INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Síntese e caracterização da Fluoroetil melatonina

MARCELO THAAD FERNANDES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. Emerson Bernardes

São Paulo
2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Síntese e caracterização da Fluoroetil melatonina

Versão Original

Versão Original disponível no IPEN

MARCELO THAAD FERNADES SOARES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. Emerson Bernardes

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

THAAD FERNANDES SOARES, M. ***Síntese e caracterização da Fluoroetil melatonina***. 2019. 125 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Thaad Fernandes Soares, Marcelo
Síntese e caracterização da Fluoroetil melatonina / Marcelo Thaad Fernandes Soares; orientador Emerson Bernardes. -- São Paulo, 2019.
125 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Melatonina. 2. fluoroetil. 3. fluoração. I. Bernardes, Emerson, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Durante este projeto várias pessoas me ajudaram. O auxílio veio de diversas formas: um material emprestado, um preparo de solução, uma análise de espectro, sugestões, criticas, auxílios nas sínteses e nas purificações, pequenas e grandes coisas que fizeram a diferença e não vou esquecer, nem por um dia, nenhuma parte disso.

Agradeço a minha mãe Neuza e a minha irmã Anny por me ajudar durante esta jornada, me ajudando quando preciso e me alegrando quando necessário.

Agradeço aos meus colegas de laboratório que me ajudaram e me aguentaram durante esses anos, Arian Pérez, Martha Pijeira, Renata Brandão, Sofia Santos Amanda Pazello e principalmente Angela Pepe Carneiro que foi meu braço direito nesta síntese, sem Sancho este trabalho não seria feito.

Agradeço aos meus orientadores Dr. Emerson Bernardes e Dra. Regina Carneiro por me ajudarem com o que fosse necessário, quando fosse necessário e me permitir participar de uma pesquisa tão interessante quanto esta.

Agradeço ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) por possibilitar a realização deste trabalho.

Agradeço aos professores Dr. Marcio Zaim e Dra. Liliane Marzorati do Instituto de Química (IQ) pela inestimável ajuda nesta pesquisa.

Muito obrigado!

“Eu gostaria de dizer duas coisas, uma intelectual e outra moral. O conselho intelectual que eu gostaria de dar é esse: quando você está estudando um assunto, ou considerando alguma filosofia, pergunte a si mesmo, somente, quais são os fatos e qual é a verdade que os fatos revelam. Nunca se deixe divergir pelo que você gostaria de acreditar ou pelo que você acha que traria benefícios sociais se fosse acreditado. Olhe apenas e somente para quais são os fatos. Esse é a recomendação intelectual que eu gostaria de dar. O conselho moral que eu gostaria de dar é muito simples. Eu diria: o amor é sábio; o ódio é tolo. Nesse mundo que está ficando mais interconectado, nós temos que aprender a tolerar uns aos outros, nós temos que aprender a aceitar o fato de que algumas pessoas dizem coisas que não gostamos. Nós só podemos viver juntos dessa forma, se formos viver juntos e não morrer juntos. Nós precisamos aprender a bondade da caridade e da tolerância, o que é absolutamente vital para a continuação da vida humana nesse planeta.”

(Bertrand Russell)

RESUMO

THAAD FERNANDES, M. ***Síntese e caracterização da fluoroetil melatonina***. 2019. 125 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

A melatonina é um neurohormônio presente em vários processos biológicos no organismo, apresentando receptores MT1 e / ou MT2, mesmo em células cancerígenas. A melatonina começou a ser receitada a pacientes com câncer desde o final do século XIX na forma de estrato de pineal, porém somente no final do século XX começou a se entender que a melatonina apresenta um efeito de restrição no crescimento descontrolado de alguns tipos de células cancerígenas, sendo que sua ausência completa no organismo está ligado ao crescimento de tumores e tendências de metastização. Essa molécula também interage com medicamentos utilizados na terapia oncológica, apresentando bons resultados e reforçando a terapia empregada. A expressão dos receptores MT1 em células de câncer de mama (ER+) é um fator de prognóstico independente, o que indica um potencial para diagnósticos e tratamento de tumores de mama. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma molécula análoga da melatonina marcada com flúor com o intuito de criar uma nova ferramenta para o diagnóstico de tumores que expressam os receptores MT1/MT2, utilizando a técnica de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Para gerar a molécula da fluoroetil melatonina foi empregado uma fluoração indireta, utilizando o grupo prostético fluoroetil, proveniente da molécula fluoroetil tosilato preparada para posterior síntese com a melatonina. A reação utilizou hidreto de sódio como base forte, dimetilformamida (DMF) como solvente, melatonina e o fluoroetil tosilato, sendo o tosilato um bom grupo abandonador. Esta reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN2), foi feita em temperatura ambiente com duração de 20 horas. O produto obtido foi purificado e caracterizado usando técnicas de espectrometria de massas e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio, carbono e flúor confirmando a formação da molécula da fluoroetil melatonina, com um rendimento de 35%. Com a fluoroetil melatonina caracterizada, ela servirá de padrão e ponto partida para síntese da melatonina com flúor -18, o que permitirá que a molécula seja avaliada como um potencial novo traçador de tumores que expressam os receptores MT1/MT2 da melatonina.

.

Palavras-chaves: Melatonina; fluoroetil; fluoração.

ABSTRACT

THAAD FERNANDES, M. ***Synthesis and characterization of fluoroethyl melatonin***. 2019. 125 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo

Melatonin is a neurohormone that regulates several biological processes in the body, including cancer, mainly through MT1 and / or MT2 receptors. Melatonin was first prescribed to cancer patients in the late 19th century as a pineal stratum. Still, it was only in the late 20th century that the molecular mechanism by which melatonin reduces the growth of some cancer cells began to be understood. Moreover, it was found that the complete absence of melatonin in the body was linked to tumor growth and increased metastatic potential. Melatonin was found to interact with several cytotoxic drugs used in cancer therapy, presenting good results and reinforcing the therapy employed. The expression of MT1 receptors in breast cancer cells (ER +) was found to be an independent prognostic factor, indicating a potential for melatonin to be used in the diagnose and treatment of breast cancer.

The aim of this study was to develop a fluorine-labeled melatonin analog molecule to create a new diagnostic tool for MT1/MT2-expressing tumors by Positron Emission Tomography (PET). To generate the fluoroethyl melatonin molecule an indirect fluorination was employed using the prosthetic group fluoroethyl from the fluoroethyl tosylate molecule prepared for subsequent synthesis with melatonin. The synthesis was prepared uing sodium hydride as a strong base, dimethylformamide (DMF) as solvent, melatonin and fluoroethyl tosylate (tosylate is a good leaving group). The bimolecular nucleophilic substitution reaction (SN2) was performed at room temperature, for 20 hours. The reaction product was purified and characterized using mass spectrometry and hydrogen, carbon and fluorine nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy techniques, confirming the formation of the fluoroethyl melatonin molecule with a 35% yield. The fluoroethyl melatonin obtained from this study will serve as the standard and starting point for the synthesis of fluorine-18 melatonin, which will allow the molecule to be evaluated as a potential new tumor tracer for MT1 / MT2-expressing tumors.

Keywords: Melatonin; fluoroethyl; fluorination

Sumário

1 INTRODUÇÃO 10
1.1 Melatonina 10
1.2 Melatonina no organismo 11
1.3 Câncer 14
1.4 Estimativas do câncer no brasil e no mundo 15
1.5 Melatonina e o câncer 16
1.6 Melatonina e o câncer de mama 17
1.7 Contexto histórico 19
1.8 Medicina nuclear 20
1.9 Tomografia por emissão de pósitrons 21
1.10. Marcações com melatonina 22
1.11.Flúor-18 como emissor de pósitron 26
1.12.Sínteses com flúor 18 26

2 OBJETIVOS 28
2.1 Justificativa 28

3 MATERIAIS E MÉTODOS 29
3.1 Solventes e reagentes 29
3.2 Equipamentos 30
3.3 Síntese de fluoroetil tosilato 31
3.4 Síntese de fluoroetil melatonina com base de hidroxido de sódio 32
3.5 Síntese de fluoroetil melatonina com base de hidreto de sódio 33
3.6 Síntese de fluoroetil melatonina por catálise de transferência de fase (ctf) 35
3.7 Síntese da 18F-Fluoroetil tosilato 36
3.8 Síntese da 18F-Fluoroetil Melatonina 37

4 RESULTADOS 38
4.1 Fluoroetil tosilato 38
4.2 Fluoroetil melatonina com base de hidróxido de sódio 41
4.3 Síntese de fluoroetil melatonina com base de hidreto de sódio 43
4.4 Fluoroetil melatonina por catálise de transferência de fase (ctf) 51
4.5 Marcação da 18F-Fluoroetil melatonina 56

5 DISCUSSÃO 59
5.1 Receptores MT1 e MT2 e análogos da melatonina 59
5.2 Mecanismos 64
5.4 Fluoração indireta e purificação 67

6 CONCLUSÃO 69

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

8 APÊNDICE A – Espectros de 1H RMN da Melatonina 81

9 APÊNDICES B – Espectros de 1H RMN de Fluoroetil tosilato.....85

10 APÊNDICES C – Espectros de 1H RMN da síntese de fluoroetil melatonina por CTF 91

11 APÊNDICES D – Espectros de 1H RMN de Fluoroetil melatonina.....99

12 . APÊNDICES E – Espectros de 13C RMN de Fluoroetil melatonina 104

13 APÊNDICES F – Espectros de (1H, 13C) HMBC de Fluoroetil melatonina em CDCl3 108

14 APÊNDICE G – Espectro de Massa de Fluoroetil melatonina 119

15 APÊNDICE H – Espectro de HPLC analítico de melatonina 120

16 APÊNDICE I – Espectro de HPLC de Fluoroetil melatonina 121

17 APÊNDICE J – Espectro de HPLC 18F Fluoroetil tosilato 122

18 APÊNDICE K – Espectro de HPLC 18F Fluoroetil Melatonina 123

19 APÊNDICE L – Espectro de 19F RMN de Fluoroetil Melatonina 124

Lista de Figuras

Figura 1 - Síntese da melatonina 11

Figura 2 - Um dos vários mecanismos de sequestro de radicais livres da melatonina 13

Figura 3. Câncer 14

Figura 4. 2-Iodomelatonina 23

Figura 5. Síntese de 2-bromomelatonina 24

Figura 6. Síntese da [^{11}C]melatonina 25

Figura 7. Síntese da [Carbonila -^{11}C]fluoromelatonina 25

Figura 8. Síntese da 2-fenil-[^{11}C]melatonina 26

Figura 9. Síntese de 18F-Fluoroetil tosilato 37

Figura 10. Fluoroetil tosilato após rotaevaporação 39

Figura 11. Aspecto físico final do fluoroetil tosilato 40

Figura 12. Espectro de RMN do fluoroetil tosilato 41

Figura 13. Espectro de RMN da síntese de fluoroetil melatonina com NaOH 43

Figura 14. Síntese com hidreto de sódio após rotaevaporação 44

Figura 15. Melatonina numerada de acordo com o espectro de 1H RMN 46

Figura 16. Espectro de 1H RMN de Fluoroetil melatonina 47

Figura 17. Picos referente a fluoroetil 48

Figura 18. 13C RMN de fluoroetil melatonina 48

Figura 19. Espectro (1H, 13C) HMBC 49

Figura 20. Espectro de massas de fluoroetil melatonina 50

Figura 21. Espectro de 19F RMN de fluoroetil melatonina 51

Figura 22. Aspecto físico no início da síntese 52

Figura 23. Aspecto físico no final da síntese 53

Figura 24. Solução após neutralização 53

Figura 25. Solução após rotaevaporação 54

Figura 26. Espectro de RMN da síntese com CTF 55

Figura 27. Espectro de RMN da síntese por CTF 2 56

Figura 28. Espectro de HPLC analítico – Melatonina 57

Figura 29. Espectro de HPLC analítico – 19F-Fluoroetil Melatonina 58

Figura 30. Espectro de HPLC analítico -18F- Fluoroetil-tosilato 58

Figura 31. Espectro de HPLC analítico -18F-Fluoroetil purificado.....58

Figura 32. Espectro de HPLC analítico -18F-Fluoroetil melatonina parte 1 59

Figura 33. Espectro de HPLC analítico – 18F- Fluoroetil melatonina parte 2 59

Figura 34. Sítios da iodo-melatonina 62

Figura 35. Melatonina.....63

Figura 36. Síntese da fluoroetil melatonina com NaH 64

Figura 37. Substituição nucleofilica.....66

Figura 38. Mecanismo SN2.....68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) foi isolada e identificada pela primeira vez em 1958 (Lerner AB et al,1958). É um indol que apresenta peso molecular de 232 Daltons, sendo este o principal neurohormônio secretado durante o período noturno com ausência completa de luz pelos pinealócitos da glândula pineal. Outros tecidos também podem produzi-la e seguem o mesmo padrão de liberação no período noturno (Franklin Epstein, 1997). Seguindo um padrão rítmico, a melatonina apresenta pico secretório no período noturno, mas não no período diurno. Em mamíferos a atividade metabólica da pineal é regulada por uma única via neural com origem nos fotorreceptores da retina e projeção ao núcleo supraquiasmático do hipotálamo, este inerva a pineal através de fibras que fazem parte do sistema nervoso autônomo simpático (Cardinali et al, 2008). A estimulação por luz ou a desenervação da pineal por ablação do gânglio cervical superior suprime a produção de melatonina na glândula pineal (Moore and Klein, 1974). O núcleo supraquiasmático é considerado um dos relógios biológicos circadiano do homem e, as projeções retino-hipotalâmicas que chegam a ele, fazem a interação entre o ambiente cíclico externo e o relógio interno. O ciclo circadiano da secreção de melatonina pela pineal é regulado por este relógio biológico (Cardinali e Pévet, 1998). A melatonina por sua vez pode sincronizar (ajustar) a atividade das células do núcleo supraquiasmático (Armstrong, 1989).

Para realizar a biossíntese da melatonina na pineal, utiliza-se o aminoácido triptofano, que pode ser encontrado no queijo (7%), no amendoim (5,5%), no frango (4,9%), na banana (0,3%), entre outros, portanto abundante em dietas regulares. A via biosintética da melatonina inicia-se com o triptofano que é hidroxilado à 5- hidrotriptofano pela ação da enzima triptofano hidroxilase, sendo esse descarboxilado pela enzima l-amino descarboxilase gerando a serotonina. As concentrações de serotonina são elevadas na pineal e sua conversão em melatonina envolve duas enzimas: a N-acetil-transferase (NAT) e a hidroxi-indol-orto-metil-transferase (HIOMT). A NAT converte a serotonina em N-acetilserotonina e a HIOMT transfere um grupo metil da 5-adenosina-metionina

para a N-acetilserotonina, gerando a melatonina (Macchi e Bruce, 2004) (Figura 1).

A NAT é a enzima limitante na síntese de melatonina, uma vez que a enzima seguinte nesta cadeia, a HIOMT, não apresenta grandes diferenças de amplitude na sua atividade ao longo das 24 horas (Klein et al, 1981).

Atualmente se tem evidências de outras rotas de síntese de melatonina em plantas onde a melatonina primeiro é orto-metilada para 5 metoxitriptamina e essa é n-acetilada para melatonina (Tan et al, 2016)

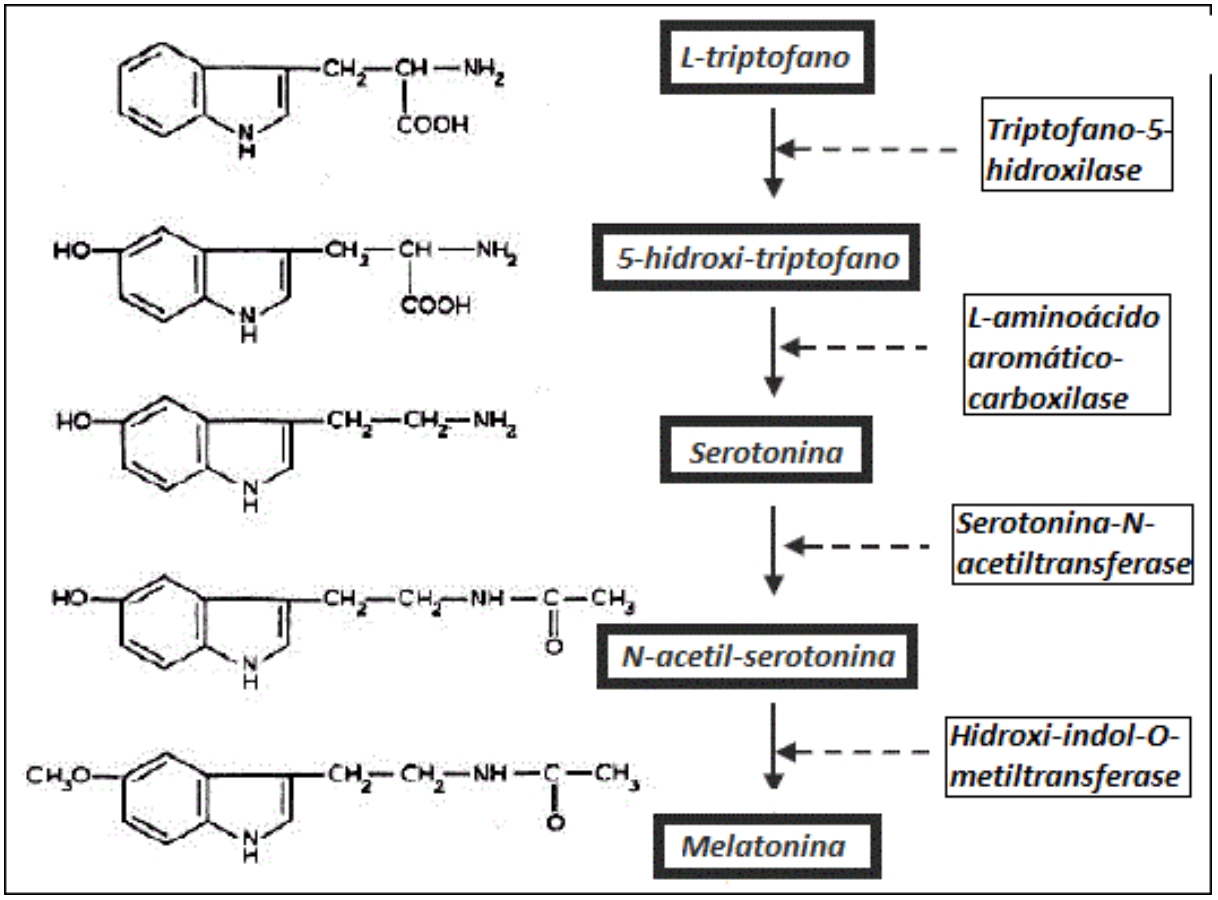


Figura **1 - Síntese da** melatonina. Modificado de (Konturek et al, 2006)

1.2 Melatonina no organismo

A melatonina produzida pela pineal ou por outros tecidos tem uma função específica em cada órgão do organismo. O papel da melatonina, produzida pela pineal, como sinalizador circadiano e sazonal do marca-passo também tem importante papel não apenas na indução do sono, mas também na sua

manutenção durante o período de descanso, na diminuição da latência do sono e aumento no tempo de sono (Jan et al, 2009). Muitos estudos têm demonstrado novos locais de produção de melatonina tais como retina (Bernard et al, 1995) e sistema gastrointestinal (Konturek et al, 2007). A função da melatonina no núcleo supraquiasmático é a de regular as mudanças de fase claro/escuro no relógio circadiano (Liu et al, 1997), preparando o organismo para entrar na fase de repouso se esta acontece no período noturno. Nos olhos de mamíferos a melatonina é sintetizada de uma forma similar à que ocorre na pineal, que tem a presença da HIOMT e a conversão de serotonina em melatonina (Bernard et al, 1995). Em aves e mamíferos os receptores MT1 e MT2 estão distribuídos na córnea, fotorreceptores, coroide, esclera, epitélio pigmentar da retina e vasos sanguíneos da retina (Seithikurippu et al, 2008). Um dos papeis da melatonina nos tecidos oculares (Fujiedaet al, 1999) é o de regulação do crescimento e remodelagem de fibras e camadas cartilaginosas escleras, que afetam a refração e o tamanho dos olhos. Também desempenha importante papel na regulação nas secreções aquosas e na manutenção das variações circadianas da pressão intraocular (Lundmark et al, 2006).

A melatonina também atua através de interação com receptores MT1 em algumas áreas do hipocampo (Gorfine e Zisapel, 2007), onde ela melhora a taxa de disparos de neurônios na região. Ela também afeta a ativação de memórias no hipocampo e no parahipocampo de acordo com o ciclo dia e noite, além disso, estudos demonstram que ela tem envolvimento em certos aspectos do processamento da memória, principalmente na sua consolidação.

O sistema cardiovascular apresenta receptores MT1 e MT2 (Ekmekcioglu et al, 2003), pacientes com doenças coronariana e pacientes hipertensos “non-dipper” (pacientes que exibem declínio na pressão sanguínea no período noturno) têm secreção de melatonina significantemente inferior quando comparadas com pessoas saudáveis (Grossman et al, 2006). O papel da melatonina nas artérias coronárias já está sendo estudado e supõe-se que ela apresente um efeito duplo, tanto na vasodilatação (MT2) quanto na vasoconstrição (MT1) dessas artérias. A melatonina também está envolvida na termoregulação via vasodilatação (Dollins et al, 1994). A melatonina apresenta ações imunomodulatória dependente da sua interação com receptores MT2 em mamíferos; se por algum motivo a síntese da

melatonina for inibida, isso suprime respostas celulares e tumorais (Seithikurippu et al, 2008).

Na década de 1990 (Ianas et al, 1991) foi descoberto que a melatonina possui propriedades de captura de radicais livres (Figura 2), desde então diversos estudos (Vijayalaxmi et al, 1998) (Reiter et al, 1995) confirmam sua habilidade em proteger o DNA de radicais livres. Como capturador de radicais livres a melatonina consegue atuar em $OH^{\cdot}$, H_2O_2, $O_2^{\cdot-}$ e em inibição de peroxidação de lipídios. A melatonina também promove uma série de enzimas antioxidativas, como a CAT (catalase), a SOD (superóxido dismutase) e a GPx (Glutationa peroxidase). Estudos demonstram que a melatonina aumenta os níveis de Glutationa intracelular por estimulação da taxa limitante da enzima na sua síntese, Ɣ-glutamil-cisteina- sintetase que inibe a enzima peroxidativas oxido nítrico sintetase e lipoxigenase. Evidências sugerem que a melatonina estabiliza as membranas microssomais auxiliando-as na resistência a danos oxidativos causados pelos radicais livres de oxigênio (Anisimov et al, 2006).

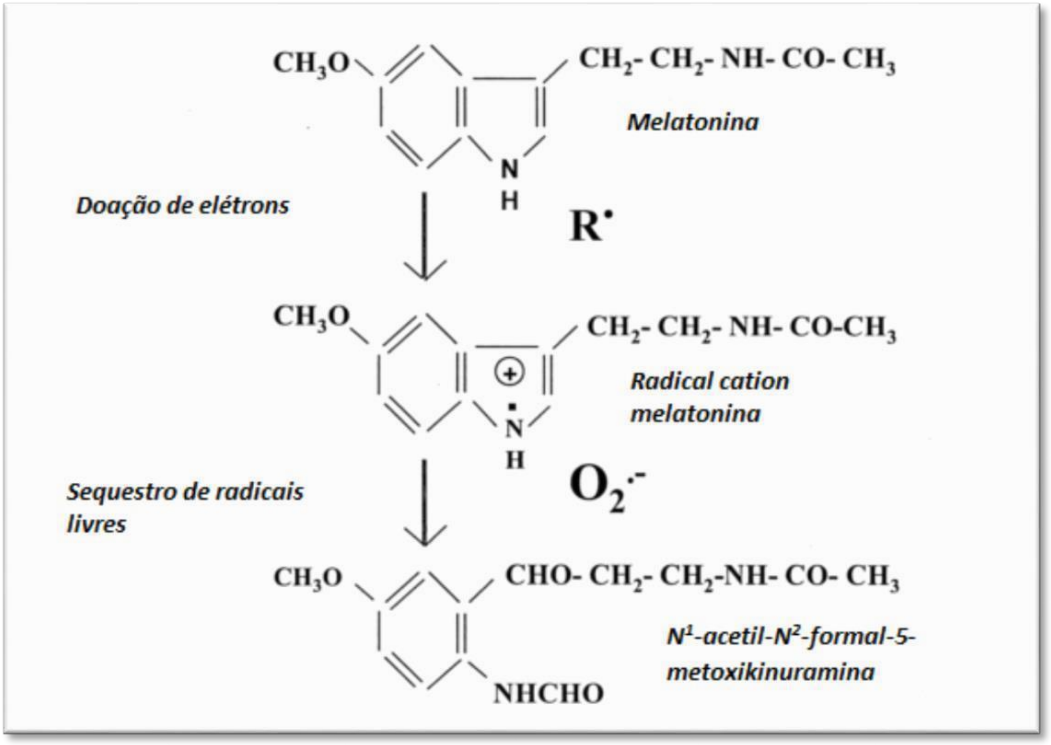


Figura 2 - Um dos vários mecanismos de sequestro de radicais livres da melatonina. Modificado de (Vijayalaxmi et al, 2004)

1.3 Câncer

O corpo é composto de trilhões de células vivas. Essas células normais do corpo crescem se dividem e morrem de forma ordenada. Durante os primeiros anos de vida de uma pessoa, as células normais se dividem mais rapidamente para permitir que a pessoa se desenvolva. Depois, na fase adulta, a maioria das células se divide apenas para substituir células desgastadas, células que morrem ou para reparar danos.

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo.

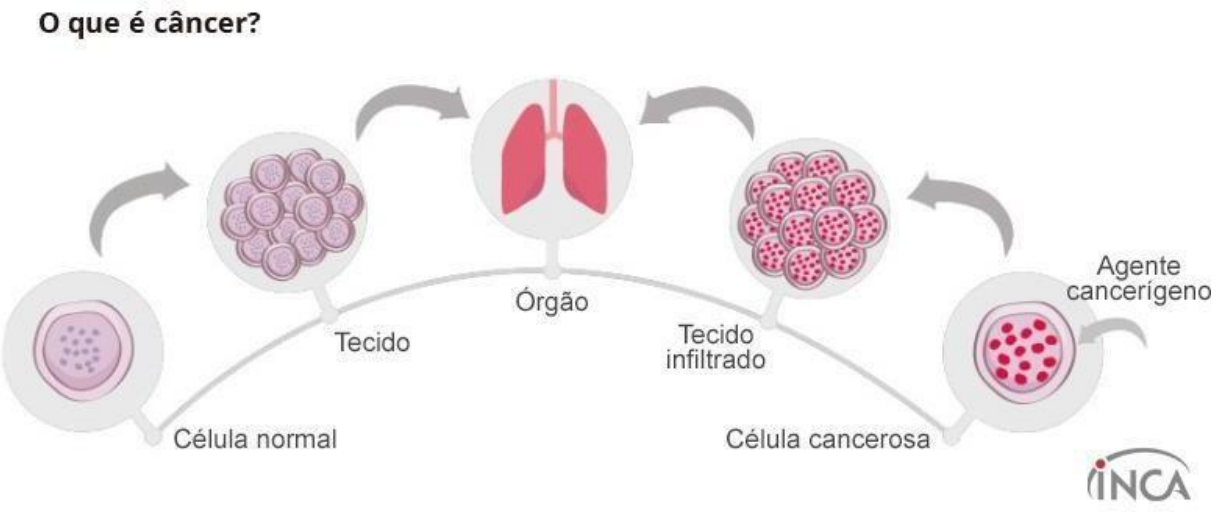


Figura 3 – Câncer (INCA, 2019)

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, conhecida como

metástase.

O câncer surge a partir de uma mutação genética, ou seja, de uma alteração no DNA da célula, que passa a receber instruções erradas para as suas atividades.

1.4 Estimativas do câncer no brasil e no mundo

As doenças e agravos não transmissíveis (DANT) já são as principais responsáveis pelo adoecimento e óbito da população no mundo. Estima-se que, em 2008, 36 milhões dos óbitos (63%) ocorreram em consequência das DANT, com destaque para as doenças cardiovasculares (48% das DANT) e o câncer (21%). Esse impacto afeta principalmente os países de baixo e médio desenvolvimentos, especialmente por mortes prematuras (World Health Organization, 2013). As transições demográficas e epidemiológicas globais sinalizam um impacto cada vez maior da carga de câncer nas próximas décadas (Ferlay et al., 2015)

A estimativa mundial mostra que, em 2012, ocorreram 14,1 milhões* de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade (57%). De modo geral, as maiores taxas de incidência foram observadas nos países desenvolvidos (América do Norte, Europa Ocidental, Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia). Taxas intermediárias são vistas na América do Sul e Central, no Leste Europeu e em grande parte do Sudeste Asiático (incluindo a China). As menores taxas são vistas em grande parte da África e no Sul e Oeste da Ásia (incluindo a Índia). Enquanto, nos países desenvolvidos, predominam os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama

feminina, cólon e reto), nos países de baixo e médio desenvolvimentos, ainda é alta a ocorrência de tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado). Além disso, apesar da baixa incidência, a mortalidade representa quase 80% dos óbitos de câncer no mundo (Ferlay et al., 2015).

Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências foram encontradas na mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (Ferlay et al., 2015).

Estima-se, para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. O cálculo global corrigido para o sub-registro, segundo Mathers et al., 2003 aponta a ocorrência de 640 mil casos novos. Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto entre os mais incidentes, entretanto ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago. Os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres serão os mais frequentes. (INCA, 2018)

1.5 Melatonina e o câncer

Os primeiros registros históricos que mostram a correlação entre a pineal e o combate ao câncer começaram no final do século XIX quando médicos receitavam extratos de pineal aos pacientes com a doença (Reiter & Robinson, 1995). Em 1982 um estudo de Tamarkin et al, demonstrou que a melatonina apresenta um efeito de restrição no crescimento descontrolado de células cancerosas na mama. Outros estudos feitos posteriormente mostram um crescimento de tumores e tendência a metastatização após a pinealectomia (Dogliotti et al, 1990); (Lissoni et al, 1987).

Em 2010 a agência internacional de pesquisa em câncer (IARC) classificou turnos noturnos como possível perigo carcinogênico aos humanos (grupo 2A) por falta de produção adequada de melatonina e dos processos que esta desencadeia

no organismo (Straif et al, 2010).

Os efeitos oncostáticos e oncoprotetores da melatonina podem estar relacionados às suas propriedades bioquímicas e/ou metabólicas e uma série de estudos foram realizados a fim de desvendar seu mecanismo de ação.

Um mecanismo proposto para a ação oncostática da melatonina (Collins et al, 2003) é a inibição do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), inibindo assim a liberação dos hormônios LH (luteinizante) e FSH (folículo- estimulante) e, por consequência, reduzindo a produção ovariana de estradiol. Dessa forma se reduz a resposta mitogênica do câncer de mama ao estradiol, o que pode explicar os efeitos protetores da melatonina neste tipo de câncer. A melatonina induz um atraso na transição G1/S em linhagens MCF-7 do câncer de mama humano (Blask, 1986) e em células do carcinoma JAr in vitro (Schneider et al, 1989).

Outra hipótese se relaciona à ação da melatonina sobre resposta imunológica inespecífica (Reiter, 1995). Receptores de melatonina já foram encontrados em linfócitos T-helper (Maestroni, 1993) e monócitos (Collins et al, 2003). Através da ligação da melatonina aos primeiros, há estímulo para a produção de interleucina-4, que aumenta a atividade de outras células da resposta imune. Há estímulo à produção de células "Natural Killer" (Lissoni et al, 1995). A melatonina inibe a destruição plaquetária mediada por macrófagos (Bregani et al, 1995), e por isso, é capaz de evitar a trombocitopenia induzida pelo tratamento com interleucina-2 (Rovelli et al, 1995).

A melatonina interage com os medicamentos utilizados na terapêutica oncológica. Já foi demonstrado que o neurohormônio aumenta a sensibilidade das células ao tamoxifeno (Barni et al, 1995) e essa associação pode ser considerada em terapias refratárias a essa substância. A associação da melatonina com a interleucina-2 (IL2) mostrou bons resultados, como o maior índice de citólise mediada por IL-2 (Lissoni et al, 1990). Quando associadas, a naltrexona, a melatonina e a IL-2, foi observado aumento da linfocitose (Lissoni et al, 2002). A linfocitose é um importante indicador de bom prognóstico do tratamento com IL- 2 (Lissoni et al, 1994).

1.6 Melatonina e o câncer de mama

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres da América do

Norte e oeste da Europa. No Brasil, é ultrapassado apenas pelo câncer de pele. Conceitualmente, pode ser classificado desde *in situ* até o carcinoma invasor. Os três principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença são: pertencer ao sexo feminino, ter mais de 50 anos e ter história familiar positiva (Tierney et al, 2003). O tratamento se baseia no estádio da doença e pode envolver a tumorectomia com radioterapia, mastectomia, administração de drogas como a ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluouracil e tamoxifeno em pacientes com receptores de estrogênio positivos. Em geral, associam- se terapias com capecitabina, anticorpo anti-HER-2/ neu, paclitaxel, etc. (Hortobagyi, 1998).

O câncer de mama pode ser dividido entre os que possuem receptores de estrogênios (ER+) e os que não possuem (ER-). Se o câncer for ER+ o estrogênio promove o crescimento das células cancerosas assim como faz com células de mama comuns. O câncer de mama também pode apresentar receptores para progesterona (PR+) o que significa que este hormônio irá promover o crescimento das células cancerosas, cerca de 70% de todos os canceres de mama são hormônio dependentes (Lumachi et al, 2013).

O câncer de mama ocupa um papel ímpar na história do uso da melatonina, pois os primeiros indícios de que o hormônio poderia ser útil na terapêutica oncológica surgiram no estudo dessa doença há evidência experimental de que a melatonina aumente a latência de tumores de mama e reduza o tamanho de adenocarcinomas mamários ((Cohen et al, 1978), (Cos et al, 1994) e (Blask et al, 1994))

Os efeitos da MEL foram bem estudados in vitro, utilizando a linhagem MCF-7 de células do câncer de mama (Horwitz et al, 1978). Essa linhagem originou-se da efusão pleural de uma mulher com carcinoma de mama metastático e continha receptores de estrogênio e progesterona (Brooks et al, 1973). A melatonina é capaz de inibir a proliferação das células MCF-7 com receptores MT1 (tipo 1 para melatonina) (Blask, 1986). A superexpressão da proteína G acoplada nos receptores MT1 nas células de câncer de mama apresentam uma melhora no crescimento da capacidade supressiva da melatonina sobre as células tumorais (Kinker et al, 2016). Um estudo recente com câncer de mama revela que a expressão de MT1, que negativamente correlaciona se ao estadiamento do tumor, é um fator de prognostico independente, indicando um potencial para diagnósticos

e tratamento de tumores de mama (ER+) com a melatonina. (Jablonska et al, 2013)

1.7 Contexto histórico

Em 1896 Henri Becquerel descobriu a radioatividade, seguido da descoberta de novos elementos como rádio, tório e polônio em 1898 e o estudo da física das radiações por Marie Curie e Pierre Curie.

Em 1900 Ernest Rutherford descobriu a natureza corpuscular das emissões intranucleares alfa e beta, e Paul Villard a da natureza eletromagnética das radiações gama (Thom, 2008).

Em 1923, Hevesy lançou a sua teoria dos traçadores, que se tornou base científica para a Medicina Nuclear. Outro percursor importante foi o cardiologista Herrmann L. Blumgart que realizou a primeira pesquisa clínica com radioisótopos, medindo a velocidade do fluxo sanguíneo pulmonar com o uso de uma amostra injetável de Radio-C (^{214}Po) (Thom, 2008).

Em 1934, Irene Joliot Curie e Frederic Joliot descobriram a forma de obtenção de isótopos radioativos artificiais de elementos não radioativos através do bombardeamento de núcleos atômicos com nêutrons oriundos de fontes de Radio/Berílio. (Thom, 2008).

Em meados de 1930 pouco era conhecido sobre metabolismo do iodo, porém quando Hertz S e Means H em 1938 injetaram I128 em coelhos demonstraram que esse iodo era captado pela Tireoide. No entanto, o 128I não se mostrou promissor para tratamento devido a curta meia-vida de 25 minutos. Em 1941 Hertz e Roberts iniciaram o tratamento de hipertireoidismo em humanos com o Iodo131 demonstrando a sua efetividade. Mas foi só em 1964 que o primeiro trabalho com os dados sobre o sucesso da terapia com 131I foi publicado em 1940, no final da II Guerra Mundial, foi construído o primeiro reator nuclear para gerar plutônio para a construção da bomba atômica. Com isso após o término da guerra, a capacidade de produção de isótopos radioativos dos mais diversos elementos passaram a ser direcionada principalmente para investigações médicas, criando-se então a especialidade da Medicina Nuclear. (Thom, 2008).

Pelas suas propriedades físicas, alguns átomos são instáveis e com isso sofrem decaimento radioativo, resultando em um produto chamado de “filho”, que vai se encontrar em um estado de energia menor que o radioisótopo chamado “pai”. A diferença de energia ou a deficiência de massa entre “pai” e “filho” será igual ao total de energia emitida na radiação (Thrall & Ziessman, 2003)

1.8 Medicina nuclear

É uma especialidade médica que emprega fontes abertas de radionuclídeos com finalidade diagnóstica e terapêutica, sendo diferenciada de outras técnicas de imagem, como ressonância magnética e tomografia computadorizada, pela capacidade de detecção do metabolismo, anatomia e fisiologia do órgão ou sistema estudado (Araujo et al., 2008)

A medicina nuclear baseia-se na concentração (mecanismo passivo) ou captação (mecanismo ativo) tecidual de elementos radioativos puros ou acoplados a outras moléculas (radiofármacos). Estes radiofármacos são usualmente administrados por via intravenosa, aguardando-se a concentração tecidual antes de se obter as imagens com o auxílio de equipamentos específicos, denominados câmeras de cintilação. As imagens refletem a distribuição do radiofármaco no corpo do paciente e podem ser planas (bidimensionais) ou tomográficas (SPECT = Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único / Single Photon Emission Computed Tomography) as imagens tomográficas obtidas após a administração de radiofármacos emissores de pósitrons (PET = Tomografia por Emissão de Pósitron / Positron Emisson Tomography) seguem o mesmo princípio básico de determinação da biodistribuição de radioisótopos *in vivo,* com diferenças no sistema de detecção da radiação (Sapienza, 2008).

Os traçadores radioativos são compostos por moléculas transportadoras que são ligadas firmemente a um átomo radioativo. Estas moléculas transportadoras variam muito dependendo da finalidade da análise. Alguns traçadores são marcados em moléculas que interagem com uma proteína específica ou açúcar no corpo e podem até mesmo serem ligadas as próprias

células do paciente. Para a maioria dos estudos de diagnóstico em medicina nuclear, o marcador radioativo é administrado a um paciente por injeção intravenosa. No entanto, um traçador radioativo também pode ser administrado por inalação, por ingestão oral ou por injeção direta em um órgão. O modo de administração do traçador dependerá do processo da doença a ser estudado

Para uso em diagnóstico, os radioisótopos e radiofármacos, devem apresentar determinadas características especificas de princípios básicos, tais como: (Saha, 1998; Thrall & Ziessman, 2003)

- Meia vida compatível com o tempo do estudo;
- Alta atividade específica;
- Maneira prática de obtenção;
- Alto grau de pureza radionuclídea, radioquímica e química;
- Ser um composto biologicamente estável;
- Apresentar uma possibilidade de marcação para preparação de radiofármacos.

1.9 Tomografia por emissão de pósitrons

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) é uma técnica de imagem molecular utilizada no diagnóstico de câncer. A tecnologia PET permite a medição da função do tecido *in vivo*, utilizando a detecção de raios gama que atravessam o corpo após a administração de um radiofármaco. A técnica tem sido utilizada para a detecção precoce, caracterização e monitoramento de "tempo real" da doença, bem como investigar a eficácia de drogas: ela permite a visualização e quantificação em espaço e tempo real de processos celulares normais ou anormais em um nível molecular ou celular.

A imagem no PET (“Positron Emission Tomography”) é obtida pela reação de aniquilação de um pósitron e um elétron, e posterior emissão de dois fótons de 511 KeV à 180 ± 0,5 °. O pósitron é uma partícula idêntica ao elétron, com carga positiva. Sua interação com o meio que atravessa é elétrica, ou seja, ele perde energia interagindo sucessivamente com átomos e moléculas, produzindo ionizações ou excitações, até quase parar. O número de interações depende da energia com que ele foi emitido e da composição do meio. Ao atingir uma velocidade da ordem da agitação térmica do meio, ele forma um pósitron com um elétron livre, após um intervalo de tempo extremamente pequeno, da ordem de 10^{-10}s, as partículas desaparecem e suas massas se convertem em energia na forma de um par de fótons que se afastam em direções opostas. A base da formação da imagem com emissores de pósitrons é a detecção em coincidência do par de fótons de aniquilação pósitron-elétron (Pennant et al, 2010).

O PET/CT por possuir uma tecnologia híbrida agregando tomografia computorizada permite que em um único exame visualizar as informações anatômicas e metabólicas in vivo.

1.10 Marcações com melatonina

A melatonina é o principal neurohormônio produzido durante a noite pela glândula pineal, tendo sua secreção estimulada pelo escuro e sendo inibida na presença de luz. Atualmente este hormônio é usado em diversos casos, como para tratar casos de distúrbios de sono (Webb & Manuel, 1995), no tratamento de insônia crônica em idosos (Wade et al, 2007), na restauração do ciclo circadiano em indivíduos com cegueira (Hack et al, 2003) e também tem sido usada para restabelecer o relógio interno de pessoas que sofrem com jet-lag (Jan et al, 2009); (Srinivasan et al. 2008). Vários estudos mostram que a melatonina está ligada a vários condições como o Parkinson (Sharma et al, 2006), o Alzheimer e outros problemas neurológicos (Pappolla et al, 2000); (Feng et al, 2006); (Olcese et al,

2009) e alguns tipos de câncer (Grant et al, 2009); (Blask, 2009).

Para estudar a ação da melatonina no organismo e o seu efeito nas condições citadas é ideal o uso de marcadores radioativos, que são captados por aparelhos de PET ou SPECT, respectivamente tomografia por emissão de pósitrons e tomografia computadorizada por emissão de fóton único em português. Os principais marcadores usado com a melatonina são o iodo, o flúor e o carbono, cada radionuclídeo tendo uma síntese e aplicação separada.

A marcação com iodo é feita via iodação com iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3α,6α-difenilglicoluril) (Rossouw & Langenhoven, 1994) gerando o composto 2-Iodomelatonina (figura 4), apesar de existirem outras rotas (Bertholet & Hisbrunner, 1985) o produto final seguira o mesmo mecanismo de substituição eletrolítica aromática, mais especificamente uma halogenação aromática eletrofílica, onde o iodo desempenha o papel de eletrófilo na reação.

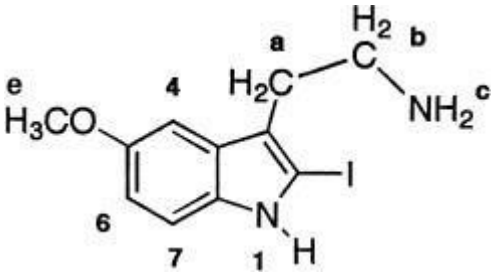


Figura 4. 2-Iodomelatonina

Essa síntese pode ser feita com os radionuclídeos de I-123 (Rossouw & Langenhoven, 1994) ou com I-125 (Chen et al, 1997), sendo este o radionuclídeo mais focado atualmente para estudos de receptores de melatonina por apresentar características favoráveis como dependência de tempo, alta especificidade com a melatonina, ausência de problemas com instabilidade de radioligantes, alta atividade especifica e problemas com a cintilação podem ser evitados (Laudon & Zisapel, 1985).

Apesar de não trabalhar com radionuclídeos, deve ser mencionado que a bromação da melatonina é uma síntese conhecida e estabelecida, que usa o mesmo princípio da síntese anterior para ligar o bromo a melatonina (figura 5)

(Duranti et al, 1992). Sendo que tanto para iodo como para bromo a ligação ocorre na posição 2 da melatonina.

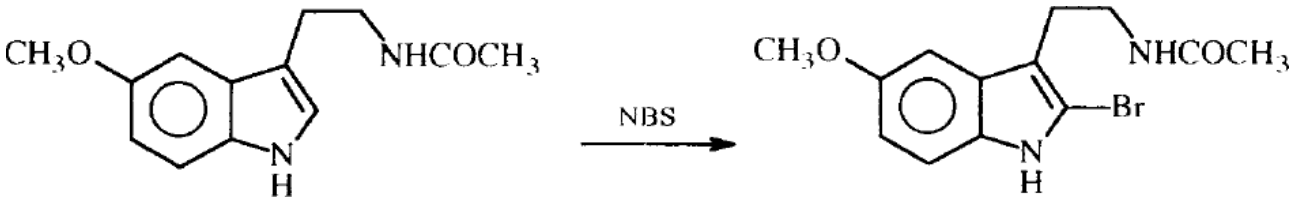


Figura 5. Síntese de 2-bromomelatonina

O 2-Iodomelatonina apesar de apresentar uma ferramenta viável não possui os recursos que os marcadores que utilizam o PET possuem, por esta razão novas sínteses como estes radionuclídeos foram criadas, visando utilizar do aparelho.

O flúor 18 é produzido em cíclotrons por diferentes métodos. Os métodos mais utilizados são: irradiação de prótons da água ([^{18}O] H_2O) enriquecida com oxigênio - 18, através da reação nuclear ^{18}O (p, n) ^{18}F, produzindo o íon 18F-fluoreto e bombardeamento de neon por Deutério través da reação nuclear ^{20}Ne (d, α) ^{18}F, produzindo [^{18}F] F_2 (Kowalsky , 2004). O método mais comum de marcação de flúor com melatonina envolve o uso do [^{18}F] F_2. Esta síntese se baseia em uma fluoração direta com a melatonina gerando dois produtos principais, o 6-[^{18}F]fluoromelatonina e o 4-[^{18}F]fluoromelatonina (Chirakal et al, 1986), essa síntese segue o mesmo mecanismo da iodação, onde neste caso o F_2 desempenha o papel de eletrofilo na reação. A halogenação na posição 6 da melatonina estende consideravelmente a meia vida biológica da molécula (Clemens et al, 1980) sem prejudicar sua atividade biológica (Frohn et al., 1980). A síntese, porem apresenta problemas relacionados a forma de obtenção do flúor, resultando em uma baixa atividade específica, < 10 GBq/mmol; 270 mCi/mmol). Isso acontece, pois, essa espécie de flúor pode ser produzida apenas pela reação ^{20}Ne (d, α) ^{18}F, usando um alvo de gás neon que contem flúor (0,1% v/v) (Lambrecht et al., 1978); (Casella et al., 1980). Sem flúor no alvo, se torna impossível recuperar o flúor-18 como [^{18}F]F_2, dessa forma não existe margem para melhorar a síntese de Chirakal et al, 1986 de forma a aumentar a atividade especifica necessária para estudos com PET de forma viável (Bars et al, 1987).

Tendo em vista o problema na atividade específica apresentado na síntese do 6-[^{18}F]fluoromelatonina e do 4-[^{18}F]fluoromelatonina, foi desenvolvida uma síntese com um traçador radioativo alternativo, neste caso o carbono -11, usando [^{11}C[cloreto de acetila foi feita uma acilação da 5-metoxitriptamina (figura 6)., usando o mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (SN2), e assim gerando o produto de interesse [^{11}C]melatonina (Bars et al, 1987).

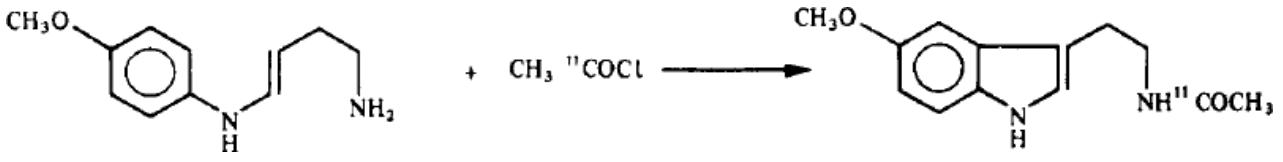


Figura 6. Síntese da [^{11}C]melatonina

Esta síntese leva 35 minutos para ser concluída, mostrando eficiente e apresenta potencial para alcançar uma alta atividade especifica, porém os estudos posteriores demostram que os análogos do [^{11}C]melatonina apresentam uma maior atividade especifica, em especial a [Carbonila -^{11}C]fluoromelatonina (figura 7), produziu uma atividade especifica 200 vezes maior que 6-[^{18}F]fluoromelatonina (Bars et al, 1988). Essa rota apesar de apresentar atividade específica superior a apresentada por Chirakal et al, 1986 ainda se mostrou insuficiente para estudo de melatonina no cérebro (Bars, et al, 1991), para resolver este problema um novo análogo foi criado o 2-fenil-[^{11}C]melatonina (figura 8) com atividade específicas mais adequadas para estudar sítios de ligação com PET no entanto não foram publicados os resultados com esse análogo. (Chen et al, 1997).

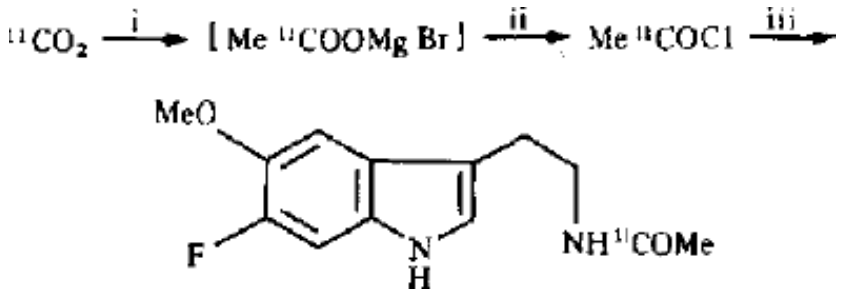


Figura 7. Síntese da [Carbonila -^{11}C]fluoromelatonina

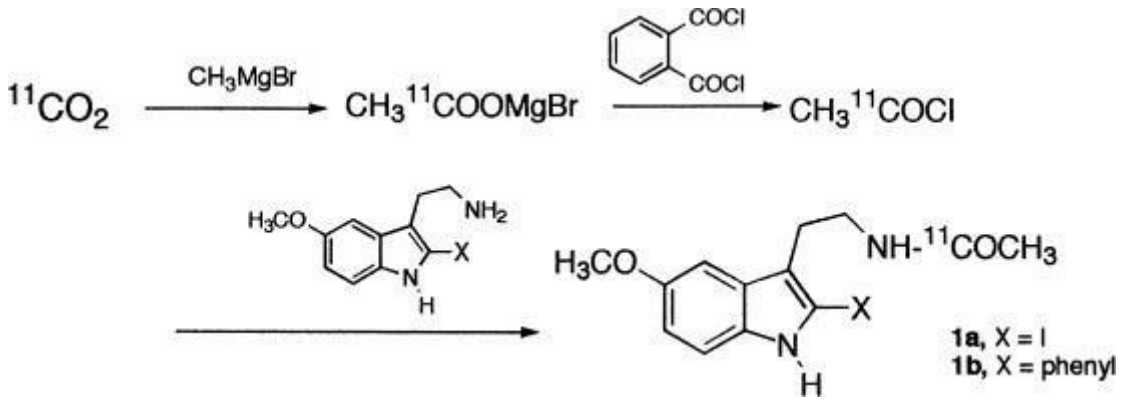


Figura 8. Síntese da 2-fenil-[^{11}C]melatonina

1.11 Flúor-18 como emissor de pósitron

O flúor 18 é o emissor de pósitrons mais utilizado em PET devido a suas propriedades físicas favoráveis. Sua meia-vida física de 110 min permite o emprego de métodos radioquímicos mais complexos em comparação com outros radionuclídeos positrônicos como o gálio 68 (67,71 min) e carbono 11(20,38 min). Além disso, devido à baixa energia dos pósitrons emitidos (Emax = 635 keV; alcance máximo em água 2,4 milímetros), permite a aquisição de imagens PET com alta resolução espacial, minimizando a dose de radiação para o paciente (Koivula , 2011).

1.12 Sínteses com flúor 18

O flúor 18 é produzido em cíclotrons por diferentes métodos. Os métodos mais utilizados são: irradiação de prótons da água ([^{18}O] H_2O) enriquecida com oxigênio - 18, através da reação nuclear ^{18}O (p, n) ^{18}F, produzindo o íon ^{18}F-fluoreto e bombardeamento de neon por Deutério través da reação nuclear ^{20}Ne (d, α) ^{18}F, produzindo [^{18}F] F_2 (Kowalsky , 2004).

Com o flúor 18 gerado da reação nuclear ^{20}Ne (d, α) ^{18}F é possível fazer uma fluoração direta com a melatonina, pois nessas condições o flúor 18 (F_2) apresenta características eletrofílica que possibilita a marcação do ^{18}F direto no indol (Chirakal et al, 1986)

No centro de Radiofarmácia (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) o método utilizado é reação nuclear ^{18}O (p, n) ^{18}F utilizando como alvo água enriquecida com oxigênio – 18. A espécie química obtida do ^{18}F é em forma nucleofílica.

Quando trabalhamos com flúor na sua forma nucleofílica precisamos usar estratégias alternativas de ligar o flúor à molécula de interesse. Uma das estratégias de síntese de radiofármacos de ^{18}F é a fluoração indireta utilizando grupos prostéticos marcados com ^{18}F. Portanto, o primeiro passo da síntese é a preparação do grupo prostético marcado com ^{18}F e a seguir, sua reação com a molécula de interesse (por exemplo, a melatonina). A preparação do grupo prostético marcado com 18F é baseada em uma reação de substituição nucleofílica, onde o íon ^{18}F-Fluoreto vai deslocar um bom grupo abandonador na molécula precursora, frequentemente um éster sulfonato ou haleto.

O ^{18}F-fluoroetil tosilato é um grupo prostético amplamente utilizado para obter radiofármacos de ^{18}F devido a suas propriedades: baixa volatilidade, alta estabilidade química e bom equilíbrio entre o grupo de abandono tosilato, quimiosseletividade e estabilidade hidrolitica. (Shoultz et al, 2013).

É importante notar que as reações de substituição nucleofílica são tipicamente realizadas em solventes apróticos sob condições próximas das condições anidras; quando solvatado, o íon ^{18}F-Fluoreto é um nucleófilo fraco. O íon ^{18}F-Fluoreto obtido da água enriquecida com ^{18}O é tipicamente isolado através do uso de cartuchos de resinas de troca iônica que interceptam os íons ^{18}F- que são, então, eluídos com uma solução contendo um solvente orgânico (acetonitrila) e uma fonte de contra-íon (carbonato de potássio), dissolvido no mínimo de água possível. Um agente de transferência de fase, tal como Kryptofix2.2.2 (K222), é adicionado antes da remoção da água a fim de complexar com o cátion potássio, deixando o ânion fluoreto exposto e altamente reativo (S Yu , 2006). A água é então removida por evaporação azeotrópica com acetonitrila.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma síntese viável da fluoroetil melatonina com flúor estável, que servirá como modelo e padrão para marcação do flúor -18 com a melatonina.

Este trabalho visa desenvolver e testar possíveis rotas sintéticas para a Fluoroetil – melatonina.

2.1 Justificativa

Levando em considerações as informações apresentadas, um análogo da melatonina marcado com ^{18}F pode ser uma potencial nova ferramenta na área de diagnósticos em células que apresentam receptores MT1 e MT2 da melatonina.

3 MATERIAIS E METODO

3.1 Solventes e reagentes

- Cloreto de 4-toluenossufonila (Sigma, 99%)
- Piridina (Merck, P.A)
- 2-Fluoroetanol (Sigma, 95%)
- Hidróxido de Sódio (Sigma, P.A)
- Diclorometano (Merck, P.A)
- Tolueno (Merck, P.A)
- Acetato de Etila (Merck, P.A)
- N-Hexano (Merck, P.A)
- Etanol (Merck, P.A)
- Dimetilformamida (Sigma, 99,8%)
- Hidreto de sódio (Merck, 60% em dispersão de óleo mineral)
- Melatonina (Sigma, 98%)
- Sílica Gel (Sigma)

3.2 Equipamentos

- Agitador magnético
- Rotaevaporador
- Placa de TLC
- Câmara de UV
- Agitador mecânico
- Balança Analítica
- Placa de aquecimento
- RMN

3.3 Síntese de fluoroetil tosilato

Os seguintes reagentes foram acrescentados a temperatura ambiente, em atmosfera de nitrogênio e agitação: 4 ml de piridina, 1ml de 2-fluoroetanol e 3,57 g de cloreto de 4-toluenossufonila.

Foi deixado reagir a temperatura ambiente toda a noite com atmosfera de nitrogênio e agitação e finalizar após 24 horas. A mistura foi rotaevaporada para retirar a piridina, utilizando temperatura de 40 °C e pressão de 100 mbar, esse procedimento resultará em um composto viscoso amarelo.

A purificação foi feita por cromatografia “flash” em coluna. Usar 1/3 da coluna com sílica gel, purgar a coluna com Hexano (2 vezes). Adicionar o composto obtido pela rotaevaporação na coluna e passar 50 ml de fase móvel de 80:20 de Hexano/acetato de etila. Acompanhar por TLC de mesma fase móvel se o composto começou a sair, para neste caso mudar o gradiente da fase móvel para 70:30 de Hexano/Acetato de etila.

3.4 Síntese de fluoroetil melatonina com base de hidróxido de sódio

Reagentes

-0,697 g de Melatonina (3 mmol)

-0,12 g de NaOH (3 mmol; 1.1 eq)

-0,752 g de Fluoroetil Tosilato (4 mmol; 1.1 eq)

Melatonina 0,996 g (3 mmol) e NaOH (3 mmol) 0,12 g foram dissolvidos em em 6 ml de DMF anidro, a mistura foi agitada por 10 minutos a 25 ºC, a seguir foi adicionado 0,654 g (3 mmol) de fluoroetil tosilato, após agitar por mais 30 minutos, 30 ml de H_2O foram adicionados ao sistema. A mistura foi extraída com acetato de etila (3 x 10ml), a camada de acetato de etila foi seca com Na_2SO_4 anidro. O solvente foi evaporado para gerar o produto de interesse.

Purificação

Este produto foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel usando benzina (éter de petróleo) /acetato de etila (v/v= 20/1 para v/v= 10/1) como eluente para obtenção do produto puro. Este produto foi analisado por RMN.

3.5 Síntese de fluoroetil melatonina com base de hidreto de sódio

Reagentes

-100 mg de Melatonina (0,43 mmol)

-19 mg de NaH (0,474 mmol; 1.1 eq)

-104 mg de Fluoroetil Tosilato (80 uL; 0,474 mmol; 1.1 eq)

Protocolo da Reação

-Frasco 1: 100 mg de Melatonina (Frasco âmbar) em 500 uL de DMF

-Frasco 2: 80 uL de Fluoroetil Tosilato em 400 uL de DMF

-Balão da reação: 19 mg de NaH (Papel Alumínio) em 500 uL de DMF

Foi acrescentado o conteúdo do frasco 1 ao balão da reação (em um banho de gelo a 0 ºC). A seguir foi acrescentado devagar gota a gota o frasco 2 ao balão da reação. A mistura reacional foi agitada por 10 min a 0 ºC (usando o mesmo banho de gelo) com N_2. Passado esse tempo foi retirado o banho de gelo e a reação foi deixada overnight a temperatura ambiente.

O solvente foi evaporado e o produto foi concentrado no rotaevaporador. O produto foi monitorado por TLC utilizando uma fase móvel Clorofórmio: Metanol (9:1). O Rf do produto formado foi de 0,6 e do material de partida (melatonina) foi de 0,5.

Purificação

O produto foi purificado por TLC SILICA GEL 60G em PLACAS DE VIDRO 20X20CM, utilizando como fase móvel CH3CL:MeOH (9:1). O produto foi aplicado

aproximadamente 1 cm da borda da placa em todo o espaço da placa na altura de 1 cm. A câmara de revelação foi saturada com a fase móvel e a placa foi colocada dentro da câmara. Quando o solvente subiu até o limite da placa (aproximadamente 1 hora) a mesma foi retirada. A placa foi observada no UV e a fração de interesse foi raspada e retirada da placa de vidro.

A sílica foi colocada em um Erlenmeyer e 5 mL de Diclorometano foi adicionado e agitado até a dissolução da sílica por 30min. A solução foi passada para um balão final e o solvente foi evaporado deixando um óleo amarelo.

3.6 Síntese de fluoroetil melatonina por catálise de transferência de fase (CTF)

Reagentes

-232 mg de Melatonina (1 mmol)

-20 mL de solução de aquosa de hidróxido de sódio (50% w/v)

-30 mL de diclorometano

-220 mg de Fluoroetil Tosilato (1.1 mmol)

-gotas de hidróxido de tetrabutilamônio (40%)

Misturou-se uma solução de melatonina (232 mg, 1 mmol) em diclorometano (30 ml) com uma solução aquosa de hidróxido de sódio (20 ml, 50% w/v) e adicionou-se fluoroetil tosilato (220 mg, 1,1 mmol) e hidróxido de tetrabutilamônio (algumas gotas de solução aquosa a 40%). Manteve-se sob agitação mecânica a 33 °C por 3h, em seguida o aquecimento foi descontinuado e a solução permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 24h. Ao término, a mistura foi resfriada em gelo e cuidadosamente acidificada com uma solução diluída de ácido clorídrico. A camada orgânica foi separada, lavada com uma solução saturada de carbonato de sódio e depois com água. Em seguida a mistura foi seca com sulfato de magnésio e evaporada a vácuo, gerando uma camada cristalina rubra.

Purificação

A purificação foi feita por cromatografia “flash” em coluna, usando fase móvel de 8:1:1 de Tolueno/Acetona/Etanol o que gerou um líquido viscoso laranja escuro (Snieckus & De Silva, 1977)

3.7 Síntese da 18F-Fluoroetil tosilato

[18F] FEtOTs (figura 9) foi preparado de acordo com protocolos da literatura (Schirrmacher et al., 2002; Schoultz et al., 2013). O precursor de bis tosilato de etileno glicol (8 mg) foi dissolvido em 1 mL de MeCN anidro e adicionado ao frasco contendo o complexo seco [K + / K222] / [18F] F- / CO32. A reação foi colocada em frascos selados e não selados, a diferentes temperaturas de marcação e tempos de reação, e foram utilizadas diferentes quantidades de K2CO3 para eluição de [18F] a partir do cartucho QMA. Depois de arrefecer o frasco da reação, analisou-se uma alíquota da mistura bruta por HPLC. Em seguida, a mistura bruta foi injetada num sistema de HPLC semi-preparativa para purificar o produto. A fração recolhida de [18F] FEtOTs foi diluída e carregada em um cartucho Sep-Pak C18 Plus. O cartucho carregado foi lavado com água Milli-Q (10 mL) e aquecido a 50 ºC durante 10 min com atmosfera de nitrogênio (Schoultz et al., 2013). Depois, [18F] FEtOTs foi eluído com DMF (1 mL). Uma alíquota da formulação final foi analisada por HPLC para confirmar a identidade do composto marcado comparando o rádio cromatograma do composto frio (figura 27) no perfil UV de 254 nm.

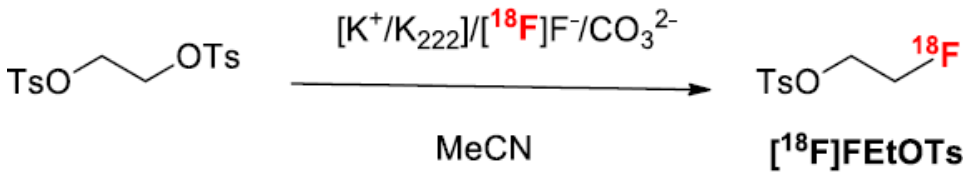


Figura. 9 Síntese de 18F-Fluoroetil tosilato

3.8 Síntese da 18F-Fluoroetil Melatonina

Uma solução de [18F] FEtOTs (0,75 MBq = 20 µCi) em DMF (800 µl) foi adicionada gota a gota a um frasco contendo melatonina (1 mg) e NaH (3 eq.) em DMF (30 µL). O frasco reacional foi aquecido a 80 ºC durante 20 min sob agitação e atmosfera de nitrogênio. A reação de marcação foi monitorizada por HPLC analítico.

4 RESULTADOS

4.1 Fluoroetil tosilato

A síntese do fluoroetil tosilato dura 24 horas, durante esse tempo ela sofre uma mudança no seu aspecto físico inicial, começando como uma mistura límpida e amarelada, no seu término ela apresenta mistura esbranquiçada branca e viscosa. Após passar pelo rotaevaporador ela forma uma camada cristalina branca no balão (figura 10) que pode ser dissolvida com diclorometano.

Após a purificação foi feito uma cromatografia de camada delgada (TLC).

Figura 10. Fluoroetil tosilato após rotaevaporação

Após a comparação do padrão, o fluoroetil tosilato produzido foi enviado para análise de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) no Instituto de Química da USP (IQ). A síntese por RMN de 1H, foi realizada em um equipamento Bruker -500 MHz. O aspecto físico final do produto é uma solução amarelo clara quando diluída em diclorometano (Figura 11). O resultado pode ser analisado na figura 12, que mostra a presença das bandas esperadas para esta molécula.

Figura 11. Aspecto físico final do fluoroetil tosilato

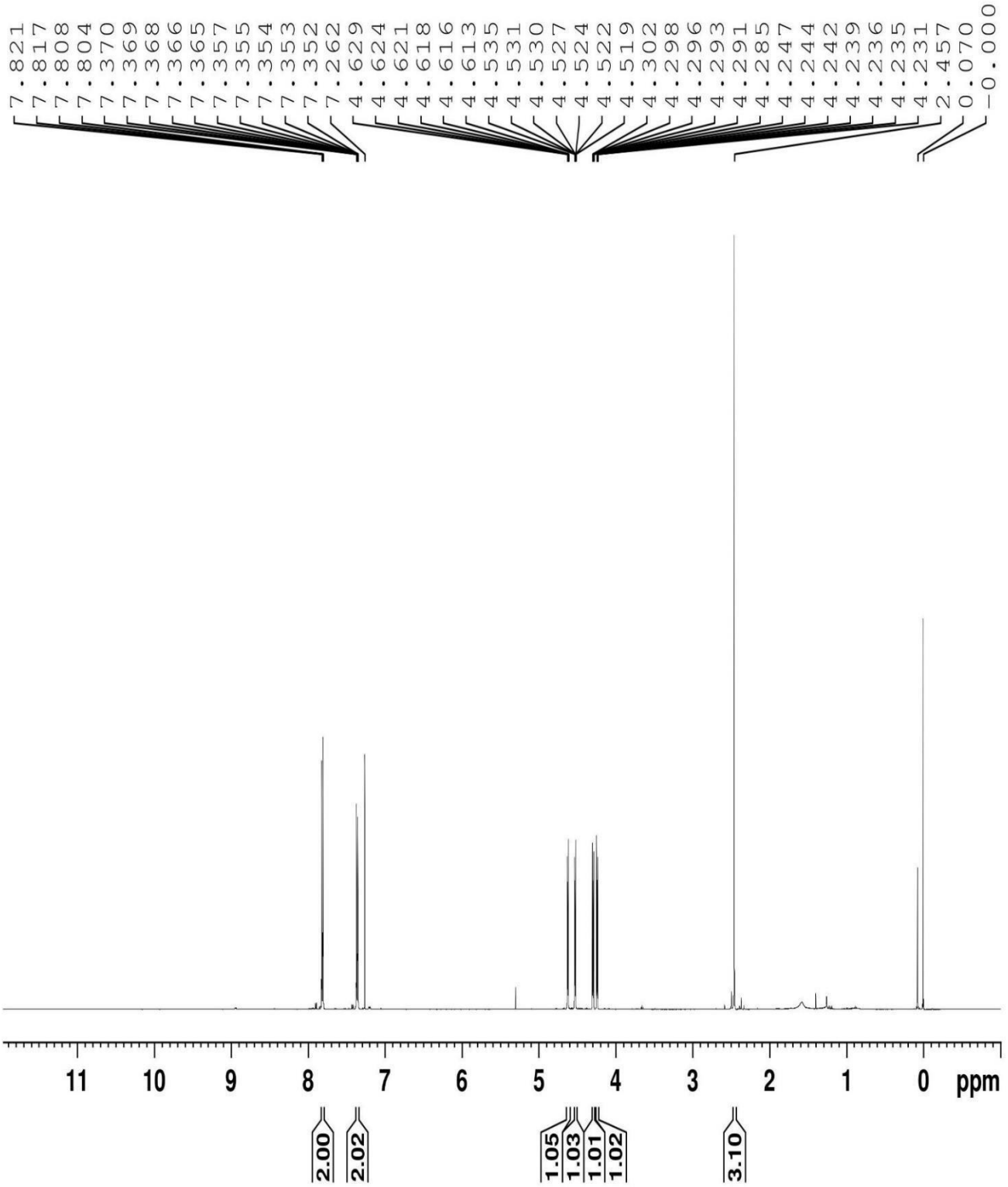


Figura 12. Espectro de RMN do fluoroetil tosilato

4.2 Fluoroetil melatonina com base de hidróxido de sódio

A síntese da fluoroetil melatonina com base de hidróxido de sódio não gerou produtos, a aparência inicial da mistura foi límpida e transparente e se manteve assim após 8 ,12, 16 e 24 horas. Os testes de cromatografia de camada delgada não indicaram formação da fluoroetil melatonina mostrando apenas os pontos conhecidos da melatonina e do fluoroetil tosilato. Esta síntese foi purificada e enviada para análise por de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) no Instituto de Química da USP (IQ) para confirmar que não houve reação. Como pode ser visto na figura 13, este espectro mostra apenas a presença de melatonina pura.

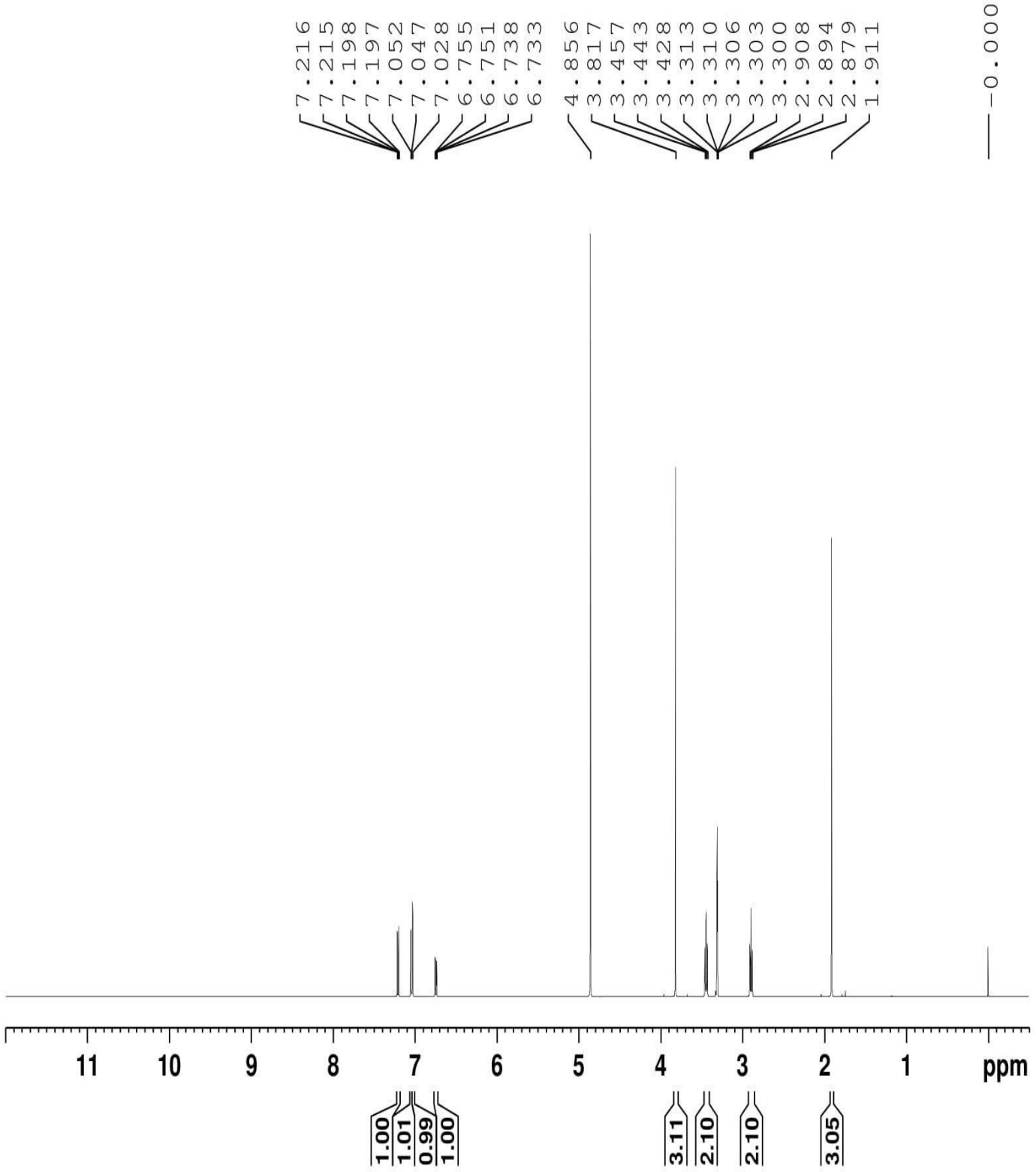


Figura 13. Espectro de RMN da síntese de fluoroetil melatonina com NaOH

4.3 Síntese de fluoroetil melatonina com base de hidreto de sódio

A síntese com hidreto de sódio teve duração de 20 horas na qual sofreu mudanças no seu aspecto físico inicial, começando como uma solução límpida e incolor e se tornando uma solução castanho claro ao término. Após a síntese a solução foi rotaevaporada e deixando um líquido castanho escuro no balão (figura 14).

Figura 14. Síntese com hidreto de sódio após rotaevaporação.

Após a purificação foi feito uma cromatografia de camada delgada (TLC) onde pode ser visto que os Rfs do produto formado e do produto de partida bem próximos, 0,6 e 0,5 respectivamente.

Após a purificação, a fluoroetil melatonina produzida foi enviada para análise de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio, carbono e flúor no Instituto de Química da USP (IQ) e no instituto Butantã. Fluoroetil melatonina apresentou um rendimento de 35% produzindo um óleo amarelo. As análises confirmaram a estrutura química esperada na síntese e sua estrutura numerada de acordo com o espectro está descrita há figura 15. As atribuições dos espectros estão descritas abaixo.

^{1}H RMN (300 MHz, CDCl3; ppm): δ 7.20 (H2, d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.05 (H7, d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.97 (H9, s, 1H), 6.91 (H7, dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 5.55 (H12, s, 1H), 4.77 (H21, t, J = 4.9 Hz, 1H), 4.61 (H20, t, J = 4.9 Hz, 1H), 4.39 (H19, t, J = 4.9Hz, 1H), 4.30 (H18, t, J = 4.9 Hz, 1H), 3.87 (H16, s, 3H), 3.58 (H11, q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.94 (H10, t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.94 (H17, s, 3H).

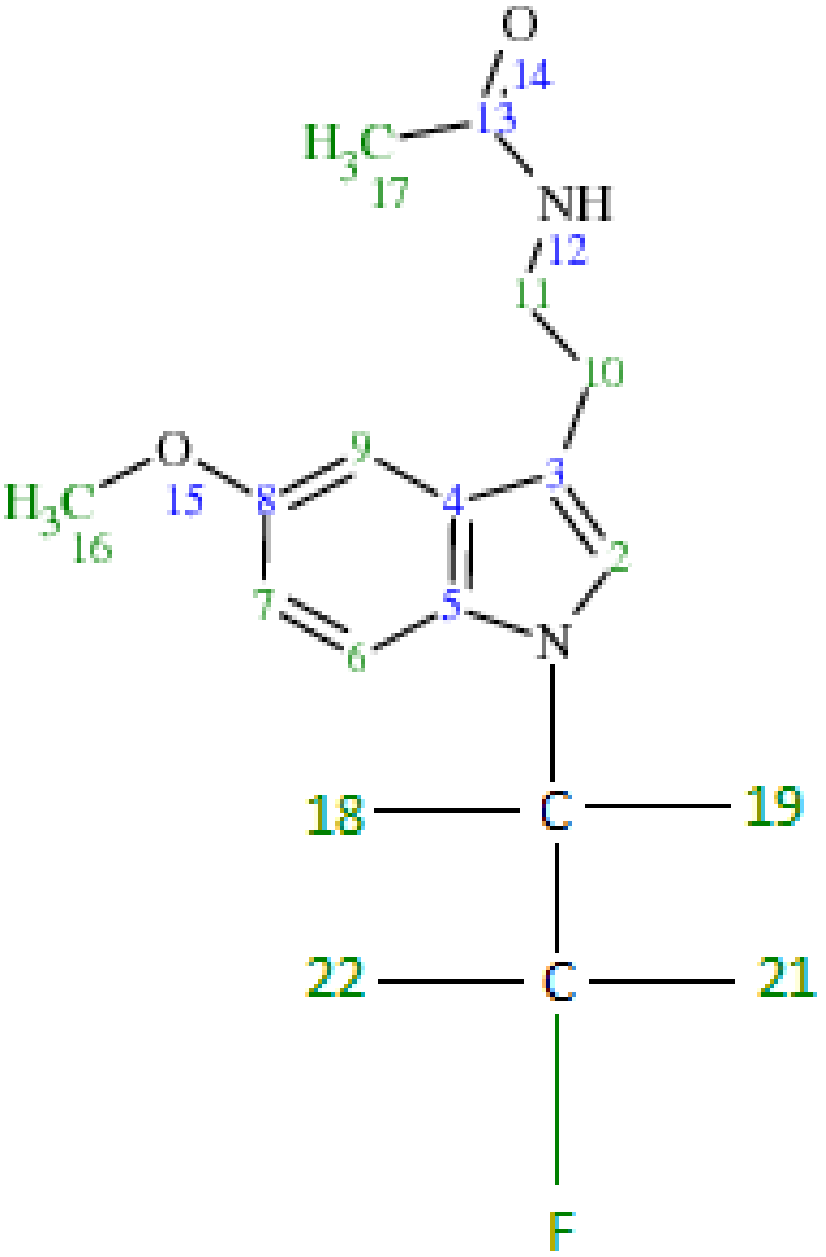


Figura 15. Melatonina numerada de acordo com o espectro de ^{1}H RMN

Se comparado a um espectro de ^{1}H RMN de melatonina pura, podemos observar que a única mudança será os novos picos presentes entre 4 e 5 ppm, como pode ser visto nas imagens abaixo (figura 16 e 17)

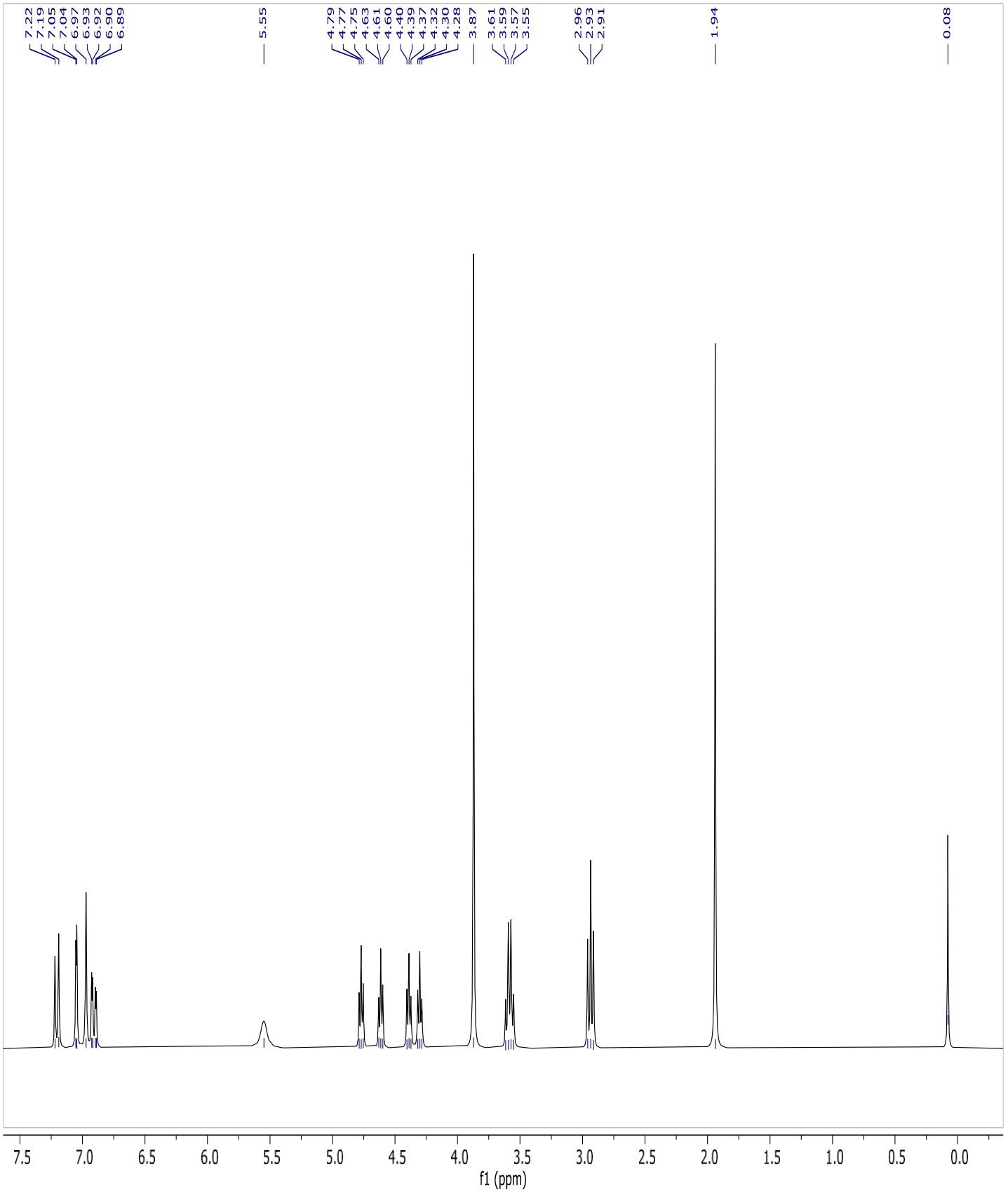


Figura 16. Espectro de ^{1}H RMN de Fluoroetil melatonina

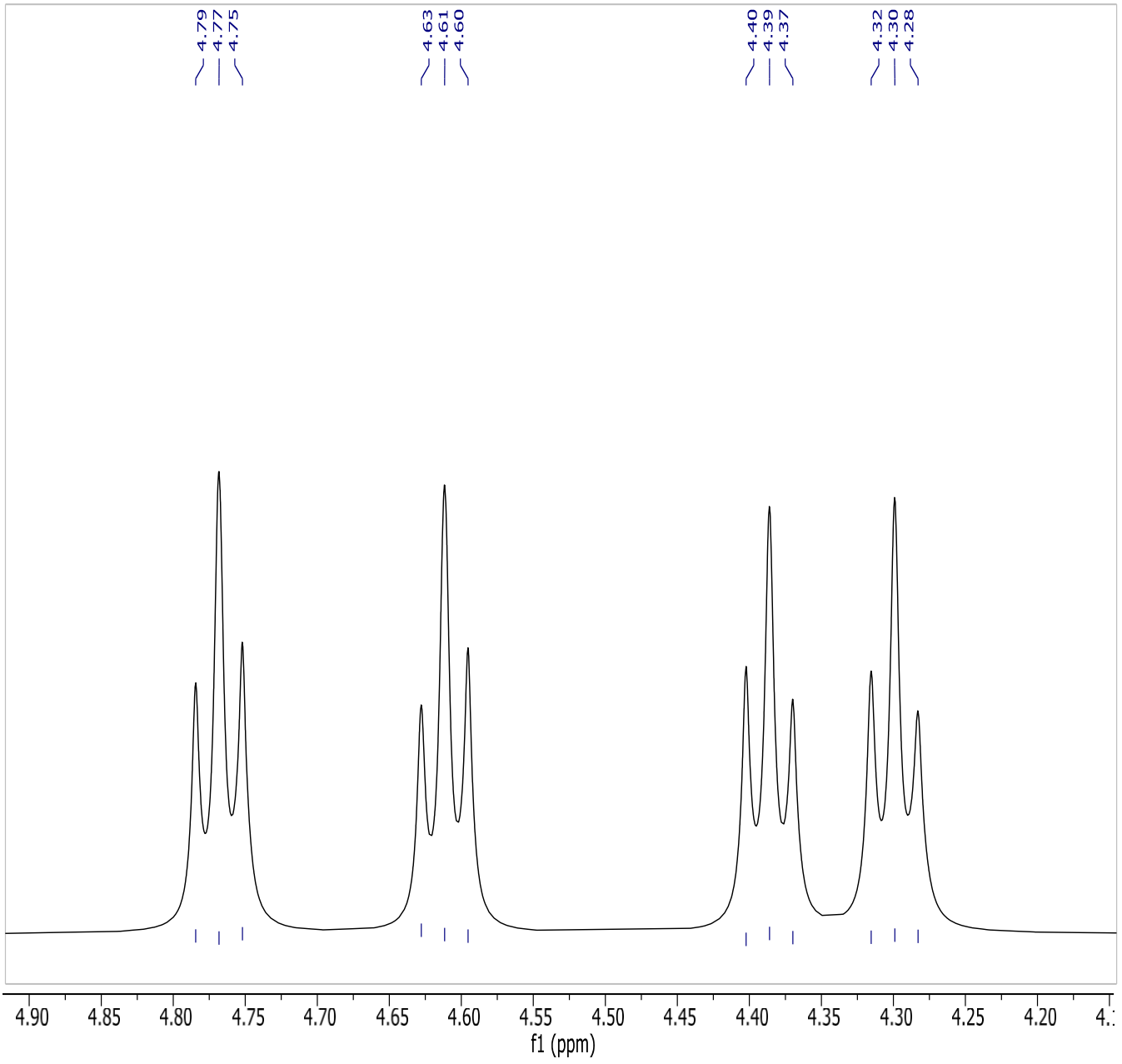


Figura 17. Picos referente a fluoroetil

^{13}C RMN (300 MHz, CDCl3; ppm): 170,04; 154,13; 131,79; 128,46; 126,70; 112,35; 11,92; 110,00; 100,86; 83,53; 81,24; 77,44; 77,22; 77,02; 76,60; 55,99; 46,74; 46,46; 39,74; 29,71; 25,19; 23,43.

Os espectros de carbono 13 e HMBC (^{1}H, ^{13}C) podem ser vistos abaixo, confirmando a estrutura química da nova molécula (figura 18 e 19)

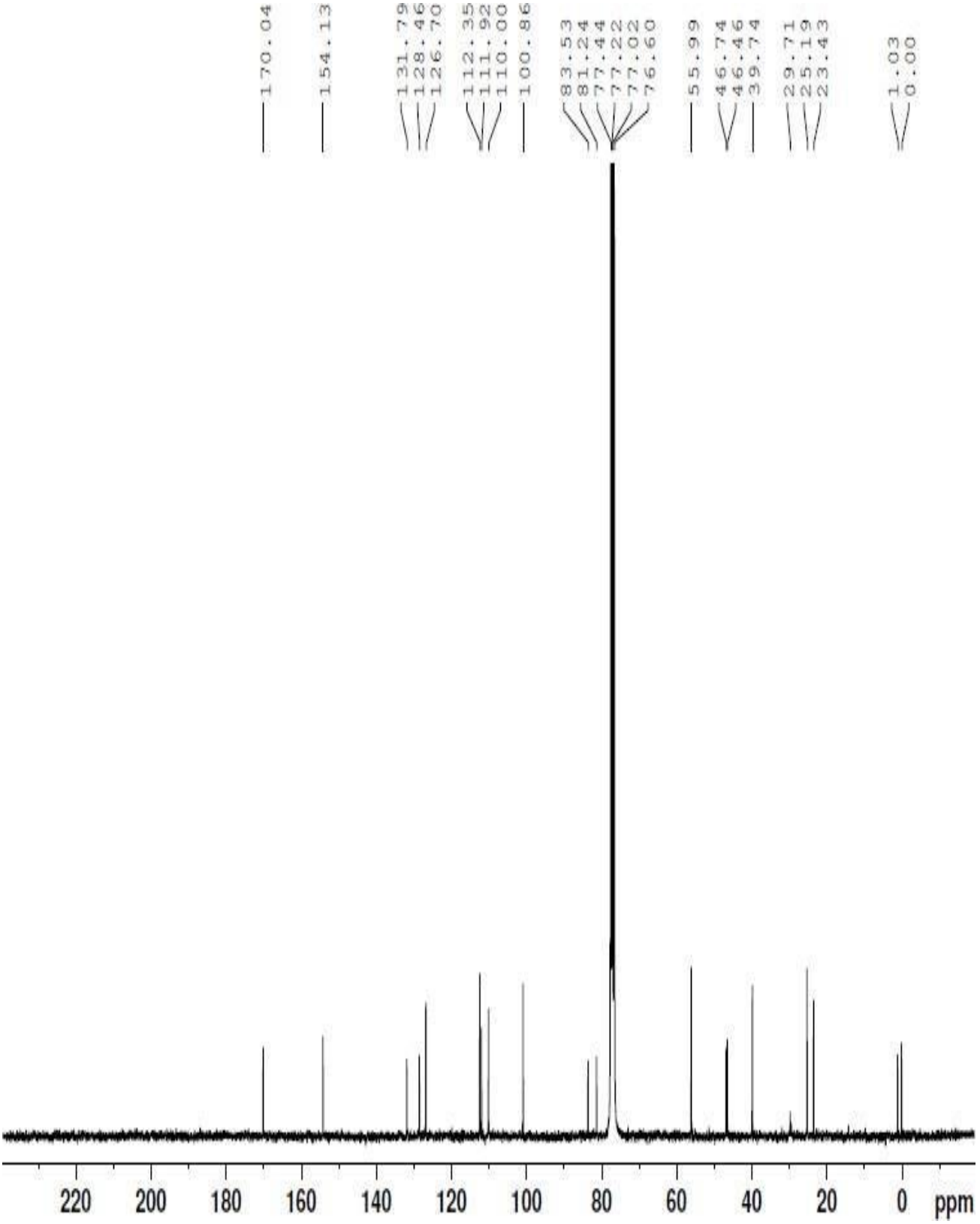


Figura 18. ^{13}C RMN de fluoroetil melatonina

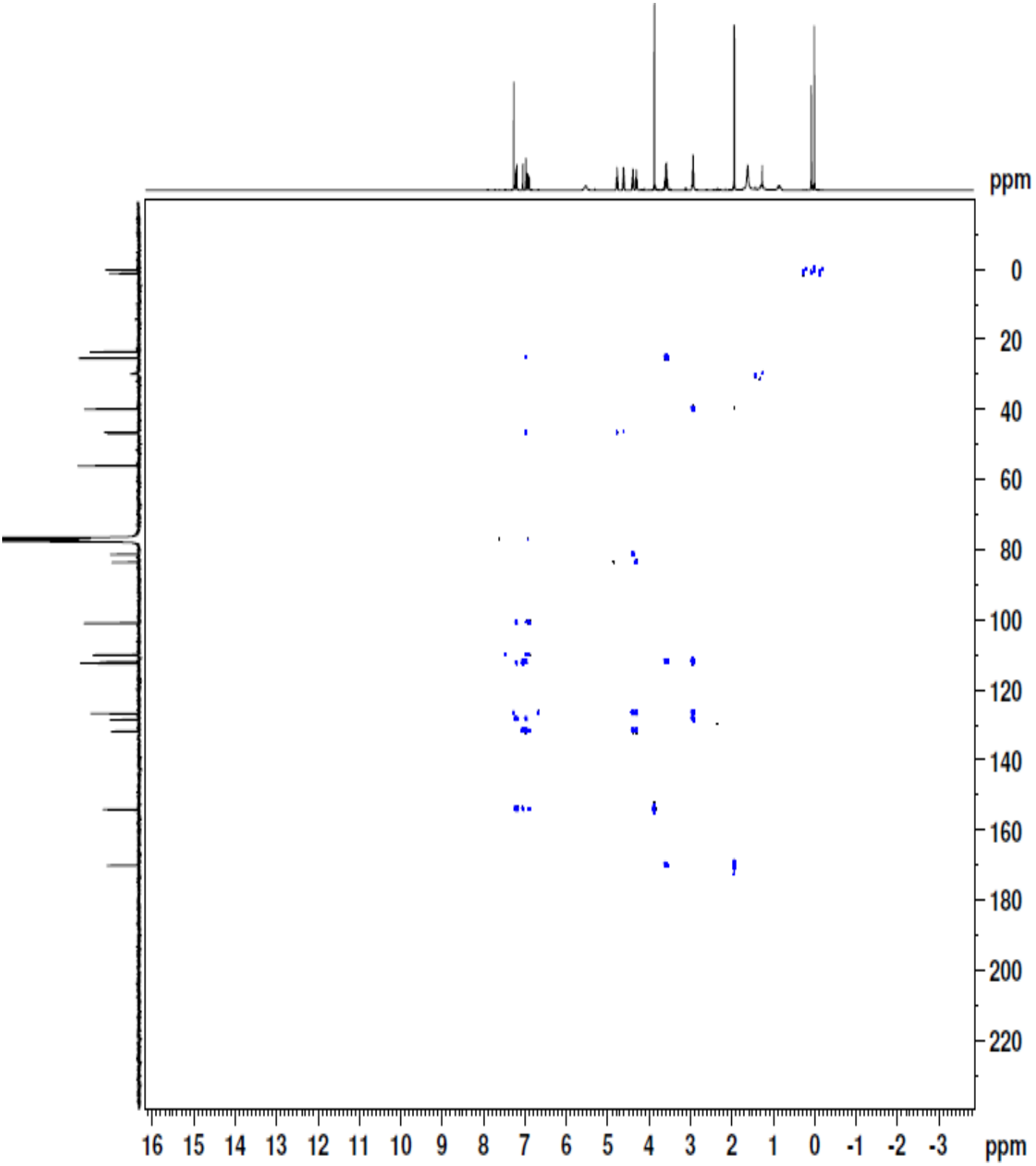


Figura 19. Espectro (^{1}H, ^{13}C) HMBC

Foi realizada também analise por espectrometria de massas (MS) na qual mostrou o resultado esperado de 279,24 u, levando em consideração o erro estatístico da análise de ± 0,1 como pode ser visto na figura 20.

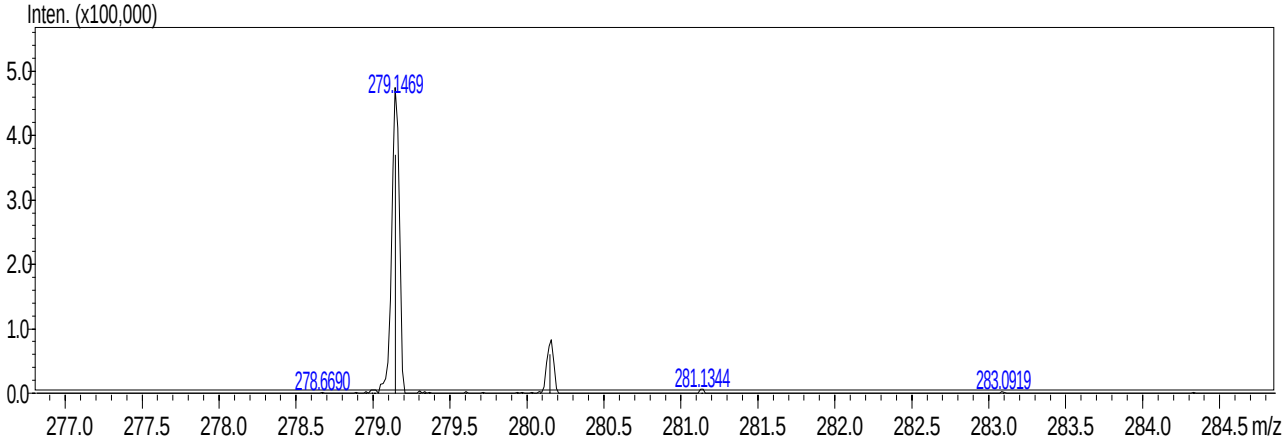


Figura 20. Espectro de massas de fluoroetil melatonina

Para finalizar a caracterização, foi realizado uma analise de ^{19}F RMN que serviu para confirmar a molécula definitivamente como pode ser visto na figura 21, com ^{19}F RMN (300 MHz, CDCl3; ppm):-219,35; -219,44; -219,52; -219,61; -219,69; -219,77.

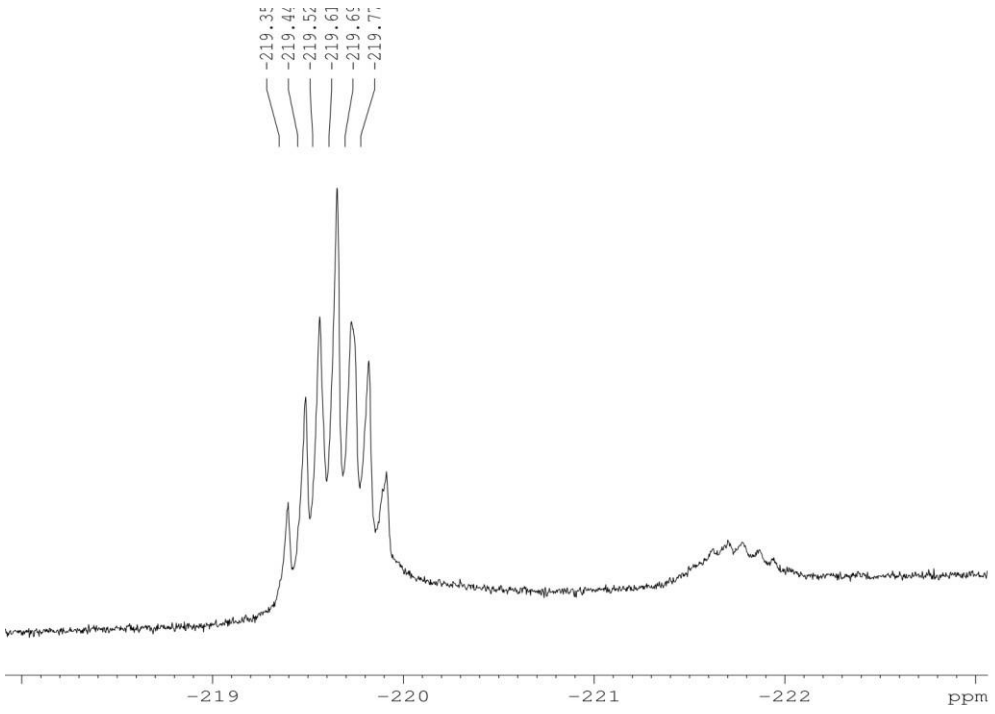


Figura 21. Espectro de ^{19}F RMN de fluoroetil melatonina

4.4 Fluoroetil melatonina por catálise de transferência de fase (CTF)

A síntese por catalise de transferência de fase teve duração de 24 horas na qual sofreu mudanças no seu aspecto físico inicial, começando como uma solução turva e amarelada (figura 22) e se tornando uma solução castanho escuro na fase aquosa e marrom na fase orgânica ao término (figura 23). Após a síntese a solução foi neutralizada (figura 24) e passou por separação de fase na qual a fase de interesse foi a orgânica, e está fase foi lavada e rotaevaporada, formando uma camada laranja acastanhada (figura 25).

Figura 22. Aspecto físico no início da síntese

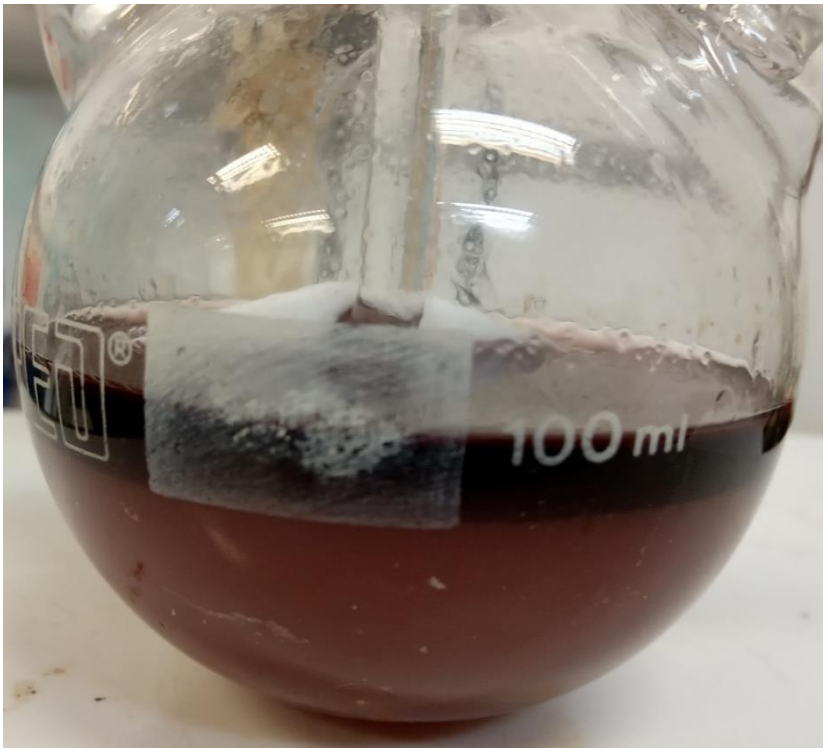


Figura 23. Aspecto físico no final da síntese

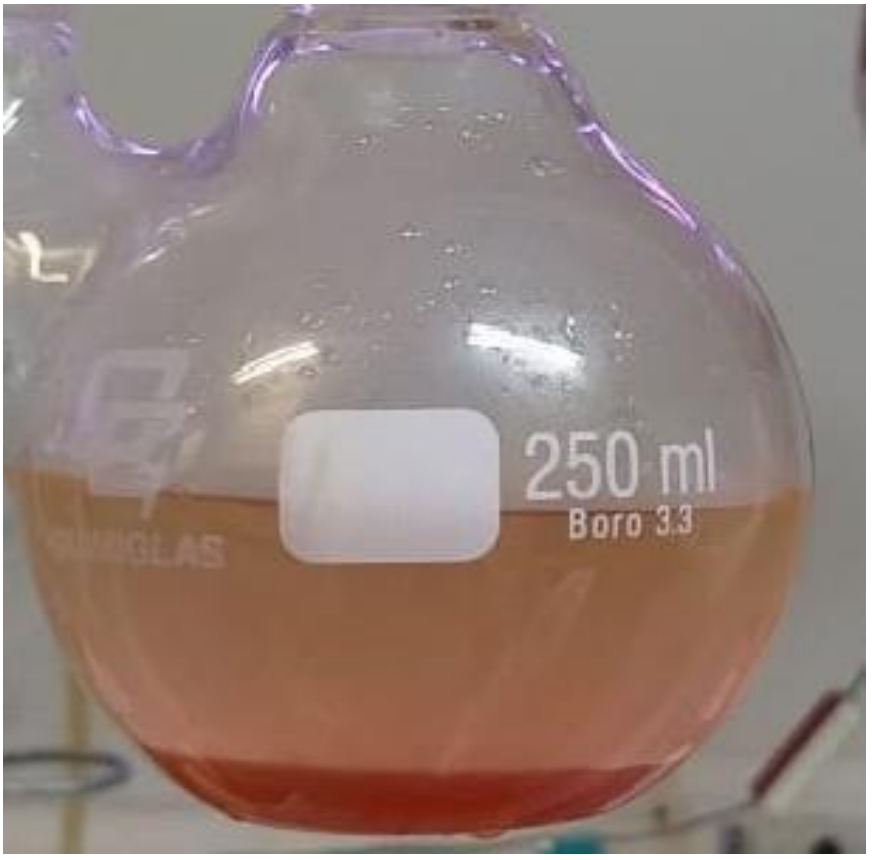


Figura 24. Solução após neutralização

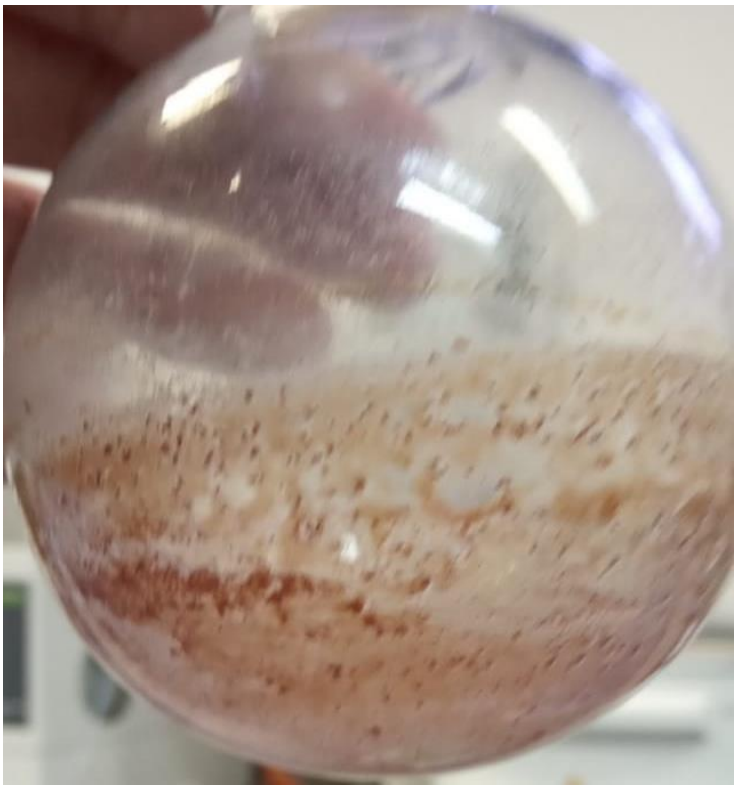


Figura 25. Solução após rotaevaporação

Após a purificação foi feito uma cromatografia de camada delgada (TLC). Sendo os pontos melatonina padrão, fluoroetil melatonina, melatonina não consumida na reação e fluoroetil tosilato não consumido na reação.

A síntese se mostrou viável, porém o fato de se utilizar catalisador e uma base relativamente forte gerou subprodutos indesejáveis que dificultou a purificação o que pode ser verificado no espectro de ^{1}H RMN (figura 26 e 27) que apresenta muitas impurezas

.

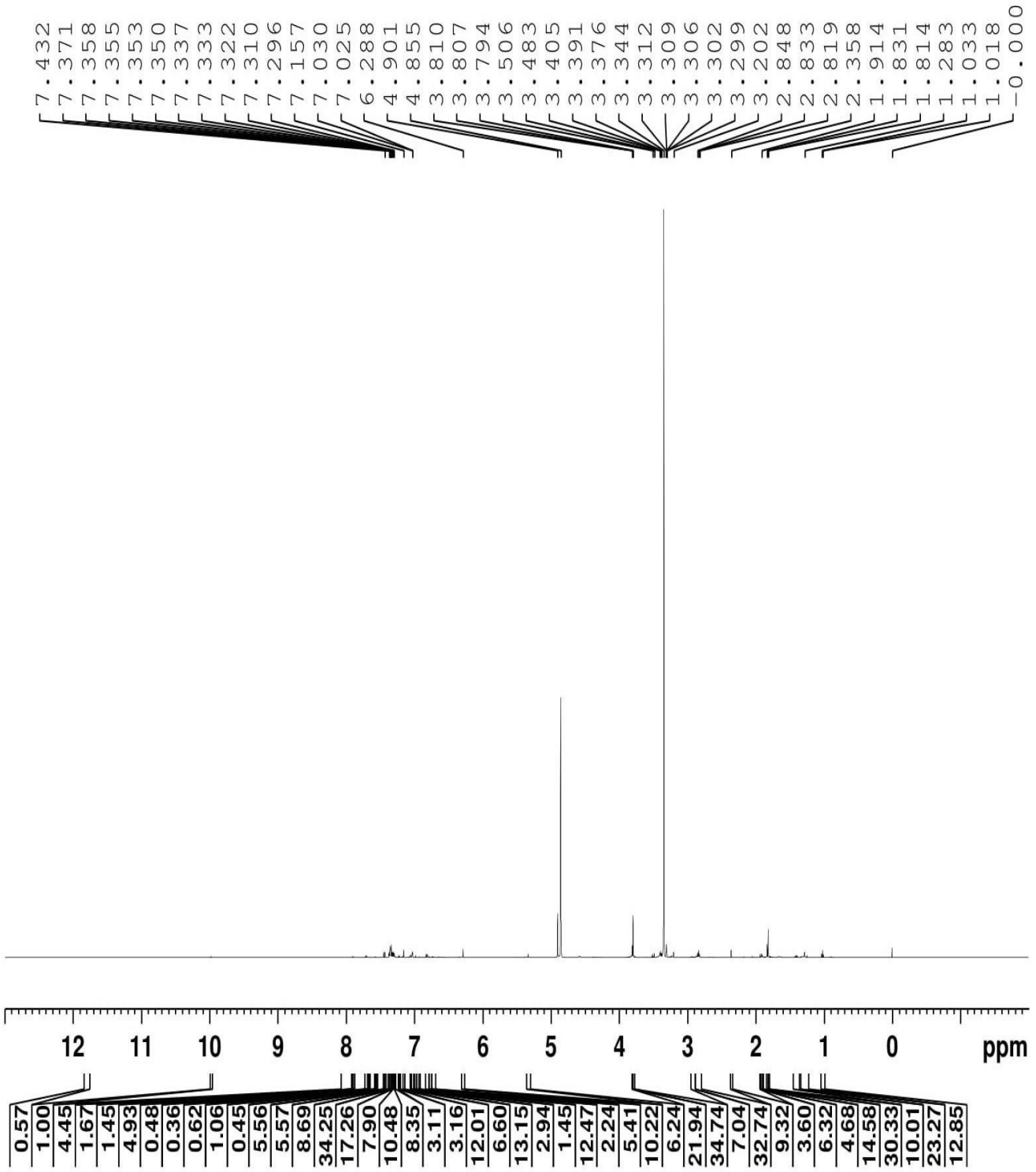


Figura 26. Espectro de RMN da síntese com CTF

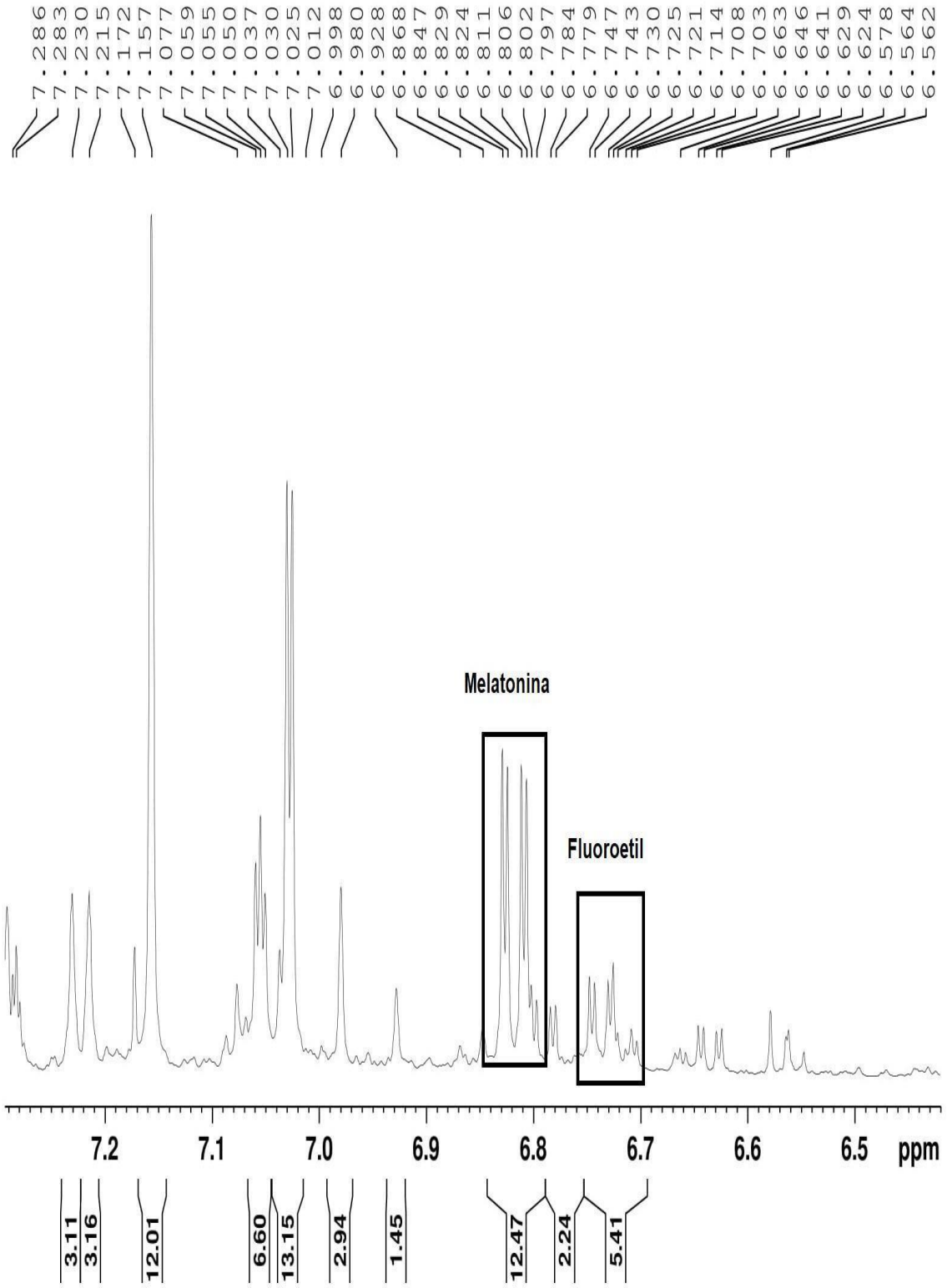


Figura 27. Espectro de RMN da síntese por CTF 2

4.5 Marcação da 18F-Fluoroetil melatonina

Após a síntese da Fluoroetil melatonina por hidreto de sódio ter sido confirmada, foi feita a caracterização da molécula por HPLC que serviu como padrão para a síntese da 18F-Fluoroetil melatonina. Para isto primeiro foi caracterizada a melatonina pura (figura 27) e em seguida a fluoroetil melatonina (figura 28) por HPLC analítico com comprimento de onda de 220, 254 e 280 nm e detectir de UV, usando um gradiente A: agua MiliQ 0,1% TFA e B: acetonitrila, 1 mL/min 0-100% B por 30 min. Coluna C18 Agilent 4.6x25 mm 5µm. A molécula de fluoroetil tosilato foi previamente caracterizada (figura 29 e 30). O pico correspondente a melatonina pura teve tempo de retenção de 10,7 min, o pico da fluoroetil melatonina teve tempo de retenção de 15,6 min, enquanto o pico do fluoroetil tosilato sai em 18,9 min.

A síntese da 18F-Fluoroetil melatonina foi analisada por HPLC analítico com base nas informações adquiridas na caracterização da molécula estável, porém utilizando um detector de radiatividade. A tentativa de marcação com 18F não obteve rendimento, como pode ser visto na figura 31 e 32, onde podemos verificar a presença de fluoroetil tosilato sem reagir livre e da melatonina pura, respectivamente em 18,8 min e 13,1 min, utilizando ambos detectores de UV e de radiação.

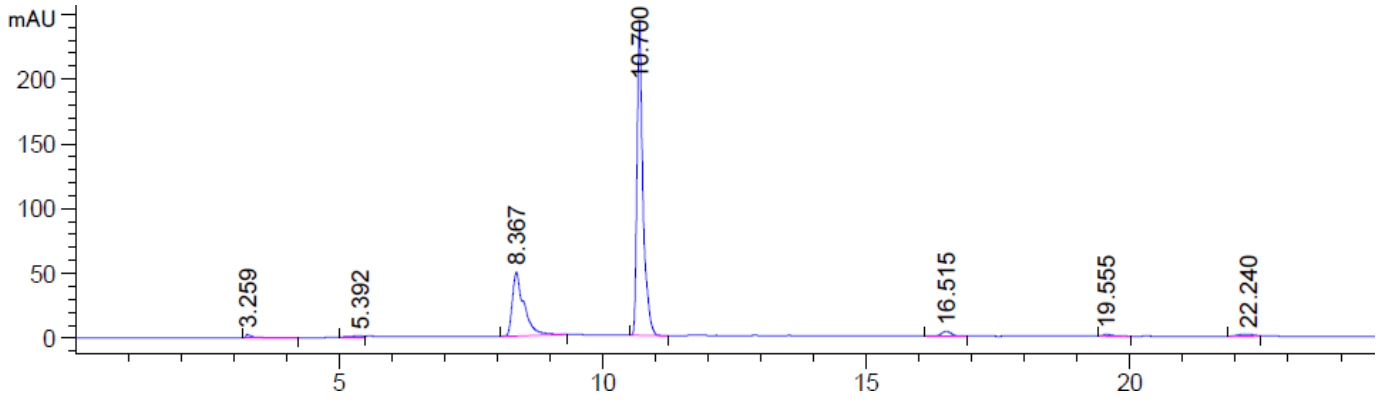


Figura 28. Espectro de HPLC analítico - Melatonina

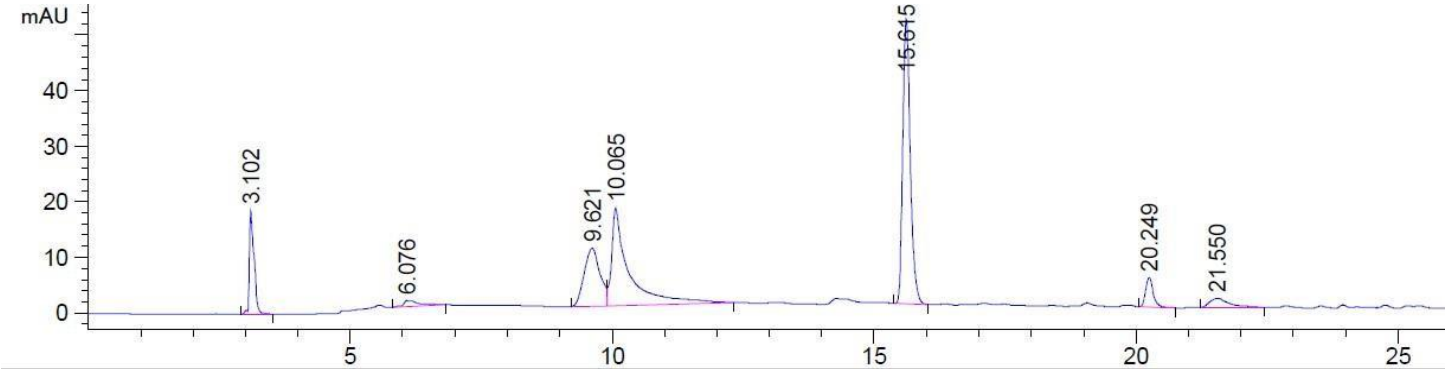


Figura 29. Espectro de HPLC analítico – 19F-Fluoroetil Melatonina

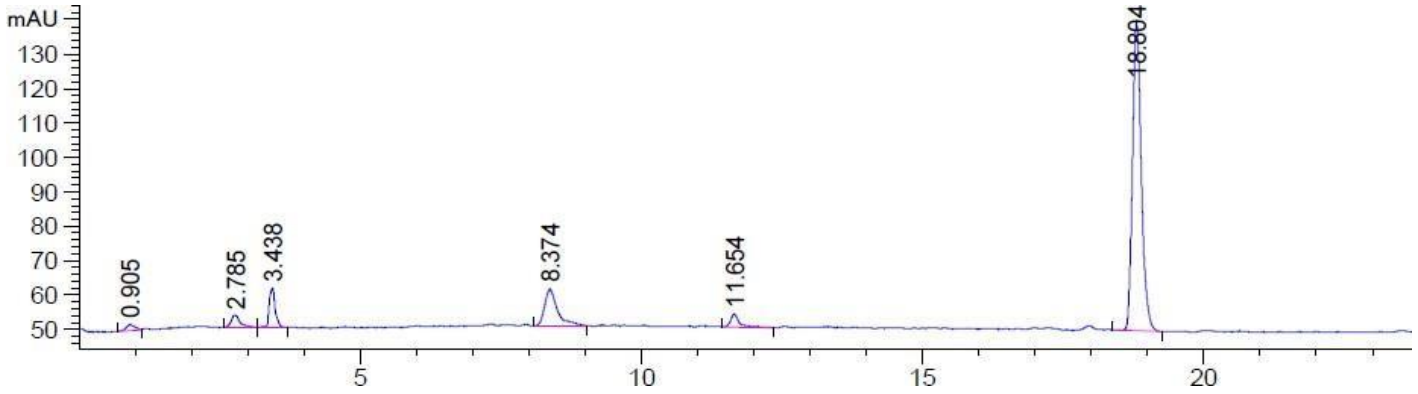


Figura 30. Espectro de HPLC analítico -18F- Fluoroetil-tosilato

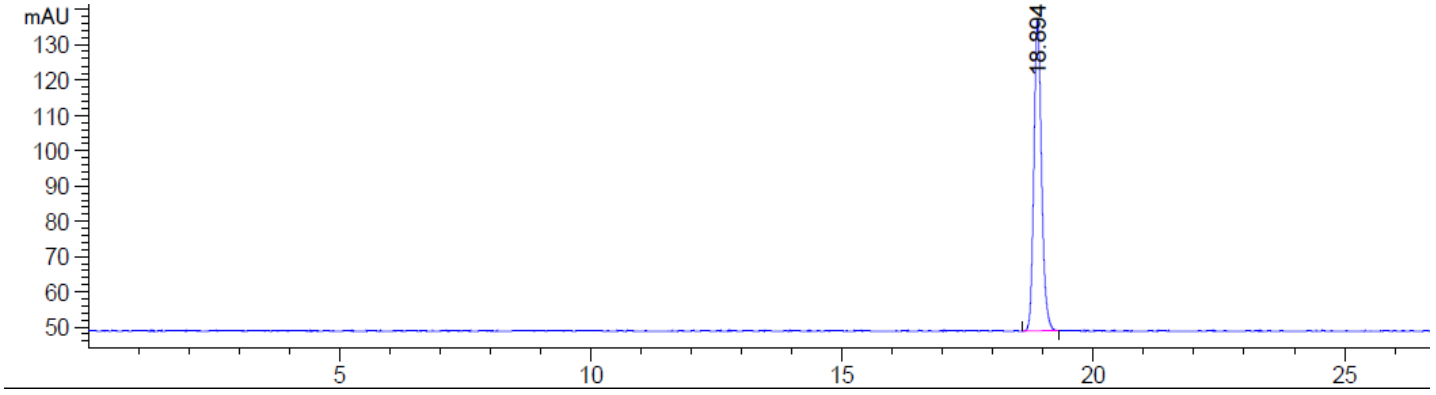


Figura 31. Espectro de HPLC analítico -18F-Fluoroetil purificado

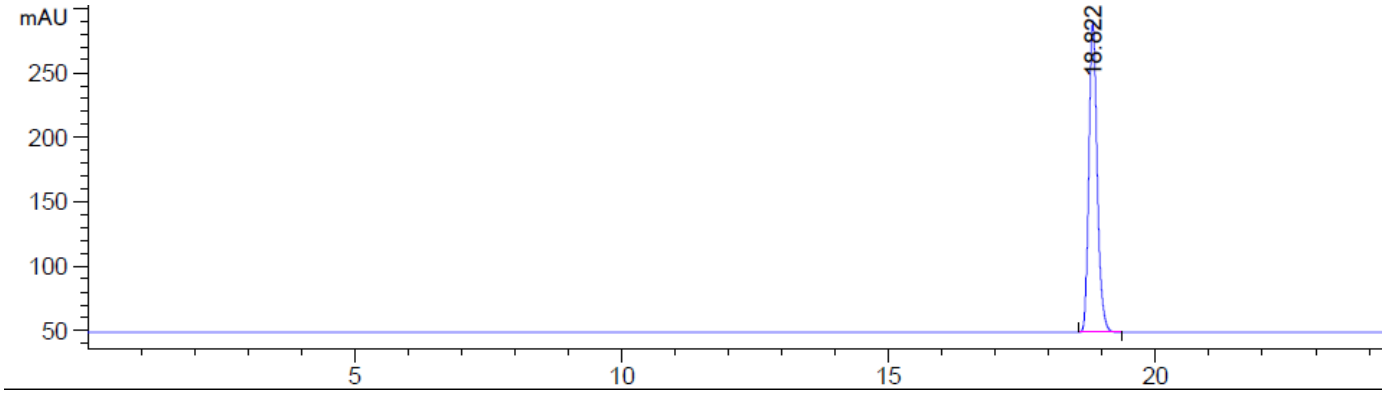


Figura 32. Espectro de HPLC analítico -18F-Fluoroetil melatonina parte 1

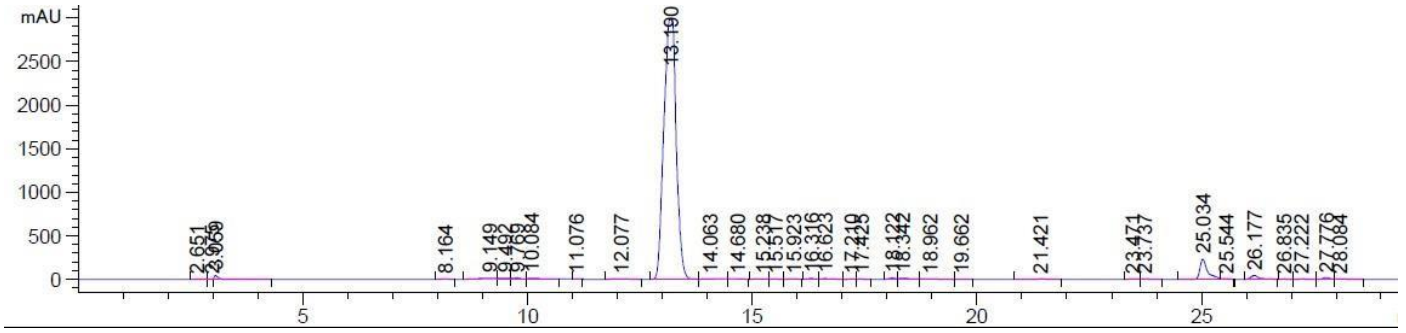


Figura 33. Espectro de HPLC analítico – 18F- Fluoroetil melatonina parte 2

5 DISCUSSÃO

O objetivo desta dissertação foi desenvolver uma síntese viável da molécula Fluoroetil melatonina com flúor -19 (estável) que servirá como padrão para a síntese da [^{18}F] Fluoroetil melatonina. Nesse trabalho foi demonstrado o uso de diferentes rotas sintéticas para alcançar uma molécula estável. Este trabalho foi feito levando em consideração que a melatonina marcada com F-18 pode ser uma nova ferramenta para estudos de processos biológicos que apresentam os receptores da melatonina, MT1 e MT2 (Legros et al, 2013).

Para esta síntese optamos por rotas sintéticas que se baseiam em fluoração indireta, usando o flúor em sua forma nucleofílica, isso foi feito para tentar evitar os problemas apresentados nos estudos de Chirakal et al, 1986; Bars et al, 1987 e Chen et al, 1998, no qual eles apresentam uma baixa atividade especifica na qual a síntese não pode ser melhorada por conta de como o flúor-18 eletrofílico é produzido, ^{20}Ne (d, α) ^{18}F (Kowalsky , 2004). O problema da atividade especifica impacta diretamente na afinidade da molécula com os receptores da melatonina. Em 1986 Chirakal et al concluiu seu estudo propondo que uma fluoração indireta usando flúor nucleofílico poderia contornar este problema

5.1 Receptores MT1 e MT2 e análogos da melatonina

Nos mamíferos a melatonina atua através de receptores próprios, MT1 e MT2 (receptores de melatonina acoplados à proteína G) (Dubocovich et al, 2000). Esses receptores são únicos, uma vez que eles apresentam estruturas moleculares distintas (Reppert et al, 1996), características farmacológicas, e localização cromossômica (Slaugenhaupt et al, 1995). Os receptores MT1 e MT2 possuem respectivamente 351 e 363 aminoácidos, com um peso calculado de 39-40 kDa (Rivera et al, 2004). Nos humanos o receptor MT1 está codificado no cromossomo #4. Durante o processo de envelhecimento e no caso de Alzheimer a expressão do

receptor no núcleo supraquiasmático diminui (Perumal et al, 2008). O receptor MT2 está codificado no cromossomo #11. Os receptores MT2 contribuem para a fisiopatologia e farmacologia dos distúrbios do sono, ansiedade, depressão e doença de Alzheimer (Comai et al, 2014).

Os mecanismos independentes do receptor estão associados com atividade antioxidante, regulação da apoptose (Sainz et al, 2003), metabolismo do tumor e imunidade ao câncer (Srinivasan et al, 2008), inibição da angiogênese e migração, e prevenção de distúrbios circadianos (Hill et al, 2015). Nas linhagens de câncer CMT-U229 e MCF-7 a melatonina apresenta efeito anti-metastático através da inibição da viabilidade e invasividade de mamosferas de câncer de mama e também mediando a expressão de proteínas relacionadas à transição mesenquimal epitelial (EMT) (Gonçalves et al, 2016), a melatonina também diminuiu a proliferação e viabilidade e induziu a apoptose em células mamárias neoplásicas, com melhor eficácia em tumores ER+ que apresentaram alta expressão do receptor de melatonina MT1 (Gonçalves et al, 2016).

O câncer de mama pode ser dividido entre os que possuem receptores de estrogênios (ER+) e os que não possuem (ER-). Se o câncer for ER+ o estrogênio promove o crescimento das células cancerosas assim como faz com células de mama comuns. O câncer de mama também pode apresentar receptores para progesterona (PR+) o que significa que este hormônio irá promover o crescimento das células cancerosas, cerca de 70% de todos os canceres de mama são hormônio dependentes (Lumachi et al, 2013).

Desde a identificação dos receptores da melatonina foram feitos diversos estudos para encontrar análogos da melatonina que consigam distinguir entre eles (Faust et al, 2007). Estes análogos seriam capazes de identificar as diferentes funções da melatonina para um receptor específico e gerar modelos para sínteses de composto que foquem em um receptor específico. Estudos mostram que os receptores MT2 humanos são mais tolerantes a modificações na estrutura da melatonina que os MT1. Já foram identificados alguns compostos com alta seletividade para MT2, enquanto nenhum composto com alta seletividade foi encontrada para MT1 (Rivara et al, 2003).

Com base nos estudos feitos nas modificações de determinados sítios da melatonina (figura 34) podemos conjecturar os impactos que a entrada do grupo fluoroetil terá na afinidade da molécula com os receptores MT1/MT2.

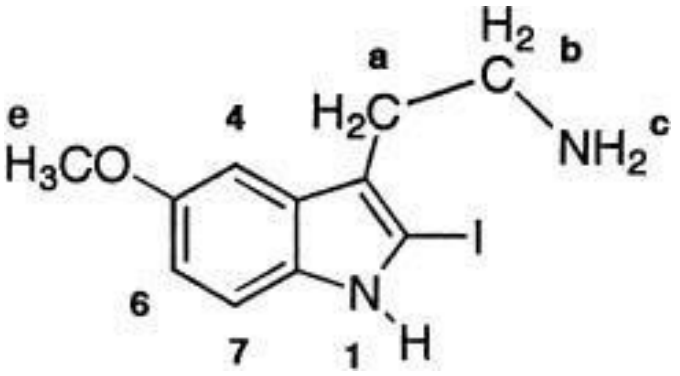


Figura 34. Sítios da iodo-melatonina

Um estudo feito por Faust et al. em 2007 demonstrou que modificações em mais de um sitio na melatonina e a entrada de grupos grandes diminui a afinidade da molécula com receptores MT1/MT2, enquanto a modificação de um único sítio, com um tamanho relativamente pequeno como o de um halogênio não impacta tanto a sua afinidade nesses receptores. Foi observado que a análogos com bromo no sítio 7 apresentam uma afinidade muito superior aos análogos da melatonina com o grupo 7-metil tanto em MT1 quanto em MT2, o que sugere que pode haver um efeito eletrostático na afinidade de ligação com esses receptores. Análogos com o grupo 7-fenil apresentam uma afinidade menor quando comparados com o anterior, possivelmente por conta da interação estérica do grupo em relação ao grupo metil e ao bromo (Faust et al, 2007). Anteriormente um estudo similar foi feito comparando a afinidade pelos receptores MT1 da melatonina entre o 2-bromomelatonina, o 2-iodomelatonina e a melatonina, ao fim do estudo foi verificado que apesar dos dois análogos terem uma relação de afinidade inferior a melatonina, o 2-bromomelatonina se mostra superior, corroborando que o efeito eletrostático pode ter ligação com receptores.(Durati et al, 1992).

A substituição no sítio R1 gera um impacto na afinidade da molécula com os receptores MT1 uma vez que a atividade biológica desse hormônio parece ser

mediada por radicais presentes em R1 (Velázquez et al, 2007). Vários estudos demonstraram que os radicais aromáticos parecem melhorar a ligação de tais moléculas aos receptores de melatonina, especificamente nos receptores de MT2 (Rocha et al, 2002); (Dubocovich et al, 2010); (Spadoni et al, 2011) ; (Kopp et al, 2000), esses estudos também demonstram que análogos de melatonina no sitio R1 com maior densidade eletrônica teoricamente devem aumentar as chances de ativar os receptores MT1 e MT2, assim aumentando a potência do análogo.

Levando em consideração todos os estudos citados anteriormente podemos considerar que a entrada do grupo fluoroetil no sítio R1 apresenta boas chances de ter afinidade de ligação com os receptores MT1 e MT2 em níveis aceitáveis para aplicação como ferramenta de estudo sobre órgãos ou células que expressem os receptores da melatonina.

Levando em consideração que no Centro de Radiofarmácia do IPEN o flúor é produzido na forma nucleofílica (^{18}O (p, n) ^{18}F) e com os dados dos estudos de Chirakal et al, 1986; Bars et al, 1988 e Chen et al, 1997, optamos por uma síntese de fluoração indireta, usando o fluoroetil tosilato que possui um bom grupo abandonador, ele também apresenta características favoráveis para a síntese, como baixa volatilidade, alta estabilidade química e bom equilíbrio entre o grupo de abandono tosilato, quimiosseletividade e estabilidade hidrolítica. (Shoultz et al, 2013). A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (figura 35) possui características físico químicas que teoricamente permitem a entrada de um grupo pequeno, que não irá alterar as funções da molécula, por meio de N-alquilação de indol.

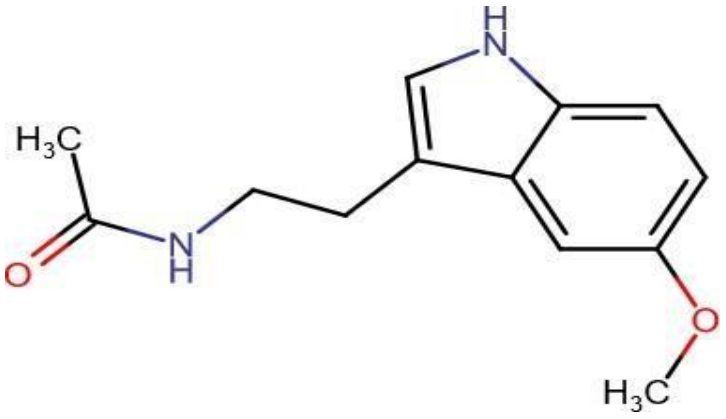


Figura 35. Melatonina

⚛ Síntese da fluoroetil melatonina com NaOH

Essa foi a primeira rota desenvolvida neste trabalho, ela foi desenhada levando em consideração que a melatonina possui um grupo indol que seria a porta de entrada para o fluoroetil, levando em consideração que os indóis, diferentemente das aminas simples não atuam como base, já que o par eletrônico não ligante do nitrogênio participa do sistema aromático da molécula.

⚛ Síntese da fluoroetil melatonina com NaH

Após os testes com NaOH, e a conclusão de que uma base mais forte era necessária, escolhemos o hidreto de sódio como substituinte para a base original, o protocolo da síntese foi criado usando informações existentes em sínteses similares da literatura (Faust et al, 2007).

A reação que ocorreu nesta síntese (figura 36), foi de substituição nucleofílica bimolecular (SN2), onde o grupo indol da melatonina sofre desprotonação com o hidreto de sódio, em um meio aprótico de Dimetilformamida (DMF). A melatonina faz então um ataque nucleofílico ao Fluoroetil tosilato, por este ser um bom grupo abandonador, a melatonina consegue se ligar ao fluoroetil, gerando a fluoroetil melatonina.

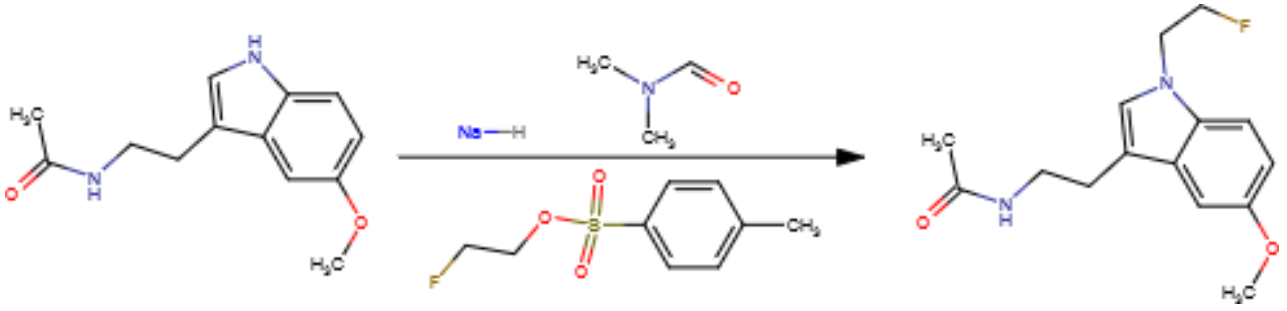


Figura 36. Síntese da fluoroetil melatonina com NaH

- **Síntese da fluoroetil melatonina por catalise de transferência de fase**

Esta rota sintética foi escolhida por sua facilidade quando comparada com a rota que utiliza NaH que apresenta uma necessidade de um meio completamente anidro para gerar um rendimento aceitável. Essa síntese foi adaptada de Silva & SNIECK, 1978.

5.2 Mecanismos

- **Reação de substituição nucleofilica bimolecular (SN2)**

O átomo de halogênio de um haleto de alquila é ligado a um carbono hibridizado em sp3. Por isso, a disposição dos grupos em torno do átomo de carbono é normalmente tetraédrica. Os átomos de halogênio, por serem mais eletronegativos do que carbonos têm a ligação carbono-halogênio polarizada. Onde, o átomo de halogênio fica com uma carga parcial negativa e o carbono com uma carga parcial positiva.

Neste tipo de reação, um nucleófilo, uma espécie com um par de elétrons não-compartilhados, reage com um haleto de alquila (chamado de substrato) pela reposição do haleto substituinte. Acontece uma reação de substituição, e o halogênio substituinte, chamado de grupo retirante (ou grupo de saída), se afasta como um íon haleto. Para ser um bom grupo retirante, o substituinte deve ser capaz de se afastar como um íon ou molécula básica fraca, relativamente estável. Com a reação de substituição é iniciada por um nucleófilo, ela é chamada de reação de substituição nucleofilica.

Nas reações de substituição nucleofilica (figura 37), a ligação carbono-halogênio do substrato passa por uma heterólise, e o par não compartilhado do nucleófilo é usado para formar uma nova ligação para o átomo de carbono.

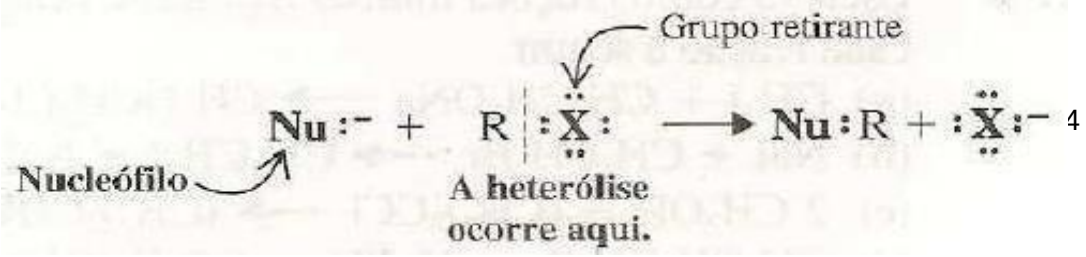


Figura 37. Substituição nucleofilica

De acordo com esse mecanismo, o nucleófilo aborda o carbono que o grupo retirante por trás, isto é, pelo lado diretamente oposto ao grupo retirante. À medida que a reação progride, a ligação entre o nucleófilo e o átomo de carbono se fortalece e a ligação entre o átomo de carbono e o grupo retirante enfraquece. Por fim, ocorre a quebra da ligação carbono- grupo retirante e ocorre a formação da ligação carbono-nucleófilo.

O mecanismo (figura 38) para esta reação é chamado de SN2, que significa que a reação depende tanto da concentração do substrato quanto do nucleófilo. Portanto, esta é uma reação bimolecular. Este mecanismo envolve apenas uma etapa, com formação de um estado de transição. Neste tipo de reação envolve a inversão da configuração do átomo de carbono. Se era R passa a ser S e vice-versa (Harris & Wanser, 1976).

Figura 38. Mecanismo SN2

⚛ Catalise por transferência de fase

A catálise de transferência de fase (CTF) é um método utilizado para provocar ou acelerar a reação entre substâncias que estão dissolvidas em ou que constituem fases diferentes, pela atuação de um agente transferidor. Este agente

ou catalisador forma um par iônico com a espécie química da fase aquosa ou sólida, que dessa forma é extraída para a fase orgânica, reagindo com o substrato ali presente.

A CTF foi utilizada como técnica preparativa a partir da metade dos anos 60 por grupos independentes de pesquisadores, Bränsdtröm na Suécia, Makosza na Polônia e Starks nos EUA, apesar de alguns relatos anteriores serem conhecidos. Desde seu surgimento, houve um grande avanço na compreensão de seus aspectos mecanísticos e na aplicação dessa técnica a um grande espectro de reações, muitas das quais utilizadas para a síntese de fármacos, perfumes, polímeros e outros produtos de interesse industrial.

A primeira proposta mecanística para o processo de transferência de fase foi formulada por Starks, para a CTF líquido-líquido (CTF-LL), com distribuição do catalisador entre as fases aquosa e orgânica. A extração de um reagente Y- para a fase orgânica e a reação subsequente ocorrem devido à formação de um par iônico deste com o sal de ônio, um requisito básico para a catálise, principalmente no caso de catalisadores muito lipofílicos, e que a formação do par iônico entre o sal de ônio e o ânion do reagente poderia ocorrer na interface do sistema(figura 39) (Lucchese & Marzorati, 2000). A rota sintética que utilizou CTF, apesar de ser viável, se mostrou problemática em relação á purificação, impossibilitando quantificar seu rendimento de forma adequada,

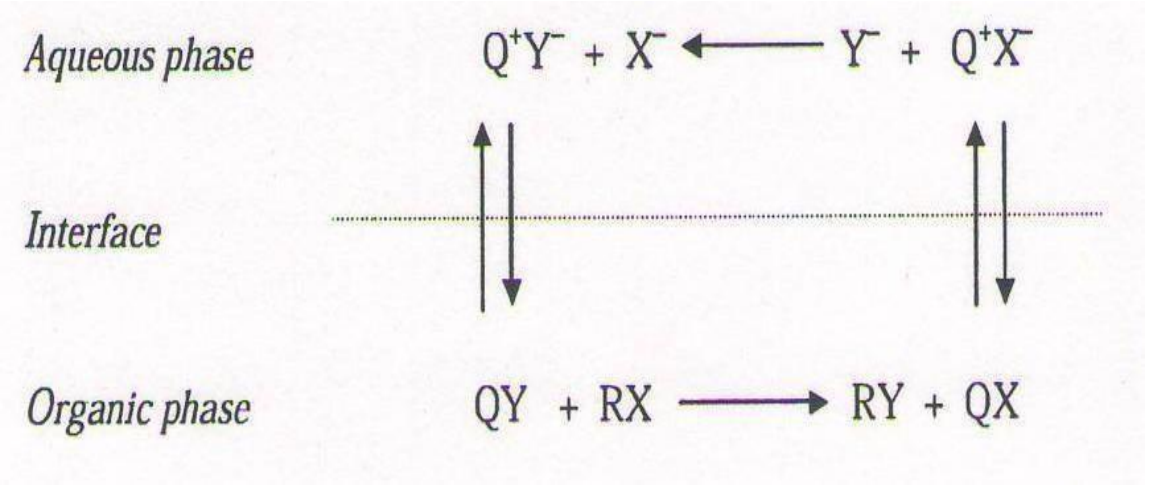


Figura 39. Interface do sistema fase aquosa/fase orgânica

5.3 Fluoração indireta e purificação

Ao optarmos por uma fluoração indireta foi necessário o uso de um grupo prostético que iria ligar o flúor nucleofílico a uma pequena unidade bifuncional reativa e subsequentemente acoplar este grupo prostético a molécula alvo. De uma forma geral o grupo fluoroetil apresenta propriedades estéricas próximas aos grupos etil e metil e é esperado que este grupo mantenha as propriedades farmacológicas do composto principal (Kniess et al, 2015).

O Fluoroetil tosilato é um dos reagentes mais utilizados para sínteses por apresentar benefícios como fácil preparação, baixa volatilidade, por ser quase estável e mostrar alta reatividade em correspondência com alguma quimiosseletividade (Shoultz et al, 2013). Apesar dos benefícios apresentados, alguns problemas são conhecidos quando trabalhamos com esse reagente, como a falta de seletividade quando uma molécula possui vários grupos amina e por possuir uma baixa pureza química devido a problemas na purificação do composto (Kniess et al, 2015), algo que pode ser visto neste trabalho.

Com base em estudos de análogos da melatonina vistos anteriormente, tanto quanto na literatura química, podemos admitir que fluorações diretas podem ser feitas facilmente nos sítios R7, R6, R5, R4 e R2 por causa do flúor na sua forma eletrofílica, porém quando trabalhamos com o flúor nucleofílico, os únicos grupos disponíveis para a substituição nucleofilica na melatonina é o indol e a amida. Apesar disso conforme observado na síntese de Silva & Snieckus, 1978 e nos estudos de Garcia et al, 2012, o grupo indol se mostra o preferencial para a entrada do grupo prostético para este tipo de síntese.

O baixo rendimento químico apresentado neste trabalho, 35% na síntese com hidreto de sódio, está relacionado a problemas com a purificação do produto, o que parece ser um problema recorrente na fluoração do grupo indol, Sun et al, 2011 apresentou um rendimento de 0,9% na sua síntese, Caillé et al, 2013 apresentou um rendimento de 1%, Shao et al, 2003 teve um rendimento de 8-11% e Bauman et al, 2011 com 35%

Outro fator que pode impactar no rendimento das sínteses é a base utilizada, para desprotonar o indol. É necessária uma base, relativamente forte, como visto na síntese no hidróxido de sódio onde não gerou produto, neste caso tivemos duas escolhas, aumentar a força da base, como feito na síntese com hidreto de sódio ou usar um catalisador para diminuir a energia de ativação e permitir a desprotonação do indol.

Apesar de apresentar um rendimento relativamente baixo, com 35%, a síntese se mostrou viável e sendo caracterizada ela servirá como padrão e ponto de partida para a reação com flúor -18 como pode ser visto na tentativa de síntese com 18F demonstrada neste trabalho.

6 CONCLUSÃO

Desenvolvemos duas rotas sintéticas para a produção de fluoroetil melatonina, ambas usando o mesmo princípio de fluoração indireta, utilizando o fluoroetil como grupo prostético. A rota por NaH se mostrou viável e que o grupo fluoroetil entrou na posição R1 da melatonina, enquanto a rota por CTF apresentou problemas que não permitiram comprovar a obtenção do produto completamente.

A rota sintética que utilizou CTF se mostrou problemática em relação á purificação, impossibilitando quantificar seu rendimento de forma adequada, em quanto a rota que usou hidreto de sódio demonstrou um bom rendimento e uma rota mais simples e rápida.

Com a molécula de fluoroetil melatonina sintetizada podemos partir para a próxima etapa e realizar a marcação da melatonina com 18F. Uma tentativa preliminar foi feita para marcação de 18F que se mostrou ineficaz, porém os dados obtidos na síntese da Fluoroetil melatonina serão fundamentais para os próximos passos da marcação com 18F.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

amarkin L, Danforth D, Lichter A . Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. Science, 216:1003–1005, 1982.

Anisimov, Vladimir et al. Melatonin as Antioxidant, Geroprotector and Anticarcinogen. Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1757, p. 573-589, 2006

Arangino, Serenella et al. Effects of Melatonin on Vascular Reactivity, Catecholamine Levels, and Blood Pressure on Healthy Man. The American Journal of Cardiology, Vol. 83, p. 1417- 1419, 1999.

Bauman, M. Piel, S. Höhnemann, A. Krauss, M. Jansen, C. Solbach, G. Dannhardt and F. Rösch, J. Labelled Compd. Radiopharm, 54, 645–656, 2011.

Armstrong, S.M. Melatonin: of mamals? In PINEAL Research Review Vol 7 Ed RJ Reiter, Liss New York, p 157-202, 1989.

Bailey, D; Humm, J; pokropek, A; Aswegen, A. Nuclear Medicine Physics: a handbook for teachers and students. Vienna: International Atomic Energy Agency, p. 49-71, 2014.

Bernard, Marianne; Donohue, Susan; Klein, David. Human hydroxyindole-O-methyltransferase in pineal gland, retina and Y79 retinoblastoma cells. Brain Research, Vol. 696, p. 37-48, 1995.

Barni S, Meregalli S, Fossati V, Cazzaniga M, Esposti D, et al. Modulation of cancer endocrine therapy bymelatonin: a phase II study of tamoxifen plusmelatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. Br J Cancer, 71(4):854-6, 1995.

Bertholet, R. and Hirsbrunner, P. Preparation of serotonin and derivatives. Europ. Pat. Off, 130 303 A1, 1985.

Blask DE, HillSM. Effects ofmelatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. J Neural Transm Suppl, 21:433-49, 1986.

Blask DE. Melatonin modulates growth factor activity in MCF-7 human breast cancer

cells. J Pineal Res., 17(1):25-32, 1994.

Blask D. E., Sleep Med. Rev, 13, 257, 2009.

Brooks SC, Locke ER, Soule HD. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. J Biol Chem., 248(17):6251-3, 1973.

Buck, D.; Förschler, A.; Lapa, C.; e cols. ^{18}F-FDG PET detects inflammatory infiltrates in spinal cord experimental autoimmune encephalomyelitis lesions. Journal of nuclear medicine, Vol. 53, N. 8 (Aug), p. 1269–76, 2012.

Burgess, Helen; Sharkey, Katherine; Eastman, Charmane. Bright light, dark and melatonin can promote circadian adaptation in night shift workers. Sleep Medicine Reviews, Vol. 6, N. 5, p. 407-20, 2002.

Bustamante-García, R., Lira-Rocha, A.S., Espejo-González, O., Gómez-Martínez, A.E.,Picazo, O.Anxiolytic-like effects of a new 1-N substituted analog ofmelatonin in pinealectomized rats. Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol.Psychiatry, 51, 133–139, 2014.

Bregani ER, Lissoni P, Rossini F, Barni S, Tancini G, Brivio F, et al. Prevention of interleukin-2-induced thrombocytopenia during the immunotherapy of cancer bya concomitant administration of the pineal hormone melatonin. Recenti Prog Med., 86(6):231-3, 1995.

Caillé F., T. J. Morley, A. A. S. Tavares, C. Papin, N. M. Twardy, D. Alagille, H. S. Lee, R. M. Baldwin, J. P. Seibyl, O. Barret and G. D. Tamagnan, Bioorg. Med. Chem. Lett., 23, 6243–6247, 2013

Cajochen, C.; Krauchi, K.; Wirz-Justice, A. Role of Melatonin in the Regulation of Human Circadian Rhythms and Sleep. Journal of Neuroendocrinology, Vol. 15, p. 432-37, 2003

Cardinali, Daniel; Pévet, Paul. Basic aspects of melatonin action. Sleep Medicine Reviews Vol., 2, N. 3, p. 175-90, 1998.

Cardinali, D. P.; Poeggeler, B.; Hardeland, R. Melatonin: Nature’s most versatile biological signal?, FEBS J. 273, 2813-2838, 2006.

Carvalo, Anita et al. Blood Pressure Response to Melatonin in type 1 diabetes. Pediatric Diabetes, N. 5, p. 26-31, 2004.

Cohen M, Lippman M, Chabner B. Role of pinealgland in aetiology and treatment of breast cancer, Lancet. ;2(8094):814-6, 1978.

Chen, J.J., Fiehn-Schulze, B., Brough, P.A., Snieckus, V., Firnau, G. Synthesis of2-iodo- and 2-phenyl-[11C]melatonin: potential PET tracers for melatoninbinding sites. Appl. Radiat. Isot., 49, 1573–1579, 1998.

Chirakal, R., Firnau, G., Garnett, E.Direct fluorination of melatonin with [18F]F2. J. Label. Compd. Radiopharm, 23, 1011–1020, 1986.

Collins A, Yuan L, Kiefer TL, Cheng Q, Lai L, Hill SM. Overexpression of the MT1 melatonin receptor in MCF-7 human breast cancer cells inhibits mammary tumor formation in nude mice. Cancer Lett, 189(1):49-57, 2003.

Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Differences between pulsatile or continuousexposure to melatonin on MCF-7 human breast cancer cell proliferation. Cancer Lett, 85(1):105-9, 1994.

Cotran, Ramzi; Kumar, Vinay; Collins, Tucker Patologia Estrutural e Funcional. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, p. 2-18, 2000.

Damont, A. , Hinnen, F. , Kuhnast, B. , Schöllhorn-Peyronneau, M. , James, M. , Luus, C. , Tavitian, B. , Kassiou, M. and Dollé, F. Radiosynthesis of [18F]DPA-714, a selective radioligand for imaging the translocator protein (18kDa) with PET. J Label Compd Radiopharm, 51: 286-292, 2008.

Dogliotti L, Berruti A, Buniva T. et al. Melatonin and human cancer. J Steroid Biochem Mol Biol., 37:983–987, 1990.

Dollins, Andrew et al. Effects of indu cing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature and performance. Proc. Natl. Sci. USA., Vol. 91, p.1824-28, 1994.

Dollins, Andrew et al. Effects of indu cing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature and performance. Proc. Natl. Sci. USA. Vol. 91, p.1824-28, 1994.

Dubocovich, M. I., Cardinali, D. P., Delagrange, P., et al. In: The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification. 2nd ed. Girdlestone, D. (ed.).,IUPHAR Media: London, 2009.

Duranti, E., Stankov, B., et al. 2-bromomelatonin: synthesis and characterization of a potent melatonin agonist. Life Science, Vol. 51, pp479-485, 1992

Duranti, E.; Stankov, B.; Spadoni, G.; Duranti, A.; Lucini, V.; Capsoni, S.; Biella, G.;

Fraschini, F.2-Bromomelatonin: Synthesis and characterization of a potent melatonin agonist. Life Sci., 51, 479–485, 1992.

Ekmekcioglu, Cem et al. The Melatonin Receptor Subtype MT2 is Present in the Human Cardiovascular System. Journal of Pineal Research, Vol. 35, p. 40-44, 2003.

Elsinga, PH., Synthesis and evaluation of [^{18}F] fluoroethyl SA4503 as a PET ligand for the sigma receptor. Synapse, 43(4):259–67, 2002.

Epstein, Franklin. Melatonin on Humans. The New England Journal of Medicine. Vol. 336, N. 3, p. 186-95, 1997.

Faust R, Garratt PJ, Trujillo Perez MA, Piccio VJ, MadsenC, Stenstrom A, Frolund B, Davidson K, Teh MT,Sugden D. 7-substituted-melatonin and7-substitued-1-methylmelatonin analogues: Effect ofsubstituents on potency and binding affinity.Bioorg MedChem;15:4543–4551, 2007.

Feng Z, C. Qin, Y. Chang and J. T. Zhang, Free Radical Biol. Med., 40, 101, 2006.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International Journal of Cancer, Geneve, v. 136, n. 5, p.359-386, 2015.

Flaugh A., M. E., Parli J. and Sawyer B. D. Inhibition of luteinizing hormone release and ovulation by 6-chloro and 6-fluoromelatonin. Neuroemh and crinology 30, 8, 1980.

Frohn M. A., Seaborn C. J., Johnson D. W., Philippou G.,Seamark R. F. and Matthews C. D. Structureactivity relationships of melatonin analogues. Life Sci. 27,2043, 1980.

Fujieda, H.; Hamadanizadeh, S.; Wankiewicz, E,; Pang, S.; Brown, G. Expression of MT1 Melatonin Receptor in Rat Retina: Evidence for Multiple Cell Targets for Melatonin. Neuroscience. Vol. 93, N. 2, p.793-99, 1999.

Gonçalves Ndo N, ColomboJ, LopesJR, Gelaleti GB, Moschetta MG, Sonehara NM, Hellmén E, Zanon Cde F, Oliani SM and Zuccari DA: Effect of melatonin in epithelial mesenchymal transition markers and invasive properties of breast cancer stem cells of canine and human cell lines. PLoS One11: e0150407, 2016.

Gorfine, Tali; Zisapel, Nava. Melatonin and the Human Hippocampus, a Time Dependant Interplay. J. Pineal Res. Vol. 43, p. 80-86, 2007.

Grant SG, Melan MA, Latimer JJ, Witt-Enderby PA. Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. Expert Rev Mol Med

11:e5, 2009.

Grossman, Ehud et al. Melatonin Reduces Night Blood Pressure in Patients with Nocturnal Hypertension. The American Journal of Medicine. Vol. 119, p. 898-902, 2006.

Hack L. M., S. W. Lockley, J. Arendt and D. J. Skene, J. Biol. Rhythms, 18, 420, 2003

HARRIS, J.M. and WANSER, C. C.; Fundamentals of Organic Reaction Mechanisms; New York: Wiley&Sons, - cap. 4., 1976.

Haddadi, Gholamhassam et al. Radioprotective Effect of Melatonin in the Cervical Spine Cord in Irradiated Rats. Cell Journal. Vol. 14, N. 4, p. 246-53, 2013.

Hing-Sing, Yu. Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Applications. CRC PRESS, 1992.

Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. N Engl J Med.,339(14):974-84, 1998.

Horwitz KB, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor. JBiol Chem., 253(7):2223-8, 1978.

Instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva, Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil: 1. Ed. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

ldo, V., T,, Wolf A. P., Fowler J. S., MacGregor R. R. and Ruth T. J. Anhydrous F-18 labelled elemental fluorine for radiopharmaceutical preparation.J. Nucl. Med. 21, 750, 1980.

Jan JE, Reiter RJ, Wasdell MB, Bax M.The role of the thalamus in sleep, pineal melatonin production, and circadian rhythm sleep disorders. J Pineal Res 46:1–7, 2009.

Jablonska k, Pula B Zemla A et al. Expression of Melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. J. Pineal Res, 54:334-345, 2013.

Kniess, T., Laube, M., Brust, P., Steinbach, J.2-[18F]Fluoroethyl tosylate – a versatile tool for building 18F-based radiotracers for positron emission tomography. Med. Chem. Commun, 6, 1714–1754, 2015.

Kinker, Gabriela, M., Sueli, et al, Melatonergetic system-based two-gene index is prognostic in human gliomas. J.Pineal Res., 60:84-94, 2016.

Koivula, T. Development of radiosynthesis methods for ^{18}F-labelled radiopharmaceuticals. University of Helsinki, Faculty of Science, Department of Chemistry, Laboratory of Radiochemistry, Helsinki, Finland, 2011.

Konturek, S.J.; Konturek, P.C.; Brzozowski, T.; Bubenik, G.A. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. J. Physiol. Pharmacol., 58 (Suppl. 6), 23–52, 2007.

Kopp C, Vogel E, Rettori M, Delagrange P, Misslin R. Anxiolytic-like properties of melatonin receptor agonist in mice: involvement of MT1 and/or MT2 receptors in the regulation of emotional responsiveness. Neuropharmacology, 39:1865–71, 2000.

Kowalsky, R.J and Falen, S.W. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine. Second Edition. American Pharmacists Association, Washington, D.C., 2004.

Laudon, M.; Zisapel, N. Characterization of central melatonin receptors using 125I-melatonin.FEBS Lett.,197, 9–12, 1986.

Lambrecht R. M., Neirinckx R. and Wolf A. P. (1978/Cyclotron isotopes and radiopharmaceuticals- XXIll.Novel anhydrous ~SF-fluorinating intermediates. Int..L Appl. Radiat. lsot. 29, 175, 1978.

LeBars, D., Luthra, S. K., Pike, V. W. and Luu Duc,C. The preparation of a carbon-11 labelledneurohormone, [11C]melatonin.Appl. Radiat. Isot.38,1073±1077, 1987

LeBars, D., Luthra, S. K., Pike, V. W. and Kirk, K.L. Radiosynthesis of NCA [carbonyl-11C]6-Øuor-omelatonin.Appl. Radiat. Isot.39,287±290, 1988.

LeBars, D., Thivolle, P., Vitte, P. A., Bojkowski, C.,Chazot, G., Ahrendt, J., Frakowiak, R. S. J. andClaustrat, B. PET and plasma pharmacokineticstudies after bolus intravenous administration of[11C]melatonin in humans.Nucl. Med. Biol.18,357±362, 1991.

Legros C, Devavry S, Caignard S, et al. Melatonin MT_1 and MT_2 receptors display different molecular pharmacologies only in the G-protein coupled state. Br J Pharmacol,171(1):186–201, 2014.

Lerner, Aaron; Case, James; Takahashim, Yoshiyata. Isolation of Melatonin and 5- Methoxyindole-3-acetic Acid From Bovine Pineal Glands. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 235, N. 7, p. 1992-97, 1960.

Liu, Ren et al. Biodistribution, pharmacokinetics and PET Imaging of [^{18}F]FMISO,

[^{18}F]FDG and [^{18}F]FAc in a sarcoma- and inflammation-bearing mouse model. Nuclear Medicine and Biology. Vol. 36, p. 305-12, 2009.

Lissoni P, BarniS, Brivio F, Rossini F, FumagalliL,Ardizzoia A, et al. A biological study on the efficacy of low-dose subcutaneous interleukin-2 plus melatonin in the treatment of cancer-related thrombocytopenia. Oncology, 52(5):360-2, 1995.

Lissoni P, Barni S, Cazzaniga M, Ardizzoia A, Rovelli F, Brivio F, et al. Efficacyof the concomitant administration of the pineal hormone melatonin in cancer immunotherapy with low-dose IL-2 in patients with advanced solid tumorswho had progressed on IL-2 alone. Oncology, 51(4):344-7, 1994.

Lissoni P, Brivio F, Barni S, Tancini G, Cattaneo G, Archili C, et al. Neuroimmunotherapy of human cancer with interleukin-2 and the neurohormone melatonin: its efficacy in preventing hypotension. Anticancer Res.,10(6):1759-61, 1990.

Lissoni P, Malugani F, Malysheva O, KozlovV, Laudon M, Conti A, et al. Neuroimmunotherapy of untreatable metastatic solid tumors with subcutaneous low-dose interleukin-2, melatonin and naltrexone: modulation of interleukin-2-induced antitumor immunity by blocking the opioid system. Neuro endocrinol Lett., 23(4):341-4, 2002.

Lissoni P, Barni S, Tancini G.et al.Clinical study of melatonin in untreatable advanced cancer patients Tumori, 73475–480, 1987.

Lira-Rocha A, Espejo-González O, Naranjo-Rodríguez EB. Receptor-binding studies of 1-N substituted melatonin analogues. European Journal of MedicalChemistry, 37:945–51, 2002.

LUCCHESE, Angélica Maria; MARZORATI, Liliana. Catálise de transferência de fase. Quím. Nova, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 641-652, out. 2000.

Lundmark, Per et al. Role of Melatonin in the Eye and Ocular Dysfunctions. Visual Neuroscience. Vol. 23, p. 853-862, 2006.

Mcchi, M; Bruce, Jeffrey. Human Pineal Physiology and Functional Significance of Melatonin. Frontiers in Neuroendocrinology. Vol. 25, p. 177-95, 2004.

Olcese J. M., C. Cao, T. Mori, M. B. Mamcarz, A. Maxwell, M. J. Runfelt, L. Wang,C. Zhang, X. Lin, G. Zhang and G. W. Arendash, J. Pineal Res., 47, 82, 2009.

Pappolla M. A, Y. J. Chyan, B. Poeggeler, B. Frangione, G. Wilson, J. Ghiso and R. J. Reiter, J. Neural Transm., 107, 203, 2000

Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. J Pineal Res. 14(1):1-10, 1993.

Mayo, RM, JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: Differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. Cell Mol Life Sci., 60:1407-1426, 2003.

Mihandoost, Ehsan; Shirazi, Alireza; Mahdavi, Seied; Aliasgharzadeh, Akbar. Can Melatonin Help Us in Radiation Oncology Treatments? BioMed Research International. p. 1-12, 2014.

Mosca, Rodrigo et al An Athymic Mouse Model To Mimic Cobalt-60 Cutaneous Radiation Injury. 2013 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013, 2013.

Neto, Julio; Scaldaferri. Melatonina e Cancer – Revisão de Literatura. Revista Brasileira de Cancerologia, Vol. 51 N.1, p. 49-58, 2005.

Nowak, Jerzy; Kurawska, Ewa; Zawilska, Jolanta. Melatonin and its generating system in vertebrate retina: circadian rhythm, effect of environmental lighting and interaction with dopamine. Neurochem Int. Vol. 14, N. 4, p. 397-404, 1989.

Ortega-Pijeira, M.S. e Bernardes, E. Radiosynthesis of 18F-Fluoroethyl losartan as a novel AT1R PET imaging radioligand in Oncology. XXV Congreso ALASBIMN. II Encuentro Latinoamericano de Radiofármacia, 2015.

OSMUND DE SILVA and VICTORS NIECKUS. Indole N-alkylation of tryptamines via dianion and phthalimido intermediates. New potential indolealkylamine haptens. Can. J. Chem, 56, 1621, 1978

Pandi-Perumal, Seithikurippu et al. Physiological Effects of Melatonin: Role of Melatonin Receptors and Signal Transduction Pathways. Progress in Neurobiology. Vol. 85, p. 335-53, 2008.

Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and sig¬nal transduction pathways. Prog Neurobiol, 85: 335-53, 2008.

Pennant M, Takwoingi Y, Pennant L, Davenport C, Fry-Smith A. A systematic review of positron emission tomography (PET) and positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) for the diagnosis of breast cancer recurrence. Health Technol Assess, 14(50), 2010.

PittalisS, Rovelli F, Vigore L, Roselli MG, Brivio F. Interleukin-2, melatonin and

interleukin-12 as a possible neuroimmune combination in the biotherapy of cancer. JBiol Regul Homeost Agents, 9(2):63-6, 1995.

Sharma, R, C. R. McMillan, C. C. Ten and L. P. Niles, Brain Res., 1068, 230, 2006.

Reiter RJ, Robinson J. Melatonin: your body's natural wonder drug. NewYork: Bantam Books; 1995.

Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatoninreceptors step into the light: Cloning and classification ofsubtypes.Trends Pharmacol Sci, 17:100–102, 1996.

Rivera-Bermudez, M. A., Masana, M. I., Brown, G. M.,Earnest, D. J., and Dubocovich, M. L. Brain Res. 1002, 21–27, 2004.

Rivara, S.; Mor, M.; Silva, C.; Zuliani, V.; Vacondio, F.; padoni, G.; Bedini, A.; Tarzia, G.; Lucini, V.; Pannacci, M.; Fraschini, F.; Plazzi, P. V. J. Med. Chem., 46, 1429–1439, 2003.

Rossouw, D., Langenhoven, J., Improved radio-synthesis of 2-[123I]iodomelatonin. Appl. Radiat. Isot. 45,902–905, 1994.

Gobbi S, G. Unveiling the role of melatonin MT2 recep¬tors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: a novel target in psychopharmacology. J Psychiatry Neurosci, 39: 6-21, 2014.

Schneider JE, Browning MM, Zhu X, Eneff KL, Floyd RA. Characterization of hydroxyl free radical mediated damage to plasmid pBR322 DNA. Mutat Res., 214(1):23-31, 1989.

Schoultz Bent W, Reed Brian, Marton Jánes. A fully automated radiosynthesis of [^{18}F]Fluoroethyl-diprenorphine on a single module by use os SPE cartridges for preparation of high quality 2-[^{18}F]Fluoroethyl tosylate. Molecules, 18,7271-7278, 2013.

Slaugenhaupt SA, Roca AL, Liebert CB, Altherr MR,Gusella JF, Reppert SM. Mapping of the gene for theMel1a-melatonin receptor to human chromosome 4(MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a).Genomics, 27:355–35, 1995.

Spadoni G, Bedini A, Orlando P, Lucarini S, Tarzia G, Mor M, et al. Bivalent ligand approach on N-{2-[(3 methoxyphenyl)methylamino]ethyl}-acetamide: synthesis, binding

affinity and intrinsic activity for MT1 and MT2 melatonin receptors. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 19:4910–6, 2011.

Sun, R, G. Tang, H. Tian, X. Wang, X. Chen, Z. Chen and S. C. Wang, Appl. Radiat. Isto., 70, 676–680, 2012.

Shao X, E. R. Butch, M. R. Kilbourn and S. E. Snyder, Nucl. Med. Biol., 30, 491–500, 2003.

Srinivasan, V., D. W. Spence, S. R. Pandi-Perumal, I. Trakht and D. P. Cardinali, Travel Med. Infect. Dis., 6, 17, 2008.

THOM, A.F. Comunicação pessoal. São Paulo-SP, 2008.

TierneyLMJ, McPheeSJ, Papadakis MA, editors. Current medical diagnosis & treatment. 42nd ed. New York: McGraw-Hill, 2003.

Vico, Antonio, et al. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. Current Opinion on in Investigational Drugs. Vol. 7, N. 5, p. 423-31, 2006.

Vijayalaxmi et al. Melatonin as a Radioprotective Agent: A Review. Int. J. Radiation Biol. Phys. Vol. 59, N. 3, p. 639-53, 2004.

Vijayalaxmi, Reiter RJ, Herman TS, Meltz ML, Melatonin reduces gamma-radiation-induced primary DNA damage in human blood lymphocytes. Mutat Res, 347:203-208, 1998.

Zepeda-Velazquez C, Lira-Rocha AS. Obtencion de derivados 1-N-Sustituidos de melatonina. Revista del Centro de Investigacion. Universidad La Salle., 7:49–68, 2007.

ZIESSMAN J.H, H.A., Medicina Nuclear. 2a ed. Rio de Janeiro:

Guanabara Koogan, 2003.

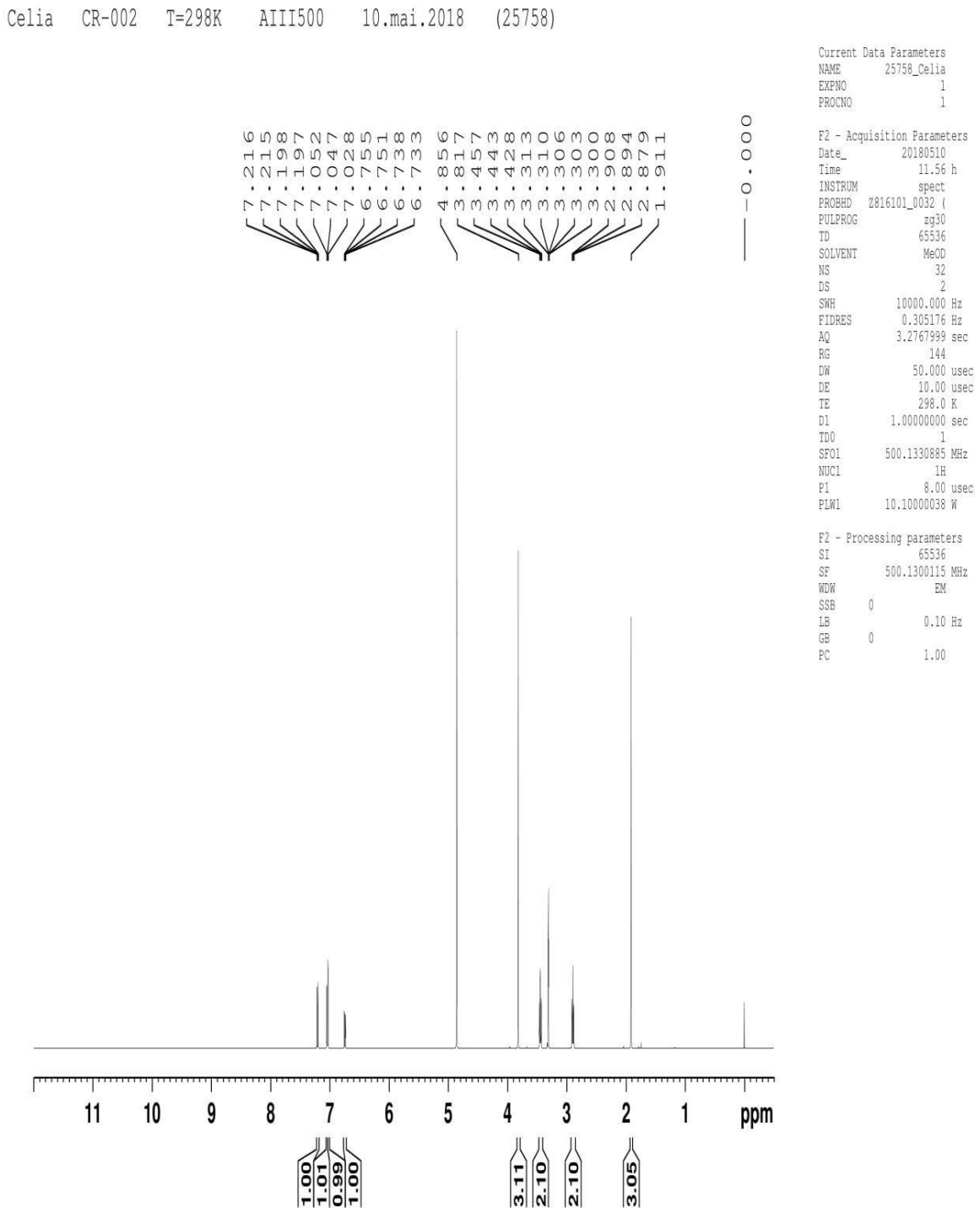
Wade, I. Ford, G. Crawford, A. D. McMahon, T. Nir, M. Laudon and N. Zisapel, Curr. Med. Res. Opin, 23,2597, 2007.

Webb, M., Manuel, P.-D. Role of melatonin in health and disease. Clinl.Endocrinol., 42, 221–234, 1995.

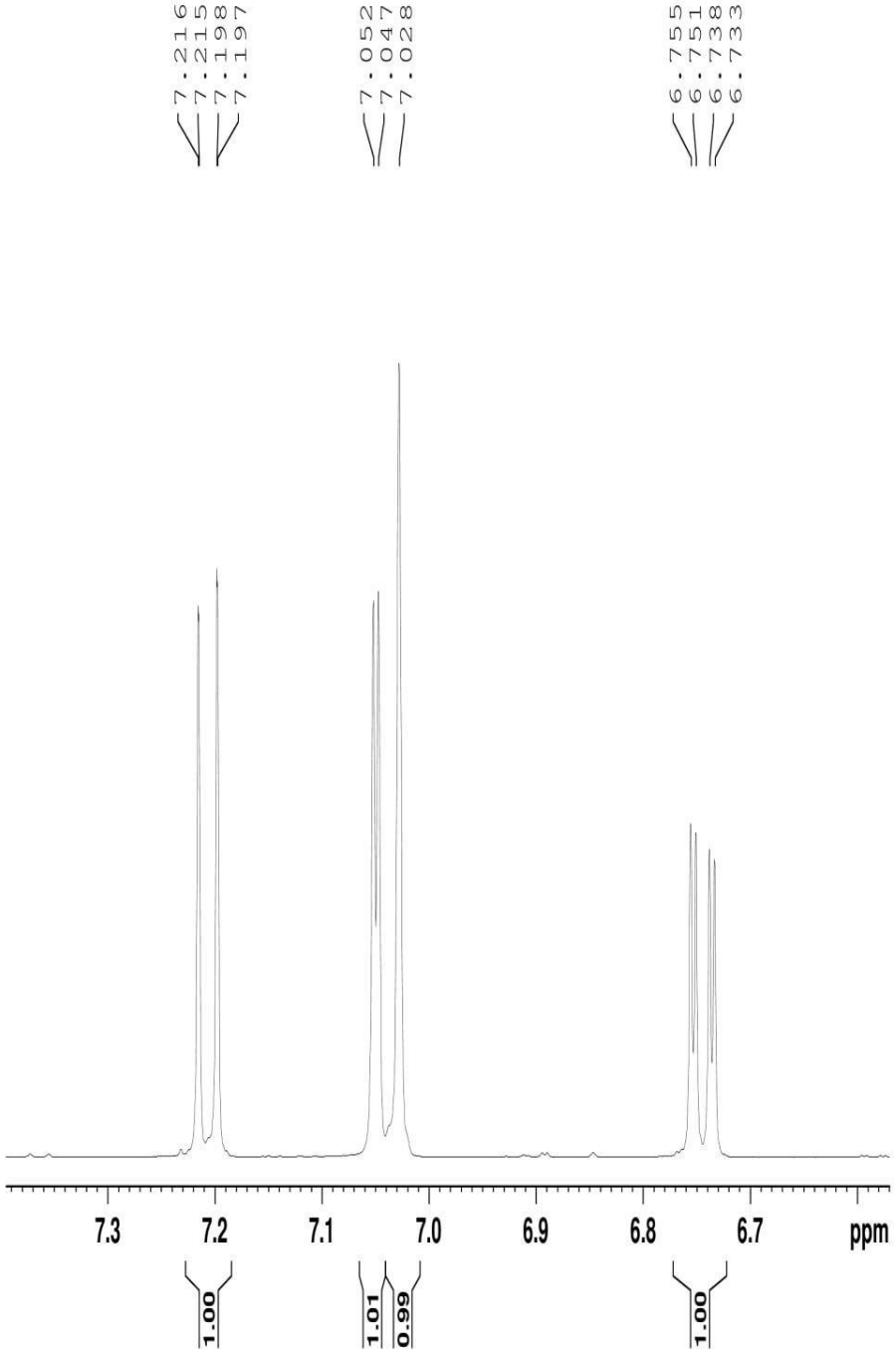
Wiechmann, Allan; Bok, Dean; Horwitz. Localization of Hydroxyindole-O-Methyltranferase in the Mammalian Pineal Gland and Retina. Investigative Ophthalmology & Visual Science Vol. 26, N. 3, p. 253-65, 1985.

Yu S. Review of ^{18}F-FDG synthesis and quality control. Biomedical Imaging and Intervention Journal REVIEW ARTICLE, 2(4):e57, 2006.

8. APÊNDICE A – Espectros de ^{1}H RMN da Melatonina



Celia CR-002 T=298K AIII500 10.mai.2018 (25758)

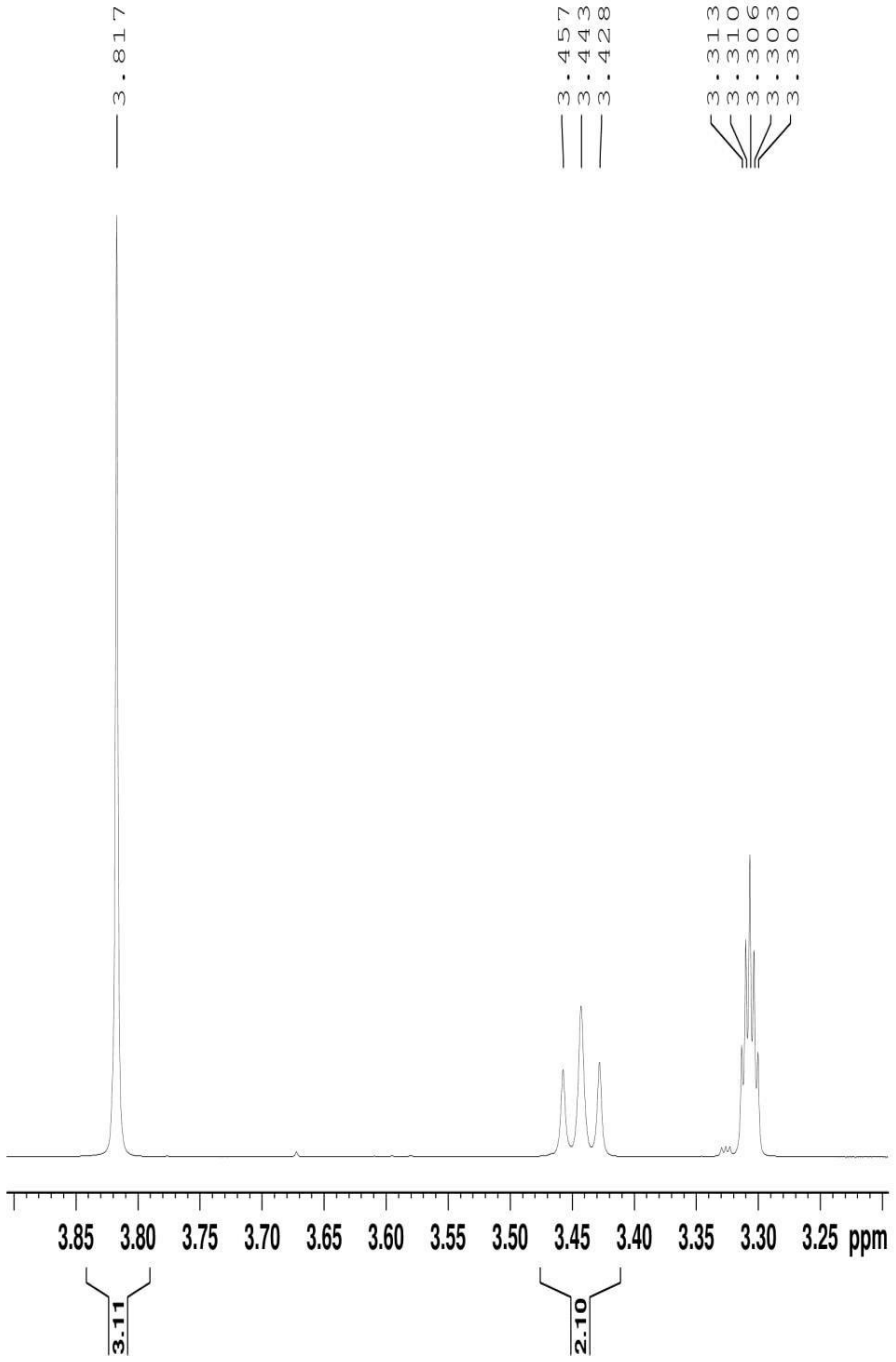


Current Data Parameters
NAME 25758_Celia
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180510
Time 11.56 h
INSTRUM spect
PROBHD Z816101_0032 (
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 2
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.305176 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 144
DW 50.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
SFO1 500.1330885 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PLW1 10.10000038 W

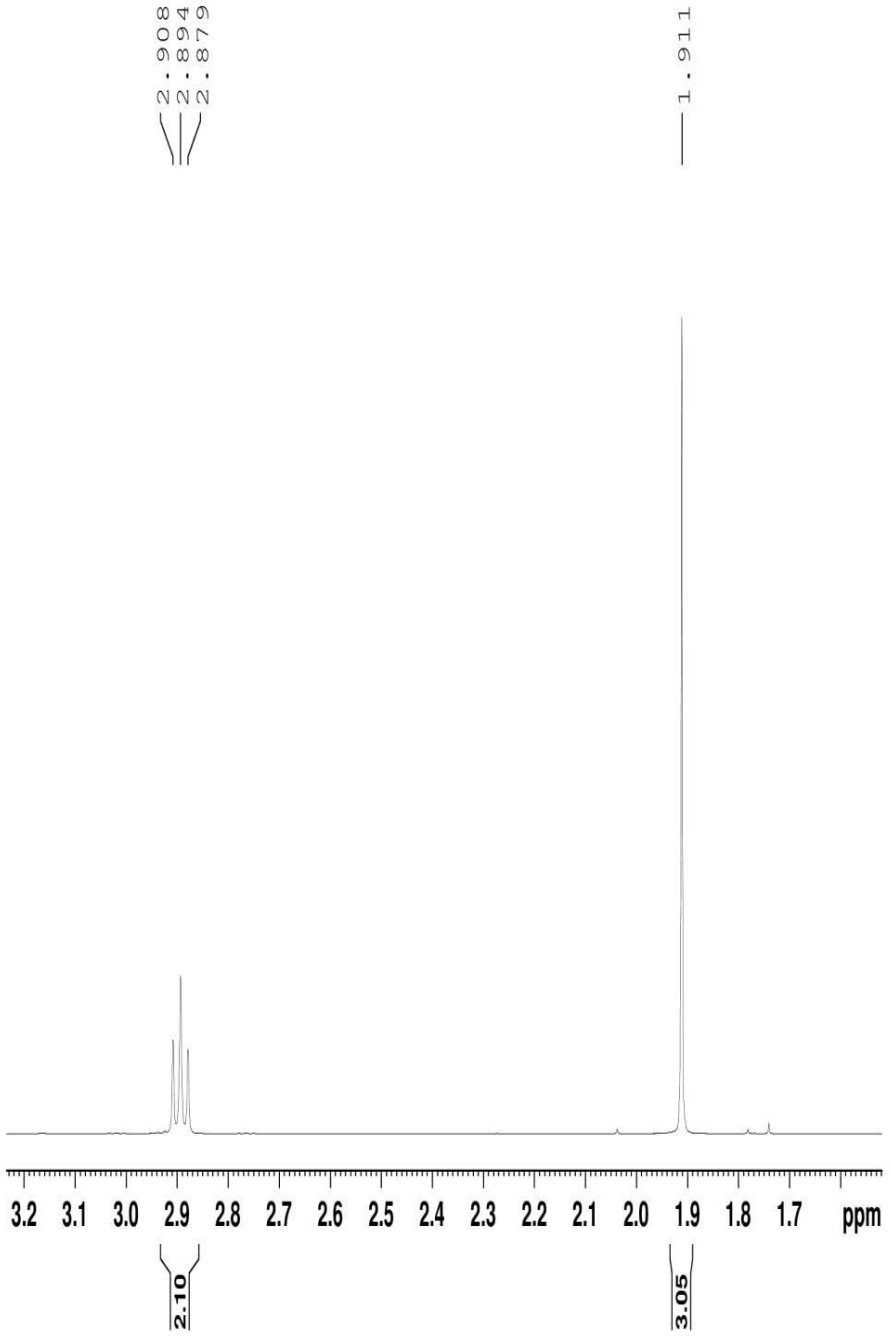
F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1300115 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

Celia CR-002 T=298K AIII500 10.mai.2018 (25758)



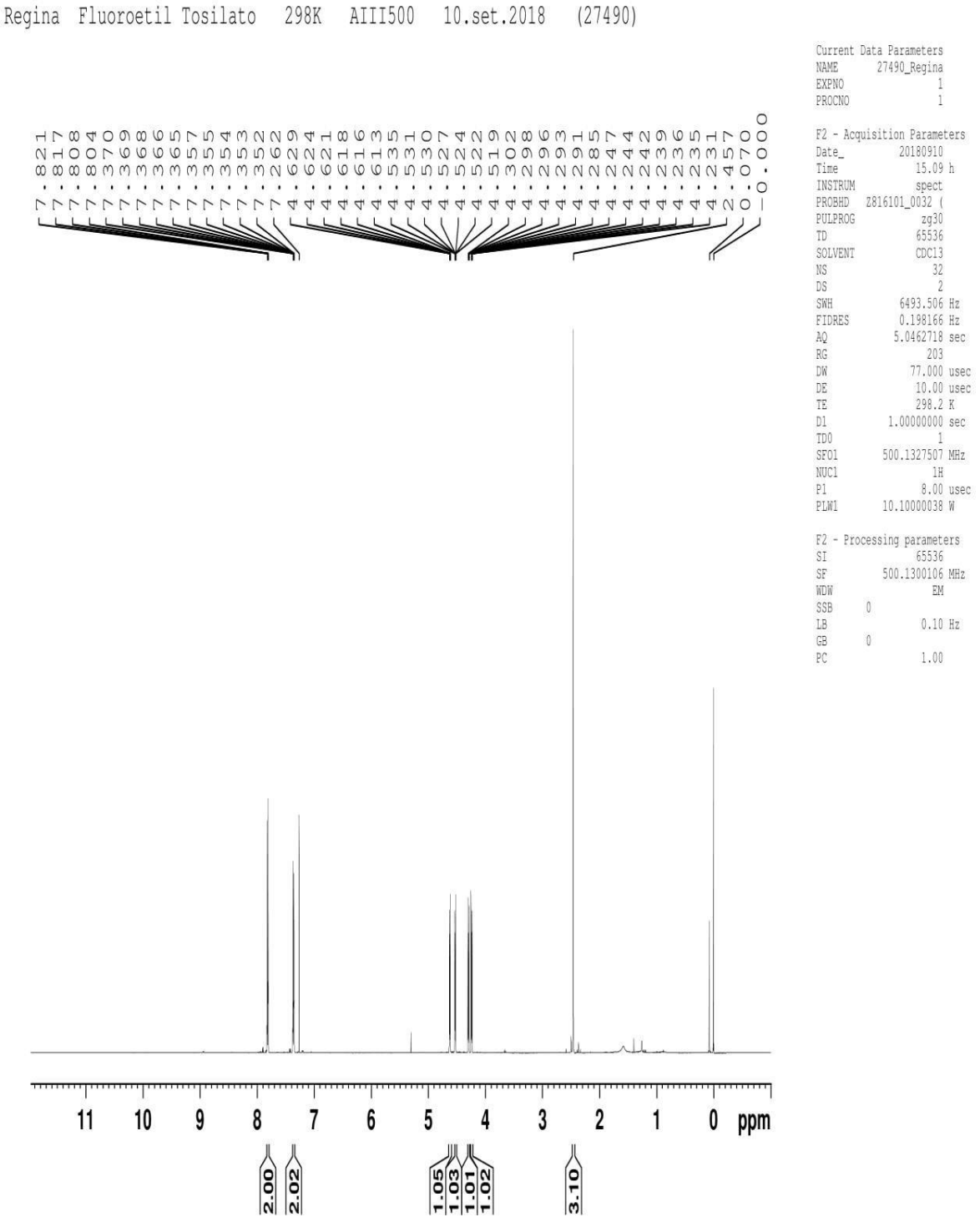

```
Current Data Parameters
NAME        25758_Celia
EXPNO                 1
PROCNO                1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20180510
Time             11.56 h
INSTRUM          spect
PROBHD   Z816101_0032 (
PULPROG            zg30
TD                65536
SOLVENT            MeOD
NS                   32
DS                    2
SWH           10000.000 Hz
FIDRES         0.305176 Hz
AQ            3.2767999 sec
RG                  144
DW               50.000 usec
DE               10.00 usec
TE               298.0 K
D1           1.00000000 sec
TD0                   1
SFO1        500.1330885 MHz
NUC1                 1H
P1                8.00 usec
PLW1        10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI                65536
SF          500.1300115 MHz
WDW                  EM
SSB      0
LB                0.10 Hz
GB       0
PC                1.00
```

Celia CR-002 T=298K AIII500 10.mai.2018 (25758)

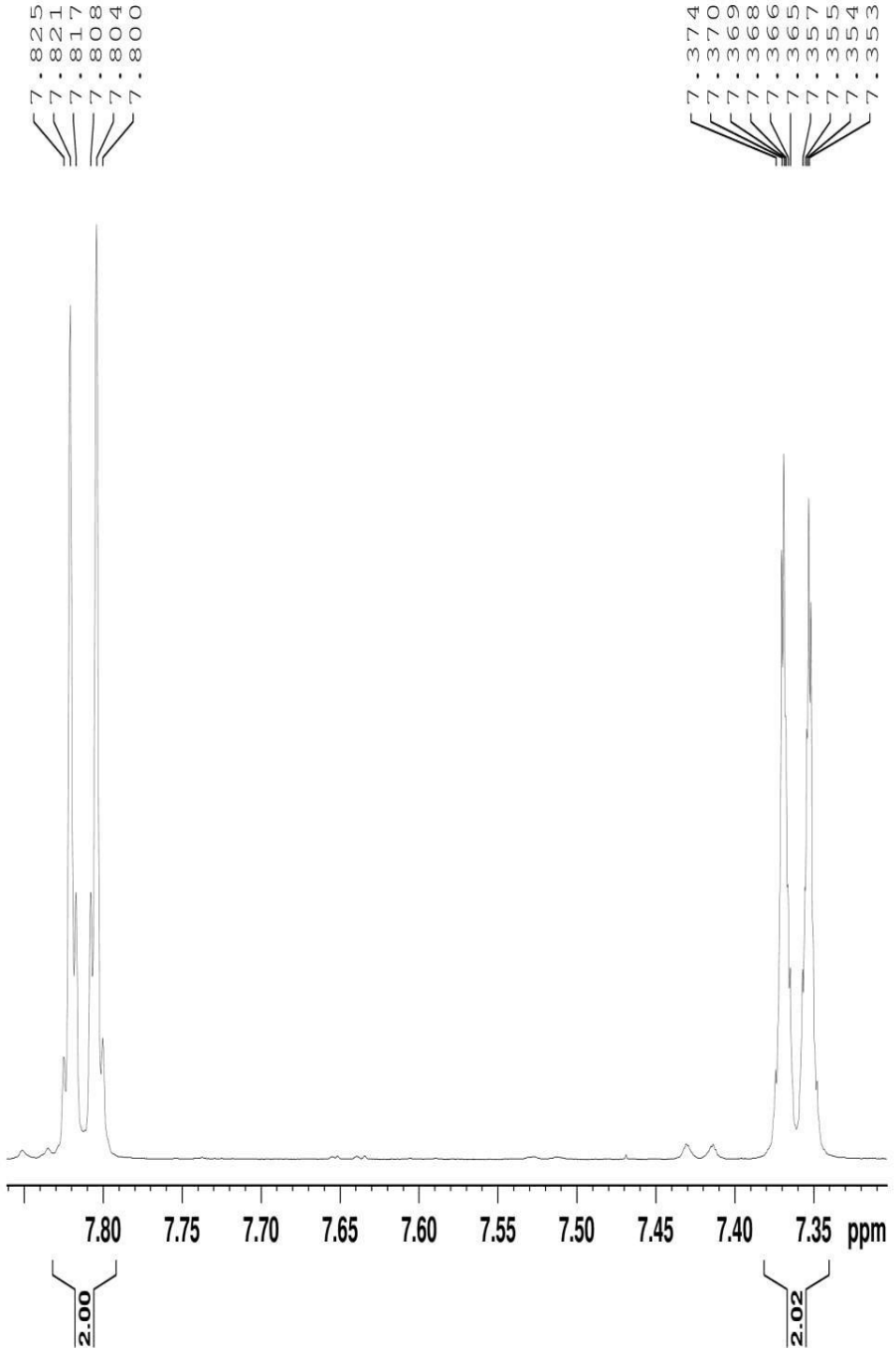



```
Current Data Parameters
NAME        25758_Celia
EXPNO                 1
PROCNO                1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20180510
Time             11.56 h
INSTRUM           spect
PROBHD   Z816101_0032 (
PULPROG            zg30
TD                65536
SOLVENT            MeOD
NS                   32
DS                    2
SWH           10000.000 Hz
FIDRES         0.305176 Hz
AQ            3.2767999 sec
RG                  144
DW               50.000 usec
DE               10.00 usec
TE               298.0 K
D1           1.00000000 sec
TD0                   1
SFO1        500.1330885 MHz
NUC1                 1H
P1                8.00 usec
PLW1        10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI                65536
SF          500.1300115 MHz
WDW                  EM
SSB      0
LB                0.10 Hz
GB       0
PC                1.00
```

9. APÊNDICES B – Espectros de ^{1}H RMN de Fluoroetil tosilato

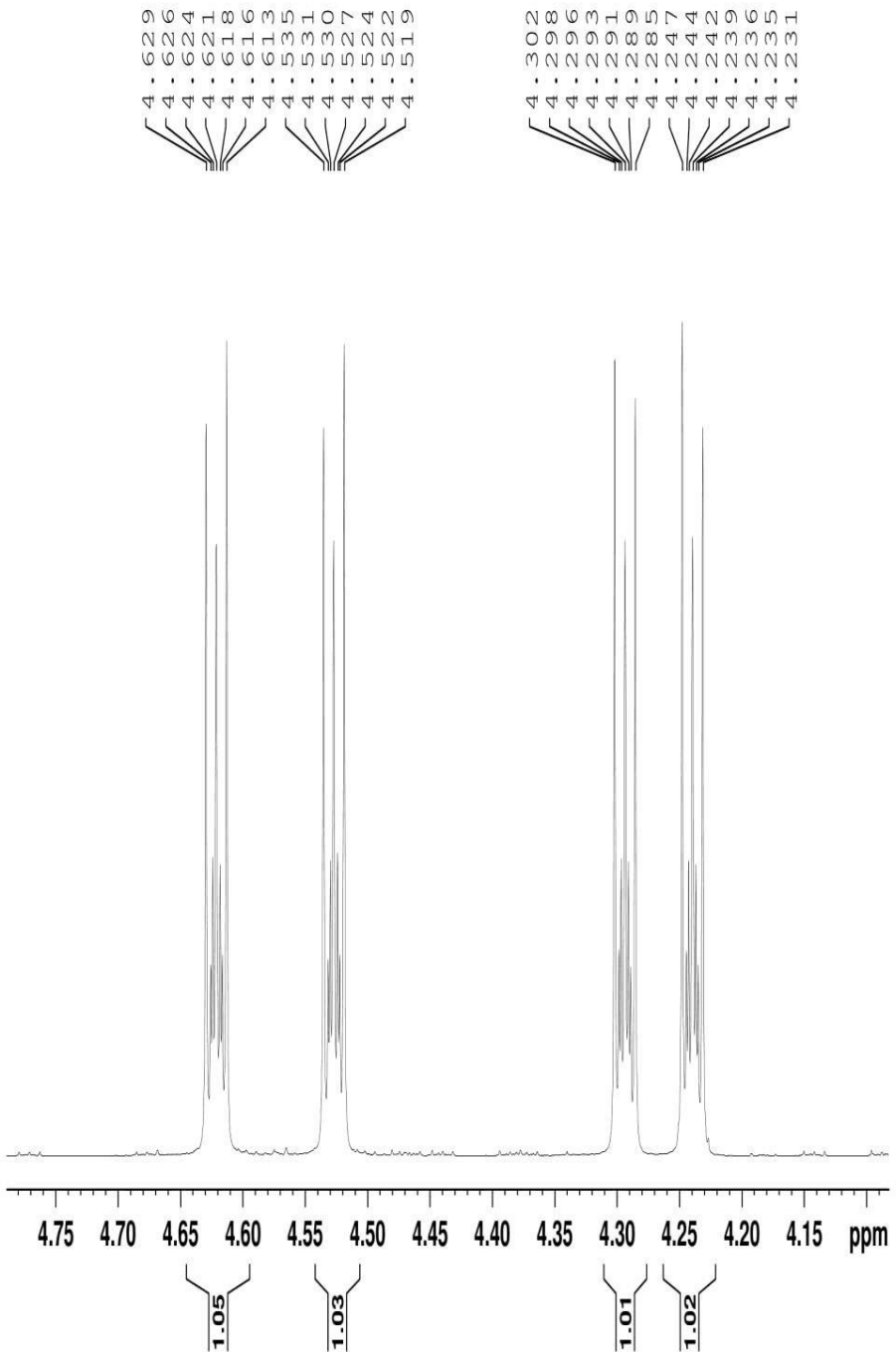


Regina Fluoroetil Tosilato 298K AIII500 10.set.2018 (27490)




```
Current Data Parameters
NAME       27490_Regina
EXPNO                 1
PROCNO                1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20180910
Time             15.09 h
INSTRUM          spect
PROBHD   Z816101_0032 (
PULPROG           zg30
TD               65536
SOLVENT          CDCl3
NS                  32
DS                   2
SWH           6493.506 Hz
FIDRES        0.198166 Hz
AQ           5.0462718 sec
RG                 203
DW              77.000 usec
DE              10.00 usec
TE              298.2 K
D1          1.00000000 sec
TD0                  1
SFO1       500.1327507 MHz
NUC1                1H
P1                8.00 usec
PLW1       10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI               65536
SF         500.1300106 MHz
WDW                 EM
SSB      0
LB               0.10 Hz
GB       0
PC               1.00
```

Regina Fluoroetil Tosilato 298K AIII500 10.set.2018 (27490)

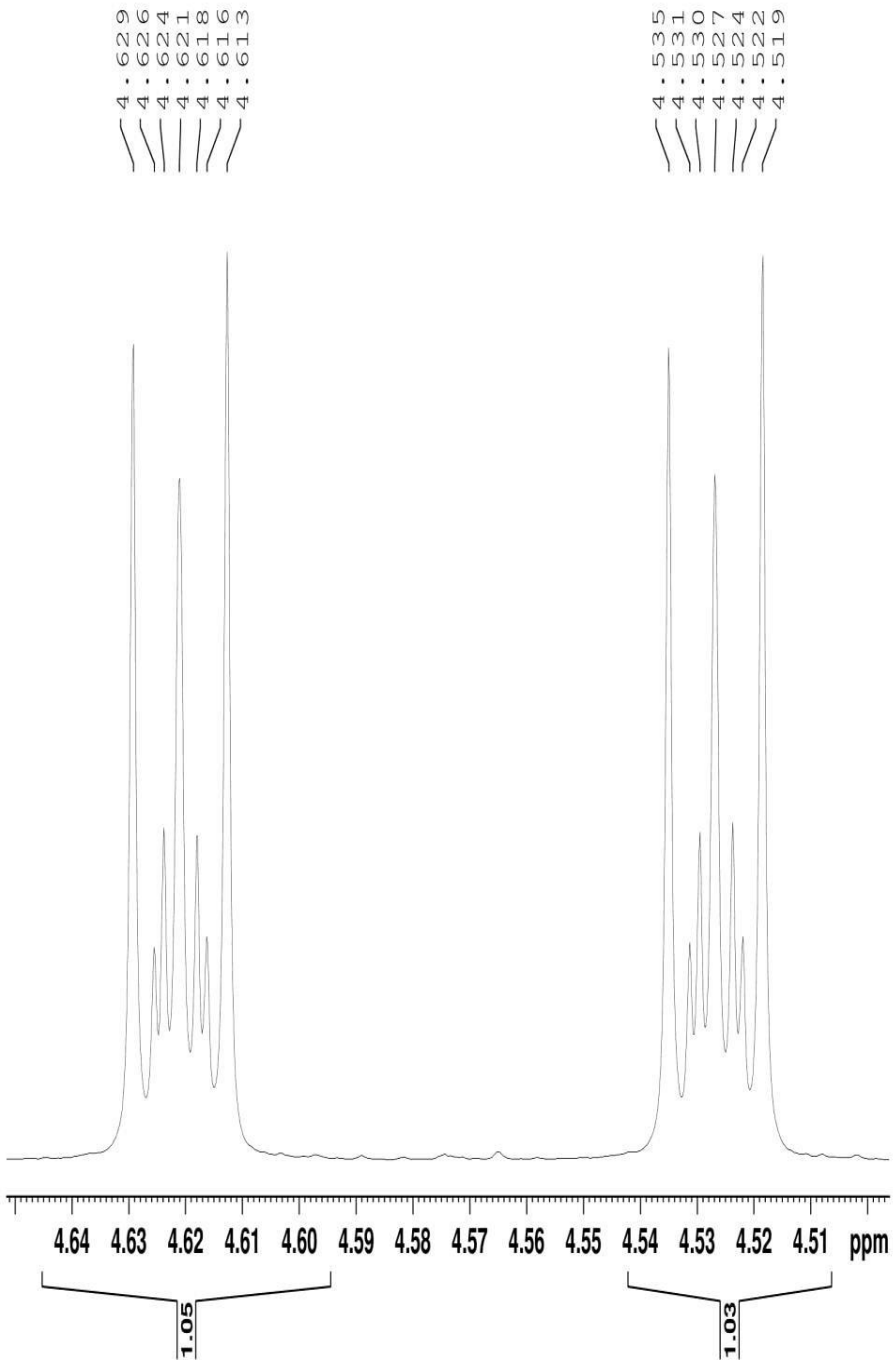


Current Data Parameters
NAME 27490_Regina
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180910
Time 15.09 h
INSTRUM spect
PROBHD Z816101_0032 (
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 32
DS 2
SWH 6493.506 Hz
FIDRES 0.198166 Hz
AQ 5.0462718 sec
RG 203
DW 77.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
SFO1 500.1327507 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PLW1 10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1300106 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

Regina Fluoroetil Tosilato 298K AIII500 10.set.2018 (27490)

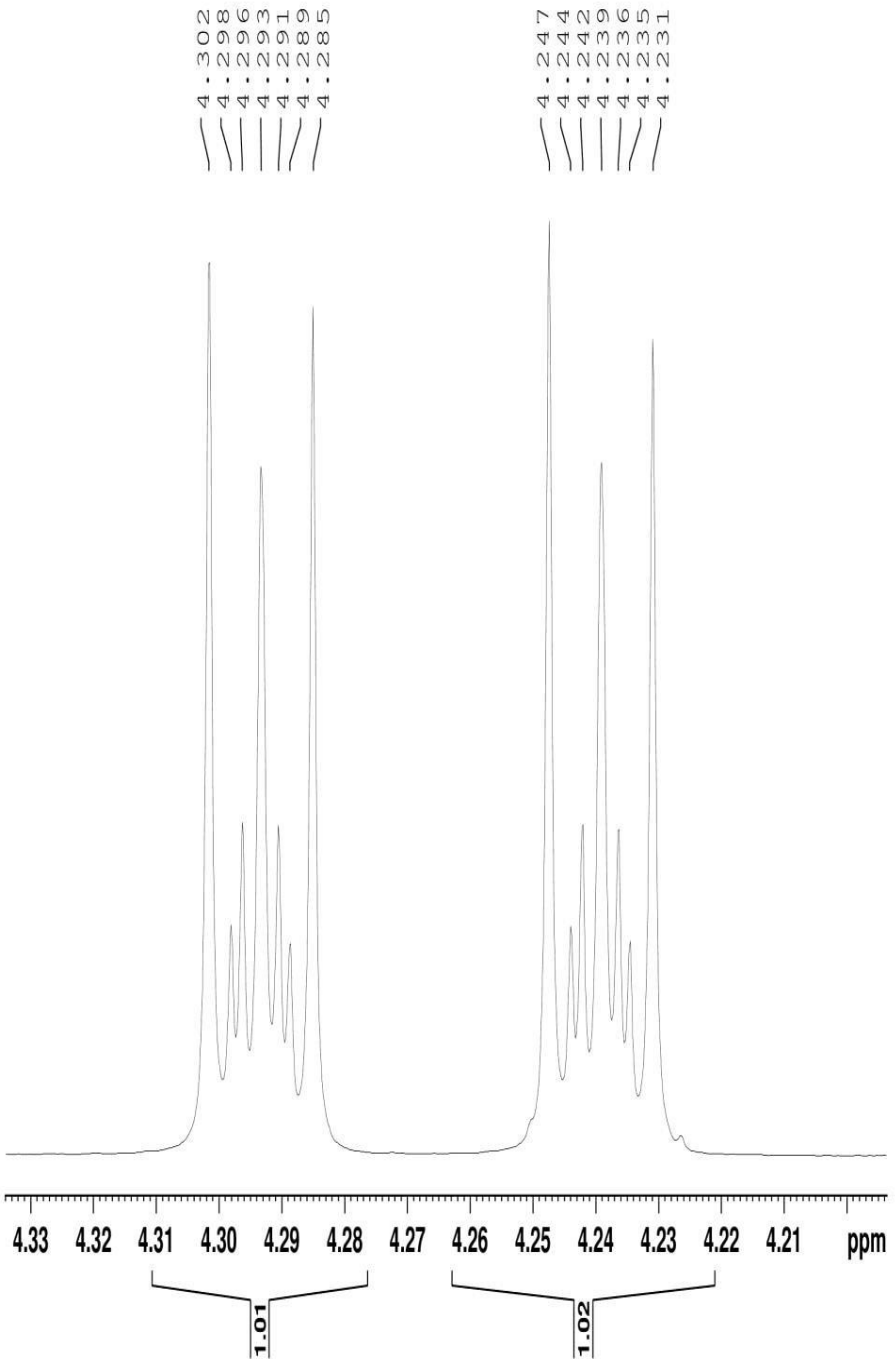


Current Data Parameters
NAME 27490_Regina
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180910
Time 15.09 h
INSTRUM spect
PROBHD Z816101_0032 (
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 32
DS 2
SWH 6493.506 Hz
FIDRES 0.198166 Hz
AQ 5.0462718 sec
RG 203
DW 77.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
SFO1 500.1327507 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PLW1 10.10000038 W

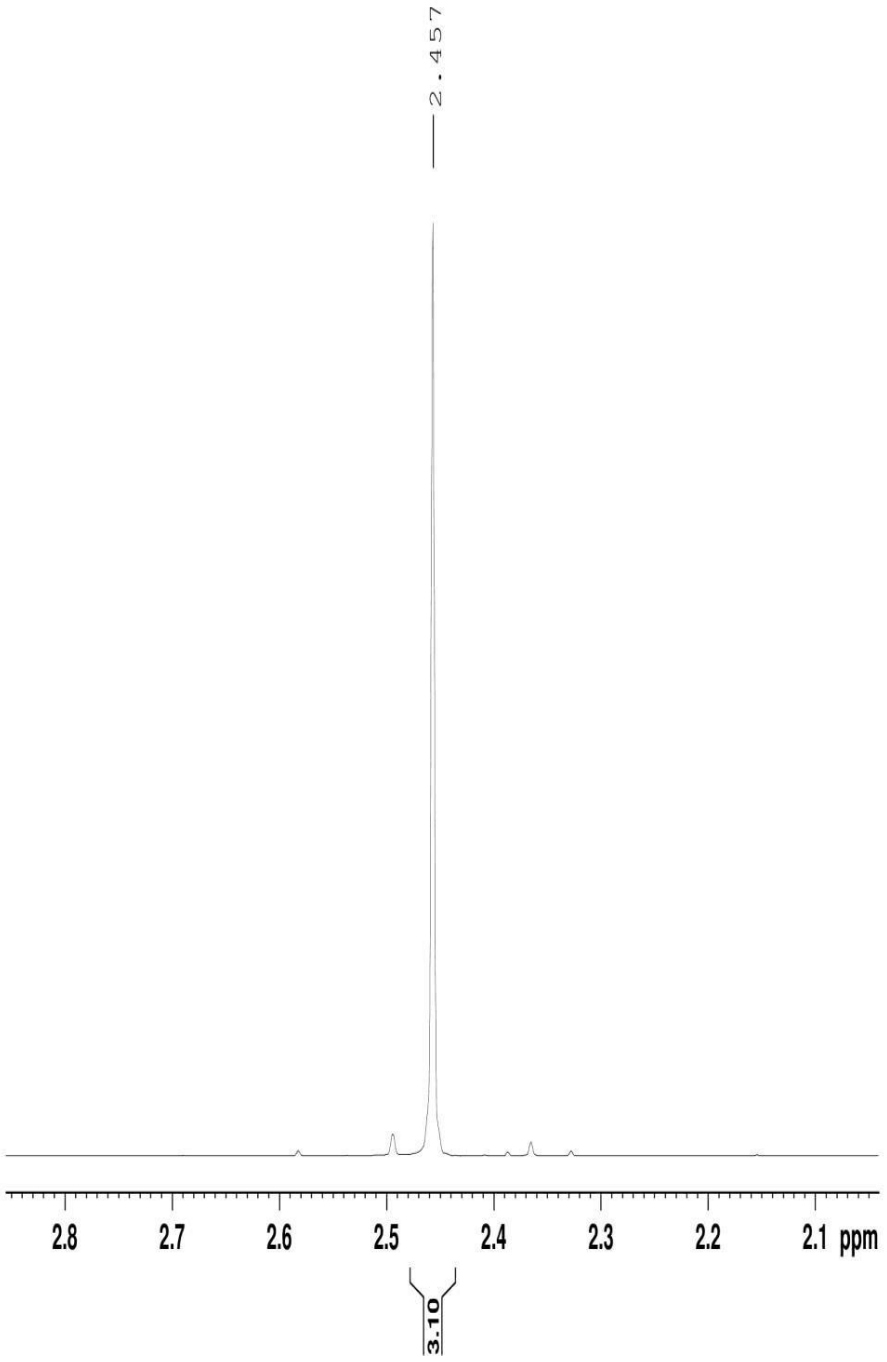
F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1300106 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

Regina Fluoroetil Tosilato 298K AIII500 10.set.2018 (27490)



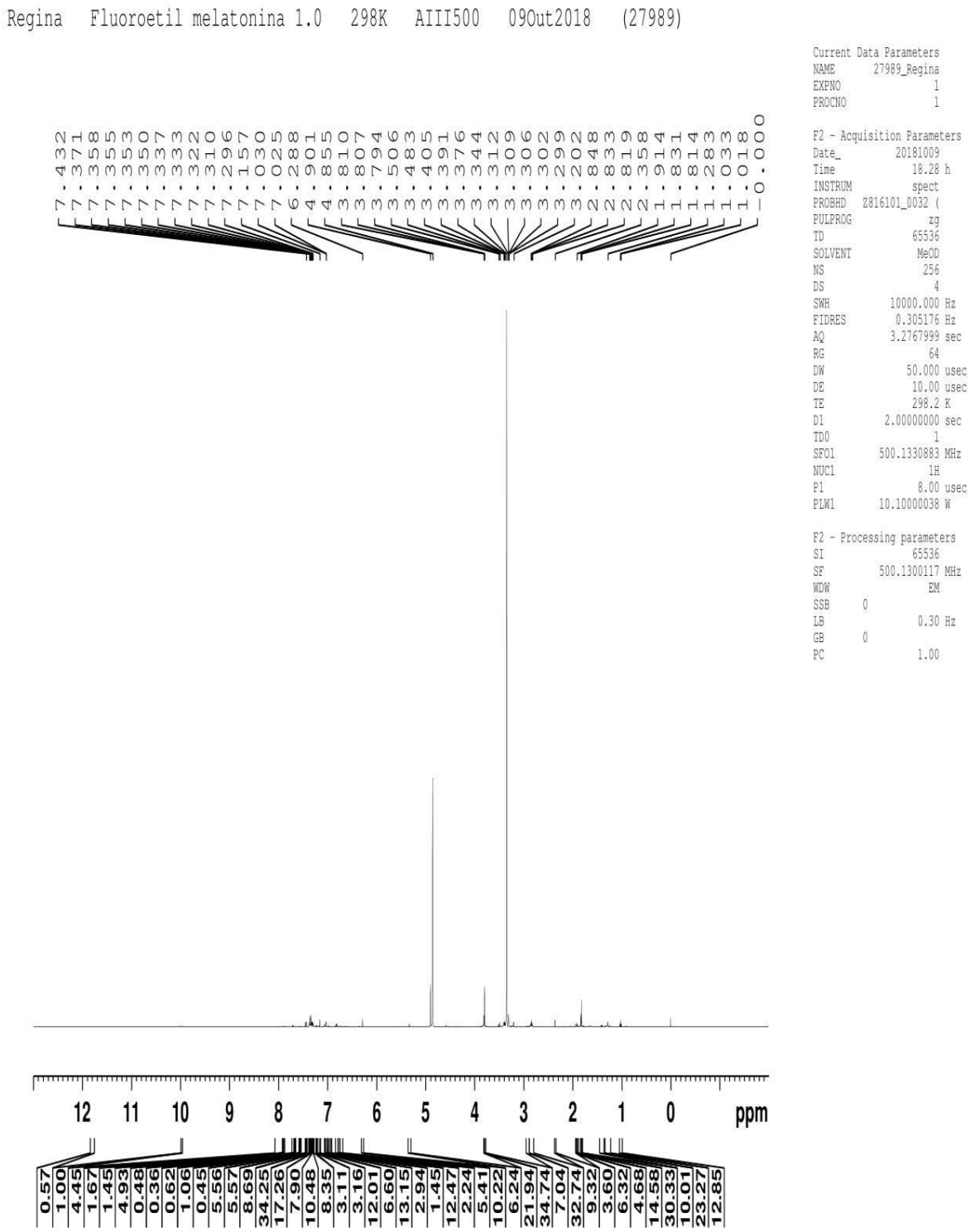

```
Current Data Parameters
NAME       27490_Regina
EXPNO                 1
PROCNO                1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20180910
Time             15.09 h
INSTRUM          spect
PROBHD   Z816101_0032 (
PULPROG            zg30
TD                65536
SOLVENT           CDCl3
NS                   32
DS                    2
SWH           6493.506 Hz
FIDRES        0.198166 Hz
AQ           5.0462718 sec
RG                  203
DW              77.000 usec
DE              10.00 usec
TE              298.2 K
D1          1.00000000 sec
TD0                   1
SFO1       500.1327507 MHz
NUC1                 1H
P1                8.00 usec
PLW1       10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI                65536
SF         500.1300106 MHz
WDW                  EM
SSB      0
LB                0.10 Hz
GB       0
PC                1.00
```

Regina Fluoroetil Tosilato 298K AIII500 10.set.2018 (27490)

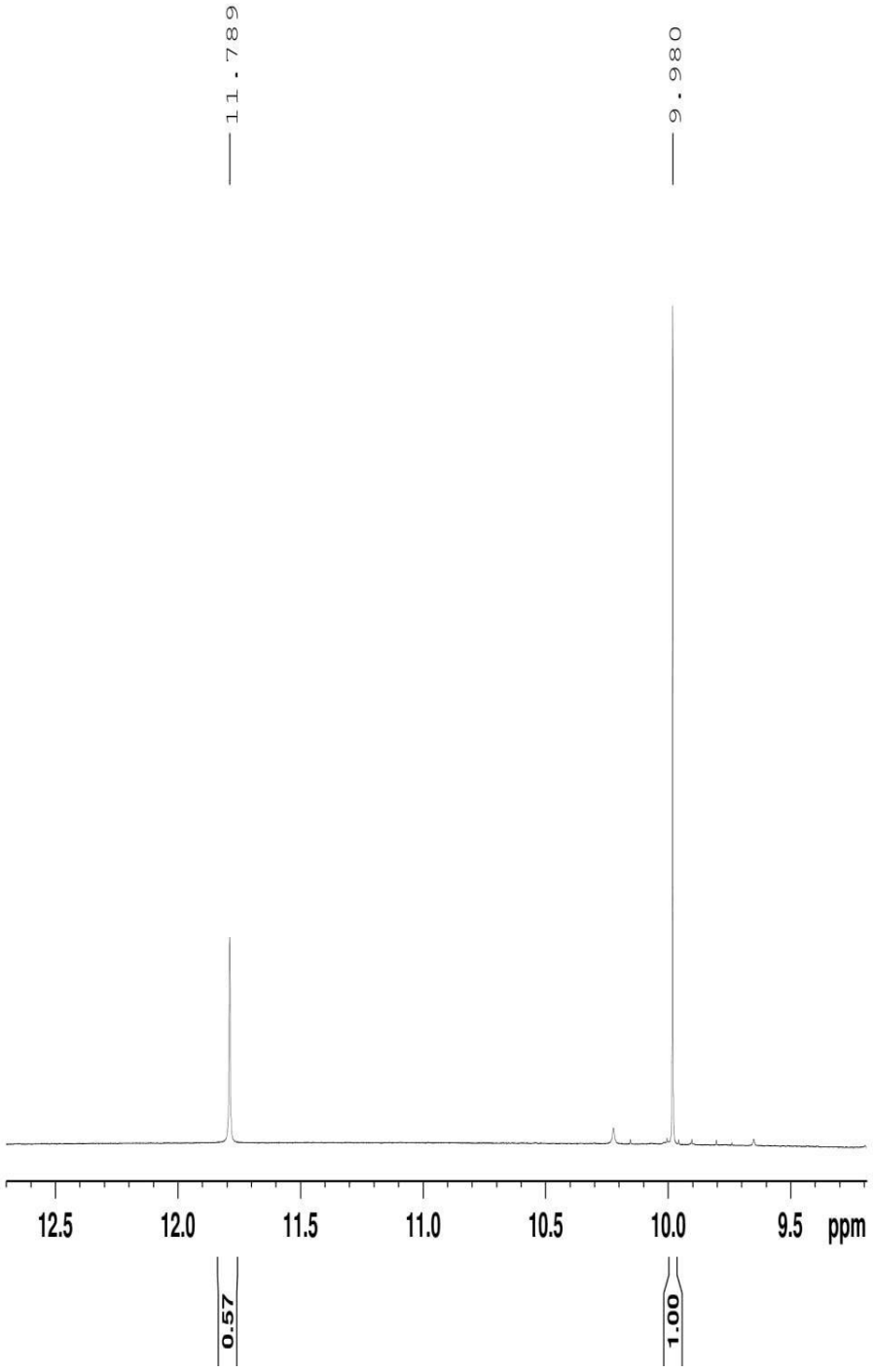



```
Current Data Parameters
NAME        27490_Regina
EXPNO                  1
PROCNO                 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20180910
Time              15.09 h
INSTRUM           spect
PROBHD   Z816101_0032 (
PULPROG            zg30
TD                65536
SOLVENT           CDCl3
NS                   32
DS                    2
SWH            6493.506 Hz
FIDRES         0.198166 Hz
AQ            5.0462718 sec
RG                  203
DW               77.000 usec
DE               10.00 usec
TE               298.2 K
D1           1.00000000 sec
TD0                   1
SFO1        500.1327507 MHz
NUC1                 1H
P1                8.00 usec
PLW1        10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI                65536
SF          500.1300106 MHz
WDW                  EM
SSB      0
LB                0.10 Hz
GB       0
PC                1.00
```

10. APÊNDICES C – Espectros de ^{1}H RMN da síntese de fluoroetil melatonina por CTF

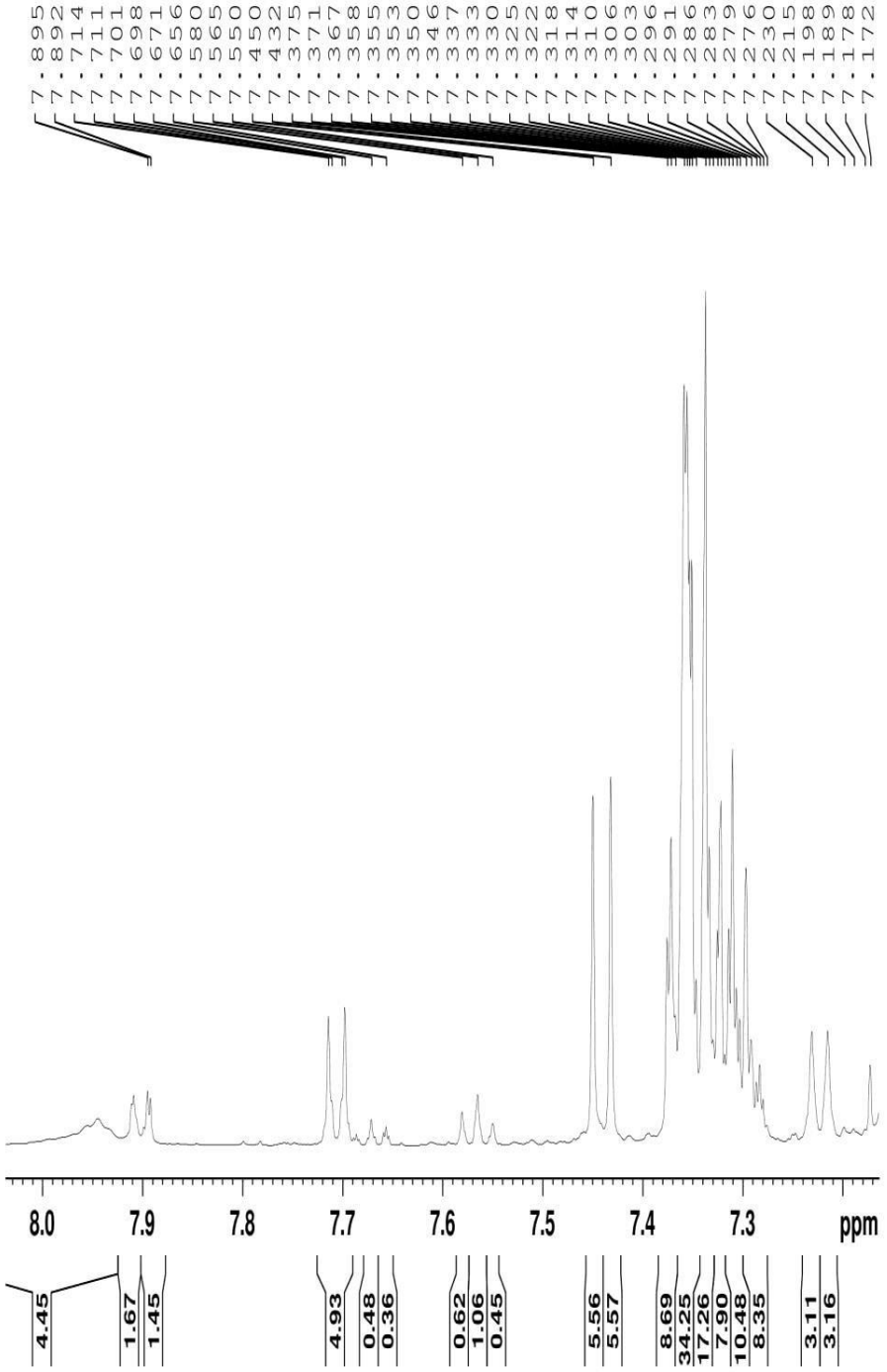


Regina Fluoroetil melatonina 1.0 298K AIII500 09Out2018 (27989)




```
Current Data Parameters
NAME        27989_Regina
EXPNO                  1
PROCNO                 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20181009
Time              18.28 h
INSTRUM           spect
PROBHD   Z816101_0032 (
PULPROG              zg
TD                65536
SOLVENT            MeOD
NS                   256
DS                     4
SWH           10000.000 Hz
FIDRES         0.305176 Hz
AQ            3.2767999 sec
RG                    64
DW               50.000 usec
DE               10.00 usec
TE               298.2 K
D1           2.00000000 sec
TD0                    1
SFO1        500.1330883 MHz
NUC1                  1H
P1                 8.00 usec
PLW1        10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI                65536
SF          500.1300117 MHz
WDW                  EM
SSB      0
LB                 0.30 Hz
GB       0
PC                 1.00
```

Regina Fluoroetil melatonina 1.0 298K AIII500 09Out2018 (27989)

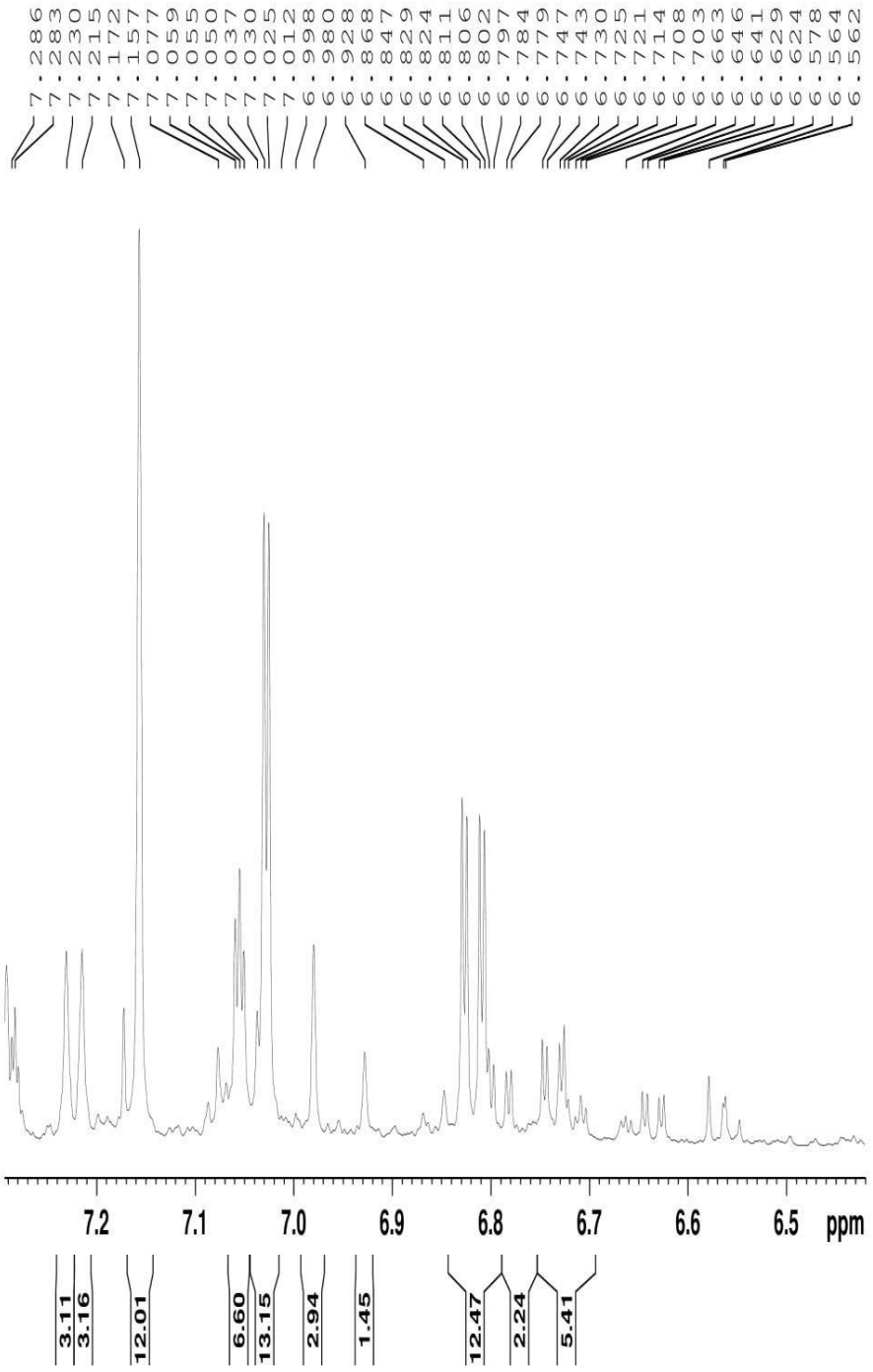


Current Data Parameters
NAME 27989_Regina
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20181009
Time 18.28 h
INSTRUM spect
PROBHD Z816101_0032 (
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 256
DS 4
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.305176 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 64
DW 50.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D1 2.00000000 sec
TD0 1
SFO1 500.1330883 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PLW1 10.10000038 W

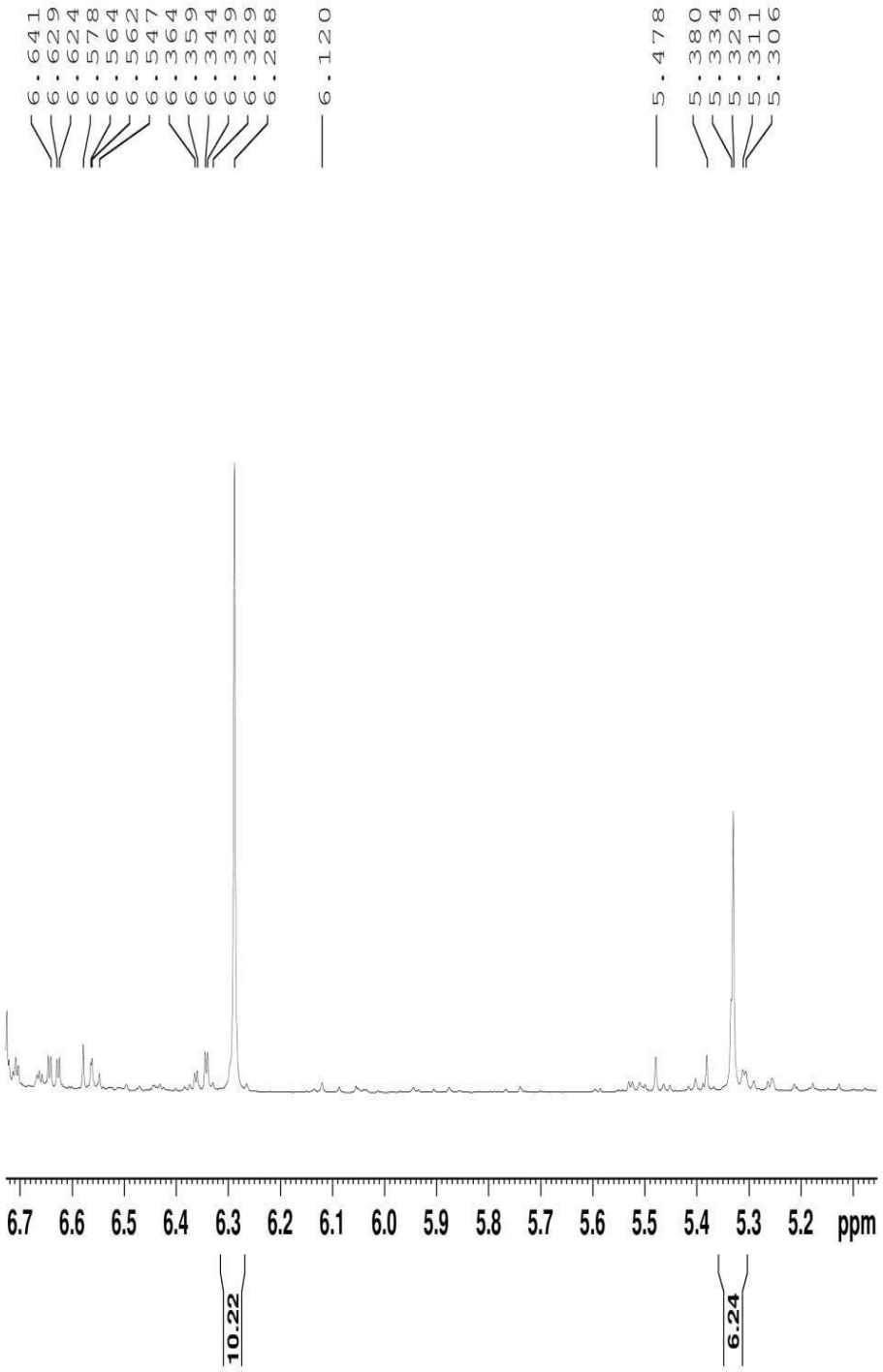
F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1300117 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Regina Fluoroetil melatonina 1.0 298K AIII500 09Out2018 (27989)



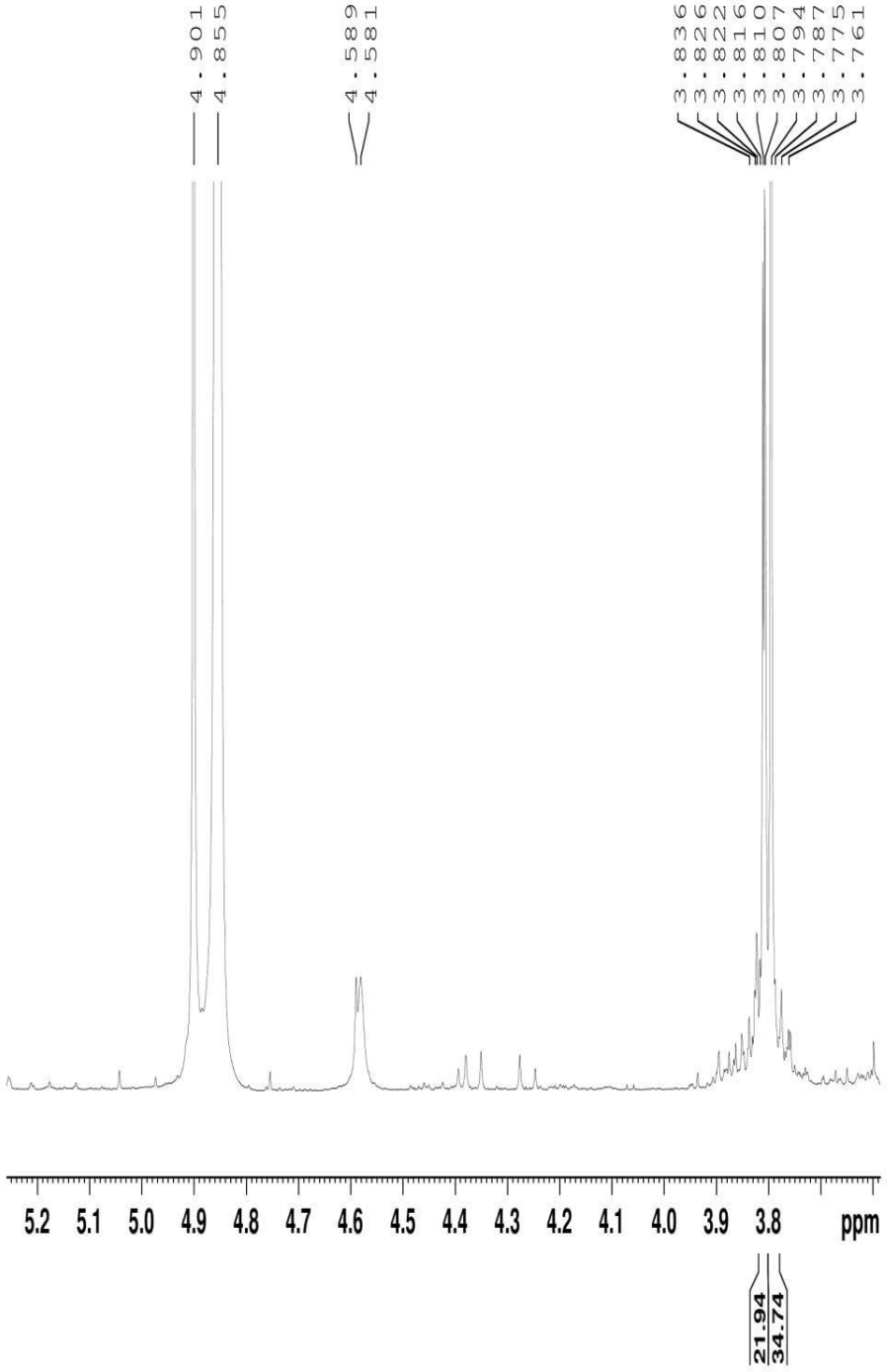

```
Current Data Parameters
NAME        27989_Regina
EXPNO                  1
PROCNO                 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20181009
Time              18.28 h
INSTRUM           spect
PROBHD    Z816101_0032 (
PULPROG              zg
TD                65536
SOLVENT            MeOD
NS                   256
DS                     4
SWH           10000.000 Hz
FIDRES         0.305176 Hz
AQ            3.2767999 sec
RG                    64
DW               50.000 usec
DE               10.00 usec
TE               298.2 K
D1           2.00000000 sec
TD0                    1
SFO1        500.1330883 MHz
NUC1                  1H
P1                8.00 usec
PLW1        10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI                65536
SF          500.1300117 MHz
WDW                   EM
SSB       0
LB                 0.30 Hz
GB        0
PC                 1.00
```

Regina Fluoroetil melatonina 1.0 298K AIII500 09Out2018 (27989)



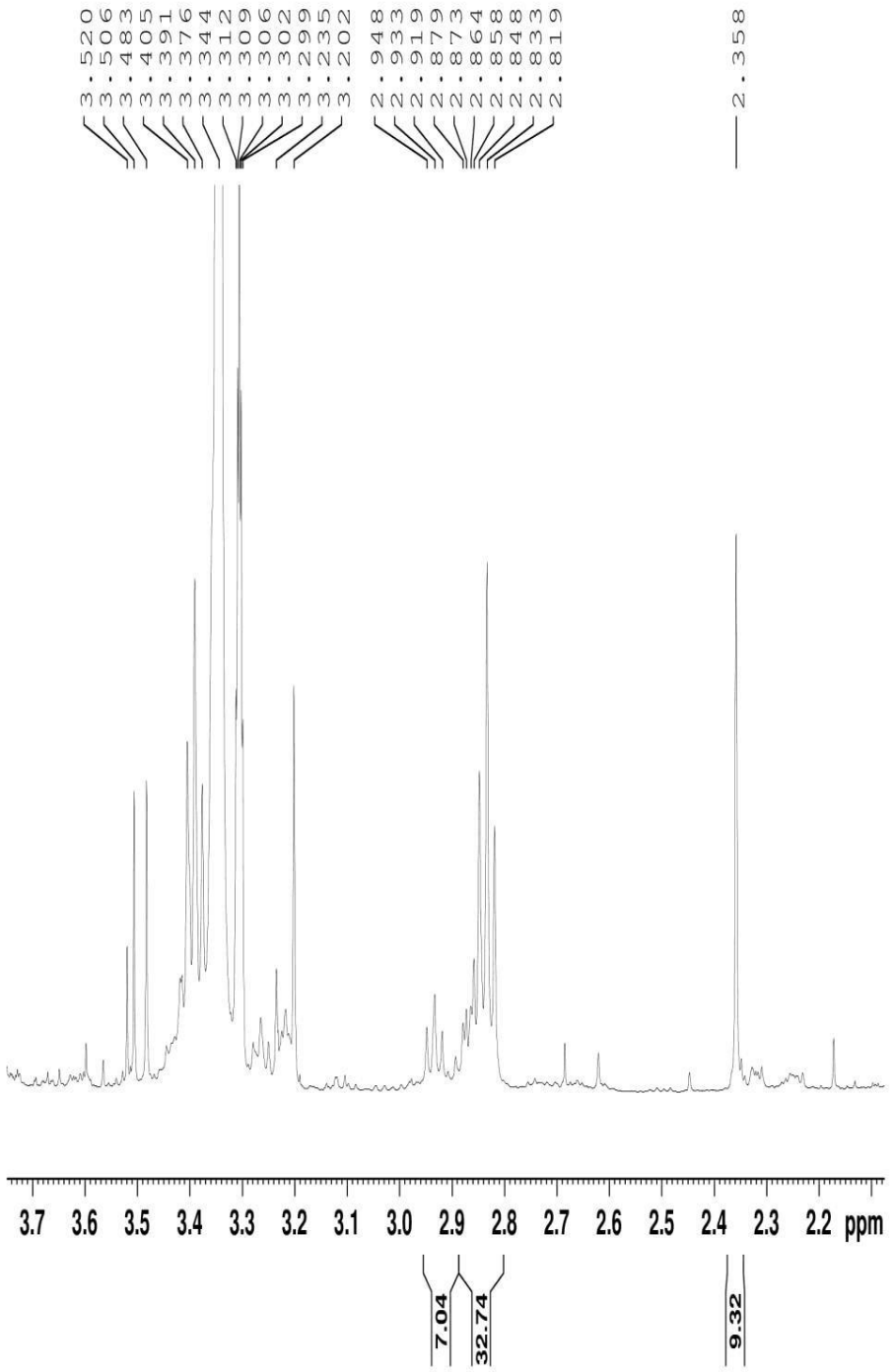

```
Current Data Parameters
NAME       27989_Regina
EXPNO               1
PROCNO              1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20181009
Time             18.28 h
INSTRUM          spect
PROBHD   Z816101_0032 (
PULPROG             zg
TD               65536
SOLVENT           MeOD
NS                 256
DS                   4
SWH          10000.000 Hz
FIDRES        0.305176 Hz
AQ           3.2767999 sec
RG                  64
DW             50.000 usec
DE             10.00 usec
TE             298.2 K
D1          2.00000000 sec
TD0                  1
SFO1       500.1330883 MHz
NUC1                1H
P1               8.00 usec
PLW1       10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI               65536
SF         500.1300117 MHz
WDW                 EM
SSB      0
LB               0.30 Hz
GB       0
PC               1.00
```

Regina Fluoroetil melatonina 1.0 298K AIII500 09Out2018 (27989)




```
Current Data Parameters
NAME       27989_Regina
EXPNO                 1
PROCNO                1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20181009
Time             18.28 h
INSTRUM          spect
PROBHD   Z816101_0032 (
PULPROG             zg
TD               65536
SOLVENT           MeOD
NS                  256
DS                    4
SWH          10000.000 Hz
FIDRES        0.305176 Hz
AQ           3.2767999 sec
RG                   64
DW             50.000 usec
DE             10.00 usec
TE             298.2 K
D1          2.00000000 sec
TD0                   1
SFO1       500.1330883 MHz
NUC1                 1H
P1                8.00 usec
PLW1       10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI               65536
SF         500.1300117 MHz
WDW                 EM
SSB      0
LB                0.30 Hz
GB       0
PC                1.00
```

Regina Fluoroetil melatonina 1.0 298K AIII500 09Out2018 (27989)

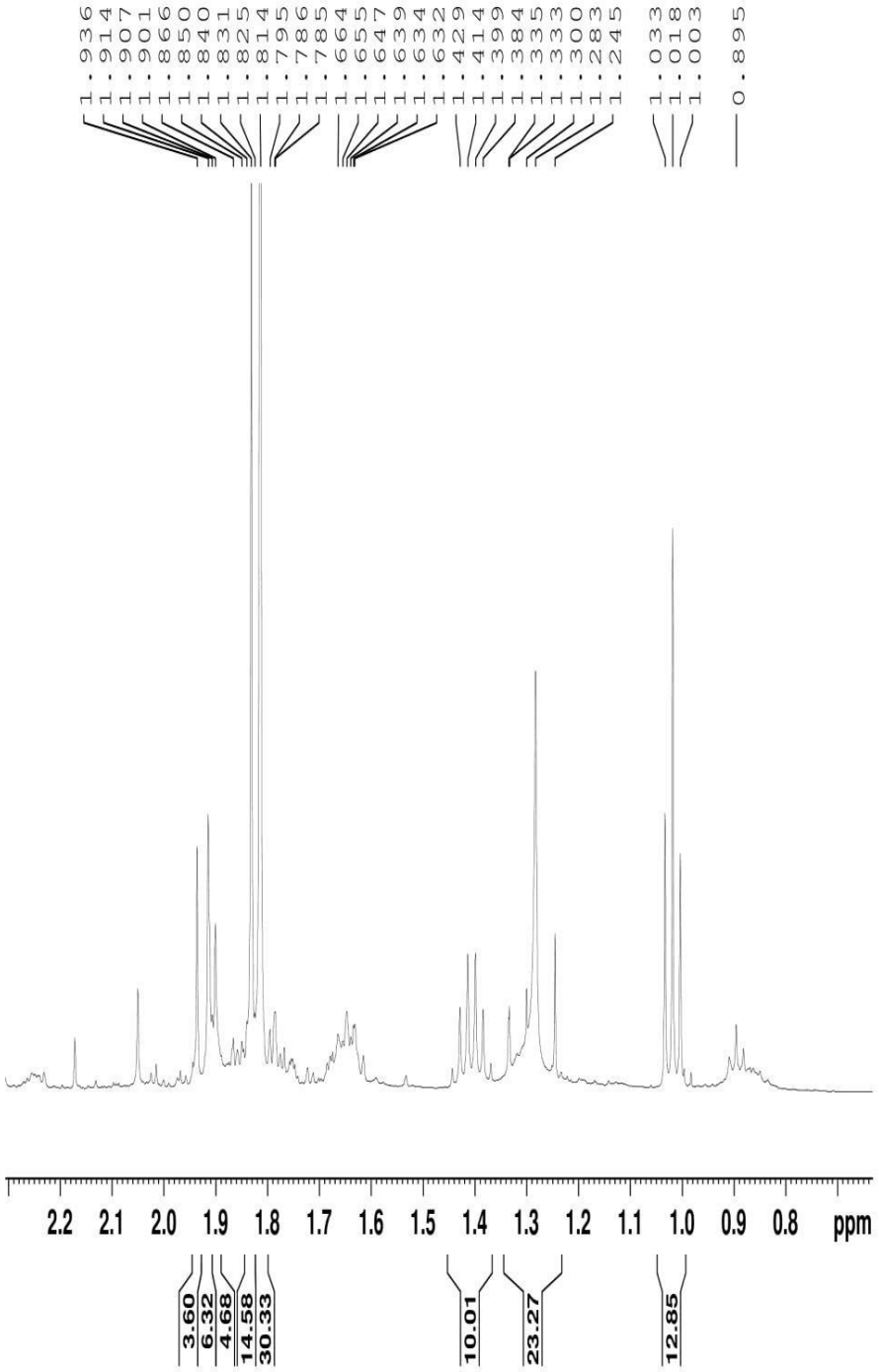


Current Data Parameters
NAME 27989_Regina
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20181009
Time 18.28 h
INSTRUM spect
PROBHD Z816101_0032 (
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 256
DS 4
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.305176 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 64
DW 50.000 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D1 2.00000000 sec
TD0 1
SFO1 500.1330883 MHz
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PLW1 10.10000038 W

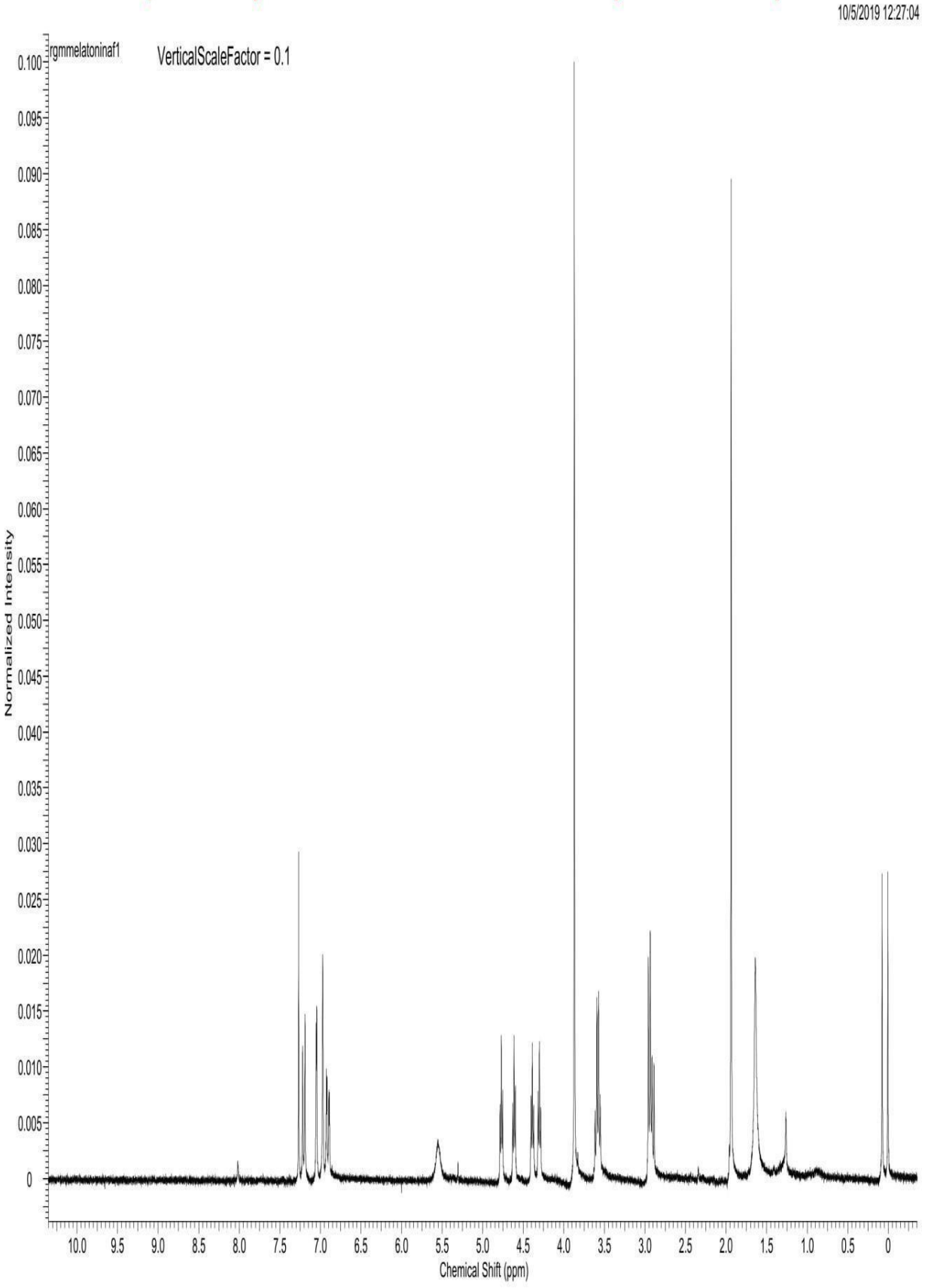
F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1300117 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

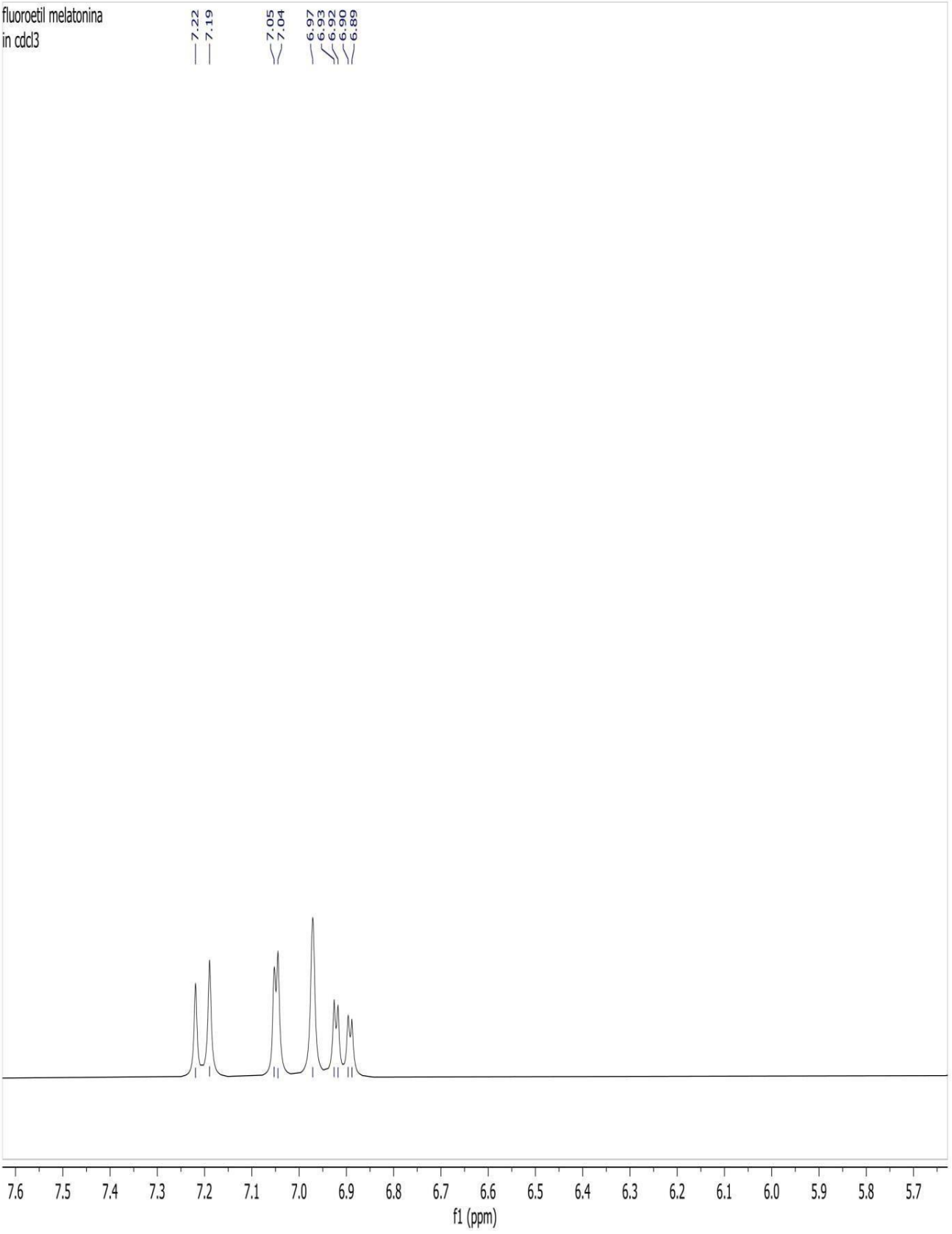
Regina Fluoroetil melatonina 1.0 298K AIII500 09Out2018 (27989)

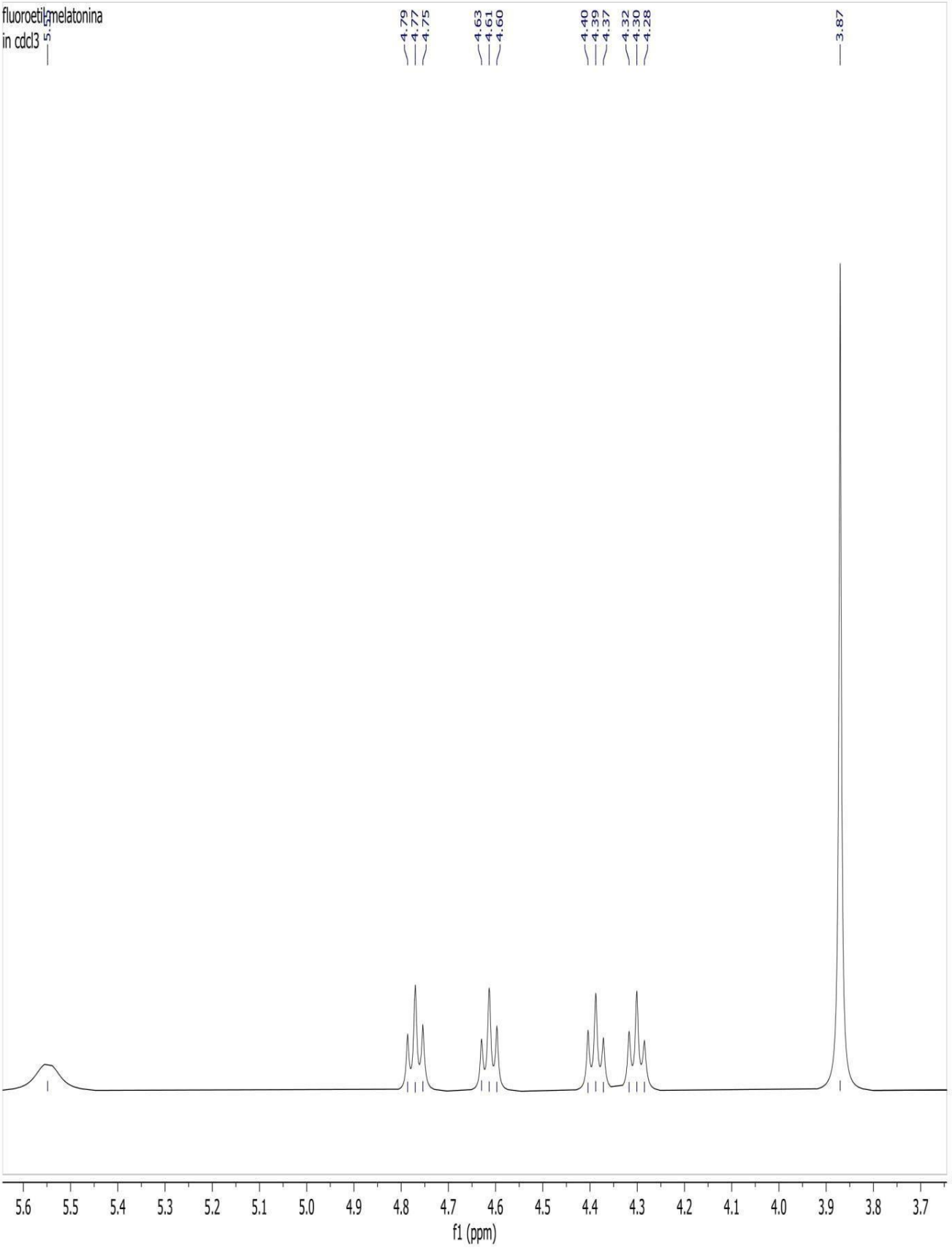


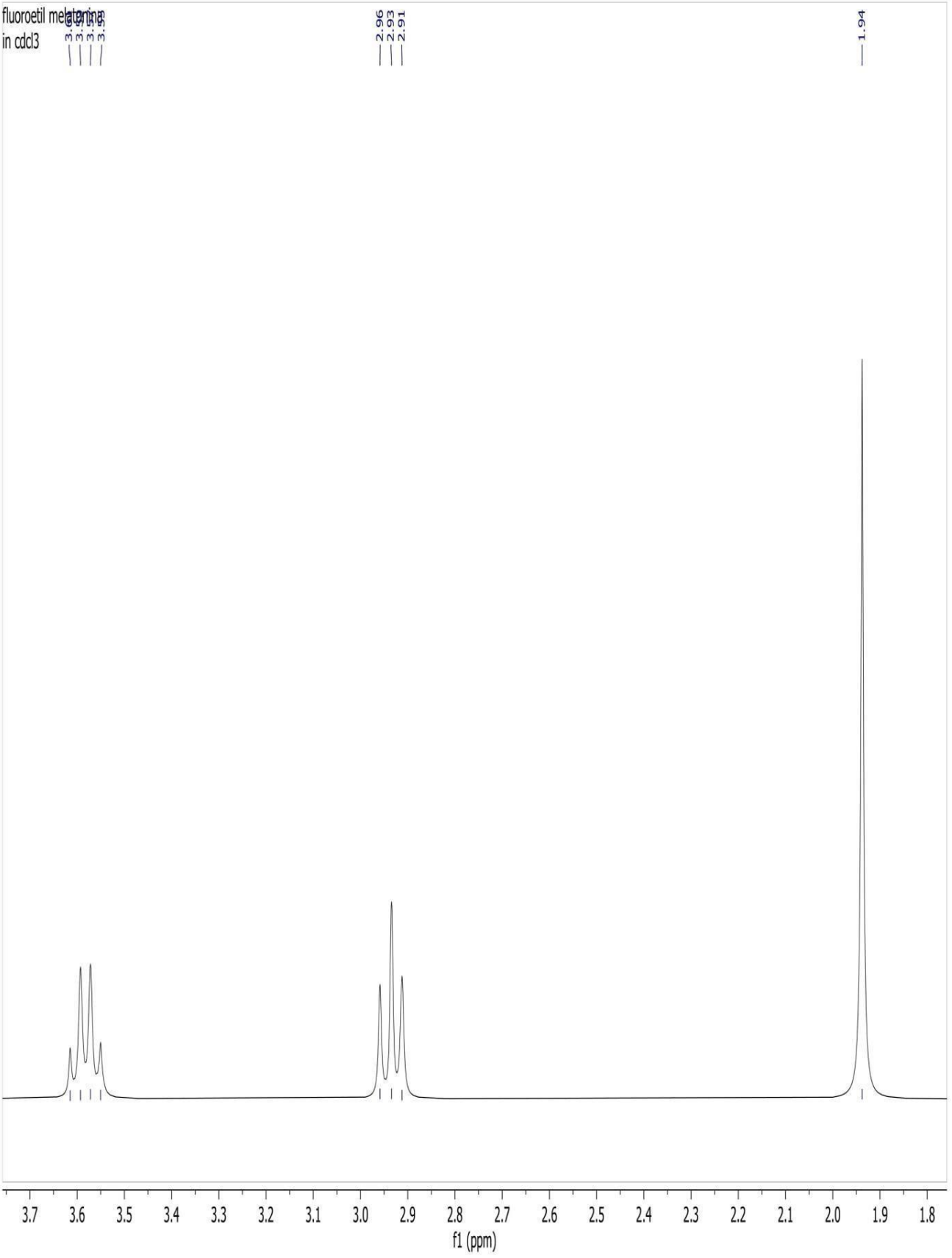

```
Current Data Parameters
NAME       27989_Regina
EXPNO                 1
PROCNO                1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20181009
Time             18.28 h
INSTRUM           spect
PROBHD   Z816101_0032 (
PULPROG              zg
TD                65536
SOLVENT            MeOD
NS                   256
DS                     4
SWH           10000.000 Hz
FIDRES         0.305176 Hz
AQ            3.2767999 sec
RG                    64
DW               50.000 usec
DE               10.00 usec
TE               298.2 K
D1           2.00000000 sec
TD0                    1
SFO1        500.1330883 MHz
NUC1                  1H
P1                 8.00 usec
PLW1        10.10000038 W

F2 - Processing parameters
SI                65536
SF          500.1300117 MHz
WDW                  EM
SSB      0
LB                 0.30 Hz
GB       0
PC                 1.00
```

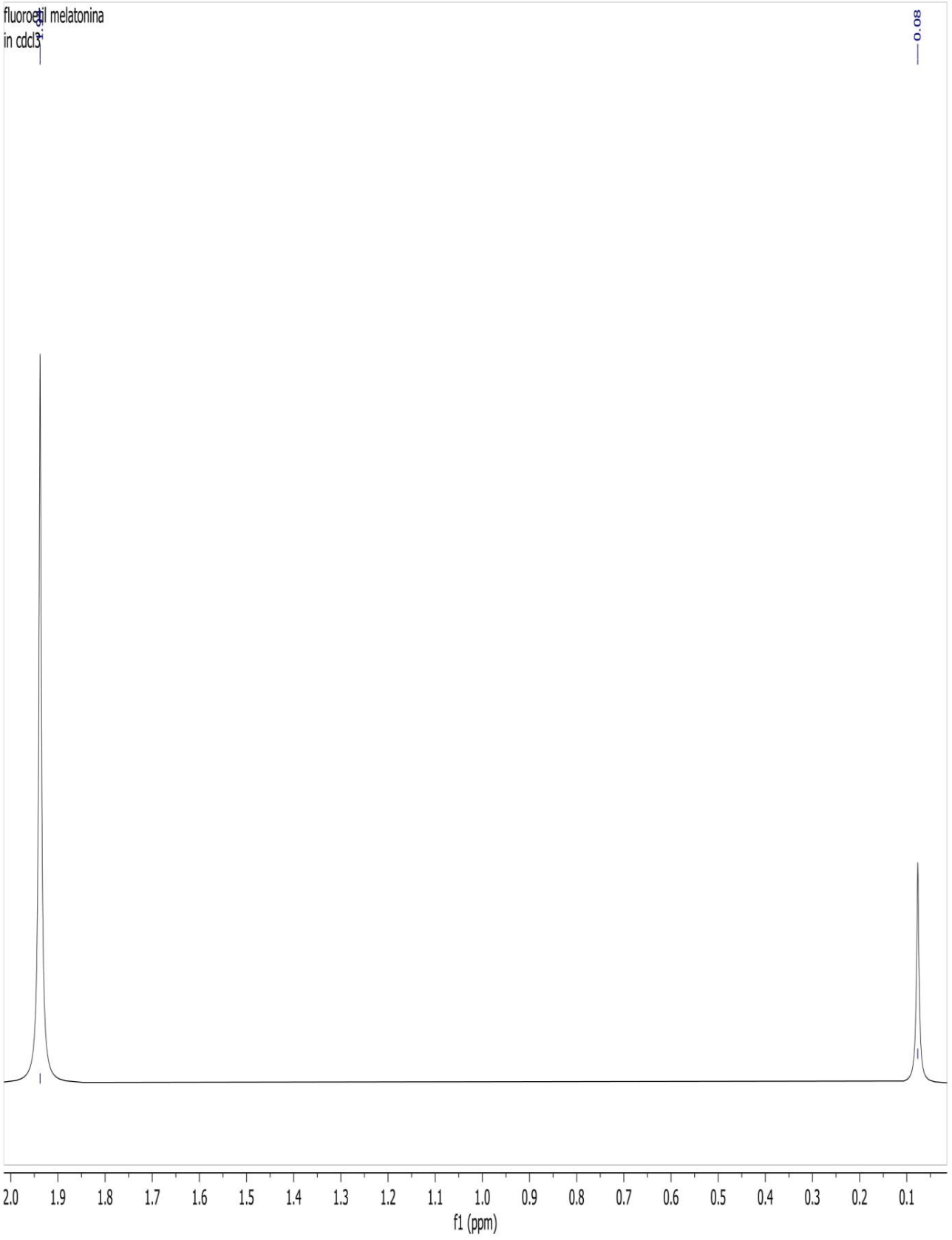
11. APÊNDICES D – Espectros de ^{1}H RMN de Fluoroetil melatonina



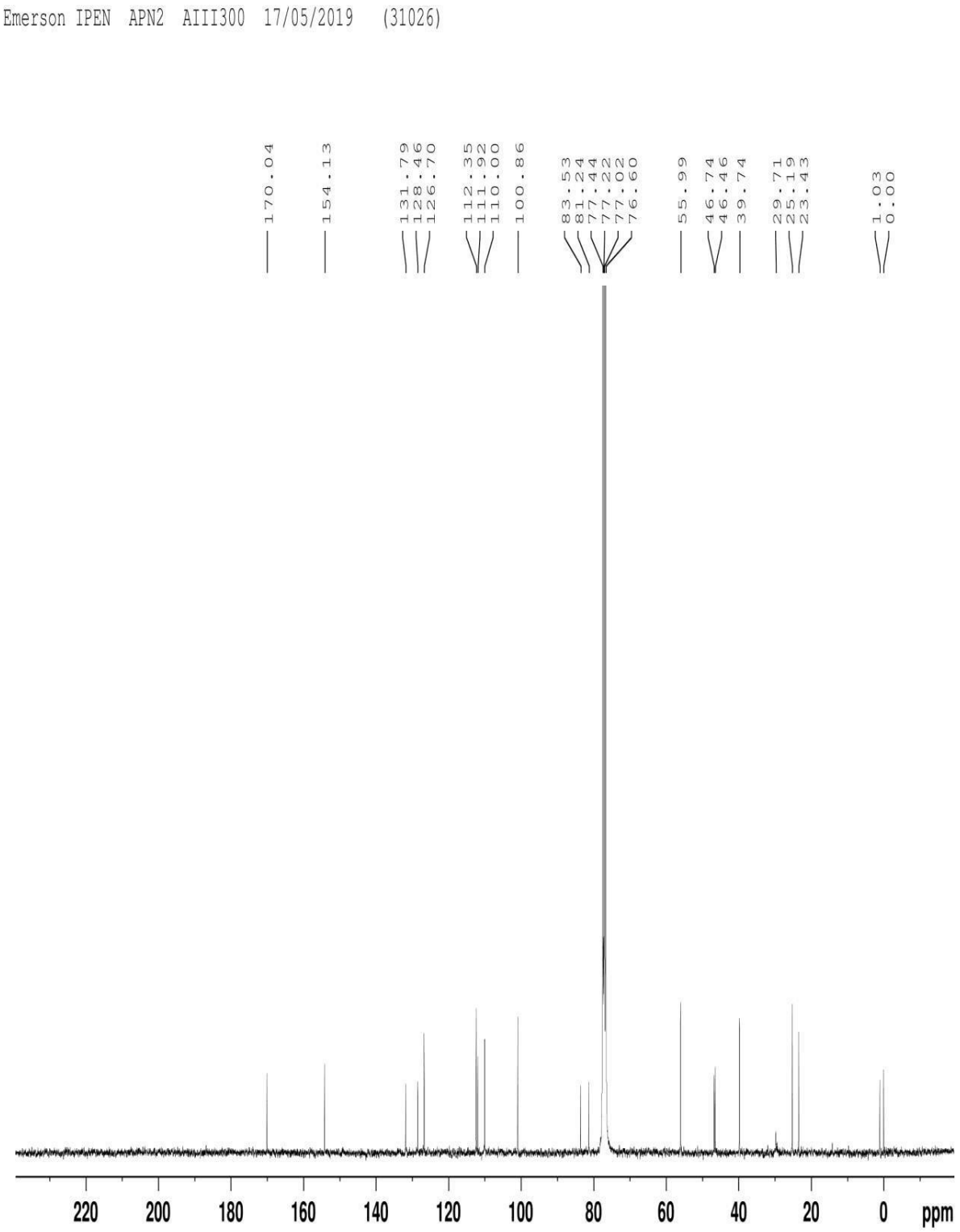

fluoroetil melatonina
in cdcl3
7.22
7.19
7.05
7.04
6.97
6.93
6.92
6.90
6.89
7.6
7.5
7.4
7.3
7.2
7.1
7.0
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
6.4
6.3
6.2
6.1
6.0
5.9
5.8
5.7
f1 (ppm)


fluoroetilmelatonina
in cdcl3
5.5
4.79
4.77
4.75
4.63
4.61
4.60
4.40
4.39
4.37
4.32
4.30
4.28
3.87
5.6
5.5
5.4
5.3
5.2
5.1
5.0
4.9
4.8
4.7
4.6
4.5
4.4
4.3
4.2
4.1
4.0
3.9
3.8
3.7
f1 (ppm)

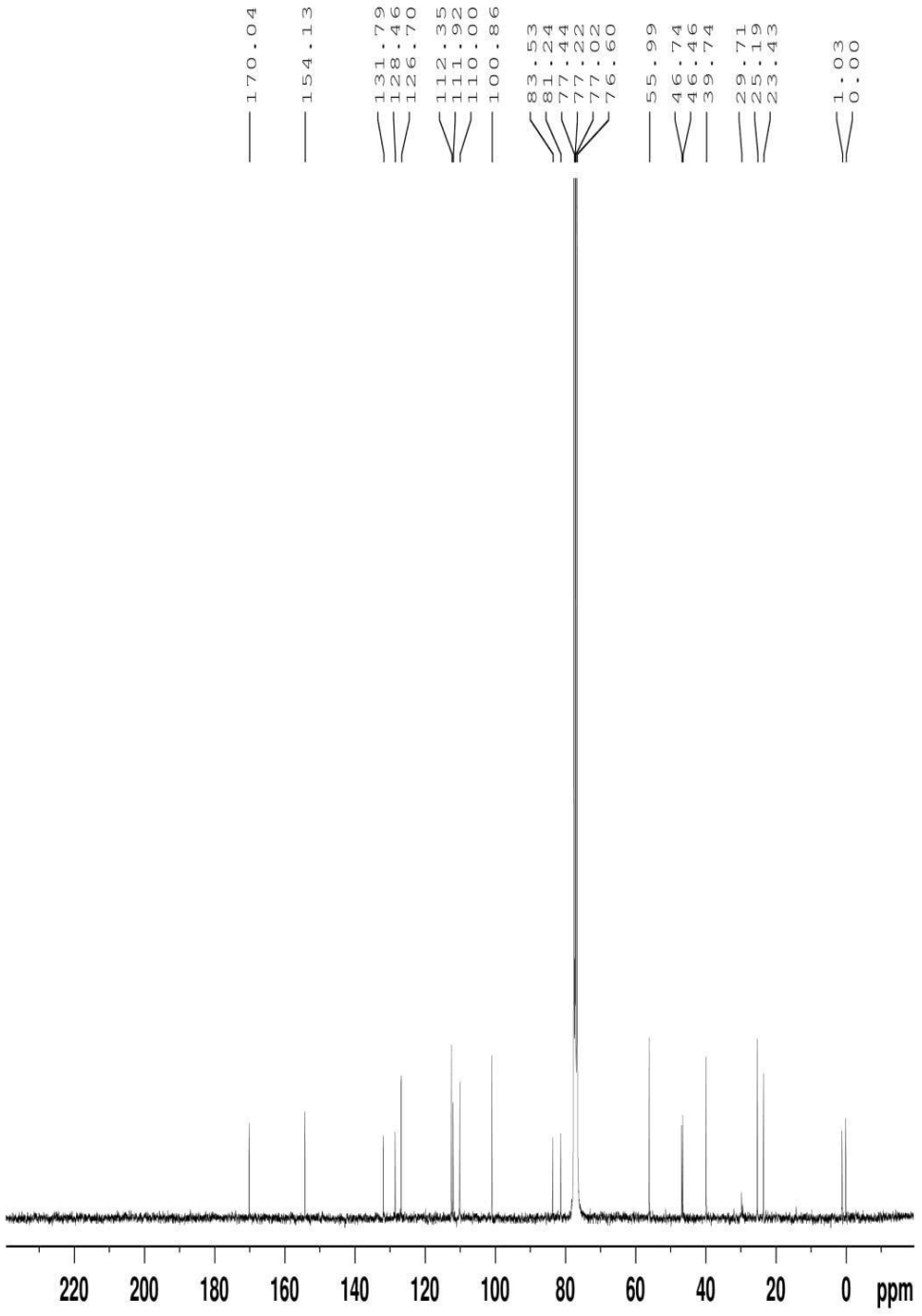

fluoroetil melatonina
in cdcl3
3.61
3.59
3.57
3.55
2.96
2.93
2.91
1.94
3.7
3.6
3.5
3.4
3.3
3.2
3.1
3.0
2.9
2.8
2.7
2.6
2.5
2.4
2.3
2.2
2.1
2.0
1.9
1.8
f1 (ppm)


fluoroetil melatonina
in cdcl3
1.93
0.08
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
f1 (ppm)

12. APÊNDICES E – Espectros de ^{13}C RMN de Fluoroetil melatonina

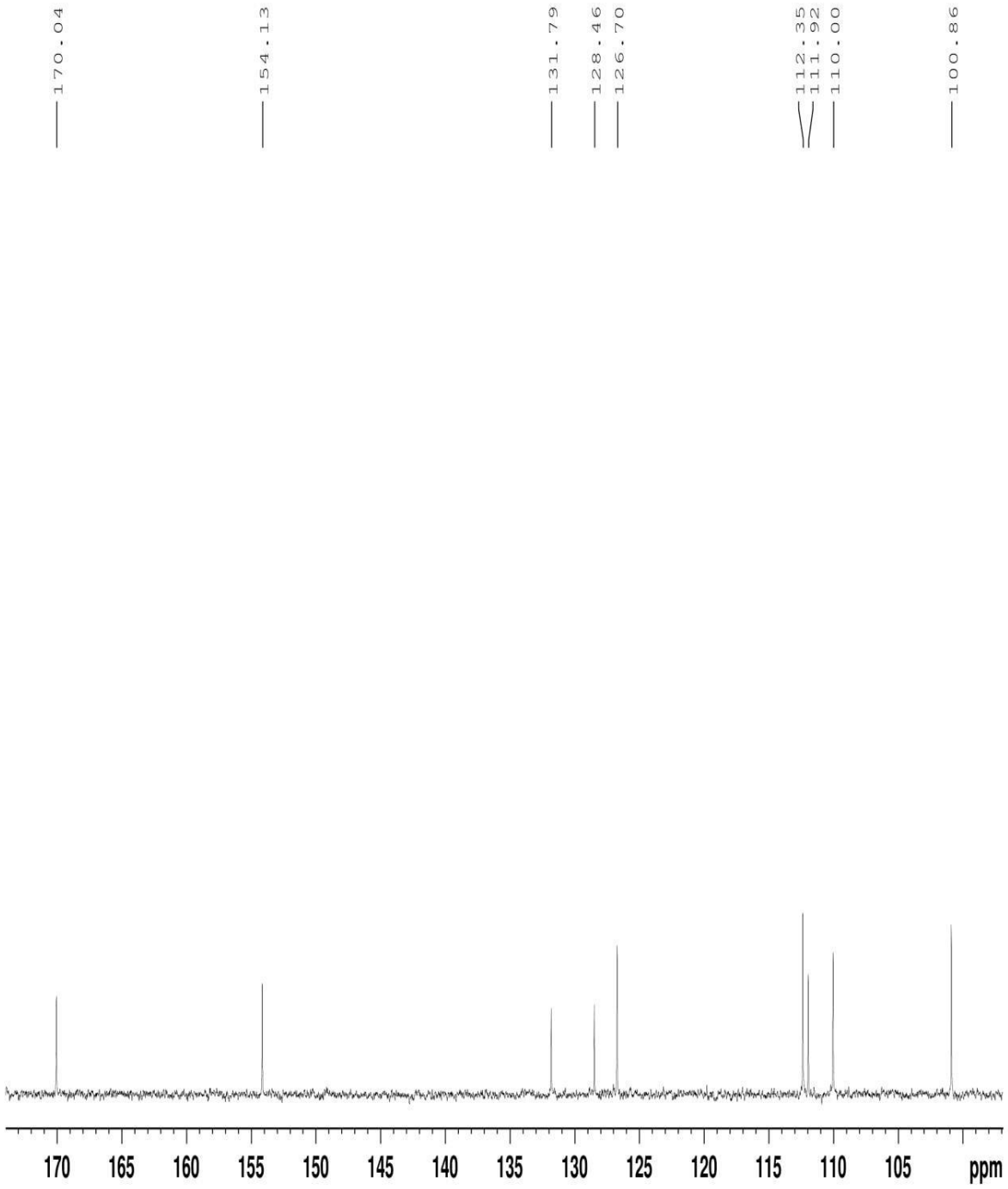


Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)

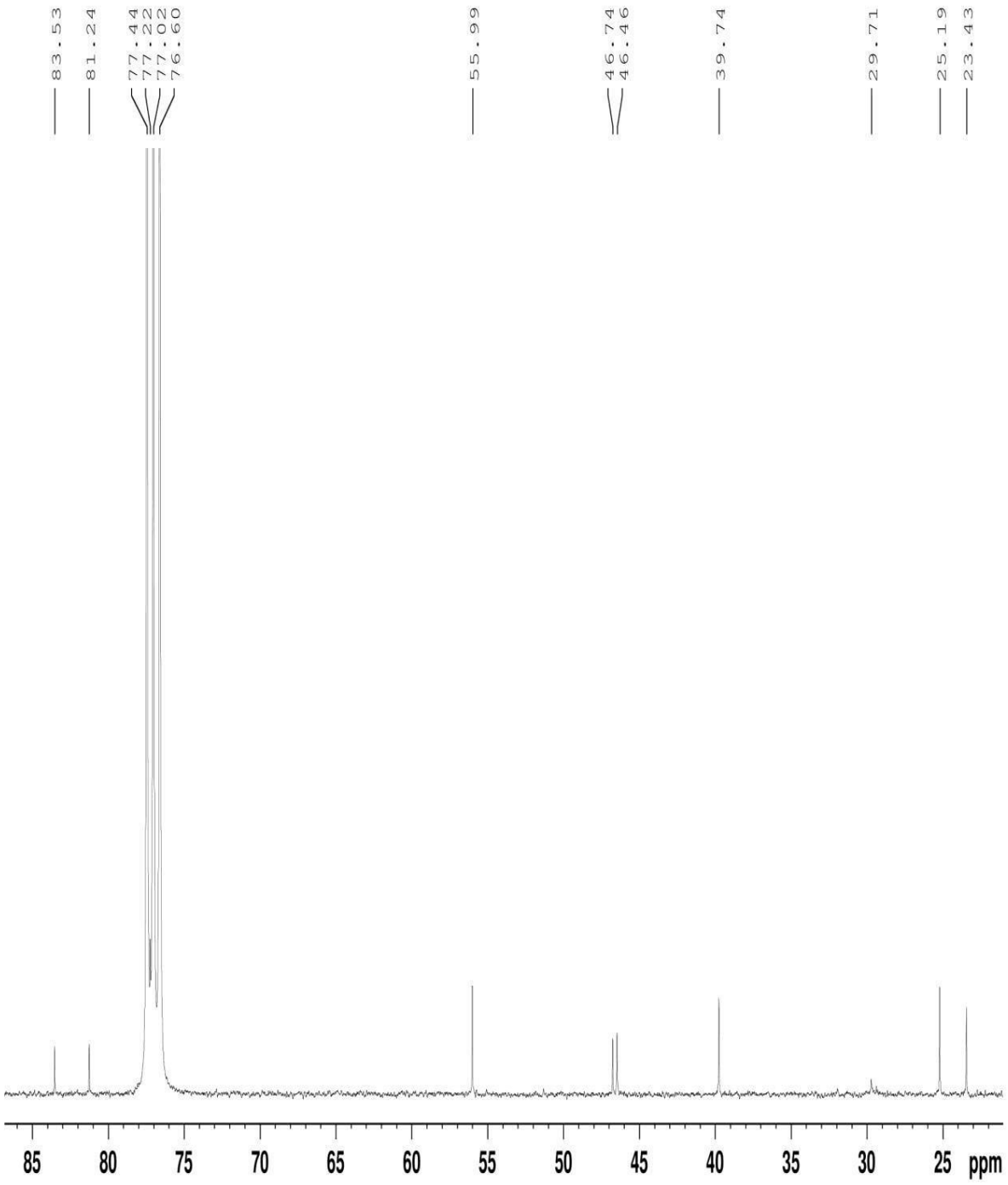



```
Current Data Parameters
NAME     31026_EmersonIPEN
EXPNO                  2
PROCNO                 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20190520
Time               7.30 h
INSTRUM           spect
PROBHD   Z8284_0936 (PH
PULPROG          zgpg30
TD               134144
SOLVENT           CDCl3
NS                45309
DS                    4
SWH           19531.250 Hz
FIDRES         0.291198 Hz
AQ            3.4340863 sec
RG                  181
DW               25.600 usec
DE               10.00 usec
TE                298.9 K
D1           2.00000000 sec
D11          0.03000000 sec
TD0                   1
SFO1         75.4760500 MHz
NUC1                 13C
P1                8.00 usec
PLW1        55.00000000 W
SFO2        300.1312005 MHz
NUC2                  1H
CPDPRG[2        waltz16
PCPD2             90.00 usec
PLW2        16.50000000 W
PLW12        0.18384001 W
PLW13        0.09247200 W

F2 - Processing parameters
SI                 131072
SF           75.4677485 MHz
WDW                    EM
SSB      0
LB                 2.00 Hz
GB       0
PC                 1.40
```

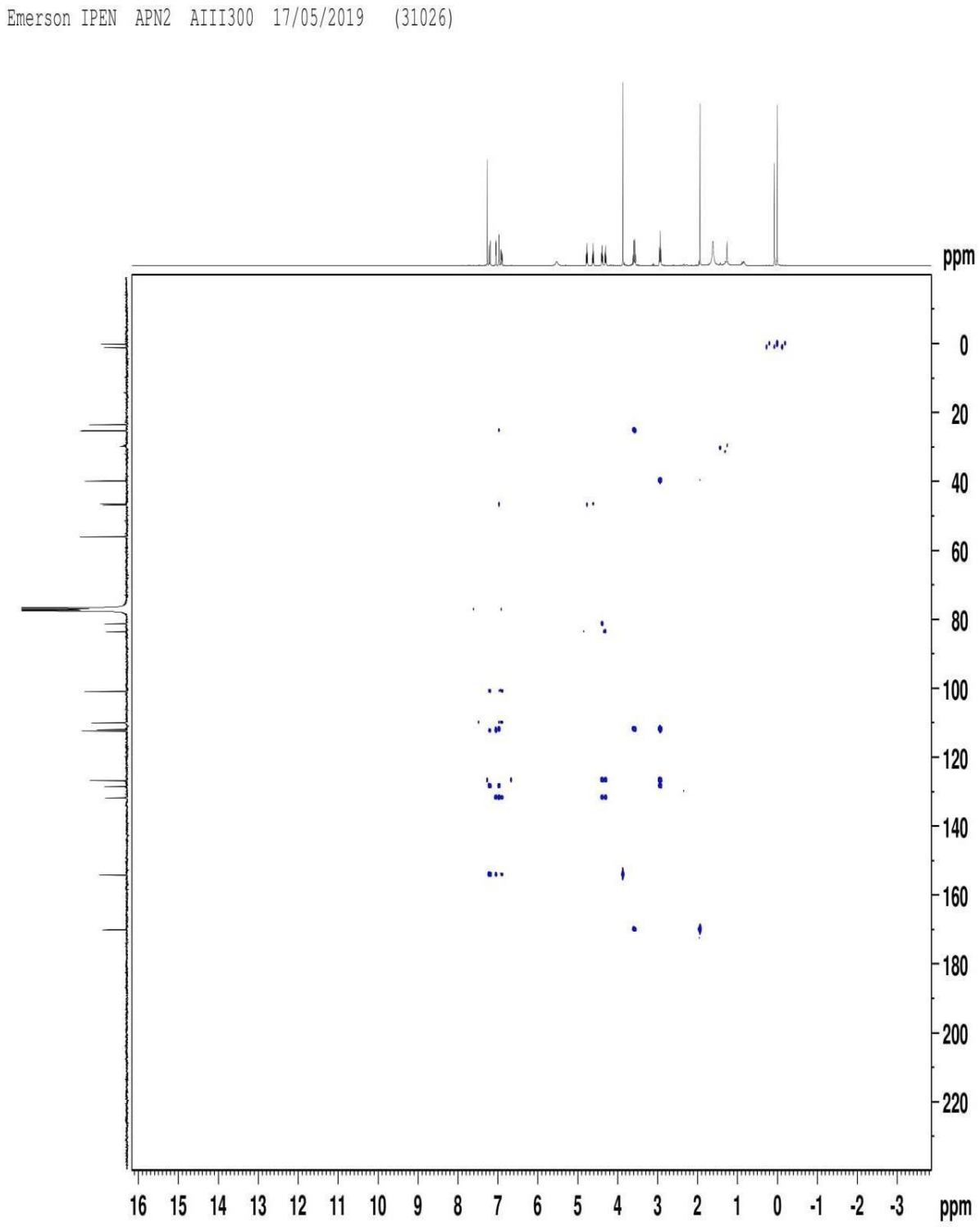
Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)



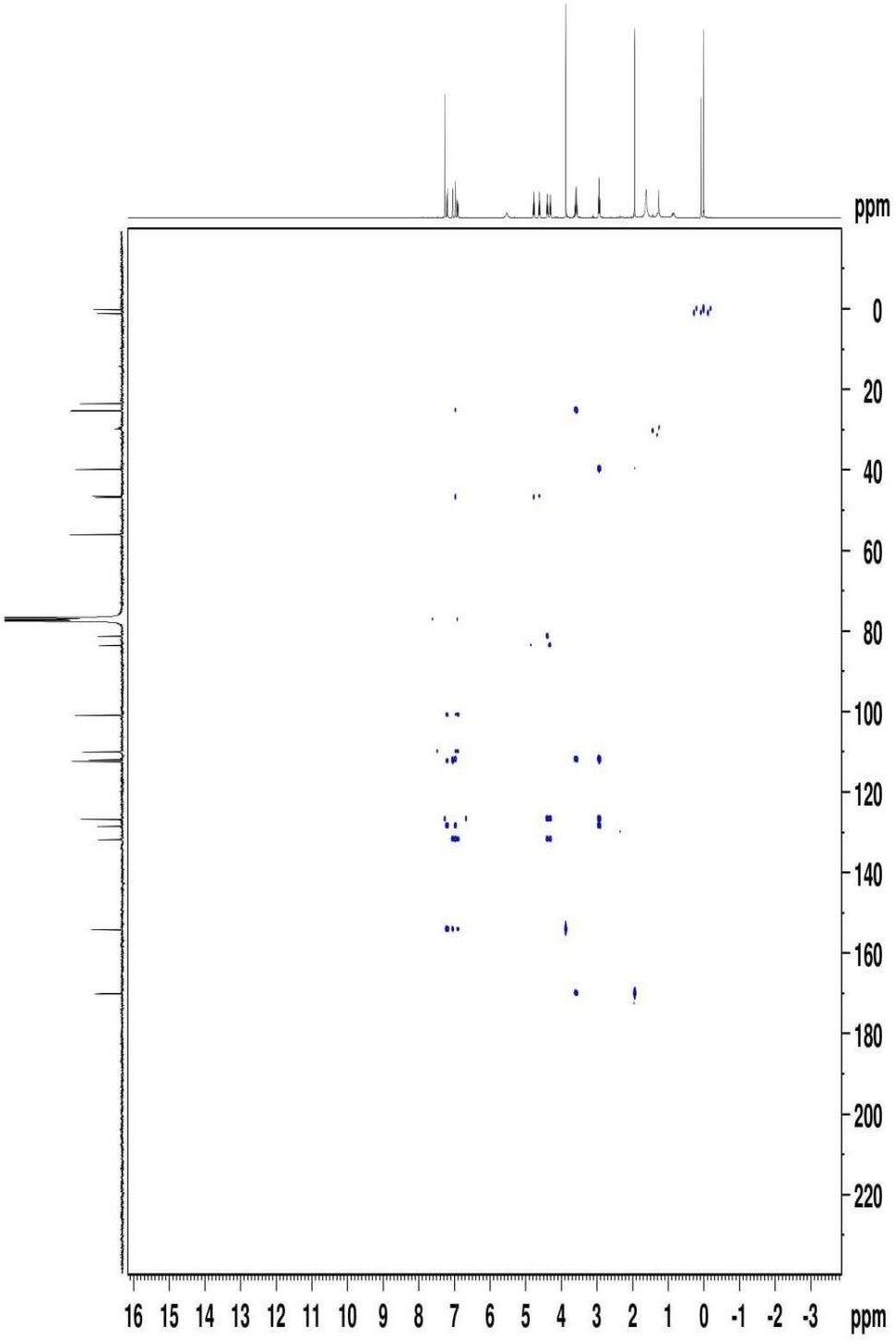
Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)



13. APÊNDICES F – Espectros de (^{1}H, ^{13}C) HMBC de Fluoroetil melatonina em $CDCl_3$

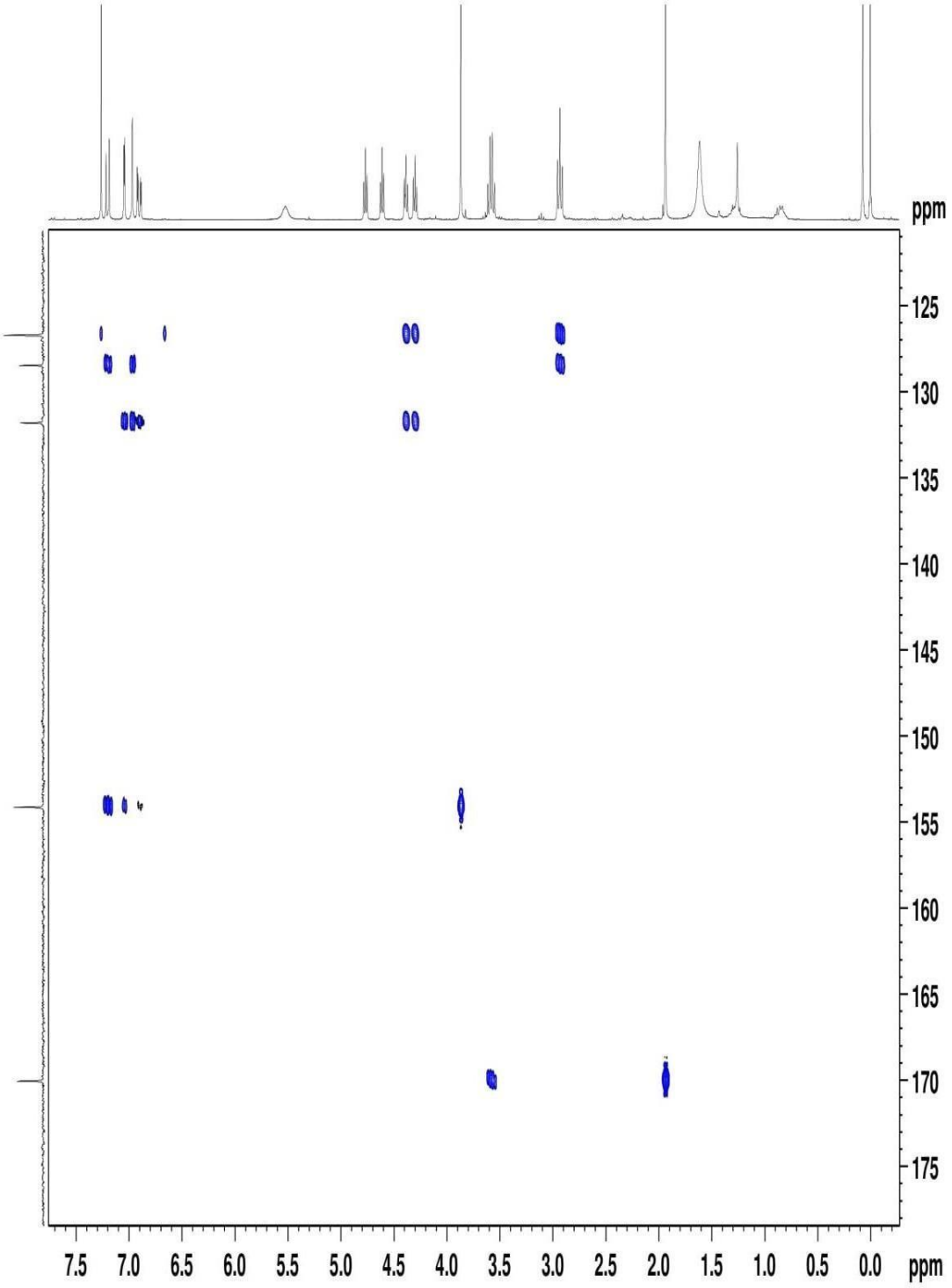


Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)

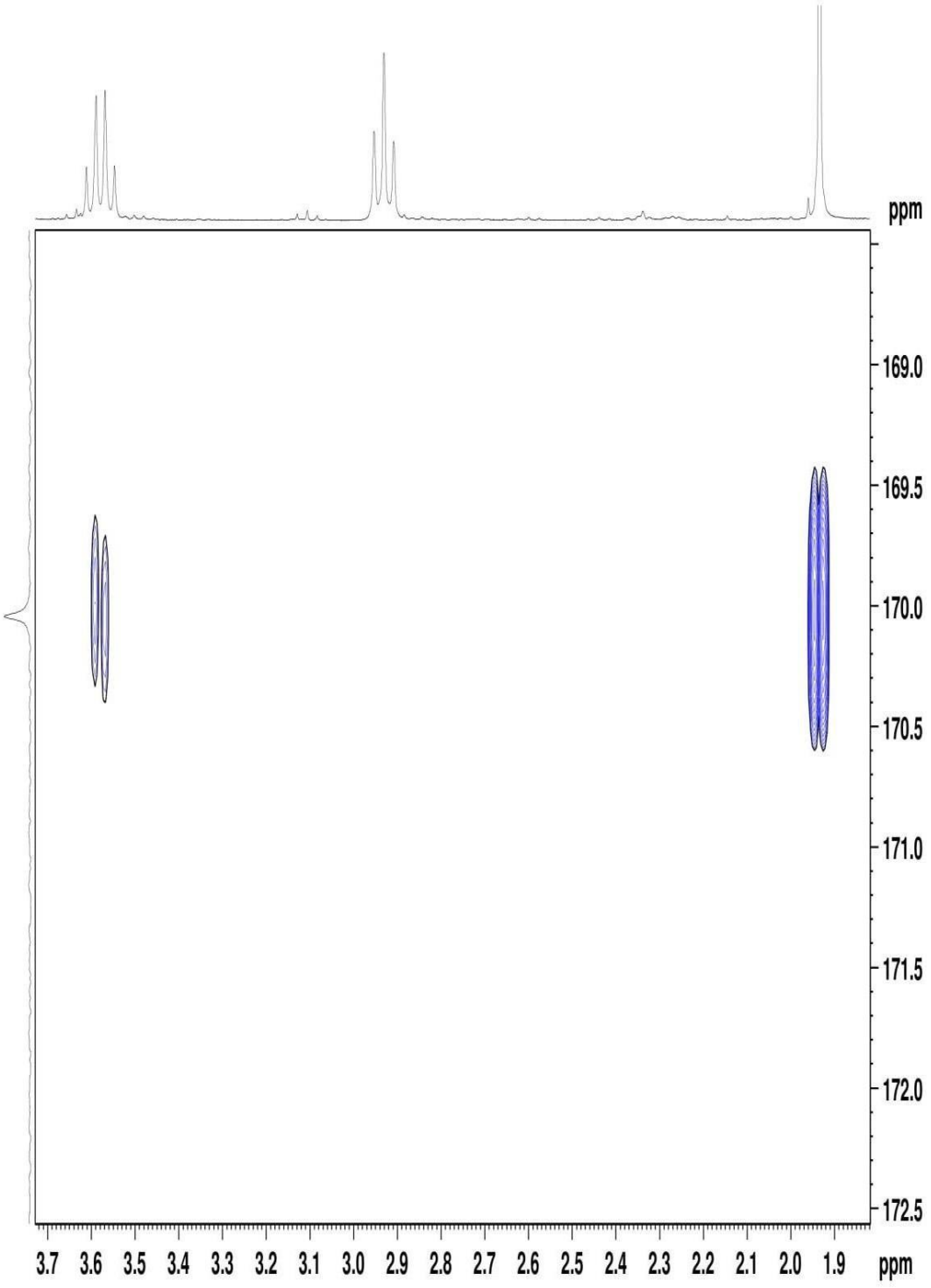



```
Current Data Parameters
NAME     31026_EmersonIPEN
EXPNO                  3
PROCNO                 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20190520
Time              10.54 h
INSTRUM           spect
PROBHD   Z8284_0936 (PH
PULPROG    hmbcgplpndqf
TD                 4096
SOLVENT           CDCl3
NS                   64
DS                   16
SWH            6009.615 Hz
FIDRES         2.934382 Hz
AQ            0.3407872 sec
RG                 80.6
DW              83.200 usec
DE              12.00 usec
TE              298.2 K
CNST2       145.0000000
CNST13        8.0000000
D0           0.00000300 sec
D1           1.50000000 sec
D2           0.00344828 sec
D6           0.06250000 sec
D16          0.00020000 sec
IN0          0.00002550 sec
TDav                   1
SFO1        300.1318533 MHz
NUC1                  1H
P1                 9.50 usec
P2                19.00 usec
PLW1        16.50000000 W
SFO2         75.4760505 MHz
NUC2                 13C
P3                 8.00 usec
PLW2        55.00000000 W
GPNAM[1]     SMSQ10.100
GPZ1              50.00 %
GPNAM[2]     SMSQ10.100
GPZ2              30.00 %
GPNAM[3]     SMSQ10.100
GPZ3              40.10 %
P16             1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                  606
SFO1           75.47605 MHz
FIDRES        64.712357 Hz
SW               259.789 ppm
FnMODE               QF

F2 - Processing parameters
SI                 4096
SF          300.1300068 MHz
WDW                SINE
SSB      0
LB       0 Hz
GB       0
PC                 1.40

F1 - Processing parameters
SI                 2048
MC2                  QF
SF           75.4677495 MHz
WDW                SINE
SSB      0
LB       0 Hz
GB       0
```

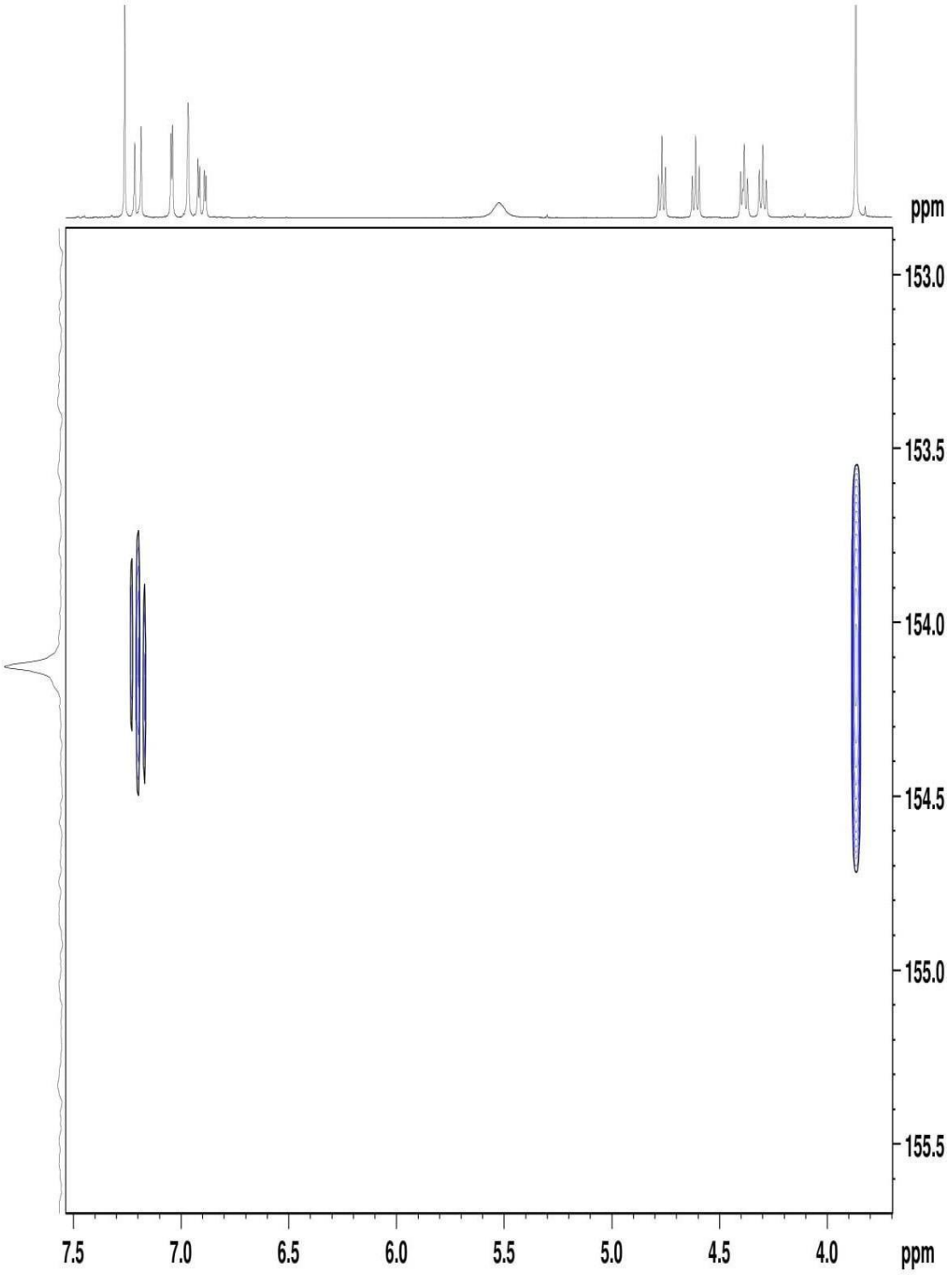
Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)



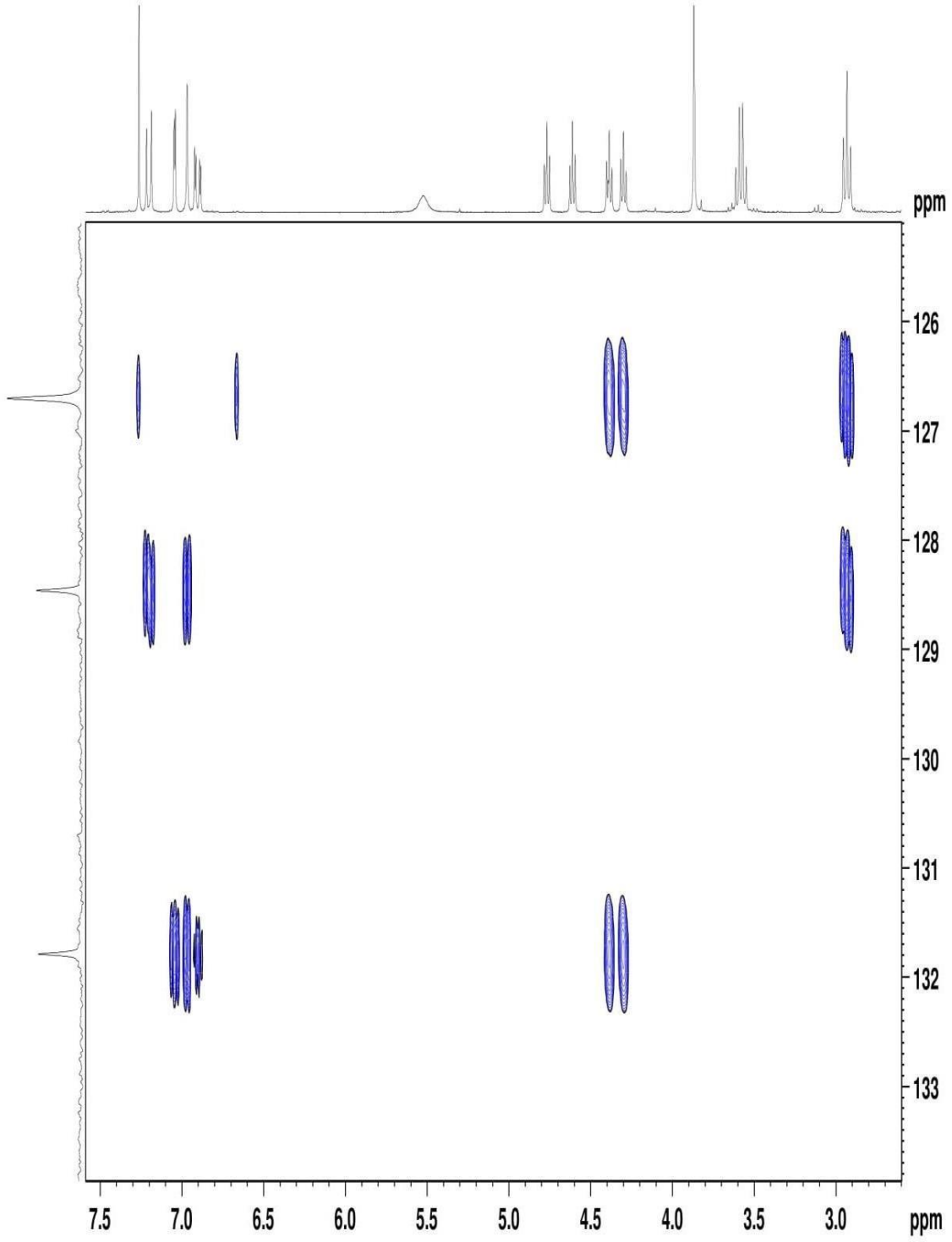
Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)



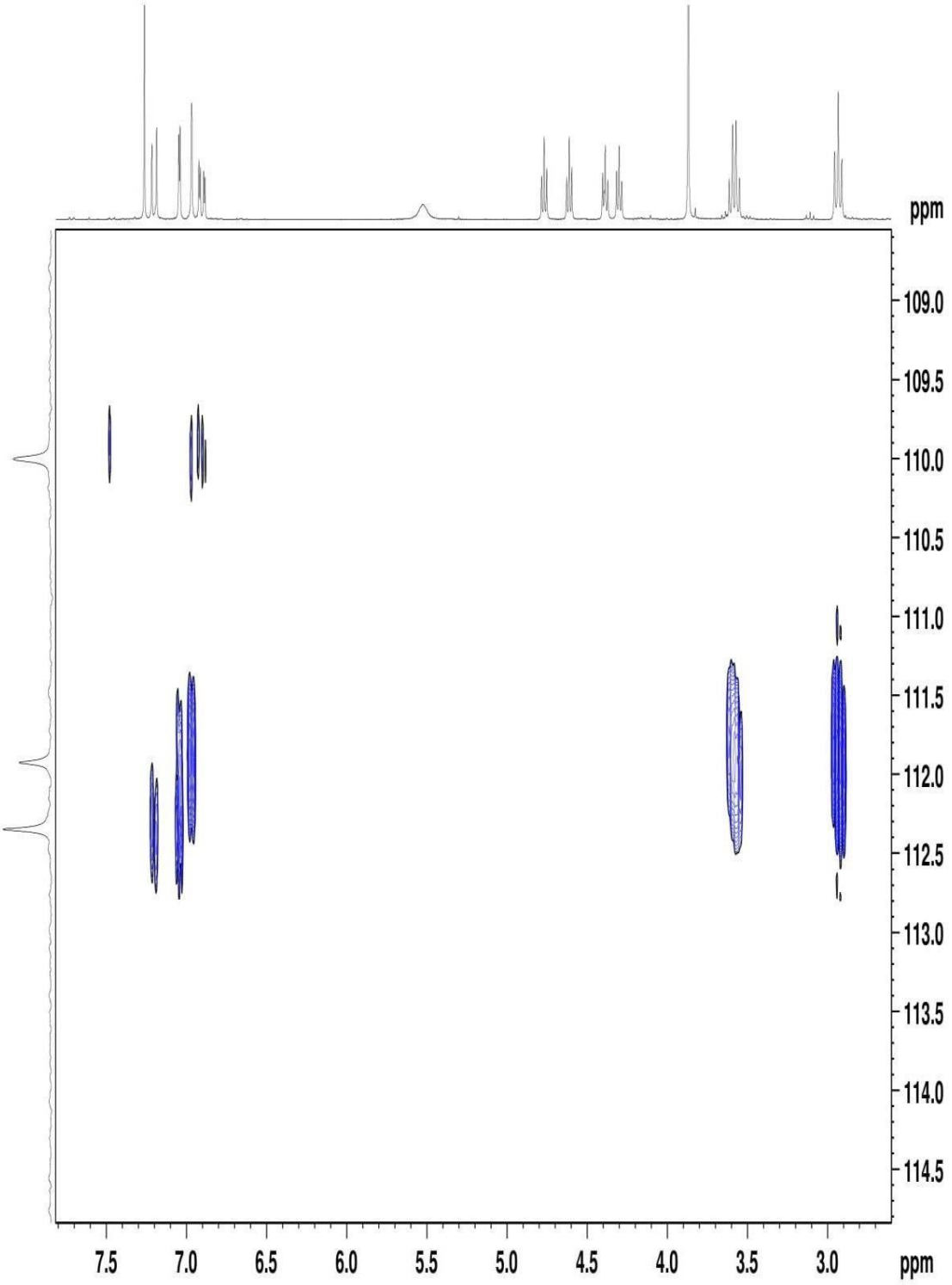
Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)



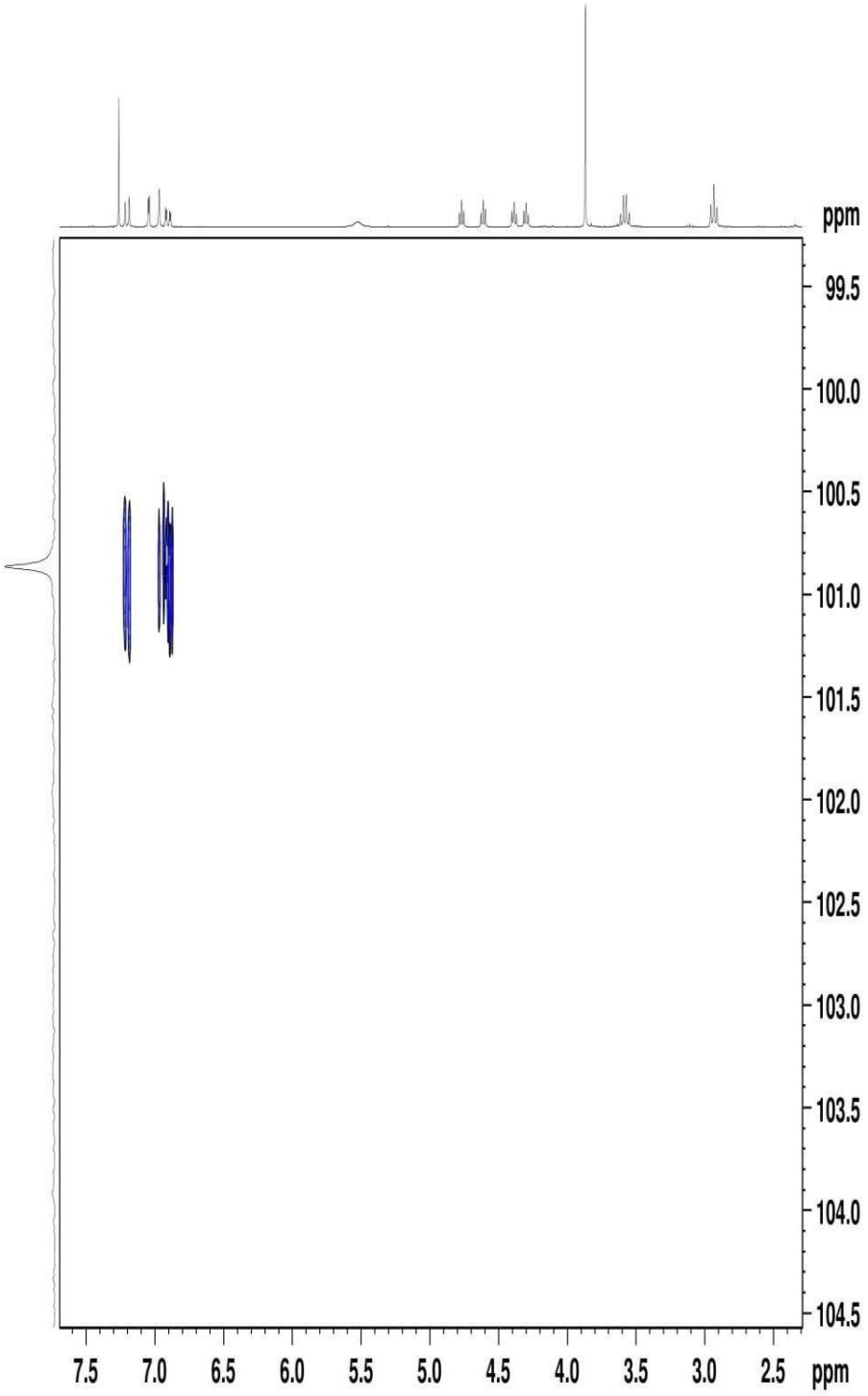
Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)



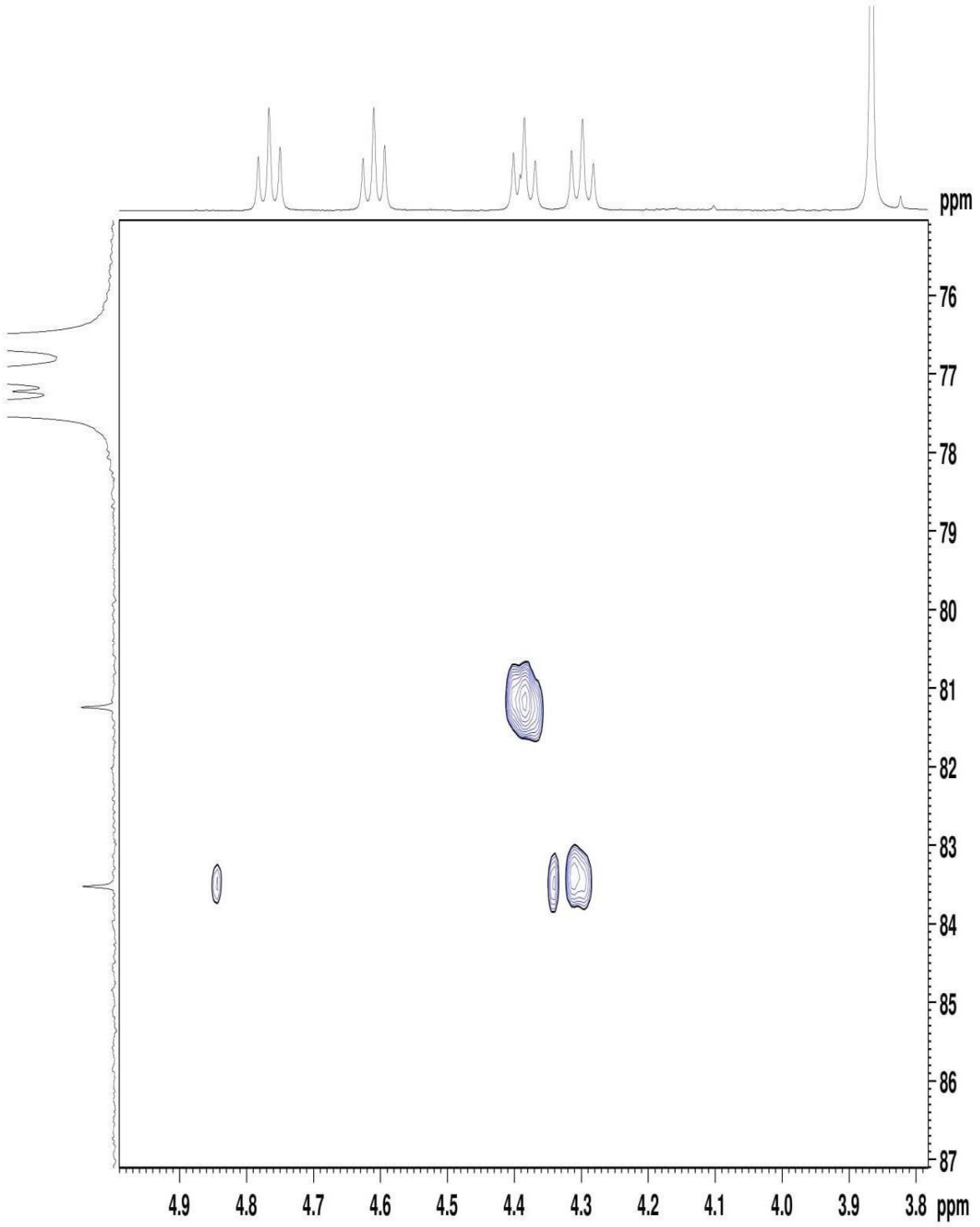
Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)



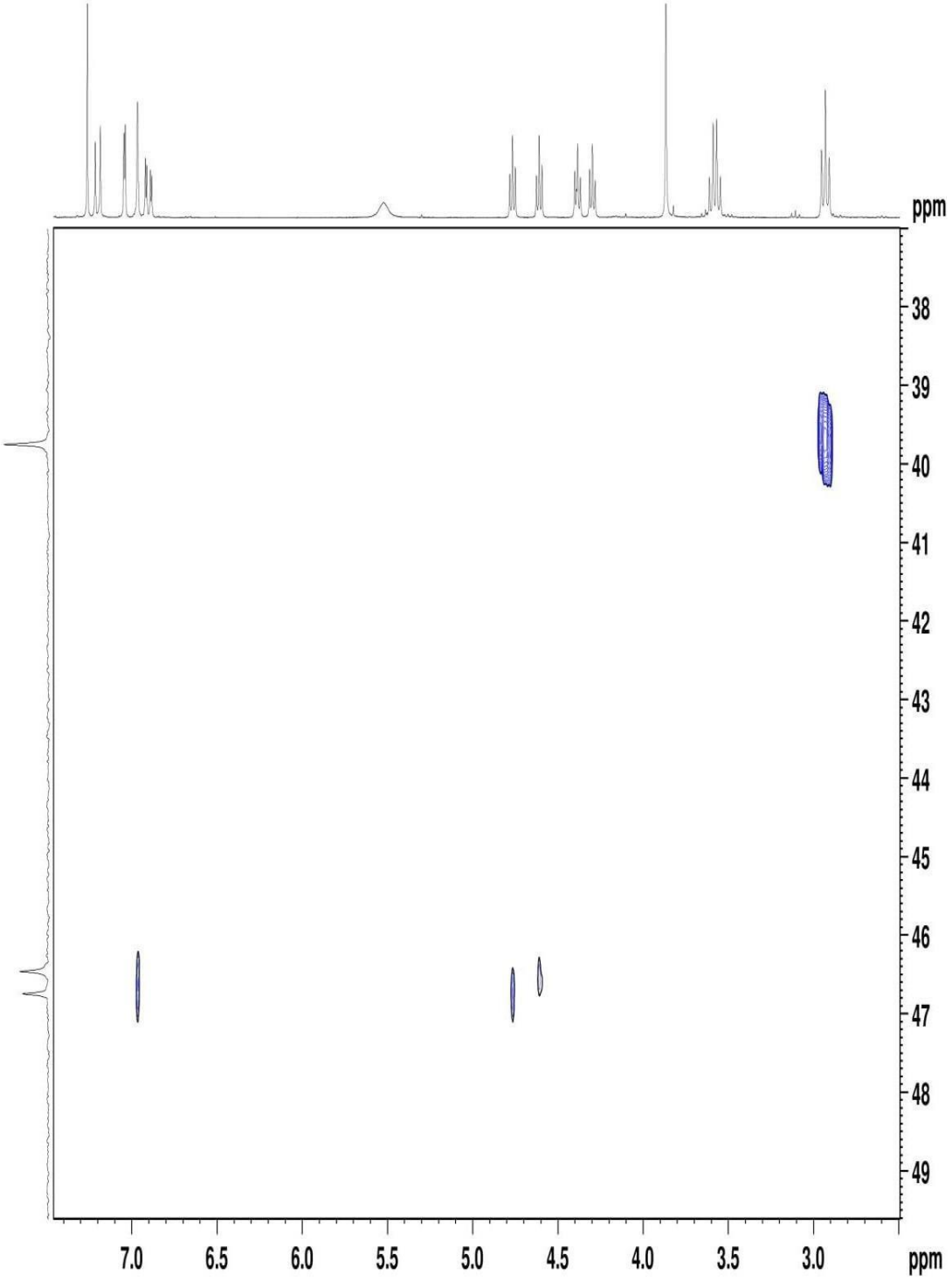
Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)



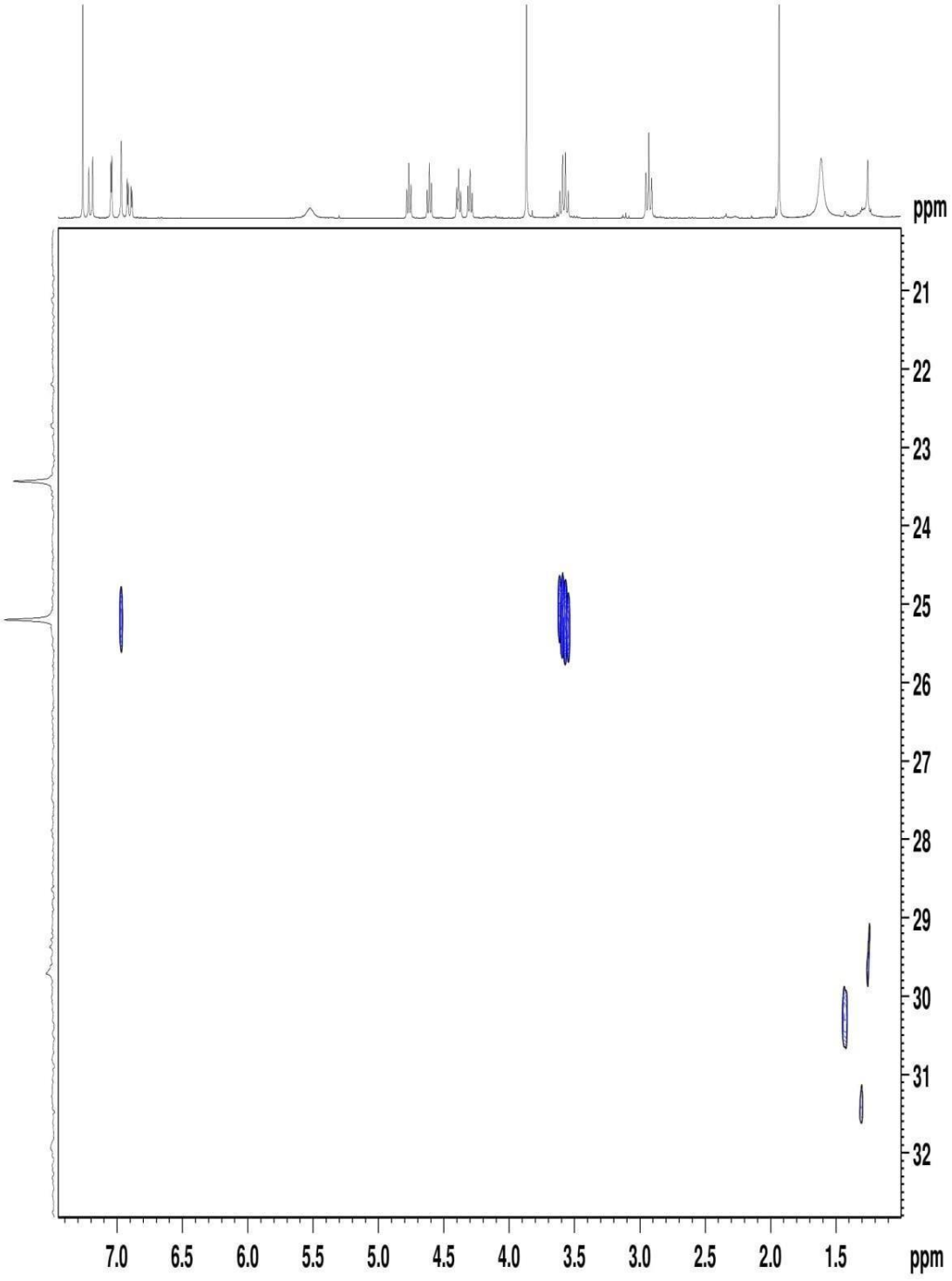
Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)



Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)

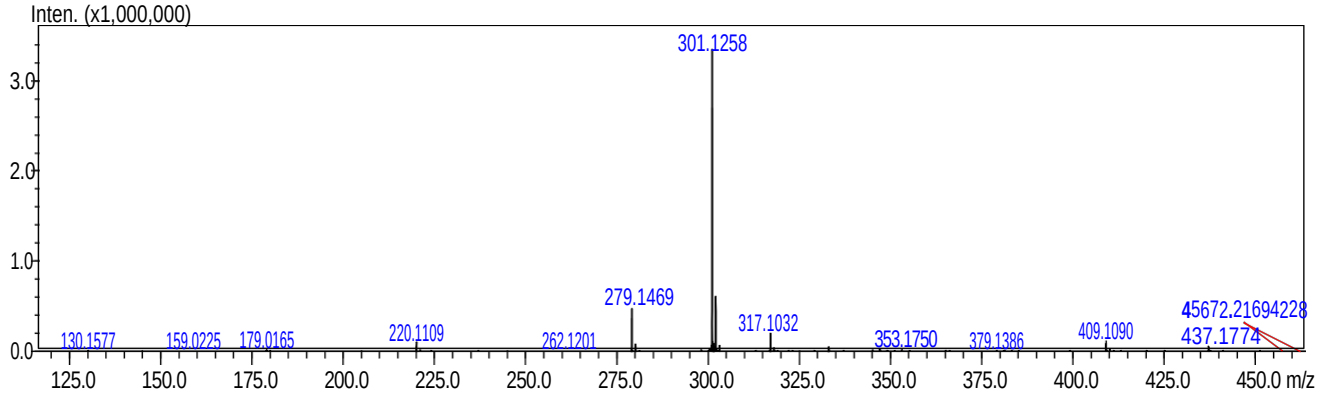


Emerson IPEN APN2 AIII300 17/05/2019 (31026)

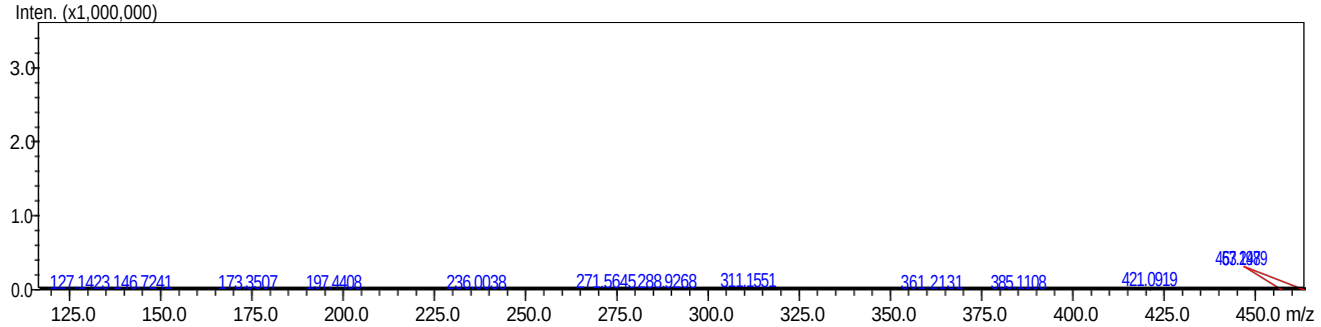


14. APÊNDICE G – Espectros de Massa de Fluoroetil melatonina

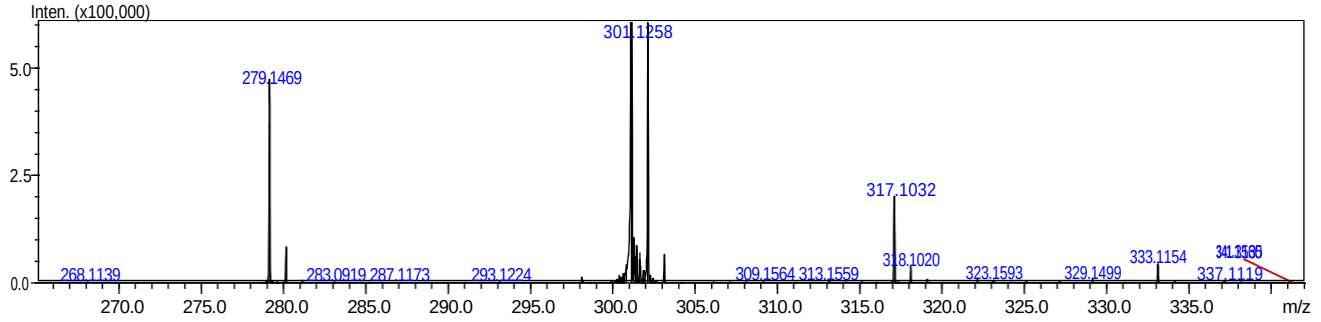
Modo Positivo



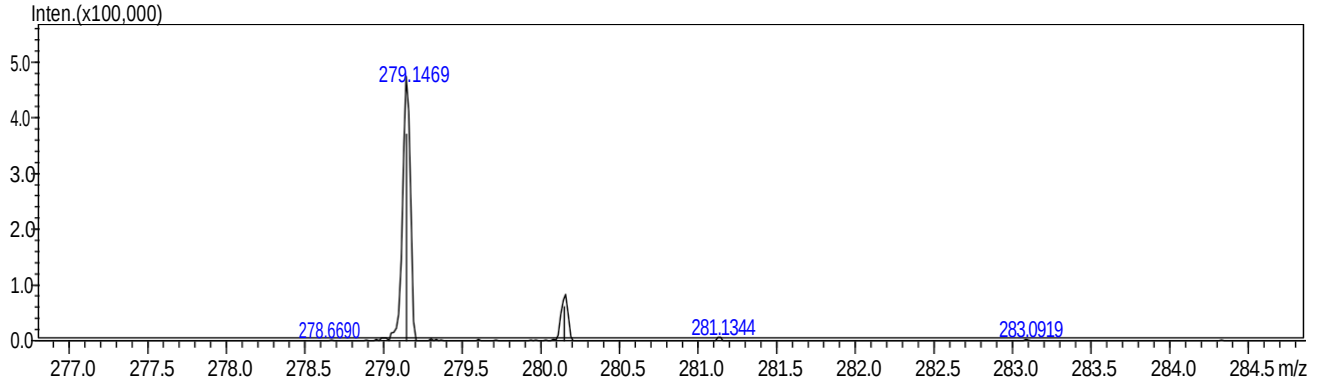
Modo negativo



Zoom positive



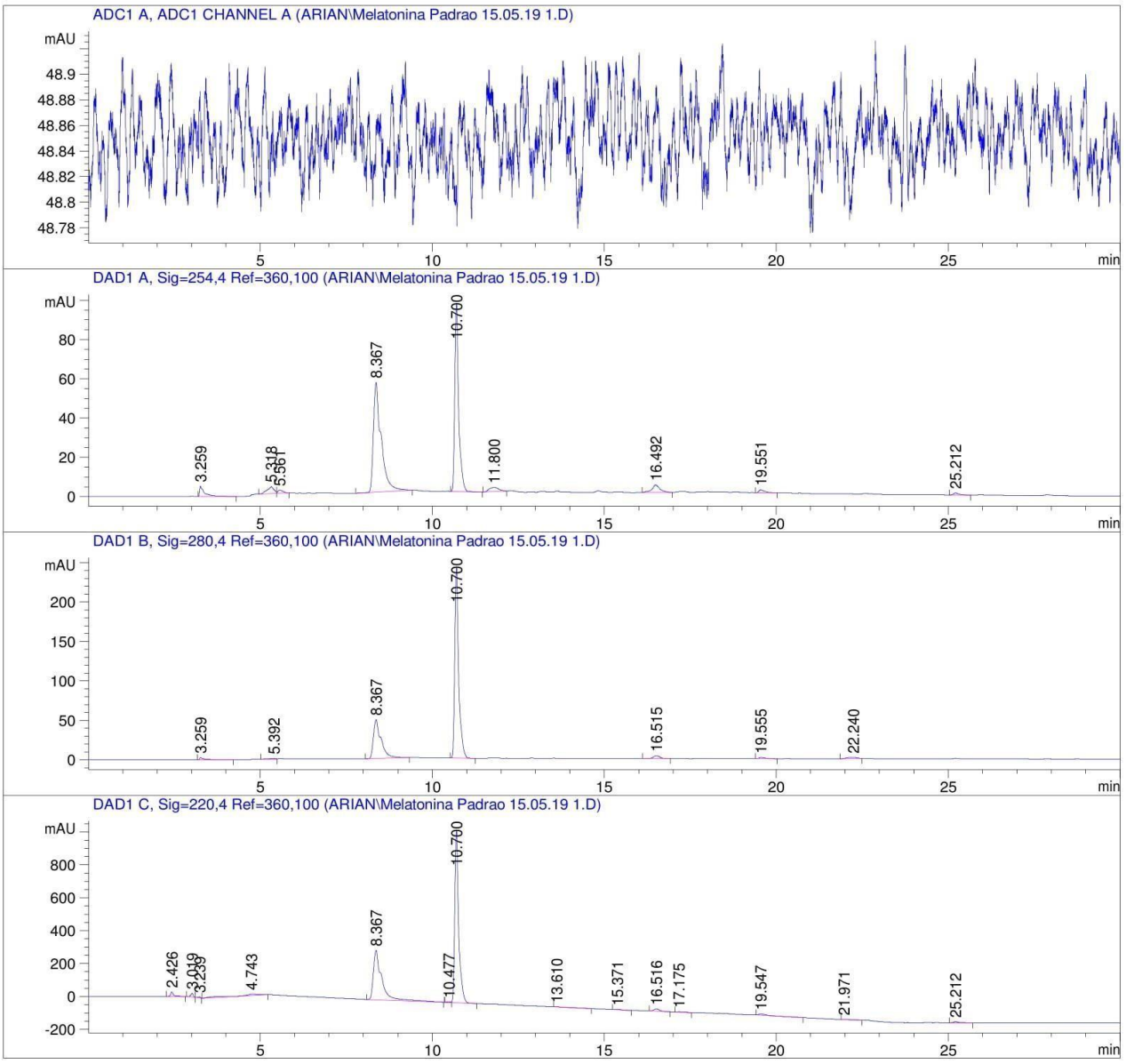
Zoom2



15. APÊNDICE H – Espectro de HPLC analítico de melatonina

Data File C:\Chem32\1\Data\ARIAN\Melatonina Padrao 15.05.19 1.D
Sample Name: F-Etil-Melatonina Padrao 15.05.19 1

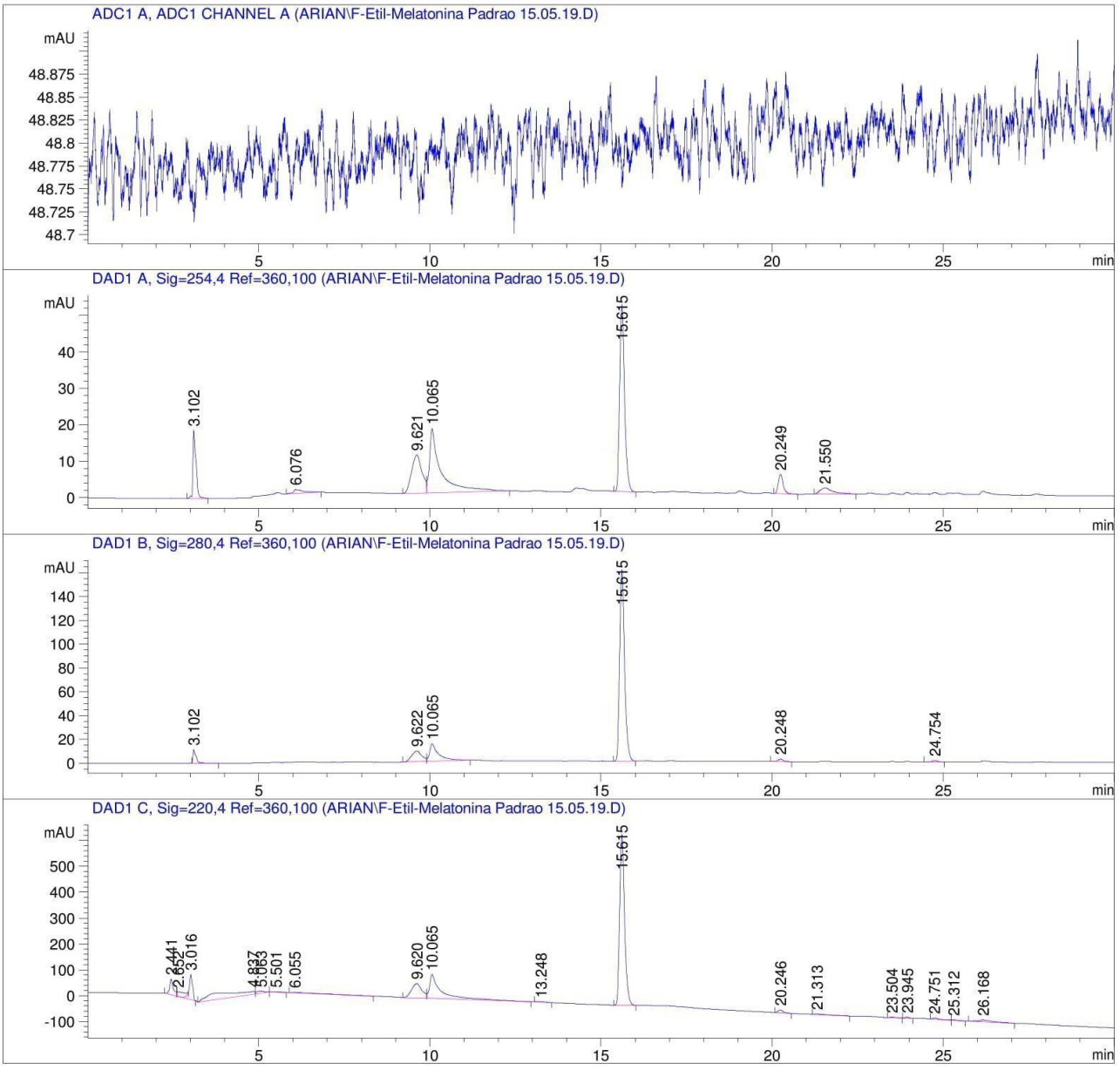
```
==================================================================
Acq. Operator   : Arian
Sample Operator : Arian
Acq. Instrument : 1260                          Location :   1
Injection Date  : 5/15/2019 1:48:26 PM
                                                Inj Volume : 20.000 µl
Method          : C:\CHEM32\1\METHODS\F-Etil-Melatonina Padrao 15.05.19.M
Last changed    : 5/15/2019 1:46:11 PM by Arian
                  (modified after loading)
Sample Info     : Melatonina Padrao 15.05.19 Gradiente 2
                  A: *agua MilliQ 0.1% TFA
                  B: acetonitrila (ACN)
                  1 mL/min 0-100% B por 30 min Inj 5 ug
                  220, 254 e 280 nm Coluna C18 Agilent 4.6x25 mm 5um
```



16. APÊNDICE I – Espectro de HPLC de Fluoroetil melatonina

Data File C:\Chem32\1\Data\ARIAN\F-Etil-Melatonina Padrao 15.05.19.D
Sample Name: F-Etil-Melatonina Padrao 15.05.19

```
==================================================================
Acq. Operator   : Arian
Sample Operator : Arian
Acq. Instrument : 1260                          Location :   1
Injection Date  : 5/15/2019 12:35:51 PM
                                                Inj Volume : 50.000 µl
Method          : C:\CHEM32\1\METHODS\F-Etil-Melatonina Padrao 15.05.19.M
Last changed    : 5/15/2019 12:30:27 PM by Arian
                  (modified after loading)
Sample Info     : F-Etil-Melatonina Padrao 15.05.19 Gradiente 1
                  A: 'agua MilliQ 0.1% TFA
                  B: acetonitrila (ACN)
                  1 mL/min 0-100% B por 30 min Inj 5 ug
                  220, 254 e 280 nm Coluna C18 Agilent 4.6x25 mm 5um
```

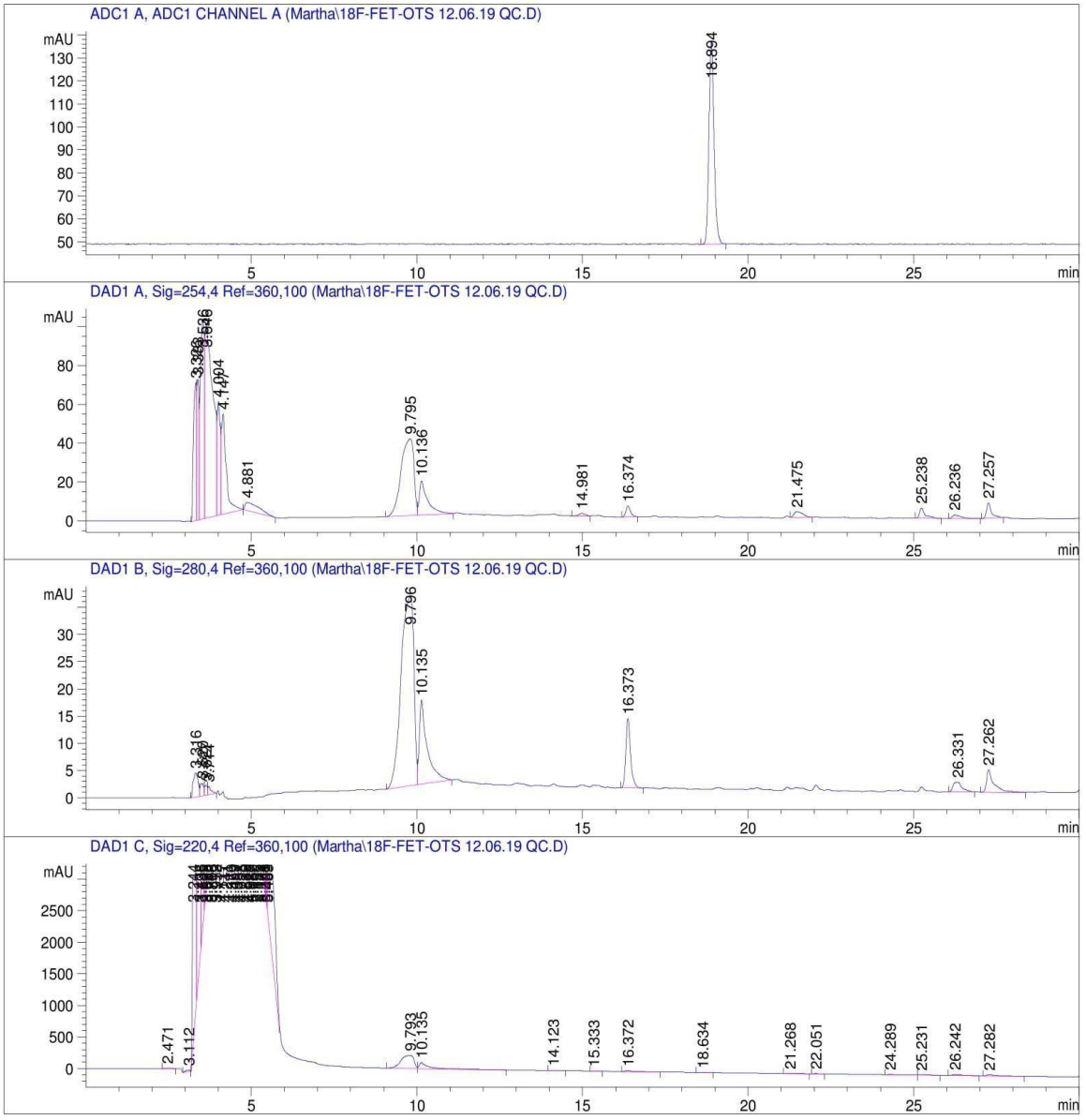


17. APÊNDICE J – Espectro de HPLC 18F Fluoroetil tosilato

Data File C:\Chem32\1\Data\Martha\18F-FET-OTS 12.06.19 QC.D
Sample Name: 18F-FET-OTS 12.06.19 QC

==========

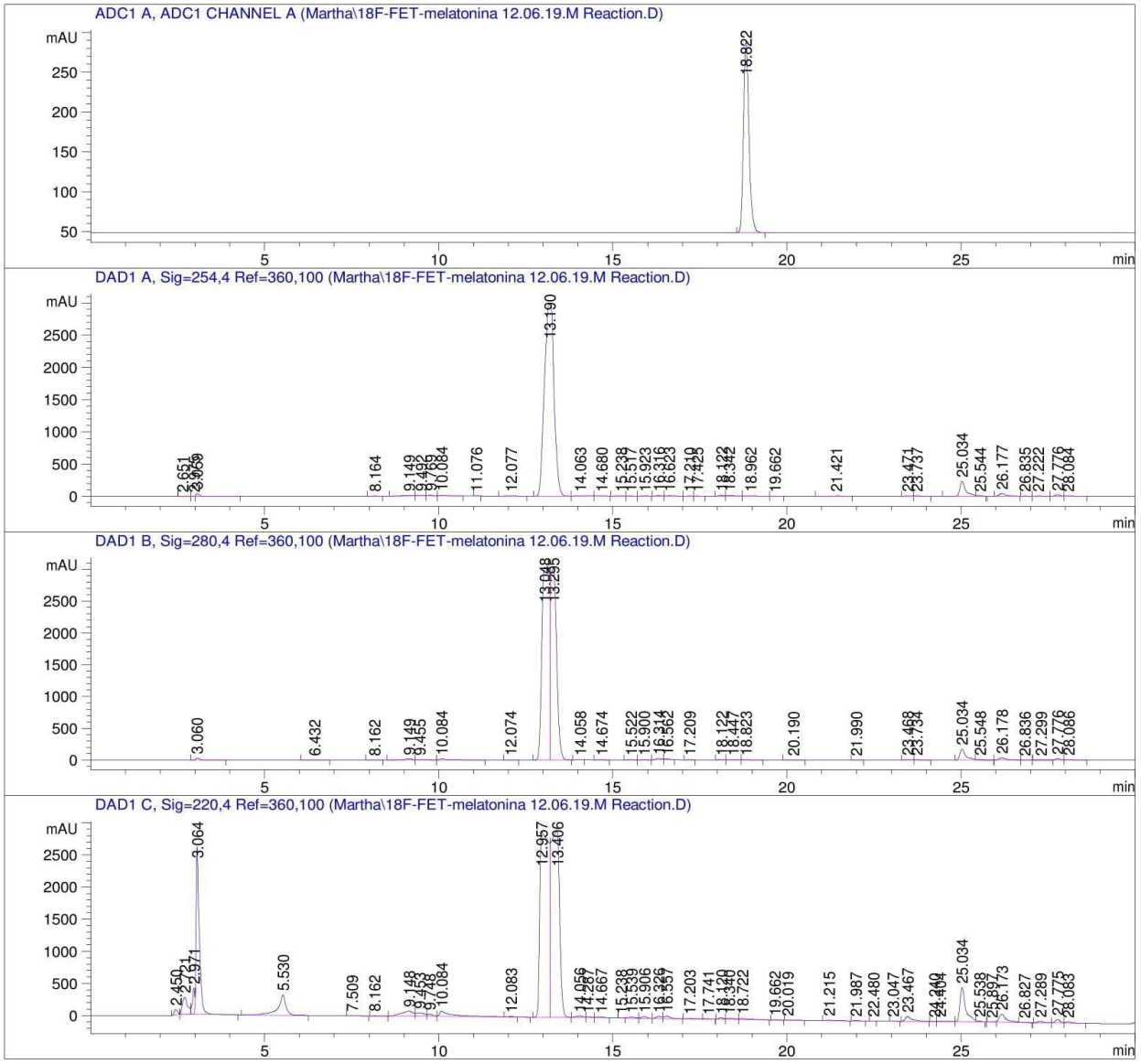
Acq. Operator :
Acq. Instrument : 1260 Location : 1
Injection Date : 6/12/2019 10:15:58 AM
Inj Volume : 100.000 µl
Method : C:\CHEM32\1\METHODS\18F-FET-OTS 12.06.19.M
Last changed : 6/12/2019 10:14:31 AM
Sample Info : 18F-FET-OTS 12.06.19 QC
Inj 100 uL,8 uCi
A: *agua MilliQ 0.1% TFA
B: acetonitrila (ACN)
1 mL/min 0-100% B de 0-30 min
220, 254 e 280 nm Coluna C18 Agilent 4.6x25 mm 5um



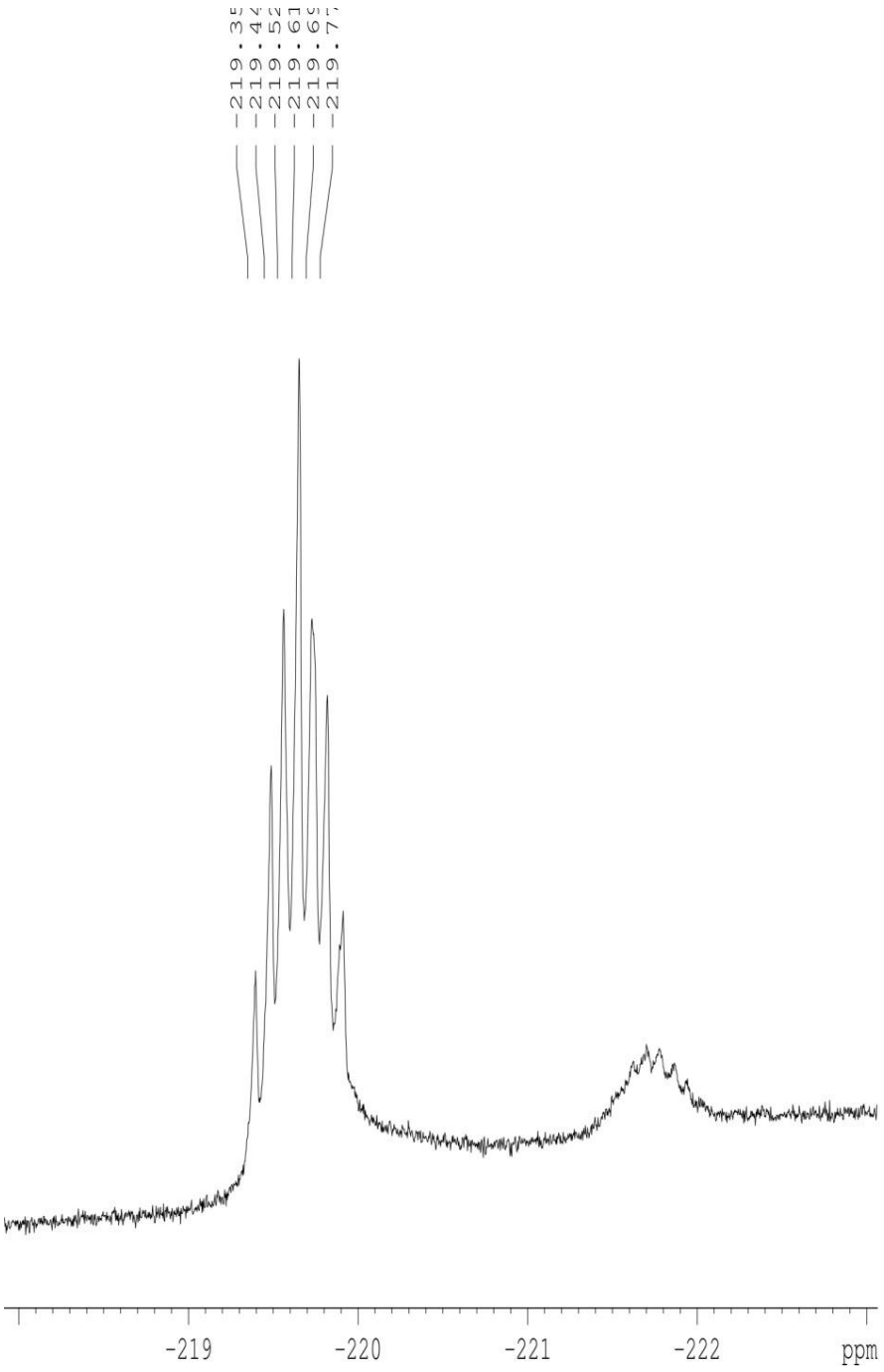
18. APÊNDICE K – Espectro de HPLC 18F Fluoroetil Melatonina

Data File C:\Chem32\1\Data\Martha\18F-FET-melatonina 12.06.19.M Reaction.D
Sample Name: 18F-FET-melatonina 12.06.19.M Reaction

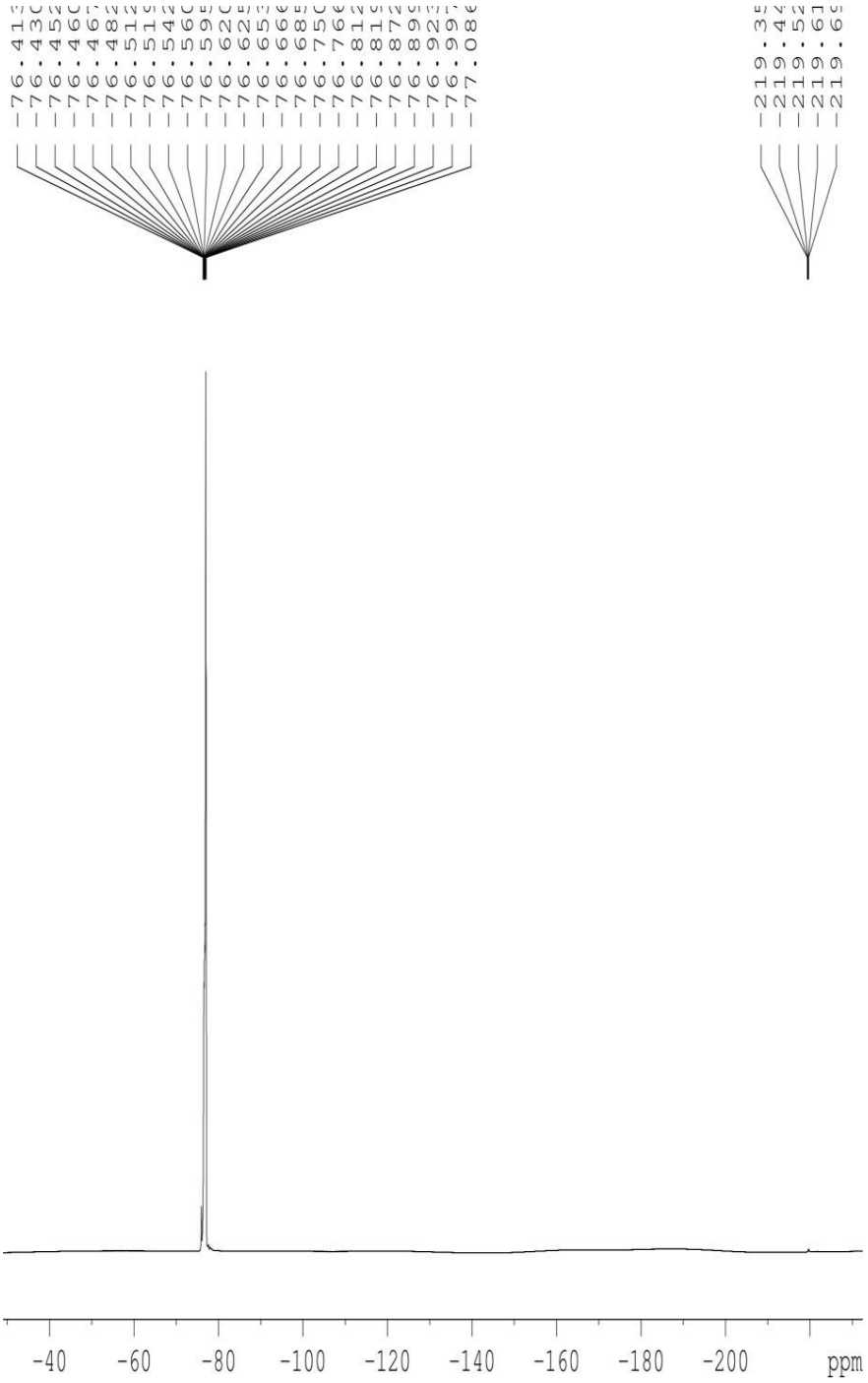
```
==================================================================
Acq. Operator   :
Acq. Instrument : 1260                          Location :   1
Injection Date  : 6/12/2019 11:12:36 AM
                                                Inj Volume : 79.000 µl
Method          : C:\CHEM32\1\METHODS\18F-FET-melatonina 12.06.19.M
Last changed    : 6/12/2019 11:09:27 AM
Sample Info     : 18F-FET-melatonina 12.06.19.M Reaction
                  Inj 79 uL,20 uCi
                  A: ˙agua MilliQ 0.1% TFA
                  B: acetonitrila (ACN)
                  1 mL/min 0-100% B de 0-30 min
                  220, 254 e 280 nm Coluna C18 Agilent 4.6x25 mm 5um
```



19. APÊNDICES L – Espectros de ^{19}F RMN de fluoroetil melatonina



```
Current Data Parameters
NAME     amostra-pad rg alto- ipen- 17-05-19-f
EXPNO                 1
PROCNO                1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20190517
Time             16.30
INSTRUM          spect
PROBHD   5 mm Multinucl
PULPROG          zgflqn
TD               131072
SOLVENT          CDCl3
NS               16715
DS                   4
SWH           57471.266 Hz
FIDRES         0.438471 Hz
AQ            1.1403764 sec
RG                1024
DW               8.700 usec
DE                6.00 usec
TE               303.0 K
D1           1.00000000 sec
TD0                  1

======== CHANNEL f1 ========
NUC1               19F
P1               11.50 usec
PL1               2.00 dB
SFO1        282.3674703 MHz

F2 - Processing parameters
SI               65536
SF          282.4043911 MHz
WDW                 EM
SSB                  0
LB               0.30 Hz
GB                   0
PC               1.00
```



```
Current Data Parameters
NAME     amostra-pad rg alto- ipen- 17-05-19-f
EXPNO                 1
PROCNO                1

F2 - Acquisition Parameters
Date_          20190517
Time             16.30
INSTRUM          spect
PROBHD   5 mm Multinucl
PULPROG          zgflqn
TD               131072
SOLVENT           CDCl3
NS                16715
DS                    4
SWH           57471.266 Hz
FIDRES         0.438471 Hz
AQ            1.1403764 sec
RG                 1024
DW               8.700 usec
DE                6.00 usec
TE               303.0 K
D1           1.00000000 sec
TD0                   1

======== CHANNEL f1 ========
NUC1               19F
P1               11.50 usec
PL1               2.00 dB
SFO1        282.3674703 MHz

F2 - Processing parameters
SI                65536
SF          282.4043911 MHz
WDW                 EM
SSB                  0
LB                0.30 Hz
GB                   0
PC                1.00
```

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.