

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA



Complexos de cobre dirigidos a G-Quadruplexos para teranóstica de cancro

Raquel Cristina Barão Correia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM
QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA

2014-2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA



Complexos de cobre dirigidos a G-Quadruplexos para teranóstica de cancro

Orientador: Doutor António Manuel Rocha Paulo, Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares, Instituto Superior Técnico

Co-orientadora: Doutora Maria Alexandra da Silva Paulo, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa

Raquel Cristina Barão Correia

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa, 2014-2016

Complexos de cobre dirigidos a G-Quadruplexos para teranóstica de cancro

O trabalho descrito nesta tese foi realizado, em parte, no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C²TN) sob orientação do Doutor António Manuel Rocha Paulo. Outra das componentes descritas corresponde ao trabalho desenvolvido no Grupo de Química Medicinal do Instituto de investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), da Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa (FFUL) sob co-orientação da Doutora Maria Alexandra da Silva Paulo.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projecto EXCL/QEQ-MED/0233/2012.

AGRADECIMENTOS

A minha tese de Mestrado foi uma longa viagem, com muitos percalços pelo caminho.

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de muitas pessoas e Instituições, às quais gostaria de exprimir o meu profundo agradecimento:

Ao meu orientador, o Doutor António Paulo, agradeço a forma sempre disponível como me ajudou a esclarecer as diversas questões que surgiram ao longo deste trabalho, a capacidade incrível de discussão e perícia no contorno dos contratempus e questões científicas que foram surgindo ao longo da génese deste trabalho.

À minha co-orientadora, a Doutora Maria Alexandra Paulo, agradeço o rigor científico com que me orientou no laboratório e a forma exemplar, disponível e cuidada como apoiou a realização deste trabalho.

Ambos assumiram um papel indispensável no meu processo de aprendizagem.

À Filipa Carneiro, colega e amiga, agradeço imenso todos os ensinamentos práticos que me deu; a sua disponibilidade, incentivo, espírito inovador e toda a ajuda incansável no decurso deste trabalho.

À Doutora Elisa Palma, agradeço o apoio científico e assistência laboratorial durante os últimos meses; obrigada pelos conhecimentos transmitidos, por toda a supervisão e rigor laboratorial e pela paciência com que me ajudou quer na prática quer na escrita deste trabalho.

À Doutora Ana Paula Francisco, deixo uma palavra de apreço por todo o incentivo, não só nesta fase, mas no mestrado em geral; obrigada pela enorme simpatia, pelos ensinamentos e pela disponibilidade de ajuda que sempre me demonstrou.

À Joana, ao Pedro, à Susana e ao João Lavrado, expreso o meu agradecimento por toda a ajuda e colaboração prestada em momentos de dúvidas existenciais; obrigada pela simpatia com que me acolheram no vosso laboratório.

À Letícia, à Vera, à Elisabete, à Maria e ao Filipe agradeço a simpatia, prontidão de resposta e ajuda prestada durante toda a minha estadia no C²TN; obrigada por me terem ensinado algo nas mais diferentes situações.

Ao Gonçalo – o amor da minha vida – pilar e suporte desta fase, agradeço por todo o amor e apoio incondicional que me dedicou, preenchendo de significado todos os meus passos.

Aos meus pais, agradeço por todo o amor, apoio e disponibilidade que dispuseram para me apoiar e sem os quais não teria sido possível percorrer este caminho; Obrigada por Tudo.

Aos meus avós, familiares, amigos e a todos os que se preocuparam realmente, remeto todo o meu carinho por me apoiarem ao longo desta fase.

RESUMO

Atualmente, é bem reconhecido que a inibição da telomerase pode impedir a proliferação celular, sendo por isso um alvo relevante para novas terapias anticancerígenas. Uma das possíveis estratégias para inibir a actividade da telomerase baseia-se no uso de compostos que se ligam selectivamente a estruturas de ADN do tipo G-quadruplexo (G4 de ADN). As indolo[3,2-c]quinolinas (IQc) são uma de entre muitas classes de compostos que têm vindo a ser estudadas como potenciais estabilizadores de G-quadruplexos (G4).

Complexos de Cu(II) têm recebido uma atenção considerável no *design* de metalofármacos, quer como agentes anticancerígenos quer como radiofármacos para fins de diagnóstico. Para além disso, a disponibilidade de vários radioisótopos de cobre com propriedades nucleares adequadas para diagnóstico e/ou terapêutica (ex.: ^{64}Cu e ^{67}Cu), pode ainda conferir aos complexos de cobre interesse para o *design* de novas ferramentas para teranóstica de cancro. Em particular, os complexos de cobre do tipo Cu(II)-Bis(tiossemicarbazonas) (BTS) apresentam diferentes características favoráveis para aplicações biomédicas, nomeadamente a versatilidade química dos ligandos BTS que permite a introdução de diversos substituintes em diferentes posições da estrutura do ligando sem comprometer a coordenação estável de iões Cu(II).

Tirando partido dessa versatilidade, o trabalho descrito nesta tese tinha como principal objectivo introduzir novos complexos de Cu(II) estabilizados por ligandos BTS e funcionalizados com derivados de IQcs para ligação seletiva ao G4 de ADN. Esperava-se que os complexos finais mantivessem a capacidade de se ligar selectivamente ao G4 de ADN e que os congéneres radioactivos (preparados com ^{64}Cu) permitissem seguir *in vivo* a biodistribuição dos compostos. Desta forma, esperava-se elucidar a relevância de quelatos bifuncionais de Cu(II) como ligandos seletivos de G4 de ADN no *design* de novas ferramentas para teranóstica de cancro. O trabalho desenvolvido permitiu sintetizar novos ligandos bifuncionais do tipo BTS e os respectivos complexos de Cu(II) – para posterior conjugação à biomolécula – bem como os precursores dos derivados di-substituídos de IQcs. Os compostos sintetizados foram caracterizados pelas técnicas analíticas usuais (ex. análise de C,H,N, RMN multinuclear, ESI-MS, HPLC) que confirmaram a estrutura química dos diferentes compostos e indicaram a pureza requerida para prosseguir com os estudos.

PALAVRAS-CHAVE: Teranóstica de Cancro, G-Quadruplexos, Bis(Tiossemicarbazonas); Indolo[3,2-c]quinolinas; Complexos de cobre.

ABSTRACT

Nowadays, it's well recognized that inhibition of telomerase can prevent carcinogenic processes, being therefore a relevant target for new anticancer therapies.

One of the possible strategies to inhibit telomerase is based on the use of compounds which can selectively bind to G-quadruplex DNA structures (G4-DNA).

Indolo[3,2-c]quinoline (IQc) are one among many classes of compounds that have been studied as potential G4 stabilizers.

Copper(II) complexes have received considerable attention in metallodrugs design, either as anticancer agents or as radiopharmaceuticals for diagnostic. In addition, the availability of several copper radioisotopes with nuclear properties suitable for diagnostic and therapy, (ex.: ^{64}Cu e ^{67}Cu), may also confer these complexes the necessary relevance in the design of new tools for cancer theranostics. Particularly, copper complexes as Cu(II)-Bis(thiosemicarbazone) (BTS) present different favorable characteristics for biomedical applications, namely the chemical versatility of BTS chelators, which offer the possibility of introducing several substituents in different positions of the chelator backbone without compromising the stable coordination of radioactive Cu(II) ions.

Taking advantage of this versatility, the work described in this project had as main goal the introduction of new copper complexes stabilized by BTS chelators and functionalized with IQcs derivatives for selective linkage to G4-DNA. It was expected that the final complexes retained the ability to bind selectively to G4-DNA and that the radioactive congeners (prepared with ^{64}Cu) allow the *in vivo* follow-up of the biodistribution of the compounds. Therefore, it was expected to elucidate the relevance of bifunctional Cu(II) chelates acting as selective G4-DNA binders in the design of new tools for cancer theranostics.

The work developed allowed the synthesis of new bifunctional BTS chelators and their copper complexes – for subsequent conjugation to the biomolecule – as well as several precursors of the disubstituted IQcs derivatives. The synthesized compounds were characterized by usual analytical techniques (ex.: C,H,N analysis, multinuclear NMR, ESI-MS, HPLC) which confirmed the chemical structure of the different compounds and that showed that they presented the purity required to proceed with the studies.

KEY-WORDS: Cancer theranostic, G-quadruplex, Bis(Thiosemicarbazones), Indolo[3,2-c]quinolines, Copper complexes.

Índice Geral

<i>Agradecimentos</i>	v
<i>Resumo e Palavras - Chave</i>	viii
<i>Abstract and Key-words</i>	x
<i>Índice Geral</i>	xii
<i>Índice de Esquemas</i>	xiv
<i>Índice de Figuras</i>	xvi
<i>Índice de Tabelas</i>	xviii
<i>Lista de Abreviaturas e Símbolos</i>	xx
Preâmbulo	1
Capítulo 1. Introdução e Objetivos do Trabalho	7
1.1. Mutações genéticas e Cancro	7
1.2. ADN – Polimorfismo e Topologias	8
1.2.1. Duplexos de ADN	9
1.2.2. Triplexos de ADN	12
1.2.3. G-quadruplexos de ADN.....	13
1.3. Telomerase	17
1.4. Ligandos seletivos para G-quadruplexos	18
1.5. Medicina Nuclear na Teranóstica de Cancro	23
1.5.1. Complexos Radioativos de Cobre com Interesse Biomédico	27
1.6. Objetivos do Trabalho.....	32
Capítulo 2. Resultados e Discussão	37
2.1. Síntese dos Ligandos Bifuncionais e respetivos Complexos de Cobre	38
Síntese de Diacetil-mono-4-metil-3-tiossemicarbazona (L1).....	40
Síntese de Diacetil-4,4-dimetil-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (L2).....	41
Síntese de Diacetil-4-ácido butirico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (L3) e do respetivo complexo de Cu(II) (C1).....	43
Síntese de Diacetil terc-butil 4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (L5) e do respetivo complexo de Cu(II) (C2).....	46
2.2. Síntese de Derivados de Indolo[3,2-c]quinolinas	54
Síntese de 2- {[(4-bromofenil)amino]metileno} malonato de etilo (RC1).....	56
Síntese de 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de etilo (RC2)	57
Síntese do ácido 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3 carboxílico (RC3).....	59
Síntese de 6-bromoquinolin-4-ol (RC4)	60
Síntese da 6-bromo-4-cloroquinolina (RC5)	62
Síntese de 6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (RC6).....	63

Síntese da 6-bromo-4-(5-bromo-1H-benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (RC7-1) e da 6-bromo-4-(6-bromo-1H-benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (RC7- 2).....	65
Capítulo 3. Conclusões	71
Capítulo 4. Procedimentos Experimentais	76
4.1. Condições gerais	76
4.1.1. Solventes e Reagentes	76
4.1.2. Técnicas de caracterização e Equipamentos	76
4.1.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	76
4.1.2.2. Espectrometria de massa (ESI-MS)	77
4.1.2.3. Análise elementar de C, H e N	77
4.1.3. Técnicas de purificação	77
4.1.3.1. Cromatografia em coluna	77
4.1.3.2. Recristalização por par de solventes – FFUL.....	79
4.1.3.3. Recristalização por gradiente térmico – C ² TN	79
4.1.4. Técnicas de Monitorização das Reações.....	79
4.1.4.1. Cromatografia em camada fina (TLC).....	79
4.2. Síntese Química	80
4.2.1. Síntese de Ligandos bifuncionais – BTS.....	80
Síntese de Diacetil-mono-4-metil-3-tiossemicarbazona (L1).....	80
Síntese de Diacetil-4,4-dimetil-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (L2).....	80
Síntese de Diacetil-4-ácido butirico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (L3)	81
Síntese de Diacetil-4-ácido butirico-4'-metilbis(tiossemicarbazonato)-cobre(II) [Cu ^{II} (L ³)], (C1)	81
Síntese de <i>tert</i> -Butil 2-aminoetilcarbamato (L4)	82
Síntese de Diacetil <i>tert</i> -butil 4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (L5)	82
Síntese de Diacetil <i>tert</i> -butil 4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazonato)- cobre(II) (C2).....	83
4.2.2. Síntese de Derivados de Indolo[3,2- <i>c</i>]quinolinas.....	84
Síntese de 2-{{(4-bromofenil)amino}metileno}malonato de etilo (RC1).....	84
Síntese de 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de etilo (RC2)	84
Síntese do ácido 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3 carboxílico (RC3).....	84
Síntese de 6-bromoquinolin-4-ol (RC4)	85
Síntese da 6-bromo-4-cloroquinolina (RC5)	85
Síntese de 6-bromo-1H-benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol (RC6).....	85
Síntese da 6-bromo-4-(5-bromo-1H-benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (RC7-1) e da 6-bromo-4-(6-bromo-1H-benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (RC7- 2).....	86
Referências Bibliográficas	90

Índice de Esquemas

Esquema 1 - Estratégia de síntese dos ligandos bifuncionais do tipo BTS e respectivos complexos de Cu(II).....	38
Esquema 2 - Síntese de Diacetil-mono-4-metil-3-tiossemicarbazona (ligando L1).....	40
Esquema 3 - Síntese de Diacetil-4,4-dimetil-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (ligando L2).....	41
Esquema 4 - Síntese de Diacetil-4-ácido-butirico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (ligando L3).....	43
Esquema 5 - Síntese de Diacetil-4-ácido butírico-4'-metilbis(tiossemicarbazonato) de cobre (C1).....	44
Esquema 6 - Procedimento sintético para a obtenção de <i>tert</i> -Butil 2-aminoetilcarbamato (L4).....	46
Esquema 7 - Síntese de Diacetil-4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (composto L5).....	47
Esquema 8 - Síntese de Diacetil <i>tert</i> -butil 4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazonato) de cobre(II) (C2).....	52
Esquema 9 - Estratégia de síntese de derivados de indolo[3,2- <i>c</i>]quinolinas.....	55
Esquema 10 - Síntese de 2-[(4-bromofenil) amino]metileno}malonato de etilo (composto RC1).....	56
Esquema 11 - Síntese de 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de etilo (composto RC2).....	57
Esquema 12 - Síntese do ácido 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3 carboxílico (composto RC3).....	59
Esquema 13 - Síntese de 6-bromoquinolin-4-ol (composto RC4).....	60
Esquema 14 - Síntese da 6-bromo-4-cloroquinolina (composto RC5).....	62
Esquema 15 - Síntese de 6-bromo-1H-benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol (composto RC6).....	63
Esquema 16 - Procedimento sintético para a obtenção da 6-bromo-4-(5-bromo-1H-benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)quinolina e da 6-bromo-4-(6-bromo-1H-benzo[<i>d</i>][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (compostos RC7-1 e RC7-2 , respetivamente).	65

Índice de Figuras

Figura 1 - Emparelhamento de bases de Watson-Crick	10
Figura 2 - Estrutura de ADN Duplex. a) B-ADN; b) A-ADN; c) Z-ADN	11
Figura 3 - Estrutura de ADN Triplex. (A) Tríade de bases TxAT com sulcos Watson-Crick, Watson-Hoogsteen e Crick-Hoogsteen. (B) Tripleto de bases C ⁺ xGC . (C) Desenho esquemático da tripla Hélice de ADN	12
Figura 4 - A) Tétrade de guanina com um catião monovalente no centro. B) G4 estabilizado por iões K ⁺	14
Figura 5 - Topologias de G-quadruplexos intramoleculares. A) Antiparalela; B) Paralela; C) e D) Híbridas	15
Figura 6 - Estruturas de ligandos de G4. A) Telomestatin (macrociclos); Naftaleno diimida (Policiclos aromáticos fundidos); Piridostatina (Policiclos aromáticos não fundidos); Complexos metálicos. B) Estrutura cristalográfica do complexo de Naftaleno diimida com o G4 do telómero	19
Figura 7 - Estrutura de derivados de indoloquinolina. A) Criptolepina. B) Isocriptolepina.....	21
Figura 8 - Complexos de Cu(II)-BTS. A) Estrutura do Cu-ATSM. B) Estrutura do Cu-PTSM.....	31
Figura 9 - Estrutura geral de complexos de Cu(II) estabilizados por bis(tiossemicarbazona) funcionalizada com um derivado de indolo[3,2-c]quinolinas	33
Figura 10 - Espectro de RMN ¹ H do composto L1 , em <i>d</i> ₆ -DMSO	41
Figura 11 - Espectro de RMN de ¹ H do composto L2 , em <i>d</i> ₆ -DMSO	42
Figura 12 - Espectro de RMN de ¹ H do composto L3 , em <i>d</i> ₆ -DMSO	44
Figura 13 - ESI-MS do complexo C1 : (A) Modo positivo; (B) Modo negativo	45
Figura 14 - Espectro de RMN de ¹ H do composto L5 , em <i>d</i> ₆ -DMSO	48
Figura 15 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto L5 , em <i>d</i> ₆ -DMSO	49
Figura 16 - Espectro de RMN [¹ H, ¹ H] COSY do composto L5	50
Figura 17 - Espectro de RMN [¹ H, ¹³ C] HSQC do composto L5	51
Figura 18 - Espectro ESI-MS do ligando L5 , em Modo negativo	51
Figura 19 - Espectro ESI-MS do complexo C2 , obtido no modo negativo	52
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹ H do composto RC1 , em <i>d</i> ₆ -DMSO	57
Figura 21 - Espectro de RMN de ¹ H do composto RC2 , em <i>d</i> ₆ -DMSO.....	58
Figura 22 - Espectro de RMN de ¹ H do composto RC3 , em <i>d</i> ₆ -DMSO	60
Figura 23 - Espectro de RMN de ¹ H do composto RC4 , em <i>d</i> ₆ -DMSO	61
Figura 24 - Espectro de RMN de ¹ H do composto RC5 , em <i>d</i> ₆ -DMSO	62
Figura 25 - Espectro de RMN de ¹ H do composto RC6 , em <i>d</i> ₆ -DMSO	64
Figura 26 - Espectro de RMN de ¹ H da fração F2 (RC7-1 ou RC7-2), em <i>d</i> ₆ -DMSO.	66
Figura 27 - Espectro de RMN de ¹ H da fração F3 (mistura de RC7-1 e RC7-2), em <i>d</i> ₆ -DMSO	67

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Radiofármacos aprovados para uso clínico em Terapia, em Medicina Nuclear	24
Tabela 2 - Propriedades físicas de alguns radionuclídeos emissores de electrões Auger	25
Tabela 3 - Propriedades físicas e potenciais aplicações de isótopos de cobre	28

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A	Adenina
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleíco
ARN	Ácido ribonucleico
BOC	terc-butoxicarbonilo
BTS	Bis(tiossemicarbazonas)
C	Citosina
CDCI ₃	Clorofórmio deuterado
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear (do inglês <i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>)
Cu	Cobre
Cu-BTS	Complexos de cobre(II) com ligandos bis(tiossemicarbazona)
⁶⁴ Cu-ATSM	⁶⁴ Cu-diacetil-bis(<i>N</i> 4-metiltiossemicarbazona)
⁶⁴ Cu-PTSM	⁶⁴ Cu-pirivaldeído-bis(<i>N</i> 4-metiltiossemicarbazona)
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Dupleto de dupletos
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDC	<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N</i> '-etilcarbodiimida Hidroclorada
eq.	Equivalente(s)
ESI-MS	Espectrometria de massa com ionização por electrospray (do inglês <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>).
EtOH	Etanol
eV	eletrão-volt
FRET	Transferência de Energia de Ressonância de Förster
G	Guanina

G4	G-quadruplexo
Hex	Hexano
HSQC	Coerência heteronuclear quântica única (do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
LBF	Ligando Bifuncional
LET	Transferência Linear de Energia (do inglês <i>Linear Energy Transfer</i>)
m	multiplete
M	Molar
MeOH	Metanol
N	Azoto
NHS	N-Hidroxisuccinimida
PET	Tomografia por emissão de positrão (do inglês <i>Positron Emission Tomography</i>)
p.f.	Ponto de fusão
PPA	Ácido polifosfórico
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
quint	Quintuplete
RMN (¹ H-, ¹³ C-)	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (de próton e de carbono-13, respectivamente)
s	Singuleto
S	Enxofre
SAR	Relação estrutura-atividade (do inglês <i>structure-activity relationship</i>)
SOD	Superóxido dismutase
SPECT	Tomografia Computorizada por Emissão de Fóton Único (do inglês <i>Single Photon Emission Computer Tomography</i>)
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
T	Timina

TEA	Trietilamina
TFO	Oligonucleótido formador de triplexos
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês <i>thin layer chromatography</i>)

Símbolos

α	Alfa
β	Beta
β^+	Positrão
γ	Gama
δ	Desvio químico
μ	Micro
η	Rendimento reacional

PREÂMBULO

Cancro. Palavra dotada de uma conotação negativa e assustadora. Clinicamente, define-se como uma doença somática responsável por milhões de mortes em todo o mundo e que, apesar das evoluções constantes na medicina, permanece ainda hoje uma ameaça a combater.

A quimioterapia é a terapia oncológica mais explorada e que melhor tem contribuído para um decréscimo da morbidade e mortalidade por cancro. Não obstante, esta terapia convencional tem inerentes a si algumas desvantagens, nomeadamente o desenvolvimento de multirresistência por parte de células cancerígenas e os efeitos secundários resultantes da falta de seletividade dos fármacos anti-cancerígenos. Neste sentido, torna-se crucial a procura incessante de novos fármacos com elevada atividade anti-cancerígena, que possam constituir uma melhor alternativa face aos utilizados clinicamente, preferencialmente com seletividade acrescida e efeitos secundários reduzidos.

O ADN é um alvo clássico e efetivo para fármacos anti-cancerígenos. Não obstante, o maior problema com os agentes de quimioterapia convencionais é a sua forte toxicidade e outros efeitos secundários para os pacientes, devido à sua reduzida seletividade.

O ADN contendo sequências ricas em guaninas (G) repetidas, pode formar estruturas de ordem superior – os G-quadruplexos (G4) – que têm demonstrado ocorrer em telómeros e regiões promotoras de oncogenes.

A formação de G4, por sequências de ácidos nucleicos relevantes biologicamente, manteve-se em grande medida inexplorada desde que se descobriu que a porção final dos cromossomas – os telómeros – são compostos por repetições em cadeia de sequências de ADN ricas em guaninas d(TTAGGG).

Tendo em conta as fortes associações entre a sobre-expressão da Telomerase e a ocorrência de processos carcinogénicos, estudos intensivos têm-se dedicado à investigação da relevância de estruturas de G4 na manutenção da atividade da mesma. Tal conduz-nos à sugestão de uma nova estratégia anti-cancerígena baseada em pequenas moléculas, como agentes capazes de estabilizar estruturas de G4 nos telómeros, com vista a inibir a função da telomerase e, portanto, participar na morte celular.

Para além das sequências teloméricas, os G4 também existem noutras localizações do genoma humano, nomeadamente em regiões promotoras de oncogenes.

Na década passada, vários estudos demonstraram que os G4 seriam alvos promissores para o *design* de novos compostos anti-cancerígenos (ligandos G4) com elevada seletividade para células cancerígenas e menor toxicidade em comparação com fármacos anti-cancerígenos *standard* que têm como alvo o ADN Duplex.

Assim, as estruturas G4 emergiram como um alvo atrativo que poderá permitir intervenções terapêuticas de espectro mais amplo a nível anti-cancerígeno.

Por exemplo, um candidato a fármaco, tendo como alvo os G4, pode simultaneamente prevenir o acesso da telomerase aos telómeros, devido à estabilização de telómeros e de regiões promotoras de um oncogene, tal como a região promotora KRAS – que reprime a transcrição e tradução genética.

De facto, pequenas moléculas que estabilizem estruturas de G4 de ADN, têm demonstrado desregular a transcrição de oncogenes em linhas celulares cancerígenas e induzir uma paragem de crescimento de células cancerígenas.

Contudo, numa perspetiva de descoberta de novos fármacos, deparamo-nos com um longo caminho a percorrer, uma vez que ainda há uma diversidade restrita de ligandos de G4 de ADN disponíveis e estes apresentam reduzida afinidade e seletividade para G4 de ADN .

As técnicas de imagiologia nucleares, nomeadamente a Tomografia de Emissão de Positrão (*PET*), apresentam cada vez mais uma inequívoca importância na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, para além do seu interesse intrínseco para diagnóstico precoce de inúmeras patologias. O cobre apresenta diferentes isótopos com propriedades nucleares adequadas para aplicações de diagnóstico ou terapêutica em medicina nuclear, nomeadamente o ^{64}Cu que é um emissor de positrões com importância crescente. O ^{64}Cu é também um emissor β^- e de eletrões Auger, apresentando por isso relevância para uma aproximação terapêutica do cancro. Nesta perspetiva, têm vindo a ser investigados diferentes complexos de Cu(II) que, nalguns casos, mostraram potencial para terapêutica do cancro devido à sua ação citotóxica intrínseca ou devido a efeitos radiotóxicos no caso dos congéneres radioactivos (ex. ^{64}Cu e ^{67}Cu). O presente trabalho insere-se nesta linha de investigação e tinha como objectivo principal desenvolver novos complexos de ^{64}Cu funcionalizados com derivados de indolo[3,2-c]quinolinas (IQCs) como ligandos selectivos de G4 de ADN. Esperava-se assim obter uma nova classe de compostos com potencial para terapêutica do cancro, em que os derivados de IQCs deviam conferir aos compostos capacidade para actuar como inibidores da telomerase e/ou de promotores de oncogenes e a presença do ^{64}Cu devia permitir a

visualização da biodistribuição dos compostos por imagiologia *PET*, bem como promover possíveis sinergias entre efeitos citotóxicos e radiotóxicos.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO

1.1. Mutações genéticas e Cancro

A totalidade da informação genética contida numa célula reside na molécula de ADN; daí a importância que revela a manutenção da integridade destas moléculas, durante toda a sua vida biológica, a fim de evitar todos os erros que possam ocorrer no momento da replicação do ADN. [1]

O ADN é sujeito a alterações por via de agentes químicos e físicos existentes no meio ambiente e pela ação dos radicais livres gerados no metabolismo. O ADN também sofre erros durante a sua replicação e no decorrer de outros processos metabólicos. Estas alterações (lesões ou erros), podem ser removidas por reparação ou substituídas por recombinação; ou então permanecem, culminando em mutações e posterior morte celular. [1]

As alterações ou mutações no ADN das células podem conduzir ao cancro. A alteração das células somáticas que culmina em cancro não pode normalmente ser herdada; contudo, pode existir uma base genética que permita que o cancro se desenvolva, especialmente nas condições ambientais adequadas – quando ocorrem mutações provocadas por produtos residuais da química do organismo ou por toxinas do meio ambiente. Neste sentido, a heritabilidade do cancro e outras anomalias tem sido descrita como susceptibilidade genética ou predisposição genética. [1,2]

O cancro consiste na multiplicação caótica das células. Os oncogenes são os genes associados ao cancro. A alteração num oncogene ou na regulação de um oncogene pode resultar numa proliferação celular descontrolada e no desenvolvimento de tumores. O controlo normal dos oncogenes implica outros genes, denominados genes supressores de tumor. Pode surgir um cancro quando uma mutação ativa um oncogene ou inativa um gene supressor de tumor. Para tal, é necessária a acumulação de várias mutações. Acredita-se que certas substâncias químicas, ditas carcinogénicas, podem induzir estas mutações, iniciando assim o desenvolvimento do cancro. [2]

Na arquitetura do ADN existe uma grande vulnerabilidade. Não obstante este apresenta, também, potencialidades para reparar as alterações entretanto originadas.

1.2. ADN – Polimorfismo e Topologias

É no núcleo que reside o património genético da célula sob a forma de moléculas de ADN. [1]

Antes do início da divisão celular, cada molécula de ADN é rigorosamente replicada – no núcleo – de modo a que cada célula-filha receba uma cópia exata de todos os genes da célula progenitora. Não obstante, o núcleo é muito mais do que um compartimento recatado e protegido onde a célula armazena e replica o seu genoma. Para serem ativos, os genes têm que ser expressos, ou seja, a informação contida em sequências específicas de bases na molécula de ADN, precisa de ser decodificada. [1]

O ADN é um polímero formado pela ligação de nucleótidos através de ligações fosfodiéster. Com efeito, cada fosfato esterifica um nucleótido através de C'₅, sendo o outro nucleótido esterificado em C'₃. [1]

A estrutura primária do ADN, ou seja, a ordem de encadeamento ou sequência dos nucleótidos, é variável consoante os seres vivos. Podemos, pois, dizer que cada ser vivo tem uma diferente estrutura primária do ADN, embora os seus componentes químicos fundamentais sejam sempre os mesmos (bases, pentoses, fosfatos). [1]

Em suma, o ADN constitui o suporte universal de toda a informação genética que define as características de cada organismo vivo. Esta encontra-se codificada nas sequências nucleotídicas, derivadas das quatro bases heterocíclicas: púricas [Adenina e Guanina (A e G)] e pirimídicas [Timina e Citosina (T e C)], que compõem as moléculas de ADN genómico. É possível verificar que, em cada ADN, a quantidade de T é igual à quantidade de A e que a quantidade de G é igual à quantidade de C (A=T e G=C). Portanto, cada ADN possui tantas bases púricas quantas as pirimídicas. A composição em bases heterocíclicas é, portanto, característica de cada organismo, embora todas as células de um mesmo organismo, em todas as circunstâncias biológicas, tenham um ADN com composição idêntica de bases. [1]

1.2.1. Duplexos de ADN

A identificação da estrutura helicoidal do ADN nativo – macromolécula linear em cadeia dupla, constituída por sequências polinucleotídicas complementares e antiparalelas – que culminou em 1953 com os trabalhos de Watson e Crick, marca o início de uma nova era das ciências biológicas. O modelo molecular da dupla hélice do ADN (ADN Duplex), permitiu a Crick enunciar, em 1958, o princípio universal que designou por Dogma Central da Biologia Molecular. [3]

Os estudos iniciados por Watson e Crick permitiram definir que a estrutura secundária do ADN era em hélice dupla (ADN Duplex), com duas cadeias helicoidais polinucleotídicas, estabelecendo relação entre si através do emparelhamento das bases púricas de uma hélice com as bases pirimídicas da outra hélice, por meio de pontes de hidrogénio (duas pontes de hidrogénio entre a A e a T e três pontes de hidrogénio entre a G e a C). [3]

As bases heterocíclicas são bastante hidrofóbicas e, como tal, orientam-se para o interior das hélices, enquanto que os resíduos de fosfato, como são polares, orientam-se para o exterior da hélice, isto é, para o meio aquoso. As duas hélices do ADN são complementares e antiparalelas, apresentando um eixo de simetria à volta do qual se enrolam as hélices. [3]

A maioria do ADN Duplex – nas formas A-, B-, ou Z- – é composto por cadeias complementares que se associam exclusivamente através de emparelhamento de bases de Watson-Crick. [3, 4, 5] Tal pode ser compreendido através da Figura 1 – Emparelhamento de bases de Watson-Crick.

A conformação mais comum, presente na maioria das moléculas do ADN Duplex, a pH neutro e concentrações de sal fisiológicas, é a conformação B-ADN (Figura 2 a). Esta é a conformação clássica da estrutura de dupla hélice, com enrolamento para a direita e em que os pares de bases se encontram dispostos perpendicularmente ao eixo da dupla hélice. O B-ADN não só é o polimorfismo de ADN Duplex mais comum no genoma humano, como também é o mais estável em condições fisiológicas. [4, 5, 6]

Relativamente à conformação A-ADN, esta apresenta-se na forma de duplex mais espesso, com enrolamento para a direita e menor distância entre os pares de bases (Figura 2 b). Esta conformação está também descrita para os duplexos ARN-ADN e ARN-ARN. [5, 7]

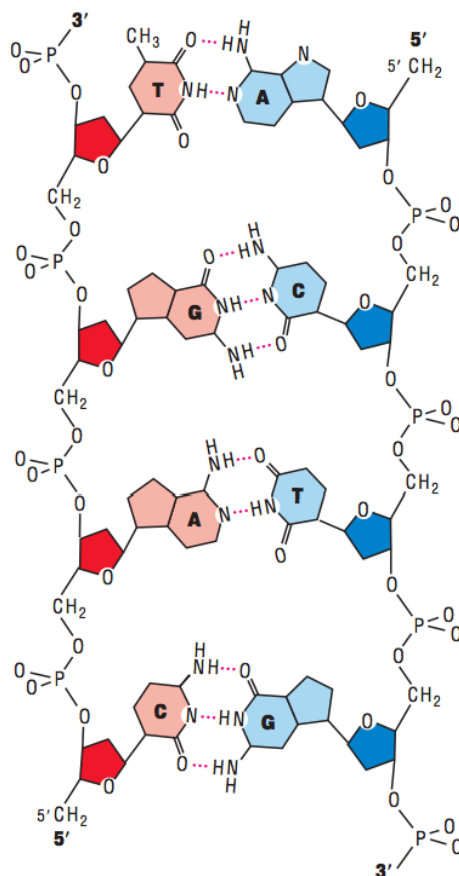


Figura 1: Emparelhamento de bases de Watson-Crick. Adaptado de: Molecular Cell Biology, 5thed. [10]

O ADN Duplex nas formas A- ou B-ADN apresenta uma estrutura helicoidal com enrolamento para a direita, contudo estas conformações podem ser distinguidas pelo espaçamento entre pares de bases, sendo que o A-ADN forma uma estrutura muito mais compacta e ordenada em meios de baixa humidade relativa. Ao contrário do que sucede com estruturas de B-ADN, o A-ADN tende a ter as suas bases azotadas desviadas do eixo helicoidal, sendo o sulco maior mais profundo e estreito enquanto que o sulco menor é largo e menos profundo. [4, 5, 7] Na Figura 2 – Estrutura de ADN Duplex, pode observar-se as estruturas de ADN Duplex mencionadas, (imagens a) e b)).

A principal diferença entre as formas A-ADN e B-ADN é a conformação da pentose – neste caso desoxirribose. Esta está na endoconformação em C'₂ para B-ADN, enquanto que na forma A-ADN está na endoconformação em C'₃. Na forma A-ADN, a ascensão axial por nucleótido é cerca de 2.59-3.59 Å, enquanto que na forma B-ADN varia entre 3.03 e 3.37 Å. Na forma A-ADN, a rotação por nucleótido sobre o eixo da hélice é apenas 30°, ao passo que na forma B-ADN aumenta para

36-45°. [4]

A terceira conformação de ADN Duplex é surpreendentemente diferente das restantes estruturas de duplexos, apresentando uma estrutura helicoidal com duas cadeias com enrolamento para a esquerda e, ao contrário do que se verifica para os dois polimorfos anteriores, não possui todas as suas bases azotadas na posição *syn* em relação às respectivas pentoses, mas sim uma mistura de *syn* e *anti* que lhe confere uma estrutura em ziguezague (daí a sua designação). Esta conformação – intitulada Z-ADN (Figura 2 c) – é formada por extensões de bases púricas e pirimídicas alternadas na sequência onde se forma, como por exemplo: CGCGC, conduzindo a um padrão de ziguezague. A estrutura de Z-ADN tem como resultado uma menor flexibilidade conformacional em relação à forma B-ADN. A alternância de bases GC favorece particularmente a formação de Z-ADN, contudo algumas modificações químicas de bases e determinados solutos podem também estabilizar esta forma de ADN Duplex. Relativamente a esta conformação, sabe-se que apenas uma pequena quantidade de ADN nas células existe na forma de Z-ADN. [4, 8, 9]

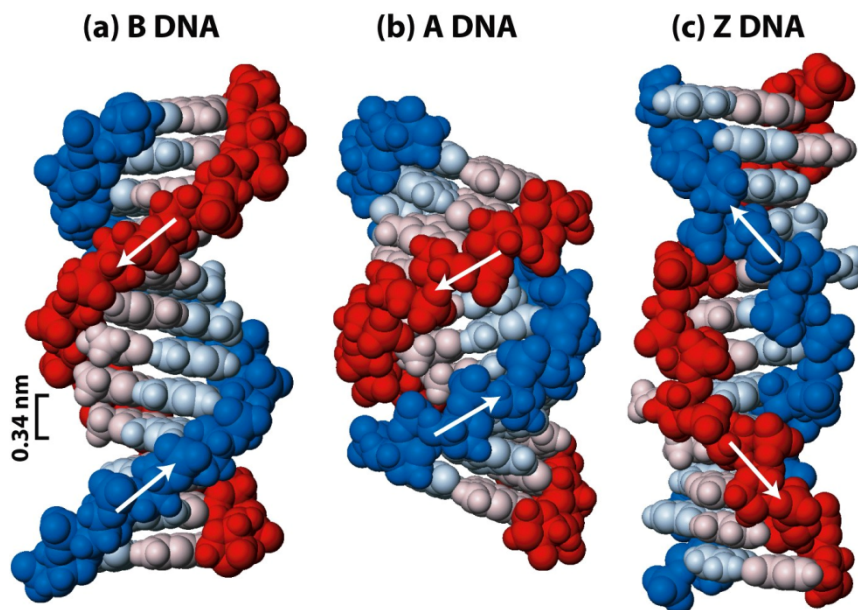


Figura 2: Estrutura de ADN Duplex. a) B-ADN; b) A-ADN; c) Z-ADN. Adaptado de Molecular Cell Biology, 5thed. [10]

1.2.2. Triplexos de ADN

Os triplexos, são estruturas de maior ordem frequentemente adoptadas pelas moléculas de ADN. Esta topologia de ADN está implicada numa panóplia de funções celulares, tais como: regulação da transcrição, processamento de ARN pós-transcricional, modificação da cromatina ou reparação do ADN. [4]

Os triplexos são constituídos por uma dupla hélice com uma terceira cadeia ligada ao sulco maior do duplexo, que irá formar ligações de hidrogénio de Hoogsteen com a cadeia rica em bases púricas. São possíveis duas configurações, num dos casos as ligações de Hoogsteen promovem a ligação da terceira cadeia numa orientação paralela à cadeia poli-púrica da hélice dupla, enquanto que uma orientação anti-paralela é estabelecida por ligações de Hoogsteen reversas. [4, 5, 8] Para compreender esta topologia de ADN, pode observar-se a Figura 3 – Estrutura de ADN Triplex.

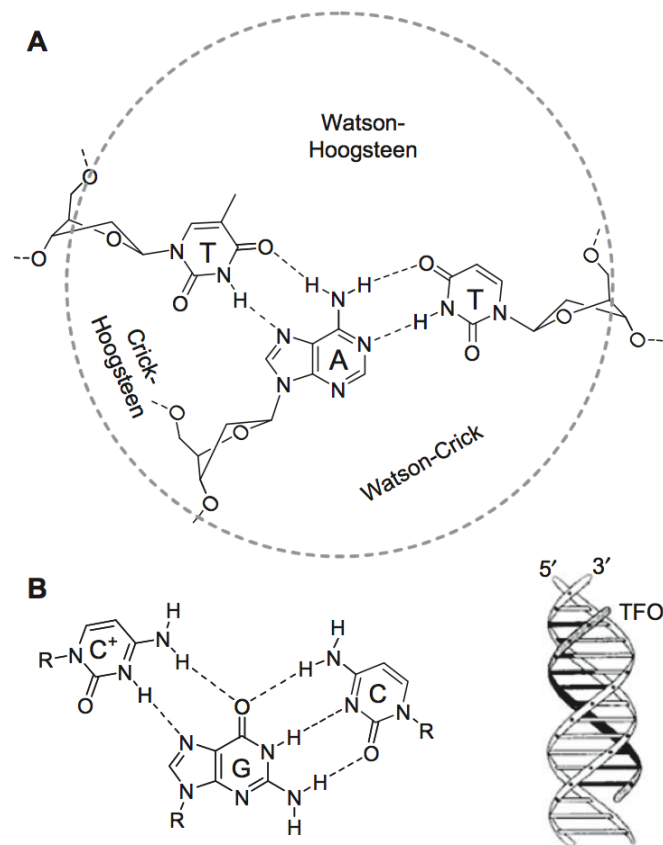


Figura 3: Estrutura de ADN Triplex. (A) Triáde de bases TxAT com sulcos Watson-Crick, Watson-Hoogsteen e Crick-Hoogsteen. (B) Tripleto de bases C⁺xGC . (C) Desenho esquemático da tripla Hélice de ADN. Adaptado de Riechert-Krause, *et al.* 2013. [38]

A formação de triplexos paralelos não é favorecida a pH fisiológico, sendo que as sequências de oligonucleótidos formadores de triplexos (TFO) podem originar também agregados de G-quadruplexos. [4]

No *motif* de bases pirimídicas, a T liga-se à A (T·A·T) e a C liga-se à G (C⁺·G·C), na cadeia poli-púrica do duplex (Figura 3 B). Devido à configuração de Hoogsteen, a terceira cadeia fica orientada paralelamente à cadeia poli-púrica. A carga positiva da citosina protonada, compensa as repulsões de carga desfavoráveis dos esqueletos de oligonucleótidos poli-aniónicos. Por outro lado, a protonação contínua das citosinas provoca repulsões de carga desfavoráveis entre elas. [4]

No *motif* de bases púricas, os tripletos (G·C·G) e (A·T·A) são formados na configuração de Hoogsteen reversa, resultando, numa estrutura de tripla hélice anti-paralela. [4] (Figura 3 C).

Os triplexos podem ser distinguidos no caso de a terceira cadeia estar ligada ao duplex (triplexo intramolecular, também designado H-ADN) ou a uma molécula independente (triplexo intermolecular). No que concerne a triplexos de ADN intermoleculares, está a ser desenvolvida a ideia de que a terceira cadeia pode ligar-se aos genes alvo no sulco maior da dupla hélice, exibindo o potencial para interferir com proteínas reguladoras que se ligam nos mesmos locais e, deste modo, exercendo controlo na expressão genética. [4, 5, 8]

1.2.3. G-Quadruplexos de ADN

Para além da estrutura inicialmente conhecida de ADN Duplex com enrolamento para a direita, o ADN pode frequentemente adotar uma topologia de maior ordem e funcionalmente útil, tal como os G-quadruplexos de ADN (G4 de ADN). [4, 11]

Os G4 de ADN constituem formas de ADN de maior ordem, particularmente relevantes em áreas do genoma como os telómeros, regiões promotoras de oncogenes (nomeadamente nos oncogenes: *c-Myc*, *c-Kit*, *bcl-2* e *KRAS*) e promotores de chaperoninas de oncogenes. [11-13]

A estabilização de G4 nos telómeros e zonas promotoras de oncogenes reveste-se de inequívoca importância, uma vez que esta estabilização induz a interrupção do ciclo celular – que irá culminar em morte celular por apoptose – o que se pretende que aconteça em células cancerígenas. Deste modo, é crucial a síntese de ligandos de G4 que exerçam seletivamente uma atividade anti-proliferativa e

quimiossensibilizante, em modelos de células cancerígenas, sem efeitos secundários consideráveis para as células normais. [14-18]

As estruturas de G4 de ADN são constituídas por empilhamentos de nucleótidos de deoxi-guanidina ligados entre si por ligações de Hoogsteen de modo a formar tétrades, tal pode ser observado na Figura 4 A – Tétrade de guanina com um catião monovalente no centro. Em suma, estas estruturas consistem num arranjo em quadrado de guaninas – G-tétrade ou G-quarteto – estabilizado por ligações de hidrogénio. [4, 11-13] Seguidamente, na Figura 4 B – G4 estabilizado por iões K^+ , pode observar-se uma ilustração de uma estrutura de G4 de ADN estabilizada por um catiões monovalentes, neste caso o K^+ .

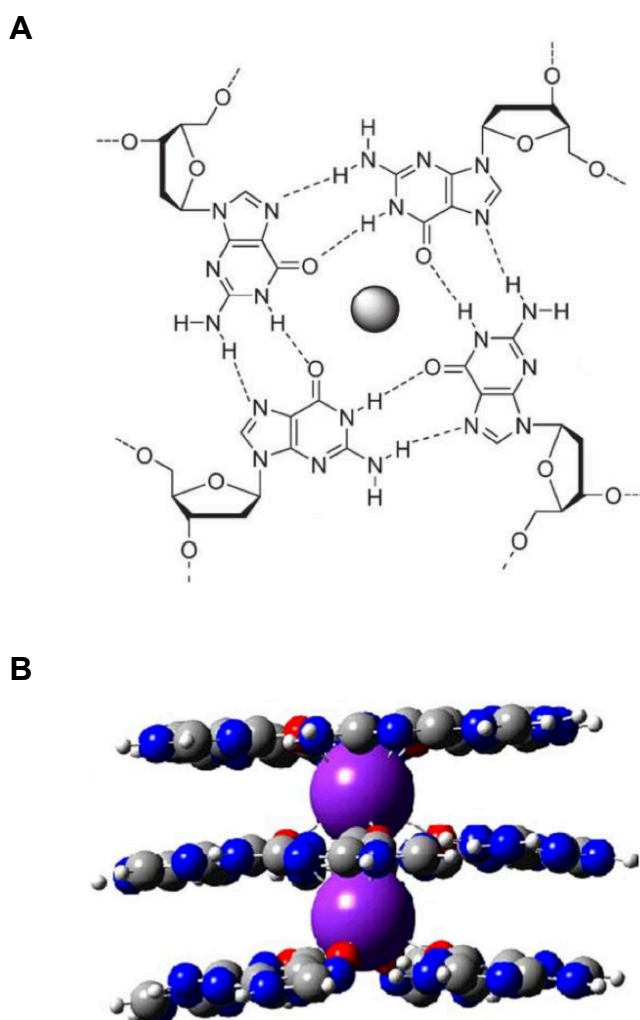


Figura 4: A) Tétrade de guanina com um catião monovalente no centro. Adaptado de Murat *et al.* 2011. [16] B) G4 estabilizado por iões K^+ . Adaptado por Clay *et al.* 2005. [22]

As oito ligações de Hoogsteen presentes numa tétrede de guanina são estabelecidas entre os prótons amino e imino de uma base e os átomos de azoto (N7) e de oxigénio (O6) da outra, ajudando a estabilizar a estrutura. (Figura 4 A) Um outro factor importante de estabilização dos G4 é a presença de catiões, geralmente monovalentes (especialmente potássio), intercalados entre as tétredes de guanina. O posicionamento destes catiões no canal central que se forma dentro do G4, permite uma estabilização adicional, por coordenação dos catiões com os átomos O6 das tétredes de guanina superiores e inferiores. [4, 19-22] (Figura 4 B).

Os G-quartetos empilham-se uns no topo dos outros para formar estruturas de G4 de ADN (Figura 4 B), as quais exibem um elevado grau de polimorfismo que depende da estequiometria da cadeia e das ansas, bem como dos catiões metálicos coordenados com os G-quartetos. Os G4 podem ser formados por enrolamento de uma sequência única rica em guaninas (intramolecular) ou por associação de duas ou quatro cadeias separadas (intermolecular). O polimorfismo pode também ser criado pelo arranjo relativo das cadeias. [4, 12, 13, 16, 18, 19]

Desde modo, dependendo da direcção das cadeias – ou partes da cadeia – as estruturas podem ser descritas como paralelas, anti-paralelas ou híbridas. [12, 17, 19, 20]. Para contextualizar o supra-mencionado, pode observar-se a Figura 5 – Topologias de G-quadruplexos intramoleculares.

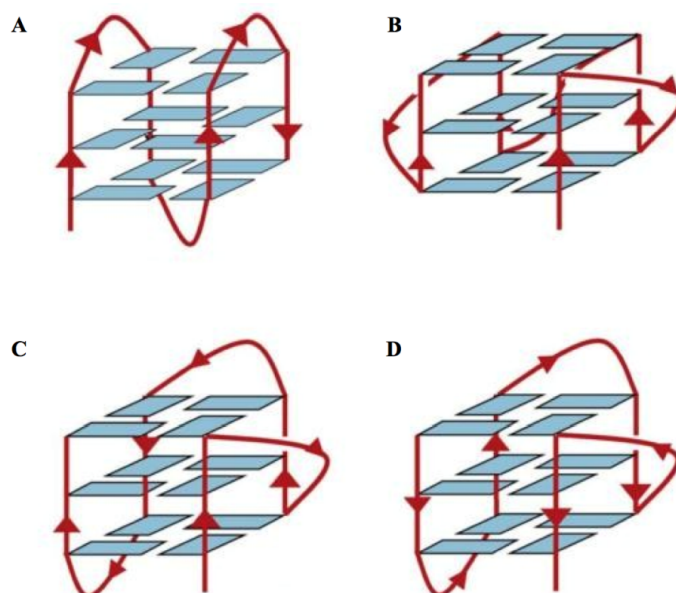


Figura 5: Topologias de G-quadruplexos intramoleculares. A) Antiparalela; B) Paralela; C) e D) Híbridas. Adaptado de Neidle. 2009. [19]

Os G-quadruplexos paralelos são constituídos por quatro cadeias paralelas. Deste modo, os G4 paralelos requerem uma ansa para ligar o G-quarteto inferior ao G-quarteto do topo, criando ansas de reversão da orientação da cadeia (dupla cadeia reversa). [4, 16, 19, 20] (Figura 5 B)

Cadeias anti-paralelas ligam os G-quartetos por ansas laterais ou diagonais, dependendo se as cadeias estão adjacentes ou opostas diagonalmente. [19, 20] (Figura 5 A)

Estruturas híbridas são topologias de G-quadruplex em que a progressão na cadeia é feita sempre no mesmo sentido, com exceção de um dos lados. (Figuras 5 C e D)

Devido aos fatores supra-mencionados, todos os quadruplexos paralelos têm guaninas com ângulos de torção glicosídica numa conformação *anti*. Por outro lado, os G-quartetos em quadruplexos anti-paralelos são encontrados em ambas as conformações *syn* e *anti*. [12, 24] (Figura 5 A)

A sequência e tamanho das ansas tem igualmente um papel importante na determinação da topologia dos quadruplexos. Os resíduos das ansas podem, eles próprios, formar interações *stacking* e ligações de hidrogénio. [4, 19, 20]

Os G4 podem também ser caracterizados pela coordenação de catiões monovalentes, habitualmente K^+ e Na^+ . [4, 16, 20-22] (Figura 4 B)

Não obstante, a estabilização não é a mesma para todos os iões monovalentes, verificando-se a seguinte ordem: $K^+ > NH_4^+ > Rb^+ \sim Na^+ > Cs^+ > Li^+$. As elevadas concentrações intracelulares de potássio, em particular, fazem com que este seja o catião estabilizador com maior relevância, o que, aliado ao seu raio iónico, faz com que seja o melhor estabilizador de entre os iões mencionados e, conseqüentemente, um dos catiões mais usados para induzir a formação de G4 em solução. [4, 16, 20-22]

A variabilidade da topologia de G4, a partir de uma mesma sequência, pode também surgir devido a diferentes características de coordenação com o catião metálico. [4, 16, 19-22] Por exemplo, a sequência de ADN telomérico humano, d[AGGG (TTAGGG)₃] forma uma topologia anti-paralela com uma ansa diagonal e duas laterais em solução de Na^+ , denominadas “tipo cesto”. Por outro lado, o complexo de potássio com esta sequência tem estruturas variáveis e complicadas, incluindo estrutura anti-paralela “tipo cesto” ou “tipo cadeira”, estrutura cristalográfica paralela “tipo hélice” e estrutura do “tipo misto” com uma hélice e duas ansas laterais. [23, 24]

Para além disto, há quatro sulcos nas estruturas dos quadruplexos, definidas como cavidades delimitadas por esqueletos fosfodiéster. [12, 17, 23, 24] As dimensões dos sulcos são variáveis, dependendo da topologia global e natureza das ansas. [12, 16, 23, 24]

Esta diversidade estrutural sugere que é possível desenhar ligandos seletivos para os diferentes G4.

1.3. Telomerase

A Telomerase – complexo de ribonucleoproteína com cerca de 170 kDa – intervém no processo de transformação neoplásica. [23] À luz do que se vai conhecendo – no âmbito da patologia tumoral maligna – a Telomerase surge cada vez mais como um potencial alvo para fins de diagnóstico e terapêutica. Sendo, deste modo, proposta como um novo alvo potencialmente seletivo para a terapia anti-cancerígena – razão pela qual tem recebido maior foco de atenção e investigação, desde a década de 90. [23, 25-32]

A Telomerase – cuja principal função é manter o comprimento dos telómeros e a integridade cromossómica – está altamente ativa em células cancerígenas e praticamente ausente em células somáticas, sendo possível estabelecer uma associação entre a atividade da Telomerase e a resistência à apoptose. [25, 26]

A Telomerase sintetiza ADN telomérico, que confere estabilidade aos cromossomas. Na ausência da Telomerase, os telómeros encurtam em cada ciclo de replicação do ADN, conduzindo à interrupção do ciclo celular (senescência) ou à morte celular por apoptose. Assim, a sua repressão ou regulação rigorosa em humanos, pode funcionar como supressor de tumores. [14, 25, 27, 28]

As vantagens chave de utilizar a Telomerase como alvo – em comparação com a panóplia de alvos em processos oncológicos – incluem a sua relativa universalidade e originalidade, assim como a sua especificidade para células cancerígenas. [25] A Telomerase surge sobre-expressa em muitos tumores – cerca de 80-90% de praticamente todos os tipos de cancro, incluindo células estaminais cancerígenas – e é necessária para a manutenção a longo-prazo dos telómeros, que por sua vez são fundamentais para a sobrevivência a longo-prazo de células cancerígenas. [14, 25, 26, 30]

Nenhum outro gene associado a processos oncológicos está tão amplamente expresso em tumores. Além disso, a baixa ou transiente expressão da Telomerase em tecidos normais e geralmente telómeros mais longos – em células normais versus células cancerígenas – confere um certo grau de especificidade a

fármacos que têm como alvo a Telomerase e reduz a probabilidade de citotoxicidade acrescida em células de tecidos normais. [14, 25, 29]

Em suma, fármacos anti-cancerígenos que atuem ao nível da inibição da Telomerase podem ter uma ampla janela terapêutica. Neste sentido, a investigação de novos inibidores da Telomerase - com melhores efeitos anti-cancerígenos e um perfil de segurança melhor estabelecido - é um tópico com grande importância na moderna química medicinal. [25-32]

1.4. Ligandos seletivos para G-Quadruplexos

O *design* de ligandos seletivos para G4 focou-se, inicialmente, na diferenciação entre ADN Duplex e G4. Com um número crescente de quadruplexos identificados no genoma, o *design* de ligandos tem sido igualmente dirigido à seletividade entre diferentes topologias de quadruplexos. [33, 34]

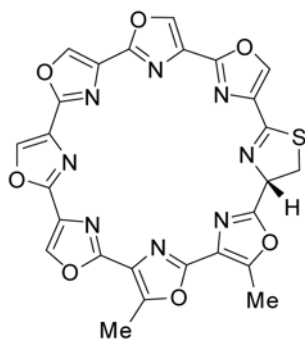
O número de ligandos G4 conhecidos tem vindo a aumentar. Muitos destes ligandos apresentam uma grande superfície aromática plana, cargas catiónicas e capacidade para adotar um modo de *stacking* no G-quarteto terminal. [34]. Neste sentido, a título de exemplo, surge a Figura 6 – Estruturas de ligandos de G4, que ilustra as diferentes classes químicas de ligandos de G4.

Complexos metálicos podem ser uma boa alternativa a moléculas orgânicas clássicas, assumindo que o centro metálico pode ser posicionado sobre o canal catiónico dos G4 e por otimização de interações *stacking* do agente quelante com o G-quarteto. A sua natureza catiónica ou altamente polarizada, constitui uma vantagem para promover a associação com os G4 de ADN, carregados negativamente. Não obstante, o uso de complexos organometálicos, pode conduzir a toxicidade aguda e efeitos secundários intoleráveis em tecidos normais, devido à sua capacidade de interação com o ADN Duplex. Por conseguinte, o aumento da seletividade para G4 relativamente a ADN Duplex é um aspeto crucial. A geometria estrutural do centro metálico é um fator chave para controlar esta seletividade. [33-35]

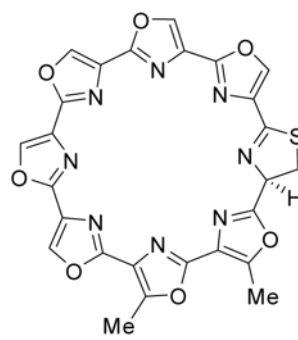
A presença de substituintes relativamente volumosos (como por exemplo a piperidina) pode reduzir a capacidade dos complexos para intercalar entre os pares de bases do ADN Duplex, enquanto que aumenta a ligação com os sulcos de G4 de ADN, aumentando assim a seletividade destes complexos. [33, 34]

Existe uma enorme variedade de pequenas moléculas orgânicas, assim como complexos metálicos que foram desenvolvidos como potenciais agentes estabilizadores de G4. [34] (Figura 6 A)

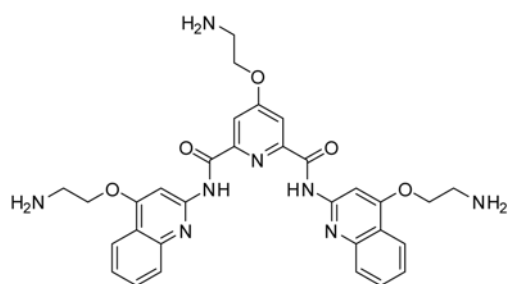
A



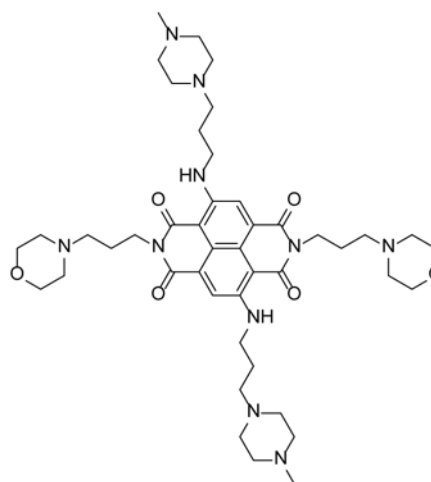
(S)-Telomestatina



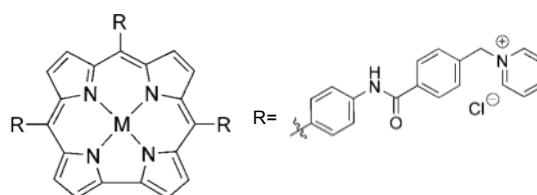
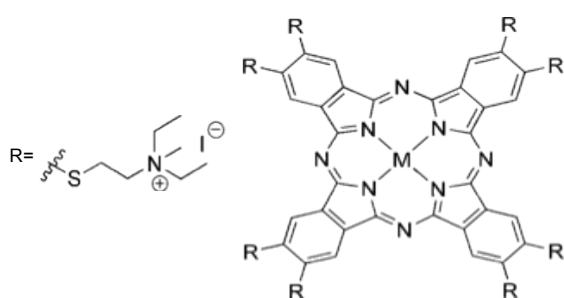
(R)-Telomestatina



Piridostatina



Naftalenodiimida



Complexos Metálicos

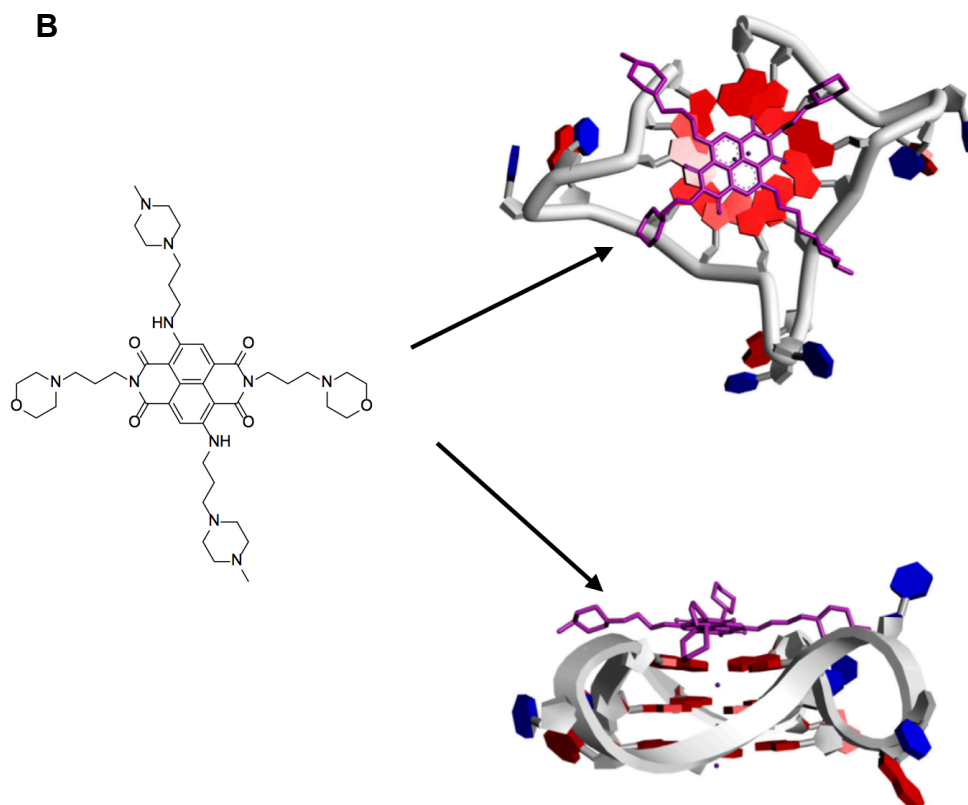


Figura 6: Estruturas de ligandos de G4. A) Telomestatin (macrociclos); Naftaleno diimida (Policiclos aromáticos fundidos); Piridostatina (Policiclos aromáticos não fundidos); [34] Complexos metálicos [70]. B) Estrutura cristalográfica do complexo de Naftaleno diimida com o G4 do telômero. Adaptado de Neidle *et al.* 2014. [34]

As indoloquinolinas são um exemplo de uma das classes de compostos orgânicos que têm relevância como ligandos de G4, como demonstrado recentemente por Alexandra Paulo e colaboradores. [36, 37, 39, 42] Tratam-se de compostos tetracíclicos planares – de origem natural – que na sua estrutura possuem um núcleo de indole e outro de quinolina. Pela sua estrutura aromática (aromáticos fundidos) e por poderem suportar diferentes tipos de derivatização, tornam-se atrativos para o *design* de ligandos de G4. [36-38].

Nos últimos anos, estes compostos têm atraído um interesse considerável por parte dos investigadores, muito em prol do seu amplo espectro de atividades biológicas e da sua capacidade de ligação a várias topologias de ADN. [37, 38]

As indoloquinolinas naturais são quase exclusivamente isoladas a partir de uma espécie de arbusto presente na África Ocidental, de seu nome *Cryptolepis sanguinolenta*, que inclui a indolo[3,2-b]quinolina não substituída, também denominada quindolina e a criptolepina (5-metil-5H-indolo[3,2-b]quinolina) (Figura 7 A). [36, 38]

Extratos desta planta têm sido usados desde há bastante tempo, na medicina tradicional na África Central e Ocidental, no combate a diversas doenças – nomeadamente doenças infecciosas – incluindo a malária. Para além da sua atividade antimalárica, a criptolepina por si só tem capacidade para atuar como agente anti-bacteriano, anti-fúngico e anti-cancerígeno. [38, 39]

A 5-metil-indolo[3,2-c]quinolina (IQc), também conhecida como isocriptolepina, (Figura 7 B), foi posteriormente isolada a partir da mesma espécie de arbusto. Vários estudos demonstraram que também as IQcs constituem esqueletos químicos interessantes para o desenvolvimento de novos anti-cancerígenos. [37-39, 44]

Em suma, o potencial citotóxico de alguns derivados de indoloquinolinas pensa-se que seja devido às interações estabelecidas por estas moléculas com o ADN genómico, nomeadamente interações π - π *stacking* favoráveis do esqueleto de indoloquinolina intercalado com os pares de bases do ADN. [38] Para além da ligação ao ADN Duplex, os derivados de indoloquinolinas também demonstraram capacidade para estabelecer – com elevada afinidade – ligações com Triplexos de ADN, assim como com estruturas G4. [40]

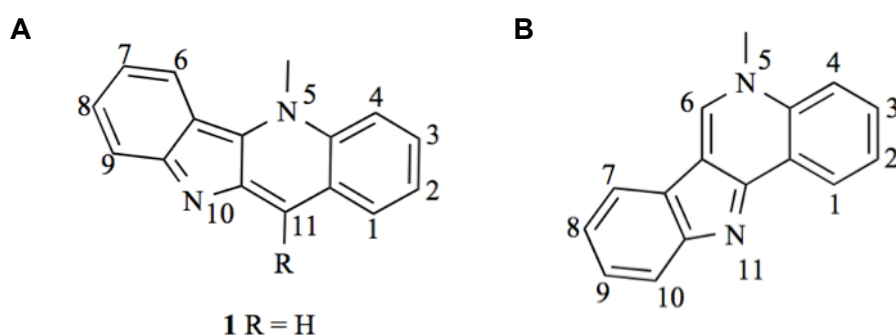


Figura 7: Estrutura de derivados de indoloquinolina. A) Criptolepina. B) Isocriptolepina. Adaptado de Lavrado *et al.* 2010 [39]

As indolo[3,2-b]quinolinas (IQb) são uma classe de ligandos de G4 bem estabelecida que tem emergido como potenciais agentes anti-cancerígenos. Um dos primeiros estudos com base nestes compostos foi efetuado por Neidle *et al.*, [43] o qual demonstrou que os derivados de IQb estabilizam os G4 teloméricos. Estudos subsequentes exploraram as IQbs como estabilizadores de G4 nos telómeros e em regiões promotoras de oncogenes.

Estudos recentes com de derivados de IQb di- e tri-substituídos sugerem que o tipo, número e posição relativa de cadeias laterais básicas, constituem fatores importantes que comandam a eficiência de ligação e seletividade inter-G4. [36, 41-43] Apesar de existirem numerosos estudos de ligação a G4 envolvendo derivados

de IQb, a capacidade de ligação do isómero natural IQc permanecia inexplorada. [37, 38] Neste sentido, os estudos pioneiros deste tipo de derivados foram realizados por um grupo da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL), que sintetizou uma biblioteca de IQcs – com vários padrões de substituição de cadeias laterais de alquildiamina. [37] Ensaio de fluorescência por Transferência de Energia de Ressonância de Förster (FRET) demonstraram que as IQcs com carga positiva no núcleo heteroaromático e duas cadeias laterais fracamente básicas, são estabilizadores potentes e seletivos de G4 dos telómeros humanos e do promotor do oncogene *KRAS*. [37, 44]

Ensaio espectroscópico, utilizando como modelo a sequência telomérica formadora de G4, demonstraram que a estabilização por IQcs envolve a ligação de duas moléculas de IQc (cloreto de 2,9-bis[3-(dietilamino)propil]amino}-5-metil-11*H*-indolo[3,2-*c*]quinolin-5-ium, composto **3d**) por unidade de G4, em dois locais de ligação não-independentes mas equivalentes. Estudos de Dinâmica molecular sugerem que o *stacking* final de **3d** induz um rearranjo conformacional na estrutura de G4, conduzindo à ligação de um segundo ligando **3d** ao sulco do G4. Estudos de modelação molecular também sugerem que o composto **3d**, com duas cadeias laterais de três carbonos, tem a geometria apropriada para participar em ligações de hidrogénio – diretas ou mediadas pela água – entre o esqueleto fosfatado e/ou às ansas de G4 e os átomos de N terminal das cadeias laterais. Adicionalmente, estudos anti-proliferativos demonstraram que os compostos **2d** (cloreto de 2-[[3-(dietilamino)propil]amino}-5-metil-11*H*-indolo[3,2-*c*]quinolin-5-ium) e **3d** são entre 7- a 12-vezes mais seletivos para linhas celulares malignas humanas do que para fibroblatos não-malignos. [37]

O *KRAS* é um dos oncogenes mais frequentemente mutados em carcinomas humanos. A fim de explorar uma nova estratégia terapêutica, foi desenhada uma biblioteca de derivados de IQcs, com capacidade para se ligarem aos G4 da região promotora do *KRAS*. Os ensaios biofísicos demonstraram que os compostos IQcs di-substituídos são potentes e seletivos estabilizadores deste G4; inibem preferencialmente a proliferação de linhas celulares cancerígenas ($0,22 < IC_{50} < 4,80 \mu M$), diminuem a atividade promotora do *KRAS* nestas células e reduzem tanto os níveis de ARNm como do *KRAS* (proteína) em linhas celulares de carcinoma do cólon. Além disso, as IQcs induzem a morte celular por apoptose, explicada em parte pela sua capacidade de reprimir a expressão do oncogene *KRAS*. Em suma, os resultados obtidos por Alexandra Paulo e colaboradores sugerem que ter como

alvo o oncogene *KRAS*, recorrendo à utilização de ligandos de G4 é uma estratégia anti-cancerígena promissora. [44]

1.5. Medicina Nuclear na Teranóstica de Cancro

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica cada vez mais revestida de inequívoca importância no diagnóstico precoce e terapêutica de inúmeras patologias. Além disso, as técnicas nucleares de imagem que lhe estão inerentes são cada vez mais exploradas no apoio à descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. [53]

A essência da Medicina Nuclear é a utilização de marcadores/traçadores – geralmente radiofármacos – para estudo de aspectos moleculares, metabólicos, fisiológicos ou patológicos, com finalidades de diagnóstico, terapêutica ou de investigação. Os mecanismos celulares que estão na base da captação e biodistribuição dos radiofármacos – que se traduzirá em imagens – determinam a sua aplicabilidade clínica. [53, 66]

Para contextualizar, um radiofármaco consiste numa preparação farmacêutica que pela qualidade e quantidade de radiação emitida, poderá ser utilizada no diagnóstico e terapêutica de diversas patologias. [53-55, 66]

Um radiofármaco contém um radionuclídeo que emite radiação a partir dos tecidos que o concentram no interior do corpo, na sequência da sua administração que é efectuada, usualmente, por via intravenosa. Consoante o tipo de radiação emitida, assim o radiofármaco é utilizado em diagnóstico ou terapêutica. Por norma, o radiofármaco contém um vector químico (biomolécula ou ligando orgânico) que permite a incorporação do radionuclídeo numa forma química adequada (ex.: moléculas radioiodadas, sal de tálio, complexos de tecnécio, péptidos marcados), levando à fixação preferencial no órgão ou sistema que se pretende estudar. [53-56, 66]

As técnicas de imagiologia utilizadas em Medicina Nuclear, para fins de diagnóstico clínico e/ou investigação, são a Tomografia computadorizada de emissão de fóton único (*SPECT*) e a Tomografia por emissão de positrão (*PET*). Face a outras técnicas de imagem médica, estas apresentam diferentes vantagens, nomeadamente: a sua elevada sensibilidade, a possibilidade de quantificação *in vivo* dos alvos moleculares, bem como de obtenção de informação funcional do sistema que está a ser analisado. Estas técnicas utilizam radiofármacos que incluem na sua composição um radionuclídeo que pode ser um emissor de radiação gama (γ) para *SPECT* ou de positrões (β^+) para *PET*. No caso do *SPECT* são detectados fótons γ

com uma gama de energia variável (idealmente 100-250 keV), enquanto no *PET* se detectam fótons γ de 511 keV, resultantes da aniquilação do positrão com electrões do meio. [53-55, 66]

No caso das aplicações para terapêutica, os radiofármacos devem incorporar radionuclídeos emissores de partículas alfa (α), beta (β) ou electrões Auger com capacidade de destruir células cancerígenas. Na Tabela 1, indicam-se alguns exemplos de radiofármacos aprovados para uso clínico em Terapia, sendo de salientar que todos contêm na sua composição emissores β^- . [59, 66]

Tabela 1: Radiofármacos aprovados para uso clínico em Terapia, em Medicina Nuclear. [59, 66]

Radiofármaco	Indicação Terapêutica
^{32}P -fosfato de sódio	Paliativo da dor em metástases ósseas Mieloproliferação desregulada
^{89}Sr - cloreto de estrôncio (Metastron)	Paliativo da dor em metástases ósseas
^{153}Sm - lexidronam (Quadramet)	Paliativo da dor em metástases ósseas
^{32}P -fosfato de crómio (Fosfocoll)	Tratamento de efusões peritoneais ou pleurais causadas por metástases Carcinomas no ovário e na próstata
^{131}I -iodeto de sódio (Iodotope)	Carcinoma papilar e folicular da tiróide Hipertiroidismo
^{131}I -metaiodobenzilguanidina (MIBG)	Carcinomas Neuroendócrinos
^{131}I -tositumomab (Bexxar)	
$^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ -Ibritumomabtiuxetan (Zevalin)	Tratamento dos linfomas non-Hodgkin's

Atualmente, a radioterapia convencional assume um papel preponderante, sendo a modalidade que domina as intervenções de terapêutica com radiação, aplicadas a patologias oncológicas. Não obstante, sabe-se que a radioterapia convencional não é eficaz ao nível do tratamento de tumores metastizados. Por sua vez, os agentes radiofarmacêuticos, de aplicação sistémica, são desenvolvidos para apresentarem seletividade para as células de determinado tipo de tumor, estejam estas circunscritas à área do tumor primário, ou disseminadas por outras localizações anatómicas na forma de metástases. [56, 60, 66] Desta forma, espera-se que apresentem uma maior eficácia na eliminação de metástases, desde que se utilizem radionuclídeos adequados.

Como atrás referido, os radionuclídeos usados clinicamente para fins terapêuticos são emissores de partículas carregadas (pouco penetrantes), como é o caso dos emissores de partículas beta (β^-), uma vez que devido à elevada transferência linear de energia (LET), estas partículas permitem uma destruição eficaz dos tecidos celulares, mesmo sem uma fixação altamente seletiva nos tecidos alvo – são exemplos o ^{90}Y , ^{131}I , ^{153}Sm , ^{166}Ho , $^{186/188}\text{Re}$ ou ^{177}Lu . [56, 60, 66].

Os emissores de partículas α ou de electrões Auger também podem ser úteis em terapia, já que estas partículas apresentam uma elevada radiotoxicidade. Não obstante, devido às suas propriedades físicas, a fixação no tecido alvo deve ser altamente seletiva. [56, 60, 66]

Recentemente, foi aprovado para uso clínico o $^{223}\text{RaCl}_2$, cuja designação comercial é Xofigo e que incorpora o emissor- α ^{223}Ra , sendo indicado para o tratamento de adultos com carcinoma da próstata resistente à castração. [58] O Xofigo corresponde ao primeiro radiofármaco emissor de partículas α , aprovado para uso clínico de forma regular. [58] Até ao momento, não existem radiofármacos comercializados para terapia Auger. No entanto, a concepção de radiofármacos baseados nos emissores de electrões Auger constitui uma área ativa de investigação. [56-66] Na tabela 2 apresentam-se exemplos significativos de radionuclídeos emissores de electrões Auger que foram estudados para esse efeito.

Tabela 2: Propriedades físicas de alguns radionuclídeos emissores de electrões Auger [56, 60, 67, 69]

Radionuclídeo	$T_{1/2}$	Nº. médio de electrões Auger emitidos por decaimento
^{64}Cu	12,7 horas	2
^{99m}Tc	6,0 horas	4
^{67}Ga	78 horas	4,7
^{55}Fe	2,7 anos	5,1
^{161}Tb	6,9 dias	12,4
^{111}In	67 horas	14,7
^{123}I	13,2 horas	14,9
^{125}I	59,4 dias	24,9

Os electrões Auger são electrões pouco energéticos, que apresentam elevada capacidade de LET, uma vez que depositam toda a sua energia ao longo do seu muito curto percurso nos tecidos biológicos (na ordem dos μm). [60, 61, 66]

Dado que os electrões Auger apenas percorrem curtas distâncias nos tecidos humanos, o radionuclídeo emissor de electrões Auger tem necessariamente que ser transportado para o núcleo da célula, de forma a causar danos no material genético.

Neste sentido, a maior exigência na seletividade da biodistribuição destas partículas deve-se à diferença no grau de penetração das partículas α , β e eletrões Auger. [56, 60, 62, 66]

Nos últimos anos, temos assistido a um grande esforço por parte da comunidade científica para explorar as propriedades ionizantes dos emissores de eletrões Auger, com o objetivo de se conseguir implementar um esquema de terapia com radionuclídeos, cuja ação seja convenientemente seletiva e dirigida ao órgão/tecido alvo, essencialmente dirigida ao ADN na teranóstica de cancro. [60, 62, 63, 70, 71, 91-93]

A terapia dirigida ao núcleo ou ao citoplasma das células cancerígenas – com recurso a eletrões Auger – é uma abordagem apelativa. Estas partículas apresentam capacidade ionizante baixa, quando situadas no citoplasma das células, mas elevada, quando incorporadas em compostos que interagem diretamente com o ADN. [60, 63, 64, 66, 70]

No caso de decaimento associado ao ADN, a elevada LET dos eletrões Auger fornece uma eficácia biológica relativamente elevada, semelhante às partículas α . Não obstante, em contraste com a radiação α , a radiação Auger apresenta menor toxicidade a quando do decaimento fora do núcleo celular, ou seja, no citoplasma ou fora das células durante a circulação sanguínea. [56, 60, 64, 66]

O principal desafio para o uso de emissores de eletrões Auger é a exigência de o radiofármaco ser captado por uma elevada percentagem de todas as células cancerígenas, uma vez que ao contrário dos emissores β^- não ocorre o chamado efeito cruzado ou de “cross-fire”, em que as partículas emitidas pelo radionuclídeo a partir de uma dada célula podem causar danos nas células circundantes. [60-65]

Na última década, foram utilizadas estratégias diversas para dirigir os radionuclídeos emissores de eletrões Auger para células tumorais, nomeadamente para os respectivos núcleos. Essas estratégias envolveram a radiomarcagem com emissores de eletrões Auger de diferentes biomoléculas, como sejam: hormonas, péptidos, anticorpos, nucleótidos halogenados, oligonucleótidos e intercaladores do ADN. [60, 71, 91-93]

No âmbito da Medicina Nuclear, o termo teranóstica – por definição – refere-se ao emprego do mesmo radiofármaco para fins simultaneamente de diagnóstico e terapêutica; encontra-se frequentemente associado à utilização de um vector químico marcado com um radionuclídeo específico de diagnóstico para avaliar a doença e seguidamente assegurar o acompanhamento da resposta do paciente à

terapêutica, com recurso ao mesmo vector químico marcado com um radionuclídeo adequado para terapêutica. [66] Muitos radionuclídeos – emissores de electrões Auger ou emissores de partículas β^- – com propriedades adequadas a terapia permitem também a aquisição de imagens, assegurando o acompanhamento da resposta do paciente à terapêutica (é um bom exemplo o ^{131}I que traduz a definição teórica do termo teranóstica ou o ^{64}Cu como discutido a seguir). [57, 66]

1.5.1. Complexos Radioativos de Cobre com Interesse Biomédico

De entre os vários elementos com interesse em Medicina Nuclear, o cobre oferece uma combinação única de radionuclídeos que são potencialmente convenientes para utilização em fins de diagnóstico e radioterapia dirigida, especificamente: ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{62}Cu , ^{61}Cu e ^{60}Cu . Estes radioisótopos de cobre apresentam propriedades nucleares relativamente diversas, incluindo tempos de vida-média ($T_{1/2}$) variando entre 10 minutos e 62 horas, como indicado na Tabela 3 [66-68, 72-75]. O radioisótopo ^{64}Cu – com um tempo de vida média de cerca de 12,7 horas – tem uma longa história ao nível de aplicações como traçador biomédico, nomeadamente na forma de $^{64}\text{Cu}^{2+}$ para avaliar a absorção do cobre, assim como o seu metabolismo e excreção. [67, 68, 73-75]

Tabela 3: Propriedades físicas e potenciais aplicações de isótopos de cobre
[67, 68, 73-75]

Isótopo	T _{1/2}	β ⁻ MeV (%)	β ⁺ MeV (%)	CE (%)	γ Mev (%)	Aplicação
⁶⁰ Cu	23,4 min	---	2,00 (69%)	7,4%	0,511 (186%)	Marcação radioativa de pequenas moléculas para estudos repetidos sobre diferentes condições fisiológicas
			3,00 (18%)		0,85 (15%)	
			3,92 (6%)		1,33 (80%)	
					1,76 (52%)	
					2,13 (6%)	
⁶¹ Cu	3,32 h	---	1,22 (60%)	40%	0,284 (12%)	Marcação radioativa de pequenas moléculas
					0,38 (3%)	
					0,551(120%)	
⁶² Cu	9,76 min	---	2,91 (97%)	2%	0,511 (194%)	Estudos repetidos sobre diferentes condições fisiológicas
⁶⁴ Cu	12,7 h	0,573 (39,6%)	0,655 (17,4%)	41%	0,511 (34,8%)	Marcação radioativa de pequenas moléculas, péptidos e anticorpos
					1,35 (0,6%)	
⁶⁷ Cu	62,0 h	0,395 (45%)	---	---	0,184 (40%)	Marcação radioativa de péptidos e anticorpos
		0,484 (35%)				
		0,577 (50%)				

A química dos radiofármacos de cobre é uma área de investigação muito atrativa, motivada por diversas razões, a saber: uma gama variada de propriedades nucleares dos radioisótopos de cobre; diversidade da química de coordenação do cobre; capacidade técnica para produzir os radionuclídeos; interesse crescente pelo uso de radiofármacos específicos emissores β⁻, em radioterapia interna; expansão das unidades de *PET*. [66-68, 73-75]

Para aplicações no âmbito da Medicina Nuclear os isótopos radioactivos de cobre devem ser incorporados em complexos de Cu(II) que levam à sua acumulação preferencial em dados tecidos ou órgãos-alvo. [67, 68, 72-75] Essa acumulação preferencial resulta de determinadas propriedades físico-químicas intrínsecas dos complexos metálicos (ex.: carga, tamanho, lipofilia, comportamento redox) ou é devida à presença de uma biomolécula ou farmacóforo (ex.: pequena molécula orgânica, péptido ou anticorpo) que lhe confere especificidade biológica.

Os complexos de cobre(II) com ligandos bis(tiossemicarbazona) (Cu-BTS) correspondem a uma das classes de complexos de cobre com maior importância para aplicações biomédicas, nomeadamente no âmbito da Medicina Nuclear. Os complexos Cu-BTS são conhecidos desde a década de 50, tendo sido propostos na década de 70 como agentes anti-cancerígenos. No entanto, nenhum destes complexos veio a ser usado clinicamente para esse efeito. [67, 68, 73, 76-78]. O interesse por este tipo de compostos resultou em boa parte do facto de as bis(tiossemicarbazonas) (BTS) serem compostos versáteis com interesse farmacêutico considerável devido às suas diversas atividades biológicas, a saber: anti-Alzheimer, anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-viral, anti-inflamatória, anti-malária e anti-cancerígena. A ação biológica que lhe está inerente, pode ser atribuída às suas propriedades quelantes, nomeadamente face aos iões metálicos de Cu(II). [45, 46]

As BTS atuam como um ligando quelante tetradentado – com iões metálicos de transição, coordenando-se através dos átomos de N (imino) ou S de modo simétrico, até mesmo para espécies binucleares. [47, 48, 94] Este tipo de compostos podem ainda ser utilizados como ligandos bifuncionais, ou seja, para marcação de biomoléculas ou de grupos biologicamente ativos com cobre radioativo. Formam complexos de Cu(II), neutros e com estabilidade suficiente para serem explorados em aplicações biomédicas. Para além disso, a marcação com Cu radioativo pode ser conseguida à temperatura ambiente, a diferentes valores de pH, ocorrendo em minutos e com rendimentos praticamente quantitativos. [49, 94]

Os primeiros estudos de complexos Cu-BTS com cobre radioativo foram iniciados na década de 80. Estes estudos envolveram uma família alargada de ligandos e identificaram o complexo ^{62}Cu -PTSM (piruvaldeído bis(tiossemicarbazona)) (Figura 8 B) como um ótimo candidato para o estudo da perfusão cerebral e da perfusão do miocárdio. [68, 77, 78] Os complexos de Cu-BTS já eram conhecidos por terem um largo espectro de atividades biológicas, mas foi o seu uso como veículo de entrega de isótopos radioativos de cobre, ou seja como radiofármacos, que gerou entusiasmo junto da comunidade científica. [67, 68, 77-83]

Posteriormente, o complexo de cobre(II) diacetil bis(4-metil-3-tiossemicarbazona) [Cu-ATSM] (Figura 8 A), nomeadamente quando preparado com ^{64}Cu , veio a revelar-se como um potencial radiofármaco para estudar processos de hipóxia *in vivo*, devido à sua especificidade por tecidos hipóxicos. [78-86] A visualização de tecidos em hipóxia – tecidos com baixa concentração de oxigénio, mitocôndrias anormalmente redutoras – tem interesse clínico em oncologia,

neurologia e cardiologia. Para este tipo de aplicação é necessário haver seletividade na retenção da radioatividade nos tecidos em hipóxia face aos tecidos normais. [68, 79, 83-85]

Como já referido, as BTS – como ligandos bifuncionais – podem também ser bastante úteis na obtenção de bioconjugados radioativos que podem levar à acumulação dos complexos radioactivos de cobre em tecidos ou órgãos-alvo mediante interacção com dados alvos moleculares. [49-51] Os estudos descritos envolveram essencialmente a estrutura base do Cu-ATSM que foi utilizada para conjugação de péptidos para detecção tumoral ou de compostos aromáticos para detecção de placas amilóide no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer.[52]

O complexo de $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ (diacetil-bis N4-metiltiossemicarbazona) ($^{64}\text{Cu-ATSM}$) foi originalmente desenvolvido para imagiologia de tumores em hipóxia – essencialmente por se tratar de um emissor β^+ , útil em *PET*. [78-80, 83, 85-87] Tendo em conta que o decaimento radioativo do ^{64}Cu passa não só pela emissão de positrões (partículas β^+), mas também de partículas β^- e electrões Auger, este radionuclídeo reveste-se de um grande potencial no desenho de novos agentes para teranóstica. Com efeito, McMillan *et al*, demonstraram que o $^{64}\text{Cu-ATSM}$ induz a morte celular devido à exposição das células cancerígenas a electrões Auger com elevado LET, apresentando fortes evidências de que o $^{64}\text{Cu-ATSM}$ danifica o ADN – através dos electrões Auger – com ocorrência de quebras/danos na dupla hélice do ADN e formação de aberrações cromossómicas. Estes resultados suportam a ideia de considerar o $^{64}\text{Cu-ATSM}$ como um radiofármaco eficaz na terapia anti-cancerígena em tumores em hipóxia. [89, 90]. Por outro lado, mostram que o ^{64}Cu ($t_{1/2} = 12,7\text{h}$), um radioisótopo emergente em *PET*, de fácil produção e química adaptável, tem imenso potencial como radioisótopo para utilização em imagiologia molecular e teranóstica do cancro. [66, 68, 75, 84, 86, 87]

As características favoráveis do ^{64}Cu levaram-nos a considerar que este seria um radionuclídeo adequado para o desenho de novos compostos para ligação a G4 de ADN, usando uma aproximação bifuncional no âmbito da teranóstica do cancro. [70] Para esse efeito, considerámos a estrutura base do Cu-ATSM e a sua funcionalização com indolo[3,2-c]quinolinas (IQc), na expectativa de obter novos complexos de Cu(II) com afinidade e selectividade para estruturas G4. A preparação dos complexos com cobre radioactivo (^{64}Cu) oferece a possibilidade de visualizar *in vivo* a sua biodistribuição por imagiologia *PET*; por outro lado, permite explorar

possíveis sinergias entre a citotoxicidade intrínseca dos compostos e possíveis efeitos radiotóxicos devidos à presença do ^{64}Cu .

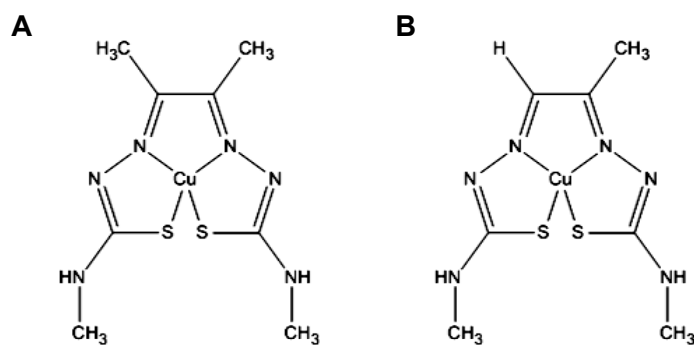


Figura 8: Complexos de Cu(II)-BTS. A) Estrutura do Cu-ATSM. B) Estrutura do Cu-PTSM. Adaptado de Liu *et al.* 2009 [79]

1.6. Objetivos do trabalho

O objetivo principal da presente dissertação era elucidar a relevância de quelatos bifuncionais de Cu(II) para o desenho de ligandos seletivos de G4 de ADN tendo em vista contribuir para o delineamento de novas estratégias para teranóstica do cancro. Para este efeito esperava-se combinar a acção citotóxica intrínseca dos compostos – enquanto ligandos de G4 de ADN – com a possibilidade de estudar *in vivo* a sua biodistribuição por imagiologia *PET* e com eventuais efeitos radiotóxicos, através da preparação e avaliação biológica de complexos congéneres radioactivos a ser preparados com ^{64}Cu .

Para atingir este objectivo, delineou-se um plano de trabalho que considerou as seguintes etapas:

1. Síntese e caracterização de ligandos bifuncionais (BTS) e respectivos complexos de Cu(II) (não radioactivos) para posterior ligação a derivados di-substituídos de IQcs, com conhecida afinidade para o G4 de ADN;
2. Síntese e caracterização de derivados de IQcs para ligação aos compostos preparados na etapa 1;
3. Conjugação dos derivados de IQcs aos ligandos bifuncionais e respectivos complexos de Cu(II) (não radioactivos) (ver Figura 9);
4. Síntese dos complexos radioactivos congéneres, utilizando ^{64}Cu e por radiomarcagem dos conjugados obtidos em 3;
5. Avaliação biológica preliminar dos novos complexos de Cu(II), preparados com $^{\text{nat}}\text{Cu}$ (ex. afinidade *in vitro* para G4 de ADN, citotoxicidade em células tumorais humanas) e com ^{64}Cu (ex. captação celular em células tumorais humanas, biodistribuição em ratinho normal).

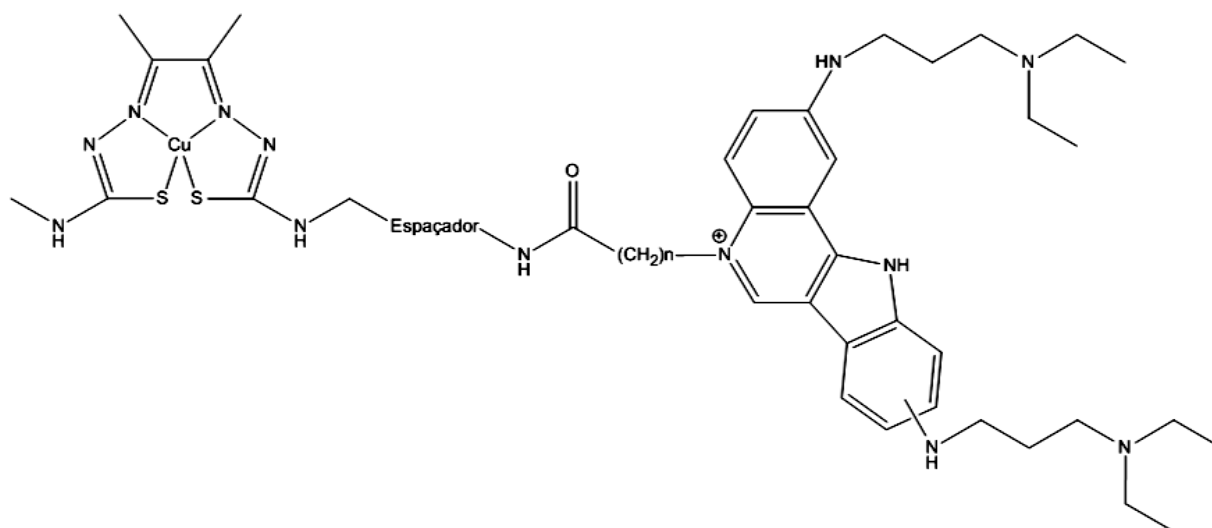


Figura 9: Estrutura geral de complexos de Cu(II) estabilizados por bis(tiossemicarbazona) funcionalizada com um derivado de indolo[3,2-c]quinolinas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, é descrita a síntese e caracterização dos diferentes ligandos bifuncionais (LBF) do tipo bis(tiossemicarbazona) (BTS) e dos respectivos complexos de cobre, bem como dos derivados di-substituídos de IQcs que se pretendiam ligar aos ligandos bifuncionais (LBFs) e complexos de Cu(II) tendo em vista obter conjugados finais com afinidade para G4 de ADN.

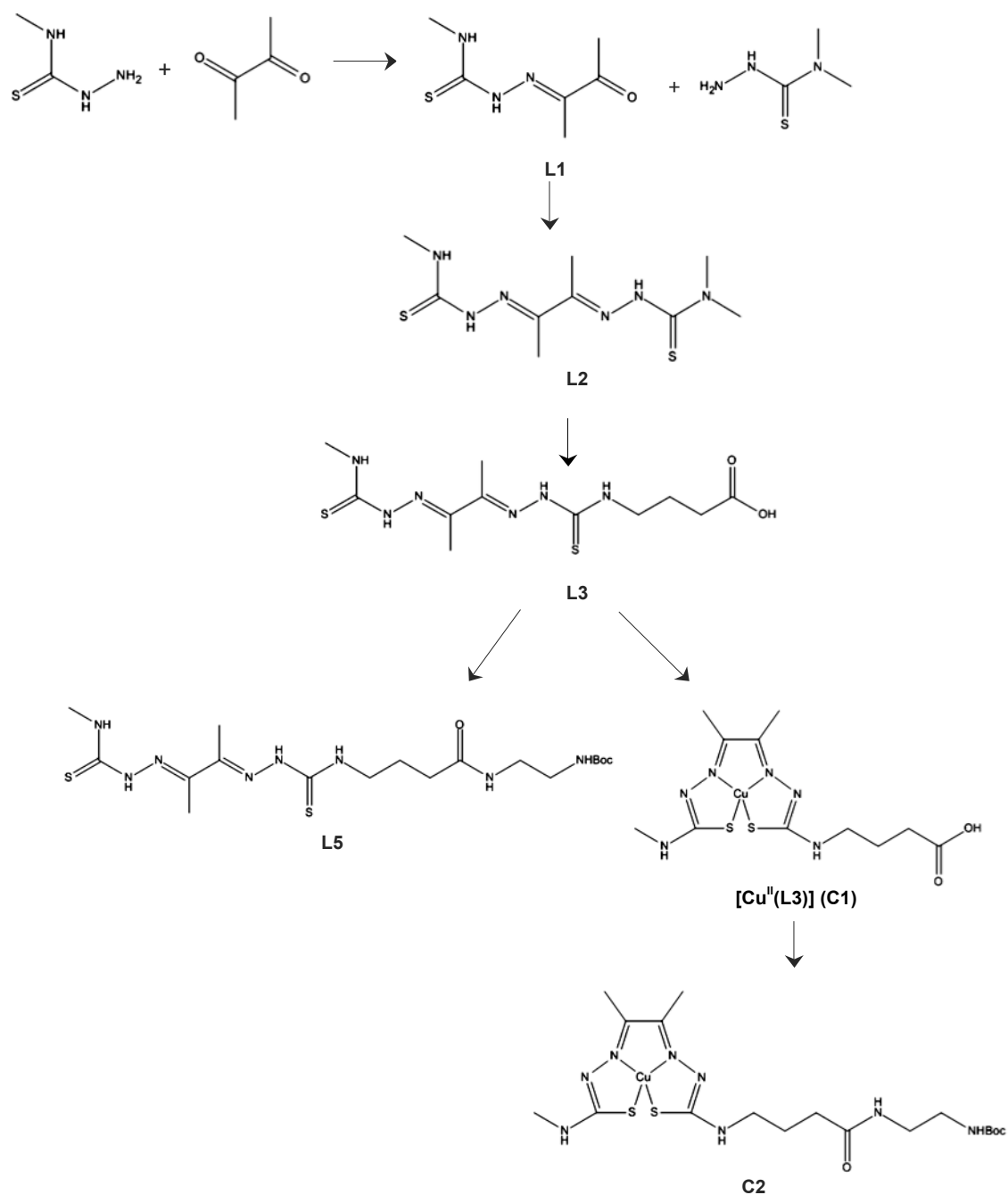
A estratégia de síntese delineada baseou-se no uso de derivados do Cu(II)-ATSM, como ligandos bifuncionais do tipo BTS. Como visto atrás, os ligandos do tipo BTS pela sua versatilidade química permitem a introdução de diversos substituintes em diferentes posições da sua estrutura e a funcionalização com pequenas biomoléculas, sem comprometer a coordenação estável de iões Cu^{2+} sob condições biológicas. O ATSM forma complexos de Cu(II) com elevada estabilidade e que só sofrem redução em células em hipóxia, surgindo como melhor alternativa a outros derivados de BTS para utilização como LBFs. Para este efeito, propusemos derivatizar a estrutura do ATSM com um grupo amino terminal para posterior acoplamento aos derivados de IQcs.

Decidimos utilizar derivados de indolo[3,2-c]quinolinas (IQcs) que, como demonstrado por Alexandra Paulo *et al.*, funcionam como ligandos selectivos de G4 de ADN. Em particular, desenhámos IQcs com duas cadeias alquildiamina em posições ideais para interação com as estruturas de G4 de ADN, conforme já demonstrado [37] e uma terceira cadeia alquílica contendo um ácido carboxílico terminal, para ligação ao derivado de BTS através da formação de uma ligação amida (Figura 9).

Como a seguir se descreve, o trabalho foi iniciado com a síntese dos LBFs do tipo BTS e respectivos complexos de Cu(II). Posteriormente, abordou-se a síntese dos derivados de IQcs devidamente modificados para permitir a ligação aos LBFs e complexos de Cu(II).

2.1. SÍNTESE DOS LIGANDOS BIFUNCIONAIS E RESPECTIVOS COMPLEXOS DE COBRE

O Esquema 1 ilustra de forma genérica os vários passos de síntese envolvidos na obtenção do ligando bifuncional final (**L5**) e do respectivo complexo de Cu(II) **C2**. Estes compostos deveriam ser utilizados para posterior conjugação ao derivado de IQCs e no caso de **L5** o conjugado a obter deveria ser utilizado para posterior marcação com ^{64}Cu .



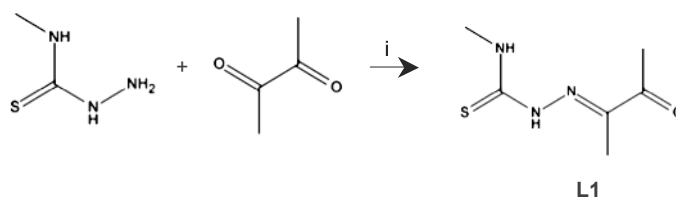
Esquema 1: Estratégia de síntese dos ligandos bifuncionais do tipo BTS e respectivos complexos de Cu(II).

A síntese dos ligandos pretendidos foi efectuada com base em métodos descritos na literatura. [95,96] Como indicado no esquema 1, a síntese dos ligandos bifuncionais iniciou-se com a preparação da BTS dissimétrica **L2** que, por reacção de transaminação seletiva, permitiu obter o derivado **L3** que contém um ácido carboxílico terminal. Finalmente, o composto **L3** reagiu com *tert*-Butil 2-aminoetilcarbamato (**L4**) para formação do ligando final **L5** contendo uma amina terminal protegida com o grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc). Após remoção do grupo BOC de **L5**, esperava-se proceder à sua ligação aos derivados de IQc's contendo um grupo carboxílico terminal através de uma reacção de formação de amida. Após complexação de Cu(II) com **L3** seguiu-se uma estratégia semelhante para incorporação do grupo amina terminal com formação do complexo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L3})]$ (**C2**), como indicado no esquema 1. A utilização do grupo protector Boc justifica-se pelo facto de o uso de *tert*-Butil 2-aminoetilcarbamato (**L4**) minimizar a formação de produtos secundários na conjugação a **L3**, comparativamente ao uso de 1,2-etilenodiamina que poderia conduzir à formação de produtos simétricos na sequência da ligação de dois ligandos **L3** à diamina.

A progressão de todos os passos reacionais foi seguida por cromatografia em camada fina (TLC). Os ligandos foram caracterizados com recurso a técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de protão (^1H -) e de carbono (^{13}C -), espectrometria de massa (ESI-MS) e análises de C, H e N. Os respectivos complexos de Cu(II) foram caracterizados pelas mesmas técnicas analíticas, com excepção da espectroscopia de RMN. Os complexos monoméricos de Cu(II) são paramagnéticos e, por essa razão, não é possível estudá-los por RMN.

A síntese e caracterização dos vários derivados de BTS sintetizados, incluindo os respectivos complexos de cobre não radioativo ($^{\text{nat}}\text{Cu}$), são descritas e discutidas a seguir de forma mais detalhada.

Síntese de Diacetil-mono-4-metil-3-tiossemicarbazona (L1)



Esquema 2: Síntese de Diacetil-mono-4-metil-3-tiossemicarbazona (ligando L1).

i: água destilada, conc. HCl (36 %), 5 °C, 1h30.

O composto **L1**, uma tiossemicarbazona assimétrica utilizada para introduzir o grupo pendente para posterior funcionalização com os derivados de IQc's, foi obtido por reação de condensação entre a 4-metil-3-tiossemicarbazida e 2,3-butanediona, como indicado no esquema 2. [95] O composto foi obtido com um rendimento reacional de 62 % e a sua identidade química foi confirmada por espectroscopia de RMN de ^1H .

O espectro de RMN de ^1H do composto **L1** (Figura 10) apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência [95], nomeadamente:

- dois singuletos (s), o primeiro a $\delta=1,96$ ppm e o segundo a $\delta=2,41$ ppm, com integração para três prótons cada, correspondendo aos prótons dos grupos metilo (CH_3);
- um duplete (d) a $\delta=3,03$ ppm, com integração para três prótons e $^3J_{\text{HH}}= 4,5$ Hz, correspondendo aos prótons do grupo metilo acoplados ao NH (NH-CH_3);
- por fim, pode constatar-se a presença de dois singuletos (s), a $\delta=8,62$ ppm e a $\delta=10,61$ ppm, com integração para um próton cada, remetendo cada um para os prótons dos dois grupos NH.

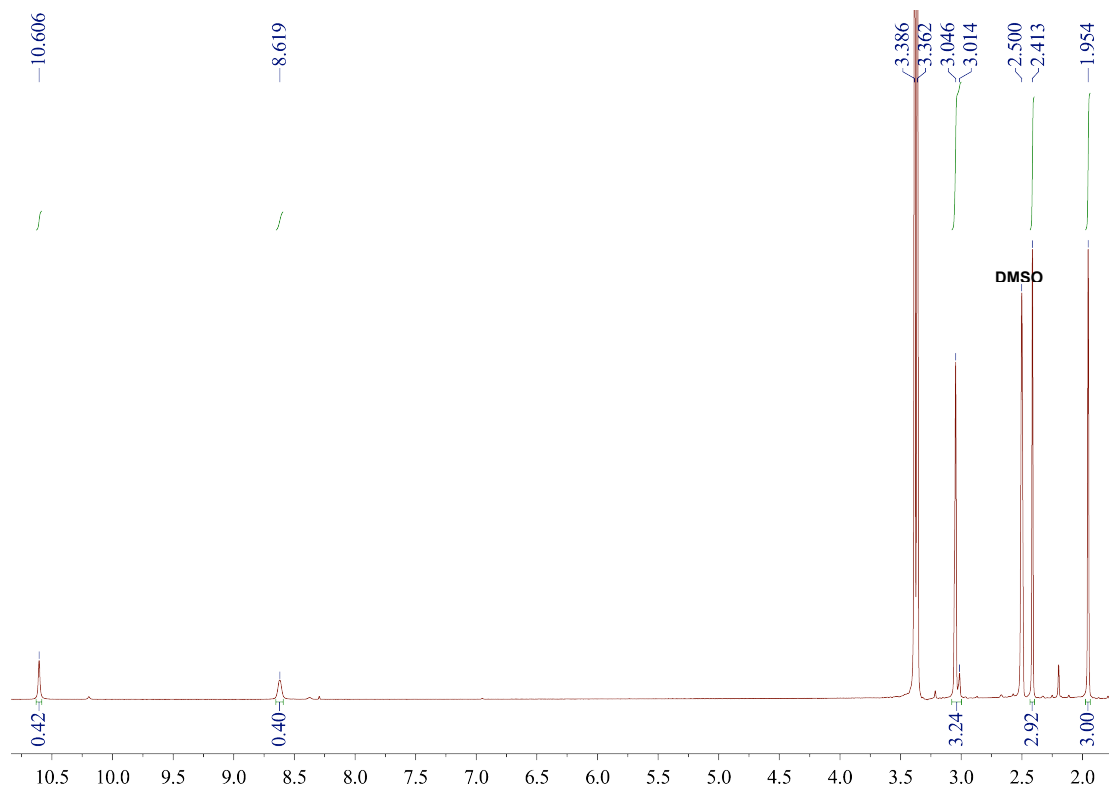
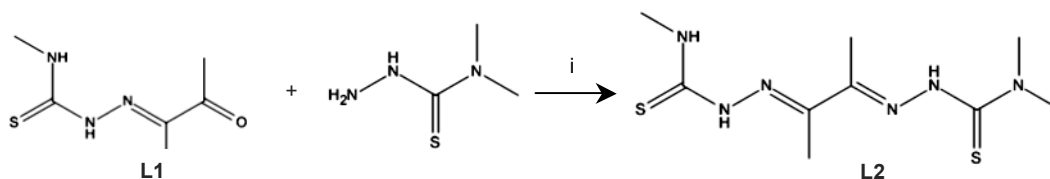


Figura 10: Espectro de RMN de ^1H do composto **L1**, em d_6 -DMSO.

A análise do espectro de **L1** (Figura 10) confirma a estrutura do composto pretendido.

Síntese de Diacetil-4,4-dimetil-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (**L2**)



Esquema 3: Síntese de Diacetil-4,4-dimetil-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (ligando **L2**). i: DMF e ácido acético (glacial), 48h.

A BTS dissimétrica (**L2**) foi preparada com elevado rendimento ($\eta = 81\%$) por condensação de diacetil-mono-4-metil-3-tiossemicarbazona com 4,4-dimetil-3-tiossemicarbazida, utilizando ácido acético como catalisador e de acordo com os procedimentos descritos na literatura. [95] A reacção conduziu ao composto pretendido (**L2**) como indicado pela caracterização de **L2** por RMN de ^1H .

O espectro de RMN de ^1H do composto **L2** (Figura 11) apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência [95], nomeadamente:

- dois singuletos (s), o primeiro a $\delta=2,14$ ppm e o segundo a $\delta=2,19$ ppm, com integração para três prótons cada, correspondendo aos prótons dos grupos metilo (CH_3);
- um duplete (d), a $\delta=3,03$ ppm, com integração para três prótons e $^3J_{\text{HH}}= 4,5$ Hz, correspondendo aos prótons do grupo metilo acoplados ao NH (NH-CH_3);
- um singuleto (s), a $\delta=3,27$ ppm, com integração para seis prótons, correspondendo aos prótons do grupo $(\text{CH}_3)_2$;
- um duplete (d), a $\delta=8,37$ ppm, com integração para um próton e $^3J_{\text{HH}}= 4,5$ Hz, que remete para o próton de NH (NH-CH_3);
- por fim, pode constatar-se a presença de dois singuletos (s) largos a $\delta=9,50$ ppm e a $\delta=10,20$ ppm, com integração para um próton cada, remetendo cada um para os prótons dos dois grupos NH.

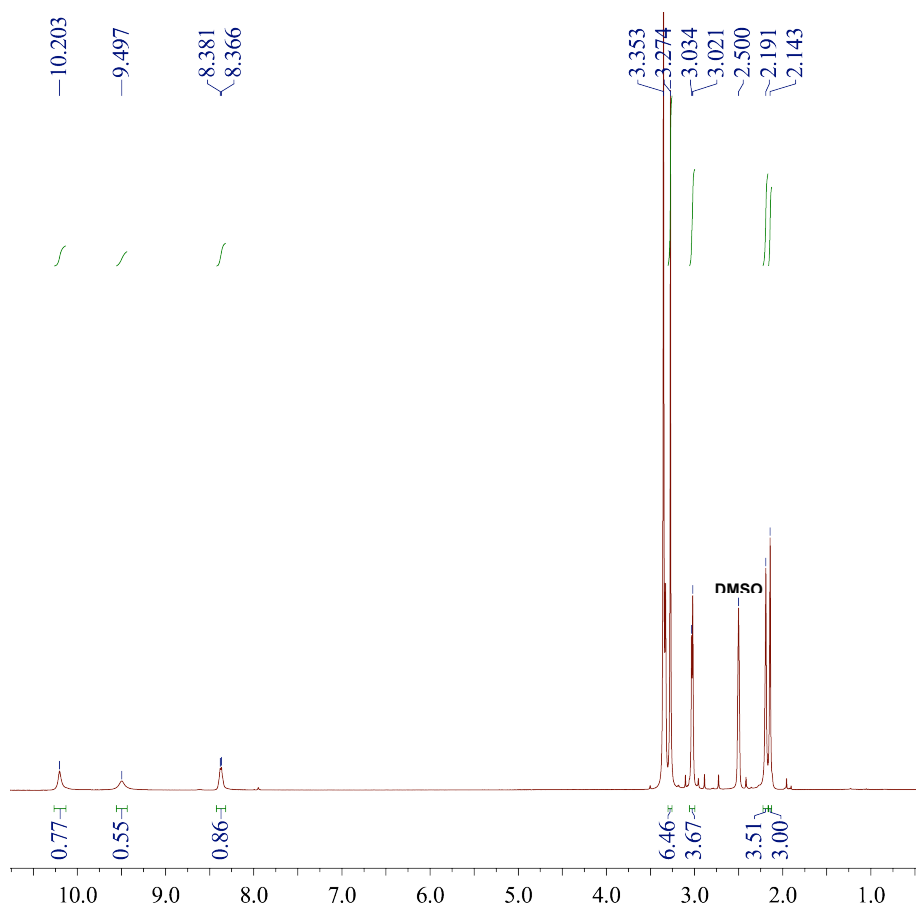
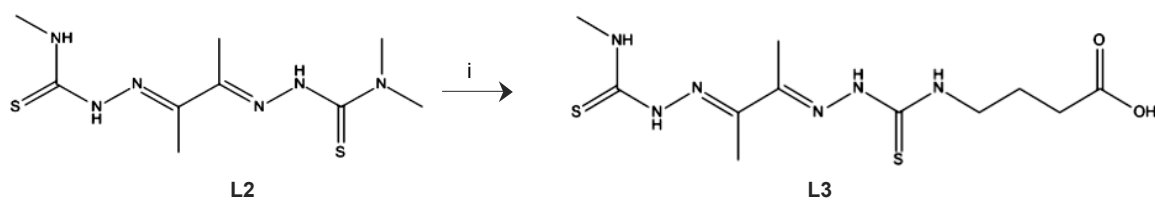


Figura 11: Espectro de RMN de ^1H do composto **L2**, em d_6 -DMSO.

Síntese de Diacetil-4-ácido-butírico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (L3) e do respectivo complexo de Cu(II) (C1)



Esquema 4: Síntese de Diacetil-4-ácido-butírico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (ligando **L3**). i: ácido 4-aminobutírico(2 equiv), acetonitrilo, refluxo.

A reação de **L2** com o ácido 4-aminobutírico permitiu obter **L3**, um derivado de BTS contendo um grupo carboxílico terminal e um espaçador propilénico entre o –COOH e os grupos coordenantes da BTS (esquema 4). **L3** foi obtido com elevado rendimento ($\eta=78\%$).

O espectro de RMN de ^1H do composto **L3** (Figura 12) apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência [95], nomeadamente:

- um multiplete (m), a $\delta=1,81$ ppm, com integração para dois prótons, correspondendo aos prótons de $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$;
- um singuleto (s), a $\delta=2,20$ ppm, com integração para seis prótons, correspondendo aos prótons do grupo CH_3 ;
- um tripleto (t), a $\delta=2,25$ ppm, com integração para dois prótons e $^3J_{\text{HH}}= 7,5$ Hz, que remete para os prótons de $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$;
- um duplete (s) a $\delta=3,02$ ppm, com integração para três prótons e $^3J_{\text{HH}}= 4,5$ Hz, que remete para os prótons de NH-CH_3 ;
- um multiplete (m), a $\delta=3,57$ ppm, com integração para dois prótons, correspondendo aos prótons de $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$;
- um quadruplete (q), a $\delta=8,38$ ppm, com integração para um próton e $^3J_{\text{HH}}= 4,5$ Hz e que remete para o próton de $\text{NH (NH-CH}_3)$;
- um tripleto (t), a $\delta=8,44$ ppm, com integração para um próton e $^3J_{\text{HH}}= 6$ Hz, que remete para o próton de $\text{NH (NH-CH}_2)$;
- por fim, pode constatar-se a presença de dois singuletos (s) o primeiro a $\delta=10,17$ ppm e o segundo a $\delta=10,22$ ppm, com integração para um próton cada, remetendo para os prótons dos grupos NH .

A análise do espectro de **L3** (Figura 12) confirma a estrutura do composto pretendido.

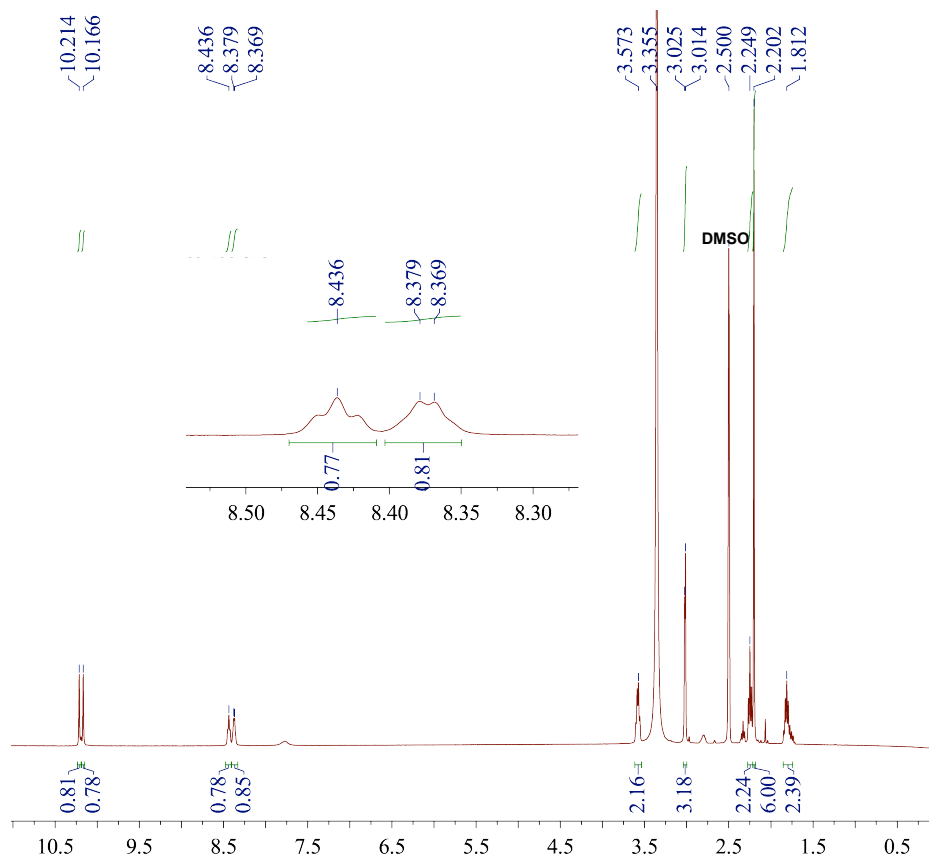
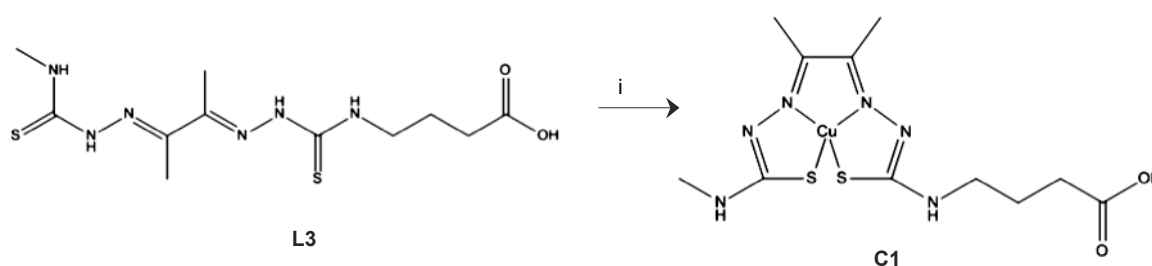


Figura 12: Espectro de RMN de ^1H do composto **L3**, em d_6 -DMSO.

O complexo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L3})]$ (**C1**) foi obtido por reacção de complexação de **L3** com acetato cúprico em dimetilformamida (Esquema 6). **C1** foi obtido com elevado rendimento reaccional ($\eta=76\%$), na forma de um sólido castanho microcristalino, após precipitação da mistura reaccional por adição de água destilada.



Esquema 5: Síntese de Diacetil-4-ácido butirico-4'-metilbis(tiossemicarbazonato) de cobre (**C1**). i: DMF, t.a., 17h.

A identidade química do complexo **C1** pôde ser confirmada por análise de ESI-MS. Neste sentido, a título de exemplo, apresentam-se na Figura 13 os espectros de massa referentes ao composto **C1**, obtidos nos modos positivo (A) e negativo (B).

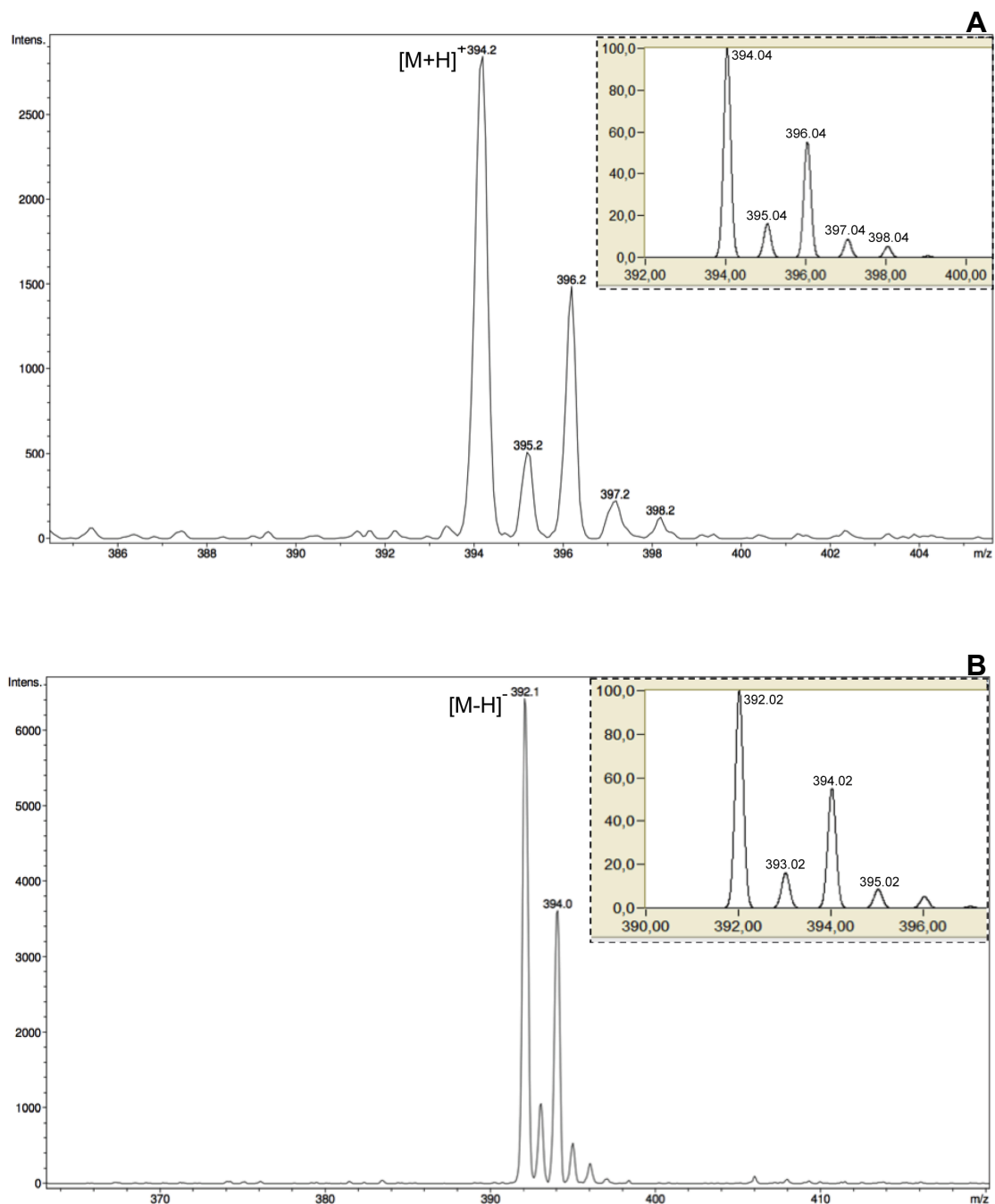


Figura 13: ESI-MS do complexo **C1**: (A) Modo positivo; (B) Modo negativo.

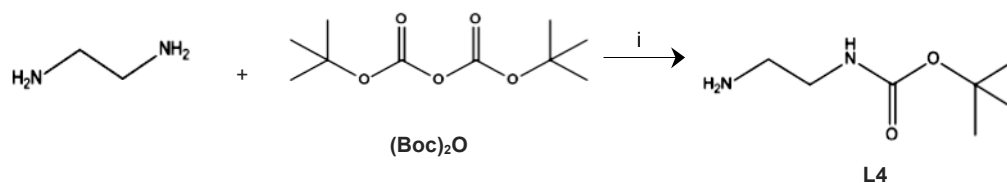
No espectro de massa do complexo **C1**– obtido em modo positivo – detetou-se um pico maioritário a $m/z = 394,2$ que corresponde ao ião molecular $[M+H]^+$. No espectro de massa do mesmo complexo – obtido em modo negativo – observou-se um pico maioritário a $m/z = 392,1$ correspondente ao ião molecular $[M-H]^-$.

A partir destas análises, pode concluir-se que os picos presentes nos espectros ESI-MS de **C1** apresentam um desdobramento compatível com o teoricamente esperado (calculado), de acordo com a distribuição isotópica do complexo.

Síntese de Diacetil *tert*-butil 4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (**L5**) e do respectivo complexo de Cu(II) (**C2**)

Como atrás referido, pretendia-se fazer a ligação dos derivados de IQc's á estrutura dos ligandos BTS e respectivos complexos de cobre por formação de uma ligação amida entre um grupo carboxílico presente na estrutura da IQc e um grupo amina a introduzir na estrutura da BTS. Para introduzir o grupo amina terminal na estrutura da BTS, a estratégia que foi explorada baseou-se em reacções entre os compostos **L3** e **C1** com *tert*-Butil 2-aminoetilcarbamato (**L4**), como descrito a seguir.

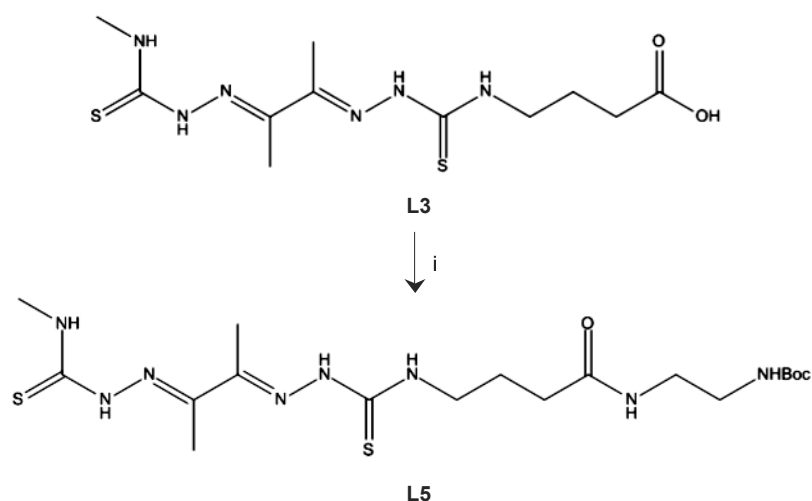
O composto *tert*-Butil 2-aminoetilcarbamato (**L4**) foi sintetizado de acordo com os métodos descritos na literatura [96] por reacção de 1,2-etilenodiamina com di-*tert*-butil dicarbonato. O composto **L4** foi obtido com um rendimento reacional de 68% e a sua caracterização foi efectuada por RMN de 1H (ver parte experimental).



Esquema 6: Procedimento sintético para a obtenção de *tert*-Butil 2-aminoetilcarbamato (**L4**). i: Dioxano, (Boc)₂O, 22h.

O composto **L4** foi obtido com um rendimento reacional (η) de 68%.

A síntese do ligando **L5** foi efectuada por reacção de **L3** com *tert*-Butil 2-aminoetilcarbamato (**L4**). Esta reacção envolveu a prévia activação da função ácido carboxílico de **L3** através da formação *in situ* de um éster activado com N-hidroxisuccinimida, como indicado no esquema 8. O composto **L5** foi obtido com elevado rendimento ($\eta=93\%$) e a sua caracterização foi efectuada pelas técnicas analíticas usuais (RMN de ^1H e ^{13}C , [^1H , ^{13}C] COSY, [^1H , ^{13}C] HSQC e ESI-MS).



Esquema 7: Síntese de Diacetil-4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (composto **L5**). i: EDC, NHS, DMF, Etilenodiamina-Boc, t.a., atmosfera de N_2 .

O espectro de RMN de ^1H do composto **L5** (Figura 14) apresenta sinais a desvios químicos e com multiplicidade de acordo com a sua estrutura; experiências bidimensionais de RMN (discutidas a seguir) auxiliaram na atribuição abaixo indicada para os diferentes sinais:

- um singuleto (s) $\delta=1,37$ ppm, com integração para nove protões, correspondendo aos protões de $(\text{CH}_3)_3$ do Boc;
- um multiplete (m), a $\delta=1,82$ ppm, com integração para dois protões, correspondendo a $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$;
- um tripleto (t), a $\delta=2,11$ ppm, com integração para dois protões e $^3J_{\text{HH}}= 7,5$ Hz, que remete para $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$;
- um singuleto (s), a $\delta=2,20$ ppm, com integração para seis protões, correspondendo aos protões dos grupos CH_3 ;
- um singuleto (s), a $\delta=2,56$ ppm, com integração para dois protões, correspondendo aos protões de CH_2 ;

- um quadrupeto (q), a $\delta=2,97$ ppm, com integração para dois prótons e $^3J_{HH}=6$ Hz, correspondendo aos prótons de $\text{CH}_2\text{-NHoc}$;
- um duplete (d), a $\delta=3,02$ ppm, com integração para três prótons e $^3J_{HH}=4,5$ Hz, que remete para NH-CH_3 ;
- um multiplete (m), a $\delta=3,57$ ppm, com integração para dois prótons, correspondendo aos prótons de $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$;
- um singuleto largo (s), a $\delta=6,76$ ppm, com integração para um próton, correspondendo ao grupo NHC=Ooc ;
- um quadrupeto (q), a $\delta=8,38$ ppm, com integração para um próton e $^3J_{HH}=4,5$ Hz e que remete para NH-CH_3 ;
- um triplete (t), a $\delta=8,52$ ppm, com integração para um próton e $^3J_{HH}=6$ Hz, que remete para NH-CH_2 ;
- por fim, pode constatar-se a presença de dois singletos (s), o primeiro a $\delta=10,15$ ppm e o segundo a $\delta=10,20$ ppm, com integração para um próton cada, remetendo para os prótons dos grupos NH-C=S .

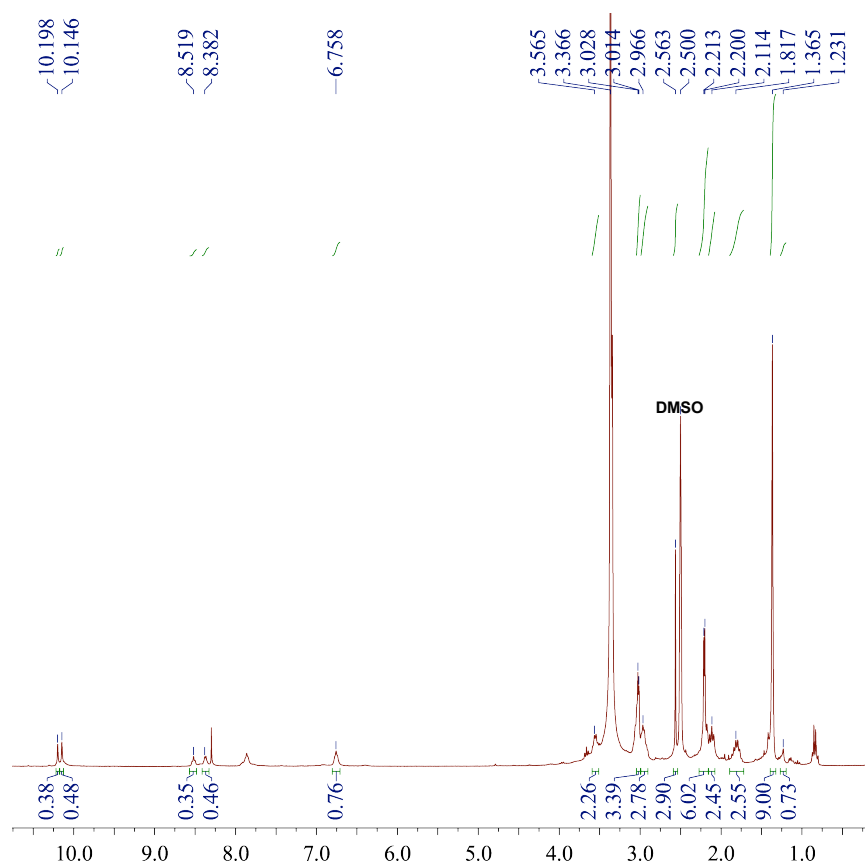


Figura 14: Espectro de RMN de ^1H do composto **L5**, em $d_6\text{-DMSO}$.

A caracterização de **L5** por RMN de ^{13}C também levou à obtenção de dados consistentes com a estrutura molecular do composto. Como se pode constatar na Figura 15, as ressonâncias observadas vão de encontro ao esperado, nomeadamente 14 ressonâncias na região alifática, que comprovam a presença do composto final **L5**, nomeadamente:

- o primeiro sinal a $\delta = 12,4$ ppm ($\text{CH}_3\text{-C=N}$);
- um sinal a $\delta = 28,7$ ppm (CH_2);
- um sinal a $\delta = 29,9$ ppm [$(\text{CH}_3)_3$];
- um sinal a $\delta = 31,9$ ppm (CH_3)
- um sinal a $\delta = 33,3$ ppm (CH_2)
- um sinal a $\delta = 39,5$ ppm (CH_2)
- um sinal a $\delta = 40,5$ ppm (CH_2)
- um sinal a $\delta = 44,3$ ppm (CH_2)
- um sinal a $\delta = 79,4$ ppm (C)
- um sinal a $\delta = 148,7$ ppm (C)
- um sinal a $\delta = 155,9$ ppm (C)
- um sinal a $\delta = 172,3$ ppm (C)
- um sinal a $\delta = 178,3$ ppm (C)
- um sinal a $\delta = 180,3$ ppm (C)

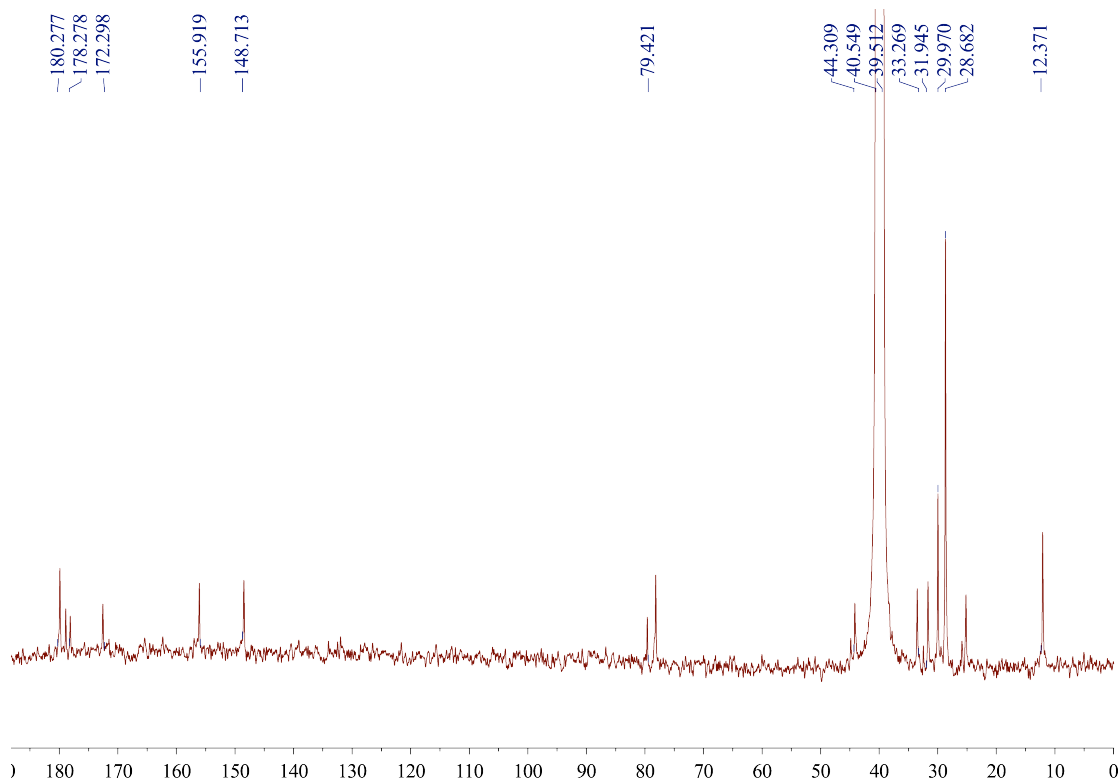


Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C do composto **L5**, em d_6 -DMSO.

Como atrás mencionado, para além das técnicas de caracterização mais comuns – ^1H e ^{13}C – efetuou-se duas experiências 2D adicionais, nomeadamente a correlação [^1H , ^1H] COSY e a correlação heteronuclear [^1H , ^{13}C] HSQC. Tal como pode ser observado nas Figuras 16 e 17, respetivamente.

RC7
COSY_AMMA NMR 400 DMSO
12.11.2015

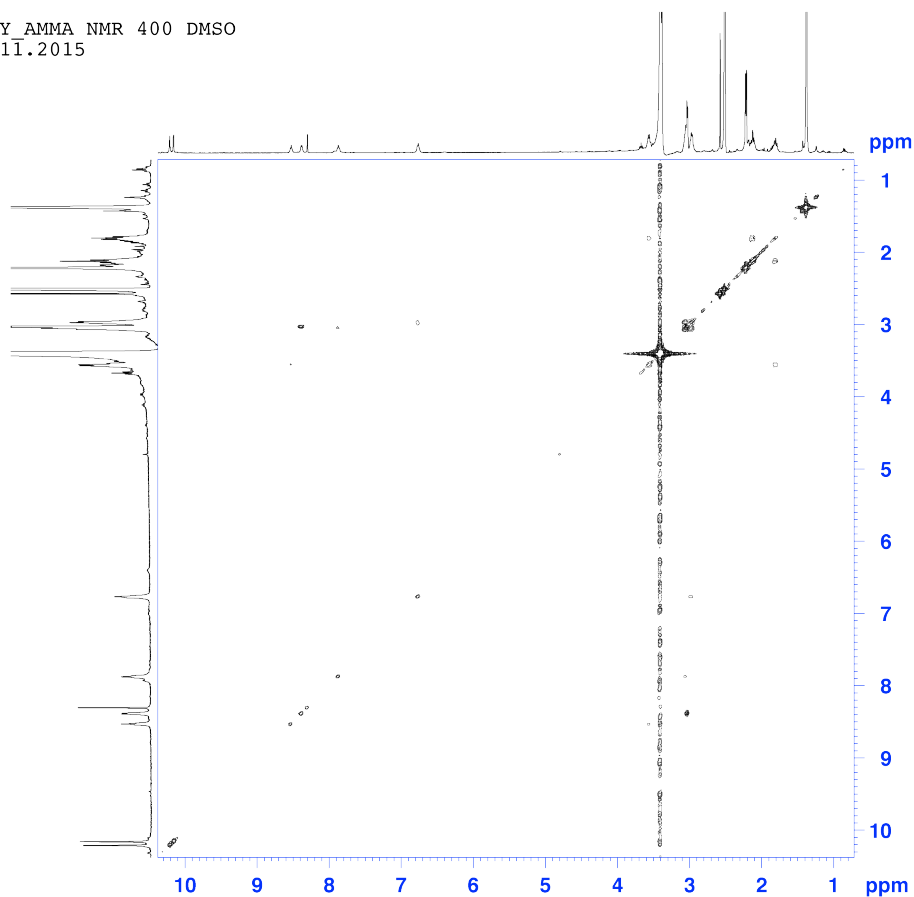


Figura 16: Espectro de RMN [^1H , ^1H] COSY do composto L5.

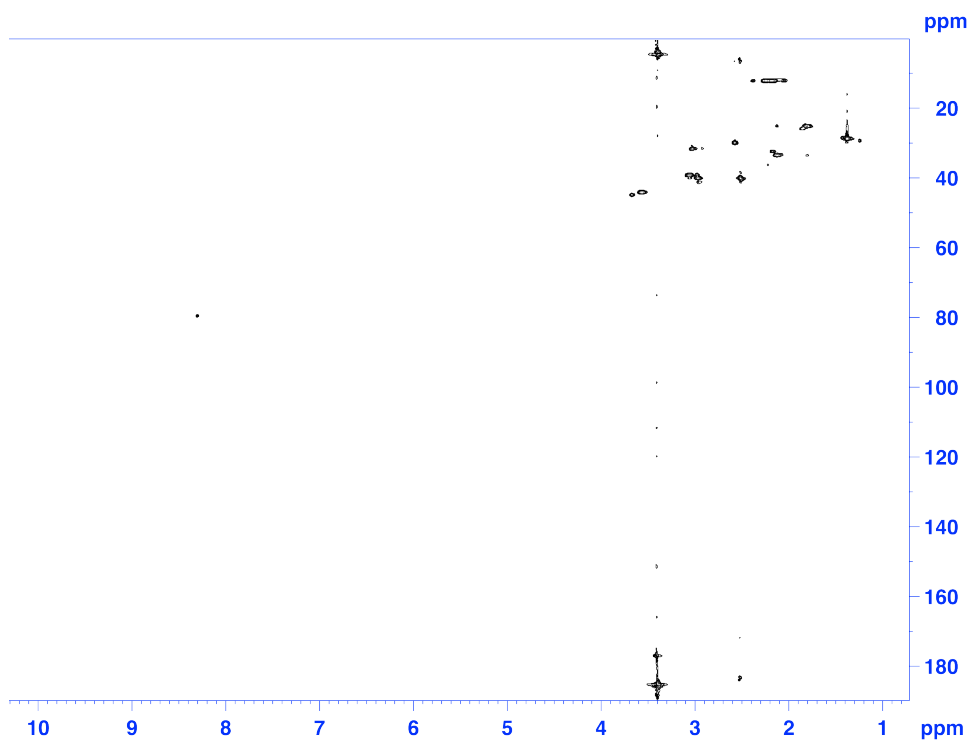


Figura 17: Espectro de RMN [^1H , ^{13}C] HSQC do composto **L5**.

A caracterização de **L5** envolveu ainda a análise por ESI-MS. A título de exemplo, apresenta-se na Figura 18 o espectro de massa obtido no modo negativo para **L5**.

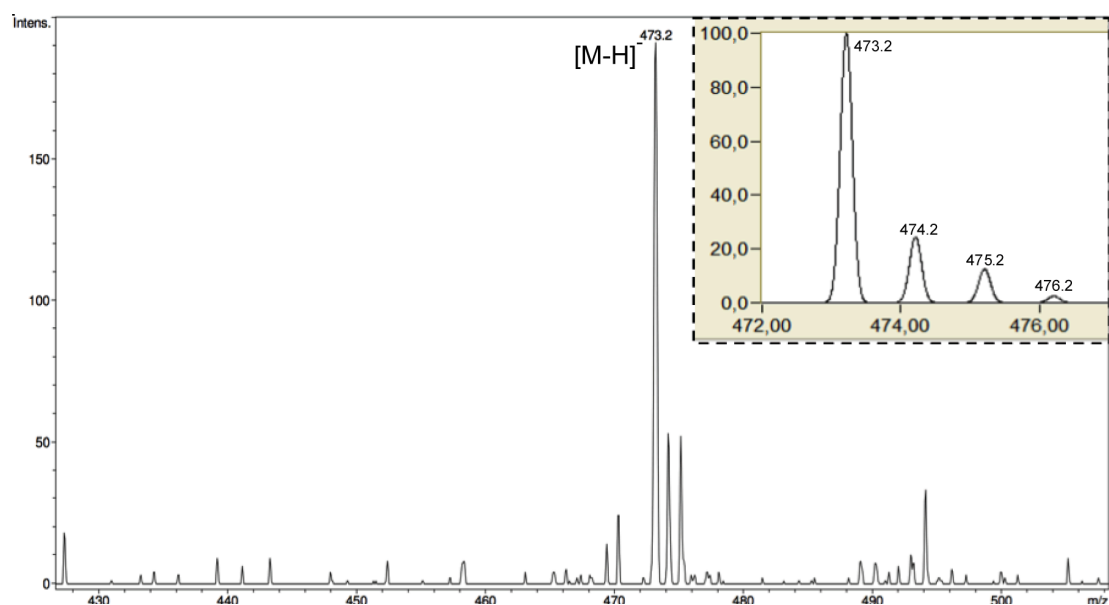
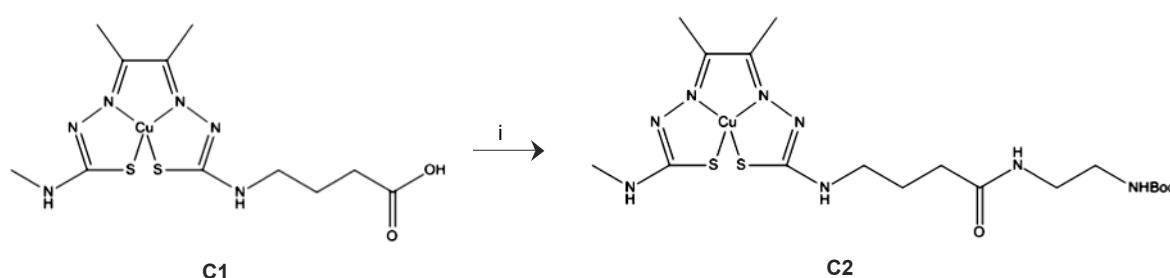


Figura 18: Espectro ESI-MS do ligando **L5**, em Modo negativo.

No espectro de massa do composto **L5** – obtido em modo negativo – detetou-se um pico maioritário a $m/z = 473,2$ que corresponde ao ião molecular $[M-H]^-$ e apresenta um desdobramento compatível com o teoricamente esperado (calculado), de acordo com a distribuição isotópica do composto.

O complexo **C2** foi obtido como atrás descrito para **L5**, mediante formação *in situ* de um éster activado com N-hidroxisuccimida (Esquema 7). **C2** foi obtido com um rendimento reacional (η) de 53 %. A caracterização de **C2** foi efectuada por análise elementar e por ESI-MS.



Esquema 8: Síntese de Diacetil terc-butil 4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazonato) de cobre(II) (**C2**). i: EDC, NHS, DMF, Etilenodiamina-Boc, t.a., atmosfera de N_2 .

A título de exemplo, apresenta-se na Figura 19 o espectro ESI-MS do complexo **C2**, obtido no modo negativo.

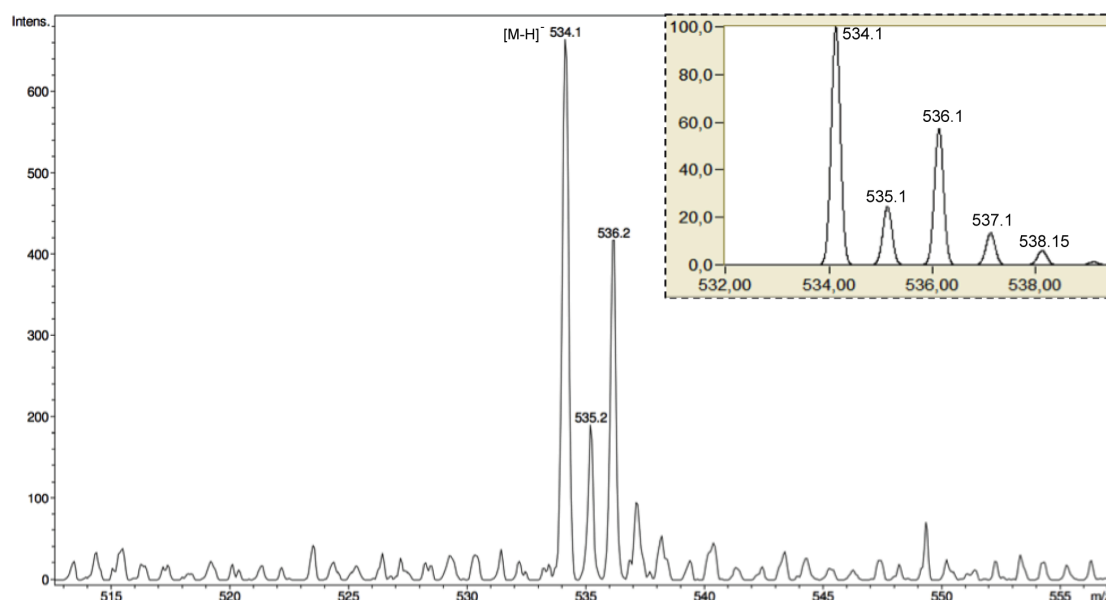


Figura 19: Espectro ESI-MS do complexo **C2**, obtido no modo negativo.

No espectro de massa do complexo **C2** – obtido em modo negativo – observou-se um pico maioritário a $m/z = 534,1$ correspondente ao ião molecular $[M-$

H]. O pico observado apresenta um desdobramento compatível com a distribuição isotópica do complexo **C2** o que confirmou a formulação proposta para o composto.

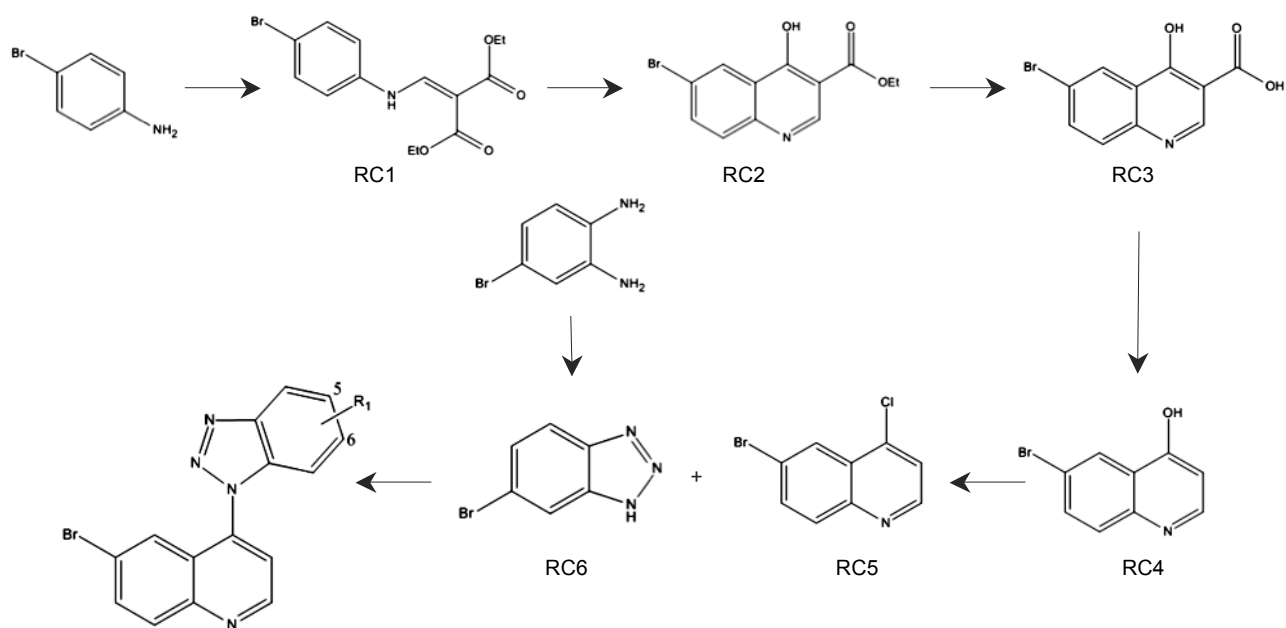
2.2. SÍNTESE DE DERIVADOS DE INDOLO[3,2-C]QUINOLINAS

Para a síntese dos compostos pretendidos (ver **Objectivos do trabalho**) foi utilizada a estratégia de síntese descrita por Lavrado *et al.* (2015) [37].

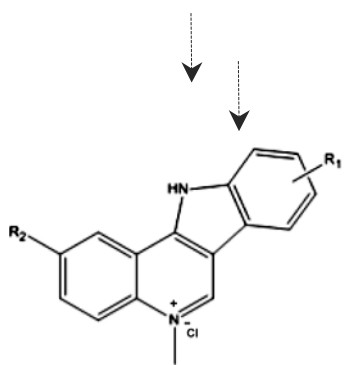
Numa descrição sumária desta estratégia, os derivados 2,8- e 2,9-dibromoindolo[3,2-c]quinolina podem obter-se por ciclização dos derivados 4-(1*H*-Benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)bromoquinolina (**RC7-1** e **RC7-2**) obtidos, por sua vez, por uma reação entre a 6-Bromo-4-cloroquinolina (**RC5**) e 6-Bromo-1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol (**RC6**).

A 4-cloroquinolina (**RC5**) foi, por sua vez, sintetizada em cinco passos a partir de 4-bromoanilina e dietil-2-(etoximetileno)malonato, de acordo com a reação de Gould-Jacobs. O esquema sintético completo pode ser observado no Esquema 9.

A progressão de todos os passos reacionais foi seguida por cromatografia em camada fina (TLC). Todos os compostos sintetizados foram caracterizados com recurso a técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de protão (¹H-).



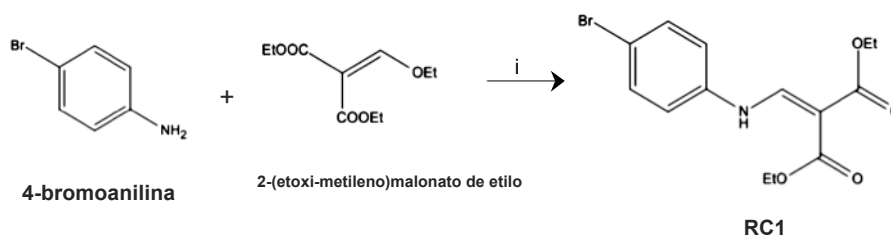
R¹ = 5-Br (RC7-1) e 6-Br (RC7-2)



R¹ = H, R² = alquildiamina
 R¹ = R² = alquildiamina

Esquema 9: Estratégia de síntese de derivados de indolo[3,2-c]quinolinas.

Síntese de 2-[[4-bromofenil) amino]metileno]malonato de etilo (RC1)



Esquema 10: Síntese de 2-[[4-bromofenil) amino]metileno]malonato de etilo (composto **RC1**). i: refluxo, 1 h.

O procedimento sintético inicia-se com uma reação da amina da 4-bromoanilina (composto de partida), com o carbono β do sistema carbonilo α,β insaturado do 2-(etoxi-metileno)-malonato de etilo, originando o composto **RC1** com um rendimento reacional (η) de 87 %.

O espectro de RMN de ^1H do composto **RC1** (Figura 20) apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência [37], nomeadamente:

- dois tripletos (t) sobrepostos (δ entre 1,21 ppm, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz e 1,28 ppm, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz) com integração para três prótons cada e um multipletto (m) (δ entre 4,08 e 4,23 ppm) com integração para quatro prótons, correspondendo aos prótons dos dois grupos etilo dos ésteres;
- dois dupletos (d), o primeiro a $\delta=7,35$ ppm, $^3J_{\text{HH}}=9$ Hz e o segundo a $\delta=7,55$ ppm, $^3J_{\text{HH}}=9$ Hz, com integração para 2 prótons cada, correspondendo aos prótons do anel aromático;
- por fim, pode constatar-se ainda a presença de dois dupletos (d) a $\delta=8,35$ ppm, $^3J_{\text{HH}}=13,8$ Hz e $\delta=10,66$ ppm, $^3J_{\text{HH}}=13,8$ Hz, com integração para um próton cada, correspondendo aos prótons dos grupos amina e vinilo.

A análise do espectro de **RC1** confirma a estrutura do composto pretendido.

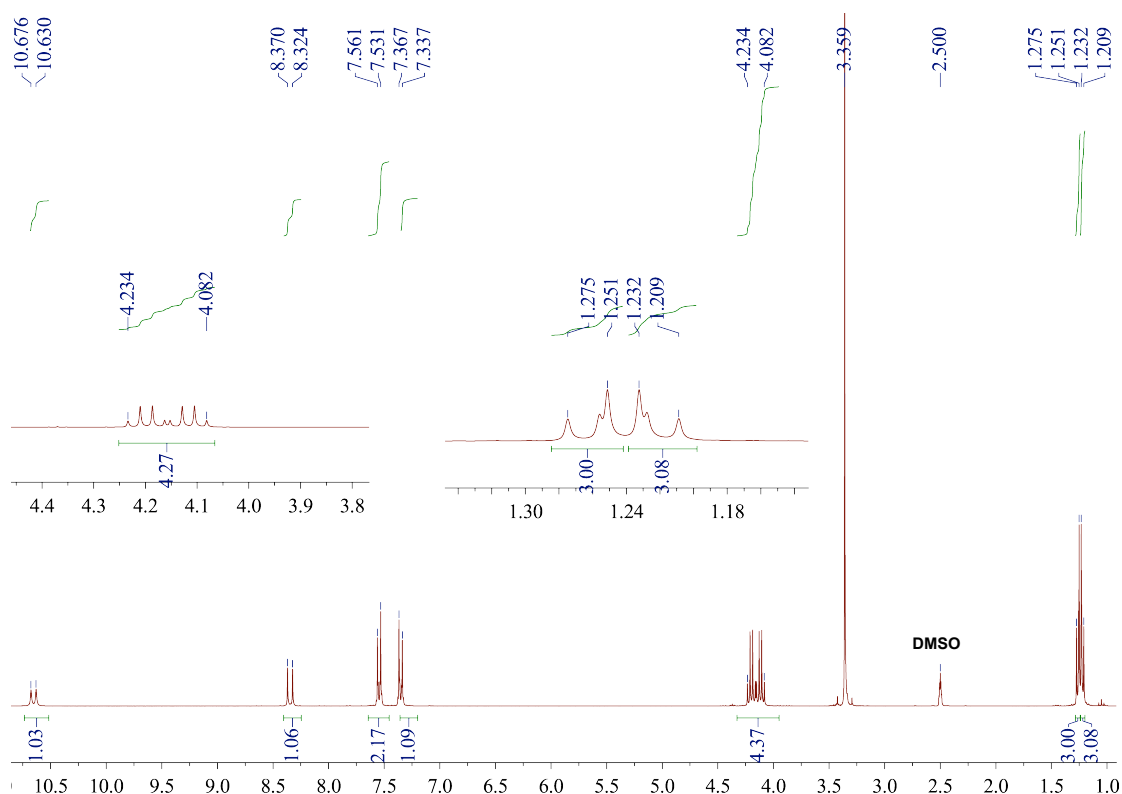
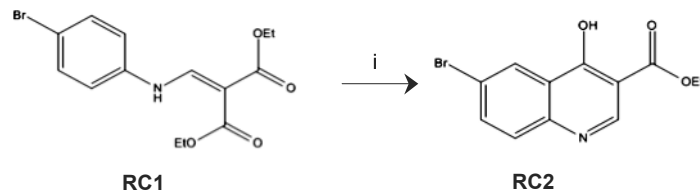


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H do composto **RC1**, em d_6 -DMSO.

Síntese de 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de etilo (**RC2**)



Esquema 11: Síntese de 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de etilo (composto **RC2**). *i*: difenil éter, refluxo, 1h.

O segundo passo sintético contempla uma ciclização, a elevadas temperaturas ($\approx 260\text{ }^\circ\text{C}$), com o objetivo de formar a quinolina **RC2**, com um rendimento reacional (η) de 79 %.

O espectro de RMN de ^1H do composto **RC2** (Figura 21) apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência [37], nomeadamente:

- um tripleto a $\delta=1,28$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, com integração para três prótons e um quadrupletto a $\delta=4,22$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz com integração para dois prótons, sendo compatível com a presença do grupo etilo do éster;
- quatro sinais, correspondentes aos quatro prótons aromáticos: o dupletto (d) a $\delta=7,60$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=9$ Hz; o duplo dupletto (dd) a $\delta=7,87$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=9, 2,1$ Hz; o dupletto a $\delta=8,22$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=2,1$ Hz e o singuleto (s) a $\delta=8,59$ ppm;
- No espectro de RMN de ^1H do composto **RC2**, são ainda visíveis dois singuletos largos a $\delta=12,43$ ppm e $\delta=11,91$ ppm, compatíveis com a presença de dois prótons ácidos na molécula (OH e COOH).

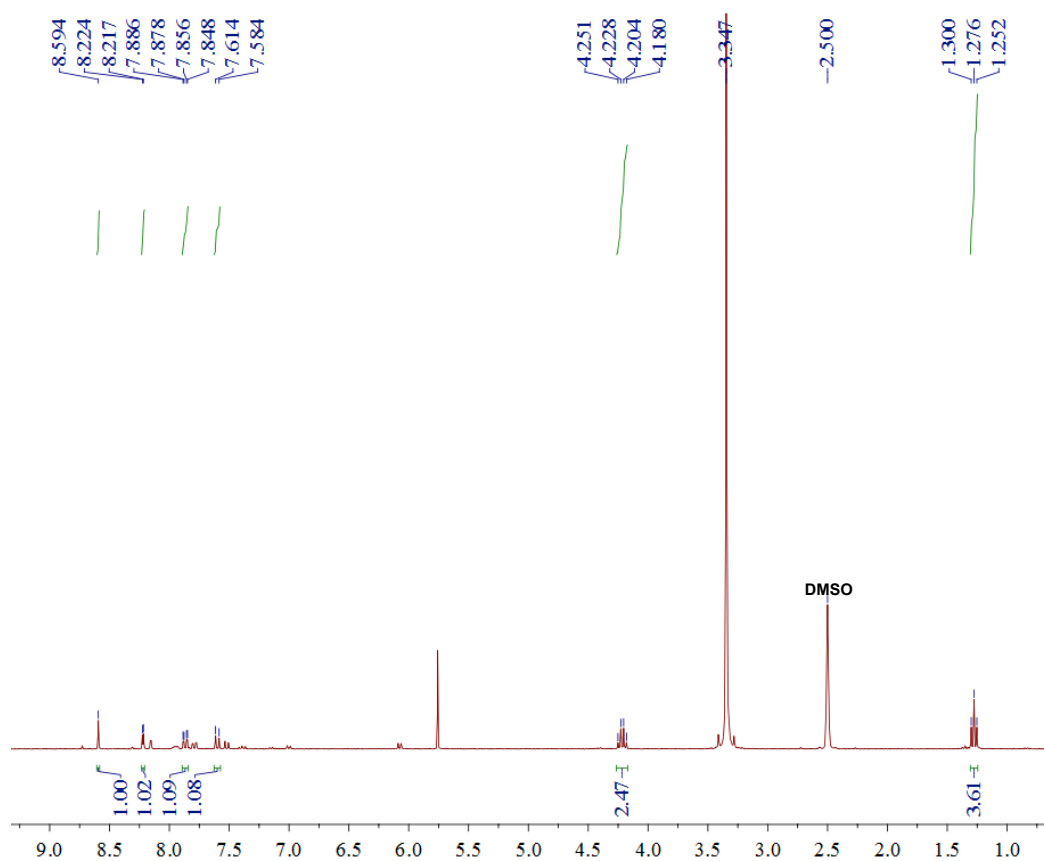
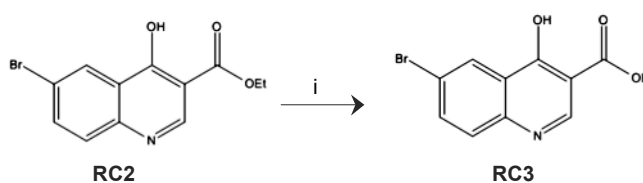


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H do composto **RC2**, em d_6 -DMSO.

Após esta análise e concomitantemente com o descrito por Lavrado *et al.* (2015) [37], pode constatar-se a presença do composto pretendido. Não obstante, o espectro apresenta sinais adicionais, compatíveis com a presença de **RC4** como contaminante, muito possivelmente resultante da descarboxilação de **RC2**.

Síntese do ácido 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3 carboxílico (**RC3**)



Esquema 12: Síntese do ácido 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3 carboxílico (composto **RC3**). i: NaOH 10%, reflux.

O terceiro passo sintético consiste numa reação de hidrólise do grupo éster, em meio básico, que conduziu à formação do ácido carboxílico – composto **RC3** – após tratamento com HCl (10 M), com um rendimento reacional (η) de 62 %.

O espectro de RMN de ^1H do composto **RC3** apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência [37], com exceção do sinal a $\delta=14,99$ ppm, que se encontra ausente. Tal pode ser explicado pela elevada quantidade de água inerente ao solvente utilizado na análise (sinal muito intenso a $\delta=3,38$ ppm).

No espectro referente ao composto **RC3** (Figura 22), pode observar-se:

- quatro sinais, correspondentes aos quatro prótons aromáticos: o duplete (d) a $\delta=7,79$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=8,9$ Hz; o duplo duplete (dd) a $\delta=8,05$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=8,9$; 2,4 Hz; o duplete a $\delta=8,36$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=2,4$ Hz e o singuleto (s) a $\delta=8,94$ ppm;
- um singuleto (s) a $\delta=13,60$ ppm;
- comparativamente ao espectro do composto **RC2**, pode constatar-se a ausência do quarteto a $\delta=4,22$ ppm e do tripleto a $\delta=1,28$ ppm.

A análise deste espectro revela a formação do composto pretendido.

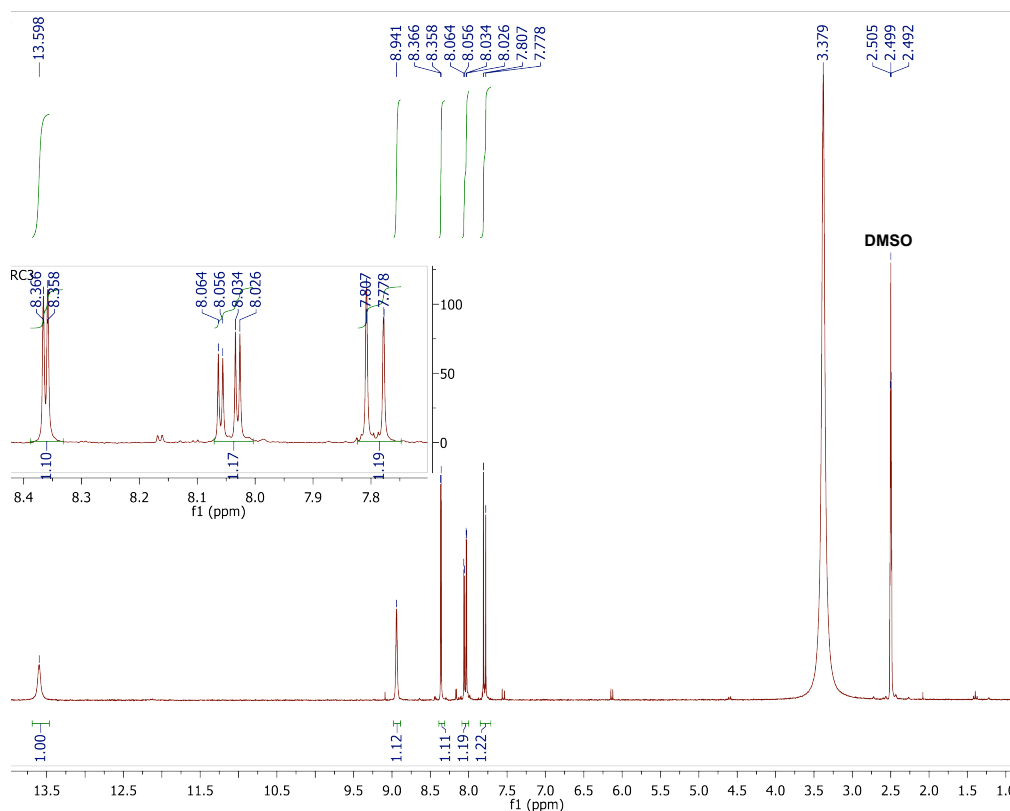
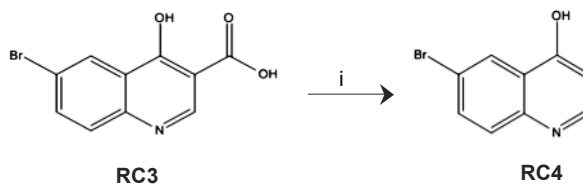


Figura 22: Espectro de RMN de ^1H do composto **RC3**, em d_6 -DMSO.

Síntese de 6-bromoquinolin-4-ol (**RC4**)



Esquema 13: Síntese de 6-bromoquinolin-4-ol (composto **RC4**). i: difenil éter, refluxo.

O quarto passo sintético consiste numa descarboxilação térmica, com consequente obtenção do composto **RC4** com um rendimento reacional (η) de 80 %.

O espectro de RMN de ^1H do composto **RC4** (Figura 23) apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência [37], nomeadamente:

- a presença de cinco sinais com integração para um próton cada, que se podem atribuir aos prótons do anel aromático: quatro dupletos (d) a $\delta=6,08$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=7,5$ Hz, a $\delta=7,53$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=8,7$ Hz, a $\delta=7,96$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=7,5$ Hz, a $\delta=8,16$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=2,4$ Hz e, um duplo duplete a $\delta=7,79$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=8,7; 2,4$ Hz;

- surge adicionalmente um singuleto (s) a $\delta=11,95$ ppm, com integração para um próton que pode ser atribuído ao próton do grupo OH;

A análise deste espectro revela a formação do composto pretendido.

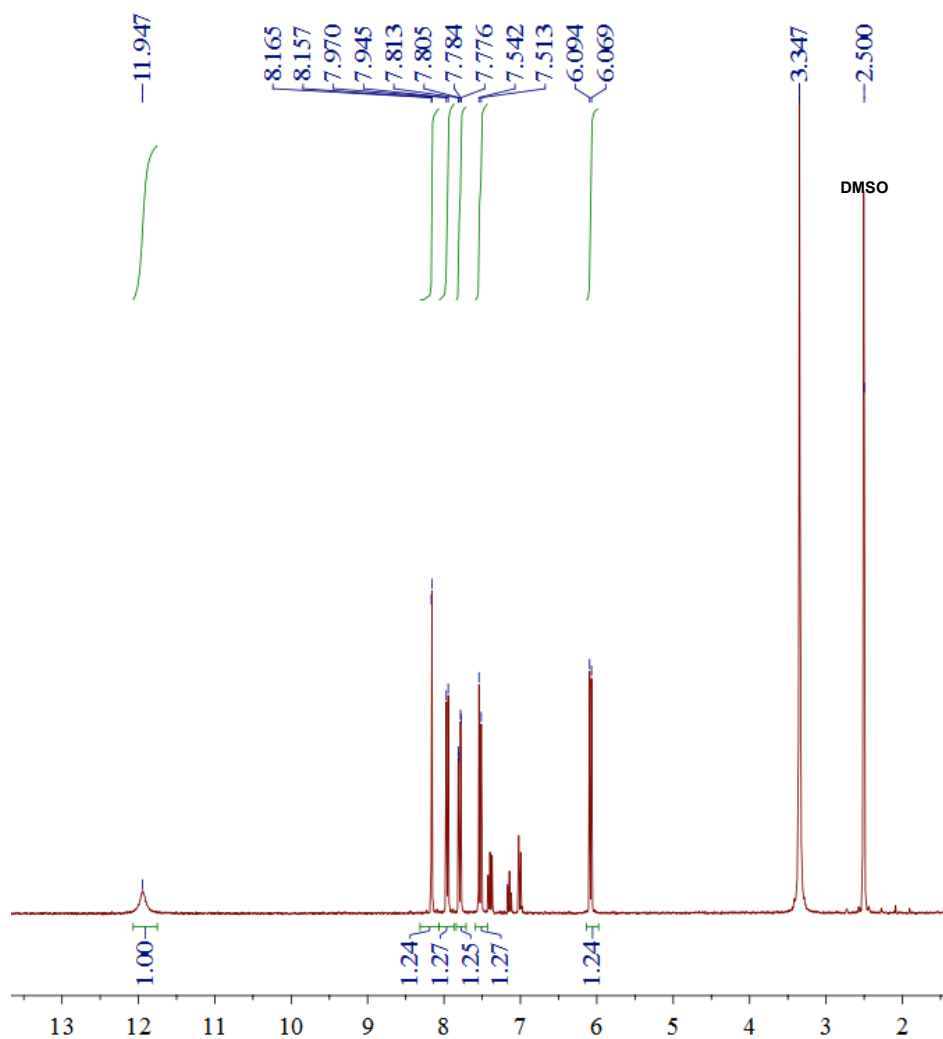
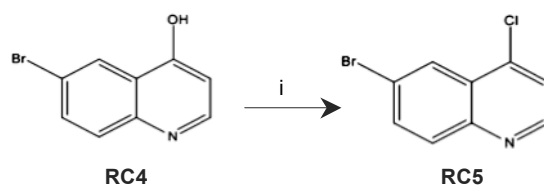


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H do composto RC4, em d_6 -DMSO.

Síntese da 6-bromo-4-cloroquinolina (RC5)



Esquema 14: Síntese da 6-bromo-4-cloroquinolina (composto **RC5**). i: POCl_3 , refluxo.

O quinto passo sintético consiste na halogenação da quinolina em C4 através de uma reação de Vilsmyer-Haack. Formou-se, assim, o composto **RC5** com um rendimento reacional (η) de 64 %.

O espectro de RMN de ^1H do composto **RC5** (Figura 24) apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência [37], nomeadamente:

- a permanência dos cinco sinais, originados pelos prótons do anel aromático, a saber: quatro dupletos, a $\delta=7,82$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=4,7$ Hz, a $\delta=8,04$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=9,0$ Hz, a $\delta=8,32$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=2,1$ Hz e a $\delta=8,88$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=4,7$ Hz e, um duplo duplete (dd) a $\delta=8,00$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=9,0; 2,1$ Hz;
- por comparação com o espectro referente ao composto **RC4**, pode notar-se a ausência do sinal a $\delta=11,94$ ppm correspondente ao próton do grupo OH.

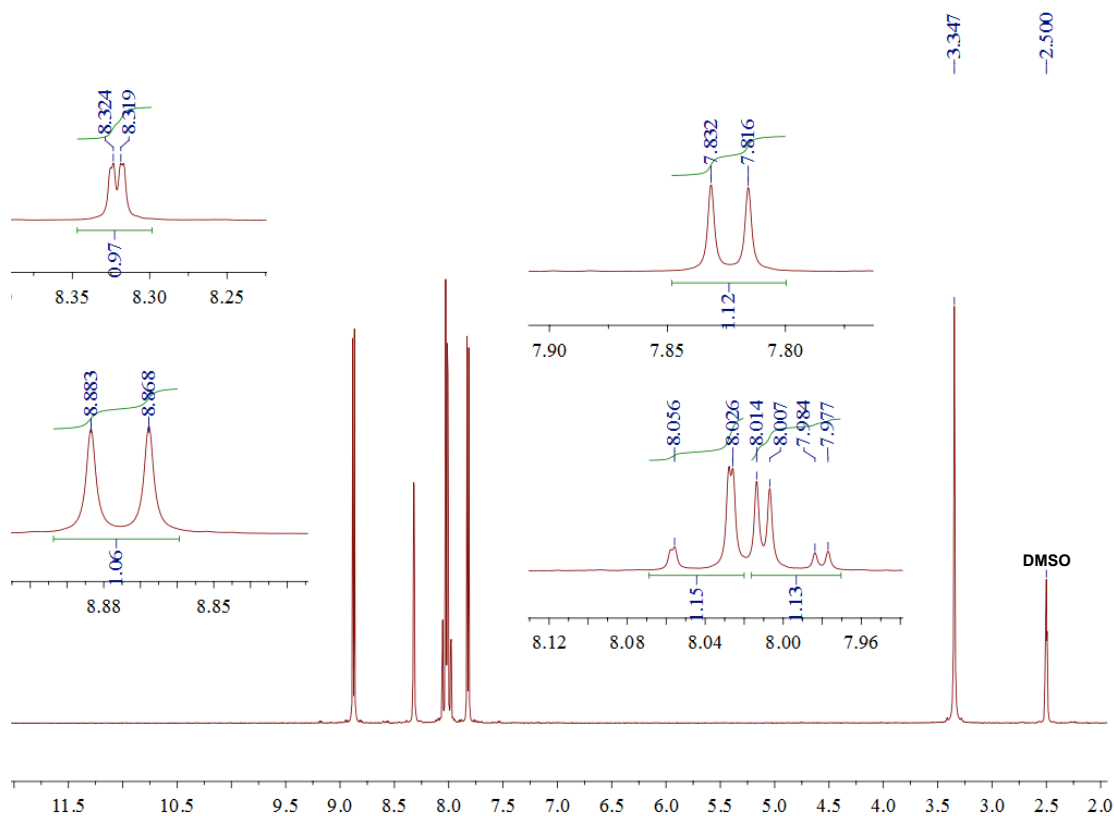
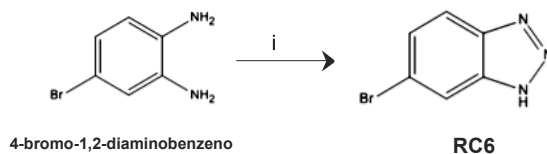


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H do composto **RC5**, em d_6 -DMSO.

Este espectro de RMN de ^1H é compatível com a estrutura da 6-bromo-4-cloroquinolina.

Síntese de 6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (RC6)



Esquema 15: Síntese de 6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (composto **RC6**). i: NaNO_2 , AcOH , sonicação (35KHz).

O sexto passo sintético consiste na formação do triazol, por reação da benzo-1,2-diamina correspondente com nitrito de sódio, numa reação assistida por ultra-sons. Formou-se, assim, o composto **RC6** com um rendimento reacional (η) de 90 %.

O espectro de RMN de ^1H do composto **RC6** (Figura 25) apresenta sinais a desvios químicos de acordo com o descrito na literatura de referência [37] (apenas o desdobramento dos mesmos varia), nomeadamente:

- três sinais – correspondentes aos três prótons aromáticos: dois singletos (s) largos a $\delta=8,20$ ppm e a $\delta=7,91$ ppm e um duplete (d) a $\delta=7,56$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=5,1$ Hz;
- um singuleto (s) largo a $\delta=15,89$ ppm, com integração para um próton, correspondendo ao próton do grupo NH do triazol.

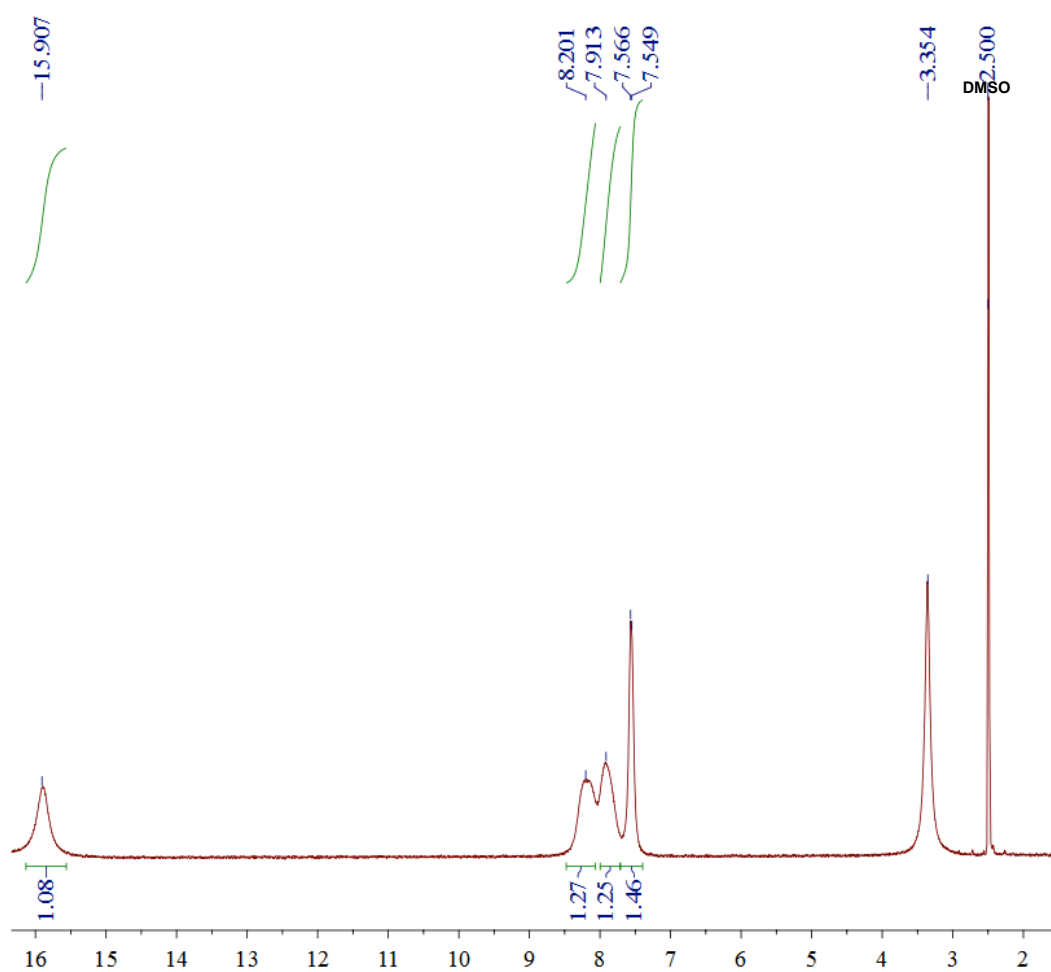
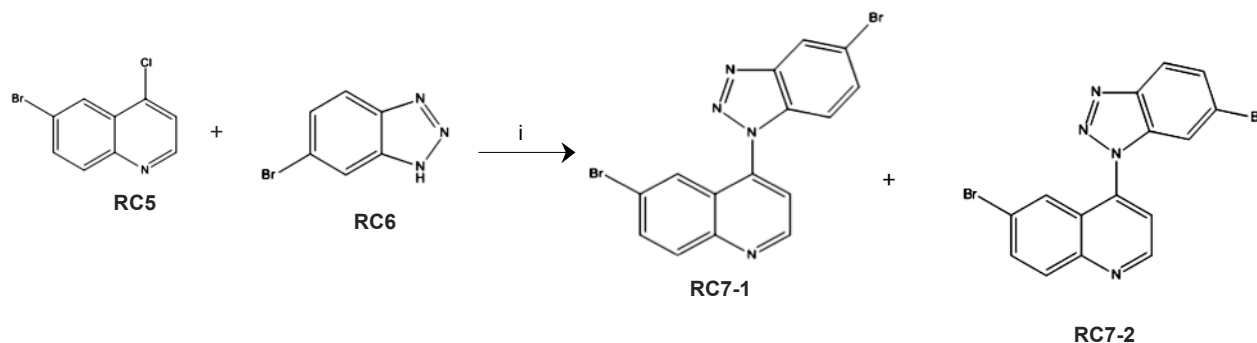


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H do composto **RC6**, em d_6 -DMSO.

Apesar das diferenças observadas no desdobramento dos sinais, pode concluir-se que este espectro de RMN de ^1H é compatível com a estrutura da 6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol.

Síntese da 6-bromo-4-(5-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (RC7-1) e da 6-bromo-4-(6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (RC7-2)



Esquema 16: Procedimento sintético para a obtenção da 6-bromo-4-(5-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)quinolina e da 6-bromo-4-(6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (compostos **RC7-1** e **RC7-2**, respetivamente).

i: 120°-145°C.

No último passo deste esquema sintético, procede-se ao acoplamento da quinolina **RC5**, com o benzotriazol **RC6**. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna, dando origem a três frações, as quais foram analisadas por RMN de ^1H . Após esta análise, verificou-se que a fração F2 correspondia a um dos isómeros puros (**RC7-1** ou **RC7-2**). O rendimento (η) para este composto foi de 78 %.

A título de exemplo, apresenta-se na Figuras 26 – Espectro de RMN de ^1H da fração F2, contendo o composto **RC7-1** ou **RC7-2** puro.

O espectro de RMN de ^1H do composto da fração F2 (Figura 26) apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade compatíveis com a estrutura dos compostos pretendidos, nomeadamente:

- três dupletos (d): a $\delta=9,21$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=4,8$ Hz, a $\delta=8,26$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=8,7$ Hz e a $\delta=8,20$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=9$ Hz, com integração para um protão cada;
- três duplos dupletos (dd): a $\delta=8,11$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=1,8$; 0,6, $\delta=8,07$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=9$; 2,3 Hz, $\delta=7,73$ ppm e $^3J_{\text{HH}}=8,8$; 1,7 Hz, com integração para um protão cada;
- um multipletto (m) a $\delta=8,01$ ppm, com integração para dois protões.

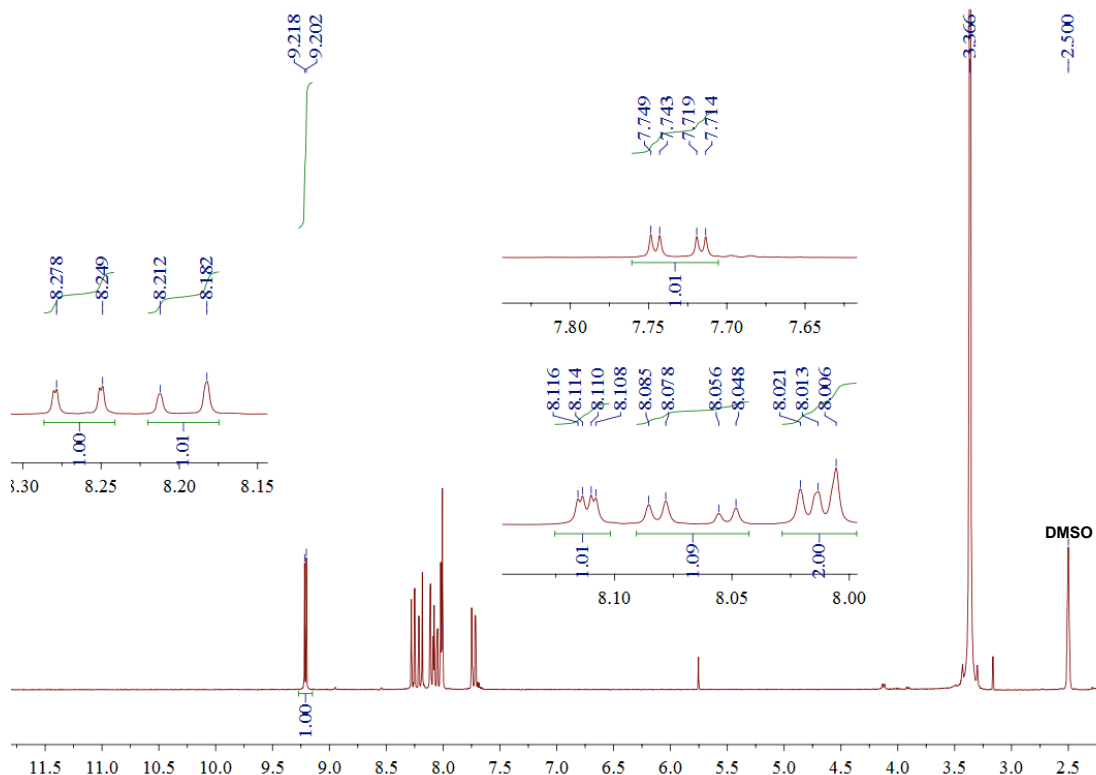


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H da fração F2 (**RC7-1** ou **RC7-2**), em d_6 -DMSO.

Por simples comparação dos sinais obtidos no espectro de RMN de ^1H da Fração 2, com os reportados para os isômeros 6-bromo-4-(5-bromo-1H-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (**RC7-1**) e da 6-bromo-4-(6-bromo-1H-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (**RC7-2**), não nos é possível concluir se o composto isolado corresponde a **RC7-1** ou **RC7-2**.

A análise do espectro da Fração 3, revela a presença de mistura de compostos. Por comparação dos desvios químicos com o espectro da Fração 2 (Figura 26) e a literatura de referência [37], pode concluir-se que esta fração é constituída por uma mistura de **RC7-1** e do seu isômero **RC7-2**. Tal pode deprender-se pela Figura 27.

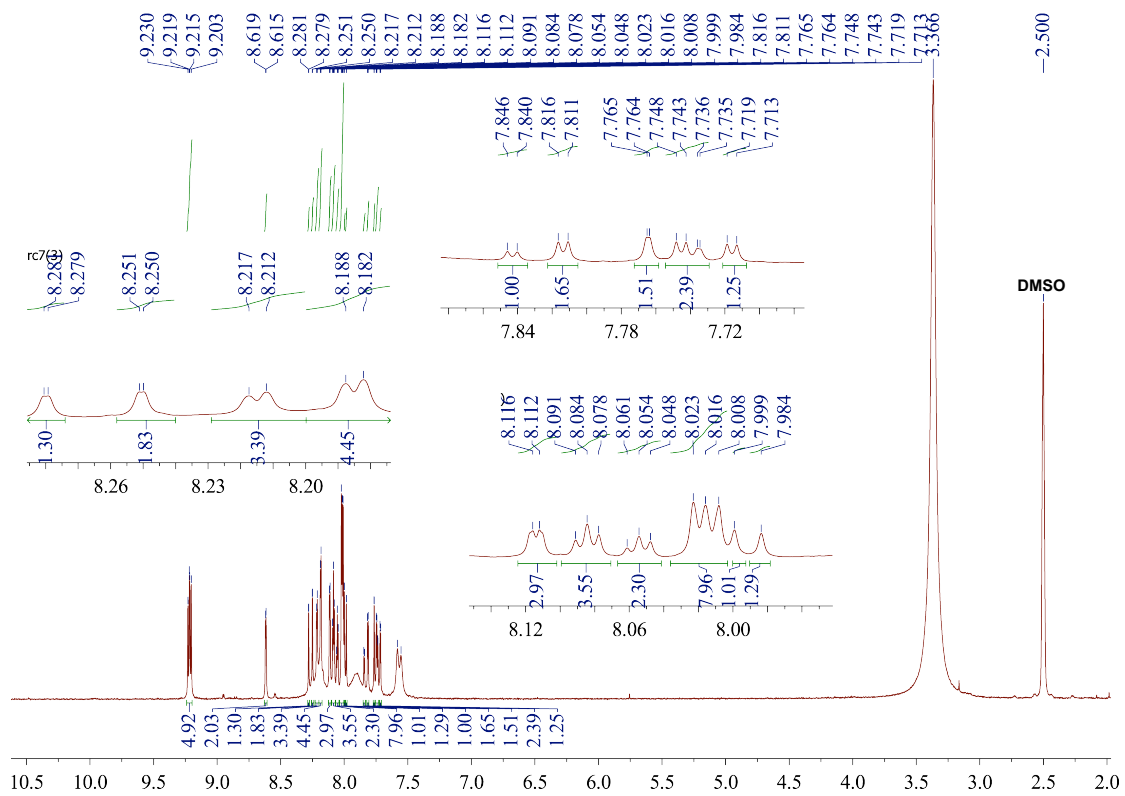


Figura 27: Espectro de RMN de ^1H da fração F3 (mistura de RC7-1 e RC7-2), em d_6 -DMSO.

CONCLUSÕES

CAPÍTULO 3. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de novos agentes anti-cancerígenos, capazes de atuar ao nível do G4 de ADN nos telómeros – com consequente inibição da Telomerase – é uma área de investigação importante que poderá contribuir para elucidar mecanismos específicos envolvidos nas patologias oncológicas. Considerámos que a associação de complexos de Cu-BTS a derivados indoloquinolinas, como biomoléculas capazes de estabilizar eficazmente os G4, seria relevante para atingir o objectivo proposto, uma vez que a presença do cobre poderia permitir a obtenção de compostos congéneres com cobre radioactivo (ex. ^{64}Cu) úteis para estudos de imagiologia por *PET*. Desta forma, esperávamos obter entidades químicas úteis simultaneamente para diagnóstico e terapia e, portanto, perspectivar uma aproximação para teranóstica ao cancro.

A fim de cumprir os objetivos propostos, procedeu-se primeiramente à síntese de LBFs do tipo BTS e respetivos complexos de Cu(II) para posterior conjugação à biomolécula – derivados di-substituídos de IQcs.

Para a síntese dos derivados BTS e respetivos complexos de Cu(II) foi seguida a metodologia descrita por Paterson *et al.*, [95] Foi possível obter os compostos pretendidos, ou seja o ligando diacetil terc-butil 4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (**L5**) e o respectivo complexo diacetil terc-butil 4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazonato) de cobre(II) (**C2**). Os compostos **L5** e **C2** apresentam a amina terminal protegida pelo grupo BOC o qual foi introduzido durante a síntese dos compostos para evitar a formação de produtos secundários. A desproteção das aminas seria efetuada a quando da sua conjugação aos derivados de IQcs. Contudo, este passo não foi possível uma vez que não se chegou a obter o derivado de IQcs necessário para efectuar a conjugação, devido a limitações de tempo. Por outro lado, o armazenamento dos compostos na forma de amina protegida com BOC é vantajoso uma vez que têm tendência a ser mais facilmente manuseáveis e estáveis que as correspondentes aminas livres.

Todos os compostos que integraram o esquema sintético que conduziu à obtenção dos compostos supra-mencionados apresentaram rendimentos adequados e de acordo com o reportado na literatura de referência, sendo o rendimento mais baixo de $\eta = 53\%$ e o mais alto de $\eta = 93\%$. O rendimento mais baixo foi atribuído a perda de composto decorrente das purificações efetuadas.

Seguidamente, procedeu-se à síntese dos derivados di-substituídos de IQcs, seguindo, neste caso seguiu-se o procedimento de síntese descrito por Lavrado *et*

a/.. [37] Este procedimento conduziu à obtenção do composto **RC7-1** (6-bromo-4-(5-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)quinolina) e do seu isómero **RC7-2** (6-bromo-4-(6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)quinolina). Todas estas reações requereram especial atenção, uma vez que poderiam surgir problemas/imprevistos que comprometessem a síntese eficaz dos compostos pretendidos. Contudo, não foram encontradas dificuldades excessivas/inesperadas, obtendo-se rendimentos entre $\eta=62\%$ e $\eta=90\%$, que foram em geral semelhantes ao reportado na literatura de referência. Não foi possível chegar ao composto final do esquema sintético, uma vez que as reações subseqüentes são complexas e com rendimentos relativamente baixos.

A conjugação dos derivados BTS aos derivados de IQcs não foi concretizada, pelo que não foi possível verificar a viabilidade da aproximação proposta para o desenho de novos ligandos de G4 de ADN baseados em complexos de Cu(II) funcionalizados com derivados di-substituídos de IQcs. Neste sentido e relativamente aos objetivos propostos – numa perspetiva global do trabalho desenvolvido – tratou-se de um projeto um pouco ambicioso, uma vez que não foi ainda reportado na literatura a síntese e caracterização deste tipo de compostos.

Não obstante a tentativa e esforço constantes para cumprir os objetivos propostos, todo o processo de síntese química acarretou alguns contratemplos que, associados à limitação temporal do prazo de entrega da presente dissertação, conduziram a alterações e pequenos contornos relativamente ao que estava previamente programado. Assim, esta dissertação, contemplou apenas a síntese química dos compostos precursores, não tendo sido realizados ensaios biológicos para avaliação dos compostos como ligandos efetivos para G4 de ADN, em termos de seletividade e afinidade.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

CAPÍTULO 4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. Condições gerais

A manipulação de reagentes e compostos químicos sensíveis ao ar ou à humidade foi efetuada sob atmosfera inerte, recorrendo à utilização de linhas de vácuo e de técnicas de Schlenk.

A manipulação dos reagentes e compostos químicos foi realizada segundo as boas práticas de laboratório. [97] O risco associado à utilização dos diferentes compostos foi analisado previamente à sua utilização, sendo manuseados com conhecimento das medidas de segurança necessárias.

4.1.1. Solventes e Reagentes

Os reagentes e solventes foram utilizados tal como adquiridos sem qualquer purificação adicional, excepto quando expressamente indicado. Sempre que foi necessário trabalhar em atmosfera inerte, utilizaram-se solventes secos de acordo com os procedimentos reportados na literatura. [97]

Todos os reagentes utilizados nos diversos procedimentos sintéticos foram adquiridos às companhias Sigma Aldrich e Merck.

Água: toda a água utilizada no decurso das reacções foi destilada e purificada.

4.1.2. Técnicas de caracterização e Equipamentos

4.1.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Compostos sintetizados na Faculdade de Farmácia (RC1-RC7):

Os espectros de RMN de ^1H foram registados num espectrómetro Bruker 300 Ultra-Shield (300 MHz), pertencente à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

O equipamento apresenta uma frequência de ressonância de 300 MHz e os espectros foram traçados à temperatura ambiente.

O solvente deuterado utilizado nas caracterizações por RMN foi o dimetilsulfóxido-d6 (DMSO-d6), da Sigma Aldrich.

Compostos sintetizados no C²TN:

Os espectros de RMN de ¹H- e ¹³C- foram registados em espectrómetros Varian Unity com frequência de ressonância de 300 MHz ou 400 MHz, pertencentes ao Instituto Superior Técnico de Lisboa. Os espectros foram obtidos a 20 °C, utilizando como solventes deuterados o DMSO e o CDCl₃.

Os desvios químicos são apresentados em partes por milhão (ppm), utilizando a ressonância residual do solvente como padrão interno. As constantes de acoplamento (J) são apresentadas em Hertz (Hz). Os desdobramentos causados pelo acoplamento *spin-spin* são apresentados como *s* (singuleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete), *q* (quadruplete), *quint* (quintuplete) ou *m* (multiplete).

4.1.2.2. Espectrometria de massa (ESI-MS):

Os espectros de massa foram realizadas apenas para os compostos sintetizados no C²TN e foram obtidos num espectrómetro ESI/QITMS Bruker HCT, através de ionização por Electrospray. As amostras foram previamente dissolvidas em metanol, com uma concentração de 10⁻⁵ M. As análises de espectrometria de massa foram realizadas pela Dr^a. Elisa Palma, nas instalações do C²TN-IST.

4.1.2.3. Análise elementar de C, H e N:

As análises elementares de C,H,N foram realizadas apenas para os compostos sintetizados no C²TN, sendo efetuadas num analisador automático EA 110 CE Instruments. Estes procedimentos de análise foram realizados pela Dr^a. Vânia Sousa, nas instalações do C²TN-IST.

4.1.3. Técnicas de Purificação

4.1.3.1. Cromatografia em coluna

Compostos sintetizados na Faculdade de Farmácia (RC1-RC7):

A cromatografia em coluna foi realizada com recurso a sílica gel 60, com granulometria 70-230 mesh ASTM (Merck). Para este efeito foram utilizadas colunas de vidro com a dimensão apropriada à quantidade de amostra a purificar. O enchimento foi preparado com uma mistura de sílica gel e de eluente (Hex:AcOEt) adequado para permitir a separação do composto pretendido. O sistema de eluentes foi selecionado de acordo com as características (polaridade) do composto a purificar.

Após aplicação da amostra no topo da coluna, a eluição foi efetuada por ação da gravidade, com o eluente previamente selecionado e recolhidas frações com volume adequado.

Aliquotas das frações recolhidas foram analisadas por TLC, de modo a selecionar as frações que continham o produto a isolar.

As frações que continham o produto puro foram recolhidas e concentradas com recurso a um evaporador rotativo e à linha de vazio.

O composto **RC7** foi purificado com recurso à técnica de cromatografia em coluna, utilizando como eluentes o Hexano (Hex) e o AcOEt, numa proporção inicialmente de 8:2 e no decorrer da coluna numa proporção de 1:1. Obtiveram-se 3 frações diferentes, controladas por TLC e cuja presença pôde ser posteriormente confirmada pela análise dos respetivos espectros de RMN de ^1H -.

Compostos sintetizados no C²TN:

A cromatografia em coluna foi realizada com recurso a sílica-gel 60, com granulometria 0,060 mesh ASTM (Merck). Para este efeito foram utilizadas colunas de vidro com a dimensão apropriada à quantidade de amostra a purificar. O enchimento foi preparado com uma mistura de sílica-gel e de eluente (CDCl_3) adequado para permitir a separação do composto pretendido. O sistema de eluentes foi selecionado de acordo com as características (polaridade) do composto a purificar.

Após aplicação da amostra no topo da coluna, a eluição foi efetuada por ação da gravidade, com o eluente previamente selecionado e recolhidas frações com volume adequado.

Aliquotas das frações recolhidas foram analisadas por TLC, de modo a selecionar as frações que continham o produto a isolar.

As frações que continham o produto puro foram recolhidas e concentradas com recurso a um evaporador rotativo (Büchi) e à linha de vazio.

Os compostos **L5** e **C2** foram purificados com recurso à técnica de cromatografia em coluna, utilizando como eluente o CDCl_3 . Para o composto **C2** obtiveram-se 4 frações diferentes e para o composto **L5** obtiveram-se 3 frações diferentes. Sendo que, para ambos os compostos, as frações obtidas foram controladas por TLC e cuja presença pôde ser posteriormente confirmada pela análise dos respetivos espectros de RMN de ^1H - e ^{13}C - e por análise de ESI-MS.

4.1.3.2. Recristalização por par de solventes – FFUL:

Para obter o composto **RC6** puro, foi necessário recorrer à técnica de recristalização por par de solventes, a saber: EtOH e água. Após efetuar a extração com EtOAc, combinar os extratos e remover todo o solvente a baixa pressão, procedeu-se à recristalização, a partir de EtOH em ebulição, com água, para obter o composto **RC6**, na forma de sólido castanho claro.

4.1.3.3. Recristalização por gradiente térmico - C²TN:

Para obter o composto **L1** puro, foi necessário recorrer à técnica de recristalização por gradiente térmico, nomeadamente por arrefecimento a -20°C. Previamente, é adicionado à solução o n-pentano, até esta ficar ligeiramente turva e posteriormente coloca-se a solução no congelador durante cerca de 12h, com o objetivo de se obter o composto **L1** na forma de “agulhas” brancas.

4.1.4. Técnicas de Monitorização das Reações

4.1.4.1. Cromatografia em camada fina (TLC)

O método de cromatografia em camada fina (TLC), foi utilizado para monitorizar o prosseguimento das reações de síntese química. Foram utilizadas placas de sílica-gel (Merck, sílica-gel 60-F254, 200 µm de espessura, partículas de 25 µm em folha de alumínio). Os eluentes utilizados foram: o Acetato de Etilo e Hexano (compostos **RC1** a **RC7**) e Clorofórmio e Metanol (compostos **L1** a **L5** e **C1** e **C2**). A revelação das placas foi feita com recurso a uma câmara de UV CAMAG, no comprimento de onda de 254 nm. Em alguns casos, de difícil percepção, a revelação das placas foi efetuada com recurso a pulverização com hidrazina e/ou uma câmara de iodo (I₂).

4.2. Síntese Química

4.2.1. Síntese de Ligandos bifuncionais – BTS:

Síntese de Diacetil-mono-4-metil-3-tiossemicarbazona, L1

Uma solução de 2,3-butanediona (2,39 g; 27,7 mmol) foi diluída em água destilada (50 mL) e, em seguida, a solução foi acidificada com algumas gotas de HCl concentrado (36 %) e arrefecida até 5 °C (com recurso a banho de gelo).

O composto 4-metil-3-tiossemicarbazida (2,65 g; 25,2 mmol), foi adicionado em pequenas porções, durante 1 hora e meia à solução fria e sob agitação (em banho de gelo), com o objetivo de produzir um precipitado branco, que foi posteriormente colocado em agitação durante 40 min.

Uma vez formado e findo o tempo de agitação, o precipitado foi extraído em clorofórmio (50+50+40 mL) e os estratos foram combinados, secos com MgSO₄, filtrados e concentrados.

O *N*-pentano foi adicionado à solução, até esta ficar ligeiramente turva e, seguidamente, a solução foi arrefecida a -20 °C (no congelador), originando “agulhas” brancas.

Por último, o produto foi recolhido por filtração, lavado com *N*-pentano e seco para se obter o composto **L1** (2,825 g; 16,3 mmol), com um rendimento reacional de 62%.

¹H RMN (400 MHz, *d*₆-DMSO): δ= 1,96 (s, 3H, CH₃); 2,41 (s, 3H, CH₃); 3,03 (d, ³J_{HH}=4.5 Hz, 3H, NH-CH₃); 8,62 (s, 1H, NH); 10,61 (s, 1H, NH).

Síntese de Diacetil-4,4-dimetil-4'-metilbis(tiossemicarbazona), L2

O composto **L1** (0,92 g; 5,3 mmol) foi diluído em DMF (3 mL) e, posteriormente, foi adicionado a esta solução o reagente 4,4-dimetil-3-tiossemicarbazida (0,76 g; 6,4 mmol; 1,2 eq.) e ácido acético (5 gotas, glacial). A solução resultante dos procedimentos atrás referidos foi colocada sob agitação, à temperatura ambiente, durante 48h. Tal como esperado, após as 48h, formou-se um sólido amarelo precipitado a partir da solução preparada, após adição de água (50 mL).

A suspensão foi arrefecida num banho de gelo e, posteriormente, o sólido “amarelo translúcido” foi recolhido por filtração, lavado com água (1x), com etanol (2x) e com dietil éter (3x) e seco para originar o composto **L2** (1,18 g; 4,3 mmol), com um rendimento reacional de 81%.

¹H RMN (300 MHz, *d*₆-DMSO): δ= 2,14 (s, 3H, CH₃); 2,19 (s, 3H, CH₃); 3,03 (d, ³J_{HH}=4,5 Hz; 3H; NH-CH₃); 3,27 (s, 6H, (CH₃)₂); 8,37 (d, ³J_{HH}=4,5 Hz; 1H; NH-CH₃) 9,50 (s largo, 1H, NH); 10,20 (s largo, 1H, NH).

Síntese de Diacetil-4-ácidobutírico-4'-metilbis(tiossemicarbazona), L3

O composto **L2** (0,28 g; 1,0 mmol) foi dissolvido em AcOEt (30 mL) e a solução obtida foi mantida sob agitação. Em seguida, foi adicionado a esta solução o ácido 4-aminobutírico (0,21 g; 2,0 mmol; 2 eq.). A suspensão amarela resultante foi aquecida em refluxo, durante 34 h, sob uma atmosfera de N₂.

Após arrefecimento até à temperatura ambiente, o sólido branco precipitado foi recolhido por filtração, lavado com HCl (3 %; 3x 3,5 mL), AcOEt (1x) e dietil éter (3x) e seco para originar o composto **L3** (0,26 g; 0,78 mmol), com um rendimento reacional de 78%.

¹H RMN (400 MHz, *d*₆-DMSO): δ= 1,81 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,20 (s, 6H, CH₃); 2,25 (t, ³J_{HH}=7,5 Hz; 2H; CH₂-CO₂H); 3,02 (d, ³J_{HH}=4,5 Hz; 3H; NH-CH₃); 3,57 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂); 8,38 (q, 1H, ³J_{HH}=4,5 Hz; NH-CH₃); 8,44 (t, 1H, ³J_{HH}=6Hz; NH-CH₂); 10,17 (s, 1H, NH); 10,22 (s, 1H, NH).

Síntese de Diacetil-4-ácidobutírico-4'-metilbis(tiossemicarbazonato)-cobre(II) [Cu^{II}(L³)], C1

A uma solução de **L3** (0,11 g; 0,3 mmol) em DMF (2 mL) – sob agitação e à temperatura ambiente – foi adicionado Cu(OAc)₂.H₂O (0,07 g; 0,3 mmol).

A solução resultante assumiu uma coloração vermelho acastanhada e permaneceu em agitação, à temperatura ambiente, durante 17 horas.

Com a finalidade de obter um precipitado, foi adicionada água (40 mL) à solução anterior. Obteve-se um sólido castanho que foi recolhido por filtração; lavado com água, etanol e dietil éter e seco para originar o complexo Cu^{II}(L³) (**C1**) (0,09 g; 0,23 mmol), η=76%.

CHN: Experimental: C, 33,14; H, 4,76; N, 21,37; Calculado para CuC₁₁H₁₈N₆O₂S₂: C, 33,53; H, 4,61; N, 21,33.

ESI-MS (MeOH): (Modo positivo) [M+H]⁺ m/z 100%= 394,2 (experimental), m/z= 394,04 (calculado); (Modo negativo) [M-H]⁻ m/z 100%= 392,1 (experimental), m/z=392,02 (calculado).

Síntese de *tert*-Butil 2-aminoetilcarbamato, L4

A uma solução de etilenodiamina (12,5 mL; 186,98 mmol) em dioxano (34 mL), foi adicionado – durante cerca de duas horas, com recurso a uma ampola de adição – uma solução de dicarbonato de *tert*-butil (Boc₂O) (5 g; 22,91 mmol) em dioxano (30 mL).

A mistura reacional permaneceu em agitação durante 22 horas, à t.a.

Findo este período de tempo, o dioxano foi evaporado na linha de vazio; adicionou-se água destilada (100 mL), com a finalidade de precipitar o produto com dois grupos Boc.

O precipitado resultante foi recolhido por filtração, extraído com diclorometano (DCM) (5 x 60 mL) e seco com Na₂SO₄.

Por fim, o DCM da fração extraída foi evaporado no evaporador rotativo e o óleo obtido foi posteriormente seco na linha de vazio para originar o *tert*-Butil 2-aminoetilcarbamato (2,498 g; 15,59 mmol), na forma de um óleo incolor, com um rendimento reacional de 68 %.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ= 1,36 (s, 9H, (CH₃)₃); 1,44 (s, 2H, NH₂); 2,72 (q, 2H, ³J_{HH}=6 Hz, CH₂-NHBoc); 3,09 (m, 2H, CH₂); 5,15 (s largo, 1H, NH).

Síntese de Diacetil *tert*-butil 4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazona) L5

Ao composto L3 (0,150 g; 0,4512 mmol) – sob atmosfera de N₂ e em agitação – foi adicionada N-Hidroxisuccinimida (NHS) (1,2 eq.; 0,062 g; 0,5414 mmol) em DMF seco (5 mL).

Em seguida, foi preparada uma solução de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrociorada (EDC) (1,2 eq.; 0,104 g; 0,5414 mmol) em DMF seco (2 mL) e adicionada “gota-a-gota” à solução anterior.

A solução permaneceu sob agitação, em atmosfera de N₂ e à temperatura ambiente durante cerca de 4 horas.

Findo este período de tempo, foi adicionado à mistura reacional a *tert*-Butil 2-aminoetilcarbamato (L4) (1,5 eq.; 0,108 g; 0,675 mmol) dissolvido em DMF seco (2 mL). A solução final (pH 7-8) permaneceu sob agitação durante cerca de 12 horas.

Após este período de tempo, o solvente foi evaporado na linha de vazio e realizou-se uma cromatografia em coluna (ver componente 4.1.3.1 – Cromatografia em coluna) para se obter o ligando L5 puro na forma de sólido castanho (0,200 g; 0,4214 mmol), η= 93%.

¹H RMN (300 MHz, d₆-DMSO): δ= 1,23 (s, 1H, NH); 1,37 (s, 9H, (CH₃)₃); 1,81 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,11 (t, ³J_{HH}=7,5 Hz; 2H, CH₂-CO₂H); 2,20 (s, 6H, CH₃); 2,56 (s,

2H, CH₂); 2,97 (q, 2H, ³J_{HH}=6 Hz, CH₂-NHBoc); 3,02 (d, ³J_{HH}=4,5Hz; 3H, NH-CH₃); 3,57 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂); 6,76 (s largo, 1H, NH); 8,38 (q, 1H, ³J_{HH}=4,5 Hz; NH-CH₃); 8,52 (t, 1H, ³J_{HH}=6 Hz, NH-CH₂); 10,15 (s, 1H, NH); 10,20 (s, 1H, NH).

¹³C RMN (*d*₆-DMSO): δ= 12,4 (CH₃-C=N); δ= 28,7 (CH₂); δ= 29,9 [(CH₃)₃]; δ= 31,9 (CH₃); δ= 33,3 (CH₂); δ= 39,5 (CH₂); δ= 40,5 (CH₂); δ= 44,3 (CH₂); δ= 79,4 (C); δ= 148,7 (C); δ= 155,9 (C); δ= 172,3 (C); δ= 178,3 (C); δ= 180,3 (C).

CHN: Calculado para C₁₈H₃₄N₈O₃S₂: C, 45,55; H, 7,22; N, 23,61.

ESI-MS (MeOH): (Modo negativo) [M-H]⁻ m/z 100%= 473,2 (experimental), [M-H]⁻ m/z= 473,2(calculado).

R_f(MeOH:CH₂Cl₂, 1:9) = 0,4

Síntese de Diacetil *terc*-butil 4-etilcarbamato-4'-metilbis(tiossemicarbazonato)-cobre(II) **C2**

Ao complexo Cu^{II}(L³) (**C1**) (0,045 g; 0,114 mmol) – sob atmosfera de N₂ e em agitação – foi adicionada N-Hidroxisuccinimida (NHS) (1,2 eq.; 0,016 g; 0,1368 mmol) em DMF seco (2 mL).

Em seguida, foi preparada uma solução de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreada (EDC) (1,2 eq.; 0,026 g; 0,1368 mmol) em DMF seco (1 mL) e adicionada “gota-a-gota” à solução anterior.

A solução permaneceu sob agitação, em atmosfera de N₂ e à temperatura ambiente durante cerca de 4 horas.

Findo este período de tempo, foi adicionou-se à mistura reacional *terc*-Butil 2-aminoetilcarbamato (**L4**) (1,5 eq.; 0,027 g; 0,171 mmol) em DMF seco (5 mL). Seguidamente, foi medido o pH (≈10) e a solução permaneceu sob agitação durante cerca de 12 horas.

Após este período de tempo, o solvente foi evaporado na linha de vazio e realizou-se uma cromatografia em coluna (ver componente 4.1.3.1 – Cromatografia em coluna) para se obter o complexo **C2** puro na forma de sólido castanho (0,032 g; 0,060 mmol), η= 53%.

CHN: Calculado para CuC₁₈H₃₂N₈O₃S₂: C, 40,32; H, 6,02; N, 20,90.

ESI-MS (MeOH): (Modo negativo) [M-H]⁻ m/z 100%= 534,1 (experimental), [M-H]⁻ m/z= 534,1 (calculado).

R_f(MeOH:CH₂Cl₂, 1:9) = 0,7

4.2.2. Síntese de Derivados de Indolo[3,2-c]quinolinas

Síntese de 2-[[[4-bromofenil]amino]metileno]malonato de etilo (RC1)

A 5,0516g (29 mmol) de 4-bromoanilina, foram adicionados 6,5 mL de Dietil-2-(etoximetileno)malonato (6,91 g; 6,5 mL; 32mmol; 1,1eq). A mistura reacional foi colocada em refluxo, durante 1 h. Findo este período de tempo, a mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e adicionada ao hexano (150 mL).

O precipitado formado é filtrado (sob condições de vácuo), lavado com hexano e seco para obter 8,6695 g (η = 87%) do composto **RC1** puro, na forma de sólido branco.

^1H RMN (300 MHz, d_6 -DMSO) δ = 1,23 (t, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz; 3H); 1,25 (t, $^3J_{\text{HH}}=7,1$ Hz; 3H); 4,08 – 4,23 (m, 4H); 7,35 (d, $^3J_{\text{HH}}=9$ Hz, 2H); 7,55 (d, $^3J_{\text{HH}}=9$ Hz, 2H); 8,35 (d, $^3J_{\text{HH}}=13,8$ Hz; 1H); 10,66 (d, $^3J_{\text{HH}}=13,8$ Hz; 1H).

Síntese de 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-carboxilato de etilo (RC2)

A solução de **RC1** (1 g; 2,9 mmol) em difenil éter (10 mL) foi colocada em refluxo, durante 1h. Findo este período de tempo, a mistura reacional foi arrefecida e adicionada ao hexano (35 mL). O precipitado formado é filtrado (sob condições de vácuo), lavado com hexano e seco para obter 0,8680g (η = 79%) do composto **RC2**, na forma de sólido branco.

^1H RMN (300 MHz, d_6 -DMSO) δ = 1,28 (t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz; 3H); 4,22 (q, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz; 2H); 7,60 (d, $^3J_{\text{HH}}=9$ Hz, 1H); 7,87 (dd, $^3J_{\text{HH}}=9$; 2,1 Hz, 1H); 8,22 (d, $^3J_{\text{HH}}=2,1$ Hz; 1H); 8,59 (s, 1H).

Síntese do ácido 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3 carboxílico (RC3)

A solução de **RC2** (0,8680 g; 2,9 mmol) em NaOH 10% (12 mL), foi colocada em refluxo, durante 1h. Findo este período de tempo, a mistura reacional foi arrefecida entre 0-5 °C, o pH foi ajustado para 1 com recurso a HCl 10 M. O precipitado formado é filtrado (sob condições de vácuo), lavado com água e seco para obter 0,4906 g (η = 62%) do composto **RC3**, na forma de sólido branco.

^1H RMN (300 MHz, d_6 -DMSO) δ = 7,79 (d, $^3J_{\text{HH}}=8,9$ Hz; 1H); 8,05 (dd, $^3J_{\text{HH}}=8,9$; 2,4 Hz, 1H); 8,36 (d, $^3J_{\text{HH}}=2,4$ Hz; 1H); 8,94 (s, 1H); 13,60 (s, 1H).

Síntese de 6-bromoquinolin-4-ol (RC4)

A solução de **RC3** (0,4815 g; 1,8 mmol) em difenil éter (6 mL), foi colocada em refluxo, durante 1 h. Findo este período de tempo, a mistura reacional foi arrefecida e adicionada ao hexano (40 mL). O precipitado formado é filtrado (sob condições de vácuo), lavado com hexano e seco para obter 0,3237 g (η = 80%) do composto **RC4**, na forma de sólido branco.

^1H RMN (300 MHz, d_6 -DMSO) δ = 6,08 (d, $^3J_{\text{HH}}$ =7,5 Hz; 1H); 7,53 (d, $^3J_{\text{HH}}$ =8,7 Hz; 1H) 7,79 (dd, $^3J_{\text{HH}}$ =8,7; 2,4 Hz, 1H); 7,96 (d, $^3J_{\text{HH}}$ =7,5 Hz, 1H); 8,16 (d, $^3J_{\text{HH}}$ =2,4 Hz; 1H); 11,95 (s, 1H).

Síntese da 6-bromo-4-cloroquinolina (RC5)

A solução de **RC4** (0,3237 g; 1,4 mmol) em POCl_3 (3,5 mL), foi colocada, durante 2 h, sob agitação a 120 °C. Findo este período de tempo, a mistura reacional foi arrefecida, adicionada à água (35 mL) e neutralizada com uma solução fria de KOH (sat.). O precipitado formado é filtrado (sob condições de vácuo), lavado com água e seco para obter 0,2175 g (η = 64%) do composto **RC5**, na forma de sólido castanho claro.

^1H RMN (300 MHz, d_6 -DMSO) δ = 7,82 (d, $^3J_{\text{HH}}$ =4,7 Hz; 1H); 8,00 (dd, $^3J_{\text{HH}}$ =9,0; 2,1 Hz; 1H); 8,04 (d, $^3J_{\text{HH}}$ =9,0 Hz; 1H); 8,32 (d, $^3J_{\text{HH}}$ =2,1 Hz; 1H); 8,88 (d, $^3J_{\text{HH}}$ =4,7 Hz; 1H).

Síntese da 6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (RC6)

A solução de 4-bromo-1,2-diaminobenzeno (0,5 g; 2,67 mmol) e NaNO_2 (nitrito de sódio, 0,46 g; 6,7 mmol; 2,5 eq) em AcOH (5 mL), foi sonicada a 35 KHz, durante 20 minutos. Após este período de tempo, a mistura reacional foi adicionada à água (62,5 mL) e extraída com EtOAc (3x50 mL). Após remoção do solvente a baixa pressão, o produto foi purificado por recristalização com o par de solventes EtOH e água para obter 0,4818 g (η = 90%) do composto **RC6**, na forma de sólido castanho claro.

^1H RMN (300 MHz, d_6 -DMSO) δ = 7,56 (d, $^3J_{\text{HH}}$ =5,1 Hz; 1H); 7,91 (s, 1H); 8, 20 (s, 1H); 15,89 (s, 1H, NH).

Síntese da 6-bromo-4-(5-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (RC7-1) e da 6-bromo-4-(6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (RC7-2)

A mistura de **RC5** (0,2175 g; 0,90 mmol) com **RC6** (0,1775 g; 0,90 mmol) foi homogeneizada e aquecida a 140 °C, durante 20 minutos. O produto formado foi purificado por cromatografia em coluna, em sílica gel, utilizando um gradiente de Hexano: Acetato de Etilo (8:2) Obtiveram-se 3 Frações que foram analisadas por ¹H RMN. A Fração 2 (0,2856 g; sólido castanho claro, continha um dos isómeros puros (RC7-1 ou RC7-2; η= 78%).

¹H RMN (300 MHz, *d*₆-DMSO) δ= 7,73 (dd, ³J_{HH}=8,8; 1,7 Hz; 1H); 8,01 (m, 2H); 8,07 (dd, ³J_{HH}=9; 2,3 Hz; 1H); 8,11 (dd, ³J_{HH}=1,8; 0,6 Hz; 1H); 8,20 (d, ³J_{HH}=9 Hz; 1H); 8,26 (d, ³J_{HH}=8,7 Hz; 1H); 9,21 (d, ³J_{HH}=4,8 Hz; 1H).

Fração 2: R_f(Hex:AcOEt, 8:2) = 0,25

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Correia, A., Correia, J. Biossíntese do ADN-replicação. In: Correia, A., Correia, J. Bioquímica Animal. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2^a. ed; 1985. p. 707-719;
- [2] Seeley, R. R., & Stephens, T. D. Desenvolvimento, Crescimento, Envelhecimento e Genética. In: Seeley, R. R., & Stephens, T. D. Anatomia & Fisiologia. Loures: Lusociência; 6^aed; McGraw- Hill Higher Education; 2003. p. 1110-1111;
- [3] Oliveira, R., Valente, L. F., Cromatina e Cromossomas. In: Azevedo, C., Sunkel, C. E. Biologia Celular e Molecular. Porto: Lidel – Edições técnicas; 5^aed; 2012. p. 139-156;
- [4] Biver, T., 2013. Stabilisation of non-canonical structures of nucleic acids by metal ions and small molecules. *Coord. Chem. Rev.* 257, 2765-2783;
- [5] Kypr, J., Kejnovská, I., Renciuk, D., Vorlícková, M., 2009. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nuc. Acid. Res.* 37(6), 1713–1725;
- [6] Aishima, J., Gitti, R., Noah, J .E., Gan, H .H., Schlick, T., Wollberger, C., 2002. A Hoogsteen base pair embedded in undistorted B-DNA. *Nuc. Acid. Res.* 30 (23), 5244-5252;
- [7] Venkadesh, S., Mandal, P.K., Gautham, N., 2011. The structure of a full turn of an A-DNA duplex d(CGCGGGTACCCGCG)₂. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 407,307–312;
- [8] Doluca, O., Withers, J. M., Filichev, V. V., 2013. Molecular Engineering of Guanine- Rich Sequences: Z-DNA, DNA Triplexes , and G-Quadruplexes. *Chem. Rev.* 113, 3044–3083;
- [9] Brzezinski, K., Brzuszkiewicz, A., Dauter, M., Kubicki, M., Jaskolski, M., Dauter, Z., 2011. High regularity of Z-DNA revealed by ultra high-resolution crystal structure at 0.55 Å. *Nuc. Acid. Res.* 39, 6238–6248;
- [10] Lodish, H., et al., From Gene to Protein: Basic Molecular Genetic Mechanisms. In: Lodish, H., et al. *Molecular Cell Biology*. New York: Scientific American; 5thed; 2003. p. 101-108;
- [11] Huppert, J. L., Balasubramanian, S., 2007. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nuc. Acid. Res.* 35(2), 406–413;

- [12] Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A.K., Neidle, S., 2006. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nuc. Acid. Res.* 34(19), 5402–5415;
- [13] Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., Balasubramanian, S., 2013. Quantitative Visualization of DNA G-quadruplex Structures in Human Cells. *Nat Chem.* 5(3), 182–186;
- [14] Chen, Z., et al., 2015. Stabilization of G-Quadruplex DNA, Inhibition of Telomerase Activity, and Tumor Cell Apoptosis by Organoplatinum(II) Complexes with Oxoisoaporphine. *J. Med. Chem.* 58, 2159–2179;
- [15] Wei, C-H., Wang, J-H., Wen, Y., Liu, J., Wang, L-H., 2013. 4-(1H-Imidazo[4,5-f]-1,10-phenanthroline-2-yl)phenol-based G-quadruplex DNA binding agents: Telomerase inhibition, cytotoxicity and DNA-binding studies. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 3379–3387;
- [16] Murat, P., Singh, Y., Defrancq, E., 2011. Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chem. Soc. Rev.* 40, 5293–5307;
- [17] Luedtke, N. W., 2009. Targeting G-Quadruplex DNA with Small Molecules. *Chimia.* 63, 134-139;
- [18] Vilar, R., et al., 2015. The interactions between a small molecule and G-quadruplexes are visualized by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature Communications.* 6, 1-10;
- [19] Neidle, S., 2009. The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 239–50;
- [20] Bidzinska, J., Cimino-Reale, G., Zaffaroni, N., 2013. Review: G-Quadruplex Structures in the Human Genome as Novel Therapeutic Targets. *Molecules.* 18 (10), 12368-12395;
- [21] Adrian, M., Heddi, B., Phan, A. T., 2012. NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods.* 57, 11–24;
- [22] Clay, E. H., Gould, I. R., 2005. A combined QM and MM investigation into guanine quadruplexes. *J. Mol. Graph. Mod.* 24, 138–146;
- [23] Jain, A., Paul, A., Maji, B., Muniyappa, K., Bhattacharya, S., 2012. Dimeric 1,3-Phenylene-bis(piperazinyl benzimidazole)s: Synthesis and Structure–Activity Investigations on their Binding with Human Telomeric G-Quadruplex DNA and Telomerase Inhibition Properties. *J. Med. Chem.* 55, 2981–2993;

- [24] Tan, J-H., Gu, L-Q., Wu, J-Y., 2008. Design of Selective G-quadruplex Ligands as Potential Anticancer Agents. *Mini-Reviews in Med. Chem.* 8(11), 1163-1178;
- [25] Zang, F., et al. 2014. Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of N-benzylidene-2-((5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio)acetohydrazide derivatives as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 468–477;
- [26] Tang, W., Wang, J., Tong, X., Shi, J., Liu, X., Li, J., 2015. Design and synthesis of celastrol derivatives as anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 95, 166-173;
- [27] Shi, J., Tang, W., Qui, X., Li, R., Liu, X., 2015. Novel pyrazole-5-carboxamide and pyrazolepyrimidine derivatives: Synthesis and anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* 90, 889-896;
- [28] Zang, X., et al., 2011. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of 1,3,4-oxadiazole derivatives possessing 1,4-benzodioxan moiety as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 6518–6524;
- [29] Xu, Y., 2011. Chemistry in human telomere biology: structure, function and targeting of telomere DNA/ RNA. *Chem. Soc. Rev.* 40, 2719-2740;
- [30] Reed, J.E., Neidle, S., Vilar, R., 2007. Stabilisation of human telomeric quadruplex DNA and inhibition of telomerase by a platinum-phenanthroline complex. *Chem Commun.* 42, 4366-8;
- [31] Arola-Arnal, A., Benet-Buchholz, J., Neidle, S., Vilar, R., 2008. Effects of Metal Coordination Geometry on Stabilization of Human Telomeric Quadruplex DNA by Square-Planar and Square-Pyramidal Metal Complexes. *Inorg. Chem.* 47, 11910-11919;
- [32] Laronze-Cochard, M., Kim, Y., Brassart, B., Riou, J., Laronze, J., Sapi, J., 2009. Synthesis and biological evaluation of novel 4,5-bis(dialkylaminoalkyl)-substituted acridines as potent telomeric G-quadruplex ligands. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 3880–3888;
- [33] Tan, J-H., et al., 2009. Isaindigotone Derivatives: A New Class of Highly Selective Ligands for Telomeric G-Quadruplex DNA. *J. Med. Chem.* 52, 2825-2835;
- [34] Ohnmacht, S. A., Neidle, S., 2014. Small-molecule quadruplex-targeted drug discovery. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 2602–2612;
- [35] Christlieb, M., Dilworth, J. R., 2006. Ligands for Molecular Imaging: The Synthesis of Bis(thiosemicarbazone) Ligands. *Chem. Eur. J.* 12, 6194-6206;

- [36] Lavrado, J., et al., 2013. Synthesis, G-Quadruplex Stabilisation, Docking Studies, and Effect on Cancer Cells of Indolo[3,2-b]quinolines with One, Two, or Three Basic Side Chains. *Chem. Med. Chem.* 8, 1648–1661;
- [37] Lavrado, J., et al., 2015. Indolo[3,2-c]quinoline G-Quadruplex Stabilizers: a Structural Analysis of Binding to the Human Telomeric G-Quadruplex. *Chem. Med. Chem.* 10, 836-849;
- [38] Riechert-Krause, F., Weisz, K., 2013. Indoloquinolines as DNA binding ligands. *Heterocycl. Commun.* 19 (3), 145-166;
- [39] Lavrado, J., Moreira, R., Paulo, A., 2010. Indoloquinolines as Scaffolds for Drug Discovery. *Curr. Med. Chem.* 17 (22), 2348-2370;
- [40] Riechert-Krause, F., Eick, A., Grünert, R., Bednarski, P. J., Weisz, K., 2011. In vitro anticancer activity and evaluation of DNA duplex binding affinity of phenyl-substituted indoloquinolines. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 2380–2383 ;
- [41] Zhang, Z., Wang, S., Wan, S., Ren, S., Li, W., Jiang, T., 2009. Efficient synthesis of jusbetonin, an indolo[3,2-b]quinoline glycoside, and its derivatives. *Carbohydrate Res.* 344, 291–297;
- [42] Paulo, A., et al., 2015. Targeting KRAS Oncogene in Colon Cancer Cells with 7-Carboxylate Indolo[3,2-b] quinoline Tri-Alkylamine Derivatives. *Plos One.* 1-18;
- [43] Neidle, S., et al., 2000. A Novel Inhibitor of Human Telomerase Derived from 10*H*-Indolo[3,2-b]quinoline. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 2063–2066;
- [44] Lavrado, J., et al., 2015. *KRAS* oncogene repression in colon cancer cell lines by G-quadruplex binding indolo[3,2-c]quinolines. *Sci Rep.* 5, 9696;
- [45] Palanimuthu, D., Samuelson, A.G., 2013. Dinuclear zinc bis(thiosemicarbazone) complexes: Synthesis, in vitro anticancer activity, cellular uptake and DNA interaction study. *Inorg. Chim. Acta.* 408, 152–161;
- [46] Arora, S., Agarwal, S., Singhal, S., 2014. Anticancer Activities of Thiosemicarbazides/Thiosemicarbazones: A Review. *Int. J. Pharm. Sci.* 6 (9), 34-41;
- [47] Alomar, K., Landreau, A., Allain, M., Bouet, G., Larcher, G., 2013. Synthesis, structure and antifungal activity of thiophene-2,3-dicarboxaldehyde bis(thiosemicarbazone) and nickel(II), copper(II) and cadmium(II) complexes: Unsymmetrical coordination mode of nickel complex. *J. Inorg. Biochem.* 126, 76–83;

- [48] Donnelly, P. S., et al., 2010. Copper and zinc bis(thiosemicarbazonato) complexes with a fluorescent tag: synthesis, radiolabelling with copper-64, cell uptake and fluorescence studies. *J. Biol. Inorg. Chem.* 15, 225-235;
- [49] Hueting, R., Tavaré, R., Dilworth, J. R., Mullen, G.E., 2013. Copper-64 radiolabelling of the C2A domain of synaptotagmin I using a functionalised bis(thiosemicarbazone): A pre- and post-labelling comparison. *J. Inorg. Biochem.* 128, 108–111;
- [50] Duncan, C., White, A. R., 2012. Copper complexes as therapeutic agents. *The Royal Soc. of Chem.* 4, 127-138;
- [51] Casagrande, V., et al., 2011. *N*-Cyclic Bay-Substituted Perylene G-Quadruplex Ligands Have Selective Antiproliferative Effects on Cancer Cells and Induce Telomere Damage. *J. Med. Chem.* 54, 1140-1156;
- [52] Hayne, D. J., Lim, S., 2014. Donnelly, P. S., Metal complexes designed to bind to amyloid- β for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* 43, 6701-6715;
- [53] Saha, G. B. Radioactive Decay. In: Saha, G. B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. New York: Springer-Verlag; 5th ed; 2003. p. 11-30;
- [54] Sharp, P. F., Gemmell, H. G., Murray, A. D. *Practical Nuclear Medicine*. London: Springer-Verlag; 3rd ed. 2005. pp. 1-35;
- [55] Hamoudeh, M., Kamleh, M. A., Diab, R., Fessi, H., 2008. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60(12), 1329-1346;
- [56] Kassis, A.I., Adelstein, S.J., 2005. Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy. *J Nucl Med.* 46 (1), 4S-12S;
- [57] Kiess, A. P., Minn, I., Chen, Y., Hobbs, R., Sgouros, G., Mease, R. C., et al., 2015. Auger Radiopharmaceutical Therapy Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen. *J Nucl Med.* 56 (9), 1401-1407;
- [58] Dauer, L. T., Williamson, M. J., Humm, J., O'Donoghue, J., Ghani, R., St. Germain, J., et al., 2014. Radiation Safety Considerations for the Use of ²²³RaCl₂ DE in Men with Castration-resistant Prostate Cancer. *Health Physics.* 106 (4), 494-504;

- [59] Delacroix, D., Guerre, J. P., Leblanc, P., Hickman, C. Table of Radionuclides Listed. In: Radionuclide and radiation protection data handbook. Radiation Protection Dosimetry. 98(1). UK: Nuclear Technology Publishing; 2nd ed. 2002. pp. 19-20;
- [60] Buchegger, F., Perillo-Adamer, F., Dupertuis, Y. M., Delaloye, A. B., 2006. Auger radiation targeted into DNA: a therapy perspective. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 33 (11), 1352-1363;
- [61] Howell, R.W., 2008. Auger processes in the 21st century. Int J Radiat Biol. 84 (12), 959-975;
- [62] Falzone, N., Fernández-Varea, J.M., Flux, G., Vallis, K.A., 2015. Monte Carlo Evaluation of Auger Electron–Emitting Theranostic Radionuclides. J Nucl Med. 56(9), 1441-1446;
- [63] Lobachevsky, P., Smith, J., Denoyer, D., et al., 2012. Tumour targeting of Auger emitters using DNA ligands conjugated to octreotate. Int. J Rad Biol. 88(12), 1009-1018;
- [64] Imstepf, S., Pierroz, V., Raposinho, P., Bauwens, M., Felbert, M., Fox, T., et al., 2015. Nuclear Targeting with an Auger Electron Emitter Potentiates the Action of a Widely Used Antineoplastic Drug. Bioconjugate Chem. 26(12), 2397–2407;
- [65] Tavares, A. A., Tavares, J. M., 2010. (99m)Tc Auger electrons for targeted tumor therapy: a review. Int. J. Radiat. Biol. 86 (4), 261-270;
- [66] Cutler, C . S., Hennkens, H. M., Sisay, N., Huclier-Markai, S., Jurisson, S. S., 2013. Radiometals for Combined Imaging and Therapy. Chem. Rev. 113, 858-883;
- [67] Eiblmaier, M., Andrews, R., Laforest, R., Rogers, B. E., Anderson, C.J., 2007. Nuclear Uptake and Dosimetry of ⁶⁴Cu-Labeled Chelator–Somatostatin Conjugates in an SSTR2-Transfected Human Tumor Cell Line. J. Nucl. Med. 48 (8), 1390–1396;
- [68] Anderson, C.J., Green, M.A., Fujibayashi, Y. Chemistry of copper radionuclides and Radiopharmaceutical Products. In: Welch, M.J., Redvanly, C.S. Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications. UK: Wiley; 2003. p. 401-416;
- [69] Haller, S., Pellegrini, G., Vermeulen, C., Köster, U., Bernhardt, P., Schibli, R., et al. 2016. Contribution of Auger/conversion electrons to renal side effects after radionuclide therapy: preclinical comparison of ¹⁶¹Tb-folate and ¹⁷⁷Lu-folate. EJNMMI Res. 6 (13) , 1-11;

- [70] Vilar, R., Georgiades, S. N., Karim, N. H. A., Suntharalingam, K., 2010. Interaction of Metal Complexes with G-Quadruplex DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 4020 – 4034;
- [71] Esteves, T., Marques, F., Paulo, A., Rino, J., Nanda, P., Smith, C. J., Santos, I., 2011. Nuclear targeting with cell specific multifunctional tricarbonyl M(I) (M is Re, ^{99m}Tc) complexes: synthesis, characterization, and cell studies. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 1141–1153;
- [72] Shokeen, M., Anderson, C.J., 2009. Molecular Imaging of Cancer with Copper-64 Radiopharmaceuticals and Positron Emission Tomography (PET). *Acc. of Chem. Res.* 42 (7), 832-841;
- [73] Smith, S. V., 2004. Molecular Imaging with copper-64. *J. Inorg. Bio.* 98, 1874-1901;
- [74] Wadas, T. J., Wong, E. H., Weisman, G.R., Anderson, C. J., 2007. Copper Chelation Chemistry and its Role in Copper Radiopharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Design.* 13, 3-16;
- [75] Krajčiová, D., Melník, M., Havránek, E., Forgáčsová, A., Mikuš, P., 2014. Copper compounds in nuclear medicine and oncology. *Journal of Coordination Chemistry.* 67 (9), 1493–1519;
- [76] Cowley, A. R.; Dilworth, J. R.; Donnelly, P. S.; Labisbal, E.; Sousa, A., 2002. An Unusual Dimeric Structure of a Cu(I) Bis(thiosemicarbazone) Complex: Implications for the Mechanism of Hypoxic Selectivity of the Cu(II) Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 5270-5271;
- [77] Bormans, G., et al., 1992. A ⁶²Zn/⁶²Cu generator for the routine production of ⁶²Cu-PTSM. *Appl. Radiat. Isot.* 43, 1437-1441;
- [78] Fujibayashi, Y., Taniuchi, H., Yonekura, Y., et al., 1997. Copper-62-ATSM: a new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential. *J Nucl Med.* 38, 1155–1160;
- [79] Liu, J., et al., 2009. Retention of the Radiotracers ⁶⁴Cu-ATSM and ⁶⁴Cu-PTSM in Human and Murine Tumors Is Influenced by MDR1 Protein Expression. *J Nucl Med.* 50 (8), 1332-1339;

- [80] Cowley, A. R., Dilworth, J.R., Donnelly, P. S., Heslop, J. M., Ratcliffe, S. J., 2007. Bifunctional chelators for copper radiopharmaceuticals: the synthesis of [Cu(ATSM)-amino acid] and [Cu(ATSM)-octreotide] conjugates. Dalton Trans. 209-217;
- [81] López-Torres, E., Cowley, A. R., Dilworth, J. R., 2007. Complexation *versus* thiadiazole formation for reactions of thiosemicarbazides with copper(II). Dalton Trans. 1194-1196;
- [82] Christlieb, M., Struthers, H. S. R., Bonnitche, P. D., Cowley, A.R., Dilworth, J. R., 2007. The exocyclic functionalisation of bis(thiosemicarbazone) complexes of zinc and copper: the synthesis of monomeric and dimeric species. Dalton Trans. 5043-5054;
- [83] Lewis, J.S., McCarthy, D.W., McCarthy, T.J., et al., 1999. Evaluation of ^{64}Cu -ATSM in vitro and in vivo in a hypoxic tumor model. J Nucl Med. 40, 177–183;
- [84] Antunes, P., Delgado, R., Drew, M. G. B., Félix, V., Maecke, H., 2007. Copper Complexes of New Benzodioxotetraaza Macrocycles with Potential Applications in Nuclear Medicine. Inorg. Chem. 46 (8), 3144-3153;
- [85] Price, K. A., et al., 2011. Subcellular localization of a fluorescent derivative of $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atSM})$ offers insight into the neuroprotective action of $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{atSM})$. Metallomics. 3, 1280–1290;
- [86] Paterson, B. M., et al., 2015. Bifunctional ^{64}Cu -labelled macrobicyclic cage amine isothiocyanates for immuno-positron emission tomography. Dalton Trans. 44 (11), 4901-4909;
- [87] Paterson, B. M., Donnelly, P. S., 2011. Copper complexes of bis(thiosemicarbazones): from chemotherapeutics to diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. Chem. Soc. Rev. 40, 3005–3018;
- [88] Liu, C., Wang, M., Zhang, T., Sun, H., 2004. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. Coordination Chemistry Reviews. 248, 147–168;
- [89] Obata, A., Kasamatsu, S., Lewis, J.S., et al., 2005. Basic characterization of ^{64}Cu -ATSM as a radiotherapy agent. Nucl Med Biol. 32, 21–28;
- [90] McMillan, D.D., Maeda, J., Bell, J.J., et al., 2015. Validation of ^{64}Cu -ATSM damaging DNA via high-LET Auger electron emission. J Rad Res. 56 (5), 784–791;

- [91] Esteves, T., Xavier, C., Gama, S., Mendes, F., Paulo, A., Santos, I., et al., 2010. Tricarbonyl M(I) (M = Re, ^{99m}Tc) complexes bearing acridine fluorophores: synthesis, characterization, DNA interaction studies and nuclear targeting, *Org. Biomol. Chem.* 8, 4104–4116;
- [92] Vitor, R. F., Esteves, T., Marques, F., Raposinho, P., Paulo, A., Santos, I., et al., 2009. Tc-99m-Tricarbonyl Complexes Functionalized with Anthracenyl Fragments: Synthesis, Characterization, and Evaluation of Their Radiotoxic Effects in Murine Melanoma Cells. *CANCER BIOTHERAPY AND RADIOPHARMACEUTICAL.* 24, 551-563;
- [93] Vitor, R. F., Correia, I., Videira, M., Marques, F., Paulo, A., Santos, I., et al. 2008. Pyrazolyl-Diamine Ligands That Bear Anthracenyl Moieties and Their Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes: Synthesis, Characterization and DNA-Binding Properties. *Chem. Bio. Chem.* 9 (1), 131-142;
- [94] Hueting, R., Christlieb, M., Dilworth, J.R., Garayoa, E.G., Gouverneur, V., Jones, M.W., et al., 2010. Bis(thiosemicarbazones) as bifunctional chelators for the room temperature ⁶⁴-copper labeling of peptides. *Dalton Trans.*, 39, 3620–3632;
- [95] Paterson, B. M., Karas, J.A., Scanlon, D. B., White, J.M., Donnelly, P.S., 2010. Versatile New Bis(thiosemicarbazone) Bifunctional Chelators: Synthesis, Conjugation to Bombesin(7-14)-NH₂, and Copper-64 Radiolabeling. *Inorg. Chem.* 49, 1884–1893;
- [96] Wang, J., Uttamchandani, M., Li, J., Hu, M., Yao, S. Q., 2006. “Click” synthesis of small molecule probes for activity-based fingerprinting of matrix metalloproteases. *Chem. Commun.* 3783-3785;
- [97] Perrin, D. D., Armarego, W. L. F., *Purification of Laboratory Chemicals.* Oxford: Pergamon Press. 3rd ed; 1988.