



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 826677 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6 )  
C07D273/00 A G01N033/84 B

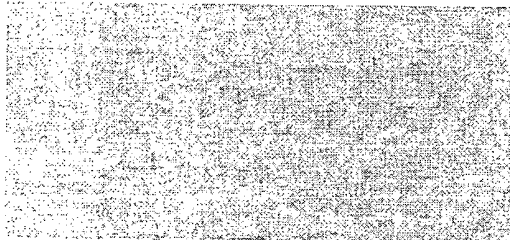
(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

<b>(22) Data de depósito:</b> 1997.08.14	<b>(73) Titular(es):</b> JOHNSON & JOHNSON CLINICAL DIAGNOSTICS, INC. 100 INDIGO CREEK DRIVE ROCHESTER NEW YORK 14650 US
<b>(30) Prioridade:</b> 1996.08.15 US 698316	<b>(72) Inventor(es):</b> WAYNE WOODROW WEBER, II US CALVIN ROMAN MESSING US MARGARET ELIZABETH LOGAN US
<b>(43) Data de publicação do pedido:</b> 1998.03.04	<b>(74) Mandatário(s):</b> PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT
<b>(45) Data e BPI da concessão:</b> 2001.10.24	

(54) *Epígrafe:* CROMOIONÓFOROS DIAZA-18-COROA-6-ÉTER ESPECÍFICOS PARA O CÁLCIO

(57) *Resumo:*

CROMOIONÓFOROS DIAZA-18-COROA-6-ÉTER ESPECÍFICOS PARA CÁLCIO



## DESCRIÇÃO

### "CROMOIONÓFOROS DIAZA-18-COROA-6-ÉTER ESPECÍFICOS PARA O CÁLCIO"

A presente invenção refere-se ao campo da química clínica, particularmente aos novos compostos para utilização nos ensaios de cálcio e às composições analíticas, elementos e métodos para utilização dos mesmos.

#### TÉCNICA ANTERIOR

Os ensaios analíticos para a determinação do conteúdo em cálcio têm aplicação em vários campos. Uma aplicação importante é no campo da química clínica em que a medição dos níveis de cálcio em fluídos biológicos como o soro pode ser utilizada para fins de diagnóstico como indicação de determinadas situações patológicas. Por exemplo, cálcio elevado no soro pode ser uma indicação de alterações nas glândulas paratiróide e tiróide, em sarcoidose e em muitos carcinomas metastizantes. A hipercalcemia está também relacionada com a osteoporose, os carcinomas osteoplásticos, a pancreatite aguda e a acidose.

Os níveis de cálcio podem ser determinados quantitativamente utilizando vários métodos analíticos. Em geral, os procedimentos colorimétricos directos que envolvem a complexação de uma matéria corante com iões cálcio são preferidos em relação a outros, métodos mais complexos. No ensaio colorimétrico, o contacto do ião cálcio com um cromoióforo provoca um sinal no espectro de absorvância do cromóforo que pode ser medido quantitativamente. Uma destas matérias corantes que é comumente utilizada para estes fins é conhecida como Arsenazo III ácido (2,2'-(1,8-di-hidroxi-3,6-dis-

sulfonaftileno-2,7-biazobisbenzenoarsónico (ver Anal. Chim. Acta, **71**, 375 (19749). Enquanto esta matéria corante funciona praticamente de forma satisfatória, a sua utilização em larga escala está limitada devido problemas ambientais.

A utilização de elementos analíticos multi-camada de filme fino seco como os descritos nas Pat. U.S. N<sup>os</sup> 3 992 158 de Przybylowicz et al. e 4 258 001 de Pierce et al. são geralmente utilizados para conduzir ensaios no campo da química clínica. Estes elementos têm geralmente uma camada porosa de dispersão e uma camada de reagente num suporte não poroso. Um destes elementos têm sido designado para a determinação de iões cálcio e é denominado Vitros Clinical Chemistry Slide by Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, Inc. (Rochester, N.Y.). Este elemento utiliza a matéria corante Arsenazo atrás mencionada que complexa selectivamente com o cálcio obtendo-se uma alteração detectável na cor. Contudo, como mencionado, os conceitos ambientais têm manifestado o desejo de compostos complexantes de cálcio novos que podem ser incorporados nestes elementos analíticos secos.

Os compostos de éter coroa, incluindo os compostos diaza-18-coroa-6, são conhecidos há algum tempo pelas suas propriedades complexantes de catião. Tem sido referida a introdução de um éter coroa de um cromóforo que muda de cor por complexação de um catião com o éter coroa. Ver e.g. Anal. Letters, 10(13), 1115-1122 (1977). M. Shiga et al, Bunseki Kagaku, 32(9), E293-E300, (1983) apresenta determinados compostos N,N-dissubstituídos-diaza-18-coroa-6 contendo substituintes cromóforos 2-hidroxi-5-(nitrofenilazo)-benzil para utilização como cromoióforos em ensaios em solução para o cálcio. Contudo, estes compostos não podem ser efectivamente

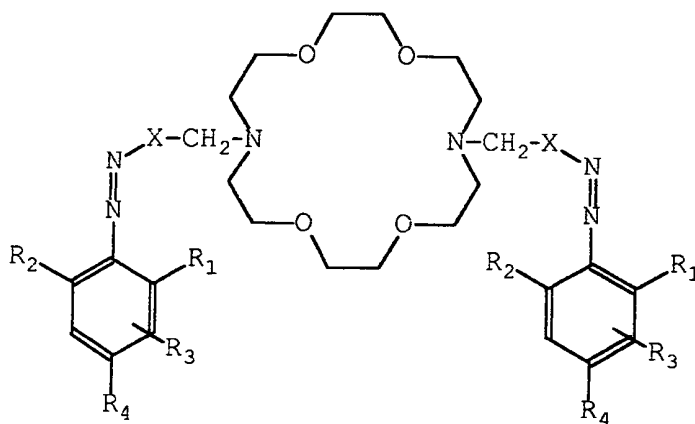
*[Handwritten signature]*

utilizados em elementos cromogénicos de ensaio seco em lâmina devido à dificuldade de os incorporar em soluções de revestimento ou dispersões para aplicação em revestimentos cromóforos de filme fino. Para além disso, os fotómeros em analisadores comerciais são tipicamente filtrados para ler a ou acima de 600 nm para evitar interferência de bilirrubina e outras amostras ou componentes de ensaio que absorvem abaixo de 600 nm. O composto dinitrofenilazo de Shiga et al tem um pico de absorção abaixo da janela de leitura desejada, i.e. o seu  $\lambda_{max}$  é aproximadamente 575 nm.

Katayama et al, Analytical Chemica Acta, 204 (1988), 113-125, apresenta compostos 18-coroa-6-compostos com substituintes 2-hidroxi-5-(-4-nitrofenilazo)benzil.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

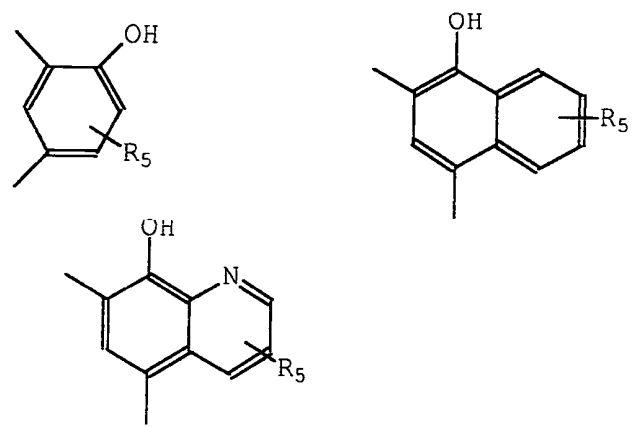
A invenção apresenta compostos novos diaza-18-coroa-6 com a fórmula I:



I

em que X é uma parte fenol, naftol ou quinolinol seleccionada das fórmulas:

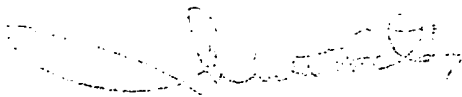
*[Handwritten signature]*



$R_1, R_2, R_3, R_4$  e  $R_5$  são independentemente seleccionados entre hidrogénio, halogéneo, ciano, nitro, alquilo ( $C_1-C_6$ ), acilo ( $C_2-C_8$ ), acetamido, mercapto, alquilo ou arilsulfonilo, trifluorometilo, arilo, e arilo substituído em que a metade arilo é seleccionada entre o fenilo e o naftilo e o substituinte arilo é seleccionado entre halogéneo, ciano, nitro, alquilo ( $C_1-C_6$ ), acilo ( $C_2-C_8$ ), fenilo, acetamido, mercapto, alquilo ou arilsulfonilo e trifluorometilo;

desde que quando  $R_1, R_2, R_3$  e  $R_5$  são hidrogénio e X é fenol,  $R_4$  não é nitro, e desde que quando X é fenol e  $R_5$  é hidrogénio,  $R_1$  (ou  $R_2$ ) e  $R_4$  não são ambos nitro.

Os compostos com a fórmula acima são úteis como cromoionóforos para a detecção de iões cálcio em solução ou ensaios a seco, mas têm vantagem particular quando utilizados em elementos analíticos multi-camada de filme fino, secos porque podem ser facilmente dispersos em solventes acopladores e uniformemente revestidos como um filme fino para se obter elementos analíticos de lâmina seca para o cálcio. Os compostos com a fórmula acima tendo substituintes receptores de electrões nas posições  $R_1, R_2$  ou  $R_4$  podem ser lidos num espectro de absorvância a ou acima de 600 nm, o que é particularmente



benéfico nos sistemas de ensaios em que há interferências nos comprimentos de onda mais baixos. De preferência, para utilização nos sistemas de ensaio de filme fino, particularmente o acima mencionado sistema de ensaio a seco VITROS, são preferidos os compostos da presente invenção que absorvem a um comprimento de onda superior a 560 nm, de preferência superior a 580 nm, quando complexado com iões cálcio.

Em conformidade, a invenção também apresenta um elemento analítico para a determinação de iões cálcio compreendendo um material veículo absorvente contendo o composto cromoionóforo descrito acima.

Para além disso, apresenta-se um método para a determinação quantitativa de iões cálcio que compreende:

- (a) contacto de uma amostra líquida suspeita de conter iões cálcio com o composto cromoionóforo descrito acima; e
- (b) determinação colorimétrica da presença quantitativa de cálcio na amostra por medição da alteração da densidade óptica resultante da complexação dos iões cálcio com o composto.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 é um gráfico dos níveis de cálcio medidos nas amostras de soro utilizando os elementos analíticos da presente invenção sem adição de citrato e mostrando os desvios em relação ao níveis de cálcio previstos.

A FIG. 2 é um gráfico dos níveis de cálcio medidos nas amostras de soro utilizando os elementos analíticos da presente invenção com adição de citrato e mostrando os desvios em relação aos níveis de cálcio previstos.

#### DESCRIÇÃO PORMENORIZADA

Em relação à descrição acima, os compostos com a Fórmula I que são preferidos para os elementos analíticos de lâmina seca de filme fino multi-camada para utilização com os analisadores que operam a comprimentos de onda de 580 nm ou superiores são os compostos em que X é fenol,  $R_1$  e  $R_2$  são independentemente seleccionados entre o hidrogénio e um grupo receptor de electrões seleccionado entre halogéneo, ciano, nitro, acilo com 2 a 8 átomos de carbono, alquilo ou arilsulfonilo, e trifluorometilo, desde que pelo menos um dos  $R_1$  ou  $R_2$  seja um grupo receptor de electrões;  $R_3$  é seleccionado entre o hidrogénio, halogéneo, ciano, nitro, alquilo ( $C_1-C_6$ ), acilo ( $C_2-C_8$ ), acetamido, mercapto, alquilo ou arilsulfonilo, trifluorometilo, arilo, e arilo substituído em que a metade arilo é seleccionada entre fenilo e naftilo e o substituinte arilo é seleccionado entre halogéneo, ciano, nitro, alquilo ( $C_1-C_6$ ), acilo ( $C_2-C_8$ ), fenilo, acetamido, mercapto, alquilo ou arilsulfonilo, e trifluorometilo;

$R_4$  é nitro e  $R_5$  é hidrogénio.

Particularmente preferidos para estes objectivos são os compostos em que X é fenol,  $R_1$  e  $R_2$  são independentemente seleccionados entre o hidrogénio e um grupo receptor de electrões seleccionado entre halogéneo, ciano, nitro, acilo com 2 a 8 átomos de carbono, alquilo ou arilsulfonilo, e trifluorometilo, desde que pelo menos um dos  $R_1$  ou  $R_2$  seja um

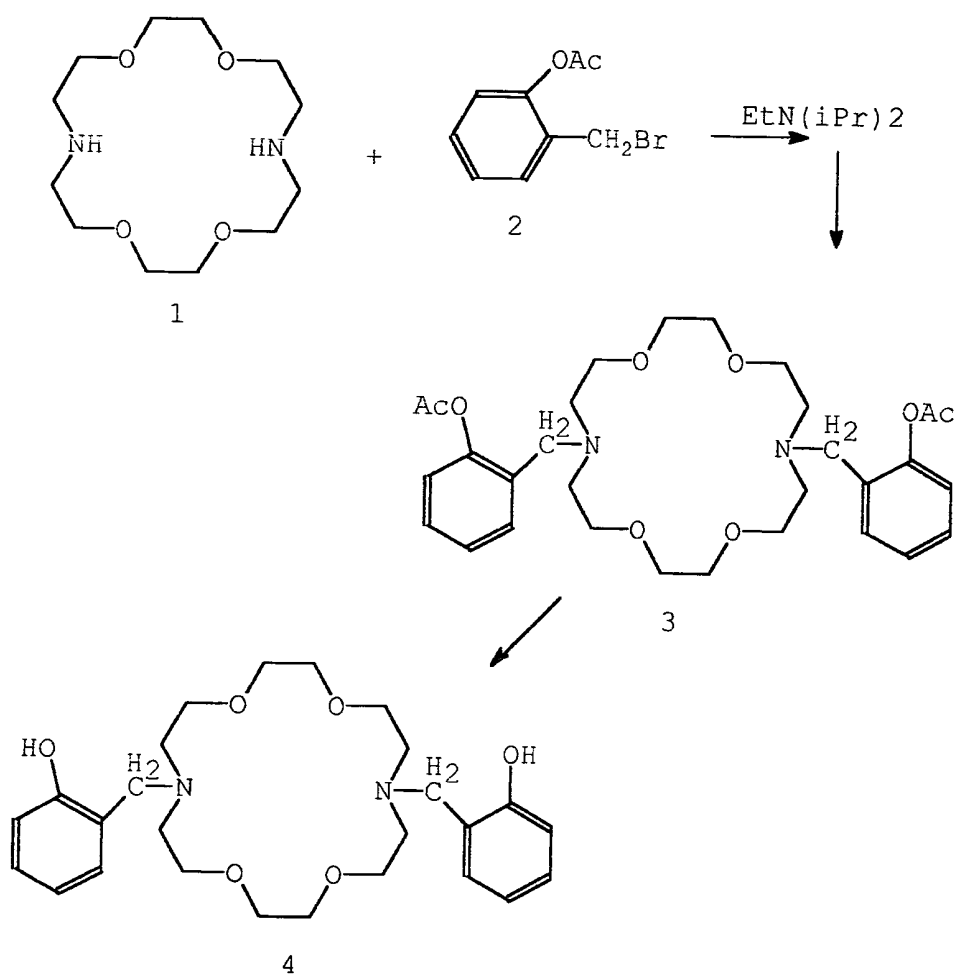


grupo receptor de electrões;  $R_3$  é alquilo ( $C_1-C_6$ );  $R_4$  é nitro e  $R_5$  é hidrogénio, desde que quando um dos  $R_1$  ou  $R_2$  seja trifluorometilo e o outro seja hidrogénio,  $R_3$  pode também ser hidrogénio.

Os compostos com a Fórmula I que são os mais preferidos para estes objectivos são aqueles em que X é fenol,  $R_1$  é trifluorometilo;  $R_2$  e  $R_3$  são hidrogénio e  $R_4$  é nitro. Num composto deste, o grupo trifluorometilo actua quer como grupo hidrofóbico para facilitar a dispersabilidade em solventes acopladores quer como grupo receptor de electrões para obter absorção elevada (pico) a ou acima de 580 nm.

Os compostos com a Fórmula I que são objecto da presente invenção podem ser preparados a partir de materiais de partida facilmente disponíveis de acordo com os procedimentos gerais seguintes mostrados nos Esquemas I-II:

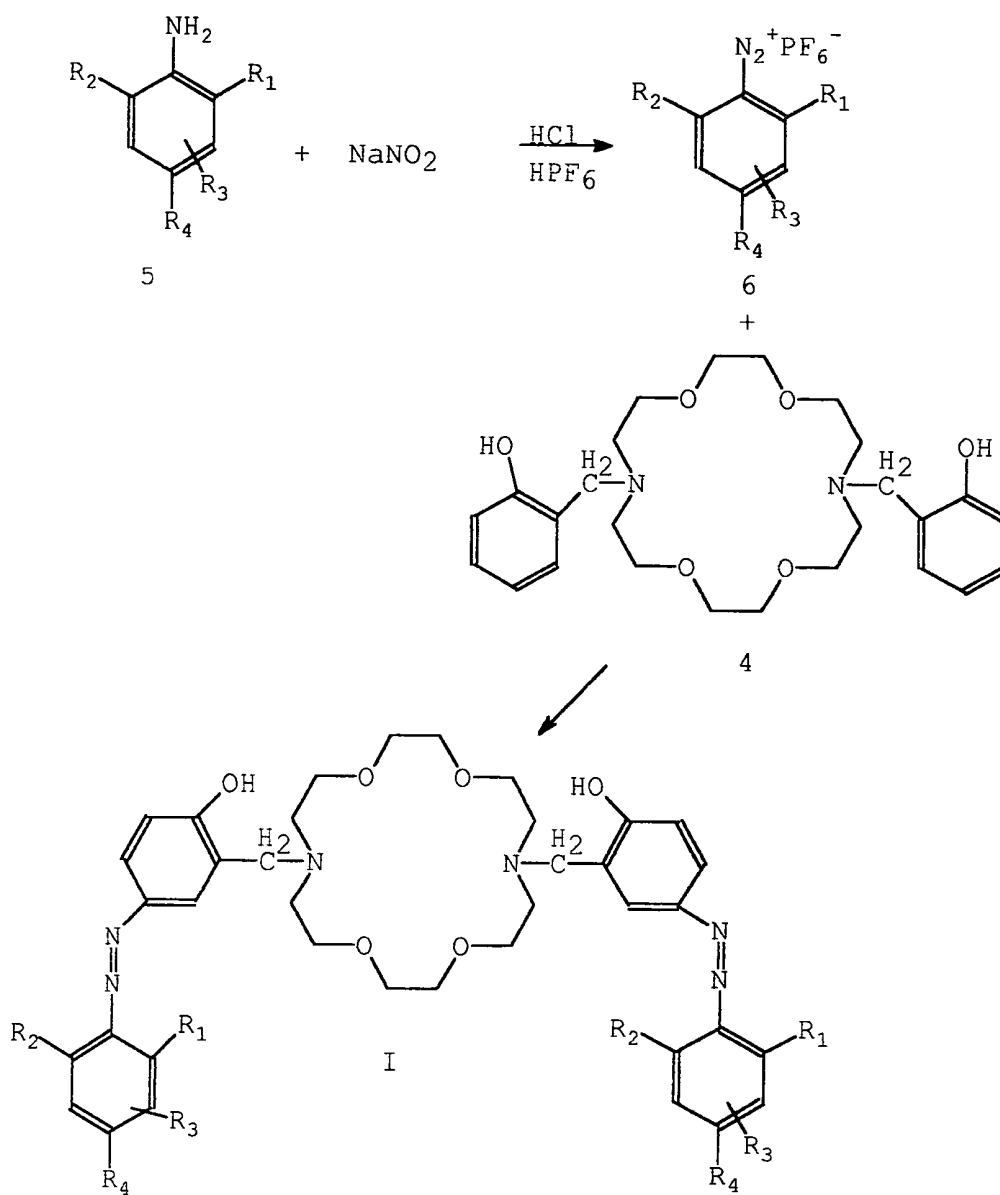
*Handwritten signature*



ESQUEMA I

De acordo com o Esquema I, um composto 4,13-diaza-18-coroa-6 com a fórmula 1 faz-se reagir com brometo de 2-acetoxibenzilo na presença de N,N-diisopropil-N-etilamina para dar o composto de acetato de benzilo com a fórmula 3. O tratamento com um ácido fraco como o ácido acético em H<sub>2</sub>O dá o intermediário 2-hidroxibenzilo com a Fórmula 4. Para preparar os compostos em que X é uma metade naftol ou quinolino, um naftilo ou quinolino apropriadamente substituído pode ser substituído pelo composto fenilo com a Fórmula 2 acima.

*Handwritten signature*



ESQUEMA 2

De acordo com o Esquema 2, um composto anilina substituído com a fórmula geral 5 faz-se primeiro reagir com nitrito de sódio em ácido clorídrico e em seguida trata-se com ácido hexafluorofosfórico para produzir o intermediário 6

hexafluorofosfato de fenildiazónio. Em seguida faz-se reagir dois equivalentes do intermediário 6 com um equivalente do intermediário 4 hidroxibenzil-diaza-18-coroa-6 do Esquema I num solvente adequado para dar o composto final com a Fórmula I. O composto de naftol ou quinolinol apropriadamente substituído pode certamente ser substituído pelo intermediário 4 hidroxibenzilo.

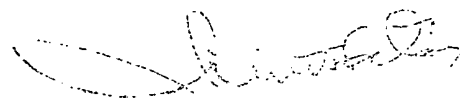
As reacções anteriores são realizadas num solvente adequado para os reagentes e materiais empregues e adequados para a transformação se realizar. Os especialistas na técnica da síntese orgânica entendem que as várias funcionalidades presentes na molécula têm que ser consistentes com as transformações químicas propostas. Isto necessita frequentemente de um parecer em relação ao arranjo dos passos de síntese, a protecção dos grupos reactivos, e a selecção das condições da reacção. As condições da reacção compatíveis com os substituintes empregues será fácil para um especialista na técnica, assim como a selecção dos grupos de protecção quando necessário.

De acordo com a presente invenção obtiveram-se composições de cromoionóforos novas que podem ser utilizadas para a determinação qualitativa ou quantitativa dos iões cálcio em líquidos aquosos. Vantajosamente, as composições podem ser utilizadas em métodos analíticos para determinação dos níveis de cálcio em fluídos biológicos como o sangue completo, o plasma, o soro, a linfa, a bilis, a urina, o fluído espinal, a saliva, a perspiração, as fezes e os análogos. As preparações fluídas de tecido humano ou animal como o músculo esquelético, o coração, os rins, os pulmões, o cérebro, os ossos da medula, a pele e os

análogos também podem ser ensaiadas em relação aos níveis de cálcio de acordo com a presente invenção.

Quando utilizado para os fins propostos, os compostos da presente invenção têm várias vantagens sobre as composições da técnica anterior. Especificamente, a matéria corante produzida pelos compostos cromoionóforos da presente invenção, na complexação com os iões cálcio, pode ser medida no pico para melhor sensibilidade. Para além disso, podem ser medidas concentrações de cálcio num intervalo grande sem diluição e, como mencionado, os compostos podem ser facilmente dispersos em solventes acopladores e uniformemente revestidos como um filme fino para se obter elementos analíticos para lâmina seca. Finalmente, os compostos são facilmente sintetizados e não necessitam de quaisquer metais pesados tóxicos.

Os compostos podem ser utilizados em ensaios em solução ou em elementos analíticos secos. Quando utilizados em ensaios em solução, os compostos são dissolvidos numa solução tampão apropriada a um pH de aproximadamente 6 a 9. A composição aquosa para ensaio em solução contém usualmente aproximadamente 50, e preferivelmente aproximadamente 100, a aproximadamente 300,  $\mu$ molar do composto complexante de cálcio da invenção. O ensaio é realizado por adição do composto cromoionóforo da invenção com uma amostra de fluido suspeito de conter cálcio iónico por um período curto. A concentração de iões cálcio é então determinada por medição da alteração da densidade óptica, (i.e., o sinal no espectro de absorção) provocada pela complexação do composto com iões cálcio no comprimento de onda apropriado utilizando equipamento de detecção colorimétrica adequado. Vantajosamente, para utilização em formas de realização de filme fino em particular, os compostos podem ser seleccionados para absorver a

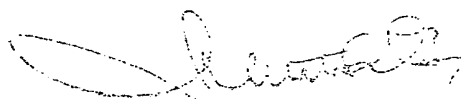


um comprimento de onda a ou aproximadamente 600 nm por complexação.

Os compostos cromoionóforos da invenção podem também ser utilizados em elementos analíticos secos. O elemento mais simples pode ser composto por um material veículo absorvente, por exemplo, uma folha fina de um material absorvente ou bibulous auto-suportável, como papéis de filtro ou tiras, que contêm o composto complexante da presente invenção. O elemento pode ser dividido em duas ou mais zonas discretas com diferentes reagentes incorporados em diferentes zonas da material veículo. Estes elementos são conhecidos na especialidade como tiras de ensaio, elementos de diagnóstico, tiras de mergulho, agentes de diagnóstico e análogos.

Os compostos cromoionóforos da presente invenção são particularmente vantajosos quando empregues em elementos analíticos secos. Nestes elementos, os compostos são geralmente incorporados em, ou revestidos com, um material veículo adequado. Alternativamente, o composto pode ser adicionado ao elemento durante o ensaio. O elemento analítico seco pode ser multi-camada e pode ser feito por técnicas bem conhecidas na técnica dos elementos analíticos secos. Por exemplo, estes elementos e os métodos para a sua produção são descritos na Patente U.S. Nº 4 357 363. Numa forma de realização, o elemento inclui uma camada de dispersão, uma camada de substituição, uma camada tampão de gelatina e uma camada de reagente contendo o composto e o tampão. Todas as camadas anteriores são revestistas num suporte.

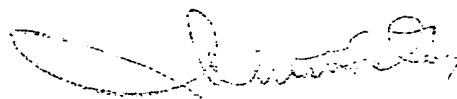
São também conhecidas outras formas de realização, por exemplo, uma forma de realização inclui uma camada combinada



reagente/dispersão ao mesmo tempo que uma camada se substituição tendo pelo menos duas zonas dismatéria corantes. Neste elemento incorpora-se tampão na camada de dispersão através ou do revestimento do elemento completo ou tampão moído de bolas na camada de dispersão antes do revestimento.

Em todas as formas de realização as camadas estão geralmente em contacto fluido umas com as outras, significando que os fluídos podem ser transportados entre as regiões sobrepostas das zonas adjacentes. Por outras palavras, quando o elemento contacta com um fluido aquoso, todos os reagentes difusíveis da composição analítica da presente invenção e os constituintes difusíveis do fluido aquoso são misturados para formar uma mistura homogénea.

As camadas de dispersão úteis podem ser preparadas utilizando materiais fibrosos, quer misturados num material ligante adequado ou entrançado num tecido, como descrito na Patente U.S. N° 4 292 272 de Katajima et al., composições poliméricas ou materiais em partículas, por exemplo um polímero avermelhado como descrito na patente U.S. N° 3 992 158, contas ligadas umas às outras com ou sem adesivos de ligação, como descrito na Patente U.S: N° 4 258 001 de Pierce et al.. As camadas de dispersão particularmente vantajosas compreendem sulfato de bário ou dióxido de titânio. Como a amostra é geralmente aplicada directamente à camada de dispersão, é desejável que a camada de dispersão seja isotropicamente porosa, significando que a porosidade é a mesma em cada direcção na camada como provocado pelos espaços interligados ou poros entre as patículas, fibras ou bandas poliméricas.



Os elementos podem também conter um ou mais outros adjuvantes comumente colocados nos elementos por terem várias vantagens no fabrico e operacionais. Estes adjuvantes incluem tensioactivos, tampões, bacteriostatos, solventes, endurecedores e outros materiais conhecidos na especialidade.

As camadas podem ser revestidas em suportes transparentes (i.e. radiação transmissiva) como o poli(etileno terftalato). Outros suportes são bem conhecidos na especialidade.

Nos elementos, o composto cromoionóforo da presente invenção está geralmente presente em uma ou mais zonas numa cobertura de pelo menos aproximadamente 0,10, e preferivelmente entre aproximadamente 0,10 e aproximadamente 1,5 g/m<sup>2</sup>. Outros reagentes e materiais estão presentes em coberturas dentro da especialidade de um trabalhador na técnica.

Os elementos da invenção podem ser configurados em várias formas, incluindo fitas alongadas de qualquer largura desejada, folhas, lâminas ou lascas.

Os elementos podem ser utilizados em técnicas de ensaio manuais ou automatizadas. Em geral, utilizando materiais secos, o ião cálcio é determinado tirando o elemento de um fornecimento em rolo, lasca empacotada ou outra fonte e contactando fisicamente com a amostra (por exemplo entre 1  $\mu$ l até 200 ml) do fluído a ser ensaiado de forma a que a amostra e os reagentes dentro do elemento se misturem. Este contacto pode ser acompanhado por qualquer forma adequada, por exemplo, por inclinação ou imersão do elemento na amostra ou, de preferência, manchando o elemento com a mão ou máquina numa gota da amostra com meios de descarga adequados.

Após a aplicação da amostra, o elemento é incubado a uma temperatura no intervalo entre 15° e 50°C, de preferência 20° a 40°, e mais preferivelmente 25° a 37°, por um período até aproximadamente 5 minutos, para facilitar o desenvolvimento da cor. Por incubação, entenda-se que os reagentes são mantidos em contacto um com o outro durante o intervalo de tempo prescrito à temperatura desejada antes ou enquanto as medições de cor são feitas.

Numa forma de realização preferida, os desvios aleatórios podem ser evitados por adição de citrato (ou ácido cítrico) à composição do ensaio descrita acima ou à amostra a ser ensaiada. Em cada caso, o citrato (ou ácido cítrico) está presente em quantidades no intervalo entre 1 e 200 mM, de preferência 10 a 100 mM. Numa forma de realização preferida, o ensaio é conduzido utilizando um elemento de filme fino como descrito acima, em que o elemento contém citrato ou ácido cítrico em uma ou mais camadas do elemento de ensaio tendo um intervalo revestido de citrato ou ácido cítrico equivalente a 0,1 a 20 mmol/m<sup>2</sup>. Um intervalo mais preferido é 1 a 10 mmol/m<sup>2</sup>. De preferência, o citrato ou ácido cítrico é incorporado na camada de dispersão durante o processo de revestimento. A incorporação de citrato ou de ácido cítrico nos ensaios utilizando os compostos cromoionóforos da presente invenção melhora os desvios aleatórios. É vantajoso estender o intervalo dinâmico dos cromoionóforos e a capacidade para obter medições colorimétricas perto ou acima de 600 nm.

Os exemplos seguintes descrevem em pormenor a síntese química dos compostos representativos da presente invenção. Os procedimentos são ilustrações, e a invenção não se limita às

reacções químicas e condições que expressam. Nenhum esforço tem sido feito para otimizar os rendimentos obtidos nestas reacções, e é óbvio para um especialista na técnica que as variações nos tempos de reacção, temperaturas, solventes, e/ou reagentes pode aumentar os rendimentos.

#### EXEMPLO 1

7,16-Bis[2-hidroxi-5-(4-nitro-2-trifluorometil-fenilazo)benzil]-7,16-diazo-1,4,10,13-tetraoxaciclooctadecano

Parte A. Preparação de 7,16-Bis(2-hidroxibenzil)-7,16-diazo-1,4,10,13-tetraoxaciclooctadecano

Adicionou-se 7,16-diazo-1,4,10,13-tetraoxaciclooctadecano (13 g, 0,05 mole) a acetonitrilo (150 ml) ao mesmo tempo que brometo de 2-acetoxibenzilo (0,12 mole) e N,N-diisopropil-N-etilamina (0,25 mole). Manteve-se a mistura à temperatura ambiente durante 24 horas, e removeu-se o solvente até se formar uma pasta. Dissolveu-se a pasta em água e extraiu-se a solução duas vezes com dicloreto de metileno. Secaram-se os extractos para dar 25 g de um óleo espesso. Dissolveu-se o óleo numa mistura de 100 ml de metanol, 10 ml de água, e 1 ml de ácido acético, e manteve-se a mistura à temperatura ambiente durante 2 horas. Arrefeceu-se a mistura, e formaram-se cristais brancos arranhando o contentor com uma vara de agitação. Adicionou-se éter dietílico e separou-se o produto por filtração e secou-se.

Parte B. Preparação de hexafluorofosfato de 4-nitro-2-trifluorometilfenildiazónio



Adicionou-se uma solução de nitrito de sódio (10 g) em 20 ml de água a uma suspensão de 4-nitro-trifluorometilanilina (20,6 g) e ácido clorídrico concentrado em gelo. Quando a adição estava completa, agitou-se a mistura durante 1 hora e tratou-se com 15 ml de ácido hexafluorofosfórico a 60% produzindo um precipitado sólido. Adicionou-se água, recolheu-se o produto por filtração, lavou-se o precipitado com água, e secou-se com ar para dar 27 g (75%)

#### Parte C. Preparação do Composto do Título

Preparou-se uma solução de 1,5 g do composto diazônio como descrito na Parte B em 30 ml de acetato de etilo e adicionou-se com agitação durante um período de 10 minutos a uma suspensão de 900 mg do bisfenol preparado na Parte A em 75 ml de acetato de etilo. Formou-se matéria corante imediatamente, e agitou-se a mistura mais 10 minutos, em seguida arrefeceu-se durante uma hora, recolheu-se o produto por filtração, lavou-se com éter dietílico, e secou-se. Rendimento 1,0 g

Análise elementar calculada (com 2HPF<sub>6</sub>): C, 40,0; H, 3,7; N, 9,3; F, 28,5; P, 5,2.

Obtido C, 36,83; H, 3,75; N, 8,47.

#### EXEMPLO 2

7,16-Bis[2-hidroxi-5-(2-metilsulfonil-4-nitrofenilazo)benzil]-7,16-diazo-1,4,10,13-tetraoxaciclooctadecano

Preparou-se uma solução de hexafluorofosfato de 2-metilsulfonil-4-nitrofenildiazônio preparado pelos procedimentos do Exemplo 1, Parte B, excepto substituindo 2-metilsulfonil-4-nitroanilina por 4-nitro-2-trifluorometilanilina (1,7 g,

*[Handwritten signature]*

4,5 mmole) em acetonitrilo (50 ml) adicionou-se lentamente durante um período de 15 minutos a 7,16-bis(2-hidroxibenzil)-7,16-diazo-1,4,10,13-tetraoxaciclooctadecano preparado como descrito no Exemplo 1, Parte A (1,0 g, 2,11 mmole) em 100 ml de acetonitrilo arrefecido a 0°C durante 3 horas e removeu-se o solvente por evaporação. Lavou-se o resíduo com água e dissolveu-se por aquecimento numa mistura de metanol e solução aquosa diluída de hidróxido de sódio. Arrefeceu-se a mistura, e precipitou-se o produto por adição de ácido acético, recolhido por filtração, lavou-se com álcool isopropílico, e em seguida com éter. Dissolveu-se uma pequena porção em N,N-dimetilformamida, precipitou-se por adição de etanol, secou-se com ar, em seguida secou-se durante 10 minutos a 90°C, e ensaiou-se.

### EXEMPLO 3

#### Ensaio Seco para Iões Cálcio

Preparou-se um elemento analítico da presente invenção com o seguinte formato e cortou-se e montou-se como lâminas para os ensaios de cálcio.

---

Camada de dispersão

-----

Sub-camada

-----

Camada de Gelatina/Tampão

-----

Camada de reagente

-----

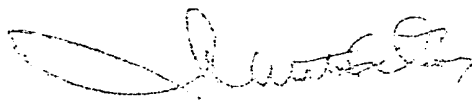
Suporte

---

Para preparar o elemento analítico com o formato acima, preparou-se uma dispersão de matéria corante com cromoionóforo a 1% do Exemplo 1, solvente acoplante de fosfato de tricresilo 5%, tensoactivo de sulfonato de Alcanol XC sódio alquil naftaleno 0,6%, e gelatina 6% por métodos padrão de dispersão de acoplantes fotográficos padrão envolvendo a moagem da matéria corante, solvente, e tensoactivos numa dispersão uniforme, estável do tamanho de partículas desejado.

A dispersão de matéria corante foi em seguida revestida num suporte de poli(etileno terftalato), com a seguinte composição de camada:

Camada de Reagente 1 : 0,25 g/m<sup>2</sup> de matéria corante como dispersão, 10,0 g/m<sup>2</sup> de gelatina, e 0,025 mol/m<sup>2</sup> de tampão TRIS (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol tampão acertado para pH 7,7 a 37°C).



Camada de Gelatina/Tampão 2: TRIS 0,035 mol/m<sup>2</sup> (mistura acertado para pH 7,7 a 37°C) em gelatina 10,0 g/m<sup>2</sup>, reticulado com bis(vinilsulfonilmetil)éter 0,5 g/m<sup>2</sup>.

Sub Camada 3: poli(N-isopropilacrilamida) 0,39 g/m<sup>2</sup>

Camada de Dispersão 4: camada dispersa de TiO<sub>2</sub> tendo a seguinte composição:

67,2 g/m<sup>2</sup> de dióxido de titânio

9,8 g/m<sup>2</sup> de acetato de celulose

1,8 g/m<sup>2</sup> de Triton X-405 (tensioactivo não iónico octilfenoxi polietoxi etanol)

0,9 g/m<sup>2</sup> Brij 78 (tensioactivo não iónico polioxietileno (20) estearil éter) 1,8 g/m<sup>2</sup> Estano 5715, um elastómero de poluretano vendido por B.F. Goodrich.

Este elemento foi utilizado para determinar a concentração de cálcio em 50 doentes cuja concentração de cálcio no soro estava no intervalo entre 1,57 e 16,5 mg/dl, 3 replicados por amostra de soro. A densidade de reflexão resultante da complexação dos iões cálcio com os compostos cromoionóforos da presente invenção foi lida a 600 nm utilizando um analisador de lâmina VITROS Johnson & Johnson disponível comercialmente. Os níveis de cálcio determinados experimentalmente com os elementos analíticos acima estavam correlacionados determinados nas mesmas amostras de soro utilizando elementos analíticos de cálcio comercialmente disponíveis.

#### EXEMPLO 4

##### Ensaio a Seco para Iões Cálcio

Preparou-se um elemento analítico da presente invenção no formato do Exemplo 3 com ou sem adição de ácido cítrico à camada

de dispersão de  $\text{TiO}_2$  a um nível de concentração de  $2,0 \text{ mmol/m}^2$ . Utilizaram-se estes revestimentos para analisar amostras de soro de 50 doentes em relação ao nível de cálcio, com as densidades de reflexão das matéria corantes desenvolvidas lidas a um comprimento de onda de  $600 \text{ nm}$ . Os valores de referência (determinados por espectroscopia de absorção atómica) em relação ao soro foram utilizados para calibrar cada revestimento: então o nível de cálcio para cada soro foi previsto em relação à curva de calibração correspondente. O desvio foi calculado como a diferença entre o valor previsto pelo revestimento e o valor de referência. A soma residual dos quadrados foi calculada utilizando a fórmula:

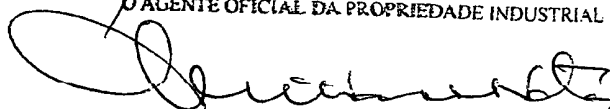
Soma Residual dos Quadrados = somatório(concentração prevista - concentração de referência)<sup>2</sup>

para dar  $4,07$  (nenhum citrato) e  $1,69$  (mais citrato). O desvio da amostra individual é mostrado em gráfico na FIG. 1 (nenhum citrato) e FIG. 2 (mais citrato). Claramente os elementos contendo ácido cítrico na camada de dispersão exibiram um desvio significativamente inferior ao dos elementos correspondentes sem ácido cítrico.

A invenção foi descrita em pormenor com particular referência às formas de realização preferidas desta, mas entenda-se que podem ser feitas variações e modificações dentro do espírito da invenção.

Lisboa, 25 de Outubro de 2001

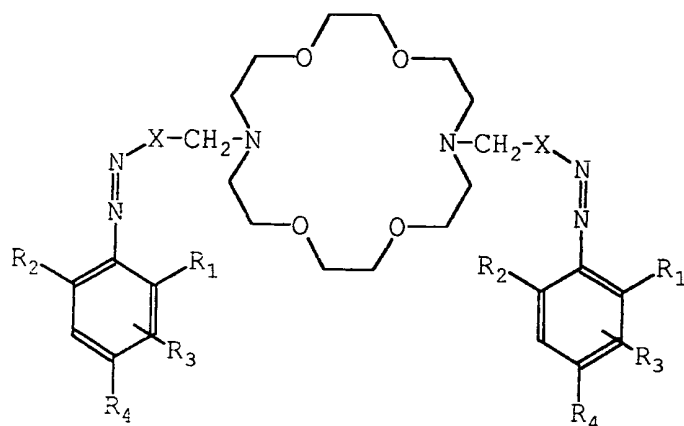
AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



*Handwritten signature*

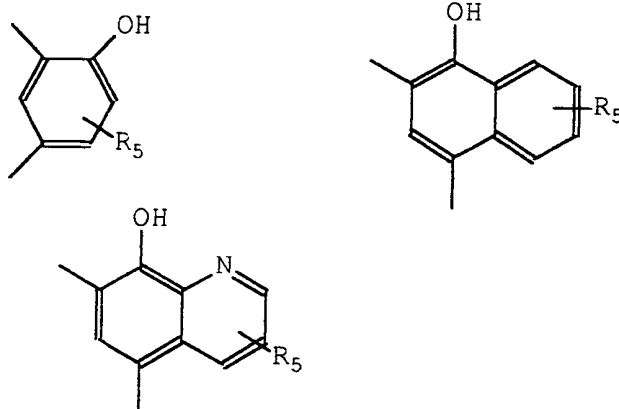
## REIVINDICAÇÕES

1. Composto com a Fórmula I:



I

em que X é uma parte fenol, naftol ou quinolinol seleccionada entre as fórmulas:



$\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  e  $\text{R}_5$  são independentemente seleccionados entre hidrogénio, halogéneo, ciano, nitro, alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ), acilo ( $\text{C}_2\text{-C}_8$ ), fenilo, acetamido, mercapto, alquilo ou arilsulfonilo, trifluorometilo, arilo, e arilo substituído

em que a parte arilo é seleccionada entre fenilo e naftilo e o substituinte arilo é seleccionado entre halogéneo, ciano, nitro, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), acilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), acetamido, mercapto, alquilo ou arilsulfonilo, e trifluorometilo; desde que quando R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>5</sub> são hidrogénio e X é fenol, R<sub>4</sub> não é nitro, e desde que quando X é fenol e R<sub>5</sub> é hidrogénio, R<sub>1</sub> (ou R<sub>2</sub>) e R<sub>4</sub> não são ambos nitro; em que o referido composto com a Fórmula I tem um pico de absorção a um comprimento de onda superior a aproximadamente 580 nm quando complexado com ião cálcio, e é solúvel em solventes orgânicos acopladores.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1 em que X é fenol, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são independentemente seleccionados entre hidrogénio e um grupo receptor de electrões seleccionado entre halogéneo, ciano, nitro, acilo com 2 a 8 átomos de carbono, alquilo ou arilsulfonilo, e trifluorometilo, desde que pelo menos um dos R<sub>1</sub> ou R<sub>2</sub> seja um grupo receptor de electrões; R<sub>3</sub> é seleccionado entre hidrogénio, halogéneo, ciano, nitro, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), acilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), acetamido, mercapto, alquilo ou arilsulfonilo, trifluorometilo, arilo, e arilo substituído em que a parte arilo é seleccionada entre fenilo e naftilo e o substituinte arilo é seleccionado entre halogéneo, ciano, nitro, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), acilo (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>), fenilo, acetamido, mercapto, alquilo ou arilsulfonilo e trifluorometilo; R<sub>4</sub> é nitro e R<sub>5</sub> é hidrogénio.
3. Composto de acordo com a reivindicação 1 em que X é fenol, R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são independentemente seleccionados entre hidrogénio e um grupo receptor de electrões seleccionado entre halogénio, ciano, nitro, acilo com 2 a 8 átomos de carbono,



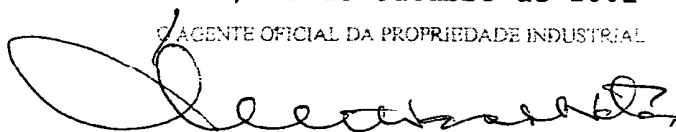
alquilo ou arilsulfonilo, e trifluorometilo, desde que pelo menos um dos  $R_1$  ou  $R_2$  seja um grupo receptor de electrões;  $R_4$  é nitro;  $R_5$  é hidrogénio e  $R_3$  é alquilo ( $C_1-C_6$ ), desde que quando um dos  $R_1$  ou  $R_2$  é trifluorometilo e o outro é hidrogénio,  $R_3$  pode também ser hidrogénio.

4. Composto de acordo com a reivindicação 1 em que X é fenol,  $R_1$  é trifluorometilo;  $R_2$ ,  $R_3$  e  $R_5$  são hidrogénio e  $R_4$  é nitro.
5. Composição aquosa tamponada para um pH entre aproximadamente 6 e aproximadamente 9 contendo um composto de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4.
6. Elemento analítico para a determinação de iões cálcio compreendendo um material transportador absorvente contendo um composto com a fórmula I de acordo com o definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.
7. Elemento analítico para a determinação dos iões cálcio compreendendo um suporte não poroso tendo nele uma zona reagente e uma zona de dispersão porosa, contendo o referido elemento em pelo menos uma das referidas zonas um composto com a fórmula I como definido em qualquer uma qualquer das reivindicações 1 a 4.
8. Elemento de acordo com a reivindicação 7 em que as referidas zonas são camadas sobrepostas.
9. Elemento de acordo com a reivindicação 7 em que o referido composto com a fórmula I está na referida zona reagente.

10. Elemento de acordo com a reivindicação 7 contendo adicionalmente 1 a 200 mM de citrato ou ácido cítrico.
11. Elemento de acordo com a reivindicação 10 em que o citrato ou o ácido cítrico está contido na zona de dispersão numa concentração de 0,1 a 20 mmol/m<sup>2</sup>.
12. Método para a determinação quantitativa de iões cálcio que compreende:
  - (a) contacto de uma amostra líquida suspeita de conter iões cálcio com um composto cromoionóforo com a fórmula I de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4; e
  - (b) determinação colorimétrica da presença quantitativa de cálcio na amostra por medição da alteração da densidade óptica resultante da complexação dos iões cálcio com o composto com a fórmula I.
13. Método de acordo com a reivindicação 12 em que o composto cromoionóforo está contido num elemento analítico seco para a determinação de iões cálcio compreendendo um suporte não poroso tendo nele uma zona reagente e uma zonas de dispersão porosa.
14. Método de acordo com a reivindicação 13 em que a zona de dispersão contém 0,1 a 20 mmol/m<sup>2</sup> de citrato ou de ácido cítrico.

Lisboa, 25 de Outubro de 2001

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



*Handwritten signature*

Tinta Azacrown, sem citreto  
Soro do Doente

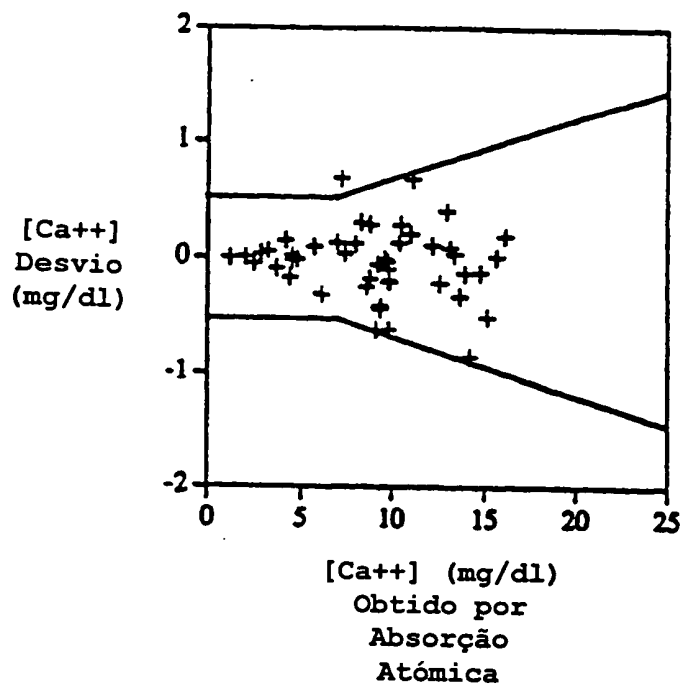


FIG. 1

*Handwritten signature*

Tinta Azacrown, sem citreto  
Soro do Doente

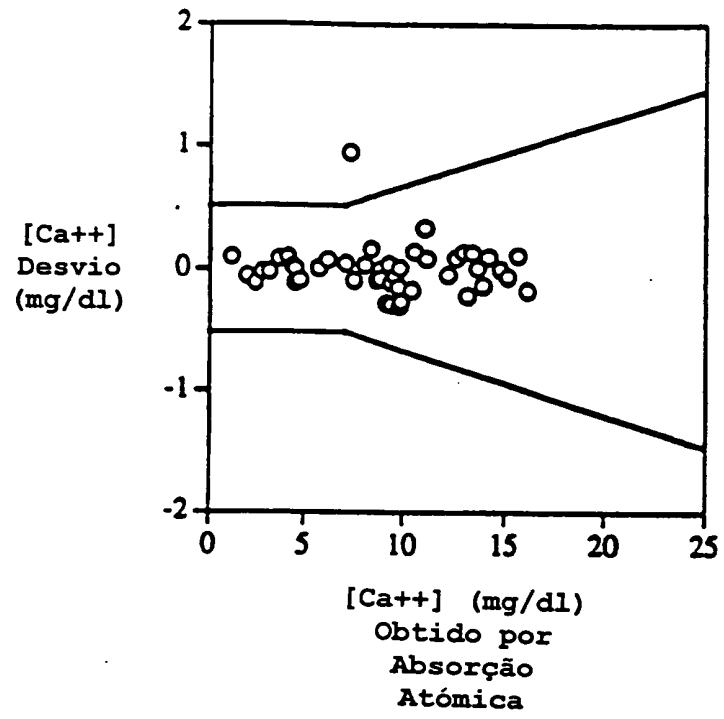


FIG. 2