

## 5. PART EXPERIMENTAL

### 5.1 Estudis de radiocompostos de tecneci

#### 5.1.1 Preparació de vials

Es varen preparar prèviament una sèrie de vials que contenien els lligands i altres reactius necessaris. Tots els vials es guardaren sota atmosfera de nitrogen.

En tots els vials es varen introduir 0.60  $\mu\text{mol}$  de lligand, i en alguns es va afegir també 0.13  $\mu\text{mol}$  de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Per tal de dipositar aquestes quantitats tan petites de producte dins dels vials es va procedir de la següent manera: a) pesar quantitats més elevades de producte (entre 25 i 75 mg); b) diluir en un dissolvent (3 a 5 ml); c) mesurar amb una micro-xeringa la quantitat necessària (entre 20 i 50  $\mu\text{l}$ ) per obtenir els  $\mu\text{mol}$  desitjats; d) dipositar aquest volum a dins d'un vial i evaporar el dissolvent al buit.

En la primera bateria d'experiments, amb els lligands **10**, **11** i **12**, els vials preparats contenien:

- Vial 1: 0.29 mg (0.60  $\mu\text{mol}$ ) de lligand **10**.
- Vial 2: 0.29 mg (0.60  $\mu\text{mol}$ ) de lligand **10** i 0.03 mg (0.13  $\mu\text{mol}$ ) de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
- Vial 3: 0.39 mg (0.60  $\mu\text{mol}$ ) de lligand **11**.
- Vial 4: 0.39 mg (0.60  $\mu\text{mol}$ ) de lligand **11** i 0.03 mg (0.13  $\mu\text{mol}$ ) de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
- Vial 5: 0.60 mg (0.60  $\mu\text{mol}$ ) de lligand **12**.
- Vial 6: 0.60 mg (0.60  $\mu\text{mol}$ ) de lligand **12** i 0.03 mg (0.13  $\mu\text{mol}$ ) de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

En la segona bateria d'experiments es varen usar els lligands **2**, **3**, **4** i **8** i els vials preparats contenien:

- Vial 1: 0.36 mg (0.60  $\mu\text{mol}$ ) del lligand **2** i 0.03 mg (0.13  $\mu\text{mol}$ ) de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
- Vial 2: 0.57 mg (0.60  $\mu\text{mol}$ ) del lligand **3** i 0.03 mg (0.13  $\mu\text{mol}$ ) de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
- Vial 3: 0.27 mg (0.60  $\mu\text{mol}$ ) del lligand **4** i 0.03 mg (0.13  $\mu\text{mol}$ ) de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
- Vial 4: 0.19 mg (0.60  $\mu\text{mol}$ ) del lligand **8** i 0.03 mg (0.13  $\mu\text{mol}$ ) de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Finalment en l'últim experiment es va usar la difosfina **18** i es prepararen 3 vials per separat cadascun amb un dels reactius:

- Vial 1: 28 mg de lligand **18** per dissoldre en 10 ml de EtOH i agafar 100  $\mu\text{l}$  (0.60  $\mu\text{mol}$ ).
- Vial 2: 30 mg  $\text{SnCl}_2$  per dissoldre en 5 ml de solució salina fisiològica 0.05M HCl i agafar 5  $\mu\text{l}$  (0.13  $\mu\text{mol}$ ).

- Vial 3: 100 mg de D-gluconat de sodi per dissoldre en 5 ml de solució salina fisiològica i agafar 50 µl (4.58 µmol).

### 5.1.2 Formació dels radiocompostos de tecneci

Aquesta part ha estat realitzada per personal especialitzat del Departament de Medicina Nuclear de l'Hospital Clínic de Barcelona.

En els experiments amb els lligands **10**, **11** i **12** es va seguir el següent procediment: s'injecta amb agitació a cada un dels vials preparats 3 ml d'una solució salina fisiològica (0.9% NaCl, pH = 5.5) de l'ordre de 0.01 µmol/l de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (entre 30 i 50 mCi/3ml). Aquesta concentració depèn del moment en el que s'ha eluït del generador i del temps transcorregut després de l'elució. Una vegada injectat el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  es procedeix a realitzar una cinètica de la reacció. S'agafen mostres a l'inici de l'experiment i als minuts 15, 30, 60 i 120. S'analitzen totes les mostres mitjançant tres tècniques: cromatografia en placa sílica-Gel, cromatografia en placa C-18 i cromatografia Sep-Pak<sup>®</sup> C-18 (Waters Corporation, USA).

- Cromatografia en placa sílica-gel: es varen utilitzar plaques amb suport de vidre de 20 cm de llargada. L'eluent fou una mescla 75:25 de metanol:aigua. El revelat de les plaques es va realitzar amb un radiocromatògraf de capa fina.

- Cromatografia en placa C-18: es varen utilitzar també plaques amb suport de vidre de 20 cm de llargada. L'eluent fou una mescla 65:35 de diclorometà: acetona. Pel revelat de les plaques es va fer servir també un radiocromatògraf de capa fina.

- Cromatografia Sep-Pak<sup>®</sup> C-18: en aquesta cromatografia s'utilitza un cartutx Sep-Pak<sup>®</sup> d'1.2 cm de llargada ple de sílica alquilada (C-18). Primer es fan passar 10 ml de metanol pel cartutx mitjançant una xeringa, després s'hi passen 10 ml de solució salina fisiològica i a continuació s'asseca fent-hi passar aire. Tot seguit es dipositen en el cartutx 100 µl de la solució del radiocompost que es vol estudiar i s'hi fan passar 10 ml de solució salina (aquosa), la qual s'analitza mitjançant un microcurímetre. Després s'hi passen 10 ml de metanol que també s'analitzen i finalment es determina l'activitat que queda en el producte retingut en el cartutx (residu).

En els experiments amb els lligands **2**, **3**, **4** i **8** es va seguir el mateix procediment, amb la diferència que es varen agafar mostres a l'inici i als 60 minuts de l'experiment. En aquest cas les tècniques cromatogràfiques emprades foren: placa sílica-gel, cartutx Sep-Pak<sup>®</sup> C-18 i paper Whatman. En les dues primeres tècniques es va seguir el procediment ja comentat.

- Cromatografia en paper Whatman: es varen utilitzar tires de paper Whatman 1 de 20 cm de llargada. L'eluent fou acetat d'etil i pel revelat es va usar un radiocromatògraf de capa fina.

L'experiment amb el lligand **18** es va realitzar d'una forma diferent, ja que es varen preparar els diferents reactius en vials per separat. A continuació es varen dissoldre tal i com s'ha especificat en l'apartat 5.1.1, es mesclaren les quantitats de cada vial, i s'hi varen afegir 3 ml d'una solució salina fisiològica (0.9% NaCl, pH = 5.5) aproximadament 0.01 mol/l de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (20 mCi/3 ml). Tot seguit es varen agafar mostres a l'inici de la reacció, als 30 i als 60 minuts i s'analitzaren mitjançant les quatre tècniques cromatogràfiques ja comentades.

### 5.1.3 Marcatge de leucòcits

Per tal de realitzar el marcatge de leucòcits primer de tot es sintetitzen el radiocompostos tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior. Els leucòcits es separen dels hematies mitjançant l'ús del reactiu HESPAN. Es prenen uns 10-15 ml de solució salina fisiològica amb leucòcits i es realitza un procés de centrifugat durant 5 minuts a unes 1400 rpm amb el que s'obtenen en el fons del recipient els leucòcits. Tot seguit es porta a terme una resuspensió afegint 1 ml de solució salina fisiològica. En aquest punt s'addiciona una dosi aproximada d'entre 10 i 20 mCi en 2ml de radiocompost preparat unes dues hores abans. Es deixa un període d'incubació d'uns 20 minuts i a continuació es realitza un altre centrifugat (1400 rpm, 5 min). Es retira el líquid sobrenedant i es renten els leucòcits dues vegades successives amb 1 ml de solució salina fisiològica sense resuspendre. S'analitza la radiació emesa pels leucòcits i pel líquid sobrenedant. Es realitza un altre rentat dels leucòcits al cap d'una hora amb 10 ml de solució salina fisiològica, centrifugant a continuació per tornar a separar el líquid sobrenedant dels leucòcits per tal de ser analitzats novament. En funció del resultat es realitzen un o dos rentats més.

### 5.1.4 Estudis "in vivo" en rates de laboratori

Aquest estudi es va realitzar conjuntament amb el Dr. Carlos Piera i el Dr. Josep Queralt de la facultat de Farmàcia de Barcelona. Es varen emprar els radiocompostos formats amb el lligand **18** d'aquest treball i amb 3 lligands sintetitzats en el nostre grup de recerca (**19**, **20** i **21**). Es varen utilitzar quatre rates que eren germanes i pesaven uns 350 g.

Primer de tot es va procedir a la síntesi dels quatre radiocompostos realitzant un control de qualitat mitjançant cromatografia en placa de sílica-gel, en placa C-18 i amb cartutxos Sep-Pak<sup>®</sup> C-18. Al cap d'uns 75 minuts de la síntesi, cada un dels

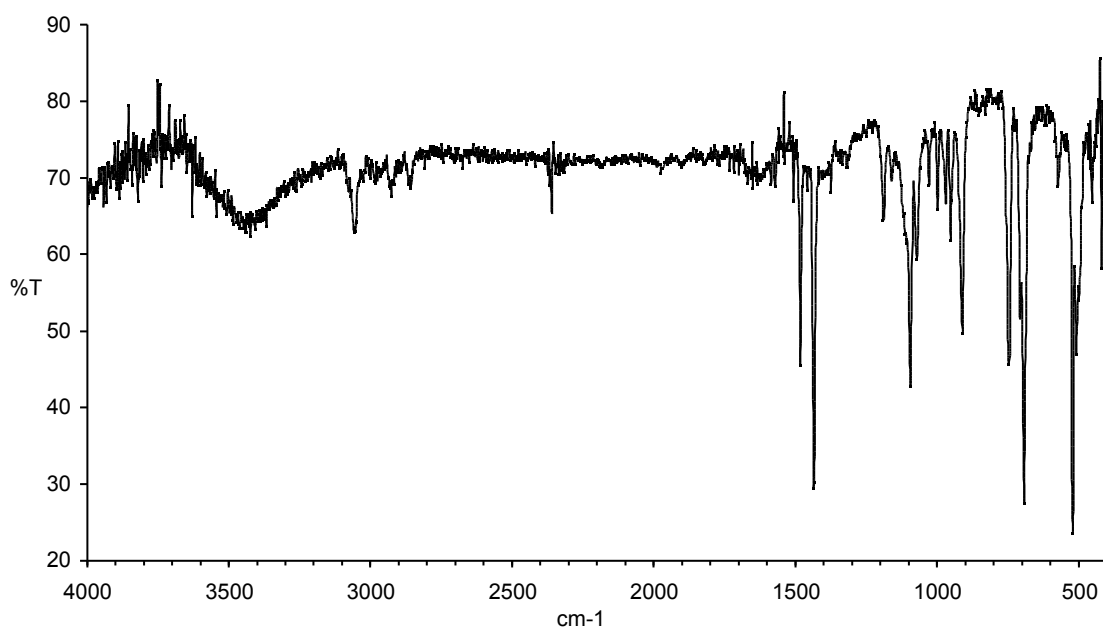
radiocompostos va ser injectat a la jugular d'una de les rates prèviament anestesiada. La dosi empleada va ser aproximadament de 300  $\mu\text{Ci}/350 \mu\text{l}$ . Al cap de 30 i 90 minuts de la injecció es varen realitzar gammagrafies de la part posterior i anterior de cada una de les rates. Una vegada finalitzades les gammagrafies es va procedir al sacrifici de les rates per tal d'extreure mostres dels seus cors, fetges, ronyons i músculs. Aquestes mostres varen ser pesades i analitzades amb un detector de radioactivitat.

## 5.2 Síntesi de compostos de reni

### 5.2.1 Síntesi de $[\text{ReOCl}_2(\text{OEt})(\text{PPh}_3)_2]$ <sup>168,169</sup>

Tot el procés es realitza a l'aire.

S'afegeixen 10 g de trifenilfosfina (38 mmol) sobre 50 ml d'etanol en un baló de 250 ml. Per una altra banda es dissolen 2 g de  $\text{NH}_4\text{ReO}_4$  (7.46 mmol) sobre 5.25 ml d'àcid clorhídric 35% (60 mmol) i tot seguit s'addicionen sobre la primera mescla. La solució pren un color verdós. Es connecta el baló a un refrigerant i es porta la mescla a refluir durant 15 minuts. Aquesta operació comporta un augment de la intensitat del color verd de la solució. Es deixa refredar a temperatura ambient, es filtra, es renta el precipitat dues vegades amb 20 ml d'etanol i dues vegades amb 20 ml d'èter i s'asseca el producte verd  $[\text{ReOCl}_2(\text{OEt})(\text{PPh}_3)_2]$ . Se n'obtenen 6.13 g amb un rendiment del 98%.



**Figura 245:** espectre IR del compost  $[\text{ReOCl}_2(\text{OEt})(\text{PPh}_3)_2]$  en pastilla de KBr

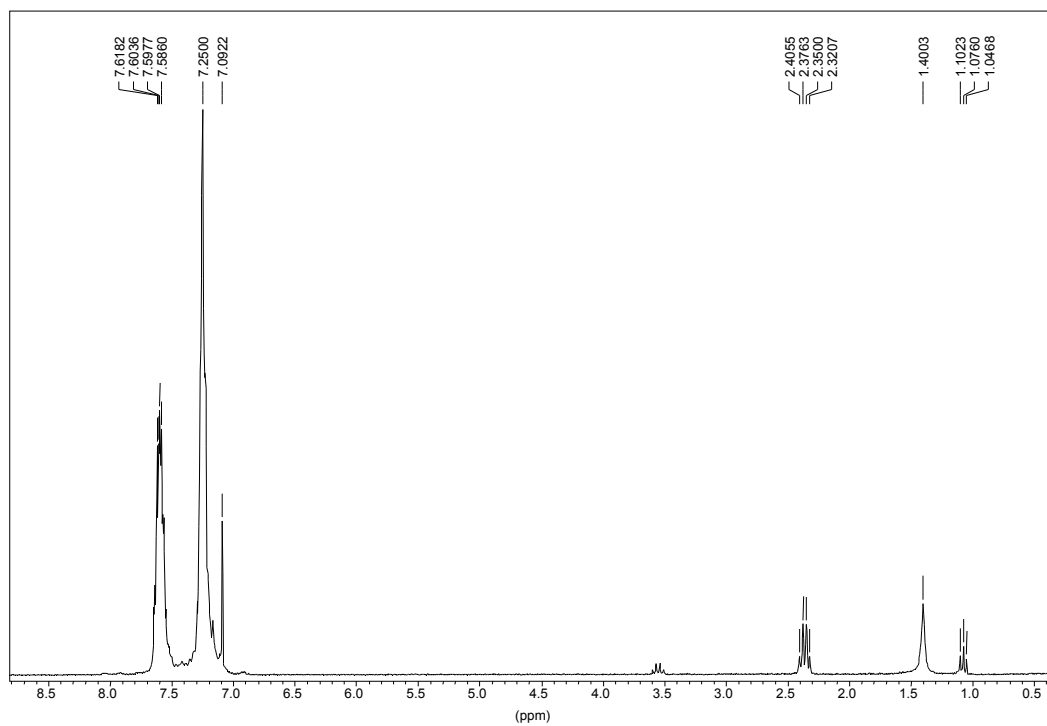


Figura 246: espectre de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compost  $[\text{ReOCl}_2(\text{OEt})(\text{PPh}_3)_2]$

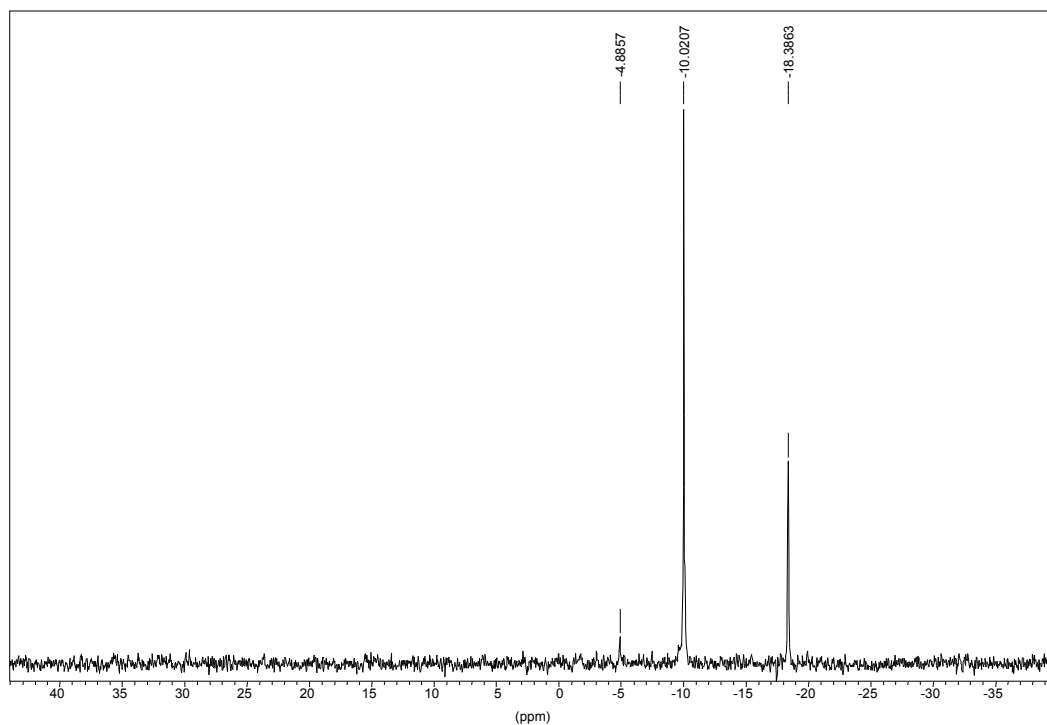
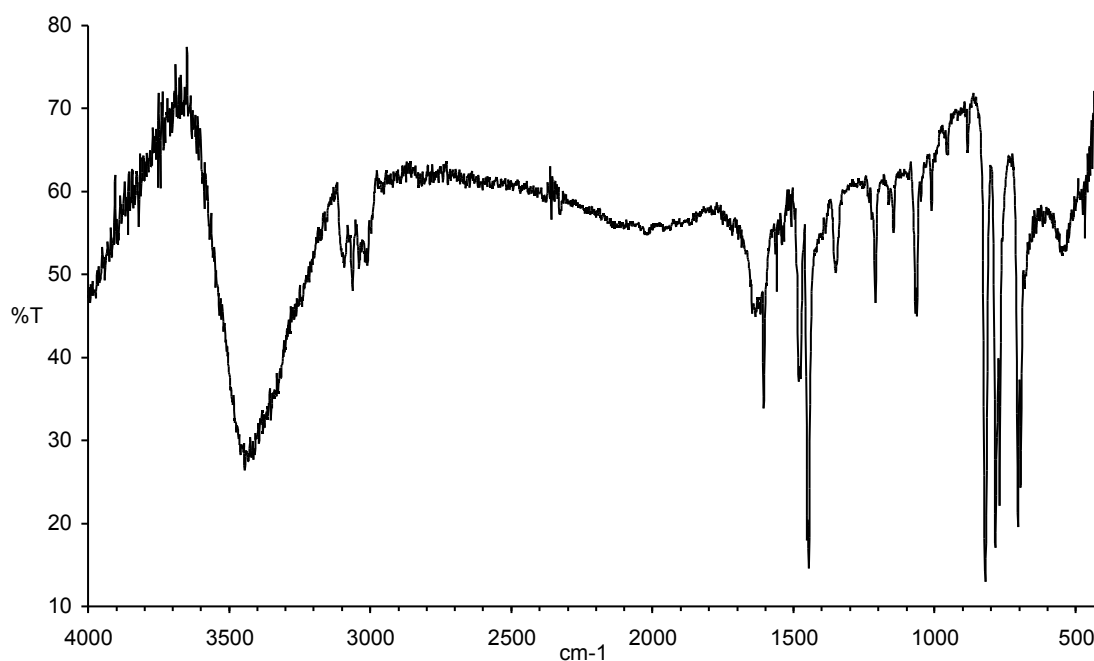


Figura 247: espectre de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) del compost  $[\text{ReOCl}_2(\text{OEt})(\text{PPh}_3)_2]$

### 5.2.2 Síntesi de $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ <sup>168,169</sup>

Aquest procés també es realitza a l'aire.

Es posen 6 g de  $[\text{ReOCl}_2(\text{OEt})(\text{PPh}_3)_2]$  (7.12 mmol) en un baló de 250 ml i s'hi afegeixen 100 ml d'etanol i després 30 ml de piridina (372.8 mmol) gota a gota amb agitació. Es connecta el baló a un refrigerant i es porta la mescla de reacció a reflux durant 2 hores i el color verd de la solució inicial passa a grana. Es redueix el volum a una tercera part i comença a precipitar un producte groc-ataronjat. S'acaba de precipitar afegint una mica d'èter. Es filtra, es renta amb èter i s'asseca a l'aire. S'obtenen 3.4 g de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (rendiment 80%).



**Figura 248:** espectre IR del compost  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en pastilla de KBr

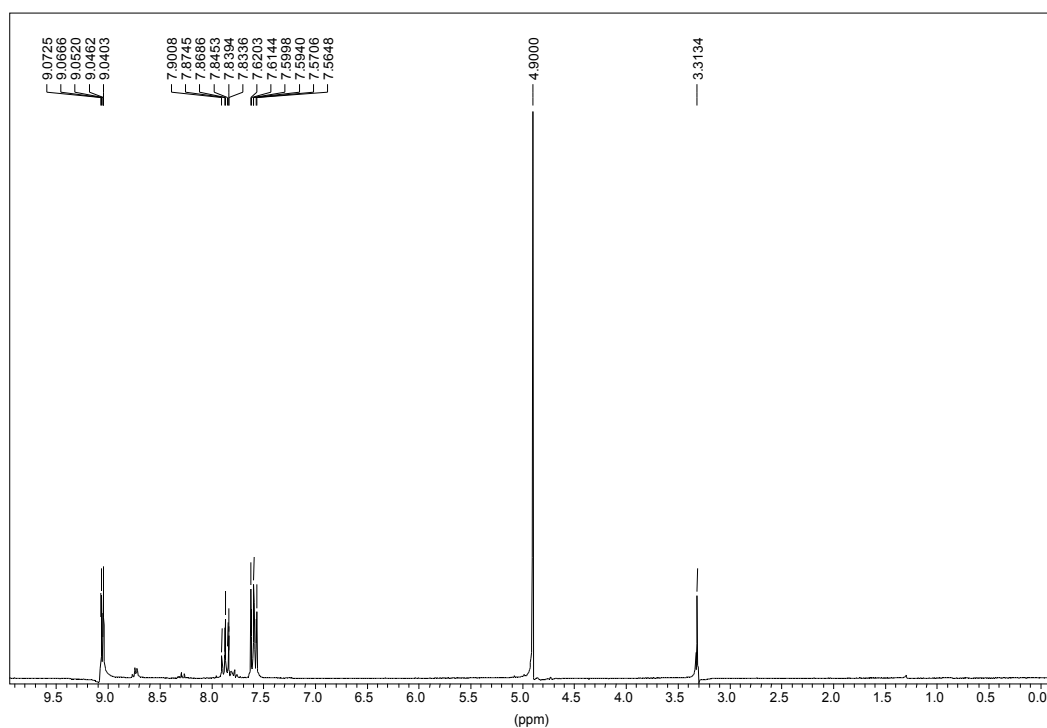


Figura 249: espectre de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compost  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

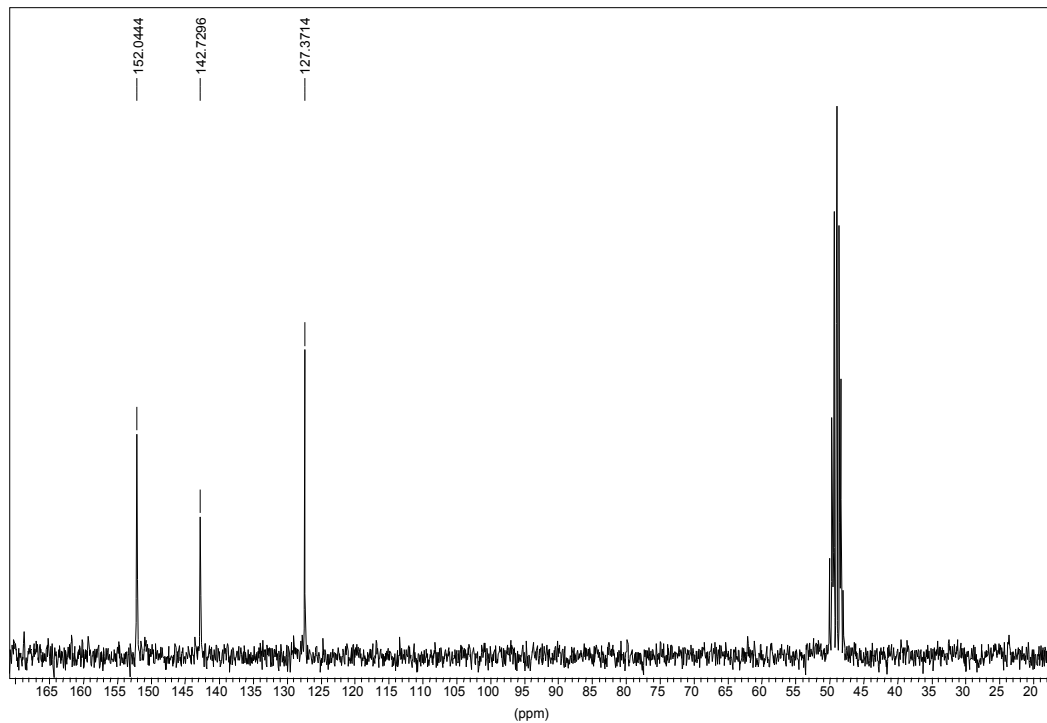


Figura 250: espectre de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compost  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

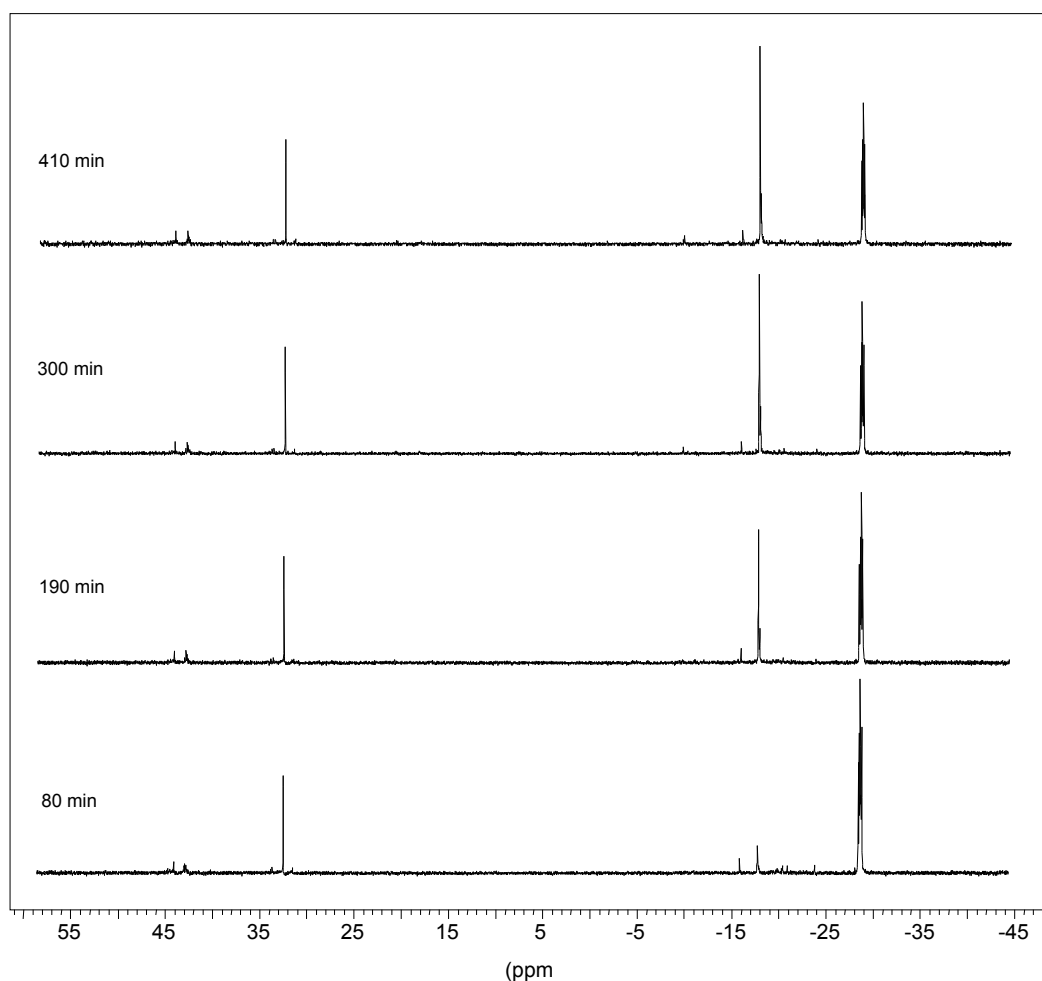


### 5.2.3 Reacció del $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ amb el lligand 11

Aquesta reacció es va realitzar en diferents relacions estequiomètriques com es detalla a continuació.

#### Reacció d'un mol de $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ amb 4 mol de lligand en tub de RMN:

Es varen dissoldre 0.075 g (0.12 mmol) de lligand en 0.5 ml de metanol deuterat dins d'un tub de RMN (es va enregistrar un espectre  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN). Tot seguit s'hi varen afegir 0.016 g (0.03 mmol) de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  i es va agitar. Es va introduir el tub de RMN dins de l'aparell (AM-400) i es varen enregistrar 3 espectres  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN a temperatura ambient (un cada 15 min). A continuació es va augmentar la temperatura fins a 40°C i s'enregistraren 25 espectres (un cada 36 min. aproximadament). Al final de l'experiment no s'observà cap canvi de coloració en la solució resultant de la reacció.

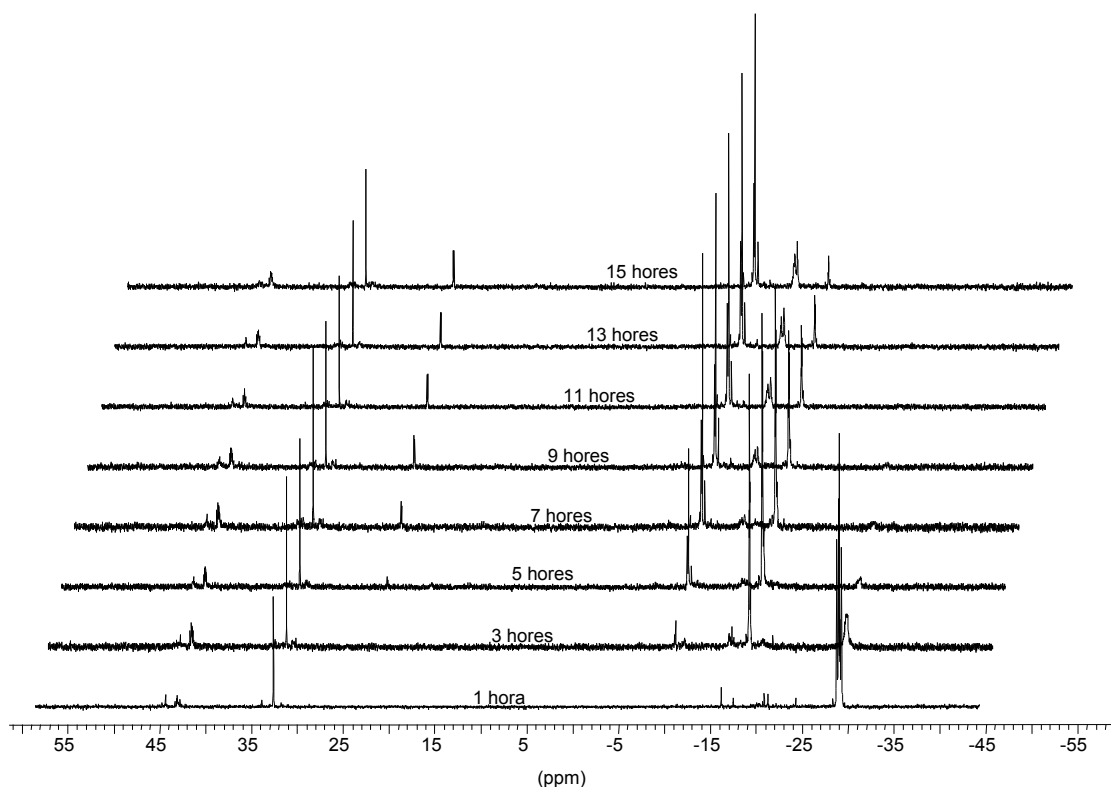


**Figura 251:** espectres de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) durant la reacció d'un mol de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  amb 4 mol de lligand 11

**Reacció d'un mol de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  amb 2 mol de lligand en tub de RMN:**

Es va repetir la reacció anterior en tub de RMN però amb una relació estequiomètrica 1:2 (metall:ligand).

Aquesta vegada es va emprar la mateixa quantitat de precursor, 0.016 g (0.03 mmol), i 0.037 g (0.06 mmol) de lligand fosfina. Es va enregistrar un primer espectre de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN del lligand. A continuació es va realitzar la mescla de reacció i es varen enregistrar dos espectres més, un cada 30 min, a temperatura ambient. A partir d'aquest moment s'augmentà la temperatura a 40°C i s'enregistraren 16 espectres més, un cada hora. Al final de l'experiment tampoc s'observà cap canvi de coloració en la solució resultant de la reacció.

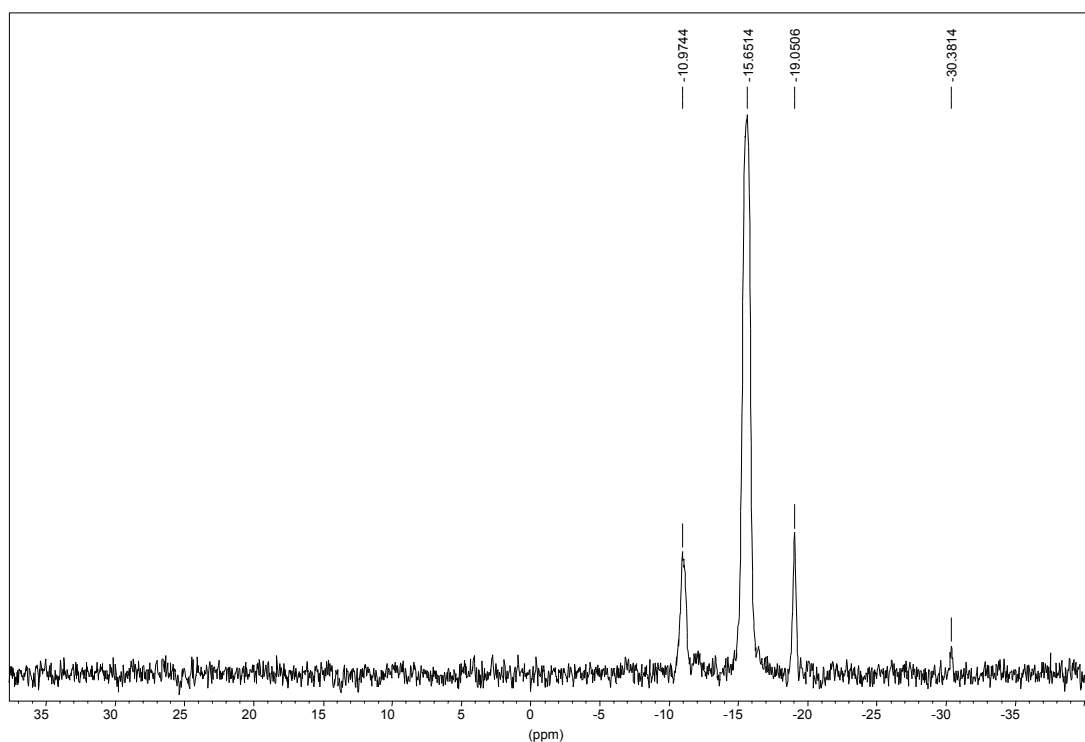


**Figura 252:** espectres de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) durant la reacció d'un mol de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  amb 2 mol de lligand **11**

### 5.2.4 Reacció del $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ amb el lligand **16**

Es realitza tot el procés en atmosfera inert i amb el dissolvent desgasat.

Es dissolen per una banda 0.246 g (0.41 mmol) de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 10 ml de metanol. Per altra banda es prepara una dissolució amb 0.314 g (0.82 mmol) de lligand **16** en 10 ml de metanol que es barreja amb l'anterior, obtenint una solució resultant de color vermell ataronjat. Es deixa el sistema en agitació en un bany a 40°C durant 18 h, obtenint una solució fosca de color marró-negre amb una mica de precipitat blanc. Es realitza l'espectre de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN de la solució anterior afegint un capil·lar de deuterioacetona.



**Figura 253:** espectre de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OH}$  + capil·lar de deuterioacetona) de la reacció d'un mol de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  amb 2 mol de lligand **16**

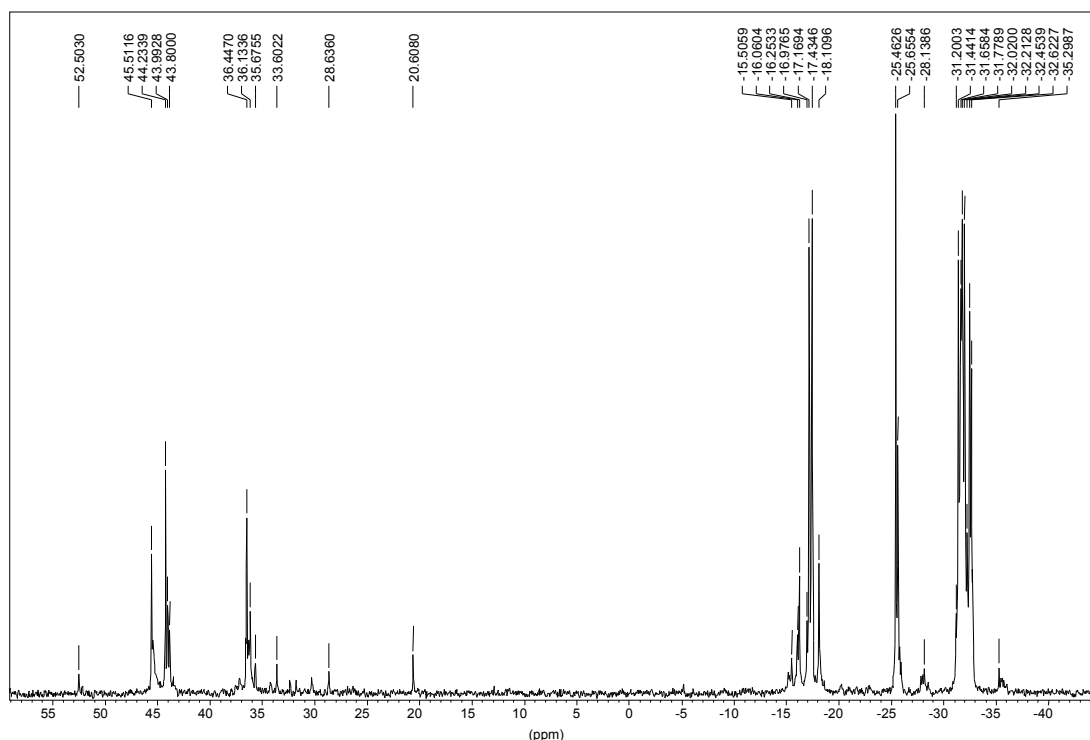
### 5.2.5 Reacció del $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ amb el lligand difosfina **18**

Aquesta reacció es realitza sota atmosfera de nitrogen i el dissolvent emprat és prèviament desgasat.

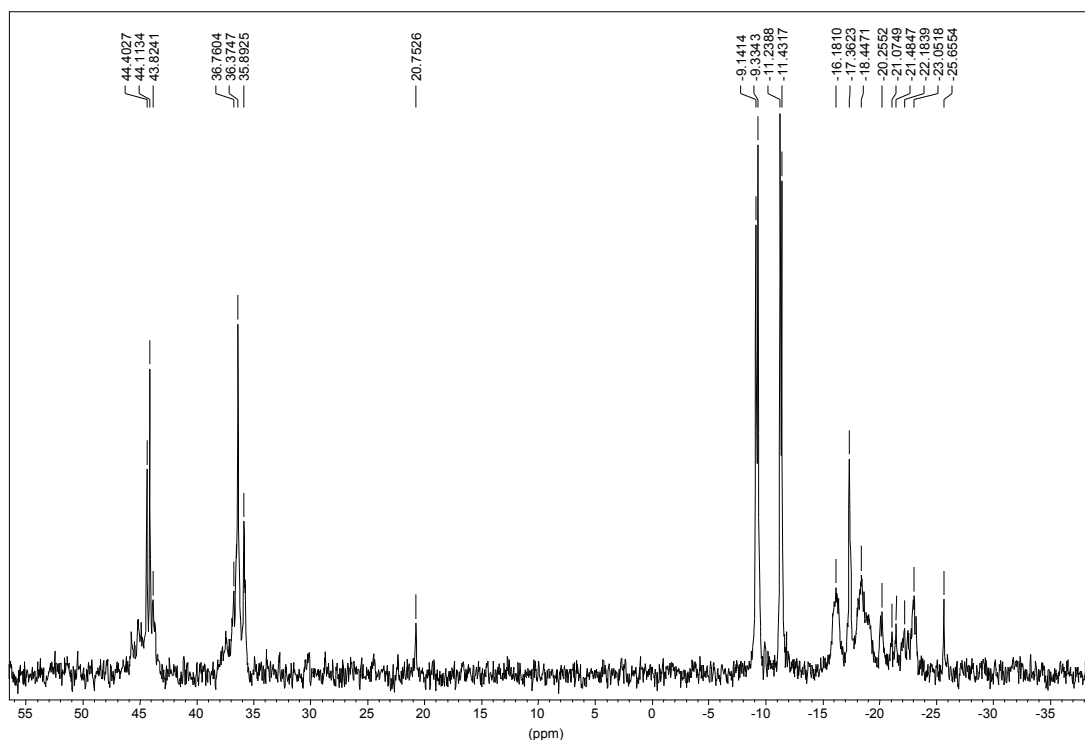
#### Reacció d'un mol de $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ amb dos mol de lligand en etanol:

Es dissolen 0.100 g (0.16 mmol) de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 20 ml d'etanol i afegim 0.170 g (0.36 mmol) de lligand **18**, el qual es va dissolen lentament (solució color taronja). Deixem la mescla de reacció en agitació a temperatura ambient durant 24 h. Durant aquest temps no s'aprecia canvi de color en la dissolució. S'evapora el dissolvent obtenint un precipitat de color taronja. Es va realitzar l'espectre  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN (Figura 254).

Es va tornar a dissoldre en etanol el precipitat obtingut de l'evaporació anterior i es va portar el sistema a reflux. Al cap de poca estona de refluir (20 min) s'observa que la solució s'enfosqueix ràpidament. Es va aturar el reflux i es va evaporar el dissolvent obtenint un precipitat de color verd marró. Es va dissoldre aquest producte en  $\text{CD}_3\text{OD}$  obtenint una solució una mica tèrbola, es va filtrar i es va realitzar l'espectre  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN (Figura 255).



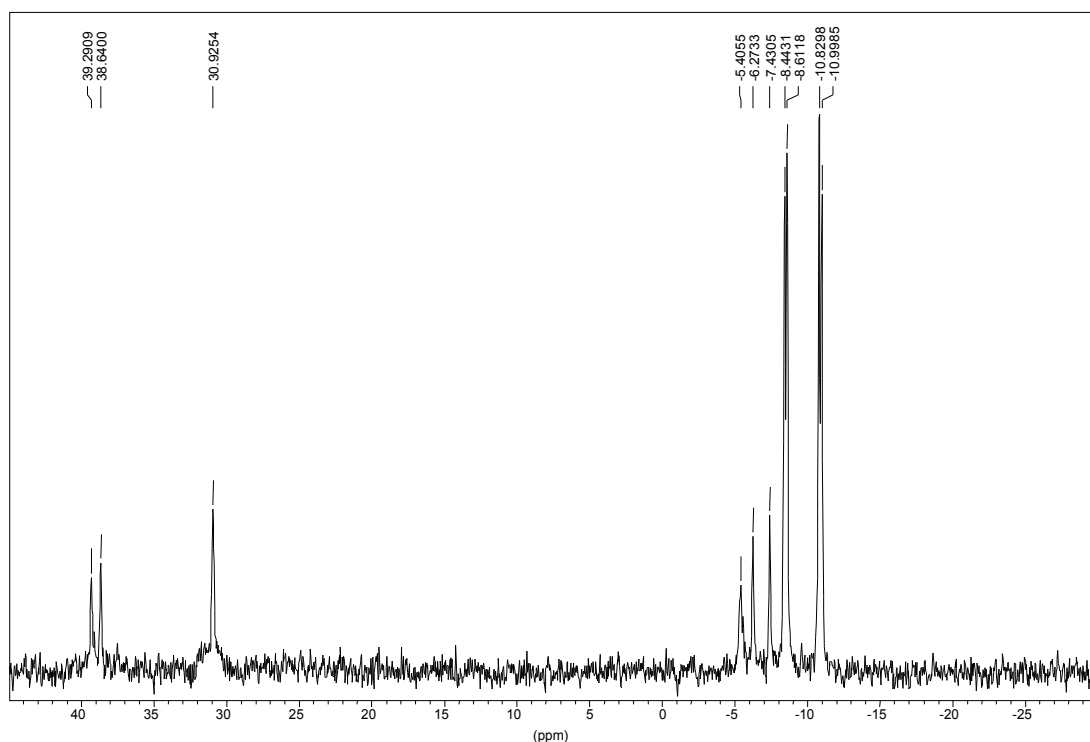
**Figura 254:** espectre de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la reacció d'un mol de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  amb 2 mol de lligand difosfina **18** en etanol a temperatura ambient



**Figura 255:** espectre de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la reacció d'un mol de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  amb 2 mol de lligand difosfina **18** en etanol a reflux

### Reacció d'un mol de $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ amb un mol de lligand en $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :

Es dissolen 0.060 g (0.1 mmol) de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 20 ml de diclorometà. Per altra banda es dissolen 0.046 g (0.1 mmol) del lligand en 10 ml de diclorometà, quedant la solució una mica tèrbola. S'addiciona la solució de lligand poc a poc sobre la del precursor metàl·lic amb agitació, observant-se una coloració taronjada en la dissolució resultant. Tot seguit es connecta un refrigerant al sistema i s'escalfa la mescla de reacció a  $30^\circ\text{C}$ . Al cap de 4 dies de reacció s'observa que el color de la dissolució ha anat canviant des del taronja inicial fins a un grana. Es va concentrar a la meitat del volum i es va realitzar l'espectre  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN.

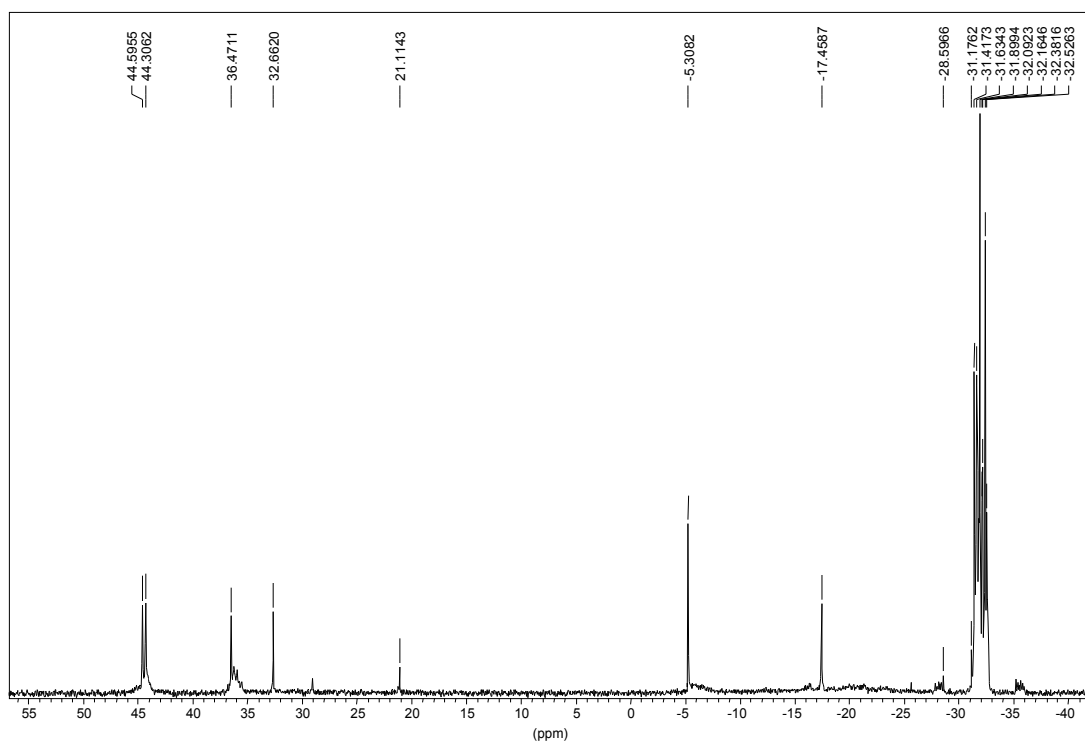


**Figura 256:** espectre de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  amb capil·lar de  $\text{C}_2\text{D}_6\text{O}$ ) de la reacció d'un mol de  $[\text{ReO}_2(\text{C}_5\text{H}_5\text{N})_4]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  amb 1 mol de lligand difosfina **18**

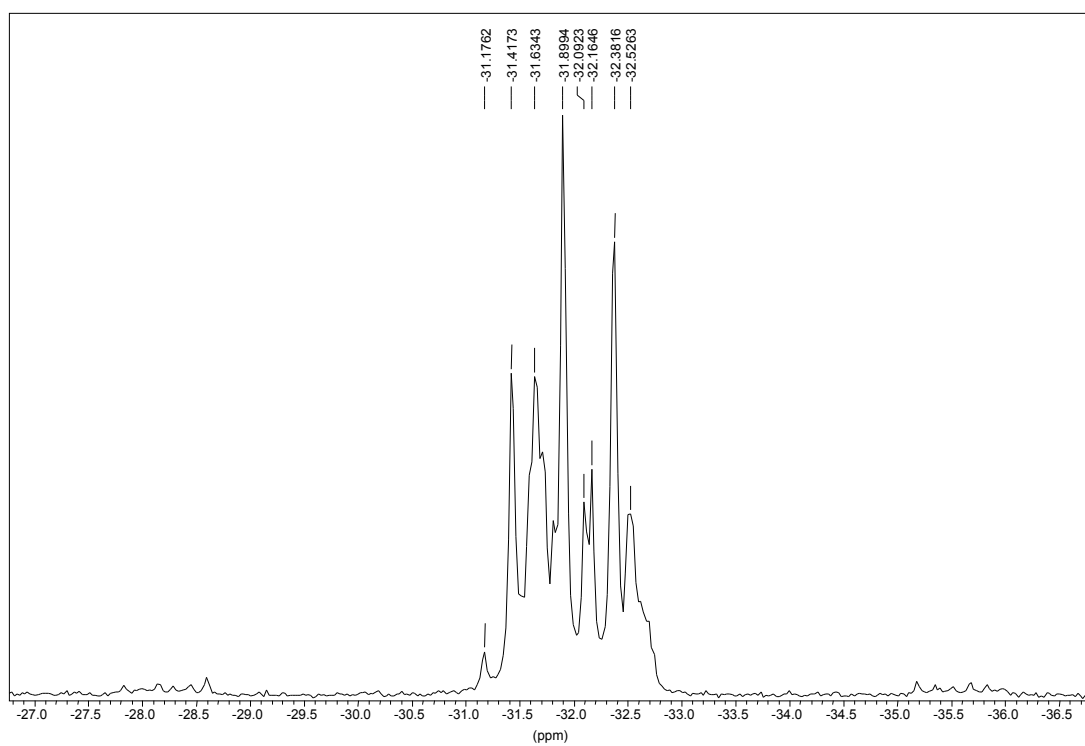
### 5.2.6 Reacció del $[\text{ReO}_2\text{I}(\text{PPh}_3)_2]$ amb el lligand difosfina **18**

Es va realitzar la reacció sota atmosfera de nitrogen i els dissolvents emprats es varen desgasar prèviament.

Es dissolen 0.200 g (0.23 mmol) de  $[\text{ReO}_2\text{I}(\text{PPh}_3)_2]$  en 5 ml de diclorometà. Per altra banda es dissolen 0.214 g (0.46 mmol) del lligand **18** en 5 ml d'aigua i s'addicionen gota a gota sobre la dissolució del precursor. La solució sembla que s'enterboleix una mica. Es deixa el sistema en agitació durant 30 minuts i a continuació se separen les dues fases, s'evaporen i es realitzen els espectres de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN (l'espectre de la fase orgànica, que no es mostra, conté un únic senyal majoritari aproximadament a  $-5$  ppm). Es va intentar obtenir cristalls del complex sòlid obtingut (fase aquosa) sense èxit.



**Figura 257:** espectre de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la reacció d'un mol de  $[\text{ReO}_2(\text{PPh}_3)_2]$  amb 2 mol de lligand **18**



**Figura 258:** ampliació de la zona -27 a -36 ppm de l'espectre anterior (Figura 257)