais desblindado é o **Cc**, devido ao fato de estar diretamente ligado ao oxigênio do grupo metóxido. Em campo mais alto do espectro são observados quatro sinais: um referente às duas metilas do grupo metóxido (**Ci** = 61,91 ppm) e três referentes às metilas do ligante (**Cj,k,l** = 55,26; 50,81 e 49,11 ppm).

Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ em DMSO, 400 MHz.

Tabela 34. Informações do espectro de RMN de ^{13}C dos cristais do complexo $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{HL}^6)]\text{Br}$ em DMSO, 400 MHz

Grupo	δ (ppm)
a, b	196,24; 195,28
c	159,44
d, d'	138,50
e	129,45
f, f'	121,65
g	114,89
h	113,99
i	61,91
j	55,26
k	50,81
l	49,11

4.2 Síntese, caracterização e testes biológicos com o complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$

4.2.1 Síntese do complexo precursor *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e avaliação da pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Antes de serem realizadas as marcações com os ligantes, foi realizado o controle de pureza radioquímica do precursor $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ por CCD e CLAE, conforme descrito nos itens 3.3.5.1 e 3.3.5.2. Para efeito de comparação, foram feitas também as mesmas análises para o íon $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4]$, espécie radioativa precursora no processo de complexação.

O controle de qualidade das preparações radiofarmacêuticas é necessária devido a possibilidade de reações incompletas ou reações colaterais devido a presença de agentes redutores ou oxidantes não previstos ou devido à decomposição ocasionada por efeito da temperatura, pH ou luz [4,97]. A avaliação da pureza radioquímica dos radiofármacos é de fundamental importância, pois dessa maneira serão geradas imagens livres de artefatos, além de evitar a exposição desnecessária dos pacientes à radiação ionizante[97,98].

Nas reações de complexação com o ^{99m}Tc , duas impurezas radioquímicas são geradas decorrentes do próprio processo reacional. Uma dessas impurezas seria o próprio pertecnetato ($[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4]^-$) decorrente da sua não-redução, a outra é o óxido de tecnécio ($[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2]$), também denominado de tecnécio hidrolisado e reduzido (TcHR), decorrente da redução do radiometal e não complexação [97,98]. A detecção dessas duas espécies normalmente é realizada por CCD[99]. Além dessas espécies, são possíveis serem produzidos complexos com o metal em estado de oxidação e número de coordenação diferentes do esperado ou complexos com estereoquímica diferente da desejada [98].

Para determinar a pureza radioquímica da preparação do complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, foram utilizados dois sistemas cromatográficos descritos na literatura[100]: 1) TLC- Al_2O_3 / solução aquosa de metanol a 95% e papel Whatman 1/, utilizando como fase móvel uma e 5% de HCl 6 M.

Enquanto na análise cromatográfica para compostos não radioativo a revelação das substâncias é normalmente realizada por exposição à luz ultra-violeta ou coloração química, com os compostos radioativos a detecção das substâncias se

dá pela contagem da radioatividade em vários segmentos da fita. No processo realizado neste trabalho, as tiras de cromatografia foram cortadas em 6 segmentos (**Figura 106**) e a radiatividade em cada uma delas foi determinada em um detector de radiação do tipo poço. Na CCD, utilizando o TLC- Al_2O_3 , o $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_2$ permaneceu na origem da fita, enquanto o $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ migrou para porções intermediárias e o *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$ migrou para o fronte[100] (**Tabela 35**). É conhecido na literatura que a espécie de tecnécio reduzida ($[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_2$) não migra na maioria dos sistemas utilizados na CCD, independente da fase móvel ou estacionária utilizadas[99]. As porcentagens das espécies radioativas em cada corte das fitas são mostradas na **Tabela 35**.

Figura 106. Ilustração dos cortes realizados nas fitas cromatográficas de papel Whatman 1 e TLC- Al_2O_3 e da cuba cromatográfica.

Tabela 35. Porcentagem das espécies radioativas nos cortes das fitas analisadas detector de radiação do tipo poço.

% das espécies radioativas nas fitas		
Cortes da fita	TLC-Al ₂ O ₃	Whatman 1
6 (frente)	67	15
5	22	2
4	9	3
3	2	14
2	1	51
1 (origem)	0	16

Já no papel Whatman 1, é conhecido que o $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$ e o *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ aparecem próximos ou na origem da fita, enquanto o $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ migra para o frente. Foi observado comportamento semelhante ao descrito na literatura[100].

Para confirmar a eficiência na síntese do complexo precursor *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, a solução da reação foi analisada por CLAE. Os valores da concentração radioativa das diferentes espécies, obtidos através da integração das áreas dos picos na análise por CLAE, assim como os seus respectivos tempos de retenção são apresentados na **Tabela 36** e nos radiocromatogramas **a** e **b** (**Figura 107-a, b**). Através da comparação dos radiocromatogramas, é possível observar que houve a formação do complexo precursor $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com rendimentos satisfatórios, apresentando valores superiores a 97% (**Tabela 36**). É observado ainda no radiocromatograma **b** uma outra espécie (integral em vermelho), que corresponde a espécie não reduzida, o $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$. Outro fato a ser comentado é que no radiocromatograma **a** a espécie coloidal $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$ não é eluída na coluna, deste modo, a CCD é teste complementar a CLAE para definição da pureza radioquímica.

Figura 107. Radiocromatogramas: a) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ e b) $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$ por CLAE, utilizando coluna de C18 (4,6x250 mm, 4 μm) da Phenomenex com fase móvel composta de (A) solução aquosa de TFA 0,05 % e (B) acetonitrila, utilizando o seguinte processo: 80 % da fase (A) de 0 a 1 minuto, gradiente linear de 1 a 10 minutos, partindo de 80 % da fase (A) até atingir a proporção 20:80 % (A:B), depois segue em modo isocrático de 10 a 25 minutos com a mesma proporção, e de 25 a 30 minutos retorna à condição inicial, com fluxo de 1 mL/min.

Tabela 36. Tempos de retenção (rf) e concentração das espécies radioativas dos complexos $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ e $\text{fac}-[[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

Radiocromatograma				
	A		B	
Espécies radioativas	$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4^-$	$\text{fac}-[[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$	$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4^-$	$\text{fac}-[[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$
Tempo de retenção (rf) (min)	3,6	-	3,6	4,4
Concentração da espécie radioativa (%)	100	-	2,91	97,09

4.2.2 Avaliação da eficiência de marcação do complexo $\text{fac}-[[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ por CCD e CLAE

Assim como foi feito para o complexo precursor $\text{fac}-[[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, foi realizada a CCD para verificar a eficiência da marcação com o ligante HL^3 . Para realizar a CCD do complexo $\text{fac}-[[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ foi utilizada uma placa de TLC-SG (sílica gel), utilizando como fase móvel uma solução 75% de clorofórmio e 25% de metanol. Para efeito de comparação, foi utilizado o mesmo sistema cromatográfico para análise da preparação do complexo precursor $\text{fac}-[[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$.

Através da contagem dos cortes das placas no detector de radioatividade, foi observado que nesse sistema cromatográfico o complexo precursor $\text{fac}-[[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e a espécie $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_2$ permaneceram na origem da fita, enquanto o íon $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-]$ migrou para outras porções da placa (**Tabela 37**). Já para o complexo $\text{fac}-[[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ não foi observada uma distribuição uniforme como é observado para o complexo precursor. Como pode ser observado na **Tabela 37**, há uma maior porcentagem do complexo marcado próximo da origem da placa de TLC-SG.

Tabela 37. Porcentagem das espécies radioativas nos cortes das placas de TLC-SG analisadas no detector de radiação do tipo poço

% das espécies radioativas nas fitas		
Cortes da fita	$fac-[^{99m}Tc](H_2O)_3(CO)_3]^+$	$fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$
6 (frente)	7%	6%
5	2%	12%
4	1%	2%
3	5%	15%
2	17%	38%
1 (origem)	68%	27%

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos na CCD, também foi realizada análise por CLAE, utilizando o mesmo sistema definido para o complexo precursor. Os valores da concentração radioativa das diferentes espécies, obtidos através da integração das áreas dos picos na análise por CLAE, assim como os seus respectivos tempos de retenção são apresentados na **Tabela 38** e no radiocromatograma a seguir (**Figura 108**).

Figura 108. Radiocromatograma por CLAE para o complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$, utilizando coluna de C18 (4,6x250 mm, 4 μm) da Phenomenex com fase móvel composta de (A) solução aquosa de TFA 0,05 % e (B) acetonitrila, utilizando o seguinte processo: 80 % da fase (A) de 0 a 1 minuto, gradiente linear de 1 a 10 minutos, partindo de 80 % da fase (A) até atingir a proporção 20:80 % (A:B), depois segue em modo isocrático de 10 a 25 minutos com a mesma proporção, e de 25 a 30 minutos retorna à condição inicial, com fluxo de 1 mL/min.

Tabela 38. Tempos de retenção (rf) e concentração das espécies radioativas dos complexos

Espécies radioativas	$[^{99m}Tc]O_4^-$	2	3	$fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$
Tempo de retenção (rf) (min)	3,5	11,5	12,0	13,1
Concentração da espécie radioativa (%)	3,9	13,3	24,6	59,1

Através do radiocromatograma, é possível observar que houve a marcação do complexo precursor $fac-[^{99m}Tc](H_2O)_3(CO)_3]$ com o ligante HL^3 , todavia, houve a formação de três novos complexos, com tempo de retenção e concentração apresentados na **Tabela 38**. Essa multiplicidade de sinais pode estar associada à formação de diferentes complexos com coordenação ou estereoquímica diferentes.

Apesar de ser encontrado na literatura exemplos de complexos de rênio com o ligante coordenado em modo meridional (**Figura 109**), o fragmento $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ invariavelmente apresenta a configuração facial[101–103]. Devido a esta estereoquímica única para as três carbonilas ligadas ao átomo de tecnécio, a formação de isômeros é drasticamente diminuída[102]. No entanto, quando a outra face do octaedro está preenchida com três átomos doadores diferentes, o metal passa a se comportar como um centro assimétrico, tornando possível a formação de isômeros[102].

Figura 109. Representação do complexo *mer,cis*- $[\text{Re}(\text{tpy}-\kappa^3\text{N})(\text{CO})_2\text{Cl}]$, onde tpy = terpiridina.

Fonte: Adaptado de Black & Hightower, 2012, p. 17.

Para entendermos melhor a quiralidade do átomo de Tc no complexo, podemos imaginar a face do octaedro contendo as três carbonilas como um único substituinte[102]. Seguindo essa lógica, caso os átomos doadores coordenados na outra face do octaedro sejam diferentes, o átomo de tecnécio irá possuir quatro substituintes diferentes, assim como um carbono assimétrico, possuindo dessa maneira as configurações absolutas (R e S) e, por conseguinte, enantiômeros. A imagem especular típica de carbono tetraédrico também pode ser aplicada à geometria octaédrica do complexo, que no nosso caso passa a ser análoga à tetraédrica.

Figura 110. Imagem especular de um complexo octaédrico de Tc "quiral". A face octaédrica definido pelos três grupos CO aparece em cinza e a centróide destacada como um pequeno círculo.

Fonte: Agostini *et al.*, 2004, p. 571.

Uma outra hipótese para explicar os sinais a mais no radiocromatograma do complexo **fac**-[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$, é que o ligante esteja coordenado com arranjos espaciais diferentes. Em Kieffer *et al.*, 2006 (pag. 383 3 384), é observado comportamento semelhante: aparecem dois sinais no radiocromatograma para o mesmo complexo (**Figura 111**)[104]. No trabalho em questão, o sinal a mais no radiocromatograma é atribuído aos diferentes modos de coordenação do ligante no eixo axial; seja pelo nitrogênio da piridina ou pelo oxigênio do carboxilato[104]. Para o ligante HL^3 , dois arranjos espaciais são possíveis após a coordenação do mesmo ao ^{99m}Tc (**Figura 112**). Em uma delas, dois nitrogênios de uma cadeia etilênica estariam na posição equatorial e um dos nitrogênios ligados ao grupo benzila ocuparia a posição axial. Na segunda hipótese, os dois nitrogênios ligados ao grupo benzila ocupariam a posição equatorial enquanto o nitrogênio central ocuparia a posição axial. Além disso, podem ocorrer diferentes orientações do grupo benzila, em função da fixação do nitrogênio no metal.

Figura 111. Complexo contendo o fragmento $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{L}]$, com L = derivado do feniltropano.

Fonte: Adaptado de Kieffer et al., 2006, p. 383.

Figura 112. Possíveis arranjos espaciais para o complexo $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$.

Uma terceira hipótese para os sinais a mais no radiocromatograma seria a formação de isômeros através da orientação dos substituintes na amina secundária do ligante. Em Simpson et al., 2012 (p. 2951 e 2955), foi realizado um estudo com ligantes derivados da histidina com o fragmento $fac-\{M(\text{CO})_3\}$, sendo $M = \text{Re}$ e ^{99m}Tc , no qual foram também observados com esses ligantes dois sinais nos cromatogramas[105]. Os espectros de RMN de hidrogênio desses complexos mostraram que haviam diferentes espécies em solução, em uma proporção em torno de 2:1. Em todos os casos, foi observado que a espécie isomérica majoritária era

aquela na qual os substituintes na amina secundária estavam posicionados na seguinte conformação (**Figura 113**):

Figura 113. Estereoquímica dos diastereoisômeros para complexos do tipo *fac*-[Re(CO)₃L], com L = moléculas derivadas da histidina.

Fonte: Adaptado de Simpson *et al.*, 2012, p. 2955.

Uma vez que foram formadas outras espécies na marcação, foi necessário fazer a separação das espécies para que, em seguida, fossem feitos os outros testes. A solução da marcação com o ligante **HL³** foi então injetada no cromatógrafo utilizando, dessa vez uma coluna preparativa, no qual cada fração foi coletada em frasco separado. A **fração 4** (pico em amarelo), a espécie majoritária, foi então injetada o cromatógrafo utilizando a coluna analítica. Para efeito da caracterização estrutural do complexo de ^{99m}Tc, o complexo de rênio *fac*-[Re(CO)₃(**HL³**)]Br foi co-injetado com o complexo *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(**HL³**)]Br. O tempo de retenção observado para o complexo de rênio, registrado no detector de ultravioleta em 254 nm, e para o de ^{99m}Tc, registrado no detector de cintilação, foram bem próximos (Re = 13,8 minutos e Tc = 14,1 min), indicando dessa maneira similaridade entre as estrutura (**Figura 114-a, b**). Deste modo, uma das estruturas formadas com o ^{99m}Tc pode ser caracterizada.

Figura 114. Análise por CLAE da injeção simultânea dos complexos: a) $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ e b) $fac-[Re(CO)_3(HL^3)]Br$ com detecção no ultravioleta (256 nm) e no contador de cintilação, respectivamente.

4.2.3 Eletroforese em papel do complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$

A eletroforese é uma técnica largamente utilizada na separação de diferentes classes de moléculas e íons inorgânicos[99]. Apesar da CLAE e a CCD serem métodos de análise mais práticos e fáceis de reproduzir, a eletroforese continua sendo muito utilizada no controle de qualidade de radiofármacos de ^{99m}Tc [99]. Tal fato se deve a eletroforese dar informações da carga do complexo que não são obtidas pelas outras técnicas citadas[99]. Outro uso interessante da eletroforese é

que é possível separar diferentes tipos de complexos de um mesmo produto, como no caso do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{DMSA})_2]^-$, que aparecem na forma neutra e aniônica, ou para o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{HMPAO})]$, que dependendo do pH, pode formar diferentes espécies[98]. [98,99].

Para os experimentos realizados na eletroforese, utilizamos o íon $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4]^-$ como referência, uma vez que o mesmo é a espécie que tem estrutura conhecida e caracterizada e foi utilizado no preparo do complexo precursor *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. O resultado obtido comprovou o caráter negativo do ânion $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4]^-$, uma vez que o complexo migrou 5 cm em direção ao ânodo (**Figura 115**). Na eletroforese, a taxa de migração é diretamente proporcional à carga e inversamente proporcional ao raio iônico do complexo que está sendo separado. A migração da espécie catiônica está voltada para o cátodo enquanto a da espécie aniônica está voltada para o ânodo[99].

Figura 115. Perfil eletroforético do complexo aniônico de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4]^-$ obtidos de corrida em papel Whatman 1, em solução eletrolítica de metanol: PBS 0,025 M, pH=7,5 (1:1) submetido à tensão de 264 V por 2 horas.

O mesmo procedimento foi realizado para as espécies **1**, **2** e para o complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ (**Figura 116-a,b,c**). Como pode ser visto na **Figura 116-a** e **b**, foi observado que as **espécies 1** e **2** migraram 2 cm em direção ao cátodo, demonstrando um caráter levemente aniônico para essas espécies. Ainda para a **espécie 2**, foi observado que um parte migrou em direção ao ânodo. Já o complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ permaneceu na região central da fita e um pouco deslocado em direção ao cátodo, sugerindo existirem duas espécies, uma neutra e

outra catiônica. Considerando a estrutura esperada para o complexo, que deve ser catiônica, é possível ser necessário alterar as condições de análise para demonstrar claramente o caráter catiônico do complexo (**Figura 116-c**).

Figura 116. Perfil eletroforético da espécie 1, espécie 2 e do complexo $fac-[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ obtidos de corrida em papel Whatman 1, em solução eletrolítica de metanol: PBS 0,025 M, pH=7,5 (1:1) submetido à tensão de 264 V por 2 horas.

4.2.4 Determinação do coeficiente de partição do complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$

O coeficiente de partição (P) é uma das propriedades físico-químicas mais importantes de um fármaco, principalmente no que se diz respeito à relação estrutura molecular/atividade biológica[106]. O coeficiente de partição está relacionado à solubilidade e permeabilidade de um fármaco, que influenciará diretamente sobre outras propriedades da droga, tais como: dissolução, absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e ligação às proteínas[106]. Uma vez no organismo vivo, as substâncias podem se distribuir entre estruturas apolares (membranas celulares) ou nas soluções aquosas (plasma sanguíneo, linfa, fluidos intracelulares).

Na literatura são conhecidos vários métodos experimentais para determinação do coeficiente de partição, sendo de longe o mais utilizado o método que consiste de mistura-se uma quantidade conhecida da substância em uma mistura de solvente orgânico imiscível com água (n-octanol, éter etílico ou clorofórmio) e uma solução aquosa (água, NaCl 0,9%, PBS); após a agitação, as fases são separadas e determina-se a quantidade de substância presente em cada uma delas[107]. Para fins práticos e melhor mimetizar o sistema biológico é utilizado a mistura n-octanol/PBS[106]. [107]. Para se calcular P utiliza-se a seguinte expressão:

$$P = \frac{\text{concentração da substância na fase orgânica ou óleo}}{\text{concentração da substância na fase aquosa}}$$

Para avaliar a quantidade de substância presente em cada fase nos radiofármacos, é feita a contagem da radioatividade em um contador de tipo poço ou calibrador de dose[107]. Em ensaios biológicos, o coeficiente de partição (P) é aplicado como o Log do coeficiente de partição (LogP), no qual se:

- LogP < 0, a substância é mais hidrofílica;
- LogP = 0, a substância tem afinidade tanto para a fase orgânica quanto pela fase aquosa;
- LogP > 0 a substância é hidrofóbica[107].

O LogP foi determinado para as três outras espécies radioativas, separada no processo cromatográfico. Como o experimento foi feito em duplicata, foi calculada a média dos valores de LogP obtidos e calculado o desvio padrão, cujos resultados são apresentados na **Tabela 39** abaixo:

Tabela 39. Valores dos coeficientes de partição (logP), como média $\pm$ desvio padrão (DP) das três amostras

Espécies radioativas	LogP (média $\pm$ DP)
1	0,35 $\pm$ 0,035
2	0,93 $\pm$ 0,028
<i>fac</i> -[[^{99m} Tc](CO) ₃ (HL ³)]Br	1,54 $\pm$ 0,028

Pelo LogP das três espécies presentes no radiocromatograma, podemos inferir que as mesmas tem caráter hidrofóbico, principalmente o complexo *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br, que apresentou o maior valor dentre eles (1,54). Dessa maneira, podemos correlacionar as propriedades físico-químicas do complexo em questão com as propriedades biológicas. Na Medicina Nuclear, é desejável que os complexos sejam lipofílicos, uma vez que isso facilita que os complexos de ^{99m}Tc sejam internalizados em células tumorais e interajam com a glicoproteína-P[69]. A glicoproteína-P é um produto do gene de multirresistência à fármacos (MDR1), responsável por transportar os fármacos e xenobióticos para a parte externa das células do fígado, rins, cérebro, trato gastrointestinal, das células tumorais e das células das barreiras hemato-teciduals, sendo por isso envolvida no processo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diferentes fármacos[108].

4.2.5 Estabilidade *in vitro* dos complexos *fac*-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br na presença de cisteína ou histidina

Uma vez administrado os radiofármacos nos pacientes, ao entrar na corrente sanguínea, os mesmos poderão entrar em contato com diferentes substâncias presentes no sangue ou mesmo nos tecidos, como as enzimas e proteínas, onde

moléculas de cisteína e histidina, componentes dessas estruturas, podem competir pela ligação ao metal [109].

A cisteína e a histidina (**Figura 117**) são aminoácidos que possuem em sua estrutura átomos doadores com afinidade reconhecida pelo fragmento *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3]^+$ [56,110,111]. A glutathiona (GSH) é um peptídeo constituído pelos aminoácidos ácido glutâmico, cisteína e glicina, presente tanto no meio intracelular quanto extracelular [112]. Devido ao fato do átomo de enxofre da cisteína ser muito reativo, a glutathiona pode formar dímeros com outra glutathiona ou ainda ligar-se à cisteína de outras proteínas [112].

Figura 117. Estrutura química dos aminoácidos cisteína e histidina e do peptídeo glutathiona.

Fonte: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Cisteína>>, <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Histidina>> e <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Glutathiona>> Acesso em 20 de novembro de 2015.

Para avaliar a estabilidade do complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ foram utilizadas a histidina e a cisteína, conforme descrito no item 3.3.8 e as análises foram realizadas por CLAE. Para efeito de comparação e determinação do tempo de retenção de possíveis produtos de substituição, foram preparados os complexos *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{cys})]^-$ e *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{his})]^-$ a partir da reação de *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]^+$ com cisteína e histidina. Todas as análises por CLAE foram realizadas utilizando as mesmas condições de análise utilizadas para determinação da pureza radioquímica.

Inicialmente foi analisada a solução do complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{his})]^-$, sendo observados dois picos: um em vermelho (3,5 minutos), referente à espécie não reduzida, o íon $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4]^-$, e um em verde (4,8 minutos), referente ao composto marcado com a histidina (**Figura 118-a**).

Na análise de alíquotas da solução de *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ na presença da histidina foi possível identificar que o perfil cromatográfico obtido, após 1 hora de

incubação com histidina (**Figura 118-b**), foi idêntico ao obtido após a marcação (**Figura 108**) demonstrando a estabilidade do complexo.

Após 3 horas de incubação, foi observada uma diminuição dos picos dos subprodutos formados seguido da formação de uma nova espécie em 5,4 minutos (pico em verde) (**Figura 118-c**), compatível com o tempo de 4,9 minutos obtido para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{his})]^-$. Após 6 horas de incubação, podendo-se notar no radiocromatograma o desaparecimento dos 4 picos originalmente observados na hora da marcação de incubação e o aparecimento de novas espécies em tempos de retenção diferentes (**Figura 118-d**). Todavia, observado os espaços entre os tempos de retenção desses novos picos e aqueles observados no tempo de incubação de 3 horas, parece ter ocorrido um atraso no registro dos sinais ou invés de realmente serem novos compostos, sugerindo a troca quase que completa do ligante L^3 pela histidina. Novas análises deverão ser realizadas para confirmar o resultado.

O mesmo procedimento realizado para a histidina foi conduzido para a cisteína. Na **Figura 119-a**, são observados vários picos no radiocromatograma do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{cys})]^-$, sendo que o pico de maior intensidade (amarelo) aparece com o tempo de retenção em 8,7 minutos. Após 1 e 3 horas de incubação em cisteína (**Figura 119-b e c**), o complexo mostrou-se estável, uma vez que os radiocromatogramas aparecem bem semelhantes ao obtido do complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ (**Figura 118**). Já na solução do complexo incubado por 6 horas, foi observado o desaparecimento dos sinais presentes no complexo incubado por 1 e 3 horas, com subsequente formação de outro pico (verde) com tempo de retenção de 13,1 minutos (**Figura 119-c**). Foi observada também a formação de um sinal próximo ao do complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$, havendo a sobreposições desses picos (rosa e amarelo), além aumento do tempo de retenção, que foi de 14,0 para 14,6 minutos (**Figura 119-d**).

Figura 118. Radiocromatogramas: a) complexo marcado com histidina, $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(his)]^+$; complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ incubado em presença de histidina por: b) 1 hora, c) 3 horas e d) 6 horas.

Figura 119. Radiocromatogramas: a) complexo marcado com a cisteína, $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(cys)^+$; complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ incubado em presença de cisteína por: b) 1 hora, c) 3 horas e d) 6 horas.

4.2.6 Estabilidade *in vitro* do complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ na presença de tampão PBS

Da mesma maneira como feito para a histidina e a cisteína, foi analisada a estabilidade do complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ no tampão PBS. O tampão PBS é uma solução salina composta de cloreto de sódio, fosfato de sódio e, em algumas formulações, como cloreto de potássio e fosfato de potássio[113]. Esse tampão é muito utilizado em ensaios biológicos, uma vez que está bem próximo ao pH fisiológico (pH = 7,4), não é tóxico às células e ainda é isotônico (mesma pressão osmótica) em relação às mesmas, sendo utilizado para diluir diferentes substâncias ou ainda como solução para limpeza celular[113].

Uma vez que esse tampão possui vários sais diluídos, o complexo marcado foi incubado nesse tampão e nos tempos de 1, 3 e 6 horas) foram retiradas alíquotas e analisadas por CLAE. Após 1 hora de incubação (**Figura 120-a**), o complexo mostrou-se estável, aparecendo os mesmos sinais que aparecem no radiocromatograma do complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$, sem purificar (**Figura 108**), mostrado anteriormente. Passadas 3 horas, pode ser observado no radiocromatograma uma diminuição significativa do pico em 11 minutos (**Figura 120-b**) seguido do aparecimento de um pico em 5,80 minutos (pico verde claro). Após 6 horas, parte dos 4 picos observados inicialmente, desaparece dando origem a outros picos, com retenção em tempos diferentes (**Figura 120-c**). Como pode ser observado pelos radiocromatogramas, o complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ mostrou-se estável por menos de 3 horas, tempo no qual começam a aparecer outras espécies radioquímicas.

Figura 120. Radiocromatogramas do complexo *fac*-[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ incubados em PBS por: a) 1 hora, b) 3 horas e c) 6 horas.

4.2.7 Captação do complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ em células B16F10

Tendo sido possível preparar e isolar três complexos a partir da reação do $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(H_2O)_3]$ com o o ligante HL^3 , decidiu-se avaliar a captação da **espécie 1**, com LogP 0,35 e o complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$, com LogP 1,54, em células de efluxomelanoma murino B16F10, pois seu cultivo em laboratório apresenta rápida proliferação, além de ser facilmente transplantada em camundongos C57/Bl e possuir alta capacidade de disseminação metastática[114]. Outro motivo para a escolha dessa linhagem, é que o grupo de pesquisa do Centro de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas (SP) já possui experiência com esse tipo de célula[107]. Uma vez que foi observado nos experimentos de estabilidade em cisteína e histidina que a espécie 2 era muito instável, ela foi excluída dessa avaliação.

Os experimentos realizados para avaliar a taxa captação mostraram que o complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ apresentou uma porcentagem de captação bem maior em relação à **espécie 1** e foi observado ainda que, em ambos os casos, os mesmos apresentaram um leve decréscimo na concentração nas células no decorrer do tempo (**Figura 121-a e b**). A captação da **espécie 1** foi de $0,6 \pm 0,14$ % aos 5 minutos, diminuindo para $0,5 \pm 0$ % aos 60 minutos. Comportamento semelhante foi encontrado para o complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$, onde a captação inicial foi de $4,2 \pm 0,14$ %, aos 5 minutos, diminuindo para $3,8 \pm 0,07$ % aos 60 minutos. Dessa maneira, como pode ser observado nos gráficos, o complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ apresentou uma melhor captação quando comparado à espécie 1, tendo melhores resultados no tempo de 15 minutos.

Figura 121. Avaliação da captação: a) espécie 1 e b) complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ em células B16F10 em meio de cultura, mantidas a 37 °C, em função do tempo.

4.2.8 Efluxo do complexo $fac-[^{99m}Tc](CO)_3(HL^3)]Br$ em células B16F10

Como foi observado uma diminuição na taxa de captação dos complexos no decorrer do tempo (**Figuras 119-a,b**), decidiu-se avaliar a taxa de efluxo dos complexos, incubando as células com os complexos por 60 minutos e depois substituindo o meio de cultura contendo as espécies radioativas e por outro sem radiação, passando a medir a quantidade de material que deixa as células. Nos

gráficos a seguir (**Figura 122-a,b**) foi considerado que após a troca do meio ($t=0$) 100% da radioatividade estava no interior das células. Nos gráficos são mostrados os valores relativos à quantidade de composto que permanece na célula após cada tempo após a lavagem do meio, conforme descrito na parte experimental (**item 3.3.9.3**).

Os experimentos realizados para avaliar a taxa de efluxo para a **espécie 1** e para o complexo **fac-[[^{99m}Tc](CO) $_3$ (HL 3)]Br** mostraram que, com o passar do tempo, em ambos os casos, as células eliminavam o radiofármaco para o meio (**Figura 122-a,b**). Foi possível observar ainda que ambas as espécies radioativas permaneceram captadas pelas células por até 60 minutos (**espécie 1** = $16,5 \pm 0,71\%$ e **fac-[[^{99m}Tc](CO) $_3$ (HL 3)]Br** = $22,9 \pm 2,2\%$).

Figura 122. Avaliação da efluxo: a) espécie 1 e b) complexo **fac-[[^{99m}Tc](CO) $_3$ (L 3)]** em células B16F10 em meio de cultura com SFB, mantidas a 37 °C em função do tempo.

4.2.9 Viabilidade celular por azul de tripan

A análise de viabilidade celular é utilizada em muitos procedimentos experimentais com o objetivo de verificar: a susceptibilidade no tumor, a resistência microbiológica e a morte celular espontânea após a submissão das mesmas às diferentes condições experimentais[115]. Nesse tipo de experimento, a integridade da membrana celular é um critério básico para distinguir células vivas das mortas[115]. O método do azul de tripan é um método muito comum para avaliar a citotoxicidade em vários tipos de experimentos, onde as células mortas absorvem o azul de tripan no citoplasma por causa da perda de seletividade da membrana, enquanto que as células vivas permanecem inalteradas[115]. Dessa maneira, o número relativo de células mortas e vivas é obtido por microscopia óptica, através da contagem do número de células coradas (mortas ou inviables) e células não coradas (vivas ou viáveis), utilizando uma Câmara de Neubauer[115,116].

A viabilidade por azul de tripan foi realizada apenas para a **espécie 1** e para o complexo **fac-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br** utilizando alíquotas retiradas durante o experimento de captação e efluxo celular. Para o cálculo da viabilidade celular, foi utilizada a equação descrita no item 3.3.10. A seguir seguem os valores calculados para a viabilidade celular nos experimentos de captação e efluxo (**Tabela 40**):

Tabela 40. Porcentagem de células viáveis (células B16F10) nos experimentos de captação e efluxo frente à espécie 1 e ao complexo fac-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br

Tempo (min)	Captação			Efluxo
	15	30	60	60
Espécie 1	92,5%	97,5%	98,8%	98,5%
fac-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br	97,4%	97,0%	96,7%	98,6%

Tanto nos experimentos da captação como nos de efluxo, foi observado em todos os tempos uma porcentagem de células viáveis superior a 90%, viabilizando assim o seu uso para os experimentos de captação e efluxo.

4.2.10 Avaliação da eficiência de marcação do complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ por microondas

Geralmente, o método convencional de marcação do complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ com agentes quelantes requer aquecimento por longo tempo para que a síntese seja efetiva[117,118]. Um dos maiores desafios na síntese de radiofármacos com radionuclídeos de meia-vida curta é prepará-los rapidamente e com elevado rendimento radioquímico, em especial com os nuclídeos emissores de pósitrons, como o ^{13}N ($t_{1/2} = 10$ min), o ^{11}C ($t_{1/2} = 20$ min) e o ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ min)[119]. Nesse contexto, a utilização das microondas como fonte de energia torna-se interessante, pois possibilita que as reações sejam processadas em um tempo menor e com rendimentos mais elevados do que àquelas realizadas nos métodos de aquecimento convencionais[118]. Outro fato que torna as microondas interessantes é que esse método possibilita realizar reações em temperaturas elevadas de maneira fácil e segura, podendo ser usado na clínica[117].

Dessa maneira, realizamos a reação para obtenção do complexo *fac*- $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ em microondas, com o objetivo de comparar os resultados desse método com aqueles obtidos no método convencional (aquecimento em banho-maria à 75 °C por 30 minutos):

Figura 123. Radiocromatogramas do complexo $fac\text{-}[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{HL}^3)]\text{Br}$ sintetizado em microondas por: a) 1 minuto, b) 3 minutos e c) 5 minutos.

Quando comparado com o método convencional de síntese, é observado que a utilização das microondas como fonte de energia minimizou a formação das outras espécies. Com apenas 1 minuto de aquecimento no microondas (**Figura 123-a**),

obteve-se a espécie principal (pico amarelo) com rendimento de 58%. Já na reação em que a solução foi aquecida por 3 minutos, é observada a diminuição das outras espécies e aumento no rendimento da espécie principal (pico amarelo), que passou para 75% (**Figura 123-b**). Aumentando-se o tempo de aquecimento para 5 minutos (**Figura 123-c**), é observado que o rendimento da espécie principal mantém-se constante (pico verde escuro), com uma leve diminuição das outras espécies, seguido do aparecimento de uma outra espécie em 6,10 minutos (pico vermelho).

No trabalho de Saji *et al.* (2011, p. 3746 e 3747), é observado que as sínteses em microondas utilizando temperaturas e tempos mais elevados (110 °C, 30 minutos), aumentam os rendimentos da marcação com o $^{99m}\text{Tc(I)}$. Uma possibilidade para aumentar o rendimento da marcação, assim como evitar a formação das outras espécies na marcação com o ligante **HL**³, seria aumentar a temperatura e o tempo de reação nas sínteses, utilizando as microondas como fonte de energia.

5 CONCLUSÕES

Foram sintetizados nesse trabalho seis ligantes (**HL**¹⁻⁶), contendo ligantes assimétricos **HL**^{1,2} do tipo bases de Schiff, derivadas da etilenodiamina e dietilenotriamina, respectivamente, e ligantes triaminas **HL**³⁻⁶ derivados da dietilenotriamina. Foram realizadas reações de complexação com o precursor metálico de Re^I [Re(CO)₅Br], com a formação de complexos neutros do tipo **fac**-[Re(CO)₃(L¹)] e complexos catiônicos do tipo **fac**-[Re(CO)₃(**HL**^{2,3,4,5,6})]Br. Os ligantes e complexos foram caracterizados por diversos métodos, que incluem ponto de fusão, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, espectrometria de massas (MS-ESI) e, no caso dos complexos com os ligantes **HL**^{1,2,5,6}, difração de raios X pelo método do monocristal.

Na etapa de caracterização dos complexos, foi observada uma maior dificuldade na interpretação dos espectros de ¹³C destes com os ligantes **HL**¹⁻⁴, nos quais foram observados mais sinais do que esperado para as estruturas propostas para os mesmos. Uma hipótese para explicar esses sinais adicionais em tais espectros seria que espécies diméricas poderiam estar formando em solução durante o experimento. Estudos de RMN de ¹H com esses complexos, variando a temperatura (-10, 25 e 60 °C), mostraram uma melhora na multiplicidade dos sinais ao baixar a temperatura para -10 °C.

Em parceria com a Faculdade de Medicina da USP (FM/USP), no Hospital das Clínicas em São Paulo, foi realizada a marcação do ligante **HL**³ com o complexo **fac**-[[^{99m}Tc](H₂O)(CO)₃]⁺. A mistura reacional foi analisada por CLAE, na qual foram observadas três espécies, sendo a espécie majoritária (**espécie 3**), o complexo marcado com esse ligante. Essas espécies foram separadas por CLAE e, a partir daí, foram realizados os demais experimentos. Devido à instabilidade da **espécie 2**, foram realizados experimentos adicionais apenas com a **espécie 1** e a **espécie 3**. A análise por eletroforese em papel da **espécie 3** sugere a existência de duas espécies, uma neutra e outra catiônica. O complexo de ^{99m}Tc foi coinjectado com o seu complexo análogo de Re^I, tendo sido observados tempos de retenção bem

próximos para ambas as espécies, mostrando dessa maneira se tratarem de espécies similares, com a mesma carga.

Os testes de estabilidade do complexo **fac-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br** em cisteína, histidina e tampão PBS mostraram que o complexo apresenta boa estabilidade nesses substratos por até 3 horas de incubação. Através do coeficiente de partição, foi observado que o complexo **fac-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br** apresenta caráter lipofílico. Dessa maneira, pode-se inferir que o complexo em questão torna-se potencialmente interessante para ser utilizado na Medicina Nuclear, uma vez que é desejável que os mesmos sejam lipofílicos, pois facilita a internalização dos complexos de ^{99m}Tc em células tumorais.

Os testes biológicos *in vitro* de captação e efluxo com células B16F10 (melanoma murino), mostraram que as células captaram o complexo **fac-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br**, em torno de 4,2%, e mantiveram retidas em seu interior cerca de 20% da quantia captada do complexo, após 60 minutos de incubação. Esse teste mostrou que o complexo em questão pode ser considerado um bom candidato a radiofármaco, uma vez que é interessante que se capte o radiofármaco, mas também o elimine para o meio, após a administração no paciente. Já o teste de viabilidade celular por azul de Tripán mostrou estabilidade das células durante os experimentos de captação e efluxo frente às espécies radioativas, apresentando uma viabilidade celular superior a 90% em todos os casos.

Adicionalmente, pelo estudo comparativo entre o método convencional de síntese (aquecimento) com o método de síntese no qual microondas são utilizadas, foi observado que com apenas 3 minutos de reação no microondas, já se obtinha o complexo **fac-[[^{99m}Tc](CO)₃(HL³)]Br**, com rendimentos em torno de 75%. Uma vez que na síntese de radiofármacos, com radionuclídeos de vida curta, um dos maiores desafios é prepará-los rapidamente e com elevado rendimento radioquímico, esse método mostrou-se uma alternativa interessante para a marcação do complexo **fac-[[^{99m}Tc](H₂O)(CO)₃]⁺** com o ligante **HL³**.

6 REFERÊNCIAS

- [1] W.D. Webster, G.T. Parks, D. Titov, P. Beasley, The production of radionuclides for nuclear medicine from a compact, low-energy accelerator system, *Nuclear Medicine and Biology*. 41 (2014) e7–e15. doi:10.1016/j.nucmedbio.2013.11.007.
- [2] R.J. Kowalsky, S. Falen, R. Kowalsky, *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy & Nuclear Medicine*, 2 edition, APhA Publications, Washington, D.C, 2004.
- [3] S. Jurisson, D. Berning, W. Jia, D. Ma, Coordination compounds in nuclear medicine, *Chemical Reviews*. 93 (1993) 1137–1156.
- [4] G.B. Saha, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 6th ed. 2010 edition, Springer, New York, 2010.
- [5] W.D. Loveland, D.J. Morrissey, G.T. Seaborg, *Modern Nuclear Chemistry*, 1 edition, Wiley-Interscience, Hoboken, N.J, 2005.
- [6] BBC - GCSE Bitesize: Penetrating properties of radiation, (n.d.). http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/aqa_pre_2011/radiation/radioactiverev3.shtml (accessed June 20, 2014).
- [7] P. por J. B, eira, *Química Integral*, (n.d.). <http://cursoquimicaintegral.blogspot.com.br/2013/05/radioatividade.html> (accessed June 20, 2014).
- [8] C.S. Cutler, H.M. Hennkens, N. Sisay, S. Huclier-Markai, S.S. Jurisson, Radiometals for Combined Imaging and Therapy, *Chemical Reviews*. 113 (2013) 858–883. doi:10.1021/cr3003104.
- [9] G. Ferro-Flores, C. Arteaga de Murphy, L. Melendez-Alafort, Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy, *Current Pharmaceutical Analysis*. 2 (2006) 339–352.
- [10] M.J. Welch, C.S. Redvanly, *Handbook of Radiopharmaceuticals*, 1 edition, Wiley, New York, 2002.
- [11] S. Jürgens, W.A. Herrmann, F.E. Kühn, Rhenium and technetium based radiopharmaceuticals: Development and recent advances, *Journal of Organometallic Chemistry*. 751 (2014) 83–89. doi:10.1016/j.jorganchem.2013.07.042.
- [12] F.A.M.J.M. MPH, M.J.G. MD, *Essentials of Nuclear Medicine Imaging: Expert Consult - Online and Print*, 6e, 6 edition, Saunders, Philadelphia, PA, 2012.

- [13] F. Tisato, C. Bolzati, M. Porchia, F. Refosco, Contribution of electrospray mass spectrometry for the characterization, design, and development of nitrido technetium and rhenium heterocomplexes as potential radiopharmaceuticals, *Mass Spectrometry Reviews*. 23 (2004) 309–332. doi:10.1002/mas.20000.
- [14] C.F. Ramogida, C. Orvig, Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy, *Chemical Communications*. 49 (2013) 4720. doi:10.1039/c3cc41554f.
- [15] S. Liu, The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals, *Chemical Society Reviews*. 33 (2004) 445. doi:10.1039/b309961j.
- [16] M.A. Pysz, S.S. Gambhir, J.K. Willmann, Molecular imaging: current status and emerging strategies, *Clinical Radiology*. 65 (2010) 500–516. doi:10.1016/j.crad.2010.03.011.
- [17] R. Weissleder, M.J. Pittet, Imaging in the era of molecular oncology, *Nature*. 452 (2008) 580–589. doi:10.1038/nature06917.
- [18] T.F. Massoud, Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light, *Genes & Development*. 17 (2003) 545–580. doi:10.1101/gad.1047403.
- [19] F.A.M.J.M. MPH, M.J.G. MD, *Essentials of Nuclear Medicine Imaging: Expert Consult - Online and Print*, 6e, 6 edition, Saunders, Philadelphia, PA, 2012.
- [20] R.M. Reilly, *Monoclonal Antibody and Peptide-Targeted Radiotherapy of Cancer*, 1 edition, Wiley, Hoboken, N.J, 2010.
- [21] L. Zhu, K. Ploessl, H.F. Kung, PET/SPECT imaging agents for neurodegenerative diseases, *Chemical Society Reviews*. (2014). doi:10.1039/c3cs60430f.
- [22] M.M. Khalil, J.L. Tremoleda, T.B. Bayomy, W. Gsell, Molecular SPECT Imaging: An Overview, *International Journal of Molecular Imaging*. 2011 (2011) 1–15. doi:10.1155/2011/796025.
- [23] A. Rahmim, H. Zaidi, PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges, *Nuclear Medicine Communications*. 29 (2008) 193–207.
- [24] G. Ting, C.-H. Chang, H.-E. Wang, Cancer nanotargeted radiopharmaceuticals for tumor imaging and therapy, *Anticancer Research*. 29 (2009) 4107–4118.
- [25] E.B. de Araújo, A utilização do elemento Tecnécio-99m no diagnóstico de patologias e disfunções dos seres vivos, *Redes*. (2012). <http://qnint.sbq.org.br/qni/visualizarTema.php?idTema=51> (accessed August 1, 2014).

- [26] M. Hamoudeh, M.A. Kamleh, R. Diab, H. Fessi, Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60 (2008) 1329–1346. doi:10.1016/j.addr.2008.04.013.
- [27] F. Zobi, B. Spingler, R. Alberto, Guanine and Plasmid DNA binding of Mono- and Trinuclear *fac*-[Re(CO)₃]⁺ Complexes with Amino Acid Ligands, *ChemBioChem*. 6 (2005) 1397–1405. doi:10.1002/cbic.200400453.
- [28] U. Abram, R. Alberto, Technetium and rhenium: coordination chemistry and nuclear medical applications, *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 17 (2006) 1486–1500.
- [29] A. Núñez-Montenegro, R. Carballo, J.M. Hermida-Ramón, E.M. Vázquez-López, Synthesis, characterization, reactivity and computational studies of new rhenium(I) complexes with thiosemicarbazone ligands derived from 4-(methylthio)benzaldehyde, *Polyhedron*. 30 (2011) 2146–2156. doi:10.1016/j.poly.2011.05.033.
- [30] F.L.N. Marques, M.R.Y. Okamoto, C.A. Buchpiguél, Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade, *Radiol Bras*. 34 (2001) 233–239.
- [31] E. Alessio, *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, 1 edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2011.
- [32] J. R. Dilworth, S. J. Parrott, The biomedical chemistry of technetium and rhenium, *Chemical Society Reviews*. 27 (1998) 43. doi:10.1039/a827043z.
- [33] M. Papachristou, I.C. Pirmettis, C. Tsoukalas, D. Papagiannopoulou, C. Raptopoulou, A. Terzis, C.I. Stassinopoulou, E. Chiotellis, M. Pelecanou, M. Papadopoulos, Synthesis and Characterization of Novel Oxotechnetium (⁹⁹Tc and ^{99m}Tc) and Oxorhenium Complexes from the 2,2'-Bipyridine (NN)/Thiol (S) Mixed-Ligand System, *Inorganic Chemistry*. 42 (2003) 5778–5784. doi:10.1021/ic034368j.
- [34] R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, A.P. Schubiger, U. Abram, T.A. Kaden, A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺ from [^{99m}TcO₄]⁻ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand, *Journal of the American Chemical Society*. 120 (1998) 7987–7988.
- [35] R. Alberto, The particular role of radiopharmacy within bioorganometallic chemistry, *Journal of Organometallic Chemistry*. 692 (2007) 1179–1186. doi:10.1016/j.jorganchem.2006.11.019.
- [36] A. Prakash, D. Adhikari, Application of Schiff bases and their metal complexes-A Review, *Int. J. Chem. Tech. Res*. 3 (2011) 1891–1896.

- [37] W.A. Zoubi, Biological Activities of Schiff Bases and Their Complexes: A Review of Recent Works, *International Journal of Organic Chemistry*. 03 (2013) 73–95. doi:10.4236/ijoc.2013.33A008.
- [38] C.M. da Silva, D.L. da Silva, L.V. Modolo, R.B. Alves, M.A. de Resende, C.V.B. Martins, Â. de Fátima, Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities, *Journal of Advanced Research*. 2 (2011) 1–8. doi:10.1016/j.jare.2010.05.004.
- [39] A. Kajal, S. Bala, S. Kamboj, N. Sharma, V. Saini, Schiff Bases: A Versatile Pharmacophore, *Journal of Catalysts*. 2013 (2013) 1–14. doi:10.1155/2013/893512.
- [40] M.A. Ashraf, K. Mahmood, A. Wajid, M.J. Maah, I. Yusoff, Synthesis, characterization and biological activity of Schiff bases, in: *International Conference on Chemistry and Chemical Process*, 2011: pp. 1–7. <http://repository.um.edu.my/31988/1/Synthesis,%20Characterization%20and%20Biological%20Activity%20of%20Schiff%20Bases.pdf> (accessed September 4, 2015).
- [41] P. Mayer, K.C. Potgieter, T.I.A. Gerber, Rhenium(I), (III) and (V) complexes of tridentate ONX (X=O, N, S)-donor Schiff bases, *Polyhedron*. 29 (2010) 1423–1430. doi:10.1016/j.poly.2010.01.013.
- [42] A. Marchi, A. Duatti, R. Rossi, L. Magon, U. Mazzi, A. Pasquetto, Reactivity of oxotetrachlororhenate (V) with bidentate and tetradentate schiff bases containing oxygen and nitrogen donors, *Inorganica Chimica Acta*. 81 (1984) 15–19.
- [43] F. Tisato, F. Refosco, U. Mazzi, G. Bandoli, M. Nicolini, Rhenium(V) oxo complexes with schiff base ligands containing four or five coordination sites. X-ray molecular structure of [N,N'-3-azapentane-1,5-diylbis(salicylideneiminato)(3-)-O,O',N,N',N'']oxorhenium(V), *Inorganica Chimica Acta*. 189 (1991) 97–103. doi:10.1016/S0020-1693(00)80394-1.
- [44] F. Tisato, F. Refosco, U. Mazzi, G. Bandoli, A. Dolmella, Synthesis, characterization and electrochemical studies on technetium(V) and rhenium(V) oxo-complexes with N,N'-2-hydroxypropane-1,3-bis(salicylideneimine), *Inorganica Chimica Acta*. 164 (1989) 127–135. doi:10.1016/S0020-1693(00)83213-2.
- [45] P. Mayer, T.I.A. Gerber, B. Buyambo, A. Abrahams, Coordination behaviour of acetylacetone-derived Schiff bases towards rhenium(I) and (V), *Polyhedron*. 28 (2009) 1174–1178. doi:10.1016/j.poly.2009.01.036.
- [46] R. Alberto, R. Schibli, R. Waibel, U. Abram, A.P. Schubiger, Basic aqueous chemistry of $[M(OH_2)_3(CO)_3]^+$ (M= Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application, *Coordination Chemistry Reviews*. 190 (1999) 901–919.

- [47] H.-J. Pietzsch, A. Gupta, M. Reisgys, A. Drews, S. Seifert, R. Syhre, H. Spies, R. Alberto, U. Abram, P.A. Schubiger, B. Johannsen, Chemical and Biological Characterization of Technetium(I) and Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes with Dithioether Ligands Serving as Linkers for Coupling the $\text{Tc}(\text{CO})_3$ and $\text{Re}(\text{CO})_3$ Moieties to Biologically Active Molecules, *Bioconjugate Chemistry*. 11 (2000) 414–424. doi:10.1021/bc990162o.
- [48] R. Schibli, K.V. Katti, C. Higginbotham, W.A. Volkert, R. Alberto, In vitro and in vivo evaluation of bidentate, water-soluble phosphine ligands as anchor groups for the organometallic $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ core, *Nuclear Medicine and Biology*. 26 (1999) 711–716.
- [49] U. Abram, S. Abram, R. Alberto, R. Schibli, Ligand exchange reactions starting from $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]_2^-$. Synthesis, characterization and structures of rhenium(I) tricarbonyl complexes with thiourea and thiourea derivatives, *Inorganica Chimica Acta*. 248 (1996) 193–202. doi:10.1016/0020-1693(96)05014-1.
- [50] R. Alberto, R. Schibli, P. August Schubiger, U. Abram, T.A. Kaden, Reactions with the technetium and rhenium carbonyl complexes $(\text{NEt}_4)_2[\text{MX}_3(\text{CO})_3]$. Synthesis and structure of $[\text{Tc}(\text{CN-But})_3(\text{CO})_3](\text{NO}_3)$ and $(\text{NEt}_4)[\text{Tc}_2(\mu\text{-SCH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3(\text{CO})_6]$, *Polyhedron*. 15 (1996) 1079–1089. doi:10.1016/0277-5387(95)00361-4.
- [51] R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, U. Abram, S. Abram, T.A. Kaden, P. August Schubiger, Steps towards $[(\text{C}_5\text{Me}_5)\text{TcO}_3]$: Novel synthesis of $[(\text{C}_5\text{Me}_5)\text{Tc}(\text{CO})_3]$ from $[\{\text{Tc}(\mu_3\text{-OH})(\text{CO})_3\}_4]$ and oxidation of $[(\text{C}_5\text{Me}_5)\text{M}(\text{CO})_3]$ ($\text{M} = \text{Tc}, \text{Re}$) with Br_2 , *Polyhedron*. 17 (1998) 1133–1140. doi:10.1016/S0277-5387(97)00500-7.
- [52] U. Abram, S. Abram, R. Schibli, R. Alberto, J.R. Dilworth, Synthesis and structures of technetium(I) and rhenium(I) tricarbonyl complexes with bis(diphenylthiophosphoryl)amide, $[\text{M}(\text{CO})_3[(\text{Ph}_2\text{PS})_2\text{N}](\text{CH}_3\text{CN})]$ ($\text{M} = \text{Tc}, \text{Re}$), *Polyhedron*. 17 (1998) 1303–1309. doi:10.1016/S0277-5387(97)00344-6.
- [53] R. Alberto, R. Schibli, A.P. Schubiger, U. Abram, H.-J. Pietzsch, B. Johannsen, First Application of $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ in Bioorganometallic Chemistry: Design, Structure, and in Vitro Affinity of a 5-HT_{1A} Receptor Ligand Labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$, *Journal of the American Chemical Society*. 121 (1999) 6076–6077.
- [54] S.S. Jurisson, J.D. Lydon, Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals, *Chemical Reviews*. 99 (1999) 2205–2218. doi:10.1021/cr980435t.
- [55] J.Y. Kim, Y.J. Ji, H.-J. Ha, H.K. Chae, Synthesis of unusual rhenium complexes with Schiff bases, *BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY*. 24 (2003) 504–506.

- [56] R. Schibli, R. La Bella, R. Alberto, E. Garcia-Garayoa, K. Ortner, U. Abram, P.A. Schubiger, Influence of the Denticity of Ligand Systems on the in Vitro and in Vivo Behavior of $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -Tricarbonyl Complexes: A Hint for the Future Functionalization of Biomolecules, *Bioconjugate Chemistry*. 11 (2000) 345–351. doi:10.1021/bc990127h.
- [57] P. Häfliger, S. Mundwiler, G. Andócs, L. Balogh, K. Bodo, K. Ortner, B. Spingler, R. Alberto, Structure, Stability, and Biodistribution of Cationic $[\text{M}(\text{CO})_3]$ ($\text{M} = \text{Re}$, ^{99}Tc , ^{99m}Tc) Complexes with Tridentate Amine Ligands, Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry. 35 (2005) 27–34. doi:10.1081/SIM-200047534.
- [58] G. Fridkin, T.A. Bonasera, P. Litman, C. Gilon, Backbone metal-cyclization: a novel approach for simultaneous peptide cyclization and radiolabeling. Application to the combinatorial synthesis of rhenium-cyclic somatostatin analogs, *Nuclear Medicine and Biology*. 32 (2005) 39–50. doi:10.1016/j.nucmedbio.2004.08.007.
- [59] M. Santimaria, T. Maina, U. Mazzi, M. Nicolini, Preparation and characterization of a new rhenium (V) complex containing the 3-diphenylphosphinopropionylglycyl-L-(S-benzyl)-cysteiny methyl ester ligand, *Inorganica Chimica Acta*. 240 (1995) 291–297.
- [60] E.W. Price, C. Orvig, Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals, *Chemical Society Reviews*. 43 (2014) 260. doi:10.1039/c3cs60304k.
- [61] R. Schibli, A. Schubiger, Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 29 (2002) 1529–1542. doi:10.1007/s00259-002-0900-8.
- [62] M.-S. Seo, K. Kim, H. Kim, Controlling helical chirality of cobalt complexes by chirality transfer from vicinal diamines, *Chemical Communications*. 49 (2013) 11623. doi:10.1039/c3cc46887a.
- [63] N.P. Kushwah, M.K. Pal, A.P. Wadawale, V.K. Jain, Diorgano-gallium and -indium complexes with salen ligands: Synthesis, characterization, crystal structure and C–C coupling reactions, *Journal of Organometallic Chemistry*. 694 (2009) 2375–2379. doi:10.1016/j.jorganchem.2009.03.029.
- [64] A.A. Emara, A.M. Ali, E.M. Ragab, A.A. El-Asmy, Synthesis, characterization and oxygen affinity of Mn(II), Co(II) and Ni(II) complexes of diethylenetriamine Schiff bases, *Journal of Coordination Chemistry*. 61 (2008) 2968–2977. doi:10.1080/00958970801993060.
- [65] S. Meghdadi, K. Mereiter, M. Amirnasr, F. Fadaee, A. Amiri, Synthesis, crystal structure, and electrochemistry of $[\text{Co}\{(\text{Me-sal})_2\text{dien}\}(\text{N}_3)]$ and $[\text{Co}\{(\text{Me-sal})_2\text{dpt}\}(\text{N}_3)]$, *Journal of Coordination Chemistry*. 62 (2009) 734–744. doi:10.1080/00958970802363966.

- [66] D. Qin, Z. Yang, G. Qi, Synthesis, fluorescence study and biological evaluation of three Zn(II) complexes with Paeonol Schiff base, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 74 (2009) 415–420. doi:10.1016/j.saa.2009.06.037.
- [67] M. Lipowska, R. Cini, G. Tamasi, X. Xu, A.T. Taylor, L.G. Marzilli, Complexes Having the *fac*-{M(CO)₃}⁺ Core (M = Tc, Re) Useful in Radiopharmaceuticals: X-ray and NMR Structural Characterization and Density Functional Calculations of Species Containing Two sp³ N Donors and One sp³ O Donor, *Inorganic Chemistry*. 43 (2004) 7774–7783. doi:10.1021/ic049544i.
- [68] P.D. Benny, T. Ganguly, L. Raiford, G.A. Fugate, B. Twamley, Synthesis and reactivity of acetylacetone with amine ligands in *fac*-Re(OH₂)₃(CO)₃⁺ complexes, *Inorganic Chemistry Communications*. 14 (2011) 392–395. doi:10.1016/j.inoche.2010.12.009.
- [69] F.L.N. Marques, Preparo e avaliação de novos complexos catiônicos de [^{99m}Tc] tecnécio para detecção de células tumorais, Universidade de São Paulo, 2007. http://www.researchgate.net/profile/Roger_Chammas/publication/35632530_Preparo_e_avaliao_de_novos_complexos_catinicos_de_99mTc_tecnicio_para_detecao_de_clulas_tumorais/links/00b7d518cf22d617d9000000.pdf (accessed October 19, 2015).
- [70] L. Xue-Ting, X. Yong-Shu, L. Qing-Liang, Synthesis and 1-D Double Line Supramolecular Structure of a Ni(II) Complex with N-alkylated Dien, *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*. 35 (2005) 459–462. doi:10.1081/SIM-200066988.
- [71] D.L. Pavia, ed., *Introduction to spectroscopy*, 4th ed, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, CA, 2009.
- [72] *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7 edition, Wiley, Hoboken, NJ, 2005.
- [73] B. Bosnich, An interpretation of the circular dichroism and electronic spectra of salicylaldimine complexes of square-coplanar diamagnetic nickel (II), *Journal of the American Chemical Society*. 90 (1968) 627–632.
- [74] P.E. Aranha, M.P. dos Santos, S. Romera, E.R. Dockal, Synthesis, characterization, and spectroscopic studies of tetradentate Schiff base chromium(III) complexes, *Polyhedron*. 26 (2007) 1373–1382. doi:10.1016/j.poly.2006.11.005.
- [75] M. Guadalupe Quintero-Téllez, M. de Jesús Rosales Hoz, S. Bernès, R. Zamorano-Ulloa, D. Ramírez-Rosales, J.L. Alcántara-Flores, Y. Reyes-Ortega, Synthesis, structural, electronic and magnetic studies of [Cu(II)(saleanN₃H₃)], *Journal of Molecular Structure*. 1034 (2013) 183–188. doi:10.1016/j.molstruc.2012.08.041.

- [76] R.C. Felicio, G.A. da Silva, L.F. Ceridorio, E.R. Dockal, Tetradentate Schiff Base Copper(II) Complexes, Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry. 29 (1999) 171–192. doi:10.1080/00945719909349442.
- [77] Synthesis and Spectral Investigation of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) Complexes with Novel N4 Ligands, Canadian Chemical Transactions. (2016) 368–380. doi:10.13179/canchemtrans.2015.03.04.0237.
- [78] S. Pattanaik, S.S. Rout, J. Panda, P.K. Sahu, M. Banerjee, Synthesis, characterisation and biological evaluation of bidentate ligands (reduced schiff's base) with metals of copper, nickel and zinc complexes, Rasayan Journal of Chemistry. 4 (2011) 136–141.
- [79] A. Biswas, M.G.B. Drew, C.J. Gómez-García, A. Ghosh, Use of a Reduced Schiff-Base Ligand to Prepare Novel Chloro-Bridged Chains of Rare Cu(II) Trinuclear Complexes with Mixed Azido/Oxo and Chloro/Oxo Bridges, Inorganic Chemistry. 49 (2010) 8155–8163. doi:10.1021/ic101183n.
- [80] I. Correia, J.C. Pessoa, M.T. Duarte, M.F.M. da Piedade, T. Jackush, T. Kiss, M.M.C.A. Castro, C.F.G.C. Geraldés, F. Avecilla, Vanadium(IV and V) Complexes of Schiff Bases and Reduced Schiff Bases Derived from the Reaction of Aromatico-Hydroxyaldehydes and Diamines: Synthesis, Characterisation and Solution Studies, European Journal of Inorganic Chemistry. 2005 (2005) 732–744. doi:10.1002/ejic.200400481.
- [81] S.H. Sumrra, M. Ibrahim, S. Ambreen, M. Imran, M. Danish, F.S. Rehmani, Synthesis, Spectral Characterization, and Biological Evaluation of Transition Metal Complexes of Bidentate N, O Donor Schiff Bases, Bioinorganic Chemistry and Applications. 2014 (2014) 1–10. doi:10.1155/2014/812924.
- [82] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Grasselli, The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules, Elsevier, 1991.
- [83] Combination Bands, Overtones and Fermi Resonances, Chemwiki.ucdavis.edu. (2013). http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Vibrational_Modes/Combination_Bands%2C_Overtones_and_Fermi_Resonances (accessed May 26, 2016).
- [84] R.F.D. FARIAS, QUIMICA DE COORDENAÇÃO: FUNDAMENTOS E ATUALIDADES, ATOMO, n.d.
- [85] M. Lipowska, H. He, X. Xu, A.T. Taylor, P.A. Marzilli, L.G. Marzilli, Coordination Modes of Multidentate Ligands in *fac*-[Re(CO)₃(polyaminocarboxylate)] Analogues of ^{99m}Tc Radiopharmaceuticals. Dependence on Aqueous Solution Reaction Conditions, Inorganic Chemistry. 49 (2010) 3141–3151. doi:10.1021/ic9017568.

- [86] M. Lipowska, R. Cini, G. Tamasi, X. Xu, A.T. Taylor, L.G. Marzilli, Complexes Having the *fac*-{M(CO)₃}⁺ Core (M = Tc, Re) Useful in Radiopharmaceuticals: X-ray and NMR Structural Characterization and Density Functional Calculations of Species Containing Two sp³ N Donors and One sp³ O Donor, *Inorganic Chemistry*. 43 (2004) 7774–7783. doi:10.1021/ic049544i.
- [87] A.M. Christoforou, P.A. Marzilli, F.R. Fronczek, L.G. Marzilli, *fac*-[Re(CO)₃L] Complexes Containing Tridentate Monoanionic Ligands (L[−]) Having a Terminal Amido and Two Amine Ligating Groups, *Journal of Chemical Crystallography*. 38 (2008) 115–121. doi:10.1007/s10870-007-9274-x.
- [88] L. Wei, J.W. Babich, W. Ouellette, J. Zubieta, Developing the {M(CO)₃}⁺ Core for Fluorescence Applications: Rhenium Tricarbonyl Core Complexes with Benzimidazole, Quinoline, and Tryptophan Derivatives, *Inorganic Chemistry*. 45 (2006) 3057–3066. doi:10.1021/ic0517319.
- [89] J.D.G. Correia, Â. Domingos, I. Santos, R. Alberto, K. Ortner, Re Tricarbonyl Complexes with Ligands Containing P,N,N and P,N,O Donor Atom Sets: Synthesis and Structural Characterization, *Inorganic Chemistry*. 40 (2001) 5147–5151. doi:10.1021/ic010417l.
- [90] S.M. Soares, S.S. Lemos, M.J.A. Sales, R.A. Burrow, On the nuclearity of tricarbonylrhenium(I) complexes with N,O,O-donating Schiff bases derived from amino acids, *Journal of Organometallic Chemistry*. 750 (2014) 80–85. doi:10.1016/j.jorgchem.2013.10.027.
- [91] C.M. Álvarez, R. Carrillo, R. García-Rodríguez, D. Miguel, pH-driven dynamic stereoinduction: epimerization upon dimerization in rhenium(I) complexes, *Chemical Communications*. 47 (2011) 12765. doi:10.1039/c1cc14799d.
- [92] W. Wang, T.S. Andy Hor, Y.K. Yan, Synthesis and X-ray structures of rhenium(I) carbonyl aminoalkoxide and aminocarboxylate complexes, *Inorganica Chimica Acta*. 359 (2006) 3754–3762. doi:10.1016/j.ica.2006.03.027.
- [93] H. Qayyum, R.S. Herrick, C.J. Ziegler, Synthesis of dimeric ReI amino acid conjugate complexes, *Dalton Transactions*. 40 (2011) 7442. doi:10.1039/c1dt10665a.
- [94] H.C. Zhao, B. Mello, B.-L. Fu, H. Chowdhury, D.J. Szalda, M.-K. Tsai, D.C. Grills, J. Rochford, Investigation of Monomeric versus Dimeric *fac*-Rhenium(I) Tricarbonyl Systems Containing the Noninnocent 8-Oxyquinolate Ligand, *Organometallics*. 32 (2013) 1832–1841. doi:10.1021/om301250v.
- [95] C. Moura, L. Gano, F. Mendes, P.D. Raposinho, A.M. Abrantes, M.F. Botelho, I. Santos, A. Paulo, 99mTc(I)/Re(I) tricarbonyl complexes for in vivo targeting of melanotic melanoma: Synthesis and biological evaluation, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 50 (2012) 350–360. doi:10.1016/j.ejmech.2012.02.014.

- [96] S.R. Banerjee, M.K. Levadala, N. Lazarova, L. Wei, J.F. Valliant, K.A. Stephenson, J.W. Babich, K.P. Maresca, J. Zubieta, Bifunctional Single Amino Acid Chelates for Labeling of Biomolecules with the $\{\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$ and $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^+$ Cores. Crystal and Molecular Structures of $[\text{ReBr}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{N})]$, $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)_2\text{NH}\}]\text{Br}$, $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}\}]\text{Br}$, $[\text{Re}(\text{CO})_3\{\text{X}(\text{Y})\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\}]\text{Br}$ ($\text{X} = \text{Y} = 2\text{-pyridylmethyl}$; $\text{X} = 2\text{-pyridylmethyl}$, $\text{Y} = 2\text{-(1-methylimidazolyl)methyl}$; $\text{X} = \text{Y} = 2\text{-(1-methylimidazolyl)methyl}$), $[\text{ReBr}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)\text{NH}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})\}]$, and $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})(\text{CH}_2\text{CO}_2)\}]$, *Inorganic Chemistry*. 41 (2002) 6417–6425. doi:10.1021/ic020476e.
- [97] W.G. Andrade, P.A.L. Santos, F.R.A. Lima, F.F. Lima, Utilização da Cromatografia em Camada Delgada para Determinação da Pureza Radioquímica de Radiofármacos em Serviços de Medicina Nuclear da Paraíba e Rio Grande do Norte, Brasil, *Scientia Plena*. 8 (2012). http://www.researchgate.net/profile/Wellington_Andrade/publication/256445381_Use_of_Thin_Layer_Chromatography_for_the_Determination_of_Radiochemical_Purity_of_Radiopharmaceuticals_in_Nuclear_Medicine_Services_of_Paraiba_and_Rio_Grande_do_Norte_Brazil/links/00b7d522a02ac62971000000.pdf (accessed November 18, 2015).
- [98] F.L.N. Marques, M.R.Y. Okamoto, C.A. Buchpiguél, Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade, *Radiol Bras.* 34 (2001) 233–239.
- [99] I. Zolle, ed., *Technetium-99m pharmaceuticals: preparation and quality control in nuclear medicine*; with 29 tables, Springer, Berlin, 2007.
- [100] R.L.S.R. Santos, B.L. Faintuch, R. Teodoro, Studies in vitro and in vivo of thymidine analog labeled with organometallic complex of technetium-99m for potential use in tumor diagnosis, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 44 (2008) 85–95. doi:10.1590/S1516-93322008000100010.
- [101] E.W. Abel, V.S. Dimitrov, N.J. Long, K.G. Orrell, A.G. Osborne, H.M. Pain, V. Šik, M.B. Hursthouse, M.A. Mazid, 2, 2': 6', 2''-Terpyridine (terpy) acting as a fluxional bidentate ligand. Part 2. Rhenium carbonyl halide complexes, fac- $[\text{ReX}(\text{CO})_3(\text{terpy})](\text{X} = \text{Cl}, \text{Br} \text{ or } \text{I})$: NMR studies of their solution dynamics, synthesis of cis- $[\text{ReBr}(\text{CO})_2(\text{terpy})]$ and the crystal structure of $[\text{ReBr}(\text{CO})_3(\text{terpy})]$, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. (1993) 597–603.
- [102] G. Bandoli, F. Tisato, A. Dolmella, S. Agostini, Structural overview of technetium compounds (2000–2004), *Coordination Chemistry Reviews*. 250 (2006) 561–573. doi:10.1016/j.ccr.2005.09.012.
- [103] D.R. Black, S.E. Hightower, Preparation and characterization of rhenium(I) dicarbonyl complexes based on the meridionally-coordinated terpyridine ligand, *Inorganic Chemistry Communications*. 24 (2012) 16–19. doi:10.1016/j.inoche.2012.07.034.

- [104] D.M. Kieffer, B.J. Cleynhens, H.P. Vanbilloen, D. Rattat, C.Y. Terwinghe, L. Mortelmans, G.M. Bormans, A.M. Verbruggen, Synthesis and biological evaluation of a technetium-99m(I)-tricarbonyl-labelled phenyltropane derivative, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16 (2006) 382–386. doi:10.1016/j.bmcl.2005.09.071.
- [105] E.J. Simpson, J.L. Hickey, D. Breadner, L.G. Luyt, Investigation of isomer formation upon coordination of bifunctional histidine analogues with $^{99m}\text{Tc}/\text{Re}(\text{CO})_3$, *Dalton Transactions*. 41 (2012) 2950. doi:10.1039/c2dt11962e.
- [106] A.K. Dash, S. Singh, J. Tolman, eds., *Pharmaceutics: basic principles and application to pharmacy practice*, Elsevier ; Academic Press, Amsterdam : Boston, MA, 2014.
- [107] C.P. Luz, Preparação, caracterização e utilização dos radiofármacos (^{18}F) FAZA e [$^{99m}\text{Tc}(\text{O})\text{HL}^{91}$] para detecção de hipóxia em cultura de células e em tumores em modelo animal, Universidade de São Paulo, n.d. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5155/tde-22012014-144309/en.php> (accessed November 19, 2015).
- [108] F.J. Azeredo, F.T. Uchôa, T.D. Costa, Papel da glicoproteína-P na farmacocinética e nas interações medicamentosas, *Rev Bras Farm.* 90 (2009) 321–326.
- [109] A. Radin, Preparo e avaliação de complexos de [^{99m}Tc] tecnécio aquacarbonil contendo ligantes 1,2-diaminoetano-N-substituídos para detecção de tumores, Universidade de São Paulo, 2010. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5155/tde-25082010-121350/en.php> (accessed November 20, 2015).
- [110] D. TourwÃ, L. Jeannin, K. Iterbeke, P.A. Schubiger, Organometallic ^{99m}Tc -AquaionLabels Peptide to an Unprecedented High Specific Activity, (1999). http://www.researchgate.net/profile/Pius_Schubiger/publication/12735012_Organometallic_99mTc-aquaion_labels_peptide_to_an_unprecedented_high_specific_activity/links/0912f510cf9532531e000000.pdf (accessed November 20, 2015).
- [111] D.R. van Staveren, P.D. Benny, R. Waibel, P. Kurz, J.-K. Pak, R. Alberto, S-Functionalized Cysteine: Powerful Ligands for the Labelling of Bioactive Molecules with Triaquatricarbonyltechnetium-99m(1+) ($[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$), *HCA*. 88 (2005) 447–460. doi:10.1002/hlca.200590029.
- [112] R.M.F. Vítor, Complexos de rênio e tecnécio com ligandos N-heterocíclicos dirigidos ao núcleo de células tumorais: da imagiologia molecular à radioterapia com ^{99m}Tc , (2007). <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/1701> (accessed November 20, 2015).

- [113] Tampão fosfato-salino, Wikipédia, a enciclopédia livre. (2014). https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Tamp%C3%A3o_fosfato-salino&oldid=40098263 (accessed December 14, 2015).
- [114] G. Junqueira Junior, Modelo experimental de metástases pulmonares de melanoma murino B16-F10 em camundongos C57BL/6N com células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico, (2005). <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/7776> (accessed December 7, 2015).
- [115] B.A. Avelar-Freitas, V.G. Almeida, M.C.X. Pinto, F.A.G. Mourão, A.R. Massensini, O.A. Martins-Filho, E. Rocha-Vieira, G.E.A. Brito-Melo, Trypan blue exclusion assay by flow cytometry, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 47 (2014) 307–315. doi:10.1590/1414-431X20143437.
- [116] L.L. Chan, A.R. Wilkinson, B.D. Paradis, N. Lai, Rapid Image-based Cytometry for Comparison of Fluorescent Viability Staining Methods, *Journal of Fluorescence*. 22 (2012) 1301–1311. doi:10.1007/s10895-012-1072-y.
- [117] N. Harada, H. Kimura, M. Ono, D. Mori, Y. Ohmomo, T. Kajimoto, H. Kawashima, H. Saji, Effective synthesis of ^{99m}Tc tricarbonyl complexes by microwave heating, *Journal of Organometallic Chemistry*. 696 (2011) 3745–3749. doi:10.1016/j.jorganchem.2011.08.033.
- [118] H. Kimura, D. Mori, N. Harada, M. Ono, Y. Ohmomo, T. Kajimoto, H. Kawashima, H. Saji, Microwave-assisted synthesis of organometallic complexes of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ and $\text{Re}(\text{CO})_3$: its application to radiopharmaceuticals, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 60 (2012) 79–85.
- [119] D.-R. Hwang, S.M. Moerlein, L. Lang, M.J. Welch, Application of microwave technology to the synthesis of short-lived radiopharmaceuticals, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. (1987) 1799–1801.