

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Química e Bioquímica**



**Avaliação do Potencial Clínico de Novos Ligandos  
para o Receptor Estrogénico em Diagnóstico e  
Terapia de Tumores da Mama**

**Susana Manuela Pereira da Cunha**

Doutoramento em Química  
(Especialidade de Química Inorgânica)

**2015**



**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Química e Bioquímica**



**Avaliação do Potencial Clínico de Novos Ligandos  
para o Receptor Estrogénico em Diagnóstico e  
Terapia de Tumores da Mama**

**Susana Manuela Pereira da Cunha**

Tese orientada pelas Doutoradas Maria de Lurdes Gano, Isabel Rego dos Santos e Maria Helena Garcia especialmente elaborada para a obtenção do grau de Doutor em Química (Especialidade de Química Inorgânica)

**2015**



O trabalho descrito nesta tese foi realizado no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas no Centro de Ciências Tecnológicas e Nucleares (C<sup>2</sup>TN) do Campus Tecnológico e Nuclear (CTN), Instituto Superior Técnico-Polo de Loures, sob orientação da Doutora Maria de Lurdes Gano e Professora Isabel Santos. Este trabalho envolveu ainda a colaboração do Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) em Dijon- França com o Professor Franck Denat.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/43432/2008 e pelos Projectos PTDC/QUI-QUI/111891/2009 e EXCL/QEQ-MED/0233/2012.



**“Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem”.**

*John Quincy Adams*



## Agradecimentos

O meu profundo agradecimento à Doutora Lurdes Gano pela orientação, pela disponibilidade, pela amizade e pela paciência que teve nos meus momentos mais difíceis. Não posso esquecer também de agradecer o seu empenho na realização dos estudos biológicos e todo o apoio prestado.

À Professora Doutora Isabel Rego dos Santos agradeço a orientação e a permanente dedicação e entusiasmo com que coordenou o Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas durante o período em que realizei o trabalho prático.

I would like to thank Prof. Frank Denat of Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) in Dijon- France and to the group P2DA, for the opportunity to do part of my work in his lab. A special thanks to all the colleagues from laboratory R13 for all the support and good environment during my time in Dijon.

Agradeço à Doutora Célia Fernandes pela amizade, pela orientação na realização do trabalho de síntese, pelo apoio no HPLC e a realização de alguns dos espectros de ESI-MS apresentados neste trabalho e por toda a disponibilidade para me ajudar nos momentos mais difíceis.

Agradeço a Dra. Cristina Oliveira a amizade e todas as críticas construtivas na escrita desta tese assim como a total disponibilidade sempre que me surgiam algumas dúvidas e a Doutora Fernanda Marques pelo empenho na realização dos estudos de RBA e de alguns ensaios celulares.

À Doutora Paula Campello agradeço a amizade e todos os conhecimentos transmitidos na área dos macrociclos e pela ajuda que me deu sempre que precisava fazer novas montagens para a destilação de THF (e não foram poucas !!!).

Ao Doutor Joaquim Marçalo do C<sup>2</sup>TN e à Doutora Christine Goze do ICMUB, agradeço a realização dos espectros de ESI-MS e Maldi-TOF, presentes neste trabalho.

Agradeço todos os meus colegas de laboratório e restantes colegas do grupo CR pelo ambiente de trabalho que proporcionaram e pela amizade. Ao Filipe Vultos agradeço também a colaboração na síntese do composto L1. Um especial agradecimento à Carolina Moura, Carina Neto, Catarina Xavier, Raquel Garcia e Francisco Silva, os meus colegas de laboratório iniciais, por todos os bons momentos passados no SQII.

A todas as minhas amigas agradeço a amizade, o facto de aceitarem as minhas “distracções” e por compreenderem a minha falta de disponibilidade nos últimos tempos. Ao Rui agradeço o apoio, a paciência e todos os bons momentos.

Por último agradeço a minha família, em especial os meus pais, por nunca duvidarem das minhas capacidades, por me darem força e por acreditarem em mim.

**Obrigada,  
Susana Cunha**



## Resumo

O trabalho apresentado nesta tese teve como objectivo o desenvolvimento de novas moléculas da família do estradiol com especificidade biológica para o receptor de estrogénio (RE) e com interesse no diagnóstico, prognóstico e/ou terapia sistémica de carcinomas invasivos da mama.

Com esse objectivo, procedeu-se à síntese e caracterização de derivados de estradiol (**L1-L7**), funcionalizados na posição C16, com diferentes unidades quelantes bifuncionais (DOTA, DTPA; DOTAGA e NOTAGA) ou com uma unidade intercaladora de ADN, o alaranjado de acridina **AO** (**3.8**) ou com uma sonda fluorescente, **BODIPY** (**4.3**, **4.4**). Estes conjugados foram sintetizados na perspectiva de veicularem selectivamente radionuclídeos ( $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$ ), **AO** ou **BODIPY** para o interior de células de cancro da mama. Os compostos **L1-L7** foram utilizados na preparação de complexos de  $\text{In}/^{111}\text{In}$  e  $\text{Ga}/^{67}\text{Ga}$ .

Os estudos de afinidade para o receptor revelaram que os compostos **L5-L7**, **InL5**, **InL6** e **3.8** possuíam afinidade e eram selectivos para o subtipo  $\alpha$  do RE.

Os complexos  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ ,  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  foram obtidos com elevado rendimento e pureza radioquímica, utilizando baixas concentrações de ligando. A maioria dos complexos demonstraram ser estáveis *in vitro* e *in vivo*. Estudos de captação em linhas celulares de adenocarcinoma da mama MCF-7 e MDA-MB-231 revelaram taxas de captação relativamente baixas, consistentes com o carácter hidrofílico da maioria dos compostos, sugerindo no entanto captação mediada pelo RE. Ensaios de biodistribuição revelaram rápida depuração sanguínea e rápida captação hepática. O composto  $^{67}\text{GaL7}$  apresentou fixação uterina e ovárica mais elevada indicando os ensaios de saturação dos receptores para um mecanismo mediado pelo RE.

Por microscopia confocal de fluorescência, verificou-se que o composto estradiol/**AO** internalizava em células MCF-7, localizando-se no núcleo.

Os compostos fluorescentes estradiol/**BODIPY** demonstraram elevados rendimentos quânticos podendo ser utilizados em microscopia de fluorescência. Verificou-se também que atravessavam a membrana plasmática, não se observando internalização nuclear.



## Abstract

The work described in this thesis has been focused on the development of a new family of estradiol molecules with specificity for estrogen receptors (ER) aiming its potential application in invasive breast cancer diagnosis, prognosis and/or systemic therapy.

To this end, a set of estradiol derivatives (**L1-L7**), functionalized at C16 with different bifunctional chelating agents (DOTA, DTPA, DOTAGA and NOTAGA) with acridine orange (**AO**), a DNA intercalating unit (**3.8**), or with the fluorescent probe **BODIPY** (**4.3**, **4.4**) were synthesized and characterized. These conjugates were synthesized aiming the selective delivery of radionuclides ( $^{67}\text{Ga}$  and  $^{111}\text{In}$ ), **AO** or **BODIPY** into breast cancer cells. The **L1-L7** compounds were the precursors used to prepare  $\text{In}/^{111}\text{In}$  and  $\text{Ga}/^{67}\text{Ga}$  complexes.

The receptor binding affinity studies indicated that the **L5-L7**, **InL5**, **InL6** and **3.8** compounds have ER affinity and are selective to ER $\alpha$  subtype.

The complexes  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ ,  $^{67}\text{GaL2}$  and  $^{67}\text{GaL7}$  were obtained in high yield and radiochemical purity at low ligand concentrations. Most of the complexes are highly stable both *in vitro* and *in vivo*. Cellular uptake studies in breast adenocarcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines have shown moderate to relatively low uptake rates, consistent with the hydrophilic character of most compounds. Nevertheless results from receptor saturation assays suggested that the uptake may occur by an ER-mediated process. Biodistribution studies in animal models indicated rapid blood clearance and rapid excretion through the hepatobiliary pathway. The highest uterine and ovarian uptake was found for  $^{67}\text{GaL7}$  and receptor blockade studies indicated an ER-mediated uptake mechanism.

The hybrid compound estradiol/AO internalizes into MCF-7 cells and localizes in the cell nucleus, as demonstrated by confocal fluorescence microscopy analysis.

The fluorescent compounds estradiol/BODIPY have demonstrated high quantum yields and can be used in fluorescence microscopy. These compounds are able to cross the cell membranes but no nuclear internalization was observed.



## **Palavras- Chave**

Estradiol

Receptores de estrogénio

Complexos de In e Ga

Intercaladores

Sondas fluorescentes

## **Keywords**

Estradiol

Estrogen receptors

In and Ga complexes

Intercalators

Flourescent probes



# Índice Geral

---

	<b>Página</b>
Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Palavras-Chave	ix
Keywords	ix
Índice Geral	xi
Índice de Figuras	xix
Índice de Esquemas	xxiv
Índice de Tabelas	xxv
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xxvii
Ligandos, Complexos e Compostos Sintetizados	xxxiii
<b>Âmbito e Objectivos do Trabalho</b>	<b>1</b>
<b><i>Capítulo 1: Introdução</i></b>	<b>5</b>
<b>1.1. Cancro da Mama</b>	<b>7</b>
<b>1.1.1. Diagnóstico e estadiamento do cancro da mama</b>	<b>10</b>
<b>1.1.2. Tratamento do cancro da mama</b>	<b>11</b>
1.1.2.1. Hormonoterapia	13
1.1.2.2. Quimioterapia	16
1.1.2.3. Terapia dirigida a alvos específicos	17
<b>1.2. Receptores de Estrogénio</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1. Subtipos de receptor de estrogénio</b>	<b>20</b>
<b>1.2.2. Modelo de transcrição genómica mediado pelo RE</b>	<b>22</b>
<b>1.2.3. Relevância dos receptores de estrogénio como biomarcadores/alvos específicos de cancro da mama</b>	<b>23</b>
<b>1.3. Medicina Nuclear</b>	<b>23</b>
<b>1.3.1. Radiofármacos</b>	<b>24</b>
<b>1.3.2. Medicina nuclear versus outras modalidades de imagem utilizadas no diagnóstico do cancro da mama</b>	<b>29</b>

1.3.3. Teranóstica	30
1.4. Química e Radioquímica do Gálio (III) e do Índio (III) para Aplicação Médica	31
1.4.1. Radioisótopos de Gálio	32
1.4.2. Radioisótopos de Índio	34
1.4.3. Terapia Auger	35
1.4.4. Concepção de radiofármacos bioespecíficos de $^{67/68}\text{Ga}$ e $^{111}\text{In}$	36
1.4.4.1. Espaçador	37
1.4.4.2. Conjugação da biomolécula ao agente quelante bifuncional	38
1.4.4.3. Agentes quelantes bifuncionais para a coordenação de Ga(III) e/ou In(III)	39
1.5. Derivados de Estradiol com Potencial Aplicação em Medicina Nuclear	43
1.5.1. Derivados de estradiol radiohalogenados	44
1.5.2. Derivados de estradiol marcados com radionuclídeos metálicos	46
1.6. Sondas Biomodais para Imagiologia Molecular	49
<b>Capítulo 2: Complexos de In(III) e de Ga(III) com Derivados da Molécula de Estradiol</b>	53
2.1. Considerações Gerais	55
2.2. Síntese dos Conjugados de Estradiol com Agentes Quelantes Bifuncionais	56
2.2.1. Síntese dos derivados de estradiol funcionalizados em C16	58
2.2.2. Conjugação aos agentes quelantes bifuncionais	71
2.2.2.1. Síntese do conjugado estradiol-DTPA (L1)	71
2.2.2.2. Síntese dos conjugados estradiol-DOTA (L2-L4)	77
2.2.2.3. Síntese dos conjugados estradiol-DOTAGA (L5-L6)	84
2.2.2.4. Síntese do conjugado estradiol-NODAGA (L7)	88
2.3. Síntese e Caracterização de Complexos de In(III) e Ga(III)	92
2.3.1. Complexos inactivos de In(III) (InL1-InL6) e Ga(III) (GaL2 e GaL7)	92
2.3.1.1. Síntese dos complexos InL1-InL6, GaL2 e GaL7	92
2.3.1.2. Caracterização dos complexos InL1-InL6, GaL2 e GaL7	96
2.3.2. Complexos de $^{111}\text{In}$ e $^{67}\text{Ga}$	103
2.3.2.1. Síntese e caracterização dos complexos de $^{111}\text{In}$	105
2.3.2.2. Síntese e caracterização dos complexos de $^{67}\text{Ga}$	108
2.3.2.3. Estudos <i>in vitro</i> de caracterização e estabilidade dos complexos de $^{111}\text{In}$ e $^{67}\text{Ga}$	112
2.3.2.3.1. Determinação da lipofilia	112
2.3.2.3.2. Estudos de estabilidade <i>in vitro</i>	114

<b>2.4. Avaliação Biológica</b>	<b>120</b>
2.4.1. Determinação da afinidade de ligação ao receptor de estrogénio dos conjugados de estradiol e de complexos de In(III) e Ga(III)	120
2.4.2. Estudos de captação celular dos complexos de <sup>111</sup> In e <sup>67</sup> Ga	123
2.4.3. Estudos de biodistribuição dos complexos de <sup>111</sup> In e <sup>67</sup> Ga	128
<b>2.5. Conclusões</b>	<b>141</b>
<b>Capítulo 3: Síntese e Avaliação Biológica de uma Molécula Híbrida Estradiol/ Alaranjado de Acridina</b>	<b>143</b>
<b>3.1. Considerações Gerais</b>	<b>145</b>
<b>3.2. Síntese e Caracterização do Composto Híbrido Estradiol/Alaranjado de Acridina</b>	<b>150</b>
<b>3.3. Avaliação Biológica do Composto Estradiol/Alaranjado de Acridina</b>	<b>153</b>
3.3.1. Determinação da afinidade de ligação ao receptor estrogénico	153
3.3.2. Determinação da inibição de proliferação celular	155
3.3.3. Estudos de captação celular e de localização intracelular	156
<b>3.4. Conclusões</b>	<b>159</b>
<b>Capítulo 4: Síntese e Avaliação Biológica de Derivados 16<math>\alpha</math>-Estradiol Conjugados a Sondas Fluorescentes</b>	<b>161</b>
<b>4.1. Considerações Gerais</b>	<b>163</b>
<b>4.2. Síntese e Caracterização dos Compostos Estradiol/BODIPY</b>	<b>167</b>
4.2.2. Síntese dos conjugados estradiol/BODIPY	167
4.2.1.1 Caracterização por espectroscopia de UV-Vis e de fluorescência	170
<b>4.3. Síntese e Caracterização de Derivados do Estradiol Bimodais</b>	<b>172</b>
<b>4.4. Avaliação Biológica das Sondas Fluorescentes Estradiol/BODIPY</b>	<b>175</b>
4.4.1. Determinação da afinidade de ligação ao receptor estrogénico	176
4.4.2. Determinação da inibição da proliferação celular	176
4.4.3. Estudos de captação celular e de localização intracelular	177
<b>4.4. Conclusões</b>	<b>178</b>
<b>Capítulo 5: Conclusões e Perspectivas</b>	<b>181</b>

<b>Capítulo 6: Parte Experimental</b>	<b>191</b>
<b>6.1. Solventes e Reagentes</b>	<b>193</b>
<b>6.2. Técnicas de Purificação e Caracterização</b>	<b>194</b>
<b>6.3. Síntese e Caracterização</b>	<b>199</b>
<b>6.3.1. Síntese dos derivados de estradiol derivados em C16</b>	<b>199</b>
6.3.1.1. Síntese do 3-( <i>terc</i> -dimetilsililoxi)estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (2.2)	199
6.3.1.2. Síntese do 4-[3'-( <i>terc</i> -butildimetilsililoxi)-17-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha$ -il]bromobut-2-eno (2.3)	200
6.3.1.3. Síntese do 4-[3'-metoxi-17'-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha$ / $\beta$ -il]but-2-enoato de metilo (2.5)	201
6.3.1.4. Síntese do 4-[3'-metoxi-17' $\beta$ -hidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha$ / $\beta$ -il]butanol (2.7)	202
6.3.1.5. Síntese do 4-[3'-metoxi-17' $\beta$ -hidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha$ / $\beta$ -il]bromobutano (2.8)	203
6.3.1.6. Síntese do 4-[3',17' $\beta$ -dihroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha$ -il]bromobutano (2.9)	203
6.3.1.7. Síntese do 1-[3'-metoxi-17'-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\beta$ -il]metanoato de metilo (2.10)	204
6.3.1.8. Síntese do 6-[3'-metoxi-17'-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha$ / $\beta$ -il]-16' $\alpha$ / $\beta$ -(metoxicarbonil)-1-[(tetrahydro-2'H-piran-2'-il)oxi]hexano (2.11)	204
6.3.1.9. Síntese do 6-[(3'-metoxi-17'-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha$ / $\beta$ -il)]-1-[(tetrahydro-2'H-piran-2'-il)oxi]hexano (2.12)	205
6.3.1.10. Síntese do 6-[(3'-metoxi-17' $\beta$ -hidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha$ / $\beta$ -il)]-1-[(tetrahydro-2'H-piran-2'-il)oxi]hexano (2.13)	206
6.3.1.11. Síntese do 6-[(3'-metoxi-17' $\beta$ -hidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\beta$ -il]bromohexano (2.14)	206
6.3.1.12. Síntese do 6-[(3',17' $\beta$ -dihroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\beta$ -il]bromohexano (2.15)	207
6.3.1.13. Síntese do 4-[3'-( <i>terc</i> -butildimetilsililoxi)-17'-oxoestra-1',3',5'(10')trien-16' $\alpha$ -il]azidobut-2-eno (2.16)	208
6.3.1.14. Síntese do 4-[3'-( <i>terc</i> -butildimetilsililoxi)-17' $\beta$ -hidroxiestra-1',3',5'(10')trien-16' $\alpha$ -il]but-2-enilamina (2.17)	208
6.3.1.15. Síntese do 4-[3'-( <i>terc</i> -butildimetilsililoxi)-17' $\beta$ -hidroxiestra-	209

1',3',5'(10')trien-16'α-il]butilamina (2.18)	
<b>6.3.2. Síntese e caracterização dos conjugados de estradiol</b>	<b>210</b>
6.3.2.1. Síntese conjugado TBDMS-E2-DTPA anidro (2.19)	210
6.3.2.2. Síntese do conjugado E2-DTPA anidro (2.20)	210
6.3.2.3. Síntese do 4-[3',17'β-dihidroxiestra-1',3',5'(10')trien-16'α-il]but-2-enilamina (2.21)	211
6.3.2.4. Síntese de dietilenotriamino-N-benzil-N',N'',N''-tetraacetato de <i>terc</i> -butilo (2.23)	211
6.3.2.5. Síntese de dietilenotriamino-N,N,N',N'-tetraacetato de <i>terc</i> -butilo (2.24)	212
6.3.2.6. Síntese de <i>N</i> -{4-[3'-( <i>terc</i> -butildimetilsililoxi)-17'-oxoestra-1',3',5'(10')trien-16'α-il]but-2-enil}-dietilenotriamina-N',N'',N''-tetraacetato de <i>terc</i> -butilo (2.25)	212
6.3.2.7. Síntese do ácido- <i>N</i> -{4-[3',17'β-dihidroxiestra-1',3',5'(10')trien-16'α-il]but-2-enil}-dietilenotriamina-N',N'',N''-tetraacético (L1)	213
6.3.2.8. Síntese do 1-{4'-[(3''- <i>terc</i> -dimetilsililoxi)-17''-oxoestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]but-2'-enil}-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacetato de <i>terc</i> -butilo (2.27)	214
6.3.2.9. Síntese do ácido 1-[4'-(3''-hidroxi-17''-oxoestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]but-2'-enil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacético (2.28)	214
6.3.2.10. Síntese do ácido 1-[4'-(3'',17β''-dihidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]but-2'-enil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacético (L2)	215
6.3.2.11. Síntese do ácido 1-[4'-(3'',17β''-dihidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]butil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacético (L3)	216
6.3.2.12. do ácido 1-[4'-(3'',17β''-dihidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]hexil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacético (L4)	217
6.3.2.13. Síntese do ácido 1-[3''-( <i>terc</i> -butildimetilsililoxi)-17β''-hidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]-N-[(but-e-enil)propanoil]amino]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-tetracético (2.32)	218
6.3.2.14. Síntese do ácido 1-[3'', 17β''-dihidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]-N-[(but-e-enil)propanoil]amino]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-tetracético (L5)	218
6.3.2.15. Síntese do ácido 1-[3''-( <i>terc</i> -butildimetilsililoxi)-17β''-hidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]-N-[(butil)propanoil]amino]-1,4,7,10-	219

tetraazaciclododecano-4,7,10-tetracético (2.33)	
6.3.2.16. Síntese do ácido 1-[3'', 17β''-dihidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]-N-[(butil)propanoil)amino]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-tetracético (L6)	220
6.3.2.17. Síntese do ácido 5-(benziloxi)-2-bromo-5-oxopentanóico (2.35)	220
6.3.2.18. Síntese do 5-(benziloxi)-2-bromopentanoato de <i>terc</i> -butilo (2.36)	221
6.3.2.19. Síntese do 5-benzil-2-[4,7-bis(2- <i>terc</i> -butoxi-2-oxoetil)]-1,4,7-triazaciclononano-1-il)pentacetato de <i>terc</i> -butilo (2.38)	221
6.3.2.20. Síntese do ácido 4-[(4',7'-di- <i>tert</i> -butoxi)-2-oxoetil]-1',4',7'-triazaciclononano-1'-il]-5-( <i>terc</i> -butoxi)-5-oxopentanóico (2.39)	222
6.3.2.21. Síntese do 1-[3''-( <i>terc</i> -butildimetilsilioxo)-17β''-hidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]-N-[(butil)propanoil)amino]-1,4,7-ciclodononano-1,4,7-triacetato de <i>terc</i> -butilo (2.40)	222
6.3.2.22. Síntese do ácido -1-[3'', 17β''-dihidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]-N-[(butil)propanoil)amino]-1,4,7-triazanociclononano-1,4,7-triacético (L7)	223
<b>6.3.3. Síntese e caracterização dos complexos de Índio e Gálio</b>	<b>224</b>
6.3.3.1. Síntese dos complexos de Índio	224
6.3.3.1.1. Síntese do complexo <b>InL1</b>	224
6.3.3.1.2. Síntese do complexo <b>InL2-InL4</b>	224
6.3.3.1.3. Síntese do complexo <b>InL5-InL6</b>	226
6.3.3.2. Síntese e caracterização dos complexos de Gálio.	227
6.3.3.1.1. Síntese do complexo <b>Gal2</b>	227
6.3.3.2.2. Síntese do complexo <b>Gal7</b>	228
<b>6.3.4. Síntese e Avaliação Biológica de uma Molécula Híbrida Estradiol/Alaranjado de Acridina</b>	<b>228</b>
6.3.4.1. Síntese do <i>N</i> -{4'-[3''-( <i>terc</i> -butildimetilsilioxo)-17''-oxoestra-1'',3'',5''(10'')-trien-16''α-il)but-2'-enil]}-3,6-bis(dimetilamino)acridina (3.6)	228
6.3.4.2. Síntese do <i>N</i> -{4'-[3'', 17''β-dihidroxiestra-1'',3'',5''(10'')-trien-16''α-il)but-2'-enil]}-3,6-bis(dimetilamino)acridina (3.8)	229
<b>6.3.5. Síntese e Caracterização Derivados 16α-Estradiol Conjugados a Sondas Fluorescentes</b>	<b>230</b>
6.3.5.1. Síntese do 4-(3',17'β-dihidroxiestra-1',3',5'(10')trien-16α-il)butamina (4.3)	230
6.3.5.2. Síntese do E2-bodipy-1 (4.3)	230

6.3.5.3. Síntese do E2-bodipy-2 (4.4)	231
6.3.5.4. Síntese do E2-Bodipy-DOTA-1 (4.6)	232
6.3.5.5. Síntese do E2-Bodipy-DOTA-2 (4.7)	233
<b>6.4. Determinação da afinidade de ligação aos receptores de estrogénio (RE<math>\alpha</math> e RE<math>\beta</math>)</b>	<b>233</b>
<b>6.5. Síntese, Caracterização e Avaliação Biológica dos Complexos Radioactivos</b>	<b>234</b>
6.5.1. Medição da actividade das soluções radioactivas	235
6.5.2. Procedimento geral para a síntese dos complexos de $^{111}\text{In}$	235
6.5.3. Procedimento geral para a síntese dos complexos de $^{67}\text{Ga}$	236
6.5.3.1. Conversão do citrato de $^{67}\text{Ga}$ a cloreto de $^{67}\text{Gálio}$ ( $^{67}\text{GaCl}_3$ )	236
6.5.3.2. Síntese dos complexos de $^{67}\text{Ga}$	236
6.5.4. Determinação da pureza radioquímica	236
6.5.5. Determinação da lipofilia dos complexos radioactivos	237
6.5.6. Ensaio de estabilidade <i>in vitro</i>	237
6.5.6.1. Estabilidade em PBS	238
6.5.6.2. Estabilidade em soro humano	238
6.5.6.3. Transquelatação para o DTPA	238
6.5.6.4. Transquelatação para a apo-transferrina	238
<b>6.6. Estudos em Células Tumorais</b>	<b>239</b>
6.6.1. Estudos de captação celular	240
6.6.2. Inibição da proliferação celular	241
6.6.3. Determinação de Captação Celular por Microscopia de Fluorescência Confocal com Células Vivas	241
<b>6.7. Estudos de Biodistribuição</b>	<b>242</b>
6.7.1. Biodistribuição em rato	243
6.7.2. Biodistribuição em ratinho	243
6.7.3. Ensaio de Estabilidade <i>in vivo</i>	244
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>245</b>



## Índice de Figuras

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.1.</b> Estrutura química de alguns SERMs (tamoxifeno, raloxifeno e toremifeno), inibidores de aromatase (exemestano, anastrozole e letrozole) e de antagonistas do receptor de estrogénio (Fulvestrant)	<b>16</b>
<b>Figura 1.2.</b> Estrutura química do estradiol ( <b>E2</b> ) e da estrona ( <b>E1</b> )	<b>19</b>
<b>Figura 1.3.</b> Representação da estrutura 3D dos receptores de estrogénio: RE $\alpha$ e RE	<b>20</b>
<b>Figura 1.4.</b> Representação esquemática da estrutura dos receptores de estrogénio: RE $\alpha$ e RE	<b>21</b>
<b>Figura 1.5.</b> Representação dos mecanismos de transcrição genómica e não genómica, mediados pelo RE	<b>23</b>
<b>Figura 1.6.</b> Principais modos de decaimento de um núcleo instável	<b>25</b>
<b>Figura 1.7.</b> Representação esquemática das técnicas de SPECT e PET	<b>25</b>
<b>Figura 1.8.</b> Modo de decaimento do $^{67}\text{Ga}$ por captura electrónica	<b>33</b>
<b>Figura 1.9.</b> Exemplo de um dos geradores de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ disponível comercialmente	<b>33</b>
<b>Figura 1.10.</b> Modo de decaimento do $^{111}\text{In}$ por captura electrónica	<b>34</b>
<b>Figura 1.11.</b> Representação esquemática de marcação de uma biomolécula com um radionuclídeo metálico, utilizando a aproximação bifuncional	<b>37</b>
<b>Figura 1.12.</b> Exemplos de reacções de conjugação entre biomoléculas e agentes quelantes bifuncionais através da formação de ligações amida ( <b>A;B;C</b> ), tioureia ( <b>D</b> ), tioéter ( <b>E</b> ) e reacção de cicloadição entre uma azida e um alcino (reacção “click”, <b>F</b> )	<b>39</b>
<b>Figura 1.13.</b> Estrutura do radiofármaco OctreoScan <sup>®</sup>	<b>40</b>
<b>Figura 1.14.</b> Estrutura química dos macrociclos ciclono e TACN e dos ligandos bifuncionais DTPA, DOTA e NOTA	<b>41</b>
<b>Figura 1.15.</b> Estrutura química dos ligandos bifuncionais anidrido de DTPA, p-NCS-Bz-DTPA, p-NCS-Bz-DOTA, DOTAGA, NODASA e NODAGA	<b>43</b>
<b>Figura 1.16.</b> Estrutura química do estradiol com as posições onde foram introduzidos substituintes	<b>44</b>
<b>Figura 1.17.</b> Estrutura química do 16 $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluorestradiol ([ $^{18}\text{F}$ ]-FES)	<b>44</b>
<b>Figura 1.18.</b> Estrutura química do cis-11 $\beta$ -metoxi-17 $\alpha$ -[ $^{123}\text{I}$ ] iodovinil estradiol (Z-MIVE)	<b>46</b>
<b>Figura 1.19.</b> Estruturas químicas do complexo estradiol-piridino-2-il hidrazino- $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ ( <b>1.1</b> ) <sup>262</sup> e de um complexo de Re/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (I) estabilizado por um ligando tridentado e funcionalizado com 16 $\alpha$ - estradiol ( <b>1.2</b> )	<b>47</b>
<b>Figura 1.20.</b> Estrutura química do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ funcionalizado com 17 $\alpha$ -etinil	<b>48</b>

*estradiol conjugado a um ligando do tipo pirazolo-diamina (1.3)*

<b>Figura 1.21.</b>	Estrutura química de um complexo de $^{177}\text{Lu}$ com um conjugado de estradiol-DOTA ( <b>1.4</b> )	<b>48</b>
<b>Figura 1.22.</b>	Exemplo de um sistema bimodal desenvolvido por Achilefu e colaboradores	<b>51</b>
<b>Figura 2.1.</b>	Representação da estrutura química dos compostos de estrona ( <b>1</b> ) e estradiol ( <b>2</b> ) funcionalizados na posição C16 com diferentes espaçadores	<b>55</b>
<b>Figura 2.2.</b>	Representação esquemática da conjugação do estradiol com diferentes quelantes bifuncionais ( <b>QB</b> ) (DTPA, DOTA, DOTAGA e NODAGA)	<b>56</b>
<b>Figura 2.3.</b>	Figura representativa de complexos de $^{111}\text{In}$ e/ou $^{67}\text{Ga}$ com derivados de estradiol funcionalizados na posição C16	<b>56</b>
<b>Figura 2.4.</b>	Representação das estruturas químicas dos derivados DTPA( $^t\text{Bu}$ ) <sub>4</sub> , DO <sub>3</sub> A $^t\text{Bu}$ <sub>3</sub> , anidrido de DOTAGA e NODAGA( $^t\text{Bu}$ ) <sub>3</sub>	<b>57</b>
<b>Figura 2.5.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do composto <b>2.3</b> e respectivas atribuições (*CDCl <sub>3</sub> )	<b>60</b>
<b>Figura 2.6.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do composto <b>2.9</b> e respectivas atribuições (*CDCl <sub>3</sub> )	<b>65</b>
<b>Figura 2.7.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do composto <b>2.15</b> e respectivas atribuições (*CDCl <sub>3</sub> )	<b>68</b>
<b>Figura 2.8.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do composto <b>2.18</b> e respectivas atribuições (*CDCl <sub>3</sub> )	<b>70</b>
<b>Figura 2.9.</b>	Espectro de ESI-MS do composto <b>2.19 (A)</b> e do composto <b>2.20 (B)</b> (modo positivo)	<b>73</b>
<b>Figura 2.10.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN de <b>L1</b> e respectivas atribuições (*CD <sub>3</sub> OD).	<b>77</b>
<b>Figura 2.11.</b>	Espectros de $^1\text{H}$ -RMN de <b>L2</b> e respectivas atribuições: ( <b>A</b> ) $^1\text{H}$ -RMN, ( <b>B</b> ) $^{13}\text{C}$ -RMN (*H <sub>2</sub> O(CD <sub>3</sub> OD); **CD <sub>3</sub> OD)	<b>80</b>
<b>Figura 2.12.</b>	Espectro de ESI-MS de <b>L3</b> (modo positivo)	<b>82</b>
<b>Figura 2.13.</b>	Espectros de RMN de <b>L4</b> e respectivas atribuições: ( <b>A</b> ) $^1\text{H}$ -RMN, ( <b>B</b> ) $^{13}\text{C}$ -RMN (*H <sub>2</sub> O(CD <sub>3</sub> OD); **CD <sub>3</sub> OD, § EtOH)	<b>84</b>
<b>Figura 2.14.</b>	Espectro de ESI-MS do composto <b>L5</b> (modo positivo).	<b>87</b>
<b>Figura 2.15.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>InL2</b> e respectivas atribuições. (*H <sub>2</sub> O(DMSO-d <sub>6</sub> ); **DMSO-d <sub>6</sub> )	<b>97</b>
<b>Figura 2.16.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>GaL2</b> e respectivas atribuições. (*H <sub>2</sub> O(DMSO-d <sub>6</sub> ); **DMSO-d <sub>6</sub> )	<b>97</b>
<b>Figura 2.17.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do complexo <b>InL1</b> e respectivas atribuições. (*DMSO-d <sub>6</sub> )	<b>98</b>
<b>Figura 2.18.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do complexo <b>InL2</b> e respectivas atribuições. (*DMSO-d <sub>6</sub> )	<b>98</b>
<b>Figura 2.19.</b>	Espectros de IV dos complexos <b>InL2</b> e <b>GaL2</b> e do ligando <b>L2</b> (KBr)	<b>100</b>
<b>Figura 2.20.</b>	Espectro de ( <b>A</b> ) ESI-MS do complexo <b>InL5</b> (modo negativo) e respectiva ( <b>B</b> ) distribuição isotópica	<b>103</b>

<b>Figura 2.21.</b>	Cromatograma de RP-HPLC dos complexos $^{111}\text{InL2}$ (detecção gama) e $\text{InL2}$ (detecção UV/Vis) (coluna: EC 254/4 10-100 C18; gradiente de 0,1% TFA/H <sub>2</sub> O e 0,1% TFA/CH <sub>3</sub> CN)	<b>107</b>
<b>Figura 2.22.</b>	Cromatograma de RP-HPLC dos complexos $^{111}\text{InL1}$ , $^{111}\text{InL3}$ - $^{111}\text{InL6}$ (detecção gama) (coluna: EC 254/4 10-100 C18; gradiente de 0,1% TFA/H <sub>2</sub> O e 0,1% TFA/CH <sub>3</sub> CN ( $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL3}$ e $^{111}\text{InL4}$ ) ou gradiente Et <sub>3</sub> N/CH <sub>3</sub> COOH (2,1:2,8) e CH <sub>3</sub> CN ( $^{111}\text{InL5}$ e $^{111}\text{InL6}$ ))	<b>108</b>
<b>Figura 2.23.</b>	Cromatogramas de RP-HPLC dos complexos $^{67}\text{GaL2}$ (detecção gama) e $\text{GaL2}$ (detecção UV/vis) (coluna: EC 254/4 10-100 C18; gradiente de 0,1% TFA/H <sub>2</sub> O e 0,1% TFA/CH <sub>3</sub> CN)	<b>111</b>
<b>Figura 2.24.</b>	Cromatograma de RP-HPLC do complexo $^{67}\text{GaL7}$ (detecção gama) (coluna: EC 254/4 10-100 C18; gradiente Et <sub>3</sub> N/CH <sub>3</sub> COOH (2,1:2,8) e CH <sub>3</sub> CN) e do $^{67}\text{GaCl}_3$	<b>111</b>
<b>Figura 2.25.</b>	Estabilidade dos complexos (B) $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ , (A) $^{67}\text{GaL2}$ e $^{67}\text{GaL7}$ em PBS (pH 7,4) após 1h, 3h, 24h e 120h de incubação a 37°C	<b>115</b>
<b>Figura 2.26.</b>	Estabilidade dos complexos (B) $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ , (A) $^{67}\text{GaL2}$ e $^{67}\text{GaL7}$ na presença de soro humano após 1h, 3h, 24h e 120h de incubação a 37°C.	<b>115</b>
<b>Figura 2.27.</b>	Radiocromatogramas obtidos por análise de RP-HPLC da mistura do complexo $^{111}\text{InL3}$ em soro humano às 1h, 3h e 24h de incubação	<b>116</b>
<b>Figura 2.28.</b>	Estabilidade dos complexos (B) $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ , (A) $^{67}\text{GaL2}$ e $^{67}\text{GaL7}$ na presença de um excesso molar de apo-transferrina após 1h, 3h, 24h e 120h de incubação a 37°C	<b>118</b>
<b>Figura 2.29.</b>	Estabilidade dos complexos $^{111}\text{InL2}$ - $^{111}\text{InL4}$ , $^{111}\text{InL5}$ e $^{111}\text{InL6}$ na presença de um excesso de DTPA após 1h, 3h, 24h e 120h de incubação a 37°C	<b>119</b>
<b>Figura 2.30.</b>	<i>Percentagem de <math>^3\text{H}</math>-estradiol ligado ao RE em função da variação do logaritmo da concentração de 17<math>\beta</math>-estradiol, L5 e L6 e respectivos valores de IC<sub>50</sub>. (A) RE<math>\alpha</math>, (B) RE<math>\beta</math></i>	<b>121</b>
<b>Figura 2.31.</b>	<i>Captação celular total dos complexos <math>^{111}\text{InL1}</math>-<math>^{111}\text{InL6}</math>, <math>^{67}\text{GaL2}</math> e <math>^{67}\text{GaL7}</math> nas células MCF-7, previamente tratadas ou não com 17<math>\beta</math>-estradiol (E2) em função do tempo de incubação, a 37°C, expressa em percentagem de actividade total adicionada por milhão de células</i>	<b>125</b>
<b>Figura 2.32.</b>	<i>Captação celular total dos complexos <math>^{111}\text{InL1}</math>-<math>^{111}\text{InL4}</math>, <math>^{111}\text{InL6}</math> e <math>^{67}\text{GaL7}</math> nas células MDA-MB-231, em função do tempo de incubação a 37 °C, expressa em percentagem de actividade total adicionada por milhão de células</i>	<b>127</b>
<b>Figura 2.33.</b>	<i>Biodistribuição do complexo <math>^{111}\text{InL5}</math>, em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média <math>\pm</math> desvio padrão; n=3)</i>	<b>130</b>
<b>Figura 2.34.</b>	<i>Biodistribuição do complexo <math>^{111}\text{InL6}</math>, em ratos fêmea imaturos da estirpe</i>	<b>131</b>

	<i>Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média ± desvio padrão; n=3)</i>	
<b>Figura 2.35.</b>	<i>Efeito da saturação de receptores estrogénicos por co-injecção de 17<math>\beta</math>-estradiol na fixação no útero e ovários dos complexos <sup>111</sup>InL5 e <sup>111</sup>InL6, em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, 2 h após administração (resultados expressos em % A.I./g; n=3)</i>	<b>132</b>
<b>Figura 2.36.</b>	<i>Razões de radioactividade útero/sangue, útero/ músculo, útero/fígado (A) e ovários/sangue, ovários/ músculo, ovários/fígado (B), em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, 1 e 2 h após administração dos complexos <sup>111</sup>InL5 e <sup>111</sup>InL6 (n=3)</i>	<b>133</b>
<b>Figura 2.37.</b>	<i>Biodistribuição do complexo <sup>67</sup>GaL2, em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média ± desvio padrão; n=3.</i>	<b>134</b>
<b>Figura 2.38.</b>	<i>Biodistribuição do complexo <sup>67</sup>GaL7, em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média ± desvio padrão; n=3)</i>	<b>135</b>
<b>Figura 2.39.</b>	<i>Efeito da saturação de receptores estrogénicos por co-injecção de 17<math>\beta</math>-estradiol na fixação no útero e ovários dos complexos <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7, em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, 2 h após administração (resultados expressos em % A.I./g; n=3).</i>	<b>136</b>
<b>Figura 2.40.</b>	<i>Razões de radioactividade útero/sangue, útero/ músculo, útero/fígado e ovários/sangue, ovários/ músculo, ovários/fígado, em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, 1 e 2 h após administração do complexo <sup>67</sup>GaL7 (n=3)</i>	<b>137</b>
<b>Figura 2.41.</b>	<i>Radiocromatogramas obtidos por análise em RP-HPLC de amostras de soro de rato e de urina recolhidas 2h após administração de <sup>111</sup>InL5 (A) ou <sup>67</sup>GaL7 (B). (coluna: EC 254/4 10-100 C18; gradiente Et<sub>3</sub>N/CH<sub>3</sub>COOH (2,1:2,8) e CH<sub>3</sub>CN</i>	<b>138</b>
<b>Figura 2.42.</b>	<i>Biodistribuição do complexo <sup>111</sup>InL1, em ratinhos fêmea da estirpe CD1, expressos em % A.I./g (média ± desvio padrão; n=3).</i>	<b>139</b>
<b>Figura 2.43.</b>	<i>Biodistribuição do complexo <sup>111</sup>InL2, em ratinhos fêmea da estirpe CD1, expressos em % A.I./g (média ± desvio padrão; n=3).</i>	<b>140</b>
<b>Figura 3.1.</b>	<i>Compostos híbridos derivados do estradiol com efeito quimioterapêuticos: estrona-daunorrubicina (3.1), estradiol-daunorrubicina (3.2) e estradiol-taxol (3.3)</i>	<b>146</b>
<b>Figura 3.2.</b>	<i>Composto híbrido 11<math>\beta</math>-aryl-estradiol-doxorrubicina (3.4)</i>	<b>148</b>
<b>Figura 3.3.</b>	<i>Estrutura do alaranjado da acridina (3.5)</i>	<b>149</b>
<b>Figura 3.4.</b>	<i>Conjugado estradiol/alaranjado da acridina</i>	<b>150</b>
<b>Figura 3.5.</b>	<i>Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do conjugado híbrido estradiol-AO 3.8</i>	<b>152</b>

<b>Figura 3.6.</b>	<i>Representação gráfica do <sup>3</sup>H-estradiol ligado ao RE (%) em função da variação do logaritmo da concentração do conjugado híbrido <b>3.8</b> no RE<math>\alpha</math> (A) e RE<math>\beta</math> (B)</i>	<b>154</b>
<b>Figura 3.7.</b>	<i>Viabilidade das células MCF-7 na presença de diferentes concentrações dos compostos 17<math>\beta</math>-estradiol (<b>E<sub>2</sub></b>) e <b>3.8</b>, após 72h de incubação a 37°C. Os resultados expressos em % de células viáveis em função do log C (mol/dm<sup>3</sup>)</i>	<b>157</b>
<b>Figura 3.8.</b>	<i>Imagens obtidas por microscopia de fluorescência confocal de células MCF-7 ao longo de 10 min tratadas com uma solução de composto <b>3.8</b> 100 <math>\mu</math>M (verde) ou com uma solução de dihidroetideo (vermelho)</i>	<b>157</b>
<b>Figura 3.9.</b>	<i>Imagens obtidas por microscopia de fluorescência confocal de células MCF-7 após 1h de exposição com uma solução 100 <math>\mu</math>M de composto <b>3.8</b> (verde) seguida de fixação com DAPI (azul). A seta branca indica o núcleo</i>	<b>158</b>
<b>Figura 4.1.</b>	<i>Fluoróforos orgânicos mais comuns</i>	<b>164</b>
<b>Figura 4.2.</b>	<i>Estrutura química base dos derivados BODIPY com as posições onde têm sido introduzidos substituintes</i>	<b>165</b>
<b>Figura 4.3.</b>	<i>Derivados 7<math>\alpha</math>-estradiol-BODIPY sintetizados por French (<b>4.1</b>) e Okonato (<b>4.2</b>)</i>	<b>166</b>
<b>Figura 4.4.</b>	<i>Representação esquemática de um composto bimodal derivado do estradiol contendo uma sonda fluorescente e uma unidade quelante para complexação com diferentes radionuclídeos</i>	<b>166</b>
<b>Figura 4.5.</b>	<i>Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (com inserção do espectro de <sup>11</sup>B) do composto <b>4.4</b></i>	<b>169</b>
<b>Figura 4.6.</b>	<i>Espectros de absorção e de emissão dos composto <b>4.3</b> (A) e <b>4.4</b> (B).</i>	<b>171</b>
<b>Figura 4.7.</b>	<i>Controlo da reacção de conjugação do composto <b>4.1</b> ao composto <b>NCS-Bodipy-DOTA</b> para síntese do composto <b>4.7</b>, por RP-HPLC. Cromatogramas do composto NCS-Bodipy-DOTA (<math>\lambda</math>=530 nm), da mistura reaccional após 1h de reacção (<math>\lambda</math>=220 nm), mistura reaccional após 18h de reacção(<math>\lambda</math>=530 nm) e co-injecção da mistura reaccional às 18h + NCS-Bodipy-DOTA (<math>\lambda</math>=530 nm).</i>	<b>174</b>
<b>Figura 4.8.</b>	<i>Espectro de massa (ESI-MS), no modo negativo, correspondente à análise da mistura reaccional da síntese do composto <b>4.6</b>.</i>	<b>175</b>
<b>Figura 4.9.</b>	<i>Viabilidade das células MCF-7 na presença de concentrações crescentes dos compostos <b>4.3</b> e <b>4.4</b>, após 72h de incubação a 37°C. Os resultados foram expressos em % de células viáveis em função do log C (mol/dm<sup>3</sup>).</i>	<b>176</b>
<b>Figura 4.10.</b>	<i>Imagens de células MCF-7 obtidas por microscopia de fluorescência confocal dos compostos <b>4.3</b> e <b>4.4</b> (fluorescência verde) e da sonda Hoechst 33342 (fluorescência azul), ao longo do tempo. A seta A indica o citoplasma e a seta B o núcleo da célula</i>	<b>178</b>
<b>Figura 6.1.</b>	<i>Estrutura química da molécula do estradiol e respectiva numeração</i>	<b>199</b>



## Índice de Esquemas

---

		Página
<b>Esquema 2.1.</b>	Esquema reaccional da síntese do derivado bromado <b>2.3</b>	<b>58</b>
<b>Esquema 2.2.</b>	Esquema reaccional da síntese do composto ( <b>2.9</b> )	<b>62</b>
<b>Esquema 2.3.</b>	Representação esquemática da síntese do composto ( <b>2.15</b> )	<b>66</b>
<b>Esquema 2.4.</b>	Esquema reaccional da síntese dos derivados de estradiol <b>2.17</b> e <b>2.18.</b>	<b>69</b>
<b>Esquema 2.5.</b>	Estratégias de síntese do conjugado estradiol-DTPA ( <b>b</b> )	<b>72</b>
<b>Esquema 2.6.</b>	Esquema reaccional da síntese do derivado DTPA( <sup>t</sup> Bu) <sub>4</sub> ( <b>2.24</b> )	<b>74</b>
<b>Esquema 2.7.</b>	Síntese do composto <b>L1</b>	<b>76</b>
<b>Esquema 2.8.</b>	Síntese do composto <b>L2</b>	<b>78</b>
<b>Esquema 2.9.</b>	Síntese do composto <b>L3</b>	<b>81</b>
<b>Esquema 2.10.</b>	Síntese do composto <b>L4</b>	<b>83</b>
<b>Esquema 2.11.</b>	Síntese dos conjugados <b>L5</b> e <b>L6</b>	<b>86</b>
<b>Esquema 2.12.</b>	Síntese do pró-quelante NODAGA( <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub> ( <b>2.39</b> )	<b>89</b>
<b>Esquema 2.13.</b>	Síntese do conjugado <b>L7</b>	<b>91</b>
<b>Esquema 3.1.</b>	Síntese do derivado estradiol-AO ( <b>3.8</b> )	<b>151</b>
<b>Esquema 4.1.</b>	Síntese dos derivados estradiol/BODIPY <b>4.3</b> e <b>4.4</b>	<b>168</b>
<b>Esquema 4.2.</b>	Estratégia de síntese dos derivados estradiol-DOTA-BODIPY <b>4.6</b> e <b>4.7</b>	<b>173</b>



## Índice de Tabelas

---

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.1.</b> Incidência do cancro da mama a nível mundial em 2012	<b>7</b>
<b>Tabela 1.2.</b> Classificação dos carcinomas da mama	<b>9</b>
<b>Tabela 1.3.</b> Radionuclídeos emissores $\gamma$ para SPECT e respectivas propriedades físicas	<b>26</b>
<b>Tabela 1.4.</b> Radionuclídeos emissores $\beta^+$ para PET e respectivas propriedades físicas	<b>27</b>
<b>Tabela 1.5.</b> Propriedades físico-químicas dos radioisótopos de Ga e In mais utilizados em medicina nuclear	<b>32</b>
<b>Tabela 1.6.</b> Modalidades de diagnóstico	<b>49</b>
<b>Tabela 2.1.</b> Condições experimentais utilizadas na síntese dos complexos de In estabilizados por <b>L1-L6</b> e respectivos rendimentos de reacção	<b>94</b>
<b>Tabela 2.2.</b> Condições experimentais utilizadas na síntese dos complexos de Ga estabilizados por <b>L2</b> e <b>L7</b> , e respectivos rendimentos de reacção	<b>95</b>
<b>Tabela 2.3.</b> Caracterização dos complexos <b>InL1-InL6</b> e <b>GaL2</b> por espectroscopia de IV	<b>101</b>
<b>Tabela 2.4.</b> Caracterização dos complexos de <b>InL1-InL6</b> , <b>GaL1</b> e <b>GaL7</b> por ESI-MS	<b>102</b>
<b>Tabela 2.5.</b> Condições experimentais estudadas na optimização da síntese dos complexos $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$	<b>106</b>
<b>Tabela 2.6.</b> Condições experimentais de síntese dos complexos $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$	<b>107</b>
<b>Tabela 2.7.</b> Condições experimentais estudadas na optimização da síntese dos complexos $^{67}\text{GaL2}$ e $^{67}\text{GaL7}$	<b>110</b>
<b>Tabela 2.8.</b> Coeficientes de Partição ( $\log D_{o/a}$ ) dos diferentes complexos, determinados a pH fisiológico	<b>112</b>
<b>Tabela 2.9.</b> Radioactividade associada às proteínas do soro humano após 1h, 3h e 24h de incubação a 37°C com os complexos de $^{111}\text{In}$ e $^{67}\text{Ga}$	<b>117</b>
<b>Tabela 2.10.</b> Valores de RBA, expressos em %, dos compostos <b>L1-L7</b> e dos complexos <b>InL5</b> e <b>InL6</b> para o RE $\alpha$ e RE $\beta$ , em comparação com o 17 $\beta$ -estradiol	<b>122</b>
<b>Tabela 2.11.</b> Percentagem de captação celular, normalizada para milhão de células, dos complexos $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ , $^{67}\text{GaL1}$ e $^{67}\text{GaL7}$ após 4h de incubação nas linhas celulares MFC-7 (RE+) e MDA-MB-231 (RE-)	<b>128</b>
<b>Tabela 2.12.</b> Resultados de biodistribuição e excreção total dos complexos $^{111}\text{InL5}$ e $^{111}\text{InL6}$ , em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média $\pm$ desvio padrão; n=3)	<b>130</b>
<b>Tabela 2.13.</b> Resultados de biodistribuição e excreção total dos complexos $^{67}\text{GaL2}$ e $^{67}\text{GaL7}$ em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em %	<b>134</b>

	A.I./g (média ± desvio padrão; n=3)	
<b>Tabela 2.14.</b>	Resultados de biodistribuição e excreção total dos complexos <sup>111</sup> InL1 e <sup>111</sup> InL2 em ratinhos fêmea da estirpe CD-1, expressos em % A.I./g (média ± desvio padrão; n=3)	<b>139</b>
<b>Tabela 3.1.</b>	Valores de RBA, expressos em %, determinados para o composto <b>3.8</b> , em comparação com o 17β-estradiol para os receptores REα e REβ	<b>154</b>

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

---

### A

**ADN**- Ácido DesoxorriboNucleico

**AO**- Alaranjado da Acridina

**AI**- Actividade Injectada

**ARN**-Ácido Ribonucleico

### B

**BODIPY**- 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a,-diazas-idaceno

**BRCA1**- do inglês *Breast Cancer1*

**n-BuLi**- n-butilítio

### D

**DMEM**- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMF**- di-metil formaldeído

**DMSO**- Dimetilsulfóxido

**DO<sub>3</sub>A<sup>t</sup>Bu<sub>3</sub>**- tri-*terc*-butil 2,2',2''-(1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato

**DOTA**- ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-1,4,7,10-tetraacético

**DOTAGA**-ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-1-glutárico-4,7,10-triacético

**DTPA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>**- *terc*-butil 2,2',2'',2'''-(2,2'-azanediil)di(ethano-2,1-diil)di(azanetriil))tetraacetato

**DTPA**- ácido dietilenotriaminopentacético

### E

**E1**- Estrona

**E2**- Estradiol

**EGFR**- do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*- receptor do fator de crescimento epidérmico)

**EMA**- do inglês *European Medicines Agency*

**ESI-MS**- do inglês *Electrospray Ionization-Mass Spectroscopy*-espectrometria de massa por ionização por electrospray

**Et<sub>3</sub>N**- trietilamina

### F

**FBS**- do inglês *Fetal Bovine Serum*- soro bovino fetal

**FDA**- do inglês *Food and Drug Administration*

**FES**- fluoroestradiol

## G

**GP1R**- do inglês *G-protein Coupled Estrogen Receptor1*

## H

**HAP**- Hidroxiapatite

**HPLC**- do inglês *High Performance Liquid Chromatography*- Cromatografia Líquida de Alta Pressão-

**HER2**- do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

## I

**IA**- Inibidores da aromatase

**IC<sub>50</sub>**- concentração para inibir em 50% a actividade máxima de determinado composto

**IV**- InfraVermelho

## J

**J**- constante de acoplamento (HZ) entre dois núcleos

## L

**LDA**- diisopropilamida de lítio

**Log P<sub>O/A</sub>**-Logaritmo do coeficiente de partição P no sistema bifásico octanol-água

## M

**MeOH**- metanol

**MTT**- brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

## N

**NODAGA**- ácido 1,4,7-triazociclododecano-1-glutárico-4,7-triacético

**NODASA**- ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1-succínico-4,7-diacético

**NOPO**- ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1-[metil(2-carboxietil)fosfínico]-4,7-bis[metil(2-carboxietil)fosfínico]

**NOTA**- ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1,4-7-triacético

## P

**PBS**- Tampão fosfato em solução salina

**PET**- do inglês *Positron Emission Tomography*- Tomografia por Emissão de Positrões

**XXX**

## Q

**QB-** Quelato Bifuncional

## R

**RBA-** do inglês *Relative Binding Affinity*

**RE-** Receptores de Estrogénio

**RMN-** Ressonância Magnética Nuclear

**RP-** Receptores de Progesterona

## S

**SPECT-** do inglês *Single Photon Emission Computer Tomography*- Tomografia por Emissão de Fóton Único Computadorizada

## T

**t.a.-** temperatura ambiente

**TACN-** triazacicloalcano

**TBAF-** fluoreto de tetrabutílamónio

**TBDMSCI-** cloreto de *terc*-butildimetilsilano

**tBu-** *terc*-butilo

**THF-** TetraHidroFurano

**TFA-** ácido trifluoroacético

**TFP-** tetrafluorofenil

**T<sub>R</sub>-** Tempo de Retenção

**TRIS-** tris(hidroximetil)aminometano

**TRAP-** ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1,4,7-tris [metil(2-carboxietil) fosfínico]

## U

**UV-Vis-** Ultravioleta-Vísivel

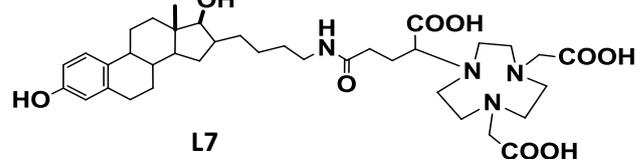
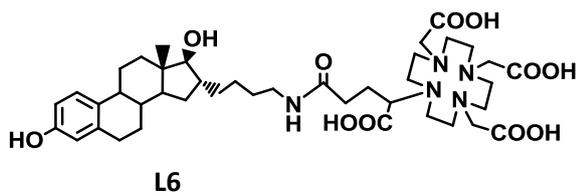
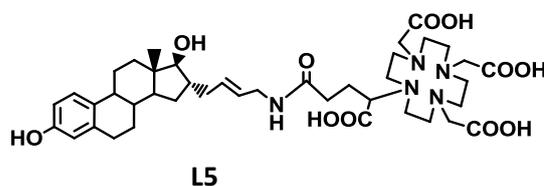
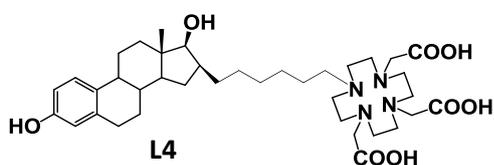
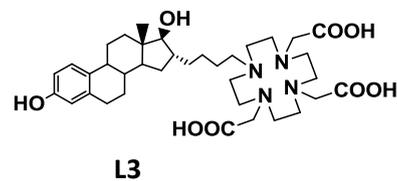
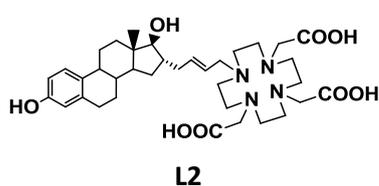
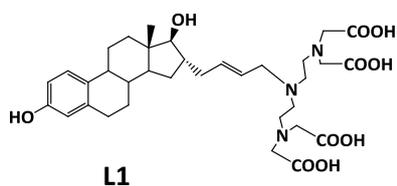
**Φ-** Rendimento quântico



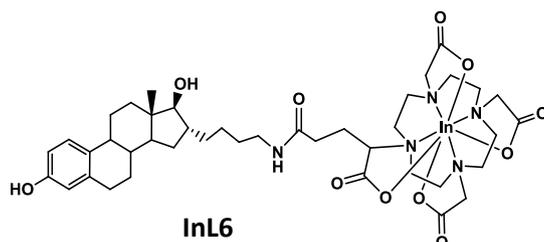
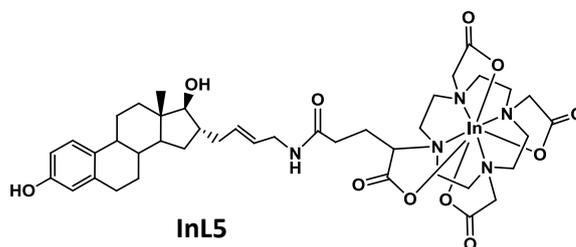
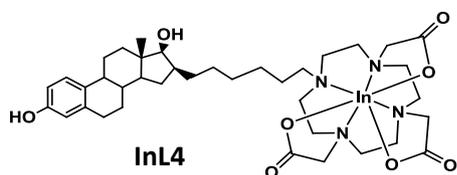
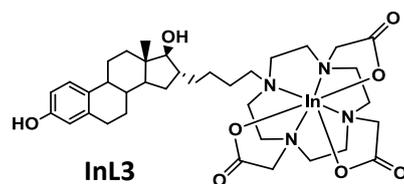
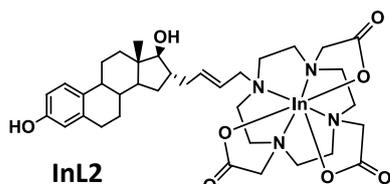
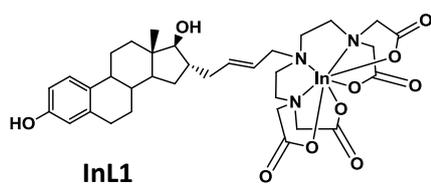
# Ligandos, Complexos e Compostos Sintetizados

## CAPÍTULO 2

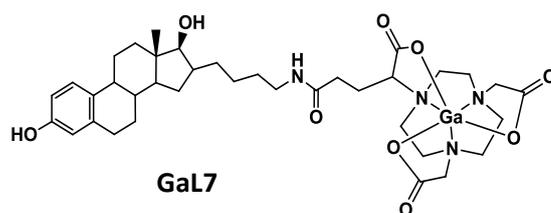
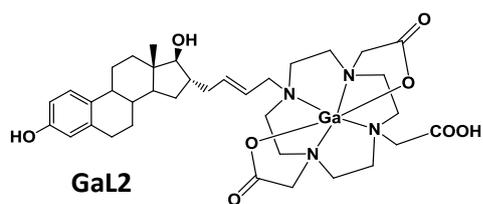
### Ligandos



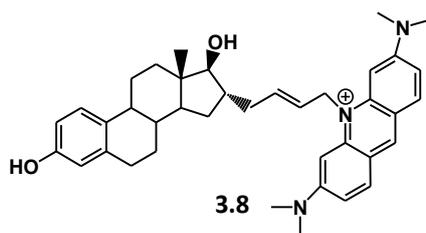
### Complexos de In



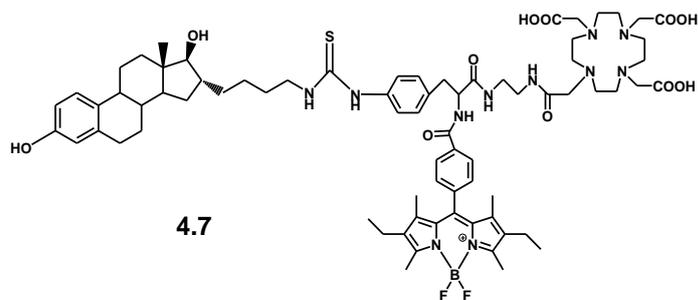
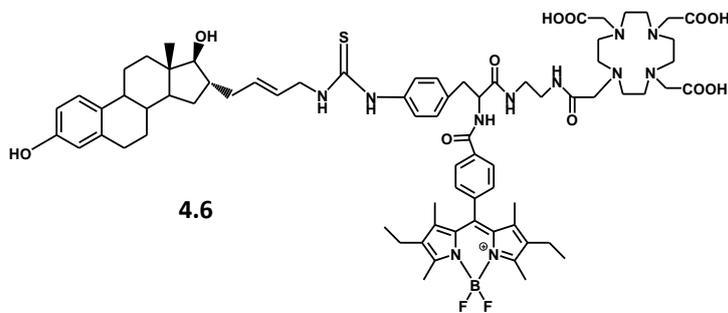
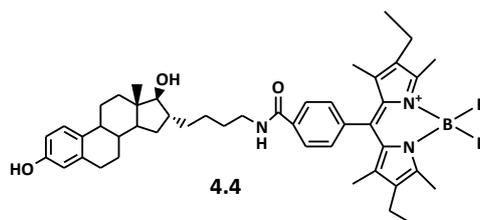
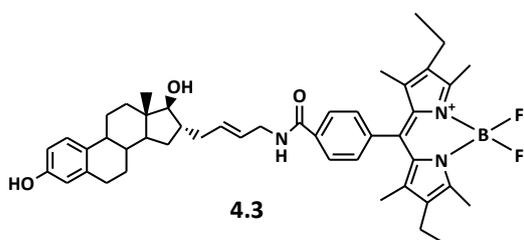
## Complexos de Ga



## Capítulo 3



## Capítulo 4



## Âmbito e Objectivos do Trabalho

---

O cancro da mama é o cancro com maior incidência no sexo feminino no mundo ocidental. A taxa de mortalidade global tem diminuído consideravelmente nos últimos anos, contudo ainda é muito elevada na faixa etária entre os 20 e os 59 anos. Por outro lado, 20 a 30% das doentes desenvolvem metástases após tratamento sendo o cancro da mama metastizado incurável. Neste contexto, o desenvolvimento de novas moléculas com especificidade biológica para alvos moleculares associados a estes tumores poderá contribuir para o diagnóstico precoce, o prognóstico, a monitorização da eficácia terapêutica e a selecção do tratamento mais adequado e individualizado das doentes com cancro da mama.

O trabalho apresentado nesta tese insere-se no âmbito do desenvolvimento de novas moléculas dirigidas a biomarcadores de cancro da mama, com reconhecida relevância clínica, para imagiologia molecular e/ou terapia sistémica deste cancro.

O objectivo principal do trabalho proposto para esta tese consistiu no desenvolvimento de novas moléculas da família do estradiol com afinidade para os receptores de estrogénio, na perspectiva da avaliação da sua potencial aplicação clínica no diagnóstico e/ou terapia dirigida de tumores da mama estrogénio-dependentes.

Nesse sentido, foi explorada uma nova estratégia que tira partido da elevada afinidade da molécula do estradiol para os receptores de estrogénio e da sua capacidade de atravessar passivamente a membrana celular para o transporte específico de radionuclídeos, unidades intercaladoras de ADN ou sondas fluorescentes para o interior de células de carcinoma da mama. Tendo em consideração que o radionuclídeo  $^{111}\text{In}$  é simultaneamente emissor de radiação gama e de electrões Auger, estabeleceu-se como um dos objectivos principais contribuir para a avaliação do potencial terapêutico de complexos de  $^{111}\text{In}$  com moléculas derivadas do estradiol.

Para a concretização desse objectivo, o trabalho realizado incluiu numa primeira fase a síntese, caracterização e avaliação do comportamento biológico *in vitro* e *in vivo* de complexos de  $^{111}\text{In}$  ou de  $^{67}\text{Ga}$  com derivados da molécula do estradiol. Para a estabilização dos radiometais utilizaram-se ligandos bifuncionais do tipo poliaminocarboxilatos lineares (DTPA) e cíclicos (DOTA, DOTAGA e NOTA). Para a sua conjugação ao estradiol foi seleccionada a posição C16 do anel esteróide com base na reconhecida tolerância do receptor a modificações estruturais nesta posição. Perspectivando o desenvolvimento de radiofármacos para

diagnóstico de cancro da mama e principalmente com valor preditivo na resposta individual de cada doente ao tratamento antecipava-se a obtenção de complexos com afinidade para o receptor de estrogénio. Por outro lado, este trabalho teve também o propósito de avaliar o potencial destes complexos para terapia dirigida a tumores com positividade para receptores de estrogénio uma vez que estes radionuclídeos são emissores de electrões Auger.

O trabalho incluiu também a síntese e caracterização de uma molécula híbrida de estradiol, funcionalizada na posição C16 com uma unidade intercaladora de ADN, o alaranjado de acridina, e a sua avaliação biológica através de ensaios de afinidade de ligação ao receptor de estrogénio e da determinação da viabilidade celular, captação e localização subcelular em linhas celulares de cancro da mama. Este estudo teve por objectivo a avaliação do híbrido estradiol/alaranjado de acridina para terapia selectiva de tumores da mama estrogénio-dependentes.

Por fim, foi sintetizada uma nova família de compostos derivados de estradiol funcionalizado na posição C16 com uma sonda fluorescente, um derivado BODIPY, com o objectivo final de preparar uma sonda bimodal que incorporasse simultaneamente a biomolécula, a sonda fluorescente e uma unidade quelante. Pretendia-se avaliar a capacidade dessas sondas para detecção simultânea por SPECT e imagiologia óptica de tumores que expressem o receptor estrogénico.

Esta dissertação está organizada em seis capítulos, sendo o primeiro uma introdução geral seguida de três capítulos de trabalho experimental, um capítulo de conclusões finais e um capítulo final contendo todos os procedimentos experimentais.

No primeiro capítulo é feita uma breve introdução sobre o cancro da mama e o estado da arte relativamente às metodologias de diagnóstico e terapia nesta patologia. Particular destaque é dado à contribuição da medicina nuclear e à utilização de moléculas da família de estradiol.

O segundo capítulo refere-se à síntese, caracterização e avaliação biológica dos novos derivados de estradiol conjugados a diferentes agentes quelantes bifuncionais e dos respectivos complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$ .

No terceiro capítulo descreve-se a síntese e avaliação biológica de uma molécula híbrida estradiol/alaranjado de acridina.

O quarto capítulo é dedicado à síntese e avaliação de uma nova classe de compostos derivados de estradiol contendo uma sonda fluorescente derivada do BODIPY.

No quinto capítulo, são apresentadas as conclusões finais e as perspectivas de trabalho futuro para completar e continuar os estudos já desenvolvidos.

Por fim, no último capítulo, descrevem-se os materiais e os protocolos utilizados no decurso de todo o trabalho experimental desenvolvido. A bibliografia encontra-se referenciada no final da tese.



# ***Capítulo 1***

*Introdução*



# 1. Introdução

---

## 1.1. Cancro da Mama

As doenças oncológicas constituem uma das principais causas de morte em todo o mundo, só ultrapassadas pelas doenças cardiovasculares.<sup>1</sup> Em 2012, foram diagnosticados 14 milhões de novos casos de cancro e registaram-se 8,2 milhões de mortes por doença oncológica. Prevê-se que nas próximas duas décadas o número de novos casos aumente para 22 milhões.<sup>1</sup> Os cancros do pulmão, da mama na mulher, do colón e recto e do estômago representam cerca de 40% de todos os casos diagnosticados.<sup>2</sup> Na mulher o cancro da mama é a doença do foro oncológico mais comum. Na **tabela 1.1.** são apresentados os dados da incidência e mortalidade por cancro da mama a nível mundial no ano de 2012.

**Tabela 1.1.** Incidência do cancro da mama a nível mundial em 2012.<sup>3</sup>

<b>Números estimados (milhares)</b>	<b>Novos Casos</b>	<b>Mortalidade</b>	<b>Prevalência a 5 anos</b>
Mundo	1677	522	6255
Regiões mais desenvolvidas	794	198	3224
Regiões menos desenvolvidas	883	324	3032
África	100	49	318
América	408	92	1618
Região do Mediterrâneo Este	99	42	348
Europa (excepto UE)	500	143	1960
Região do Sudeste Asiático	240	110	735
Região Pacífica Ocidental	330	86	1276
Membros do IARC (24 países)	940	257	3614
EUA	233	44	971
China	187	48	697
India	145	70	397
União Europeia (UE-28)	367	92	1467

O cancro da mama constitui a segunda causa de morte no sexo feminino a seguir ao cancro do pulmão, a nível mundial. No entanto, na faixa etária entre os 20 e os 59 anos é a principal causa de morte por cancro. Por outro lado, na Europa este cancro constitui a principal causa de mortalidade feminina do foro oncológico. Em Portugal, surgem todos os anos cerca

de 4500 novos casos e morrem, aproximadamente, 1500 mulheres vitimadas por esta doença.<sup>4-6</sup> Apesar do aumento verificado na sua incidência, a taxa de mortalidade global tem diminuído nos últimos anos principalmente em consequência do maior número de casos diagnosticados precocemente e da maior eficácia dos tratamentos adoptados, dos quais se destacam as terapias adjuvantes por via sistémica.<sup>6</sup> No caso do diagnóstico em estadios iniciais da doença a taxa de cura é muito elevada podendo ocorrer em 70% das doentes. Contudo o prognóstico em caso de recidiva não é favorável e o cancro da mama metastático não é curável.<sup>7, 8</sup> Neste contexto é importante definir uma estratégia terapêutica que garanta a cada doente um tratamento mais adequado evitando os efeitos secundários e a morbilidade, frequentemente associados aos fármacos antitumorais. Assim, para além da caracterização histológica clássica do cancro da mama é importante a determinação de biomarcadores tumorais, a nível celular e molecular, que permitam identificar o risco e/ou vantagem do tratamento adjuvante para cada doente. Deste modo será também possível seleccionar a melhor opção terapêutica.<sup>9, 10</sup>

O cancro da mama é uma doença heterogénea do ponto de vista molecular. Existem diversos subtipos que apresentam perfil molecular e comportamento biológico diferentes. Consequentemente a avaliação de marcadores de prognóstico e preditivos de resposta ao tratamento, associados a cada tumor, é essencial para assegurar a eficácia terapêutica personalizada, sem efeitos adversos. A caracterização celular, molecular e genética dos tumores conduziu à identificação de vários biomarcadores com valor prognóstico e preditivo de resposta a tratamento. Contudo para a caracterização dos carcinomas da mama e definição da opção terapêutica apenas três biomarcadores são utilizados de modo sistemático, designadamente os receptores de estrogénios (RE), de progesterona (RP) e do factor epidérmico humano 2 (HER-2). Os tumores que expressam os marcadores hormonais RE e/ou RP têm indicação para terapêutica endócrina e possuem menor taxa de resposta clínica após quimioterapia. A expressão tumoral de HER-2 é preditiva de resposta a terapia adjuvante com o anticorpo monoclonal anti-HER-2 trastuzumab ou com inibidores da tirosinacina, como por exemplo o lapatinib. Estes biomarcadores também têm sido considerados como alvos potenciais para a imagiologia molecular *in vivo* dos tumores.<sup>11</sup> Mais recentemente a proteína Ki67 foi identificada como biomarcador da proliferação celular. A expressão tumoral de Ki67 tem valor preditivo na resposta a quimioterapia e a quimioterapia adjuvante, especialmente quando determinada durante ou após tratamento.<sup>12</sup>

Na última década a análise da expressão genética das células de cancro da mama permitiu a sua classificação em subtipos moleculares intrínsecos que se relacionam directamente com os três biomarcadores anteriormente referidos. Assim os carcinomas da mama invasivos podem ser agrupados em três grandes grupos que dependem, predominantemente, da expressão do RE<sup>13, 14</sup>:

- 1) tumores do tipo luminal (RE positivos);
- 2) tumores que sobre-expressam HER-2 (RE negativos e HER-2 positivos);
- 3) tumores do tipo basal (RE negativos, RP negativos e HER-2 negativos).

Os tumores do tipo luminal apresentam características de células luminais, expressam citoqueratinas e factores de transcrição que incluem o RE e estão associados a um prognóstico favorável. O subtipo que sobreexpressa HER-2 não expressa receptores hormonais e apresenta pior prognóstico. Os tumores com diferenciação basal caracterizam-se pela ausência de HER-2 e de receptores hormonais e pela expressão de características das células basais/mioepiteliais. Este subtipo de carcinomas apresenta elevada agressividade e uma reduzida taxa de resposta às terapias convencionais. Esta classificação (**tabela 1.2**) tem por base a assinatura molecular obtida por técnica de *microarray*, no entanto a validação do seu valor preditivo requer confirmação por análise de séries de carcinomas.

**Tabela 1.2.-** Classificação dos carcinomas da mama. (Adaptado de <sup>14</sup>)

Subtipos Moleculares	Frequência	Expressão de RE/RP/HER-2	Expressão de genes de proliferação	Prognóstico
<b>Basal</b>	10-20%	RE (-), RP (-), HER-2(-)	Elevada	Mau
<b>Sobreexpressão de HER-2</b>	10-15%	RE(-), RP(-), HER-2(+)	Elevada	Mau
<b>Normal Breast Like</b>	5-10%	RE(-/+), HER-2(-)	Baixa	Intermédio
<b>Luminal A</b>	50-60%	RE(+), RP (+), HER-2(-)	Baixa	Excelente
<b>Luminal B</b>	10-20%	RE(+/-), RP(+/-), HER-2 (-/+)	Elevada	Intermédio/Mau
<b>Claudin-low</b>	12-14%	RE(-), RP(-), HER-2(-)	Elevada	Mau

Actualmente existem duas assinaturas genómicas, o Oncotype Dx, desenvolvido para prever o risco de recidiva e o Mammaprint, de 70 genes, que classifica os tumores de acordo com o seu prognóstico. Decorrem estudos com estes perfis genéticos para validar o seu valor preditivo na resposta terapêutica e no prognóstico de cada tumor. Assim é expectável que futuramente seja possível identificar as doentes que beneficiam com a quimioterapia.<sup>12</sup>

### 1.1.1. Diagnóstico e estadiamento do cancro da mama

O diagnóstico e decisão terapêutica no cancro da mama requerem uma abordagem multidisciplinar que envolve especialistas em ginecologia, oncologia, imagiologia, patologia, radioterapia. A detecção pode ser efectuada através de exames imagiológicos de rastreio ou de profilaxia. O principal meio de diagnóstico de rastreio do cancro da mama é a mamografia anual, a partir dos 40 anos, ou 35 no caso de antecedentes familiares. No entanto o exame físico também é muito importante uma vez que cerca de 11% dos tumores não são detectados por mamografia.<sup>15</sup>

As modalidades imagiológicas de diagnóstico mais comuns são:

**Mamografia-** Constitui o método de eleição para diagnóstico em mulheres sem mama densa. Após a menopausa é a melhor forma de detectar lesões não palpáveis. Cerca de 90% dos novos casos de cancro da mama são diagnosticados através de mamografia ou, em última instância, através de ressonância magnética.<sup>1</sup>

**Ecografia-** É o método mais eficaz para diagnosticar pequenos tumores em mulheres com mama densa e para diferenciar nódulos de lesões quísticas. É o exame de primeira linha em mulheres jovens contribuindo para a detecção de algumas neoplasias. Noutras faixas etárias concorre com a mamografia para o diagnóstico precoce devendo ser feita em paralelo com a mamografia.

**Ressonância magnética-** Método mais sensível na detecção do cancro da mama, contribui para o diagnóstico de doentes de alto risco e com carcinoma oculto em que existe adenopatia axilar metastática não detectado na mamografia ou na ecografia. É também utilizada para avaliar a resposta a quimioterapia neoadjuvante. Esta modalidade apresenta muitos falsos positivos e por isso não pode ser a única indicação para cirurgia.

Estas técnicas constituem o principal meio de detecção do cancro da mama. São métodos não invasivos mas que dão informação essencialmente sobre alterações morfológicas

que podem ser ou não suspeitas de malignidade. Em caso de malignidade, antes de qualquer decisão terapêutica é necessário um diagnóstico histológico, com recurso a biópsia da lesão mamária, para confirmação do carcinoma. Assim sendo, as técnicas de imagiologia molecular que dão informação funcional são fundamentais para diagnosticar o cancro da mama de modo não invasivo.

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica que utiliza técnicas nucleares de imagem que combinam uma elevada sensibilidade, conferida pela presença de radionuclídeos, e uma elevada especificidade quando utiliza moléculas biologicamente activas para vectorizar o radionuclídeo para alvos específicos a nível celular e molecular. Deste modo possibilita a caracterização precoce a nível molecular, antecipando alterações morfológicas associadas a estados mais avançados da doença. Nesse sentido, nos últimos anos tem havido um interesse crescente na utilização de técnicas de Medicina Nuclear, nomeadamente a tomografia computadorizada de fóton único (SPECT) e a tomografia de emissão de positrões (PET) no diagnóstico do cancro da mama. A visualização da expressão dos biomarcadores moleculares do cancro da mama, em especial dos receptores de estrogénio, constitui uma estratégia importante no diagnóstico, prognóstico e definição de uma opção terapêutica personalizada. A detecção destes receptores tem também valor preditivo na resposta terapêutica e no seguimento do tratamento. Contudo, até ao momento não existem sondas radioactivas específicas com características ideais para a detecção de cancro da mama estrogénio-dependente.

**PET e SPECT-** Estas técnicas nucleares ao possibilitarem a detecção não invasiva de alterações a nível molecular permitem a identificação precoce de tumores assim como a resposta individual aos tratamentos.<sup>16</sup> Por outro lado, são também utilizadas para visualizar metástases em órgãos distantes do tumor primário e no estadiamento de nódulos axilares pré-cirurgia.<sup>15</sup>

### **1.1.2. Tratamento do cancro da mama**

O tratamento da doente com cancro da mama pode envolver uma terapêutica locorregional como a cirurgia e a radioterapia ou uma terapia sistémica, como a hormonoterapia, a quimioterapia, ou terapias alvo.<sup>17</sup> Por outro lado a combinação de

modalidades terapêuticas constitui uma abordagem frequente para maximizar a eficácia do tratamento. O diagnóstico histológico do carcinoma da mama quanto à expressão de RE, RP e HER-2 é obrigatório. Pode ainda incluir a detecção dos níveis de expressão das proteínas Ki67 e das citoqueratinas 5 e 6. A técnica de pesquisa de invasão ganglionar por biópsia do gânglio sentinela permite o estadiamento ganglionar e pode constituir alternativa ao esvaziamento axilar.

O cancro da mama é um tumor maligno que se desenvolve nas células do tecido mamário cuja principal característica consiste na heterogeneidade biológica, que reflecte a complexidade e variabilidade de mutações que ocorreram durante o processo de oncogénese. Quando ocorre uma alteração genética durante a divisão celular, a célula danificada começa a multiplicar-se muito rapidamente e de forma aleatória. Actualmente reconhecem-se seis alterações na fisiologia celular que determinam a proliferação de células malignas: 1) Auto-suficiência nos sinais de proliferação; 2) Falta de sensibilidade aos sinais inibidores da proliferação; 3) Resistência à morte celular programada, a apoptose; 4) Capacidade replicativa ilimitada; 5) Indução de angiogénese; 6) Invasão de tecidos e metástases.<sup>16</sup> O conjunto destes factores determina a resposta tumoral às várias terapêuticas e o desenvolvimento de resistência aos tratamentos. A metástase constitui a última fase da doença e ocorre quando as células tumorais se espalham para diferentes órgãos. Estas células podem ser transportadas através do sangue ou, como é mais comum nos tumores mamários, através do sistema linfático. Deste modo, as células tumorais migram para os nódulos linfáticos situados nas axilas sendo este, o local mais frequente na detecção de metástases. Em estadios avançados da doença é possível encontrar metástases no fígado, ossos, pulmão e pele.<sup>18</sup>

**Cirurgia-** A cirurgia conservadora é a mais frequente (75-85%) sendo geralmente realizada no caso de tumores de tamanho reduzido ou em tumores de maiores dimensões em regressão, após quimioterapia primária. A mastectomia pode ser necessária no caso de carcinomas invasivos multicêntricos, ductais extensos ou de grandes dimensões. A sua combinação com quimioterapia adjuvante e neo-adjuvante e radioterapia são estratégias frequentemente utilizadas.<sup>15, 17</sup>

**Radioterapia-** Esta terapêutica faz parte integrante do tratamento após cirurgia conservadora e a sua utilização reduz muito a probabilidade de recidiva local. Quando utilizada após mastectomia aumenta a sobrevivência. Em doentes com metástases ósseas, ciclos curtos de irradiação podem ter efeito paliativo e prevenir fracturas.

Aproximadamente 60 a 70% dos novos casos de cancro da mama diagnosticados, expressam RE em concentrações mais elevadas do que em tecidos normais da mama ou tecidos não-alvo.<sup>19</sup> A quimioterapia e a hormonoterapia são as terapêuticas mais utilizadas no tratamento do cancro da mama que sobreexpressam estes receptores. No entanto, muitas das pacientes tornam-se resistentes aos tratamentos e desenvolvem tumores metastáticos.<sup>20, 21</sup> Têm sido propostos vários mecanismos para explicar a progressão tumoral e a resistência aos fármacos<sup>22-24</sup> sendo claro que uma detecção precoce do cancro da mama é fundamental para que se possa adoptar a melhor terapia.<sup>25, 26</sup>

**Terapias sistémicas-** Estas terapêuticas podem ser utilizadas com diferentes propósitos:<sup>15</sup> 1) **terapia adjuvante** que é administrada pós-cirurgia para evitar que as micrometástases se dispersem para outros órgãos ou tecidos, o que potencialmente pode sempre acontecer em doentes com carcinoma invasivo e 2) **terapia neoadjuvante** que constitui o primeiro tratamento em doentes com tumores em estado avançado ou de grandes dimensões. Pode também ser utilizada para aumentar a probabilidade de fazer cirurgia conservativa. Para além disso, pode induzir a regressão de nódulos axilares e fornecer informação sobre a resposta ao tratamento.

A decisão da terapêutica depende da categoria de risco de recorrência, estabelecida de acordo com o Consenso de *St Gallen*, e de se tratar de tumores com resposta endócrina que podem ser tratados com **hormonoterapia** ou de doença sem resposta endócrina em que a opção é a **quimioterapia**, eventualmente utilizando também anticorpos monoclonais ou inibidores da tirosinacina.<sup>27</sup>

### **1.1.2.1. Hormonoterapia**

A hormonoterapia está indicada sempre que há expressão dos RE contribuindo para reduzir as taxas de recorrência e de morte aos 5 anos em 41 e 34%, respectivamente.<sup>28</sup> Aproximadamente 75% dos carcinomas da mama expressam RE e/ou RP.<sup>27</sup> Para estes tumores a terapia endócrina tem sido utilizada como tratamento padrão com o objectivo de modelar ou interromper a função do RE ou a produção endógena de estrogénios que desempenham um papel fundamental no crescimento tumoral.<sup>29</sup> Em geral, esta terapêutica tem uma boa resposta inicial mas, na maioria dos casos, os tumores desenvolvem resistência aos fármacos após tratamento repetido. O aparecimento de múltipla resistência a fármacos constitui um problema na terapia hormonal do cancro da mama com grande impacto na Saúde Pública.

Nestes casos é necessário recorrer à quimioterapia, numa tentativa de controlar a progressão da doença. Embora os tumores que expressam RE possuam menor taxa de crescimento, o seu potencial metastático não é menor. A expressão de RE por si só não é um bom indicador de prognóstico mas tem um bom valor preditivo de resposta ao tratamento com agentes que bloqueiam a sinalização dos receptores. A detecção de uma percentagem de células que expressam RE superior a 50% indica uma boa resposta a hormonoterapia. No caso de baixa percentagem de células com RE poderá ser necessário recorrer a quimioterapia.

No cancro da mama estrogénio-dependente, a inibição da sinalização dos RE pode ser realizada através de:

- Moduladores selectivos do receptor de estrogénio (SERM- *selective estrogen receptor modulator*), como por exemplo o tamoxifeno.
- Medidas para redução do nível de estrogénios circulantes tais como ablação ovárica e utilização de análogos da hormona de libertação da hormona luteinizante, LHRH ou de inibidores da aromatase.
- Antagonistas do receptor de estrogénio.

Os SERMs são antiestrogénios que inibem a função dos estrogénios nas células do cancro da mama mas, tal como a designação indica, são selectivos e podem ter actividade agonista ou antagonista noutras células ou tecido-alvo. São exemplos de SERMs o tamoxifeno, o toremifeno, o raloxifeno, entre outros.

O tamoxifeno é um antiestrogénio não esteróide cujo mecanismo de acção consiste na inibição competitiva da ligação dos estrogénios aos receptores e conseqüente inibição da expressão dos genes regulados pelos estrogénios, retardando a proliferação celular. Nos últimos anos, o tamoxifeno tem sido o fármaco de eleição no tratamento adjuvante do cancro da mama estrogénio-dependente. Cancros que expressam RE/RP possuem taxas de resposta de 60-70% enquanto os cancros que não expressam estes receptores possuem taxas inferiores a 10%.<sup>27</sup> Por outro lado, a taxa de recorrência a 5 anos é reduzida a metade.<sup>29</sup> No entanto na doença metastática o seu efeito está limitado a um tempo médio de 15 meses verificando-se após este período desenvolvimento de resistência.<sup>30</sup> Os efeitos agonistas do tamoxifeno ajudam a reforçar e manter as células do osso e reduzem o risco de problemas coronários.<sup>31,32</sup> Por ser um agonista parcial apresenta igualmente actividade estimuladora intrínseca semelhante ao estrogénio nalguns tecidos, osso, endométrio. O carácter agonista do

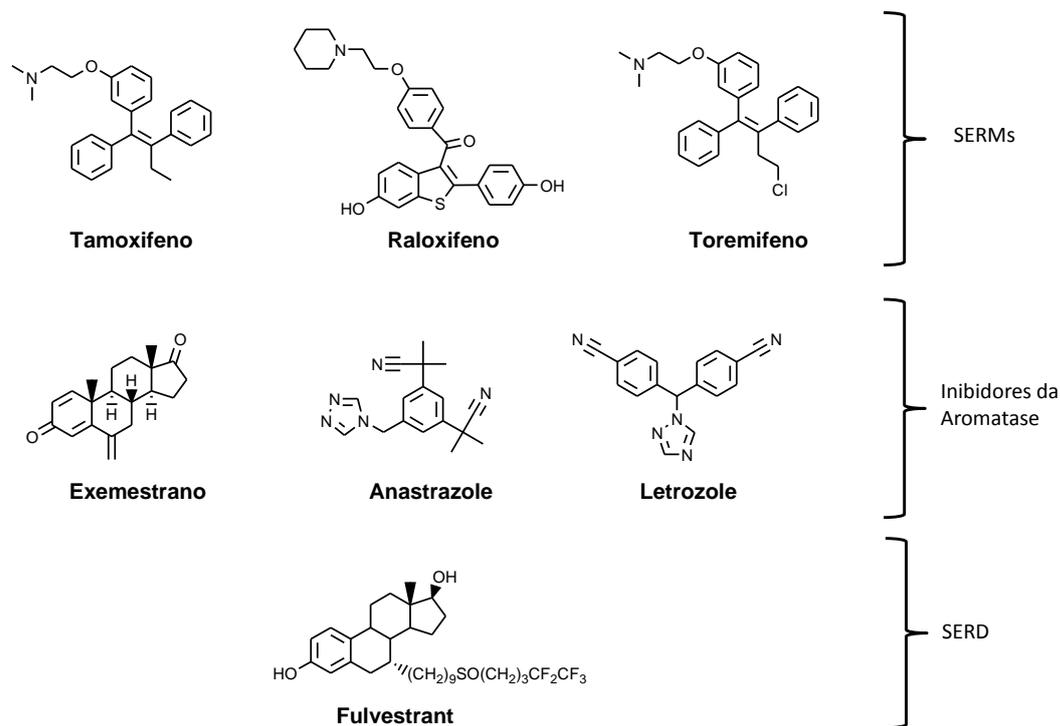
tamoxifeno poderá também ser o responsável por alguns dos efeitos secundários como a resistência do tumor ao fármaco.<sup>33</sup>

Posteriormente foram desenvolvidos outros SERMs e o seu interesse clínico avaliado, nomeadamente o droloxifeno, idoxifeno, toremifeno, miproxifeno e raloxifeno (**Figura 1.1.**) mas nenhum demonstrou eficácia terapêutica superior à do tamoxifeno.<sup>17</sup>

A redução do nível de estrogénios circulantes na mulher pré-menopáusicas pode ser definitiva por ablação ovárica ou transitória por administração de análogos da LHRH, dependendo do risco de recorrência. Após a menopausa são utilizados inibidores da aromatase.<sup>34</sup> Os inibidores da aromatase (IA) inibem a enzima aromatase que catalisa a conversão de androgénios em estrogénios. Assim inibem a síntese nos tecidos periféricos, a principal fonte de estrogénios nestas mulheres. Actualmente os IA em utilização clínica pertencem à 3ª geração que apresenta maior potência, especificidade e toxicidade reduzida relativamente aos de 1ª e 2ª geração. Quanto aos mecanismos de acção, estes podem ser do tipo I ou inactivadores produzindo inactivação irreversível da enzima ou do tipo II ou inibidores competitivos, que actuam por ligação competitiva à enzima inactivando-a de modo reversível. Os IA do tipo I são do tipo esteróide, como por exemplo o exemestano, enquanto os do tipo II são não-esteróides, tais como o anastrozole e o letrozole (**Figura 1.1.**). Os estudos realizados em mulheres pós-menopáusicas que compararam a eficácia dos IA com a do tamoxifeno, demonstraram uma melhoria no intervalo livre de doença e do tempo para a progressão sem melhoria da sobrevivência global. Por outro lado, é também reconhecido que o tratamento exclusivo com tamoxifeno em doentes com elevado risco de recorrência não é suficiente devendo ser seguido de tratamento com IA.<sup>17,35</sup> O tratamento com IA é particularmente recomendado em doentes com contra-indicações para tamoxifeno, como por exemplo em doentes com antecedentes de trombose, embolia ou doenças da retina.<sup>15</sup>

Foram sintetizados vários estrogénios antagonistas do RE visando o tratamento do cancro da mama. Desses antagonistas destacou-se o fulvestrant (**Figura 1.1.**). O Fulvestrant é um antiestrogénio puro mas também actua de modo selectivo no RE como *downregulator*. Tem um modo de acção diferente dos outros fármacos em hormonoterapia pois inactiva totalmente as funções de transcrição do RE suprimindo a expressão de genes estrogénio-dependentes. Apesar de ser eficaz no tratamento do cancro da mama estrogénio-dependente, não previne a perda de densidade óssea e apresenta alguns efeitos secundários no sistema cardiovascular.<sup>32</sup> Liga-se aos RE de forma competitiva e com uma afinidade comparável à do

estradiol.<sup>36</sup> É habitualmente utilizado após progressão da doença sob tratamento com tamoxifeno ou IA em qualquer faixa etária.<sup>17,27</sup>



**Figura 1.1.-** Estrutura química de alguns SERMs (tamoxifeno, raloxifeno e toremifeno), inibidores de aromatase (exemestrano, anastrozole e letrozole) e de antagonistas do receptor de estrogénio (Fulvestrant).

Para terapia paliativa, a principal opção é, sempre que possível, a hormonoterapia devido à sua menor toxicidade, maior duração de resposta e igual sobrevivência comparativamente à quimioterapia. De um modo geral, a administração sequencial de tamoxifeno, IA não esteróides, IA esteróides e fulvestrant têm, em muitos doentes, um efeito paliativo durante períodos longos devido ao diferente mecanismo de acção.

### 1.1.2.2. Quimioterapia

A quimioterapia está indicada em doentes cujos tumores não expressam nem RE nem RP. Embora também seja eficaz em tumores que expressam estes receptores, a resposta à quimioterapia é menor. Pode ser utilizada como terapia adjuvante prevenindo a recorrência de micrometástases já existentes no momento do diagnóstico. A associação da quimioterapia a terapêutica local apropriada melhora o prognóstico do cancro da mama prevenindo as recorrências à distância. Vários estudos clínicos utilizando diferentes combinações de fármacos

demonstraram o benefício da quimioterapia adjuvante nas doentes com alto risco de recorrência. Segundo o Consenso de *St Gallen* os tumores triplos negativos e os tumores HER-2 positivo possuem indicações formais para quimioterapia adjuvante.<sup>37</sup> A quimioterapia pode também ser utilizada como terapia neo-adjuvante para induzir a regressão dos tumores e facilitar a cirurgia e radioterapia.

Na década de 1960, a combinação de ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracilo foi considerada terapia padrão em doentes com cancro da mama em estadio precoce. Posteriormente foram incluídas antraciclinas nos esquemas de quimioterapia com benefício na redução do risco de recorrência e de morte. Com base em diversos estudos clínicos, as antraciclinas foram adoptadas como fármacos padrão em quimioterapia adjuvante. Os taxanos foram adicionados aos esquemas convencionais com antraciclinas, na década de 1990, tendo sido validados como terapêutica padrão no cancro da mama em doentes com gânglios positivos.<sup>27,37</sup>

Na última década a utilização da quimioterapia evoluiu bastante permitindo uma melhoria considerável da sobrevivência global das doentes. No entanto, o tratamento do cancro da mama metastático constitui ainda um grande desafio. Apesar de incurável, este cancro é geralmente sensível a quimioterapia permitindo controlar os sintomas e prolongar a sobrevida. Assim a quimioterapia com antraciclinas ou taxanos constitui o principal tratamento dependendo a sua duração da resposta, da toxicidade e tolerância. No entanto o período de resposta é geralmente curto e a sobrevivência a longo prazo não é frequente.<sup>37</sup> Nas doentes com recorrência precoce podem ser tentados outros fármacos, tais como gemcitabina, epotilones, derivados de platina, em regime de monoterapia ou em combinação.

Tal como referido anteriormente, o tratamento individualizado é cada vez mais aplicado tendo em consideração os avanços recentes na oncologia molecular que antecipam a utilização do perfil molecular para orientar a decisão terapêutica, nomeadamente a indicação para quimioterapia apenas em doentes com elevada probabilidade de terapia efectiva e evitando tratamentos desnecessários em doentes cujo benefício é previsivelmente baixo.

### **1.1.2.3. Terapia dirigida a alvos específicos**

Os avanços recentes em patogénese molecular dos tumores permitiram a identificação de alvos específicos relacionados com a proliferação e disseminação tumoral que podem ser

úteis no tratamento mais efectivo do cancro da mama. O anticorpo monoclonal recombinante humanizado trastuzumab foi o primeiro vector biológico a ser utilizado com eficácia em cancros da mama que sobre-expressam HER-2.<sup>13,27</sup>

O HER-2 é uma glicoproteína transmembranar com actividade catalítica em tirosina-cinase. Está associado a doença mais agressiva, elevado risco de recidiva e sobrevivência reduzida.<sup>38</sup> A sobre-expressão de HER-2 ou a amplificação do gene HER-2 selecciona as doentes para tratamento com trastuzumab, um anticorpo anti-HER-2, dirigido ao domínio extracelular do HER-2. O tratamento está indicado em terapia neo-adjuvante, terapia adjuvante concomitante com quimioterapia ou sequencial, e no tratamento de doentes com cancro metastizado cujos tumores sobre-expressam HER-2. Quando administrado em combinação com quimioterapia, aumenta a sobrevivência global e diminui a progressão de doença. Contudo, o seu uso está associado a cardiotoxicidade e a elevada percentagem de resistência ao tratamento.<sup>16</sup> Recentemente foi aprovado pela FDA e EMA a utilização de outro anticorpo monoclonal humanizado, o pertuzumab, em terapia combinada com docetaxel e trastuzumab. Este anticorpo liga-se a um domínio diferente do HER-2 bloqueando a sua dimerização.<sup>39</sup>

O lapatinib é um inibidor reversível da tirosina-cinase que tem como alvos os receptores EGFR (receptor do factor de crescimento epidérmico) e HER-2. A sua utilização está indicada em cancro da mama metastizado que sobre-expressa HER-2 resistente ao trastuzumab.<sup>13,27</sup>

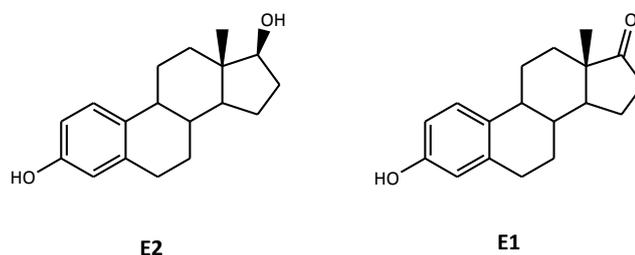
O bevacizumab é outro anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao factor de crescimento do endotélio vascular, VEGF, bloqueando a sua acção mediadora de angiogénese. A sobre-expressão de VEGF correlaciona-se com um prognóstico reservado. Estudos pré-clínicos indicaram que o bevacizumab parece ser promissor na redução da angiogénese tumoral e inibição de tumores sólidos. A associação deste anticorpo a paclitaxel mostrou melhoria no intervalo livre de doença e na taxa de resposta global, num ensaio clínico fase III.

Os carcinomas com fenótipo triplo negativo (RE, RP e HER-2) representam 10 a 20% dos cancros da mama sendo a maioria do tipo basal embora não haja uma concordância completa entre os dois grupos.<sup>40</sup> A designação triplo negativo refere-se à classificação imunohistoquímica enquanto a expressão tipo basal é definida a partir da expressão de genes por análise de *microarray*. Os carcinomas destes subtipos apresentam características moleculares, histológicas e tumorais que lhes conferem prognóstico desfavorável, elevada malignidade, menor sobrevida, elevada taxa de metastização com um padrão de localização

preferencial no pulmão e cérebro sem metástases nos gânglios linfáticos. Não existindo terapêuticas alvo para este tipo de tumores, o tratamento engloba geralmente cirurgia, radioterapia e quimioterapia com antraciclinas e taxanos.<sup>41,42</sup> No entanto parece existir correlação com câncros da mama hereditários que expressam fenótipo associado a mutação do gene *BRCA1*. Este gene é necessário para reparar o ADN, pelo menos parcialmente. Por outro lado as células com defeito de reparação do ADN são mais sensíveis aos inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1). Como a PARP1 actua na reparação de quebras de ADN de cadeia única, a sua inactivação pode provocar morte celular. Neste contexto, os inibidores da PARP1 poderão vir a desempenhar, futuramente, um papel importante na terapia dirigida a este tipo de carcinomas.<sup>43</sup>

## 1.2. Receptores de Estrogénio

Os estrogénios são hormonas que desempenham funções fisiológicas e patológicas muito importantes, em especial no sexo feminino. O estradiol (E2) e a estrona (E1) são responsáveis, juntamente com a progesterona, pelo desenvolvimento e regulação do sistema mamário e reprodutivo da mulher (**Figura 1.2.**). Actuam também na regulação do crescimento ósseo e na manutenção das funções cardiovascular, do sistema nervoso central e da resposta imune. Consequentemente, alterações nos níveis de estrogénios podem induzir situações patológicas nestes sistemas e o eventual aparecimento de tumores.<sup>29,44</sup> Os estrogénios estimulam a proliferação e a actividade metastática dos câncros da mama com positividade para RE.



**Figura 1.2.-** Estrutura química do estradiol (E2) e da estrona (E1).

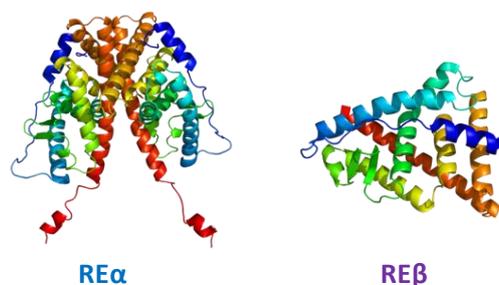
A biossíntese dos estrogénios ocorre fundamentalmente no aparelho reprodutivo feminino, a partir do precursor androstenediona, mas também no tecido adiposo através dos androgénios produzidos nas glândulas adrenais. O estradiol é o estrogénio predominante durante o período de pré-menopausa sendo produzido principalmente pelos ovários. A sua

actividade intrínseca é muito superior à da estrona mas pode haver interconversão entre estas duas hormonas através da enzima  $17\beta$ -desidrogenase. Após a menopausa, os ovários não funcionam e a produção de estradiol é feita nos tecidos periféricos, adiposo e muscular.<sup>45</sup> Os efeitos biológicos dos estrogénios nos tecidos são mediados fundamentalmente pelos receptores de estrogénios: receptor do subtipo  $\alpha$ , RE $\alpha$  e receptor do subtipo  $\beta$ , RE $\beta$  (**Figura 1.3.**).

### 1.2.1. Subtipos do receptor de estrogénio

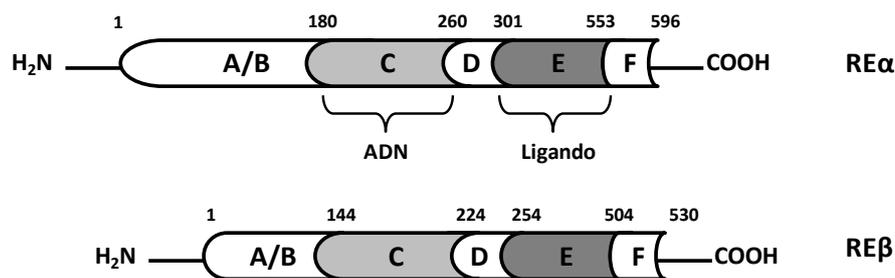
Os receptores de estrogénio pertencem à superfamília dos receptores nucleares, subfamília dos receptores hormonais esteróides que está dividida em duas classes I e II. A classe I inclui, para além dos esteróides hormonais RE $\alpha$  e RE $\beta$ , RPA e RPB, receptores glucocorticóide, mineralocorticóide e de androgénio. Estes receptores ligam-se ao ADN sob a forma de homodímeros e medeiam a resposta celular aos estrogénios através da regulação da síntese de ARN e de proteínas.<sup>46,47</sup>

Os RE são factores de transcrição dependentes dos seus ligandos endógenos. Foram identificados pela primeira vez em 1966, por Toft e colaboradores e durante muitos anos assumiu-se que existia um único subtipo, o RE $\alpha$ , responsável pelos níveis fisiológicos de estradiol.<sup>48</sup> Só muito mais tarde, em 1996, o RE $\beta$  foi identificado e caracterizado. O RE $\alpha$  e o RE $\beta$  são codificados por genes diferentes e possuem distribuições diferentes nos tecidos. O subtipo RE $\alpha$  é essencialmente expresso no útero, ovários e fígado enquanto os RE $\beta$ , são expressos predominantemente no osso, sistema nervoso central, sistema cardiovascular e sistema gastrointestinal.<sup>49,50</sup> No tecido normal da mama predomina a isoforma RE $\beta$  enquanto nas lesões pré-malignas a concentração de RE $\alpha$  geralmente aumenta promovendo a proliferação celular, sob estimulação de estrogénios, e diminuindo a expressão do RE $\beta$ .



**Figura 1.3.-** Representação da estrutura 3D dos receptores de estrogénio: RE $\alpha$  e RE.<sup>51,52</sup>

Estes dois subtipos do RE possuem uma estrutura modular semelhante com vários domínios que incluem 6 regiões funcionais (A-F). Do terminal N, onde se localiza o domínio A/B, para o terminal C, onde se situa o domínio F (**Figura 1.4.**). O domínio A/B, não depende da ligação ao ligando e é responsável por interacções proteína-proteína e pelo aumento da expressão de genes. Na região C localiza-se o domínio de ligação ao ADN e é também responsável pela dimerização do receptor. O domínio de ligação ao ligando localiza-se na região E onde também actuam co-ativadores e supressores.



**Figura 1.4.-** Representação esquemática da estrutura dos receptores de estrogénio: REα e RE. <sup>52</sup>

Os subtipos REα e REβ partilham uma sequência homóloga de aproximadamente 47%. <sup>53,54</sup> A maior diferença verifica-se no domínio A/B onde a homologia é apenas de 20%. Contudo o domínio de ligação ao ADN apresenta uma homologia de 95% comparativamente a 55% de homologia no domínio de ligação ao ligando, na região E. Assim sendo, a homologia dos domínios de ligação poderia sugerir acções semelhantes após ligação ao ADN, ou aos ligandos, o que não se verifica devido à baixa homologia global. De facto o REβ tem, por vezes, efeito oposto ao do REα devido às diferenças nos domínios de ligação e à existência de variantes do REβ. Por outro lado, os REα e REβ apresentam diferenças na selectividade para os ligandos e na actividade de transcrição. <sup>45</sup>

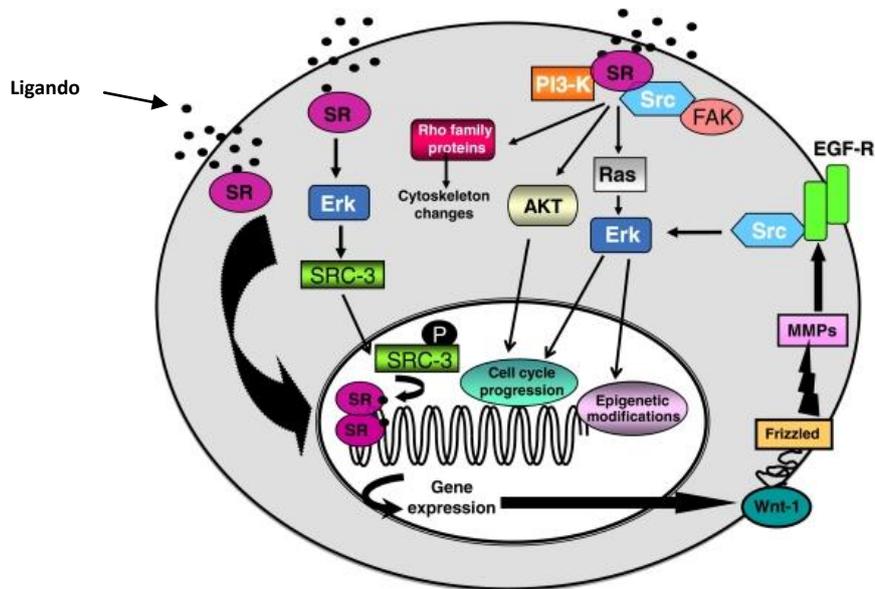
A localização intracelular do RE é um tema controverso, considerando-se actualmente que existe um equilíbrio dinâmico de entrada e saída do núcleo influenciado por factores diversos, tais como interacções proteicas e ligação ao ligando. Foi demonstrado por vários estudos que a maioria dos REs se localizam no núcleo da célula o que não significa que estejam sempre confinados a este organelo. Sabe-se que existe deslocação do RE entre os compartimentos nuclear e citoplasmático. <sup>55</sup>

Estudos mais recentes mostraram que os estrogénios também interactuam com receptores transmembranares da família dos receptores acoplados às proteínas G. <sup>56</sup> O GPR30, actualmente designado GPER1 (do inglês *G-protein coupled estrogen receptor*1) possui as

características de um RE de membrana. O estradiol tem elevada afinidade para o GPER1 e a sua ligação é saturável.<sup>44, 47, 55</sup> Os SERMs e antagonistas, como o fulvestrant também se ligam a este receptor induzindo efeito agonista.<sup>57</sup> O GPER1 encontra-se em muitos tecidos e células de origem humana assim como em linhas celulares de cancro da mama com expressão de RE. Relativamente à sua localização intracelular, vários estudos indicam que se localiza na membrana plasmática, no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi.<sup>44,47,55</sup> Está associado à proliferação, migração, invasão e metastização tumoral podendo representar um alvo importante no diagnóstico e terapia de cancro da mama.<sup>58,59</sup> O seu estudo em células de cancro do ovário e da mama demonstrou um comportamento de supressor sugerindo que a sua presença esteja associada a uma resposta clínica favorável.<sup>60,61</sup>

### 1.2.2. Modelo de transcrição genómica mediado pelo RE

Os efeitos biológicos dos estrogénios são atribuídos, geralmente, a um mecanismo de transcrição genómica mediado pelo RE (**Figura 1.5.**).<sup>21</sup> Segundo este modelo, o RE na ausência de ligando encontra-se na forma inactiva. A ligação a um ligando induz uma alteração conformacional activando o RE, o que provoca a sua dimerização e interacção com sequências específicas de ADN. Dependendo da célula e do ligando, o receptor ligado ao ADN pode regular de modo positivo ou negativo a transcrição do gene, interagindo com o sistema de transcrição e com co-activadores proteicos, aumentando por fim a actividade da ARN polimerase. Assim, a activação do RE aumenta a actividade de transcrição de genes que por sua vez se correlaciona com a proliferação celular, invasão e angiogénese, no caso de tumores. A translocação do RE do citoplasma para o núcleo, após a ligação ao agonista, é essencial para iniciar a via genómica pois o RE extra-nuclear não tem actividade transcripcional.<sup>62</sup> Todo este processo demora horas ou dias a produzir efeitos nas células. No entanto sabe-se que existem respostas bioquímicas rápidas à estimulação estrogénica que podem demorar apenas segundos ou minutos. São considerados efeitos não genómicos dos estrogénios associados a receptores de membrana e à activação de cascatas de sinalização.<sup>62</sup>



**Figura 1.5.-** Representação dos mecanismos de transcrição genômica e não genômica, mediados pelo RE.<sup>62</sup>

### 1.2.3. Relevância dos receptores de estrogênio como biomarcadores/alvos específicos de cancro da mama

O RE $\alpha$  é indiscutivelmente o biomarcador mais importante no cancro da mama e o alvo terapêutico de eleição sendo a sua quantificação obrigatória para delinear a opção terapêutica. O papel do RE $\beta$  na carcinogénese não é ainda bem conhecido havendo estudos com resultados contraditórios que o associam a um bom prognóstico enquanto outros, o correlacionam com mau prognóstico e resistência a hormonoterapia. Assim, o seu valor preditivo no cancro em geral e no carcinoma da mama em particular necessita ser determinado.<sup>12</sup> Relativamente ao GPER1, a sua importância na terapia antiestrogénica de tumores que expressam RE ainda não foi determinada e não existem fármacos que bloqueiem especificamente a sua ação sendo fundamental clarificar os mecanismos para estabelecer o seu valor preditivo no cancro associado a este tipo de receptores.<sup>12</sup>

### 1.3. Medicina Nuclear

A medicina nuclear é um ramo da medicina que utiliza radiofármacos para fins de diagnóstico ou para fins terapêuticos. A principal vantagem desta especialidade médica

consiste na visualização de processos fisiológicos ao nível molecular *in vivo*, por método não invasivo. Deste modo contribui para a melhoria das condições de diagnóstico, prognóstico e terapia de outras especialidades médicas como a oncologia, a cardiologia, a neurologia, entre outras. Para fins terapêuticos permite a destruição, por exemplo de células tumorais, por acção da radiação ionizante veiculada de modo selectivo aos tecidos alvo.

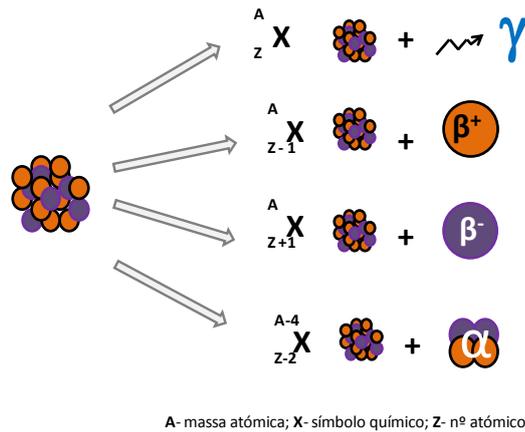
### 1.3.1. Radiofármacos

Os radiofármacos são compostos que possuem na sua composição um radionuclídeo. De um modo geral, são compostos orgânicos, inorgânicos ou organometálicos que direccionam um radionuclídeo adequado para o órgão ou tecido alvo. Podem também conter na sua composição, macromoléculas com actividade biológica relevante, tais como péptidos e anticorpos monoclonais ou nanoestruturas, como por exemplo nanopartículas. Devido às baixas concentrações em que são administrados não apresentam acção farmacológica. A elevada sensibilidade de detecção do radionuclídeo permite a visualização de processos fisiológicos sem provocar alterações funcionais.

A maioria dos radiofármacos aprovados é utilizada em diagnóstico e só uma pequena percentagem em terapia. São administrados predominantemente por via endovenosa e o sinal de radiação emitido pelo radionuclídeo é detectado externamente.

Os radiofármacos podem ser classificados em radiofármacos de perfusão e radiofármacos específicos. A distribuição biológica dos radiofármacos de perfusão é determinada exclusivamente pelas características físico-químicas do composto, tais como a carga, lipofilia, massa molecular, através de diferentes mecanismos de acção. Os radiofármacos específicos possuem na sua composição uma molécula biologicamente activa que interacciona de modo específico com alvos celulares, como por exemplo antigénios e receptores.

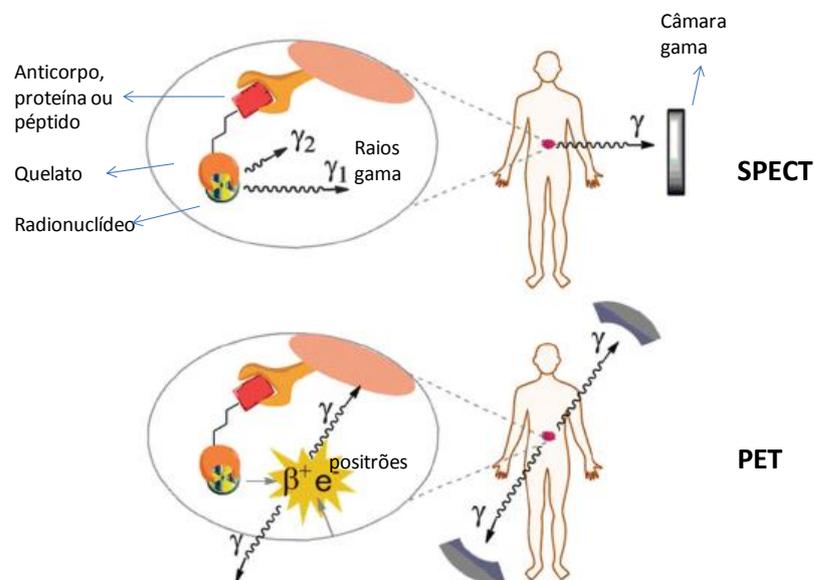
O radionuclídeo é um átomo cujo núcleo se encontra num estado instável contendo excesso de energia. Para libertação desse excesso energético, transforma-se espontaneamente num nuclídeo mais estável, por desintegração radioactiva. Possuem um período de desintegração característico e emitem simultaneamente radiação electromagnética (raios  $\gamma$  ou raios-X) e/ou partículas subatómicas ( $\alpha$ ,  $\beta^+$ ,  $\beta^-$ , electrões Auger) (**Figura 1.6.**)<sup>63,64</sup>



**Figura 1.6.-** Principais modos de decaimento de um núcleo instável.

A aplicação clínica dos radiofármacos em diagnóstico e/ou terapia depende do modo de decaimento e das propriedades físico-químicas dos radionuclídeos, em especial da energia e tipo de radiação e/ou partículas emitidas e do período de semi-desintegração ( $t_{1/2}$ ).<sup>64,65</sup> Os radiofármacos para diagnóstico devem incluir na sua composição radionuclídeos emissores de radiação electromagnética penetrante, detectável externamente (radiação  $\gamma$  ou  $\beta^+$ ), para permitirem a visualização dos órgãos ou tecidos alvo.

As técnicas de aquisição de imagem utilizadas em medicina nuclear são o SPECT e o PET. Na **Figura 1.7.** estão representadas esquematicamente as técnicas de SPECT e PET.



**Figura 1.7.-** Representação esquemática das técnicas de SPECT e PET. (Adaptado de <sup>66</sup>)

O SPECT é uma técnica de imagiologia médica que envolve a administração de radiofármacos contendo radionuclídeos emissores de radiação  $\gamma$  com energias compreendidas

entre 80 e 300 keV.<sup>67</sup> Na **tabela 1.3.** apresentam-se alguns dos radionuclídeos mais utilizados em SPECT.

Em SPECT, a imagem tomográfica é obtida através de uma câmara gama constituída por detector de cintilação NaI(Tl) que roda em torno do paciente detectando a radiação  $\gamma$  nos diversos planos anatómicos do paciente e produzindo um sinal que é processado por computador para obtenção de imagens.<sup>63</sup>

Na técnica PET os radiofármacos incluem na sua composição, radionuclídeos emissores de positrões ( $\beta^+$ ). Embora sejam pouco penetrantes não podendo ser detectadas externamente, estas partículas sofrem uma reacção de aniquilação por interacção com os electrões do meio, produzindo dois fotões  $\gamma$  de 511 KeV, emitidos com a mesma direcção mas sentidos opostos. Esses fotões são detectados em coincidência em diferentes ângulos permitindo a aquisição de imagens tridimensionais. Comparativamente à técnica de SPECT, a imagem obtida por PET tem maior resolução, maior sensibilidade e permite uma quantificação exacta da distribuição do radionuclídeo.

**Tabela 1.3.-** Radionuclídeos emissores  $\gamma$  para SPECT e respectivas propriedades físicas.<sup>64-66,68,69</sup>

Radionuclídeo	$t_{1/2}$	Radiação $\gamma$ (keV)	Abundância (%)	Electrões Auger emitidos
<sup>99m</sup> Tc	6,02 h	140	90	4
<sup>67</sup> Ga	78,26 h	93	38	5
		185	21	
		300	17	
		394	5	
<sup>111</sup> In	67,90 h	171	91	14
		245	94	
<sup>123</sup> I	13,20 h	159	83	15
<sup>125</sup> I	60,5 d	27	138	25
		35	7	
<sup>201</sup> Tl	72 h	135	3	37
		167	9,4	

Como se pode observar na **tabela 1.4.**, a maior parte dos radionuclídeos com interesse em PET são elementos não metálicos. Destacam-se os radioisótopos <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O e <sup>18</sup>F que são

isótopos de elementos que integram a composição de diferentes biomoléculas, com excepção do  $^{18}\text{F}$ .<sup>70,71</sup> Deste modo, é possível incorporar estes radioisótopos nas biomoléculas sem alterar o seu comportamento biológico possibilitando a síntese de radiofármacos específicos.<sup>72</sup> O  $^{18}\text{F}$ , usado para substituir um átomo de hidrogénio ou um grupo OH da molécula, poderá eventualmente induzir alterações na via metabólica. Embora do ponto de vista estereoquímico não provoque alterações significativas, pois o átomo de flúor é pouco maior do que o de hidrogénio, pode perturbar a reactividade na sua vizinhança, o  $\text{pK}_a$  e a conformação molecular devido à forte electronegatividade do flúor.

**Tabela 1.4.**-Radionuclídeos emissores  $\beta^+$  para PET e respectivas propriedades físicas.<sup>64-66,72</sup>

Radionuclídeo	$t_{1/2}$	Radiação $\gamma$ (MeV)
$^{15}\text{O}$	2 min	1,7
$^{13}\text{N}$	10 min	1,2
$^{11}\text{C}$	20 min	1,0
$^{82}\text{Rb}$	76s	3,4
$^{18}\text{F}$	110 min	0,7
$^{68}\text{Ga}$	68 min	1,9
$^{64}\text{Cu}$	13h	5,11

O curto período de semi-desintegração desses radioisótopos condiciona a síntese dos radiofármacos e limita a sua utilização clínica, com excepção do  $^{18}\text{F}$ . Assim, os centros de medicina nuclear devem localizar-se próximo do local de produção.<sup>63</sup> Por este motivo e devido às suas propriedades favoráveis, tem havido um interesse crescente no desenvolvimento de radiofármacos para PET com os radiometais  $^{64}\text{Cu}$  e o  $^{68}\text{Ga}$ , com períodos de semi-desintegração mais longos.<sup>71-75</sup>

Para **terapia** os radiofármacos possuem na sua composição radionuclídeos emissores de partículas  $\alpha$ ,  $\beta^-$  ou electrões Auger, que devido ao seu efeito ionizante, provocam a destruição de células ou tecidos alvo.<sup>63,65</sup> No entanto, a obtenção de um efeito terapêutico eficaz com riscos mínimos de radiotoxicidade para os tecidos envolventes requer a utilização de moléculas que transportem selectivamente o radionuclídeo para as células alvo. O radionuclídeo deve possuir um período de semi-desintegração adequado à duração do tratamento e deve emitir partículas com energia e alcance adequados às dimensões do tumor. Até ao momento, a maioria dos radiofármacos aprovados para utilização clínica têm na sua

constituição emissores de partículas  $\beta^-$ . Desses radionuclídeos destacam-se:  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ;  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{89}\text{Sr}$  e  $^{32}\text{P}$ . Recentemente foi aprovado o primeiro radiofármaco contendo um emissor de partículas  $\alpha$ , o  $^{223}\text{RaCl}_2$  para terapia de metástases ósseas.<sup>76</sup>

A emissão simultânea de radiação  $\gamma$  no caso de alguns emissores  $\beta^-$  (e.g.  $^{177}\text{Lu}$ ;  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ), pode ser vantajosa para a obtenção de imagens, que permitem seguir a biodistribuição e avaliar o efeito terapêutico.

Os electrões Auger são emitidos por cerca de metade dos radionuclídeos conhecidos que decaem por captura electrónica ou por conversão interna. Ao ser capturado um electrão pelo núcleo dá origem a uma lacuna numa orbital interna que irá ser preenchida por um electrão de uma orbital mais periférica. Esta transição entre orbitais gera uma diferença energética que pode ser libertada com a emissão de um electrão de baixa energia.<sup>77</sup> Durante muitos anos não se atribuiu importância a estes electrões devido à sua baixa energia, quando comparada com a energia total libertada durante o processo de decaimento. No entanto, já foi demonstrada a possibilidade de provocarem fragmentação molecular e o interesse no desenvolvimento de compostos com estes radionuclídeos tem aumentado ao longo dos anos devido ao seu potencial interesse para aplicação clínica em terapia selectiva.<sup>78</sup> Os radionuclídeos emissores de electrões Auger com interesse clínico são  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{193\text{m}}\text{Pt}$  e  $^{195\text{m}}\text{Pt}$ , a maioria dos quais já são utilizados em Medicina Nuclear para fins de diagnóstico (**tabela 1.3.**).

As partículas  $\beta^-$  tem uma transferência linear de energia (LET) baixa e dependendo da sua energia, podem percorrer alguns milímetros nos tecidos alvo. Por outro lado, as partículas  $\alpha$  e os electrões Auger possuem um LET elevado, sendo o seu percurso mais curto do que o das partículas  $\beta^-$ .<sup>79-82</sup> O alcance das partículas  $\alpha$  é da ordem de grandeza dos 50-100  $\mu\text{m}$ , equivalente a algumas células enquanto os electrões Auger possuem um alcance inferior às dimensões do núcleo das células. Assim sendo, para tratamento de tumores de maiores dimensões os emissores  $\beta^-$  serão mais eficientes, enquanto em metástases e pequenos aglomerados de células tumorais, os emissores de partículas  $\alpha$  ou electrões Auger são mais adequados.<sup>65,83</sup>

No caso dos radionuclídeos emissores de electrões Auger, para garantir a sua eficácia terapêutica é essencial que se localizem muito próximo do alvo terapêutico, o ADN, devido ao curto alcance destes electrões. Quando localizados no citoplasma, o efeito dos electrões Auger não é letal e as curvas de sobrevivência das células são semelhantes às curvas devido a exposição a radiação com baixo LET. Contudo, se interagirem com o ADN podem ser

altamente citotóxicos e provocar uma diminuição acentuada na sobrevivência. O seu curto alcance minimiza o risco de radiocitotoxicidade para as células vizinhas.<sup>84,85</sup> Por estas razões, para que os compostos com emissores de electrões Auger possam ser úteis para fins terapêuticos, devem ser concebidos por forma a atravessar as membranas celulares e serem internalizados no núcleo, próximo da molécula de ADN. Como a dupla hélice da molécula de ADN tem um diâmetro de 2 nm, a radiação ionizante destes electrões é suficiente para promover a quebra das ligações da cadeia de ADN e produzir efeitos citotóxicos. Para este efeito citotóxico também contribuem os radicais livres produzidos por efeito da radiação (e.g. OH $\cdot$ , H $\cdot$ ).<sup>77</sup>

### **1.3.2. Medicina nuclear *versus* outras modalidades de imagem utilizadas no diagnóstico do cancro da mama**

As técnicas de imagiologia da medicina nuclear, SPECT e PET, quando comparadas com outras técnicas convencionais de imagem frequentemente utilizadas no diagnóstico do cancro da mama, nomeadamente a imagiologia por ressonância magnética (MRI) ou a tomografia computadorizada (CT) possuem uma maior sensibilidade e especificidade. Contudo a principal vantagem das técnicas nucleares está relacionada com a possibilidade de obter informação funcional por método não invasivo e não só de visualizar a morfologia dos órgãos. Pelo contrário a imagem por MRI, para além da menor sensibilidade, quando utiliza agentes de contraste requer a administração de concentrações muito mais elevadas que podem ter carácter invasivo e provocar efeitos secundários indesejáveis. Por outro lado a CT apesar de ter uma resolução espacial muito boa tem uma sensibilidade muito baixa.

Para superar as vantagens e desvantagens de cada modalidade de imagem com diferentes características de resolução e sensibilidade foram introduzidos equipamentos que combinam a detecção por técnicas nucleares com CT ou MRI. Para além da imagem obtida por cada uma das modalidades, o sistema sobrepõe as imagens permitindo obter uma terceira imagem, por exemplo SPECT/CT ou PET/MRI que se pretende forneça informação morfológica e funcional permitindo um diagnóstico mais preciso e auxiliando na decisão terapêutica.<sup>86,87</sup>

### 1.3.3. Teranóstica

A concepção de novos radiofármacos, até recentemente, era feita de acordo com a aplicação clínica a que se destinava, diagnóstico ou terapêutica. Contudo o desenvolvimento de novas moléculas direccionadas para alvos específicos com capacidade para veicular selectivamente os radionuclídeos para determinado tecido ou tumor, fez surgir o interesse em radiofármacos nos quais o mesmo composto possa ser utilizado como vector tanto para diagnóstico como para terapia utilizando dois radionuclídeos diferentes: um radionuclídeo para imagiologia e outro para terapia. No entanto esta abordagem tem o inconveniente de cada radionuclídeo possuir uma química diferente o que pode afectar a biodistribuição e o mecanismo de acção do composto marcado, excepto se forem radioisótopos do mesmo elemento. Assim, os novos radiofármacos devem ter uma composição tal que permita a sua utilização simultaneamente para diagnóstico e para terapia, numa única entidade. São radiofármacos para teranóstica.

As sondas para imagiologia molecular são compostos com a particularidade de se dirigirem a alvos biológicos específicos a nível molecular. Como as alterações nos processos bioquímicos ocorrem antes das doenças atingirem um estado avançado, estas sondas permitem localizar, fazer o estadiamento, seleccionar doentes com base na previsão de resposta ao tratamento e monitorizar a eficácia terapêutica. O objectivo principal da teranóstica consiste no desenvolvimento de sondas de diagnóstico que permitam visualizar o estadio da doença associadas à aplicação de terapias específicas para melhorar a sua eficácia. Deste modo, é possível efectuar um diagnóstico personalizado de cada doente e determinar o fenótipo específico de cada doente a nível molecular, antes de iniciar o tratamento. Permite também determinar a heterogeneidade do tumor ou tecido alvo. Assim sendo, através da imagem determina-se a biodistribuição, a dosimetria, a dose máxima tolerada, a dose limite para cada órgão e a expressão e capacidade dos receptores. Com esta informação é possível identificar os alvos moleculares mais adequados e seleccionar o melhor ligando/radionuclídeo, assim como a dose mais eficaz, para cada individuo. No caso da medicina nuclear, a teranóstica refere-se frequentemente à utilização inicial de um radionuclido para diagnóstico seguido de outro para terapia personalizada. Mas o radiofármaco ideal para teranóstica deve ter na sua composição radionuclídeos que emitam simultaneamente fótons, adequados à obtenção de imagens, e partículas que possam ser úteis para terapia.<sup>68,88</sup>

## 1.4. Química e Radioquímica do Gálio(III) e do Índio(III) para Aplicação Médica

O Gálio (Ga) e o Índio (In) são elementos metálicos que pertencem ao grupo 13 da tabela periódica. Em solução encontram-se predominantemente no estado de oxidação +3. Apresentam propriedades de coordenação muito semelhantes entre si mas possuem tamanho e densidade de carga diferentes. O In(III) tem um raio iônico de 0,92 Å e o Ga (III) de 0,65 Å.<sup>68</sup> Devido ao seu raio iônico mais pequeno, o Ga(III) forma preferencialmente complexos estáveis com ligandos hexadentados enquanto que o In(III) forma complexos mais estáveis com ligandos hepta ou octadentados. São considerados ácidos duros de Lewis formando complexos estáveis com bases duras de Lewis, em particular ligandos polidentados contendo átomos doadores de oxigénio, azoto e enxofre, tais como grupos carboxilato, fosfonato, aminas.<sup>66,89</sup>

Na preparação de complexos de Ga(III) e In (III) é necessário ter em consideração duas características químicas destes metais que condicionam fortemente a síntese de complexos para aplicação clínica:

1) A elevada afinidade para o grupo OH<sup>-</sup>, numa gama alargada de valores de pH. Em solução aquosa os iões Ga<sup>3+</sup> e In<sup>3+</sup> só são estáveis em condições ácidas, a valores de pH <3. Na ausência de ligandos para estabilizar os metais, sofrem hidrólise a pH = 3-7 ocorrendo a formação de hidróxidos do tipo M(OH)<sub>3</sub> (M = Ga, In). A pH >7 estes hidróxidos solubilizam sob a forma de [M(OH)<sub>4</sub>]<sup>-</sup> podendo conduzir a processos de desmetalacão. Para evitar a ocorrência de hidrólise utilizam-se soluções de HCl sendo geralmente necessário subir o pH para uma síntese eficiente dos complexos. No caso da cinética de complexação não ser favorável, os metais podem ser estabilizados com ligandos lábeis, tais como o citrato.

2) A química de coordenação do Ga(III) e In(III) é muito semelhante à do Fe(III), em especial no caso do Ga(III) podendo ocorrer transquelatação para a transferrina, a proteína transportadora do ferro na corrente sanguínea. A transferrina contém dois locais de ligação para Fe(III) apresentando também elevada afinidade para outros metais trivalentes, como o Ga(III) e o In (III). Por outro lado, grande parte dos locais de ligação ao Fe não estão ocupados podendo coordenar com outros metais. Assim sendo, os complexos de Ga e In devem ter estabilidade termodinâmica superior à dos complexos com transferrina, ou serem cineticamente inertes, para que não ocorra permuta com esta proteína. Devido à elevada afinidade do Ga(III) e do In(III) para a transferrina, estes metais quando não complexados localizam-se *in vivo* no fígado e pulmões, órgãos com elevada capacidade de ligação à

transferrina.<sup>90-92</sup> Por este motivo, elevadas captações hepáticas ou pulmonares, após administração de complexos de Ga ou In, podem indicar instabilidade *in vivo*.

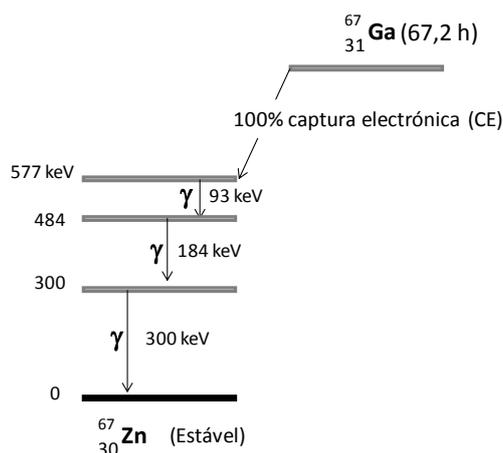
### 1.4.1. Radioisótopos de Gálio

O Ga possui três radioisótopos que poderão ser utilizados em medicina nuclear para fins de diagnóstico: <sup>66</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga e <sup>68</sup>Ga, com períodos de semidesintegração de 9,5 h, 78,3 h e 68 min, respectivamente (**tabela 1.5.**). Destes radioisótopos, o <sup>67</sup>Ga é o mais utilizado em medicina nuclear. É um emissor  $\gamma$  que decai exclusivamente por captura electrónica (**Figura 1.8.**). Os outros radioisótopos são emissores de positrões podendo ser utilizados em PET. No entanto o <sup>68</sup>Ga tem a vantagem de ser produzido em gerador de <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga (**Figura 1.9.**) o que aumenta a sua disponibilidade.

**Tabela 1.5.** Propriedades físico-químicas dos radioisótopos de Ga e In mais utilizados em medicina nuclear.<sup>79,93</sup>

Características	<sup>67</sup> Ga	<sup>68</sup> Ga	<sup>111</sup> In	<sup>113m</sup> In
Método de produção	Ciclotrão <sup>68</sup> Zn(p, 2n) <sup>67</sup> Ga	Gerador <sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga	Ciclotrão <sup>111</sup> Cd(p, 2n) <sup>111</sup> In	Gerador <sup>113</sup> Sn/ <sup>113m</sup> In
t <sub>1/2</sub>	78h	68min	67,2 h	99,8min
Tipo de energia emitida (keV)	$\gamma$ (93, 184, 300)	$\beta^+$ (1880)	$\gamma$ (171, 245)	$\gamma$ (393)
Modo de Decaimento	CE (100%)	CE (11%) $\beta^+$ (89%)	CE (100%)	TI

CE- Captura electrónica; TI- transição isomérica



**Figura 1.8.-** Modo de decaimento do  $^{67}\text{Ga}$  por captura eletrônica. (Adaptado <sup>79</sup>)

O  $^{68}\text{Ga}$  decai por desintegração  $\beta^+$  (89%) e captura eletrônica (11%) com uma energia média por desintegração de 1880 keV. É obtido, a partir de um gerador, por decaimento do  $^{68}\text{Ge}$  ( $t_{1/2} = 270,8$  d). As diferenças nas características químicas do Ge(IV) e do Ga(III) permitem uma separação eficiente dos dois radioisótopos. Assim no gerador de  $^{68}\text{Ge}/^{69}\text{Ga}$ , o  $^{68}\text{Ge}$  encontra-se numa coluna e o  $^{68}\text{Ga}$  é eluído na forma iônica com uma solução de HCl.<sup>94,95</sup>



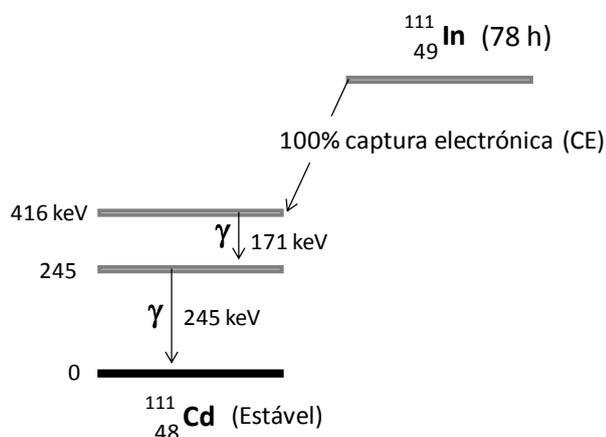
**Figura 1.9.-** Exemplo de um dos geradores de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  disponível comercialmente.

O  $^{67}\text{Ga}$  é utilizado em medicina nuclear sob a forma de citrato de gálio para diagnóstico, seguimento e monitorização da resposta terapêutica de vários tumores (*e.g.* doença de Hodgkin's, linfomas, cancro do pulmão) e na detecção de patologias associadas a processos infecciosos e inflamatórios.<sup>96-98</sup> O interesse no  $^{68}\text{Ga}$  relaciona-se com as suas características físicas adequadas à obtenção de imagens por PET com uma resolução espacial superior às imagens obtidas com compostos marcados com  $^{18}\text{F}$ , o radionuclídeo mais utilizado nesta modalidade. O desenvolvimento recente dos geradores de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  fez aumentar o interesse no desenvolvimento de novos complexos de Ga para aplicação clínica antecipando-se uma maior utilização de radiofármacos de  $^{68}\text{Ga}$  para imagiologia molecular.

Neste contexto vários péptidos, análogos da somatostatina, foram marcados com  $^{67/68}\text{Ga}$  e utilizados para detecção de tumores neuroendócrinos associados a receptores da somatostatina, designadamente o  $[\text{Tyr}^3]$ -octreótido-DOTA (DOTA-TOC; DOTA = ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) que é actualmente utilizado com sucesso na clínica, mas também o  $[\text{NaI}^3]$ -octreótido-DOTA (DOTA-NOC) e o  $[\text{Tyr}^3, \text{Thr}^8]$ -octreótido (DOTA-TATE).<sup>99-101</sup> Para além dos análogos da somatostatina, outros análogos de neuropéptidos com relevância clínica têm sido marcados com radioisótopos de Ga e avaliados em ensaios pré-clínicos e clínicos.<sup>101</sup>

### 1.4.2. Radioisótopos de Índio

O In possui dois radioisótopos com potencial interesse em medicina nuclear para fins de diagnóstico, nomeadamente  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}$ , com períodos de semidesintegração de 67,9 h e 99,8 min, respectivamente (**tabela 1.5.**). No entanto o  $^{111}\text{In}$  é único que tem sido utilizado em medicina nuclear. É um emissor  $\gamma$  que decai exclusivamente por captura electrónica emitindo radiação com energias a 171 e 245 keV (abundâncias de 89% e 95% respectivamente) (**Figura 1.10.**).



**Figura 1.10.-** Modo de decaimento do  $^{111}\text{In}$  por captura electrónica. (adaptado <sup>79</sup>)

O  $^{111}\text{In}$  é utilizado em medicina nuclear sob a forma de complexo oxina- $^{111}\text{In}$ , um precursor para marcação de leucócitos e plaquetas aplicados na detecção de processos inflamatórios e/ou infecciosos ou de trombos, respectivamente.<sup>79</sup> É igualmente utilizado nos radiofármacos específicos OctreoScan® e ProstaScint® para o diagnóstico de tumores neuroendócrinos, associados a sobre-expressão de receptores da somatostatina, e de metástases do cancro da próstata, respectivamente.<sup>79</sup>

O primeiro radiofármaco específico para receptores de péptidos, aprovado para aplicação clínica, foi o OctreoScan®. Este radiofármaco resulta da marcação com  $^{111}\text{In}$  de um análogo sintético da somatostatina, o octreótido, conjugado ao agente quelante ácido etilinoctriamino pentaacético, DTPA (pentatreótido). Este péptido possui elevada afinidade de ligação aos receptores da somatostatina do subtipo 2. Posteriormente, foram desenvolvidos outros conjugados peptídicos, análogos da somatostatina, nomeadamente o DOTA-TOC e o DOTA-TATE que apresentam maior afinidade para estes receptores e que estão actualmente em utilização clínica em vários centros hospitalares marcados com  $^{111}\text{In}$ , entre outros radionuclídeos.<sup>102-105</sup>

Outros análogos de péptidos biologicamente activos com importância clínica, designadamente análogos da bombesina, neurotensina, exedina, gastrina conjugados a diferentes quelantes bifuncionais têm sido marcados com  $^{111}\text{In}$  e estudados em ensaios pré-clínicos e clínicos.<sup>106-112</sup>

O radiofármaco ProstaScint® é um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a antigénios de membrana específicos da próstata (PSMA). Para além deste anticorpo monoclonal, estão aprovados para aplicação clínica outros dois anticorpos monoclonais, o OncoScint®, que se liga à glicoproteína TAG-72, sobre-expressa em adenocarcinomas do ovário e do cólon e recto e o MyoScint® que se liga às cadeias pesadas da miosina cardíaca, um biomarcador do enfarte agudo do miocárdio.<sup>89</sup>

### **1.4.3. Terapia Auger**

Como referido anteriormente, o  $^{111}\text{In}$  e o  $^{67}\text{Ga}$  são utilizados para imagiologia no entanto, para além de emitirem radiação gama, estes radionuclídeos emitem também 15 e 5 electrões Auger/ desintegração, respectivamente. Isto significa que podem ser potencialmente úteis para aplicações terapêuticas, se os compostos que os veicularem forem selectivos e internalizarem no núcleo das célula-alvo permitindo a interacção com o ADN.<sup>68,85,113</sup>

O interesse da aplicação clínica de moléculas biologicamente activas marcadas com  $^{111}\text{In}$ , para terapia Auger, tem sido demonstrado em vários estudos. Para potenciar esse efeito terapêutico, a investigação nesta área tem-se centrado no desenvolvimento de estratégias que permitam direccionar e aumentar a concentração do radionuclídeo no núcleo. Com esse objectivo, Ginj e colaboradores introduziram uma sequência peptídica de localização nuclear

(NLS) em análogos octreótido-DOTA tendo obtido uma internalização nuclear 45 vezes superior, assim como maior tempo de retenção, do análogo DOTA-TOC-<sup>111</sup>In contendo a NLS (H-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-OH) comparativamente ao DOTA-TOC-<sup>111</sup>In sem NLS.<sup>114</sup> Constantini e colaboradores utilizaram uma abordagem semelhante para modificar o trastuzumab tendo também encontrado um efeito citotóxico superior em células de carcinoma da mama tratadas com trastuzumab-NLS-<sup>111</sup>In, comparativamente às células tratadas com trastuzumab-<sup>111</sup>In.<sup>115</sup> Leyton e colaboradores também obtiveram resultados promissores com um anticorpo monoclonal 7G3 modificado com uma sequência peptídica NLS. Este anticorpo reconhece preferencialmente a expressão de CD123 (subcadeia  $\alpha$  do receptor da interleucina-3 [IL-3R]) na ausência de CD131 (IL-3R subcadeia  $\beta$ ) em células estaminais de leucemia. O anticorpo-<sup>111</sup>In contendo a NLS manteve a imunoreatividade para CD123 e a sua localização nuclear, em células de leucemia mielóide aguda, foi específica e mais elevada do que a do anticorpo-<sup>111</sup>In sem a NLS.<sup>116</sup> A utilização de sequências NLS tem sido bastante explorada para aumentar a translocação nuclear e potenciar o efeito terapêutico de diversos radionuclídeos emissores de electrões Auger. Esteves e colaboradores conseguiram também aumentar a localização nuclear de um análogo da bombesina conjugado a um intercalador de ADN através de uma NLS.<sup>117</sup>

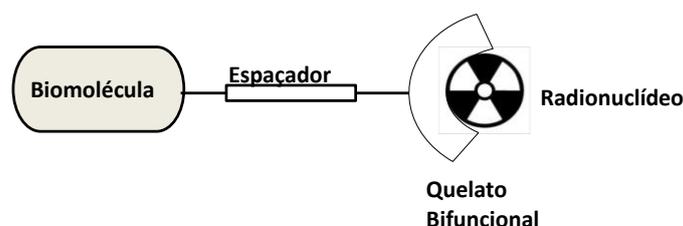
Estratégias alternativas, como a utilização de PNAs, sequências peptídicas homólogas do ADN, de origem sintética, com afinidade de ligação para determinadas sequências de ADN têm também sido utilizadas para veicular o <sup>111</sup>In para o núcleo e provocar a clivagem da molécula de ADN.<sup>118</sup>

#### 1.4.4. Concepção de radiofármacos bioespecíficos de <sup>67/68</sup>Ga ou <sup>111</sup>In

Os radionuclídeos metálicos <sup>67/68</sup>Ga e <sup>111</sup>In são bastante interessantes para o desenvolvimento de radiofármacos específicos devido às suas propriedades nucleares.

A síntese de radiofármacos de <sup>67/68</sup>Ga ou <sup>111</sup>In para aplicação biomédica requer a presença de sistemas quelantes que complexem rapidamente os radiometais, em concentrações muito baixas, de modo a impedir a ocorrência de hidrólise ou transquelatação. Para esse efeito utiliza-se geralmente a aproximação bifuncional que consiste na utilização de agentes quelantes bifuncionais para estabilizar o radionuclídeo e para se ligar a uma molécula biologicamente activa. Assim um agente quelante bifuncional caracteriza-se por possuir um grupo funcional para reagir com a biomolécula formando uma ligação covalente, e um

conjunto de átomos doadores susceptíveis de coordenar com o radionuclídeo. A biomolécula pode ser um péptido, um anticorpo monoclonal ou outra molécula com interesse biológico, como por exemplo derivados da molécula do estradiol. A sua função consiste em transportar o radionuclídeo a um alvo específico de interesse.<sup>93,119</sup> Frequentemente a ligação covalente entre a biomolécula e o ligando bifuncional é feita através de um espaçador (**Figura 1.11.**).



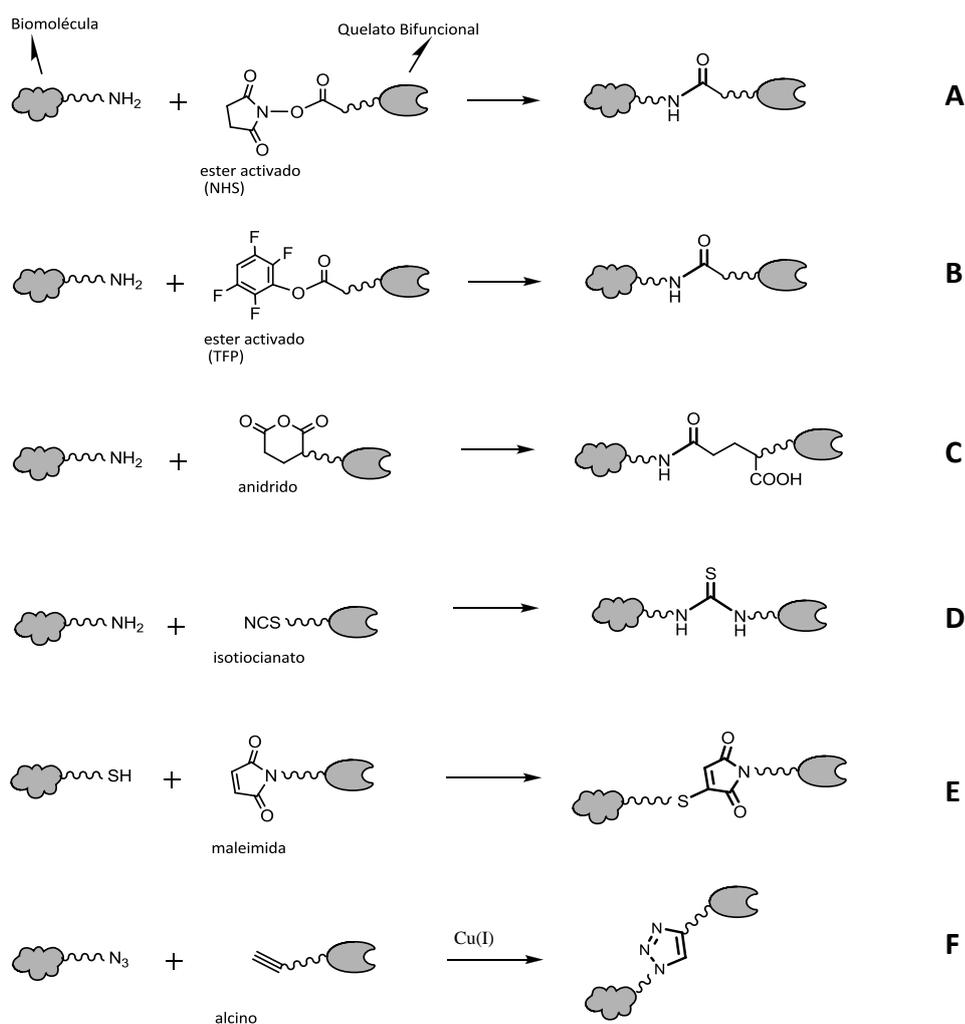
**Figura 1.11.-** Representação esquemática de marcação de uma biomolécula com um radionuclídeo metálico, utilizando a aproximação bifuncional.

#### 1.4.4.1. Espaçador

A introdução de um espaçador entre a biomolécula e a unidade quelante permite modelar as propriedades farmacocinéticas do radiofármaco. Os complexos devem ser capazes de se ligar selectivamente aos órgãos alvo durante um período de tempo suficiente para permitir a obtenção de imagens ou o efeito terapêutico desejados, mantendo uma cinética de eliminação suficientemente rápida para evitar aparecimento de efeitos secundários indesejáveis. O espaçador pode ser de natureza diversa e, consoante o comportamento biológico que se pretende, pode servir para alterar a carga global, lipofilia, rigidez, polaridade do radiofármaco ou servir apenas para afastar o centro metálico do local de interacção específica entre a biomolécula e o seu alvo. O espaçador pode ser um substituinte catiónico, aniónico ou neutro. De modo geral, uma cadeia carbonada simples, aumenta a lipofilia enquanto uma sequência peptídica pode modificar o local de captação preferencial do composto final ou alterar o seu mecanismo de excreção. Por exemplo, uma sequência contendo várias unidades de ácido aspártico torna o composto mais hidrófilico podendo melhorar, nalguns casos, a eliminação dos compostos por via renal.<sup>96</sup>

#### 1.4.4.2. Conjugação da biomolécula ao agente quelante bifuncional

O método mais usual de acoplamento de um ligando bifuncional a uma biomolécula consiste numa reacção de conjugação através de um grupo funcional. O mais utilizado é o grupo carboxílico que pode ser facilmente activado permitindo o ataque de uma amina, frequente em biomoléculas.<sup>93,120</sup> De entre as técnicas de bioconjugação mais frequentes (**Figura 1.12.**) destaca-se a reacção de conjugação entre um ácido carboxílico e uma amina primária através da formação de uma ligação amida. Esta reacção é possível após activação do carboxilato a éster activado com N-hidroxisuccinimida (-NHS), pentafluorfenol, p-nitrofenol, ou tetrafluorofenil (TFP) ou através da forma anidra do ácido que inclui anidridos simétricos ou mistos. Estas reacções são muito utilizadas por serem selectivas e ocorrerem em condições suaves. O isotiocianato (NCS) e a maleimida são também grupos funcionais muito explorados para formação de ligações tiourea e tioéter, respectivamente. Estas ligações formam-se por reacção, respectivamente, com aminas primárias e grupos tiol (SH). Outra técnica de conjugação com utilização crescente é a reacção de ciclo-adição 1,3-dipolar ("*click-chemistry*") por reacção entre um grupo azida (N<sub>3</sub>) e um alcino terminal, catalisada por Cu(I). A biomolécula também pode ser conjugada ao ligando bifuncional através de uma reacção de N-alquilação por ataque nucleófilo de uma amina primária ou secundária do ligando a um haleto de alquilo.<sup>93,120</sup>



**Figura 1.12.-** Exemplos de reacções de conjugação entre biomoléculas e agentes quelantes bifuncionais através da formação de ligações amida (A, B, C), tioureia (D), tioéter (E) e reacção de cicloadição entre uma azida e um alcino (reacção “click”, F). (Adaptado de <sup>93,120</sup>)

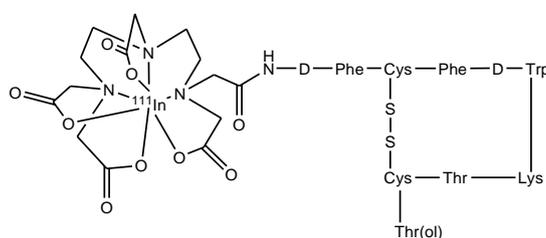
#### 1.4.4.3. Agentes quelantes bifuncionais para coordenação ao Ga(III) e/ou In(III)

Os agentes quelantes bifuncionais mais eficientes para marcação com <sup>67/68</sup>Ga e <sup>111</sup>In são os ligandos polidentados ricos em aminas e carboxilatos, ligandos poli(amino-carboxílicos).<sup>93</sup> Formam complexos com elevada estabilidade evitando a libertação do ião metálico após a sua administração *in vivo*. Quanto à sua estrutura, podem ser ligandos acíclicos que geralmente formam complexos em condições reaccionais suaves mas podem ser susceptíveis a reacções de transmetalacção e/ou transquelatacção *in vivo*. Podem também ser

ligandos macrocíclicos que são termodinamicamente mais estáveis mas necessitam de condições de complexação mais agressivas o que pode afectar a actividade biológica da biomolécula.<sup>119</sup>

Os agentes quelantes bifuncionais mais explorados para complexação com  $^{67/68}\text{Ga}$  e/ou  $^{111}\text{In}$  são o DTPA, o DOTA e o ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA).

O DTPA é o ligando acíclico mais utilizado na coordenação ao In(III), formando complexos octaédricos. Forma rapidamente complexos, à temperatura ambiente com outros metais incluindo o  $^{67/68}\text{Ga}$ . Na prática clínica, o DTPA é utilizado com sucesso nos radiofármacos OctreoScan® (**Figura 1.13.**), ProstaScint®, OncoScint®, MyoScint® e na marcação do anticorpo monoclonal transtuzumab.<sup>79,121,122</sup>

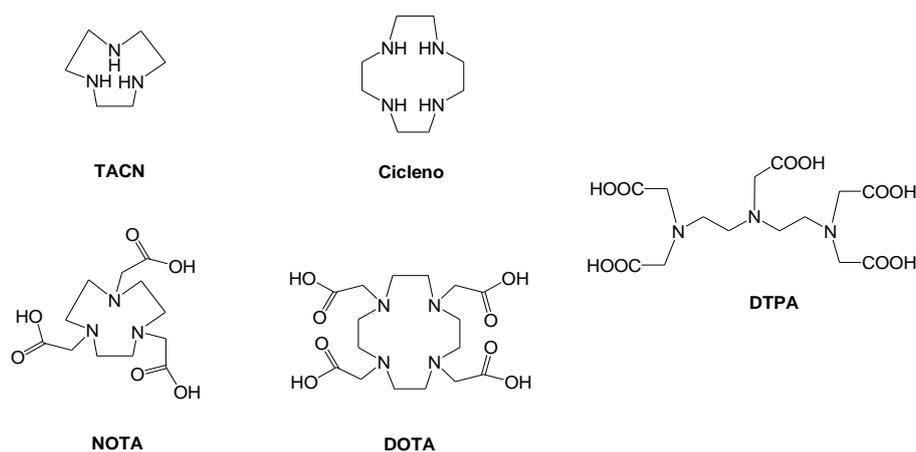


$^{111}\text{In}$ -DTPA-Octreotide (OctreoScan®)

**Figura 1.13.** - Estrutura do radiofármaco OctreoScan®

O DTPA (**Figura 1.14.**) pode ser utilizado como ligando bifuncional por simples activação de um dos ácidos carboxílicos na sua estrutura. O procedimento mais fácil para esse efeito consiste na sua modificação em anidrido misto, no entanto esta abordagem não é selectiva podendo formar-se uma mistura de conjugados mono- e di-substituídos na reacção de conjugação à biomolécula.<sup>96,119</sup> Para evitar a formação destas misturas a melhor opção é a utilização de derivados de DTPA com quatro grupos carboxilato protegidos.<sup>123</sup> Foram também sintetizados análogos de DTPA através da incorporação de um ou dois substituintes (grupos isotiocianato, aminometilfenil) nos átomos de carbono centrais.<sup>124-126</sup> Sabbah e colaboradores modificaram um anticorpo com o derivado do DTPA contendo o grupo isotiocianato ( $p$ -NCS-Bz-DTPA) e efectuaram com sucesso a sua marcação com o  $^{111}\text{In}$ . Após a administração do anticorpo verificaram um aumento da estabilidade *in vivo*.<sup>127</sup> William e Rapoport descreveram uma estratégia alternativa de síntese de análogos de DTPA que consiste na sua funcionalização com seqüências de aminoácidos (ácido glutâmico, lisina) para obtenção de ligandos bifuncionais.<sup>128</sup>

Dos ligandos macrocíclicos poli(amino-carboxílicos) mais explorados em química radiofarmacêutica, como agentes quelantes bifuncionais para complexação com metais trivalentes, destacam-se os derivados do DOTA e do NOTA.<sup>129,130</sup> Estes ligandos correspondem a derivados dos macrociclos tetraazocicloalcanos (ciclono) e triazacicloalcanos (TACN) substituídos nas aminas com 4 e 3 grupos acetato, respectivamente (**Figura 1.14.**).



**Figura 1.14.-** Estrutura química dos macrociclos ciclono e TACN e dos ligandos bifuncionais DTPA, DOTA e NOTA.

Estes ligandos devido à sua natureza cíclica, pré-organizada, são considerados mais adequados para coordenação com Ga(III) e In(III), formando complexos de elevada estabilidade termodinâmica e cinética, quando comparados com os agentes quelantes acíclicos análogos. Factores estruturais, tais como a rigidez, tamanho da cavidade do macrociclo, número de braços e a natureza dos átomos doadores têm um papel importante na estabilidade e consequentemente no comportamento radioquímico e biológico dos respectivos complexos.<sup>66,93</sup>

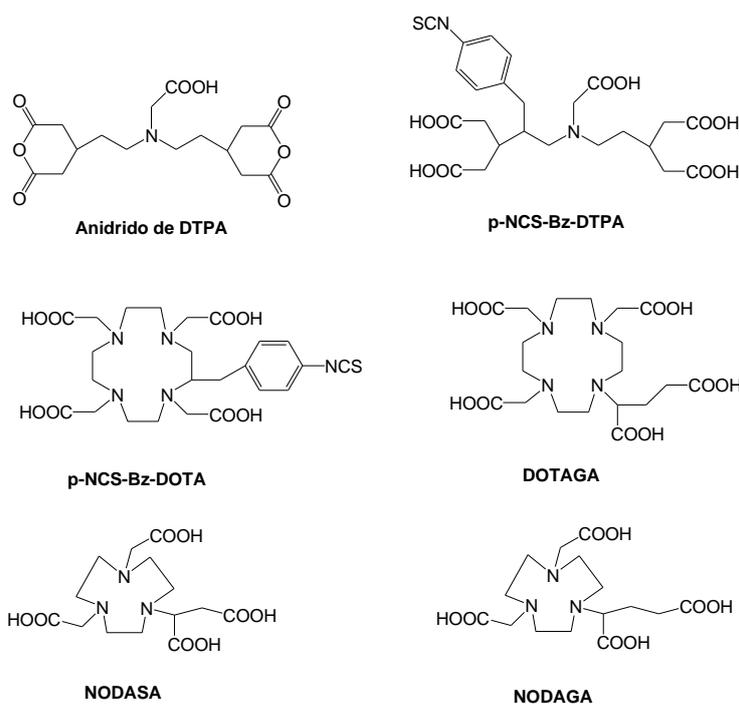
Tetrazamacrociclos e nomeadamente derivados do DOTA são dos principais ligandos utilizados em química radiofarmacêutica. O DOTA forma complexos octaédricos com o In(III), envolvendo os quatro átomos de azoto e os quatro grupos carboxilato na coordenação ao metal. Quando um grupo carboxilato forma uma ligação amida, para conjugação a uma biomolécula, a constante de estabilidade do complexo diminui embora a cinética de dissociação permaneça praticamente inalterada.<sup>119</sup> Na coordenação com o Ga(III) um dos braços substituintes fica livre podendo ser utilizado para ligação à biomolécula.<sup>131,132</sup> A principal desvantagem da utilização deste ligando está relacionada com a cinética lenta de

formação dos complexos sendo geralmente necessário recorrer a aquecimento, o que pode comprometer a marcação de biomoléculas sensíveis a temperatura. No entanto complexos resultantes de ligandos do tipo DOTA conjugados a biomoléculas têm sido amplamente estudados para aplicação em imagiologia e terapia.<sup>93,133-135</sup> Na conjugação a anticorpos é frequentemente utilizado um derivado do DOTA com um substituinte *p*-isotiocianato de benzilo (*p*-NCS-Bz-DOTA) (**Figura 1.15.**). Por outro lado, na síntese de conjugados peptídicos, em fase sólida é mais usual utilizar o derivado do DOTA com três dos seus grupos carboxilato protegidos com grupos *tert*-butilo. Outro derivado do DOTA muito utilizado na conjugação a biomoléculas é o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-glutárico-4,7,10-triacético (DOTAGA), inicialmente sintetizado por Maecke e colaboradores para a síntese de conjugados peptídicos.<sup>136</sup> Este ligando possui num dos seus braços um grupo glutarato em vez de acetato. Deste modo, este derivado possui um grupo carboxilato suplementar para conjugação à biomolécula mantendo o número de coordenação 8 para formar com o In(III) complexos octaédricos.

O NOTA é o ligando cíclico mais pequeno da família dos ligandos poli(amino-carboxílicos). Embora sendo mais adequado para coordenar com Ga(III), formando complexos hexadentados estáveis *in vivo*, também pode complexar com o In(III). A sua utilização tem a vantagem de formar complexos à temperatura ambiente. Os derivados do NOTA, ácido 1,4,7-triazaciclononano-1-glutárico-4,7-diacético (NODAGA) e ácido 1,4,7-triazaciclononano-1-succínico-4,7-diacético (NODASA) nos quais um dos braços acetato está substituído por um braço glutarato e succinato, respectivamente (**Figura 1.15.**), são particularmente apropriados para coordenar com Ga(III) devido ao tamanho da cavidade e ao facto de terem um braço suplementar para reacções de conjugação.<sup>96</sup> Recentemente foram introduzidos dois derivados do NOTA que apresentam maior selectividade para o ião Ga(III) relativamente a outros iões metálicos (*e.g.* Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>), os ligandos ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-tris [metil(2-carboxietil) fosfínico] (TRAP) e ácido 1,4,7-triazaciclononano-1-[metil(2-carboxietil)fosfínico]-4,7-bis[metil(2-carboxietil) fosfínico] (NOPO). Nestes ligandos os braços acetato foram substituídos por grupos trifosfinato.<sup>93</sup>

A selectividade dos ligandos macrocíclicos para os iões metálicos depende do raio iónico do metal e do tamanho da cavidade macrocíclica.<sup>96</sup> Por essa razão, o NOTA forma complexos mais estáveis com o Ga(III), cujo raio iónico é menor, do que com o In(III) (log K<sub>ML</sub> = 30,1 para o Ga-NOTA e log K<sub>ML</sub> = 26,2 para In-NOTA).<sup>135</sup> Por outro lado, o NOTA forma

complexos mais estáveis com o Ga(III) do que o DOTA ( $\log K_{ML} = 21,3$  para Ga-DOTA).<sup>135</sup> No caso do complexo de Ga com DOTA a cavidade do macrociclo é demasiado grande e apenas seis dos  $N_4O_4$  átomos doadores participam na coordenação ao Ga(III).<sup>96,135</sup> No entanto embora forme complexos mais estáveis do que o DOTA, o NOTA nem sempre é o melhor ligando para certas aplicações pois as diferenças de carga e as propriedades físicas dos complexos com DOTA podem ser mais adequados para administração *in vivo*.<sup>66,93</sup>



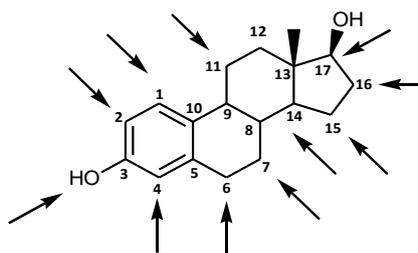
**Figura 1.15.-** Estrutura química dos ligandos bifuncionais anidrido de DTPA, p-NCS-Bz-DTPA, p-NCS-Bz-DOTA, DOTAGA, NODASA e NODAGA.

## 1.5. Derivados do Estradiol com Potencial Aplicação em Medicina Nuclear

O receptor de estrogénio constitui um bom alvo para imagiologia molecular e terapia selectiva do cancro da mama, como referido anteriormente. Nesse contexto, compostos com elevada afinidade e selectividade para o RE, marcados com radionuclídeos adequados, podem desempenhar uma função importante no diagnóstico, prognóstico, estadiamento e terapia de tumores com positividade para estes receptores. Por essa razão, tem havido intensa investigação para desenvolver radiofármacos específicos para os RE e que permitam obter informação relevante sobre o cancro da mama.

### 1.5.1. Derivados do estradiol radiohalogenados

Tendo em consideração a elevada afinidade do estradiol para o RE, alguns derivados radiohalogenados do estradiol foram sintetizados e extensivamente avaliados como potenciais radiofármacos, embora poucos tenham atingido a fase clínica.<sup>45,137</sup> A introdução de vários grupos substituintes em diferentes posições da molécula de estradiol tem permitido modular a afinidade desses compostos para o RE (**Figura 1.16.**).<sup>138-145</sup>

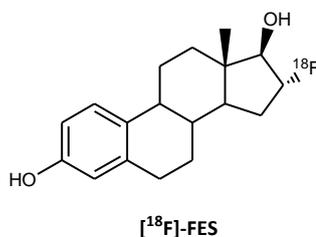


**Figura 1.16.-** Estrutura química do estradiol com as posições onde foram introduzidos substituintes.<sup>45</sup>

De entre eles destacam-se o derivado radiofluorado (<sup>18</sup>F) 16 $\alpha$ -fluoroestradiol (<sup>18</sup>F-FES) como agente de diagnóstico para PET, e os derivados radioiodados (<sup>123/125</sup>I) 16 $\alpha$ -iodoestradiol e 17 $\alpha$ -iodovinilestradióis, como potenciais agentes de diagnóstico para SPECT.

#### Derivados 16 $\alpha$ -fluoroestradiol

O composto radiofluorado <sup>18</sup>F-FES foi o derivado radiohalogenado do estradiol com comportamento mais promissor como radiofármaco de PET para imagiologia da expressão do RE (**Figura 1.17.**). A sua avaliação pré-clínica demonstrou que possuía uma elevada actividade específica, uma elevada afinidade para o RE e uma elevada fixação e selectividade para tecidos ricos em RE.<sup>146</sup> Perante estes resultados encorajadores foram realizados vários estudos clínicos.



**Figura 1.17.-** Estrutura química do 16 $\alpha$ -[<sup>18</sup>F]fluoroestradiol ([<sup>18</sup>F]-FES).

Esses estudos demonstraram a capacidade do  $^{18}\text{F}$ -FES para detectar tumores com positividade para RE e uma boa correlação entre a fixação em tumores primários e a concentração do RE, determinada por imunohistoquímica. Foi também comprovado o seu valor preditivo na resposta a hormonoterapia.<sup>16</sup> O  $^{18}\text{F}$ -FES mostrou também possuir sensibilidade para a detecção de metástases RE+ mas não pode ser utilizado de modo generalizado para excluir a presença de metástases uma vez que metástases RE- não são detectáveis.<sup>147,148</sup> No entanto, os factores que influenciam a captação do  $^{18}\text{F}$ -FES, para além da expressão do RE, não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que factores associados à terapêutica com estrogénios podem bloquear a sua captação e que níveis séricos elevados de globulina de ligação às hormonas, assim como o índice de massa corporal, se correlacionam com captação reduzida mas que o estradiol endógeno na pré-menopausa não a afectam. Por outro lado, o  $^{18}\text{F}$ -FES não permite a detecção de metástases hepáticas. Apresenta uma captação hepática elevada, devido à sua rápida metabolização *in vivo*, superior à captação no útero e na maioria das metástases, indicando que não é o radioligando ideal para a visualização de tumores RE+.<sup>149</sup>

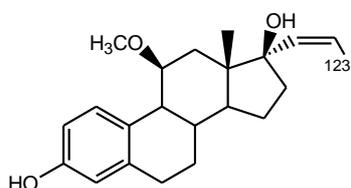
A investigação nesta área prossegue no sentido de otimizar a farmacocinética destes ligandos radiofluorados.<sup>45</sup> Por outro lado é também explorada a possibilidade de conceber e sintetizar compostos adequados para SPECT devido essencialmente à menor disponibilidade e aos elevados custos associados à utilização de radiofármacos para PET. Os estudos mais significativos incluíram derivados radioiodados embora apenas tenham sido realizados ensaios clínicos com  $16\alpha$ - $^{123}\text{I}$ ] iodoestradiol e  $17\alpha$ - $^{123}\text{I}$ ] iodovinilestradióis.<sup>148</sup>

### **Derivados $16\alpha$ -iodoestradiol**

Estudos *in vitro* e em modelo animal com  $16\alpha$ - $^{123/125}\text{I}$ ] iodoestradiol demonstraram, de modo geral, uma elevada afinidade para o RE assim como fixação e selectividade para tecidos ricos nestes receptores. Este perfil biológico promissor, associado às propriedades físicas do  $^{123}\text{I}$ , adequadas para imagiologia, conduziram a vários ensaios clínicos, realizados por diferentes grupos de investigadores, que demonstraram a sua eficácia para detectar tumores da mama que expressam RE, incluindo alguns de difícil detecção pelos métodos convencionais de diagnóstico.<sup>148</sup>

### Derivados 17 $\alpha$ -iodovinilestradiol

Os derivados radioiodados 17 $\alpha$ -iodovinilestradiol são considerados os compostos mais promissores como radiofármacos para detecção de cancro da mama, por SPECT, devido à sua elevada afinidade para o RE e comportamento biológico. Vários ensaios clínicos independentes realizados com o isómero *cis* do 11 $\beta$ -metoxi-17 $\alpha$ -iodovinil estradiol marcado com  $^{123}\text{I}$  (Z-MIVE) (Figura 1.18.) confirmaram o interesse deste composto como agente não invasivo para a detecção de RE em doentes com cancro da mama.<sup>148,150</sup> Bennink e colaboradores, num estudo clínico envolvendo 23 doentes com metástases de cancro da mama demonstraram também o valor preditivo deste composto na resposta ou resistência ao tratamento de tumores metastáticos da mama com antiestrogénios.<sup>151</sup>



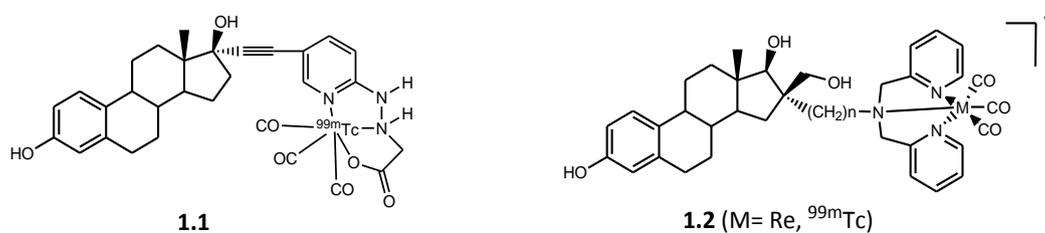
Z- $^{123}\text{I}$ -MIVE

Figura 1.18.- Estrutura química do *cis*-11 $\beta$ -metoxi-17 $\alpha$ -[ $^{123}\text{I}$ ] iodovinil estradiol (Z-MIVE).<sup>148</sup>

### 1.5.2. Derivados do estradiol marcados com radionuclídeos metálicos

Como referido anteriormente a maioria dos radiofármacos em utilização clínica incluem na sua composição radionuclídeos metálicos. Assim, nos últimos anos foram sintetizados alguns complexos metálicos e organometálicos, funcionalizados com derivados do estradiol para avaliação do seu interesse clínico no alvejamento do RE.<sup>152,153</sup> De entre esses complexos destacam-se os estudos realizados com o par Re/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$  devido às características físico-químicas e nucleares ideais do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  para medicina nuclear.<sup>154-156</sup> Nesse sentido, as estratégias mais exploradas consistiram na síntese de derivados do estradiol funcionalizados nas posições C7 $\alpha$  e C17 $\alpha$  uma vez que os ensaios de afinidade para o RE realizados anteriormente mostraram que o receptor era tolerante à introdução de substituintes relativamente volumosos nestas posições. Alguns destes compostos possuíam afinidade para o receptor, contudo os complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  não mostraram uma boa afinidade e selectividade para os tecidos ricos em RE *in vivo*, aparentemente devido a elevada lipofilia ou rápida metabolização.<sup>157-161</sup>

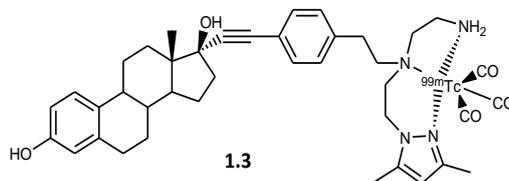
O complexo de  $\text{Re}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  que apresentou resultados mais promissores até ao momento foi o complexo organometálico de estradiol-piridino-2-il hidrazino- $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$  (**1.1**) (**Figura 1.18**).<sup>156</sup> Em ensaios pré-clínicos apresentou uma captação mediada pelo receptor, tanto em tecidos normais ricos em RE, como em tumores de adenocarcinoma da mama e em tumores primários de endométrio sugerindo o seu interesse para o diagnóstico do cancro da mama e do cancro endométrio. Apesar dos resultados promissores os autores consideraram ser ainda necessário otimizar a estrutura dos compostos para melhorar o perfil do complexo para imagiologia.<sup>156</sup> Huang e colaboradores conceberam três complexos organometálicos de  $\text{Re}/^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$  (**1.2**) ligados na posição C16 $\alpha$  tendo identificado dois com afinidade para o RE (8,6% e 25,7%).<sup>155</sup> Os complexos radioactivos apresentaram uma estabilidade elevada mostrando ser potenciais agentes de diagnóstico para o cancro da mama que expressa RE (**Figura 1.19**).



**Figura 1.19.-** Estruturas químicas do complexo estradiol-piridino-2-il hidrazino- $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$  (**1.1**)<sup>156</sup> e de um complexo de  $\text{Re}/^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$  estabilizado por um ligando tridentado e funcionalizado com 16 $\alpha$ - estradiol (**1.2**)<sup>155</sup>

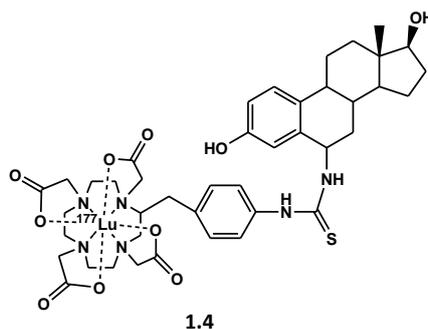
No grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do C<sup>2</sup>TN foram preparados dois novos complexos de  $\text{Re}(\text{I})/^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$  funcionalizados com 17 $\alpha$ -etinilestradiol e o seu perfil biológico avaliado para determinar o seu interesse no diagnóstico de tumores positivos para RE. Para esse efeito foram sintetizados derivados do 17 $\alpha$ -etinilestradiol conjugados a dois ligandos bifuncionais tridentados, um do tipo pirazolo-diamina (**Figura 1.20.**) e outro do tipo piridina-carboxilato. Estes conjugados reagiram com  $\text{fac}-[\text{M}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  ( $\text{M}=\text{Re}, ^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) conduzindo à formação dos complexos de  $\text{Re}(\text{I})/^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$  com elevado rendimento radioquímico e elevada estabilidade. A estrutura dos complexos foi concebida de forma a avaliar o efeito da sua carga global e/ou rigidez no comportamento biológico. Os estudos de captação celular dos complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , em células de carcinoma da mama com expressão de RE, mostraram que um dos complexos, com carga catiónica, conseguia atravessar a membrana celular acumulando-se no núcleo das células. No entanto, os ensaios de saturação dos receptores com estradiol indicaram que o processo de captação não era mediado pelo RE. Estes resultados

foram corroborados pela reduzida afinidade para o RE determinada com os complexos análogos de Re.<sup>154</sup>



**Figura 1.20.**- Estrutura química do complexo  $^{99m}\text{Tc(I)}$  funcionalizado com 17 $\alpha$ -etinil estradiol conjugado a um ligando do tipo pirazolo-diamina (**1.3**)<sup>154</sup>

A síntese de complexos metálicos funcionalizados com análogos de estradiol na perspectiva do desenvolvimento de radiofármacos para fins terapêuticos não tem sido muito explorada. Nesse sentido, Banerjee e colaboradores prepararam um conjugado de estradiol com o agente quelante bifuncional *p*-NCS-Bz-DOTA para coordenar o emissor  $\beta^-$ ,  $^{177}\text{Lu}$ , que possui propriedades adequadas para terapia.<sup>162</sup> A molécula de estradiol foi funcionalizada na posição C6 com o ligando bifuncional e o complexo de  $^{177}\text{Lu}$  sintetizado com elevado rendimento (**Figura 1.21.**). A avaliação biológica do complexo incluiu estudos de captação em células do cancro da mama MCF-7 e ensaios de ligação a um anticorpo anti-estradiol. Os resultados destes ensaios sugeriram que a captação era mediada pelo RE. Como conclusão deste estudo os autores anteciparam a preparação de outros complexos com os radionuclídeos  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{156}\text{Ho}$  e  $^{90}\text{Y}$  utilizando o mesmo conjugado estradiol-DOTA.<sup>162</sup>



**Figura 1.21.**- Estrutura química de um complexo de  $^{177}\text{Lu}$  com um conjugado de estradiol-DOTA (**1.4**)<sup>162</sup>

Para além dos estudos mencionados acima, vários complexos metálicos e organometálicos funcionalizados com derivados da molécula do estradiol têm sido concebidos e estudados para aplicação em diagnóstico ou terapêutica embora fora do âmbito da medicina nuclear, nomeadamente complexos de Eu(III) e Gd(III) com finalidade diagnóstica e complexos de Ru(III) e Pt(II) para fins terapêuticos.<sup>163-168</sup>

## 1.6. Sondas Bimodais para Imagiologia Molecular

A imagiologia molecular desempenha um papel fundamental no estudo não invasivo dos processos biológicos associados a patologias. Constitui uma área de intensa investigação sendo expectável que num futuro próximo seja possível garantir a cada doente um acompanhamento e uma opção terapêutica mais personalizada. Existem várias modalidades de imagiologia que permitem avaliar alterações morfológicas ou funcionais. No entanto, cada uma apresenta vantagens e inconvenientes intrínsecos associados à sua sensibilidade de detecção, penetração nos tecidos e resolução espacial (**tabela 1.5.**). Por exemplo a técnica nuclear PET apresenta elevada sensibilidade mas má resolução espacial. Pelo contrário, a imagiologia óptica tem uma sensibilidade relativamente boa mas a penetração nos tecidos é muito baixa. Deste modo, nenhuma das técnicas fornece toda a informação a nível funcional, estrutural e molecular.

**Tabela 1.5.-**Modalidades de diagnóstico (Adaptado de <sup>86,169</sup>)

Técnica	Fonte	Resolução	Sensibilidade	Penetração	Agente de contraste
Radiografia	Raios-X	50-200 $\mu\text{m}$	----	Alta	Iodo, $\text{BaSO}_4$
Ecografia	Ultrasons	50 $\mu\text{m}$	----	Alta	-----
Ressonância magnética	Ondas electromagnéticas	25-100 $\mu\text{m}$	mM a $\mu\text{M}$	Alta	Complexos de Gd (III)
PET	Partículas $\beta^+$	1-2 mm	pM	Alta	Radiofármacos
SPECT	Radiação $\gamma$	1-2 mm	nM a pM	Alta	Radiofármacos
Imagiologia óptica de fluorescência	UV/ IV	2-3 mm	nM a pM	< 1cm	Fluoróforos orgânicos

Para ultrapassar as limitações inerentes a cada técnica e combinar as vantagens das diferentes modalidades, nos últimos anos tem sido utilizada uma abordagem multimodal que combina no mesmo equipamento duas técnicas diferentes de imagiologia. O co-registo por diferentes técnicas de imagem permite a obtenção de informação complementar permitindo um diagnóstico mais preciso.<sup>86</sup> No entanto não existem muitas opções de sistemas de equipamento para imagem multimodal. Por outro lado se a obtenção dessa imagem envolver a

administração de dois compostos diferentes a biodistribuição é diferente para cada um deles e existe maior risco de efeitos secundários. Nesse contexto, surgiu recentemente um novo conceito no domínio das novas sondas para imagiologia, as sondas bimodais que consiste em incorporar na mesma molécula duas unidades detectáveis através de técnicas diferentes de imagem.<sup>170,171</sup>

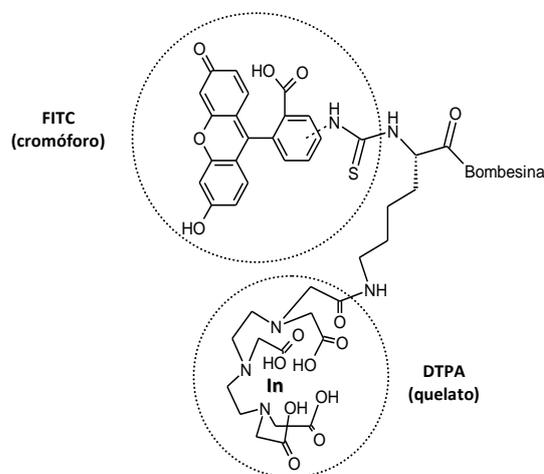
As técnicas nucleares na medida em que constituem as modalidades de imagem funcional de eleição têm sido associadas a outras modalidades que fornecem informação preferencialmente anatómica. Por exemplo, uma sonda contendo um radionuclídeo adequado para PET ou SPECT e que simultaneamente possa ser utilizada como agente de contraste para ressonância magnética (MRI), ecografia ou imagem óptica (OI) pode ser detectada por duas técnicas diferentes com um perfil de biodistribuição idêntico. As sondas bimodais para PET/MRI seriam as sondas ideais pois combinam a sensibilidade da técnica PET com a elevada resolução espacial do MRI no entanto a concepção destas sondas é altamente desafiante uma vez que a falta de sensibilidade da imagiologia por MRI requer a utilização de doses elevadas de composto. Assim, a síntese de novos compostos susceptíveis de poderem ser utilizados simultaneamente em imagiologia nuclear (SPECT e PET) e em imagiologia óptica tem merecido especial atenção nos últimos anos.<sup>172</sup> A utilização da sonda óptica, com elevada resolução espacial, permitiria validar e complementar as informações fornecidas pelo PET ou SPECT.<sup>173</sup>

A maioria dos sistemas desenvolvidos até ao momento relacionam-se com o desenvolvimento de novas sondas para estudos em pequenos animais ou *in vitro*. Trata-se de um sistema fácil e de baixo custo que permite obter rapidamente imagens ópticas. Após validação da fixação da sonda no órgão/ tecido de interesse o estudo pode ser aprofundado por técnicas nucleares. A utilização de radiofármacos está limitada pelo período de semi-desintegração do radionuclídeo, não permitindo um exames de longa duração. Pelo contrário, o sinal emitido pela sonda óptica pode ser detectado após vários dias. Assim, com sondas deste tipo é possível a aquisição de imagem rápida por PET/ SPECT. Qualquer alteração ao longo do tempo pode ser seguida por análise óptica.

Outra importante aplicação destes sistemas bimodais consiste na sua utilização durante procedimentos cirúrgicos.<sup>174</sup> Troyan e colaboradores demonstraram a eficácia de um sistema de acompanhamento cirúrgico através de imagens de fluorescência de uma que permitiu, por um lado confirmar a presença dos tumores e por outro detectar pequenas lesões tumorais não detectadas anteriormente por SPECT.<sup>174</sup>

Das várias sondas bimodais que têm sido concebidas destacam-se os sistemas contendo nanopartículas. Em 2007, Cai e colaboradores sintetizaram Quantum Dot estabilizados com derivados de DOTA funcionalizados com sequências peptídicas para marcação com  $^{64}\text{Cu}$  e demonstraram a detecção simultânea de tumores por PET e fluorescência.<sup>175</sup> Hnatowitch e colaboradores prepararam nanopartículas modificadas com streptavidina e beneficiando da afinidade desta proteína para a biotina decoraram as nanopartículas com um anticorpo anti-Her2, para permitir selectividade para o tumor, um sistema DOTA-biotina, para marcação com  $^{111}\text{In}$  e um cromóforo-biotina tendo demonstrado que era possível obter imagem simultânea por SPECT e fluorescência de tumores HER2 positivo, em modelo animal.<sup>176</sup> Apesar das elevadas taxas de fixação nas células tumorais a administração *in vivo* destas partículas coloca ainda alguns problemas que necessitam optimização. No sentido de superar este problema, a pesquisa centra-se actualmente na preparação de sondas de baixo peso molecular. Assim, vários complexos contendo radiometais ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) têm sido estudados e acoplados a diferentes fluoróforos, principalmente a cianina e a FITC.<sup>177-179</sup> Em 2002 Achilefu e colaboradores<sup>180</sup> sintetizaram sondas bimodais que incorporam simultaneamente um agente quelante (DTPA ou DOTA), um cromóforo (carbocianina ou FITC) e análogos peptídicos de bombesina, octreócio e RGD (**Figura 1.22.**)<sup>179-</sup>

181



**Figura 1.22.-** Exemplo de um sistema bimodal desenvolvido por Achilefu e colaboradores<sup>180</sup>

Kimura e colaboradores<sup>182</sup>, sintetizaram um sistema bimodal  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-Cianina e demonstraram a sua detecção por PET e fluorescência. Briechbiel e colaboradores também conceberam um agente bimodal para SPECT/imagiologia óptica que incorporava um derivado de DTPA e cianina acoplado através de um espaçador (lisina) a diferentes anticorpos com resultados preliminares bastante promissores.<sup>183</sup>



## ***Capítulo 2***

*Complexos de In(III) e de Ga(III) com  
Derivados da Molécula de Estradiol*

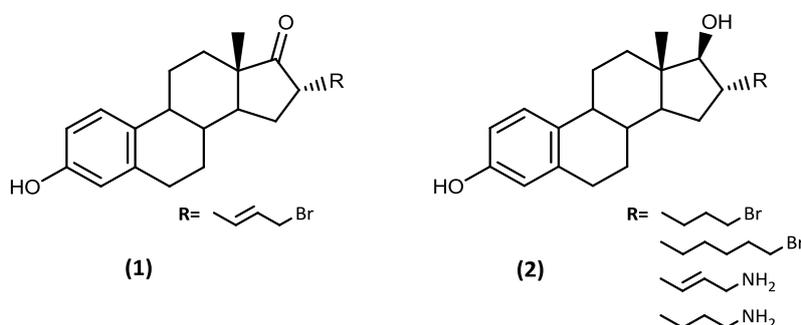


## 2. Complexos de In(III) e de Ga(III) com Derivados da Molécula de Estradiol

### 2.1. Considerações Gerais

O trabalho proposto para esta tese tem como objectivo principal o desenvolvimento de novas sondas radioactivas com base na estrutura química do estradiol e em radionuclídeos que são simultaneamente emissores de radiação gama e de electrões Auger. Nesse sentido, explorámos uma nova abordagem que consiste na utilização do estradiol para veicular os metais radioactivos  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  para os receptores estrogénicos sobre-expressos em células tumorais, tendo em vista o diagnóstico e a terapia dirigida ao cancro da mama. Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo deste trabalho que incluiu:

- Síntese e caracterização de derivados de estrona e de estradiol funcionalizados na posição C16 com diferentes grupos funcionais (**Figura 2.1.**);



**Figura 2.1.-** Representação da estrutura química dos compostos derivados de estrona (1) e estradiol (2) funcionalizados na posição C16 com diferentes espaçadores.

- Síntese e caracterização de derivados de estradiol conjugados a agentes quelantes bifuncionais: DTPA, DOTA, DOTAGA e NODAGA com reconhecidas propriedades para estabilização dos metais In e Ga (**Figura 2.2.**);

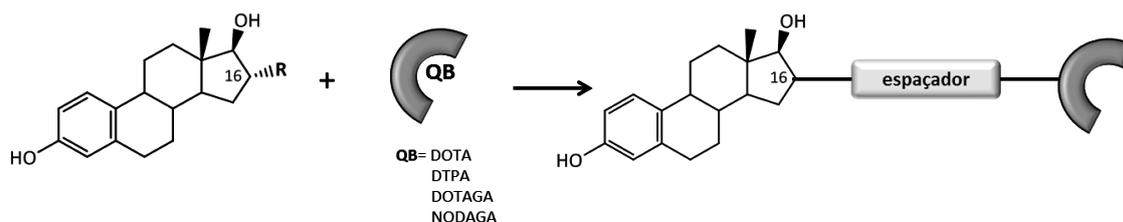


Figura 2.2.- Representação esquemática da conjugação do estradiol com diferentes quelantes bifuncionais (QB) (DTPA, DOTA, DOTAGA e NODAGA).

- Síntese e caracterização de novos complexos metálicos de In/<sup>111</sup>In e Ga/<sup>67</sup>Ga com conjugados do estradiol (Figura 2.3.);

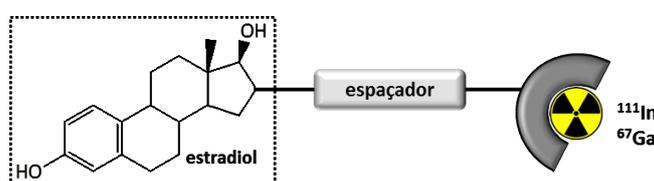


Figura 2.3.- Representação esquemática de complexos de <sup>111</sup>In e/ou <sup>67</sup>Ga com conjugados de estradiol funcionalizados na posição C16.

- Determinação da afinidade de ligação dos novos compostos para os receptores de estrogénio (RE $\alpha$  e RE $\beta$ );
- Avaliação biológica dos complexos de <sup>111</sup>In e <sup>67</sup>Ga através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

## 2.2. Síntese de Conjugados de Estradiol com Agentes Quelantes Bifuncionais

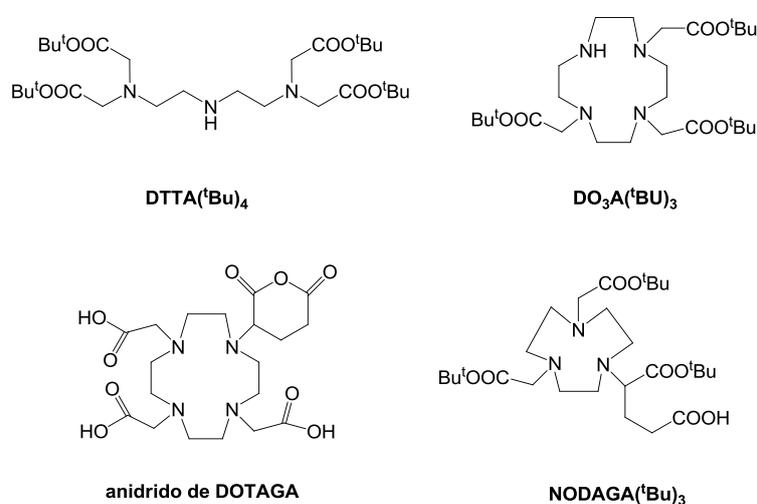
Nesta secção descreve-se a síntese de derivados de estradiol funcionalizados com diferentes substituintes na posição C16 bem como a sua conjugação a agentes quelantes bifuncionais para estabilização dos centros metálicos In(III) e Ga(III). Estes substituintes são constituídos por cadeias alquílicas, saturadas ou insaturadas, que incluem um bromo ou uma amina terminal para conjugação da biomolécula aos diferentes agentes quelantes bifuncionais. A reacção de conjugação ocorreu por 2 vias:

1) *N*-alquilação da amina secundária de um ligando estabilizador do metal, nomeadamente um análogo tetracarboxílico do DTPA, o ácido dietilenotriaminatetraacético protegido com grupos

*tert*-butilo, (DTTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub> descrita em 2.2.2.1.) ou um derivado do cicleno (DO<sub>3</sub>A(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>, descrita em 2.2.2.2.);

2) Formação de uma ligação amida entre a amina do derivado do estradiol e um dos grupos carboxilato do agente pró-quelante, designadamente o anidrido de DOTAGA (descrita em 2.2.2.3.) ou o NODAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> (descrita em 2.2.2.4.).

Na **Figura 2.4.** apresentam-se as estruturas químicas dos agentes pró-quelantes utilizados nas reacções de conjugação aos derivados de estrona ou estradiol funcionalizados na posição C16.



**Figura 2.4.-** Representação das estruturas químicas de DTTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>, DO<sub>3</sub>A(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>, anidrido de DOTAGA e NODAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> utilizados no acoplamento à biomolécula.

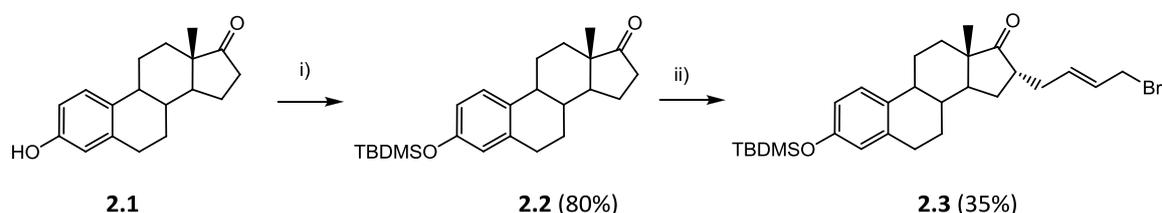
Estudos conduzidos por Huang e colaboradores com complexos metálicos de estradiol funcionalizados em C16 $\alpha$  com cadeias alquílicas de diferentes comprimentos ( $n=4, 6, 8$ ) mostraram que a afinidade de ligação destes complexos para o RE eram relativamente elevadas, com concentrações na ordem do nanomolar, indicando a capacidade do receptor para tolerar substituintes volumosos nesta posição.<sup>155</sup> Com base nestas observações seleccionámos a posição C16 para conjugação do agente quelante bifuncional. Tanto quanto se sabe, a preparação de complexos metálicos de <sup>111</sup>In e <sup>67</sup>Ga com derivados de estradiol não foi ainda descrita na literatura.

## 2.2.1. Síntese dos derivados de estradiol funcionalizados em C16

### Cadeias alquílicas insaturadas com um bromo terminal

Para posterior conjugação aos quelantes bifuncionais DTTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub> e DO<sub>3</sub>A(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> foram sintetizados alguns derivados bromados de estrona alquilados em C16. Uma vez que não é possível alquilar directamente a posição C16 da molécula do estradiol, a estrona foi escolhida como reagente de partida e alquilada via formação de um enolato. A estrona foi reduzida a estradiol num passo posterior, após a conjugação aos agentes quelantes.

No **esquema 2.1**, é apresentada a síntese do derivado de estrona funcionalizado na posição C16α com um espaçador insaturado de quatro átomos de carbono e contendo um átomo de bromo terminal necessário para a posterior *N*-alquilação do DTTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub> e do DO<sub>3</sub>A(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>. A introdução das diferentes cadeias laterais em C16 é efectuada por alquilação α da estrona no átomo de carbono 16 com formação de uma ligação carbono-carbono. Esta reacção ocorre por acção de um electrófilo activado na presença de uma base forte tal como a diisopropilamida de lítio (LDA).<sup>184</sup>



**Esquema 2.1.-** Esquema reaccional da síntese do derivado bromado (2.3).

*i) TBDMSCl, imidazolo, DMF, t.a., 6h; ii) LDA in situ, 1,4-dibromobut-2-eno, THF seco, 0°C->-45°C, 4h.*

A síntese do derivado bromado (2.3) realizou-se em dois passos, de acordo com um método descrito na literatura com ligeiras modificações.<sup>185</sup> Nesta abordagem foi usada a estrona (2.1) como reagente de partida após adequada protecção do grupo fenólico em C3, uma vez que a alquilação em C16 é realizada em condições básicas. Em meio básico, o fenol poderia sofrer substituição electrofílica por ataque do electrófilo ao fenolato intermediário. O grupo fenólico foi protegido por reacção da estrona com cloreto de *terc*-butildimetilsilano (TBDMSCl) na presença de imidazolo, obtendo-se 2.2 quantitativamente. A estrona *O*-protegida 2.2 foi caracterizada por espectroscopia multinuclear de RMN de <sup>1</sup>H estando os dados espectroscópicos consistentes com a estrutura formulada. Na zona aromática do espectro observou-se um duplete a 7,13 ppm (*J*= 8,4Hz) integrando para um protão,

correspondente ao próton aromático em C1, um duplo duplete a 6,64 ppm ( $J= 2,7\text{Hz}$ ,  $J= 8,4\text{Hz}$ ) integrando para um próton, correspondente ao próton aromático em C2 e um duplete a 6,58 ppm ( $J= 2,7\text{Hz}$ ) integrando para um próton, correspondente ao próton aromático em C4. Os sinais dos prótons metilénicos, do envelope esteróide, apareceram sob a forma de vários multipletos largos entre 1,44 e 2,80 ppm. O sinal correspondente à ressonância dos prótons metílicos em C18 aparece como um singuleto a 0,93 ppm, valor característico deste tipo de prótons, e integrando para 3 prótons. A presença do grupo *terc*-butildimetilsilano (TBDMS) foi confirmada pela observação de um singuleto a 0,20 ppm integrando para 6 prótons, atribuível aos dois grupos metilo e um singuleto a 0,99 ppm integrando para 9 prótons, atribuível ao grupo *terc*-butilo.

A alquilação de **2.2** em C16 ocorre por adição de um electrófilo activado (1,4-dibromobut-2-eno) no carbono alfa (C16), na presença de LDA sintetizada *in situ*, conduzindo à formação do brometo (**2.3**). Esta reacção ocorre segundo um mecanismo  $S_N2$  via formação de um enolato de lítio. O grupo 18-CH<sub>3</sub> na face  $\beta$  do esteróide orienta o ataque do electrófilo pela face  $\alpha$  do esteróide, estereoquimicamente menos impedida, conduzindo exclusivamente à formação do estereoisómero 16 $\alpha$  seguindo a regra da estereoselectividade.

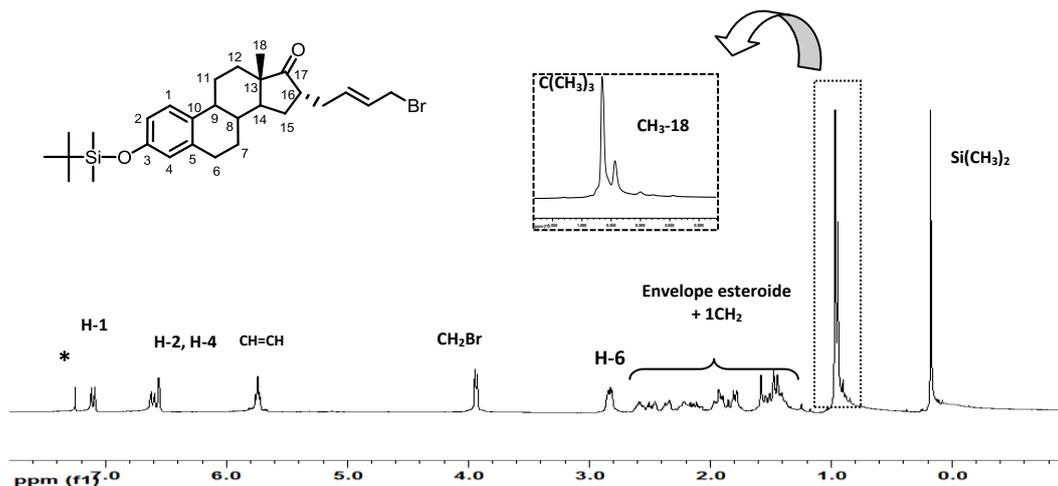
Um dos prótons acídicos em C16 é removido por acção da LDA formando um enolato de lítio, que é fortemente estabilizado por ressonância por deslocalização da carga negativa para o oxigénio electronegativo. O enolato nucleofílico ataca o brometo de alilo (1,4-dibromobut-2-eno) no carbono electrofílico adjacente ao bromo conduzindo à formação da estrona alquilada (**2.3**).

A formação do enolato constitui o passo crítico na alquilação da estrona. Quando se utilizou LDA disponível comercialmente, nas mesmas condições experimentais, não se observou formação do produto alquilado muito provavelmente pelo facto de a LDA ser pouco estável em solução. Assim, foi necessário proceder à sua síntese *in situ* por reacção de diisopropilamina com *n*-butillítio. A uma solução de LDA em THF, a 0°C, adicionou-se a estrona *O*-protegida (**2.2**). Após 1h de agitação, arrefeceu-se a mistura reaccional a -45°C e adicionou-se um excesso de 1,4-di-bromobut-2-eno para evitar a ocorrência de produtos secundários, formados por reacção do electrófilo com alguma diisopropilamina que eventualmente não tivesse reagido.<sup>185</sup>

Na literatura é referido que a alquilação de enolatos de lítio com brometos de alilo ocorre com sucesso a temperaturas inferiores a -20°C.<sup>185</sup> No entanto, no nosso caso, temperaturas superiores a -35°C, condicionaram o rendimento da reacção. Observou-se por TLC, que um aumento de temperatura, ainda que ligeiro, durante o período de reacção do

electrófilo com o enolato de lítio, conduzia ao aparecimento de vários produtos secundários que não foram identificados.

O precursor alquilado **2.3** foi obtido em quantidades moderadas após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando a mistura de solventes n-hexano/ $\text{CHCl}_3$ /éter dietílico (15:2:1) como eluente. Os dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostraram-se consistentes com a estrutura formulada. Na **Figura 2.5.** apresenta-se o espectro RMN de  $^1\text{H}$  de **2.3** em  $\text{CDCl}_3$ . A atribuição dos sinais encontra-se descrita no próprio espectro.



**Figura 2.5.**-Espectro de RMN- $^1\text{H}$ -do composto **2.3** e respectivas atribuições. (\* $\text{CDCl}_3$ )

O espectro de **2.3** foi comparado com o espectro da estrona-O-protégida **2.2**. Como se pode observar na **Figura 2.5.**, a alquilação é evidenciada pelo aparecimento de um sinal correspondente aos prótons do espaçador insaturado nomeadamente um multipletto entre 3,91 e 3,94 ppm, integrando para dois prótons, atribuível aos prótons alílicos adjacentes ao bromo terminal ( $\text{CH}_2\text{Br}$ ) e um multipletto entre 5,75 e 5,71 ppm, integrando para dois prótons, atribuível aos prótons vinílicos ( $\text{CH}=\text{CH}$ ). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  é relativamente complexo devido à sobreposição das ressonâncias dos carbonos do envelope esteróide tornando impossível a identificação inequívoca dos sinais dos dois carbonos alílicos ligados ao bromo terminal. No entanto, o aparecimento de dois sinais a 134,0 ppm e a 128,6 ppm, correspondentes aos dois carbonos vinílicos, vem confirmar a estrutura formulada. Através da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi também possível identificar, desviado para campo baixo, o sinal correspondente à ressonância do carbono carbonilo C17 a 220,9 ppm. O sinal correspondente à ressonância do carbono metílico C18 aparece desviado para campo alto a 14,6 ppm, valor característico deste tipo de carbonos.<sup>186</sup>

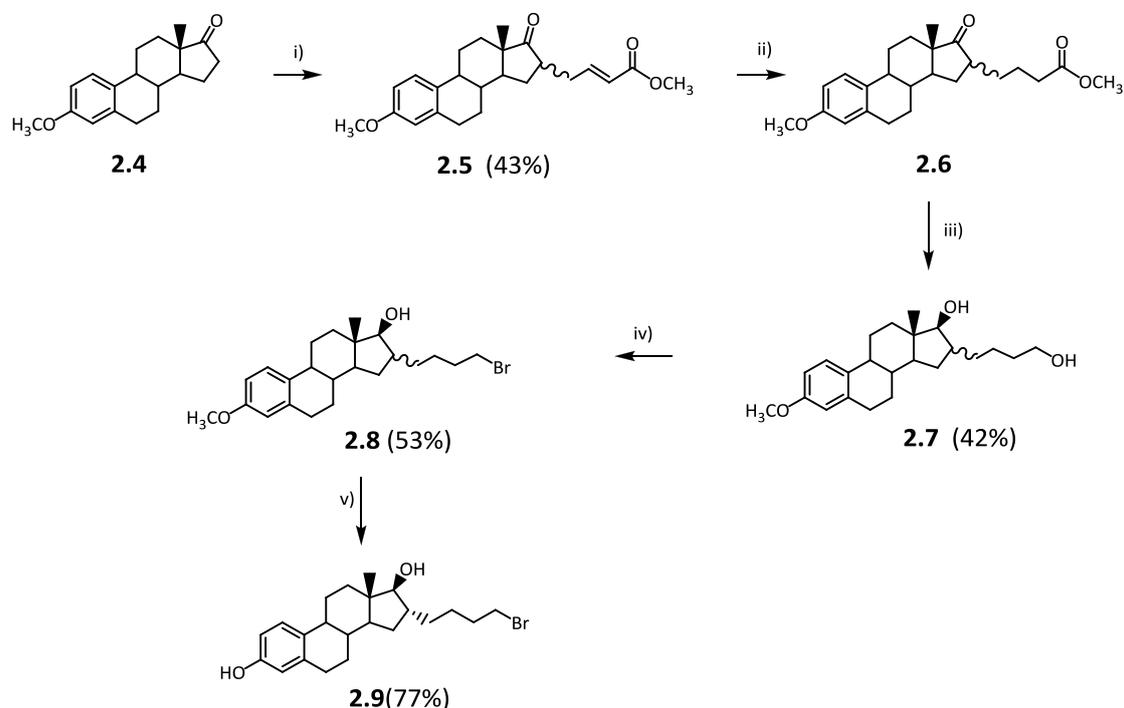
**Cadeias alquílicas saturadas com um bromo terminal**

Fevig e colaboradores observaram que a tolerância do RE para alguns derivados de estradiol substituídos em C16 $\alpha$  poderia ser influenciada pelo grau de saturação da cadeia alquílica.<sup>187</sup> No sentido de avaliar o efeito da saturação da cadeia alquílica no comportamento radioquímico e biológico dos complexos metálicos foi também sintetizado um análogo saturado de **2.3**. Tendo em consideração que a redução da dupla ligação em **2.3** pelos métodos usuais de hidrogenação catalítica (*e.g.* H<sub>2</sub>, Pd/C) iria alterar a estrutura do composto, uma vez que o brometo de alquilo seria simultaneamente reduzido a alceno, foi necessário neste caso, optar por uma estratégia de síntese diferente. A estratégia química seguida para a sua preparação está representada no **esquema 2.2**. No caso deste composto, a redução de estrona a estradiol efectuou-se simultaneamente com a redução do éster **2.6**.

Embora as alquilações  $\alpha$  de cetonas ocorram com sucesso por acção de uma base forte e um halogeneto de alquilo, no caso particular de estronas este tipo de reacção está limitada ao uso de electrófilos activados, como demonstrado por Fevig.<sup>185</sup> De facto, os brometos de alilo têm sido usados com sucesso na alquilação directa da posição C16 da estrona na presença de bases fortes, como em **2.3**, conduzindo quase exclusivamente a isómeros 16 $\alpha$ .<sup>184,185,188-192</sup> Goto e colaboradores realizaram com sucesso a síntese estereoselectiva de quatro epímeros do 17-hidroxi-16-etelestrano utilizando uma estratégia diferente à que foi utilizada.<sup>193</sup> No entanto o método seguido por estes autores não pode ser adaptado aos nossos objectivos, uma vez que se pretende alquilar o esteróide com uma cadeia versátil que permita o posterior acoplamento ao agente quelante, quer directamente quer por modificação da função terminal.

O 4-(16' $\alpha$ -estradiol)bromobutano (**2.9**) foi sintetizado com base numa modificação da estratégia de síntese desenvolvida por Tremblay e colaboradores para alquilação  $\alpha$  de estronas em C16 utilizando 4-bromocrotonato de metilo como electrófilo.<sup>184</sup> A estratégia química seguida para a sua preparação está representada no **esquema 2.2**. Após alquilação e redução da dupla ligação, o éster **2.6** foi reduzido a um álcool que foi posteriormente halogenado com tetrabrometo de carbono. Nesta estratégia de síntese optou-se por utilizar como grupo protector da função hidroxilo em C3 o grupo metoxilo, ao invés do grupo *tert*-butildimetilsilano, uma vez que nas condições reaccionais utilizadas, nomeadamente na reacção de desprotonação com hidreto de potássio, necessário na síntese de **2.11 (esquema 2.3)**, o grupo protector TBDMS não é estável.<sup>184</sup> Assim, o grupo metoxilo, mais resistente, foi utilizado como grupo protector da função fenólica da estrona em C3. Embora os compostos intermediários obtidos ao longo deste processo tenham sido sujeitos a purificação cromatográfica, não foi possível nos passos iniciais de síntese, resolver a mistura isomérica

16 $\alpha$ /16 $\beta$  em que foram obtidos, pelo que a sua caracterização por espectroscopia se revelou difícil. Apenas no passo final da sequência foi possível separar os dois isómeros e confirmar inequivocamente a configuração estereoquímica de **2.9**.



**Esquema 2.2.**- Esquema reaccional da síntese do composto **2.9**.

**i)** LDA *in situ*, BrCH<sub>2</sub>CH=CHCOOCH<sub>3</sub>, THF, -78°C->t.a.; **ii)** H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, 18h; **iii)** LiAlH<sub>4</sub>, THF, -78°C->0°C; **iv)** CBr<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C; **v)** BBr<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C.

Assim, a alquilação da 3-metoxiestrona (**2.4**) em C16 com 4-bromocrotonato de metilo, segundo o método anteriormente descrito para a síntese de **2.3**, conduziu a uma mistura isomérica de dois ésteres **2.5** (16 $\alpha$ :16 $\beta$ ; 4:1) que não foi resolvida mesmo após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel. O protão ácido em C16 poderá ser responsável por uma eventual isomerização, quer durante o processo de *work-up* quer durante a purificação cromatográfica da mistura, uma vez que neste tipo de alquilação se utilizou um ligeiro excesso de base.<sup>193</sup> No entanto, o diastereómero maioritário observado foi o 16 $\alpha$ -substituído, como antecipado pela regra da estereoselectividade referida anteriormente.

A mistura isomérica **2.5** foi analisada por espectroscopia multinuclear de RMN de <sup>1</sup>H. Comparando o espectro RMN de <sup>1</sup>H de **2.5** com o espectro da 3-metoxiestrona **2.4** a alquilação é evidenciada pelo aparecimento de sinais correspondentes aos protões do espaçador insaturado, nomeadamente um duplete a 5,86 ppm e um multiplete a 6,94 ppm, integrando para um protão cada. Observa-se também um singuleto a 3,72 ppm, integrando para três

protões, correspondente aos protões metílicos do éster. O espectro revela ainda a existência de dois singuletos a 0,79 ppm (maioritário, correspondente ao isómero 16 $\alpha$ ) e 0,76 ppm (minoritário, correspondente ao isómero 16 $\beta$ ), atribuíveis aos protões metílicos em C18 o que evidencia a presença de uma mistura isomérica. Os protões metílicos do isómero  $\beta$  estão mais blindados relativamente aos do isómero  $\alpha$  o que explica o desvio do sinal para campo mais alto.<sup>184</sup>

Os passos seguintes da estratégia consistiram numa sequência de três reduções sucessivas para a obtenção do diol **2.7**. A redução da dupla ligação em **2.5** foi realizada por hidrogenação catalisada por paládio obtendo-se **2.6** que, apesar de não ter sido isolado, foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$ , confirmando-se a redução da dupla ligação pelo desaparecimento dos sinais dos dois protões vinílicos a 5,86 ppm e a 6,94 ppm.

A redução simultânea do grupo carbonilo e da função éster em **2.6** foi realizada recorrendo a hidreto de alumínio e lítio ( $\text{LiAlH}_4$ ) como agente redutor devido à sua versatilidade, disponibilidade e facilidade de manuseamento. Assim, uma solução do crude **2.6** em THF foi tratada com  $\text{LiAlH}_4$  durante 2 horas a  $-78^\circ\text{C}$  para reduzir o carbonilo. Esta temperatura teve de ser rigorosamente controlada, de modo a permitir uma maior diastereoselectividade durante o ataque do hidreto ao carbonilo, resultando exclusivamente numa configuração 17 $\beta$ -OH e não se observando formação do isómero 17 $\alpha$ -OH. Temperaturas superiores favorecem a redução do éster pelo que o aumento da temperatura para  $0^\circ\text{C}$ , conduziu à formação duma mistura isomérica de **2.7** numa razão 16 $\alpha$ :16 $\beta$  de 3:1, que não foi separada por purificação cromatográfica. O diol **2.7** foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  e comparado com **2.6**. Da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  salienta-se o aparecimento de um tripleto a 3,65 ppm, integrando para dois protões, atribuível aos protões  $-\text{CH}_2\text{OH}$  e o desaparecimento dos protões metílicos do éster a 3,72 ppm confirmando a sua redução. A redução do carbonilo a 17 $\beta$ -OH é evidenciada pelo aparecimento de um duplete a 3,26 ppm ( $J=7,5\text{Hz}$ ), integrando para um protão, atribuível ao protão H-17 $\alpha$ .<sup>184,186</sup> A configuração estereoquímica dos carbonos C16 e C17 foi confirmada por correlação com dados espectroscópicos de RMN descritos por Goto e colaboradores para compostos semelhantes.<sup>191</sup> Segundo estes autores, que correlacionaram os desvios químicos e as constantes de acoplamento  $J_{16,17}$  de uma série de quatro epímeros 17-hidroxi-16-etilestranos, uma constante de acoplamento  $J_{16,17} = 7,5\text{Hz}$  é típica de um sistema 16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -disubstituído.<sup>191</sup> A presença do isómero 16 $\beta$  é evidenciada pelo aparecimento de um duplete com desvio químico a 3,19 ppm ( $J_{16,17} = 9,9\text{ Hz}$ ) correspondente ao protão 17 $\alpha$  acoplado a H-16 $\alpha$ . Esta atribuição é feita com base nos valores das constantes típicas de um sistema 16 $\beta$ ,17 $\beta$ -di substituído (9-10Hz).

A bromação do álcool primário da cadeia alifática em **2.7** foi realizada segundo a reacção de Appel que constitui um método suave para a conversão de álcoois nos respectivos halogenetos.<sup>194</sup> Assim, fazendo reagir o diol **2.7** com tetrabrometo de carbono (CBr<sub>4</sub>) e trifetilfosfina (PPh<sub>3</sub>) obteve-se uma mistura isomérica de brometos **2.8** (16 $\alpha$ :16 $\beta$ ; 3:1).

A reacção inicia-se com a halogenação da trifetilfosfina com tetrabrometo de carbono formando-se um sal de trifetilfosfónio, seguida da formação de um alcóxido resultante da desprotonação do álcool com tribromocarbanião. Reacção do alcóxido com o ião brometo de trifetilfosfónio conduz à formação de um intermediário oxifosfónio libertando o ião brometo. O grupo trifetiloxifosfónio é um excelente grupo abandonante, sendo facilmente eliminado após ataque nucleófilo (S<sub>N</sub>2) pelo ião brometo ao carbono electrofílico, conduzindo à formação do 3-metoxi-16 $\alpha$ -bromoalquil-estradiol (**2.8**) e de óxido de trifetilfosfina como produto secundário. Esta mistura isomérica **2.8** foi analisada por espectroscopia RMN de <sup>1</sup>H sendo a bromação do álcool evidenciada pelo desvio do sinal dos prótons adjacentes ao bromo para campo mais alto ( $\delta$  = 3,45 ppm) quando comparado com a ressonância relativa aos dois prótons CH<sub>2</sub> do álcool **2.7** ( $\delta$  = 3,65 ppm).

O último passo da sequência reaccional consistiu na hidrólise do grupo metóxilo em C3 com um ácido de Lewis forte, o tribrometo de boro (BBr<sub>3</sub>). A mistura isomérica **2.9** foi separada após purificação cromatográfica por coluna de sílica gel utilizando como eluente n-hexano:acetato de etilo (80:20). Nas condições cromatográficas utilizadas, o isómero 16 $\alpha$  é eluído em primeiro lugar. As quantidades vestigiais do isómero 16 $\beta$  não permitiram a sua recuperação. O composto **2.9** foi caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H (**Figura 2.6.**) sendo os dados espectroscópicos consistentes com a estrutura esperada. A presença de um único singuleto a 0,78 ppm correspondente aos três prótons metílicos em C18 vem confirmar a pureza isomérica de **2.9**. A configuração estereoquímica foi também evidenciada por RMN de <sup>1</sup>H, pela presença de um único duplete (J<sub>16 $\beta$ ,17 $\alpha$</sub> =7,5Hz) a 3,24 ppm, atribuível ao próton 17 $\alpha$ .

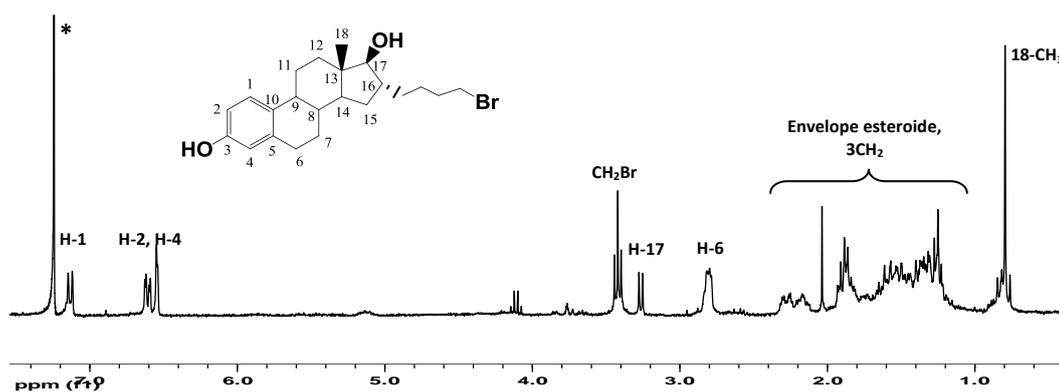


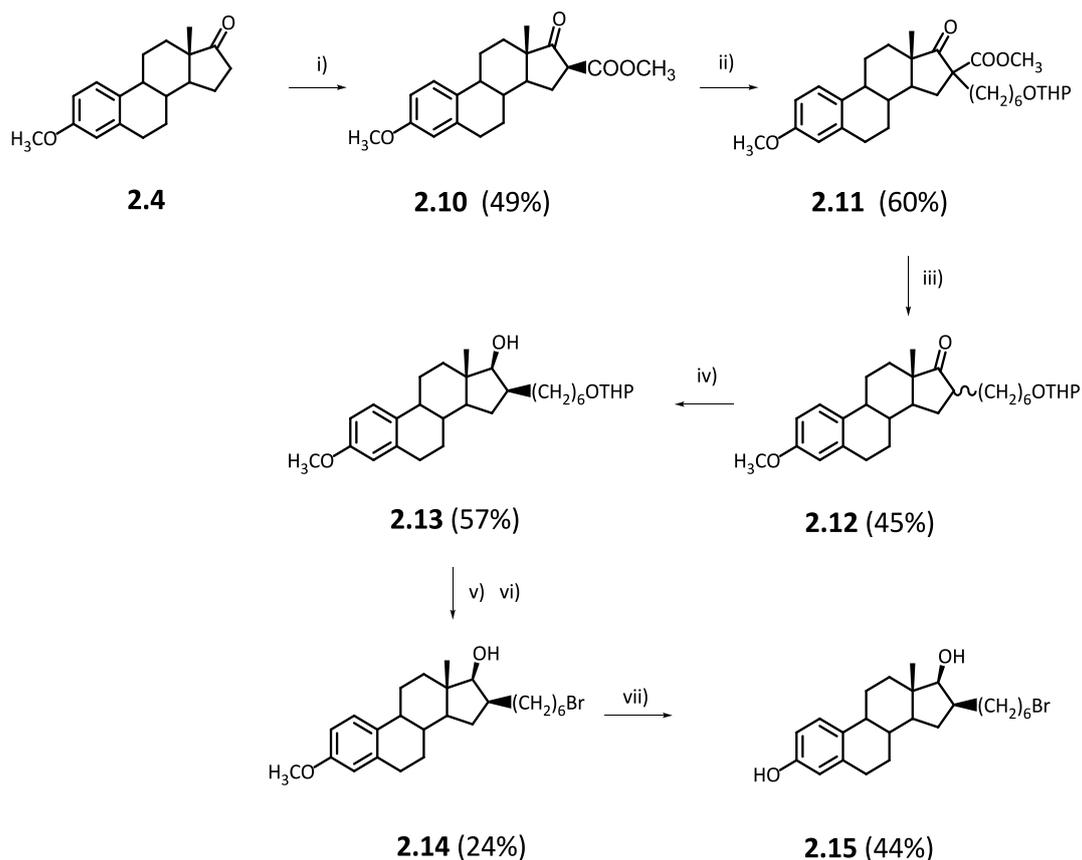
Figura 2.6.- Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2.9** atribuições principais (\* $\text{CDCl}_3$ ).

### **Cadeias alquílicas saturadas mais longas com um bromo terminal**

Estudos conduzidos por Huang e colaboradores com complexos metálicos de estradiol substituídos em C16 $\alpha$  com diferentes cadeias alquílicas demonstraram que a sua capacidade de ligação ao RE dependia do comprimento da cadeia linear.<sup>155</sup> Assim, para avaliar a influência do comprimento da cadeia alifática em C16 no comportamento biológico dos novos complexos metálicos preparou-se também um derivado estradiol com uma cadeia hexílica.

Como referido anteriormente, a alquilação de cetonas esteróides na presença de LDA está geralmente limitada a electrófilos activados e assim, apenas cadeias curtas podem ser introduzidas na posição 16 $\alpha$  do núcleo esteróide. Para a introdução de uma cadeia lateral mais longa foi definida uma estratégia diferente. Embora tenham sido referidos na literatura alguns casos específicos de alquilação  $\alpha$  directa de cetonas esteróides com electrófilos não activados<sup>195</sup> esta reacção geralmente requer a presença de um grupo carbonilo activado. Consequentemente, a introdução de um grupo metoxicarbonilo em C16, capaz de promover a enolização e subsequente alquilação da cetona menos reactiva, constitui uma boa opção tendo em conta a facilidade de remoção deste grupo.

A estratégia que se seguiu é ilustrada no **esquema 2.3**. e inclui três passos chave: 1) acilação da estrona; 2) uma segunda alquilação na posição C16 activada para introdução da cadeia linear e 3) reacção de descarboxilação, para remoção do metoxicarbonilo. Esta estratégia de síntese conduz geralmente a uma mistura de isómeros 16 $\alpha$ /16 $\beta$  (**2.12**) que eventualmente poderão ser isolados por cromatografia em coluna de sílica-gel.



**Esquema 2.3.-** Representação esquemática da síntese do composto **2.15**.

**i)** LDA *in situ*, CNCOOCH<sub>3</sub>, THF, -78°C-> t.a., 18h; **ii)** KH, éter 18-coroa-6, Br(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OTHP, THF, refluxo, 20h; **iii)** LiCl, H<sub>2</sub>O, DMF, refluxo, 2 dias; **iv)** LiAlH<sub>4</sub>, THF, -78°C-> t.a., 1h; **v)** HCl/MeOH (2:98), t.a. 12h; **vi)** CBr<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 2h; **vii)** BBr<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C-> t.a., 3h.

Assim, a posição C16 de **2.4** foi activada por acilação com cianoformato de metilo (CH<sub>3</sub>COOCN) na presença de um excesso de LDA conduzindo à formação do isómero 16β do éster **2.10**. A estrutura química e configuração 16β foi estabelecida por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H por comparação com dados espectroscópicos descritos na literatura para compostos semelhantes.<sup>193</sup> A acilação é evidenciada pelo aparecimento no espectro de RMN de <sup>1</sup>H de um singuleto a 3,74 ppm, integrando para os 3 protões, correspondentes aos protões metílicos do grupo metoxicarbonilo. O sinal do protão em C16α aparece a 3,19 ppm acoplado com os protões 15α e 15β (*J*<sub>16α,15</sub>=9,9 Hz) como um tripleto aparente.

A alquilação do éster **2.10** com o éter tetrahidropirânico do 6-bromo-1-hexanol conduziu à formação de **2.11**. Neste caso, o enolato foi preparado com hidreto de potássio na presença de éter 18-coroa-6, uma vez que a desprotonação de **2.10** não ocorre por acção de LDA, estereoquimicamente impedida. Este éter permite a complexação do ião potássio aumentando a reactividade do ião hidreto. A estrutura química de **2.11** foi determinada por

espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ . A alquilação é evidenciada pela presença de quatro multipletos integrando um protão correspondentes ao grupo OTHP e a ausência do sinal do protão H-16 $\alpha$ .

A remoção do grupo metoxicarbonilo em **2.11** foi realizada por reacção de descarboxilação de Krapcho. A reacção de Krapcho permite a descarboxilação de ésteres de ácidos carboxílicos que possuam um substituinte electrodoador no carbono  $\beta$  sem ocorrer a hidrólise do éster.<sup>196</sup> Ésteres activados, tais como os  $\beta$ -cetoésteres, sofrem descarboxilação por aquecimento em solventes dipolares apróticos (DMSO ou DMF) e/ou na presença de água por adição de sais, tais como o cloreto de sódio ou lítio e cianeto de potássio ou sódio, conduzindo à formação das respectivas cetonas. Esta reacção é termodinamicamente favorecida pela formação de cloreto de metilo e dióxido de carbono sob forma gasosa. Assim, o grupo metoxicarbonilo em **2.11** foi facilmente eliminado em solução de DMF, com cloreto de lítio (LiCl) e  $\text{H}_2\text{O}$  formando-se um enolato de lítio. Na presença de um protão no carbono  $\alpha$ , relativamente ao éster, este tipo de descarboxilação ocorre normalmente em condições suaves. No nosso caso, e uma vez que o carbono C16 é quaternário foi necessário aquecer em refluxo durante 48 horas. Após descarboxilação o enolato de lítio formado, fortemente estabilizado por ressonância por deslocalização da carga negativa para o oxigénio, é protonado, conduzindo á formação de **2.12**.

Após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel o composto **2.12** foi obtido como uma mistura isomérica (16 $\alpha$ :16 $\beta$ ; 1:4) com um rendimento moderado ( $\eta = 45\%$ ). Por análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi possível observar a existência de dois singuletos a 0,91 ppm (minoritário, correspondente ao isómero 16 $\alpha$ ) e 0,84 ppm (maioritário, correspondente ao isómero 16 $\beta$ ) atribuídos aos protões metílicos 18- $\text{CH}_3$  numa razão de 1:4. Tal como mencionado acima, o 18- $\text{CH}_3$  correspondente ao derivado 16 $\beta$ -substituído está desviado para campo alto relativamente ao derivado 16 $\alpha$ -substituído.<sup>191</sup>

O passo seguinte consistiu na redução estereoselectiva do grupo carbonilo (C17) em **2.13** a hidroxilo. Utilizando  $\text{LiAlH}_4$  como agente redutor esta reacção resulta exclusivamente na formação de isómeros de configuração 17 $\beta$ -OH. Após purificação da mistura isomérica, por cromatografia em coluna de sílica-gel, foi possível isolar e caracterizar o isómero 16 $\beta$  (**2.13**). No entanto, o isómero 16 $\alpha$  foi obtido apenas em quantidades vestigiais, não tendo sido possível isolá-lo em quantidades suficiente para prosseguir a síntese. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2.13**, observou-se apenas um singuleto a 0,74 ppm, correspondente aos protões metílicos em 18- $\text{CH}_3$ . O sinal correspondente ao protão 17 $\alpha$ -H encontra-se sobreposto com o

sinal CH<sub>3</sub> do grupo metoxilo em C3. Os restantes sinais obtidos no RMN de <sup>1</sup>H estão consistentes com estrutura proposta.

A hidrólise ácida (2% de HCl em metanol) do grupo tetrahidropiraniolo em **2.13**, seguida de bromação, por reacção de Appel, conduziu à formação de 6-(3'-metoxi-16'β-estradiol)bromohexano (**2.14**). Os dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H mostraram o desaparecimento dos sinais correspondentes aos prótons do grupo tetrahidropiraniolo e o aparecimento de um tripleto a 3,39 ppm atribuível aos prótons adjacentes ao bromo terminal, confirmando a hidrólise e a bromação.

O último passo desta síntese consistiu na hidrólise do grupo metoxilo presente em **2.14** com tribrometo de boro (BBr<sub>3</sub>) obtendo-se o produto final, 6-(16'β-estradiol)bromohexano **2.15** sob a forma de um pó branco, após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto precursor 6-(16'β-estradiol)bromohexano **2.15** é apresentado na **Figura 2.7**.

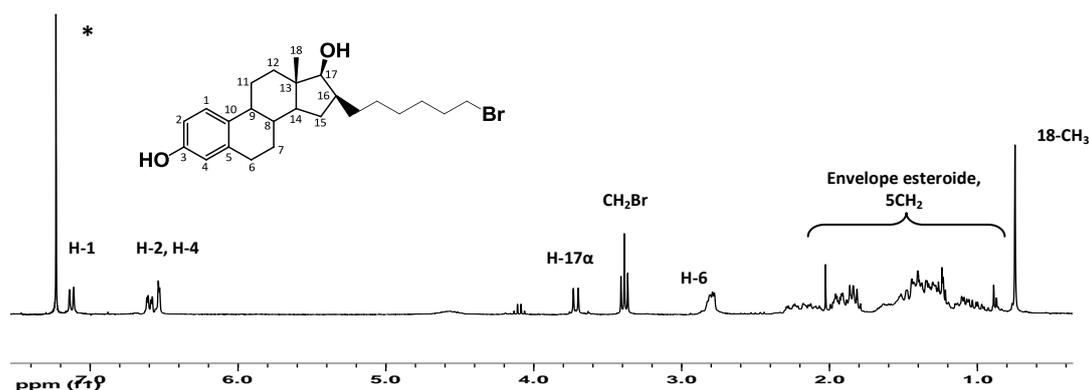
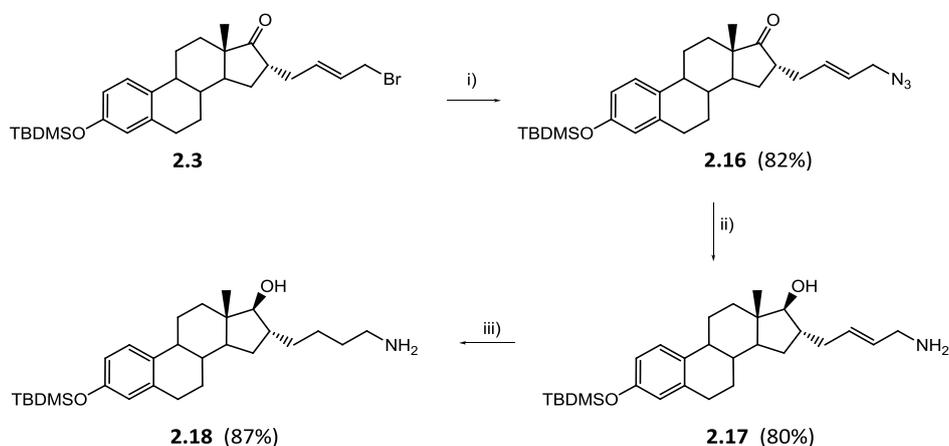


Figura 2.7.- Espectros de <sup>1</sup>H-RMN do composto **2.15** principais atribuições (\*CDCl<sub>3</sub>).

Da análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **2.15** salienta-se a existência de um tripleto a 3,34 ppm, relativo aos dois prótons adjacentes ao bromo terminal e um singuleto a 0,70 ppm, relativo aos três prótons do grupo metilo 18-CH<sub>3</sub>. O sinal relativo ao próton 17α-H surge como um duplete a 3,66 ppm com uma constante de acoplamento  $J_{16\alpha,17\alpha}=9,9$  Hz, característica de um sistema 16β,17β-disubstituído.<sup>191</sup>

**Cadeias alquílicas com aminas primárias terminais**

Para posterior conjugação aos pró-quelantes anidrido de DOTAGA e NODAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> foram também sintetizados derivados 16 $\alpha$ -alquilamina-estradiol. Uma possível estratégia a seguir seria a introdução na posição 16 $\alpha$  de cadeias ciano-alquílicas de diferentes comprimentos que por redução do grupo ciano seriam posteriormente convertidas nas correspondentes aminas. No entanto, Fevig e colaboradores demonstraram que a alquilação do enolato de lítio e de sódio da 3-metoxiestrona com  $\alpha$ -halo- $\omega$ -ciano-alcanos não é um processo fácil. De facto, as várias tentativas que efectuamos para a alquilação de **2.2** com 3-iodopropanonitrilo (I(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CN) e 5-iodopentanonitrilo (I(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CN)) também não foram bem sucedidas. Ambos os electrófilos parecem reagir com a base utilizada (LDA) na formação do enolato, conduzindo à formação de produtos secundários. Por exemplo, o 3-iodopropanonitrilo ao interagir com a base pode eventualmente sofrer eliminação conduzindo à formação de acrilonitrilo. Assim, utilizando como reagente de partida o composto **2.3**, cuja síntese foi descrita anteriormente, foram sintetizados dois derivados de estradiol funcionalizados em C16 com uma cadeia alifática de quatro átomos de carbono insaturada (**2.17**) ou saturada (**2.18**) contendo uma amina primária terminal. No **esquema 2.4**, está representado o esquema reaccional para a síntese dos derivados amina-estradiol **2.17** e **2.18**.



**Esquema 2.4.**- Esquema reaccional da síntese dos derivados de estradiol **2.17** e **2.18**.

*i) NaN<sub>3</sub>, DMSO/THF/H<sub>2</sub>O, t.a., 24h; ii) LiAlH<sub>4</sub>, THF, -78°C-> -10°C, 4h; iii) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, 18h.*

As 16 $\alpha$ -alquilaminas **2.17** e **2.18** foram sintetizadas introduzindo algumas alterações à estratégia descrita por Fevig e colaboradores.<sup>185</sup> Assim, o brometo **2.3** foi convertido na azida **2.16** por reacção com um excesso de azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) numa mistura de DMSO/THF/H<sub>2</sub>O, não se observando qualquer vestígio de epimerização em C16. A conversão em azida foi

confirmada, analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2.16**, pelo aparecimento de um multipletto, correspondente aos prótons  $\text{CH}_2\text{N}_3$ , desviado para campo mais alto ( $\delta= 3,72$  ppm) comparativamente ao sinal dos prótons  $\text{CH}_2\text{Br}$  ( $\delta= 3,93$  ppm) de **2.3**.

A redução da cetona em C17 a álcool ( $-78^\circ\text{C}$ ) seguida de redução da azida a amina por aumento de temperatura ( $-10^\circ\text{C}$ ) utilizando  $\text{LiAlH}_4$  como agente redutor, conduziu à formação da olefina **2.17** que foi posteriormente convertida no seu análogo saturado **2.18** por hidrogenação catalítica na presença de 10% Pd/C. A síntese deste análogo saturado teve como objectivo a posterior avaliação do efeito da saturação nas propriedades biológicas do complexo metálico correspondente.

As  $16\alpha$ -alquilaminas **2.17** e **2.18** foram caracterizadas por RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e ESI-MS. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  de ambos os compostos são muito semelhantes entre si. Na **Figura 2.8**, apresenta-se, a título de exemplo, o espectro de **2.18**. A presença de um multipletto entre 3,70-3,73 ppm e um triplete a 2,69 ppm referentes aos prótons  $\text{CH}_2\text{NH}_2$  nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de **2.17** e **2.18**, respectivamente, confirmam a obtenção destes dois precursores.

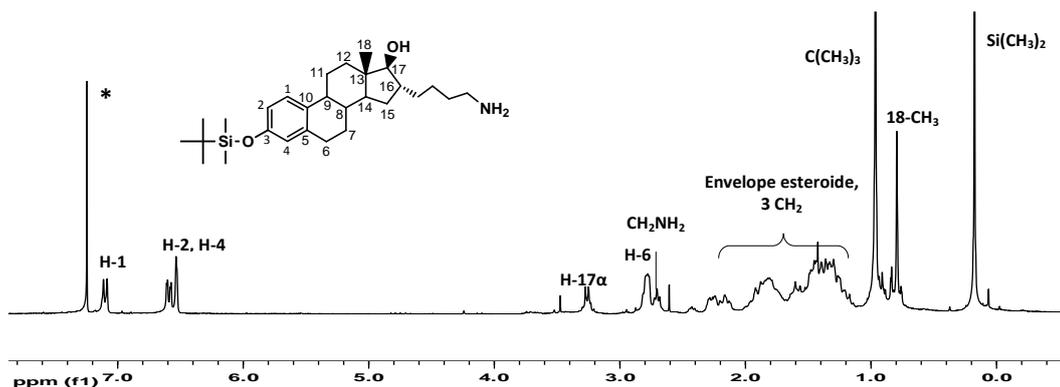


Figura 2.8.- Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN e respectivas atribuições do composto **2.18** ( $^*\text{CDCl}_3$ ).

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  destes dois precursores é também possível observar o sinal correspondente ao próton  $17\alpha\text{-H}$  ( $\delta=3,20$  ppm), com uma constante de acoplamento  $J_{17,16}=7,5$  Hz que permite confirmar a configuração estereoquímica dos carbonos C16 e C17. No caso da amina **2.17** observa-se ainda um multipletto ( $\delta= 5,60$ - $5,85$  ppm) correspondente aos dois prótons vinílicos da dupla ligação e cuja ausência no espectro de **2.18** vem atestar a redução da dupla ligação. O padrão de desdobramento dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **2.17** e **2.18** está também coerente com as estruturas esperadas. De salientar que o sinal

correspondente ao carbono C17-OH surge a 88,6 ppm comprovando que se encontra na posição  $\beta$ .<sup>191</sup>

## 2.2.2. Conjugação aos agentes quelantes bifuncionais

Como referido no capítulo introdutório, a vectorização de uma biomolécula específica com um agente quelante bifuncional permite veicular um radionuclídeo a um alvo de interesse. Um agente quelante bifuncional é caracterizado por conter na sua estrutura um grupo funcional disponível para se ligar covalentemente a uma biomolécula (*e.g.* estradiol) e um grupo de átomos doadores capazes de coordenar eficientemente um determinado metal (*e.g.*  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), conferindo ao complexo resultante a capacidade de ser reconhecido por um determinado alvo específico (*e.g.* receptores de estrogénio). Assim, tendo em consideração o objectivo final de sintetizar complexos de estradiol- $^{111}\text{In}$  e estradiol- $^{67}\text{Ga}$ , nesta secção descreve-se a síntese de derivados de estradiol conjugados a agentes quelantes bifuncionais adequados para estabilizar estes metais.

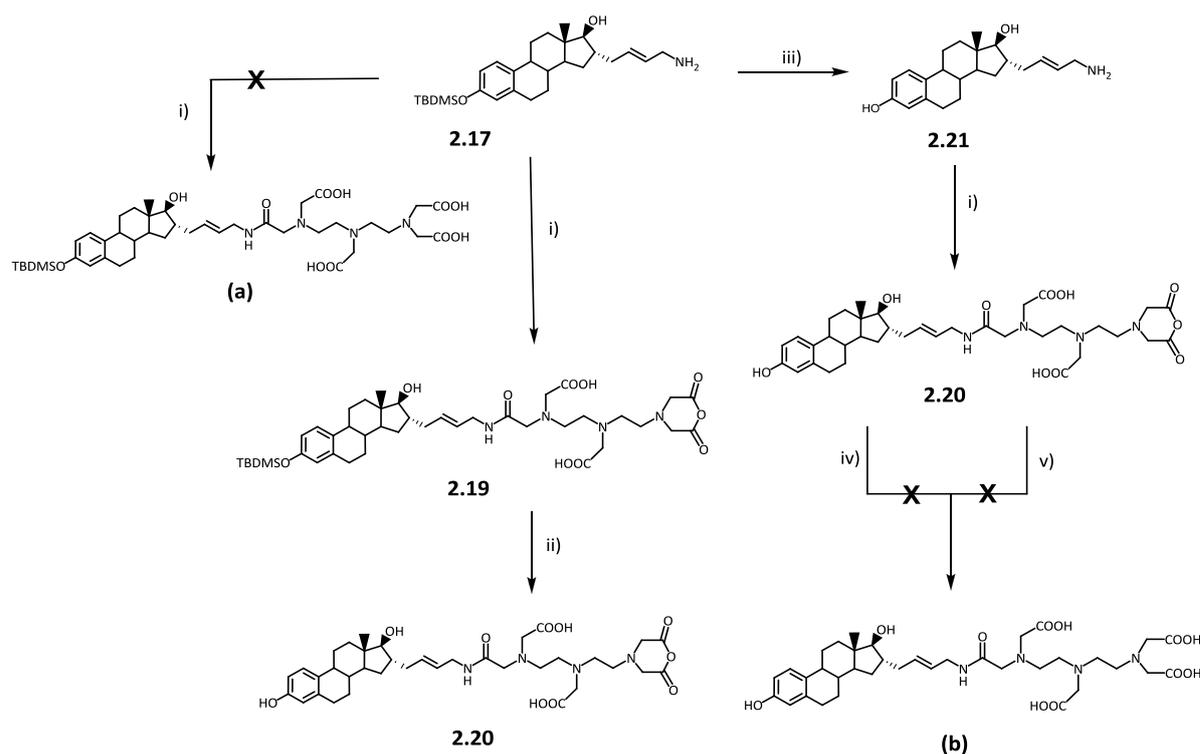
### 2.2.2.1. Síntese do conjugado estradiol-DTPA (L1)

Os agentes quelantes bifuncionais mais utilizados para estabilizar os radiometais  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  são ligandos do tipo poliaminopolicarboxilato. De entre eles, o DTPA é o ligando com estrutura acíclica mais antigo e mais estudado para marcação de biomoléculas com  $^{111}\text{In}$ . Contudo, diversos derivados deste composto têm sido propostos de modo a melhorar as estratégias de acoplamento às biomoléculas. Dos análogos do DTPA, o di-anidrido cíclico de DTPA tem sido um dos mais explorados em química de coordenação, quer pela sua disponibilidade comercial quer pela facilidade de formação de quelatos com uma grande variedade de iões metálicos. O di-anidrido de DTPA inclui na sua estrutura duas funções anidrido cíclico susceptíveis de formar ligações covalentes com um nucleófilo. As condições reaccionais de acoplamento à biomolécula são em geral optimizadas de modo a favorecer a formação da espécie mono-substituída.<sup>197</sup>

A conjugação do anidrido de DTPA ao derivado butilamina do estradiol **2.17** foi realizada segundo uma modificação do procedimento experimental descrito por Biber e colaboradores e ocorreu através da formação de uma ligação amida, por um mecanismo de adição-eliminação nucleofílica, entre o grupo amina da biomolécula e um dos carbonos carbonílicos do anidrido

cíclico.<sup>198</sup> Resumidamente, a amina que actua como nucleófilo, promove um ataque nucleofílico a um dos carbonos carbonílicos do anidrido cíclico, provocando a abertura do anel com a ligação da amina e formação de um nucleófilo no segundo carboxilato. A transferência de um protão da amina para este grupo nucleófilo conduz à formação da amida.

A estratégia seguida para a síntese do conjugado estradiol-DTPA (**b**) é apresentada no esquema 2.5.



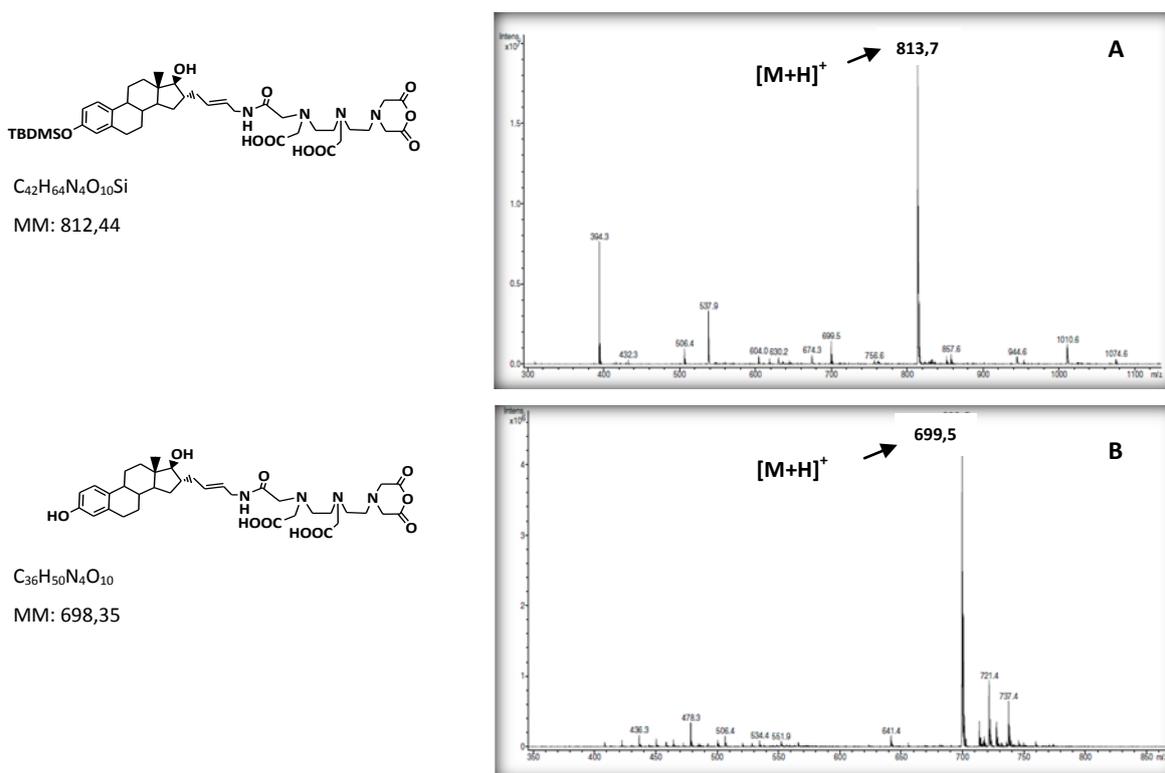
Esquema 2.5.- Estratégias de síntese do conjugado estradiol- DTPA (**b**).

**i)** di-anidrido de DTPA, Et<sub>3</sub>N, DMF, t.a., 24h; **ii)** p-TSA, CH<sub>3</sub>CN, refluxo, 24h; **iii)** HCl/MeOH (2:98 (v/v)), t.a., 6h; **iv)** Et<sub>3</sub>N, pH 12, 24h; **v)** NaOH, pH 12, t.a., 24h.

O precursor **2.17** reagiu com o anidrido de DTPA, durante 24 horas na presença de trietilamina. O anidrido foi usado em excesso relativamente a **2.17** para minimizar a formação da espécie di-substituída. A adição da base tinha como objectivo conseguir a abertura simultânea do anel anidrido por hidrólise alcalina de modo a obter o conjugado (**a**). Contudo, o anel manteve-se intacto pelo que se obteve o conjugado **2.19** sob a forma de um pó amorfo branco amarelado, solúvel em DMSO mas muito insolúvel na maior parte dos solventes orgânicos e inorgânicos.

A análise do composto por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e por espectrometria de massa revelou-se consistente com a sua estrutura. O espectro RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2.19** é relativamente complexo não permitindo uma clara atribuição de todos os sinais. No entanto, é possível observar, quando comparando com o espectro do precursor **2.17**, o aparecimento de vários multipletos entre 2,77 e 3,85 ppm, a campo mais baixo e distintos dos prótons do envelope esteróide, correspondentes aos prótons  $-\text{CH}_2$  da molécula do DTPA. A análise por espectrometria de massa ESI-MS, revelou apenas o ião molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  813,7, o que permitiu confirmar claramente a estrutura proposta (**Figura 2.9.**).

A abertura do anel do anidrido cíclico e concomitante remoção do grupo TBDMS em C3 foi tentada por hidrólise ácida com ácido *p*-toluenosulfónico (*p*-TSA) sob refluxo. No entanto os dados espectroscópicos revelaram que o anel continuou intacto ocorrendo apenas a hidrólise em C3, o que foi confirmado por análise de ESI-MS do composto **2.20** observando-se o pico correspondente ao ião molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  669,7) (**Figura 2.9.**) e pelo desaparecimento dos sinais correspondentes aos prótons do grupo TBDMS no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

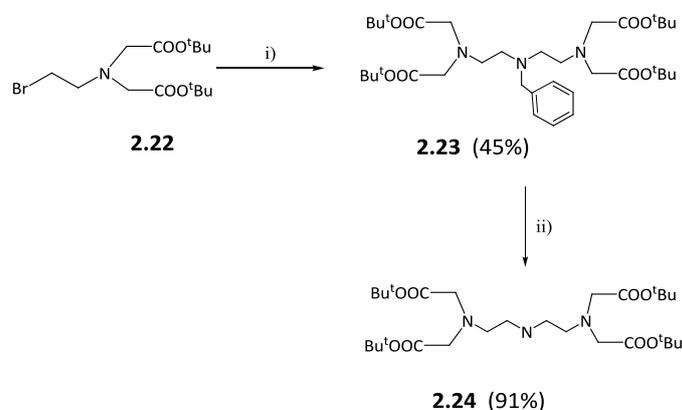


**Figura 2.9.-** Espectro de ESI-MS do composto **2.19** (A) e o composto **2.20** (B) (modo positivo).

Um dos inconvenientes associados à hidrólise ácida do grupo TBDMS em C3 é a baixa recuperação do produto hidrolisado **2.20** durante o processo de purificação cromatográfica, quer por coluna de sílica-gel quer por RP-HPLC. Para obviar esta dificuldade, tentou-se uma estratégia de síntese alternativa em que a remoção do grupo protector ocorre antes do acoplamento ao DTPA. Assim, procedeu-se à sua remoção no precursor **2.17**, por hidrólise ácida utilizando uma mistura de HCl/MeOH (2:98) obtendo-se **2.21**. De seguida procedeu-se ao acoplamento de **2.21** ao di-anidrido de DTPA nas condições descritas anteriormente (Et<sub>3</sub>N, DMF, t.a., 24h) tendo ocorrido a formação do conjugado **2.20**. No entanto, não se observou a abertura do anel do di-anidrido DTPA. Não tendo resultado a abertura do anel do conjugado **2.20** por hidrólise ácida foi experimentada uma abordagem recorrendo a hidrólise alcalina.<sup>199</sup> Apesar de terem sido testadas diferentes bases (NaOH, Et<sub>3</sub>N) também não foi possível obter o conjugado estradiol-DTPA (**b**).

Face às dificuldades encontradas na síntese do conjugado estradiol-DTPA (**b**) a partir do derivado di-anidrido, nomeadamente na abertura do anel, optou-se por uma via de síntese alternativa utilizando um análogo tetracarboxílico do DTPA, o DTTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>. Este análogo (**2.24**) está na forma de éster com os quatro grupos carboxilato protegidos com grupos *terc*-butilo. Neste caso a ligação à biomolécula ocorre por *N*-alquilação da amina secundária do DTTA por ataque nucleofílico de **2.3**. Esta via de síntese envolveu duas fases: a síntese do éster *terc*-butílico do análogo do DTTA e a sua posterior conjugação à biomolécula.

A síntese do éster **2.24**, que se encontra descrita no **esquema 2.6.**, foi realizada segundo uma estratégia descrita por Williams e Rapport para a preparação de compostos semelhantes.<sup>128</sup> A bis *N*-alquilação da benzilamina com di-*terc*-butil-2-dibromoetiliminodiacetato (**2.22**) em CH<sub>3</sub>CN, conduziu à formação de **2.23**.



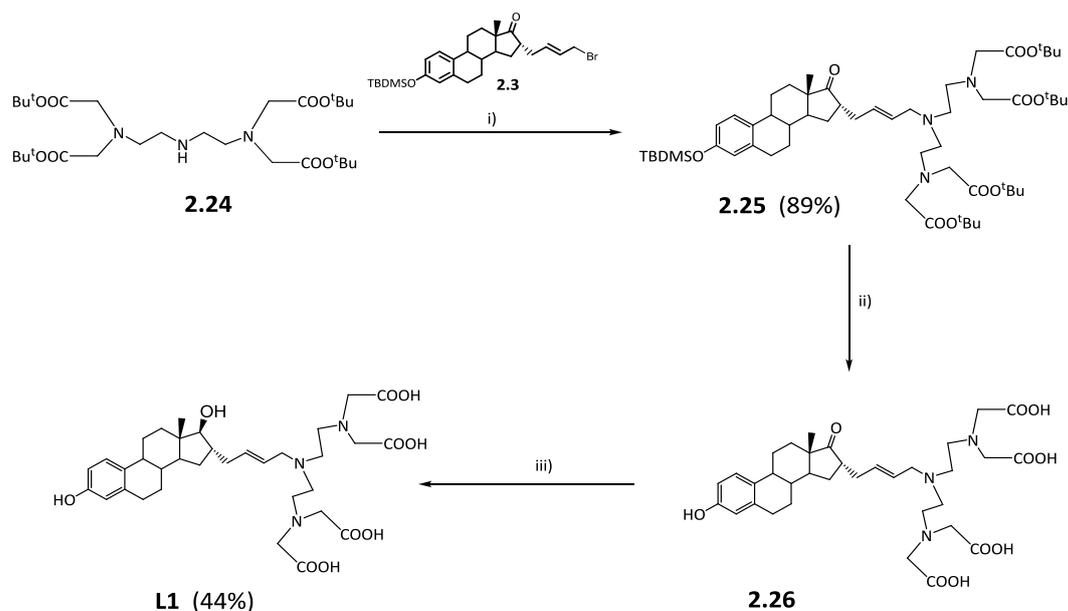
**Esquema 2.6.- Síntese do derivado DTTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub> (**2.24**).**

**i)** ArCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, DIPEIA, CH<sub>3</sub>CN, 50 °C, 12h; **ii)** H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, 24h.

Após purificação por cromatografia em coluna sílica-gel, a benzilamina bisalquilada **2.23** foi caracterizada por espectroscopia multinuclear de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e por ESI-MS. Da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observa-se a campo baixo um multipletto ( $\delta=7,19-7,27$  ppm) atribuível aos prótons aromáticos. De salientar ainda um singuleto ( $\delta=3,36$  ppm) integrando para 8 prótons correspondente aos prótons  $-\text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$  e dois tripletos ( $J=7,1$  Hz), desviados para campo mais alto ( $\delta=2,57$  ppm e  $\delta=2,79$  ppm) integrando para 4 prótons cada um, correspondentes aos prótons  $-\text{CH}_2\text{N}$ . O sinal correspondente aos 36 prótons dos grupos *terc*-butilo aparece sob a forma de um singuleto desviado para campo alto (1,38 ppm). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  é relativamente simples e é concordante com a estrutura química proposta. Este caracteriza-se por apresentar a campo baixo ( $\delta=170,7$  ppm) um sinal correspondente aos carbonos carbonilo dos quatro grupos  $-\text{COO}^t\text{Bu}$ . O sinal das ressonâncias dos carbonos terciários ( $-\text{CH}$ ) e quaternário ( $-\text{C}$ ) do anel benzílico surgem entre 126,8-128,8 ppm e 139,5 ppm, respectivamente. A 80,74 ppm aparece um sinal correspondente aos carbonos quaternários dos grupos *terc*-butílicos e entre 51,9 e 59,0 ppm aparecem os sinais correspondentes aos nove carbonos metilénicos. O sinal relativo à ressonância aos carbonos  $-\text{CH}_3$  dos grupos *terc*-butílicos surge desviado para campo alto (28,1 ppm). A observação do ião molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  650,4) no espectro de ESI-MS permitiu estabelecer claramente a estrutura de **2.23**.

Após remoção do grupo benzilo, por hidrogenação catalítica na presença de Pd/C, obteve-se o éster *terc*-butílico **2.24** que foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel. Da análise dos espectros de RMN observou-se o desaparecimento dos sinais correspondente ao anel benzílico.

Por fim, o conjugado estradiol-DTPA (**L1**) foi obtido após *N*-alquilação da amina secundária do DTTA( $^t\text{Bu}$ )<sub>4</sub> **2.24** com o derivado bromado **2.3**, seguida de hidrólise ácida para remoção dos grupos protectores, e redução selectiva em C17 (**esquema 2.7.**).



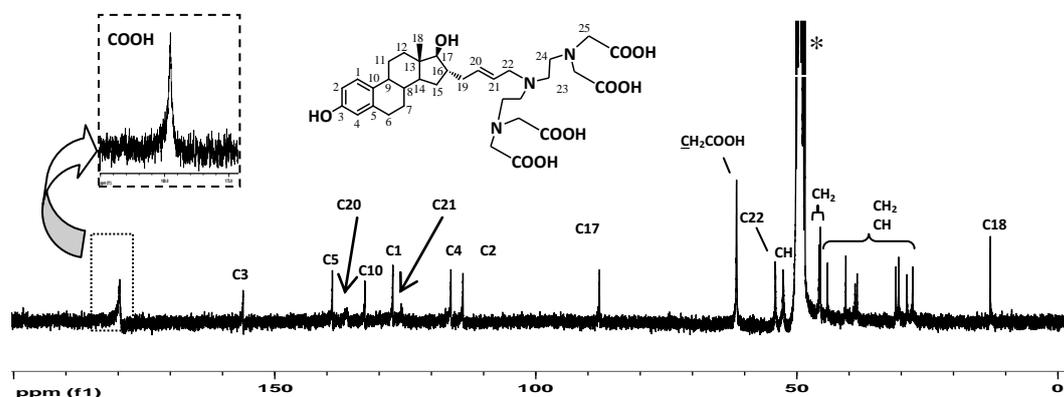
Esquema 2.7. Síntese do conjugado **L1**.

**i)** DIPEIA, composto **2.3**, CH<sub>3</sub>CN, t.a., 6h; **ii)** TFA, *i*-Pr<sub>3</sub>SiH, CH<sub>3</sub>Cl, 12h; **iii)** NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 0°C, 48h.

A reacção de *N*-alquilação de **2.24** com o precursor 16 $\alpha$ -bromo-estrone **2.3** ocorreu na presença da base *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEIA), obtendo-se o conjugado **2.25** após purificação por cromatografia em coluna sílica-gel. O conjugado **2.25** foi caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e por ESI-MS. Os espectros de RMN são relativamente complexos devido à multiplicidade de sinais na zona do envelope esteróide não permitindo a confirmação inequívoca da sua estrutura química. Contudo, é possível observar no espectro de RMN de <sup>1</sup>H a ausência do sinal relativo aos prótons adjacentes ao átomo de bromo terminal (-CH<sub>2</sub>Br) do precursor 16 $\alpha$ -bromo-estrone **2.3**. A análise do espectro de ESI-MS, revelando o ião molecular [M+H]<sup>+</sup> (m/z 996,7), confirmou a estrutura proposta.

Os grupos protectores em **2.25** foram posteriormente removidos por hidrólise ácida, com TFA, utilizando tri-isopropilsilano (*i*-Pr<sub>3</sub>SiH) como *scavenger*. O progresso da reacção foi seguido por HPLC de fase reversa (RP-HPLC). Após remoção do solvente, a mistura foi redissolvida em EtOH e procedeu-se à redução do grupo carbonilo em C17 a hidroxilo utilizando borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) como agente redutor, de forma a promover a redução selectiva do grupo carbonilo em C17 uma vez que a utilização de LiAlH<sub>4</sub> reduziria simultaneamente o grupo carboxílico a hidroxilo. O crude resultante foi purificado por coluna Sep-Pak C<sub>18</sub>. O conjugado **L1** foi obtido, sob a forma de um pó branco após liofilização, e caracterizado pelas técnicas analíticas usuais, RMN <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, ESI-MS e IV. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **L1** é muito complexo não permitindo estabelecer de modo claro a sua estrutura

química. Assim, a sua caracterização por RMN de  $^{13}\text{C}$  e ESI-MS revelou-se fundamental. Na **Figura 2.10.** está representado o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **L1**.



**Figura 2.10.-** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do conjugado **L1** e principais atribuições (\* $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  é possível observar todos os sinais esperados estando estes de acordo com a estrutura química formulada. Observa-se apenas uma ressonância a 179,6 ppm relativa aos carbonos carbonilo dos grupos carboxilato. A existência de uma só ressonância é indicativa da existência de um eixo de rotação em torno da amina terciária central, conduzindo a uma sobreposição dos sinais das ressonâncias destes carbonos. O sinal do carbono C17 aparece desviado para 87,6 ppm, relativamente a **2.27**, confirmando a redução da cetona.

A característica mais significativa do espectro de IV de **L1** é a presença de uma banda devida à vibração de extensão  $\nu(\text{C}=\text{O})$  dos grupos carboxilato a  $1564\text{ cm}^{-1}$ . É esperado um desvio desta banda aquando da coordenação de **L1** ao centro metálico. A observação no espectro de ESI-MS do ião molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  671,4) confirma a estrutura proposta para **L1**.

#### 2.2.2.2. Síntese dos conjugados estradiol-DOTA (L2-L4)

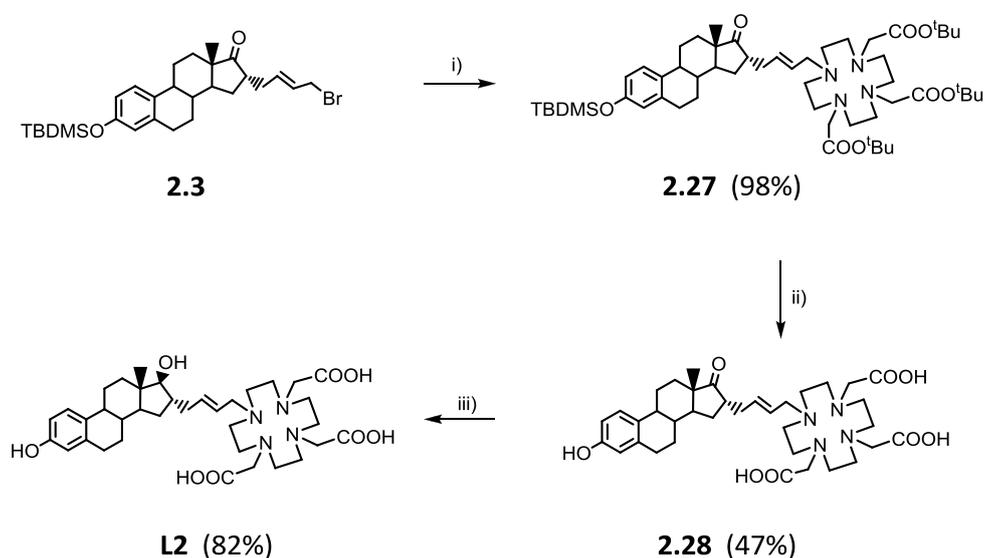
Os derivados do DOTA são frequentemente utilizados como agentes quelantes bifuncionais para marcação de diversas biomoléculas com radiometais devido às suas reconhecidas propriedades para formar complexos de elevada estabilidade termodinâmica e cinética com vários iões metálicos nomeadamente iões trivalentes, tais como o In(III) e o Ga(III).<sup>93,96,120,136,200,201</sup>

No decorrer deste trabalho foram sintetizados três novos conjugados do tipo estradiol-DOTA, em que a biomolécula e a unidade quelante estão separadas por diferentes

espaçadores (**L2-L4**), para posterior avaliação do comportamento radioquímico e biológico dos respectivos complexos de In(III) e Ga(III). Para a conjugação à biomolécula foi utilizado o derivado do DOTA,  $\text{DO}_3\text{A}(\text{tBu})_3$ . Nesta molécula, três das quatro aminas secundárias do anel cicleno estão alquiladas regioselectivamente com acetatos de *terc*-butilo, o que permite a conjugação directa e específica à biomolécula por alquilação da amina secundária livre.

### Síntese de L2

O composto **L2** é um conjugado estradiol-DOTA, que inclui na sua estrutura um espaçador insaturado de quatro átomos de carbono e foi sintetizado utilizando como precursor 4-(16' $\alpha$ -estrona)bromobut-2-eno (**2.3**). O processo de síntese está esquematizado sucintamente no **esquema 2.8**.



**Esquema 2.8.** Síntese do composto **L2**.

**i)**  $\text{DO}_3\text{A}(\text{tBu})_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $65^\circ\text{C}$ , 24h; **ii)** TFA, *t.a.*, 12h; **iii)**  $\text{NaBH}_4$ , EtOH,  $4^\circ\text{C}$ , 48h.

O primeiro passo da estratégia de síntese consistiu na *N*-alquilação da amina secundária do  $\text{DO}_3\text{A}(\text{tBu})_3$  pelo derivado **2.3** obtendo-se o conjugado **2.27**, quantitativamente. A cinética da reacção de conjugação foi controlada por RP-HPLC ( $T_R = 17,03$  min). Após purificação, por cromatografia em coluna de sílica-gel, **2.27** foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e por ESI-MS. Os dados espectroscópicos de RMN obtidos estão consistentes com a estrutura química do composto pretendido. Da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2.27** é possível observar o aparecimento de vários multipletos entre 2,59 e 3,08 ppm correspondentes aos prótons  $\text{CH}_2$  do anel macrocíclico e aos prótons  $\text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$  dos braços do anel. Observa-se também o desaparecimento do sinal correspondente aos prótons –  $\text{CH}_2$  adjacentes ao bromo terminal do precursor **2.3** e o aparecimento de um multiplete largo,

a campo mais baixo e integrando para dois prótons, correspondente ao sinal dos prótons –  $CH_2N$  ( $\delta=3,27$  ppm), o que vem confirmar a conjugação da biomolécula ao agente quelante. Desviados para campo mais alto observam-se os sinais relativos aos 27 prótons dos grupos *tert*-butilo sob a forma de um multipletto com um desvio químico entre 1,38 e 1,48 ppm. No espectro de RMN de  $^{13}C$  observam-se apenas dois sinais atribuíveis aos carbonos correspondentes aos três grupos *tert*-butilo carboxilato ( $CH_2COO^tBu$ ) a 172,95 ppm e 174,03 ppm, assim como duas ressonâncias centradas a 27,77 e 28,13 ppm devidas aos carbonos metílicos dos mesmos grupos. Este desdobramento do espectro reflecte a existência de um centro de simetria na molécula que passa pelos átomos de azoto ao qual está ligada a biomolécula e pelo átomo de azoto diametralmente oposto.

A análise por espectrometria de massa em modo positivo é consistente com a formulação proposta para o composto **2.27**, sendo de destacar os iões moleculares  $[M + H]^+$  ( $m/z$  951,7) e  $[M+Na]^+$  ( $m/z$  973,8).

Os grupos protectores *tert*-butilo e TBDMS foram removidos por hidrólise ácida, com ácido trifluoroacético (TFA) e após purificação, por coluna Sep-Pak  $C_{18}$ , obteve-se um conjugado estrona-DOTA **2.28**. A reacção de hidrólise foi controlada por análise por RP-HPLC de alíquotas da mistura reaccional ao longo do tempo tendo-se observado o aparecimento de um novo pico e a diminuição sucessiva do pico correspondente ao composto de partida (**2.27**). Da análise dos espectros de RMN de  $^1H$  de **2.28** foi possível observar o desaparecimento dos sinais correspondentes aos prótons dos grupos protectores e o desvio do sinal dos prótons –  $CH_2N$  ( $\delta=3,27$  ppm) para campo baixo ( $\delta= 4,21$  ppm).

O último passo consistiu na redução selectiva do grupo carbonilo em C17 a hidroxilo utilizando  $NaBH_4$  como agente redutor. Após purificação por coluna Sep-Pak  $C_{18}$  obteve-se o conjugado estradiol-DOTA **L2**, sob a forma de um sólido ligeiramente amarelo que foi caracterizado pelos métodos analíticos usuais (RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , ESI-MS, IV e RP-HPLC).

Os espectros de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$ , apresentados na **Figura 2.11.**, são coerentes com a estrutura proposta para o conjugado **L2**. Da análise do espectro de RMN de  $^1H$  salienta-se o aparecimento de um dupletto a 3,28 ppm ( $J_{16\alpha,17\beta}= 7,6$ Hz) correspondente ao sinal do próton H-17 $\alpha$ , confirmando a configuração 17 $\beta$ -OH esperada.<sup>191</sup>

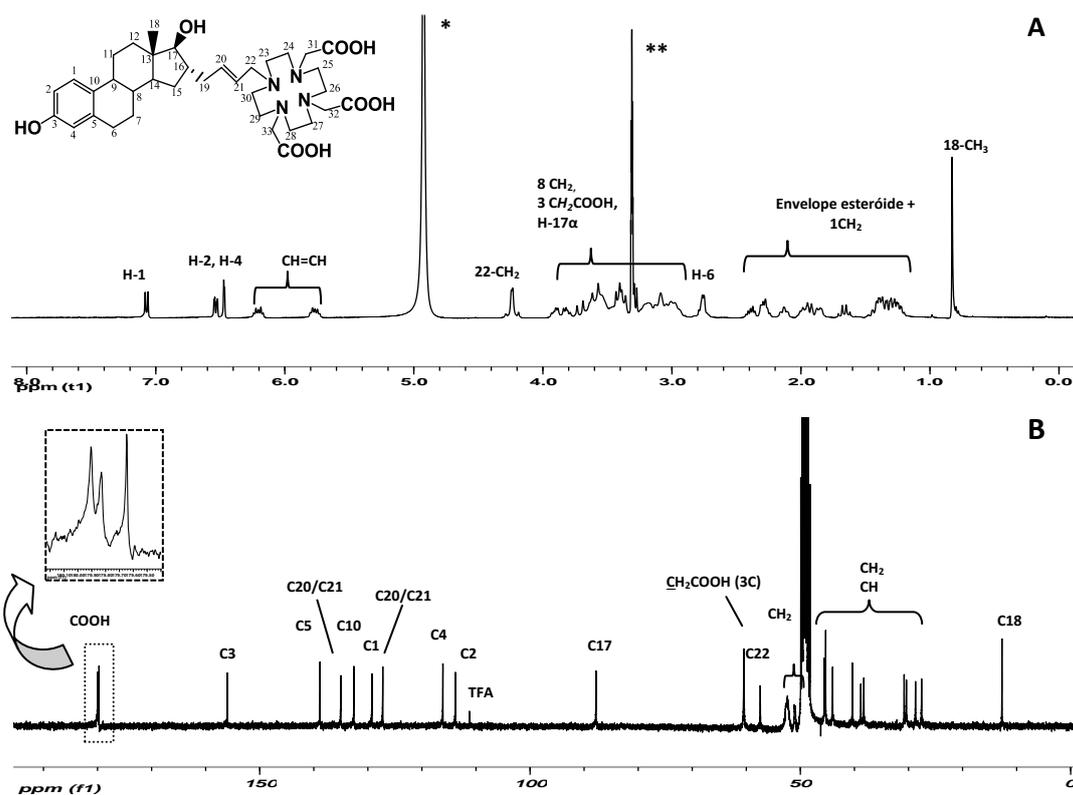


Figura 2.11.- Espectros de RMN do conjugado **L2** e respectivas atribuições: (A)  $^1\text{H}$ -RMN, (B)  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $^*\text{H}_2\text{O}(\text{CD}_3\text{OD})$ ,  $^{**}\text{CD}_3\text{OD}$ ).

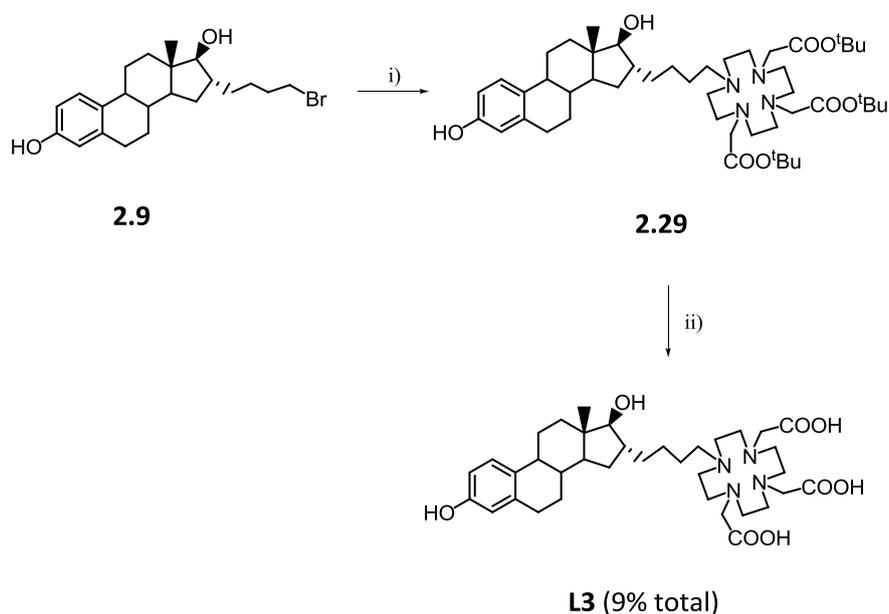
A redução da estrona é também evidenciada no RMN de  $^{13}\text{C}$  pelo desaparecimento do sinal a 225,83 ppm, correspondente ao carbonilo em C17, e pelo aparecimento de um sinal a 87,74 ppm atribuível ao mesmo carbono. Da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  verifica-se a existência de três ressonâncias relativas aos carbonos carbonilo dos grupos metilcarboxilato, com desvios químicos a 179,66 ppm, 179,85 ppm e 179,92 ppm. Este aumento de complexidade do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  relativamente ao do que foi observado para **2.27**, reflecte a não equivalência magnética dos carbonos, o que é uma forte indicação da presença de um grande número de ligandos topómeros em solução. Estas formas topoméricas deverão ter uma elevada rigidez interna devido à presença de ligações de hidrogénio entre as formas protonadas dos átomos de azoto e dos grupos carboxilatos, o que vai provocar uma diferente orientação relativa dos braços metilcarboxilato do macrociclo.<sup>202</sup>

A característica mais significativa do espectro de IV de **L2** é a presença de uma banda devida à vibração de extensão  $\nu(\text{C}=\text{O})$  dos grupos carboxilato a  $1584\text{ cm}^{-1}$  sendo esperado um desvio desta banda após coordenação de **L2** ao centro metálico. A análise por ESI-MS em

modo positivo está de acordo com a estrutura proposta para o composto **L2** sendo de destacar o íão molecular  $[M+H]^+$  ( $m/z$  671,4).

### Síntese de L3

O conjugado **L3** é o análogo saturado do conjugado **L2** e foi sintetizado em dois passos sequenciais por *N*-alquilação da amina secundária do  $DO_3A(tBu)_3$  com o precursor 4-(16' $\alpha$ -estradiol)bromobutano (**2.9**) seguida de hidrólise ácida com TFA, para a remoção dos grupos *tert*-butilo (**esquema 2.9**). Embora o composto intermediário **2.29** não tenha sido isolado nem caracterizado, toda a sequência reaccional foi monitorizada por RP-HPLC tendo-se observado, ao longo do processo, a formação de alguns produtos secundários não identificados.



#### Esquema 2.9. Síntese do conjugado L3.

i)  $DO_3A(tBu)_3$ ,  $K_2CO_3$ ,  $CH_3CN$ ,  $65^\circ C$ , 24h; ii) TFA, t.a., 12h.

O conjugado **L3** foi isolado da mistura reaccional por purificação cromatográfica em RP-HPLC, tendo sido obtido após liofilização, sob a forma de um sólido ligeiramente amarelo, com um baixo rendimento total (9%). Uma vez que o intermediário **2.29** não foi isolado da mistura reaccional não foi possível concluir se o baixo rendimento obtido é devido à reacção de conjugação ou à hidrólise.

O composto **L3** foi caracterizado pelos métodos analíticos usuais em química, tais como RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$ , IV, ESI-MS e RP-HPLC, que confirmaram inequivocamente a estrutura molecular do composto. Os espectros de RMN de **L3** são muito semelhantes ao do composto **L2**. Da análise do espectro de RMN de  $^1H$  de **L3** observa-se o desaparecimento do

sinal correspondente aos prótons  $-CH_2$  adjacentes ao bromo terminal do precursor **2.9** ( $\delta=3,41$  ppm) e o aparecimento a 4,19 ppm de um multipletto largo, correspondente aos dois prótons da ligação  $-CH_2N$  o que vem confirmar a conjugação da biomolécula ao agente quelante. Os sinais correspondentes aos prótons  $CH_2$  do anel macrocíclico e aos prótons  $CH_2COOH$  dos braços do anel surgem sob a forma de vários multipletos entre 3,06 e 3,61 ppm. No espectro de RMN de  $^{13}C$  de **L3** observam-se todos os sinais esperados estando estes concordantes com a estrutura química formulada. Comparativamente ao espectro de RMN de  $^{13}C$  de **L2**, no espectro de **L3** observam-se apenas duas ressonâncias relativas aos carbonos carbonilo dos grupos carboxilato ( $\delta=169,78$  ppm e  $174,81$  ppm) sugerindo a existência de um processo dinâmico entre as várias espécies topoméricas coexistentes em solução, que ocorre rapidamente na escala de tempos do RMN. Para além disso, a não existência de uma ligação insaturada no espaçador introduzido na biomolécula contribuiu igualmente para a maior rapidez deste processo relativamente ao observado para **L2**.

A característica mais significativa do espectro de IV de **L3** é a presença de uma banda devida à vibração de extensão  $\nu(C=O)$  dos grupos carboxilato a  $1649\text{ cm}^{-1}$  sendo esperado um desvio desta banda após a coordenação de **L3** ao centro metálico. No espectro de ESI-MS de **L3** o pico de maior intensidade corresponde ao respectivo ião molecular  $[M+H]^+$  ( $m/z$  673,6), como se pode verificar pela análise do espectro (**Figura 2.12.**).

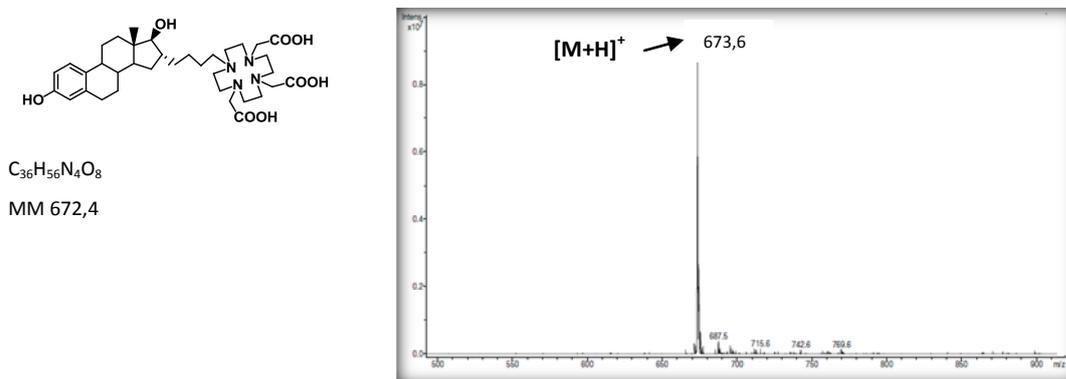
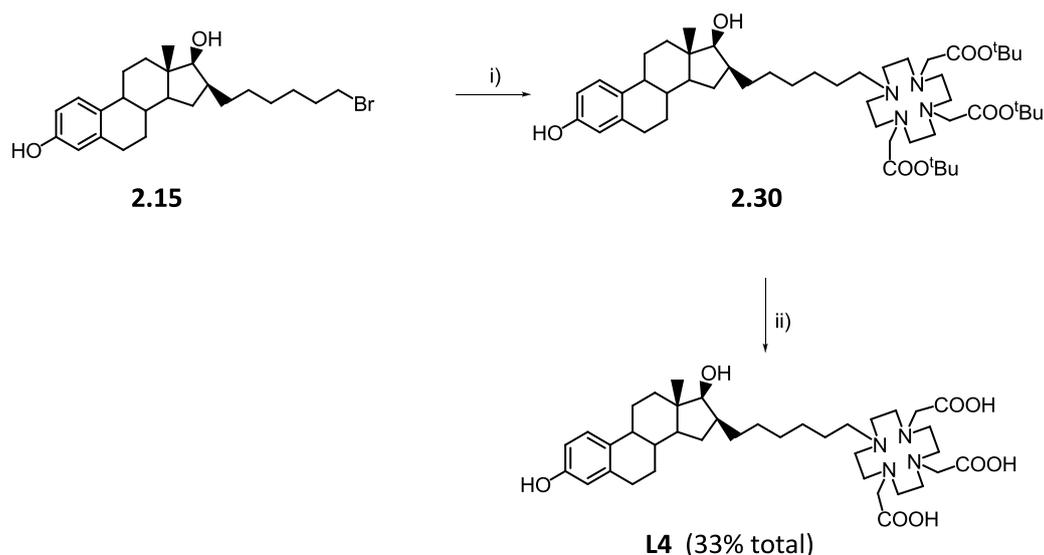


Figura 2.12. Espectro de ESI-MS do conjugado **L3** (modo positivo).

### Síntese de **L4**

O conjugado **L4** é também um derivado estradiol-DOTA, mas que difere dos ligandos anteriores por apresentar uma configuração estereoquímica  $16\beta$  e um espaçador saturado de seis átomos de carbono. A estratégia adoptada na síntese de **L4** foi semelhante à utilizada na síntese de **L2** e **L3**. O **esquema 2.10.** ilustra a via sintética seguida.



**Esquema 2.10.** Síntese do conjugado **L4**.

i)  $\text{DO}_3\text{A}(\text{tBu})_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $65^\circ\text{C}$ , 24h; ii) TFA, t.a., 12h.

O composto **L4** foi obtido em dois passos sequenciais. Após *N*-alquilação da amina secundária do  $\text{DO}_3\text{A}(\text{tBu})_3$  com o derivado 6-(16 $\beta$ -estradiol)bromohexano (**2.15**) obteve-se o intermediário **2.30**. Embora o composto intermediário **2.30** não tenha sido isolado nem caracterizado toda a sequência reaccional foi monitorizada por RP-HPLC tendo-se observado, ao longo do processo, a formação de alguns produtos secundários, que não foram isolados nem caracterizados. Seguidamente, os grupos *tert*-butilo foram removidos por hidrólise ácida, com TFA, obtendo-se o composto **L4** após purificação em coluna Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  utilizando um gradiente de metanol em água (0->100%). **L4** foi obtido com um rendimento total de 33% sob a forma de um sólido amarelo pálido e foi caracterizado pelas técnicas analíticas usuais, que confirmaram inequivocamente a sua estrutura molecular.

Na **Figura 2.13**, encontram-se os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto **L4**. Da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **L4** observa-se o aparecimento de um multipletto largo a 4,18 ppm, correspondente aos dois prótons da ligação  $-\text{CH}_2\text{N}$  e o desaparecimento do sinal correspondente aos prótons  $-\text{CH}_2$  adjacentes ao bromo terminal do precursor **2.15** ( $\delta = 3.34$  ppm), o que vem confirmar a conjugação da biomolécula ao agente quelante. Entre 2,80 e 3,68 ppm observam-se vários multipletos correspondentes aos prótons  $\text{CH}_2$  do anel macrocíclico e dos  $\text{CH}_2\text{COOH}$  dos braços do anel. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  destacam-se duas ressonâncias relativas ao grupo carboxilato ( $\delta = 169,74$  ppm e  $174,75$  ppm) reflectindo a existência de um centro de simetria no anel macrocíclico, sugerindo a existência de um processo dinâmico rápido entre as várias espécies topoméricas coexistentes em solução.

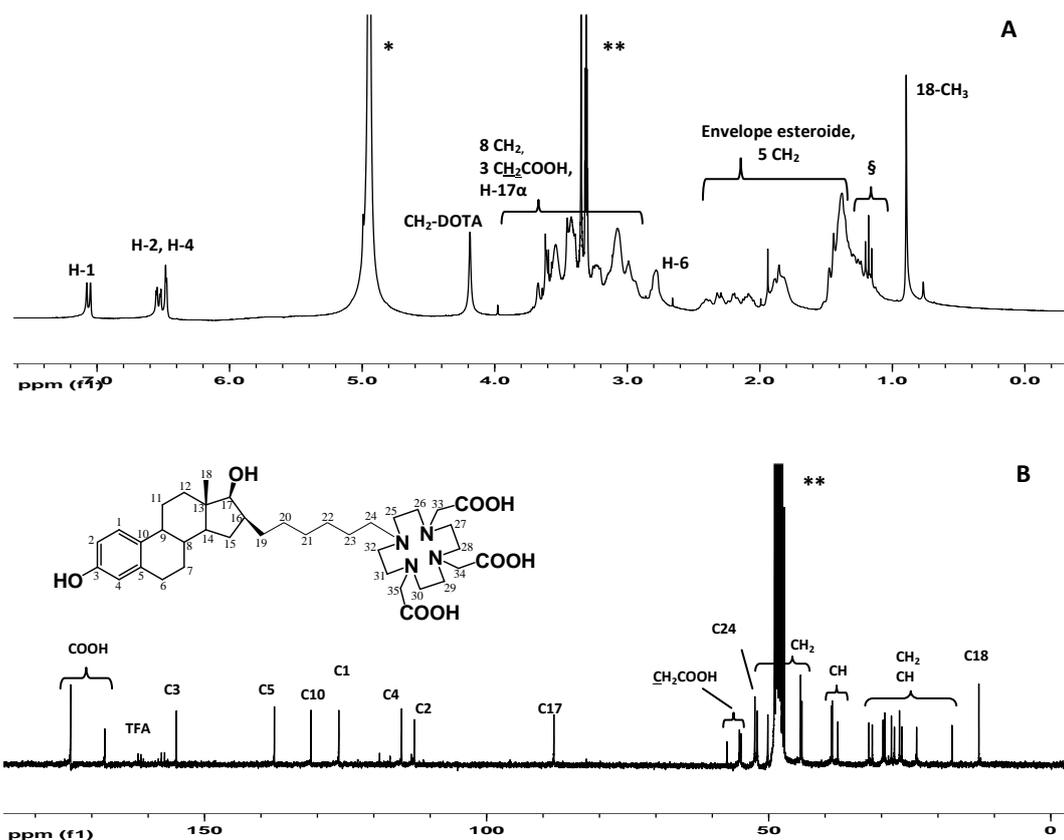


Figura 2.13.- Espectros de RMN de **L4** e respectivas atribuições: (A)  $^1\text{H}$ -RMN, (B)  $^{13}\text{C}$ -RMN (\* $\text{H}_2\text{O}(\text{CD}_3\text{OD})$ ; \*\* $\text{CD}_3\text{OD}$ , §  $\text{EtOH}$ ).

A característica mais significativa do espectro de IV de **L4** é a presença de uma banda devida à vibração de extensão  $\nu(\text{C}=\text{O})$  dos grupos carboxilato a  $1685\text{ cm}^{-1}$  sendo esperado um desvio desta banda aquando da coordenação de **L4** ao centro metálico. No espectro de ESI-MS de **L3** o pico de maior intensidade corresponde ao respectivo ião molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  701,7) o qual está de acordo com a estrutura proposta.

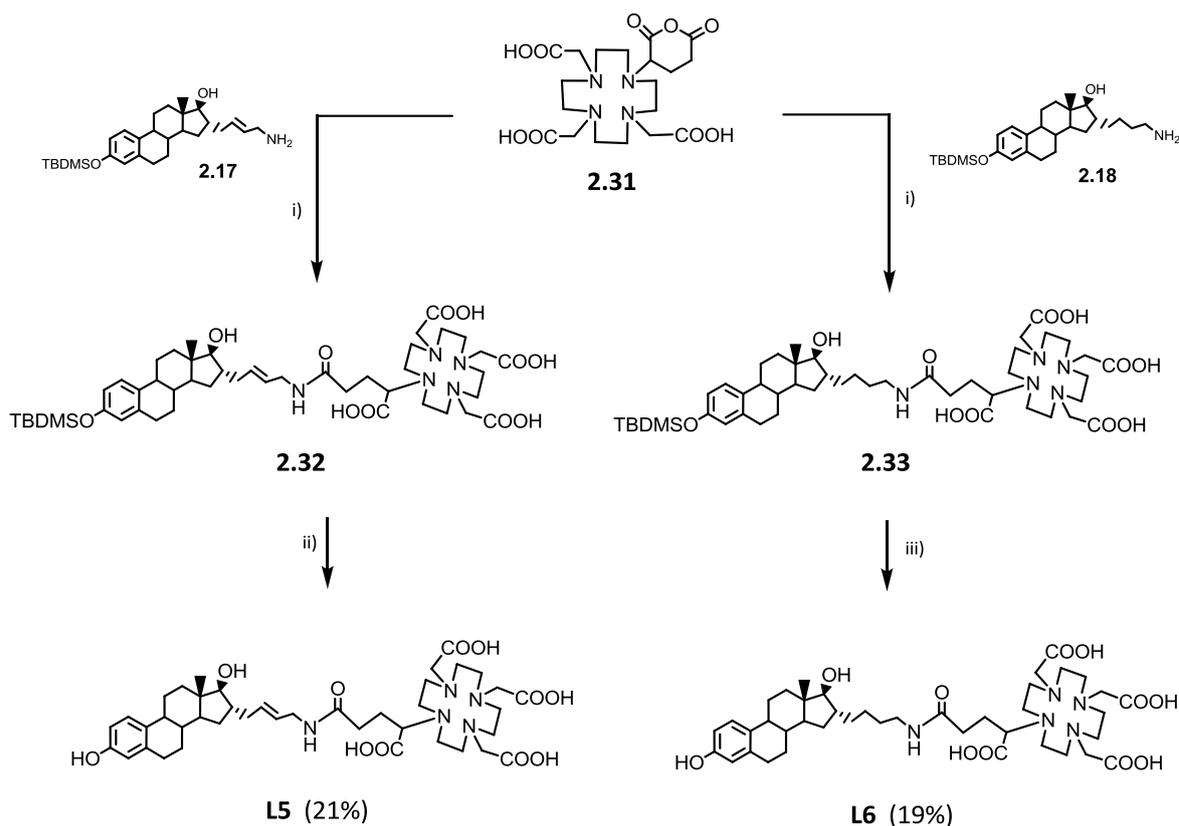
### 2.2.2.3. Síntese dos conjugados estradiol-DOTAGA (L5-L6)

O agente quelante DOTAGA é um derivado do DOTA, diferindo deste por possuir num dos seus braços um grupo glutarato em vez de um grupo acetato. O grupo carboxílico suplementar permite a conjugação à biomolécula mantendo o comportamento de coordenação característico do DOTA. Assim, o DOTAGA após acoplamento a uma biomolécula pode formar complexos octacoordenados com o In(III).<sup>93,203,204</sup>

Normalmente, a conjugação do DOTAGA a uma biomolécula é realizada utilizando o derivado DOTAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub> em que quatro dos cinco grupos carboxilato estão protegidos com grupos *tert*-butilo e o grupo remanescente reage de modo específico com um grupo amina da biomolécula.<sup>205,206</sup> A síntese deste tipo de conjugados é no entanto, bastante complexa envolvendo muitos passos reaccionais e morosos processos de purificação cromatográfica. Assim, uma estratégia alternativa que utiliza o anidrido de DOTAGA, facilmente obtido por reacção do DOTAGA com ácido acético, foi recentemente explorada por Bernhard e colaboradores.<sup>207</sup> Esta aproximação combina a facilidade de preparação e a reactividade de ligandos que possuem um grupo anidrido com as excelentes características quelantes do DOTA.

Nesta tese descreve-se a síntese de dois novos conjugados estradiol-DOTAGA (**L5-L6**) para coordenação ao In(III). A síntese do conjugado **L5** e do seu análogo saturado **L6** foi efectuada por conjugação do anidrido de DOTAGA aos precursores alquilamino-estradiol **2.17** e **2.18**, respectivamente, sendo a ligação da biomolécula ao agente quelante efectuada por intermédio de uma ligação amida. A utilização do anidrido de DOTAGA poderia levar à formação de dois isómeros com a ligação amida a formar-se através do braço butanoato ou no braço acetato. Contudo, Bernhard e colaboradores demonstraram através de estudos espectroscópicos de RMN, que a abertura do anel por um nucleófilo conduz sempre à formação do isómero em que a função amida está presente no braço butanoato e não no braço acetato.<sup>207</sup>

A estratégia seguida para a síntese dos conjugados **L5** e **L6** foi adaptada da abordagem descrita por Bernhard e colaboradores para conjugação a biomoléculas e na síntese de compostos bimodais<sup>207</sup> e está representada no **esquema 2.11**.



**Esquema 2.11.**-Síntese dos conjugados L5 e L6.

*i)*  $NEt_3$ , DMF,  $70^\circ C$ , 5h; *ii)* TFA/ $CH_2Cl_2$  (1:1), t.a., 18h; *iii)* HCl/MeOH (2:98 (v:v)), t.a., 5h

O primeiro passo da síntese consistiu na conjugação dos precursores alquilamino-estradiol **2.17** e **2.18** ao anidrido de DOTAGA (**2.31**) em DMF na presença de um excesso de trietilamina e a uma temperatura de  $70^\circ C$ . O tempo de reacção foi controlado por análise cromatográfica em RP-HPLC de alíquotas da mistura reaccional. Os compostos **2.32** e **2.33** não foram isolados nem caracterizados tendo apenas sido identificados por análise de massa MALDI-TOF. A observação no espectro de massa dos iões moleculares  $914,6 [M+H]^+$  e  $916,6 [M+H]^+$  permitiu estabelecer a estrutura química de **2.32** e **2.33**, respectivamente.

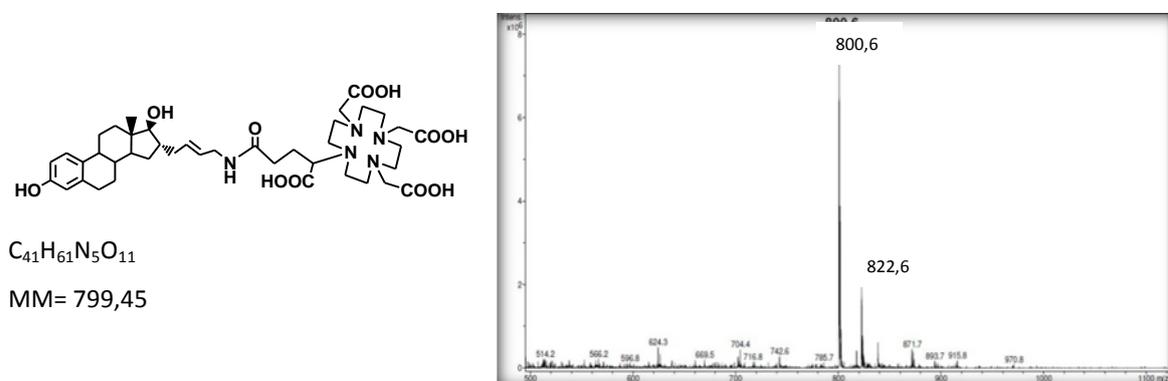
O último passo da estratégia de síntese consistiu na remoção do grupo TBDMS de **2.32** e de **2.33** por hidrólise ácida. Numa primeira fase a hidrólise ácida de ambos os compostos foi efectuada utilizando uma solução metanólica contendo 2% de HCl.<sup>208</sup> No caso de **2.33**, a utilização desta solução para a remoção do grupo TBDMS foi bem sucedida conduzindo à formação do composto pretendido. Mas no caso de **2.32**, após purificação da mistura por RP-HPLC preparativo, a análise de massa MALDI-TOF indicou que nenhuma das fracções eluídas da coluna correspondia ao composto pretendido. A reduzida quantidade de espécies formadas

não permitiram a sua posterior caracterização por outras técnicas espectroscópicas. Optou-se então, por uma via de hidrólise alternativa, removendo o grupo TBDMS com TFA. Ambos os conjugados **L5** e **L6** foram obtidos sob a forma de um pó ligeiramente amarelado após purificação numa coluna Sep-Pak C<sub>18</sub> utilizando como eluente um gradiente de metanol em água. Os compostos **L5** e **L6** foram caracterizados pelas técnicas analíticas usuais (RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, IV e ESI-MS).

Apesar da complexidade dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, devido à grande multiplicidade de sinais, da comparação dos espectros de **L5** e **L6** com os espectros dos respectivos precursores **2.17** e **2.18** destaca-se entre 2,75 e 3,82 ppm o aparecimento de vários multipletos adicionais atribuíveis aos prótons CH<sub>2</sub> do anel macrocíclico e dos braços do anel. Os restantes prótons metilénicos sobrepõem-se com os do envelope esteróide. Observa-se igualmente o desaparecimento dos sinais correspondentes aos prótons do grupo TBDMS confirmando a hidrólise. Da análise dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C evidenciam-se os sinais correspondentes aos carbonos carbonilo (-COOH) que surgem com desvios químicos a 170,6 e 174,6 ppm em **L5** e 174,8 ppm em **L6**.

A característica mais significativa do espectro de IV de **L5** e **L6** é a presença de uma banda devida à vibração de extensão ν(C=O) dos grupos carboxilato a 1649 cm<sup>-1</sup> (**L5**) e 1639 cm<sup>-1</sup> (**L6**). É esperado um desvio desta banda após coordenação dos compostos **L5** e **L6** ao metal. Nos espectros de ESI-MS os picos de maior intensidade correspondem aos respectivos iões moleculares [M+H]<sup>+</sup> m/z 800,6 (**L5**) e m/z 802,6 (**L6**) permitindo elucidar a estrutura química dos conjugados de estradiol.

A título de exemplo, na **Figura 2.14**, está representado, o espectro de ESI-MS do conjugado **L5**.



**Figura 2.14.**- Espectro de ESI-MS do conjugado **L5** (modo positivo).

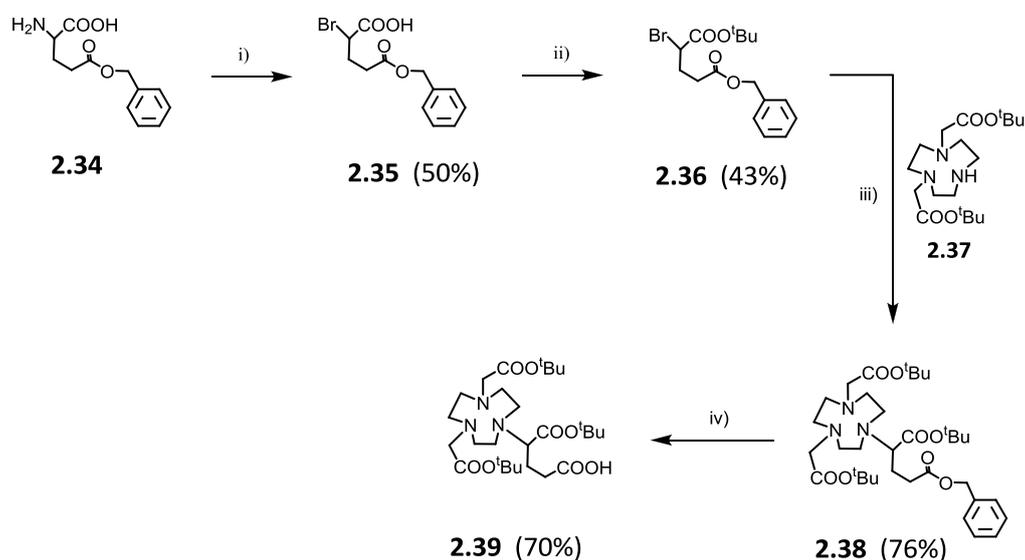
#### 2.2.2.4. Síntese do conjugado estradiol-NODAGA (L7)

De entre os vários agentes quelantes bifuncionais que têm sido propostos para coordenação ao Ga(III) destacam-se os ligandos macrocíclicos do tipo triaza, tais como o NOTA e o NODAGA, que conduzem à formação de complexos metálicos termodinamicamente bastante estáveis. O NOTA é um ligando poliaminopolicarboxilato do tipo  $N_3O_3$  derivado do 1,4,7-triazaciclononano que tem a capacidade de coordenar o Ga(III) formando complexos hexacoordenados. O NODAGA é um derivado do NOTA caracterizado por possuir uma função carboxílica suplementar que é utilizada na conjugação à biomolécula. Tendo em consideração que os conjugados derivados do NOTA se têm revelado como sendo dos mais apropriados para a preparação de complexos de Ga(III) com possível aplicação clínica<sup>93,135</sup>, sintetizou-se um novo conjugado estradiol-NODAGA (L7) para posterior avaliação do comportamento biológico do respectivo complexo de Ga(III).

Para a conjugação à biomolécula foi utilizado o  $NODAGA(tBu)_3$ , um agente pró-quelante que foi sintetizado segundo uma estratégia de síntese alternativa à desenvolvida por Maecke e colaboradores.<sup>99,205,206</sup> A abordagem descrita por estes autores inclui três passos de síntese, nomeadamente a mono-alquilação do 1,4,7-triazaciclononano com um ácido dicarboxílico, ortogonalmente protegido, seguida de *N*-alquilação com bromoacetato de *tert*-butilo e subsequente desprotecção selectiva do grupo benzilo. Esta estratégia apresenta, no entanto, alguns inconvenientes devido à formação de espécies secundárias durante as reacções de alquilação e que são responsáveis pelo baixo rendimento total obtido (21%).<sup>99</sup> Resumidamente, a alquilação do 1,4,7-triazaciclononano conduz, mesmo após optimização das condições reaccionais, a uma mistura de produtos mono- e bisalquilados, numa razão de 3:1, que têm de ser separados por cromatografia em coluna. Por outro lado, durante a alquilação da espécie mono-alquilada com bromoacetato de *tert*-butilo os autores observaram sempre alquilação múltipla com a obtenção de um sal de amina quaternário, inclusivamente quando a reacção era conduzida a baixas temperaturas.<sup>205</sup>

Na tentativa de utilizar uma via de síntese mais expedita para preparar  $NODAGA(tBu)_3$  e tirando partido do facto de um derivado do NOTA selectivamente protegido ( $NO_2A(tBu)_2$ , **2.36**) se encontrar disponível comercialmente, desenvolvemos uma estratégia alternativa que tem como principais vantagens a eliminação de uma das etapas de síntese, nomeadamente a *N*-alquilação com o bromoacetato de *tert*-butilo o que se traduz num aumento considerável do rendimento total da síntese para 53%. Assim, o  $NODAGA(tBu)_3$  foi sintetizado em apenas dois passos, designadamente a mono-alquilação do  $NO_2A(tBu)_2$  e a desprotecção do grupo benzilo.

Além de reduzir um dos passos da via de síntese, a vantagem da utilização do derivado do NOTA selectivamente protegido permite obter apenas a espécie mono-alkilada o que facilita o processo de purificação, conduzindo à obtenção do derivado mono-alkilado do  $\text{NO}_2\text{A}(\text{tBu})_2$  (**2.37**) com um bom rendimento ( $\eta=76\%$ ). A estratégia seguida na síntese do  $\text{NODAGA}(\text{tBu})_3$  está representada no **esquema 2.12**.



**Esquema 2.12.**- Síntese do pró-quelante  $\text{NODAGA}(\text{tBu})_3$  (**2.39**).

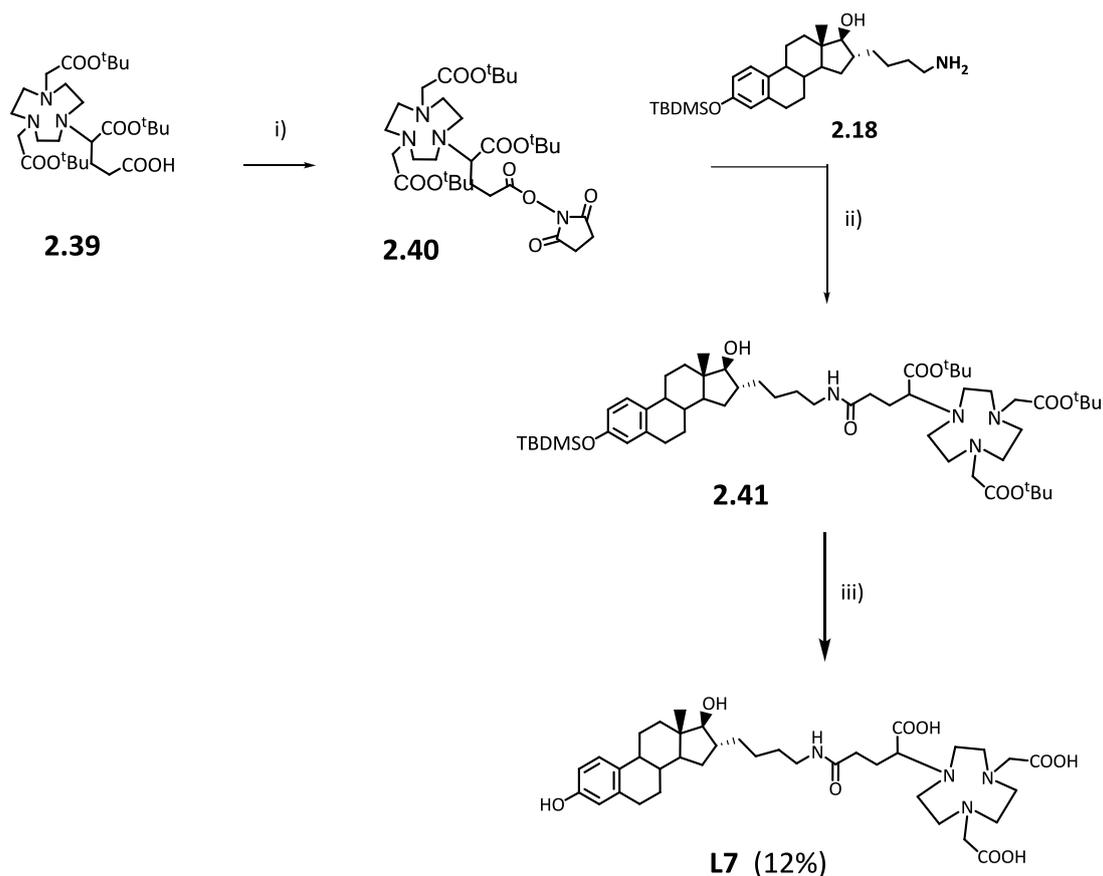
**i)** NaBr, HBr 1N,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 3h; **ii)** TBTA,  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ , ciclo-hexano,  $\text{CHCl}_3$ , DMA, t.a., 72h; **iii)**  $\text{NO}_2\text{A}(\text{tBu})_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , t.a., 48h; **iv)**  $\text{H}_2$ , Pd/C, isopropanol, 24h.

Resumidamente, a síntese do  $\text{NODAGA}(\text{tBu})_3$  iniciou-se com a preparação de um ácido dicarboxílico ortogonalmente protegido (**2.43**), que foi sintetizado segundo a estratégia descrita na literatura por Macke.<sup>205</sup> Assim, a halogenação do glutamato de benzilo (**2.34**), comercialmente disponível, com brometo de sódio (NaBr) conduziu à formação de ácido 5-(benziloxi)-2-bromo-5-oxipentanoícoo (**2.35**) que foi isolado após cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de n-hexano/EtOAc. Seguidamente a função carboxílica em **2.35** foi protegida com um grupo *tert*-butilo por reacção com *tert*-butiltricloroacetimidato na presença de quantidades catalíticas de eterato de trifluoreto de boro obtendo-se o composto **2.36** após purificação por cromatografia em coluna. A análise dos compostos **2.35** e **2.36** por RMN de  $^1\text{H}$  mostrou-se consistente com a sua estrutura estando os dados espectroscópicos coerentes com os referidos na literatura.<sup>205</sup> No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2.35** é possível observar na zona dos aromáticos (6-9 ppm) um multiplete correspondente aos 5 prótons do anel benzílico (Bz). A 5,12 ppm e a 4,38 ppm observa-se um singuleto, correspondente aos 2 prótons  $\text{CH}_2\text{-Bz}$ , e um duplo duplete associado ao próton CH,

respectivamente. Desviado para campo mais alto, observa-se a existência de um tripleto ( $\delta=2,59$  ppm) e um multipletto ( $\delta=2,25-2,47$  ppm) atribuíveis aos restantes grupos  $\text{CH}_2$ . O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2.36** é idêntico ao de **2.35**, com excepção de um singuleto correspondente aos nove protões do grupo *terc*-butilo ( $\delta=1,46$  ppm).

A *N*-alquilação de  $\text{NO}_2\text{A}(\text{tBu})_2$  (**2.37**) com o ácido dicarboxílico **2.36** conduziu à formação do derivado **2.38**, ortogonalmente protegido, que após hidrogenação catalítica na presença de Pd/C para remoção selectiva do grupo benzílico, originou o agente pró-quelante mono-desprotegido NODAGA( $\text{tBu}$ )<sub>3</sub> (**2.39**). Os compostos **2.38** e **2.39** foram caracterizados por RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) estando os dados espectrométricos de acordo com as estruturas químicas propostas. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2.38** quando comparado com o espectro de **2.36**, mostrou vários multipletos entre 1,63 ppm e 3,10 ppm correspondentes aos protões  $\text{CH}_2$  da unidade macrocíclica e um singuleto a 1,42 ppm integrando 18 protões, atribuível aos protões do grupo *terc*-butilo. Dos dados obtidos por RMN de  $^{13}\text{C}$  salienta-se a existência de três sinais entre 171,5 ppm e 172,7 ppm correspondentes aos três grupos carbonilo. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2.39** é semelhante ao de **2.38** à excepção da ausência do sinal dos protões aromáticos do anel benzílico confirmando a sua remoção.

Entre as várias técnicas descritas para o acoplamento de ligandos bifuncionais a biomoléculas uma das mais utilizadas tem sido a conjugação de um éster activado (*e.g.* *N*-hidroxisuccinimida) a uma amina primária, presente na biomolécula, através de uma ligação amida. Assim, o acoplamento do NODAGA( $\text{tBu}$ )<sub>3</sub> ao derivado do estradiol **2.18**, ilustrado no **esquema 2.13.**, foi realizado após activação da função carboxílica de **2.39** com *N*-hidroxisuccinimida em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , na presença de 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiámid (EDC). A análise por ESI-MS em modo positivo permitiu identificar o pico correspondente ao ião molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  641,5) o que está de acordo com a estrutura proposta para o éster activado **2.40**, não se procedendo à sua purificação. A conjugação de **2.40** ao precursor **2.18** seguida da remoção dos grupos protectores TBDMS e *terc*-butilo conduziu à formação do conjugado **L7**.



**Esquema 2.13.- Síntese do conjugado L7.**

**i)** NHS, EDC,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 24h; **ii)** composto **2.18**,  $\text{NEt}_3$ , DMF, t.a., 48h; **iii)**  $i\text{-Pr}_3\text{SiH}$  TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1), t.a., 12h.

O éster activado **2.40** reagiu com a amina primária do precursor 16 $\alpha$ -alquilamina **2.18** na presença de trietilamina, obtendo-se o conjugado estradiol-NODAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> (**2.41**) que não foi isolado nem caracterizado. Finalmente, o conjugado **L7** foi obtido após hidrólise ácida dos grupos protectores com TFA na presença de  $i\text{-Pr}_3\text{SiH}$  seguida de purificação por Sep-Pak C<sub>18</sub>, utilizando um gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH como eluente. Após liofilização, o composto **L7** obteve-se como um pó amarelado, solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Seguindo a mesma estratégia de síntese tentámos também sintetizar o análogo insaturado de **L7** utilizando a biomolécula **2.17** contudo, após a reacção de conjugação do éster activado **2.39** ao precursor **2.17**, verificou-se pelas técnicas analíticas de caracterização que não se obtivera o conjugado pretendido.

Quando comparado com o espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **2.18**, a análise do espectro de **L7** revelou a ausência do sinal a 2,69 ppm correspondente aos protões  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ . É possível

observar também o aparecimento de vários multipletos entre 2,99 e 3,71 ppm correspondentes aos prótons CH<sub>2</sub> da estrutura macrocíclica e o desaparecimento dos sinais dos prótons dos grupos *terc*-butilo. O padrão de desdobramento do espectro de RMN de <sup>13</sup>C de **L7** está de acordo com a estrutura química formulada. Os sinais dos grupos carbonilo surgem com desvios químicos de 175,1 ppm e de 175,2 ppm, sugerindo a existência de um eixo de simetria no anel do macrociclo. A estrutura química foi também confirmada por ESI-MS no modo negativo pela observação do ião molecular [M-H]<sup>-</sup> (m/z= 699,5). A característica mais significativa do espectro de IV de **L7** é a presença de uma banda devida à vibração de extensão ν(C=O) dos grupos carboxilato a 1637 cm<sup>-1</sup>. É esperado um desvio desta banda aquando da coordenação do composto **L7** ao metal.

## **2.3. Síntese e Caracterização de Complexos de In(III) e Ga (III)**

Neste subcapítulo descreve-se a síntese e caracterização dos complexos de In/<sup>111</sup>In e Ga/<sup>67</sup>Ga estabilizados pelos conjugados de estradiol **L1-L7** sintetizados na secção 2.2.2.

### **2.3.1 Complexos inactivos de In(III) (InL1-InL6) e Ga(III) (GaL2 e GaL7)**

Os conjugados estradiol-DTPA (**L1**), estradiol-DOTA (**L2-L4**) e estradiol-DOTAGA (**L5-L6**) foram utilizados para estabilizar o In(III) enquanto que para a coordenação ao Ga(III) foram utilizados os conjugados estradiol-DOTA (**L2**) e estradiol-NODAGA (**L7**). Estes complexos inactivos foram sintetizados com a dupla finalidade de confirmar a identidade dos respectivos congéneres radioactivos e de determinar a afinidade de ligação aos receptores de estrogénio.

#### **2.3.1.1. Síntese dos Complexos InL1-InL6, GaL2 e GaL7**

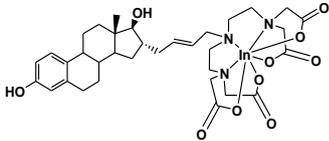
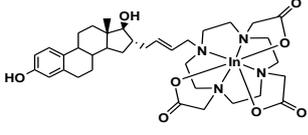
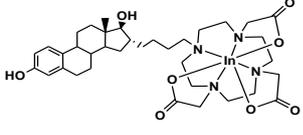
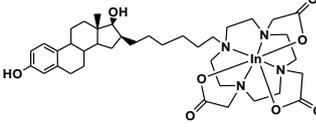
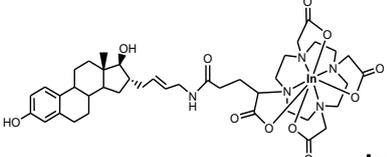
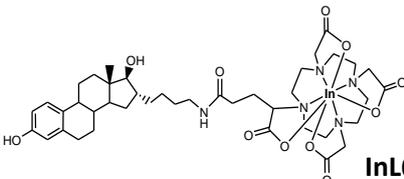
A síntese dos complexos de In e Ga inactivos foi baseada em estratégias de síntese descritas na literatura para a coordenação de ligandos do tipo DTPA, DOTA, DOTAGA e NODAGA aos metais In(III) e Ga(III).<sup>93,135,209,210</sup> A capacidade de coordenação destes agentes quelantes aos iões trivalentes de In e Ga é muito influenciada pelo valor de pH. Embora a velocidade da reacção de complexação aumente em função do aumento do valor de pH, valores de pH superiores a 6 condicionam o rendimento da reacção, uma vez que favorecem a formação de espécies insolúveis, tais como hidróxidos de In ou de Ga.<sup>79</sup> Os estudos

desenvolvidos por vários grupos de investigação determinaram que o valor de pH óptimo para a coordenação ao In(III) e Ga(III) por agentes quelantes do tipo DTPA, DOTA e NOTA varia entre 4 e 6.<sup>93,135</sup>

### **Complexos de Índio**

Os complexos de índio foram obtidos por reacção dos conjugados de estradiol com  $\text{InCl}_3$ , a pH 5. A temperatura e o tempo de reacção variaram em função da unidade quelante presente na estrutura do conjugado de estradiol. Uma vez que os compostos que contêm na sua estrutura unidades quelantes acíclicas possuem, em geral, uma cinética de ligação ao metal mais rápida, estudou-se a reacção do tricloreto de índio ( $\text{InCl}_3$ ) com o conjugado estradiol-DTPA, **L1**, à temperatura ambiente.<sup>200</sup> No entanto, compostos contendo na sua estrutura unidades quelantes macrocíclicas, tais como o DOTA ou seus derivados, apresentam uma cinética de coordenação mais lenta. Por essa razão, a sua reacção de complexação com o índio requer temperaturas mais elevadas.<sup>135</sup> Assim, a reacção com os conjugados estradiol-DOTA, **L2-L4**, e estradiol-DOTAGA, **L5-L6**, foi estudada a 95 °C. Na **tabela 2.1.** encontram-se descritas as condições experimentais utilizadas na síntese dos complexos **InL1-InL6.**

Tabela 2.1.- Condições experimentais utilizadas na síntese dos complexos de In estabilizados por L1-L6 e respectivos rendimentos de reacção.

Ligando	Condições Experimentais (solvente, pH, temperatura, tempo de reacção)	Complexo
L1	H <sub>2</sub> O, pH 5, t.a., 30 min	 <p style="text-align: right;"><b>InL1</b></p> <p style="text-align: center;"><math>\eta_r = 71,3\%</math></p>
L2	H <sub>2</sub> O, pH 5, 95°C, 2h	 <p style="text-align: right;"><b>InL2</b></p> <p style="text-align: center;"><math>\eta_r = 54,7\%</math></p>
L3	H <sub>2</sub> O, pH 5, 95°C, 2h	 <p style="text-align: right;"><b>InL3</b></p> <p style="text-align: center;"><math>\eta_r = 43,4\%</math></p>
L4	H <sub>2</sub> O, pH 5, 95°C, 2h	 <p style="text-align: right;"><b>InL4</b></p> <p style="text-align: center;"><math>\eta_r = 57,1\%</math></p>
L5	Tampão acetato de sódio 0,4M pH 5, 95°C, 2h	 <p style="text-align: right;"><b>InL5</b></p> <p style="text-align: center;"><math>\eta_r = 50,4\%</math></p>
L6	Tampão acetato de sódio 0,4M pH 5, 95°C, 2h	 <p style="text-align: right;"><b>InL6</b></p> <p style="text-align: center;"><math>\eta_r = 43,8\%</math></p>

O complexo **InL1** foi obtido por reacção do estradiol-DTPA (**L1**) com InCl<sub>3</sub> numa relação equimolar, a pH 5 e à temperatura ambiente, tendo sido observada a formação de um precipitado, após 30 min de reacção. Os complexos **InL2**, **InL3** e **InL4** foram obtidos por reacção dos conjugados estradiol-DOTA **L2-L4**, em água, com InCl<sub>3</sub> numa relação molar de 1:3 (L:M), a pH 5. Os complexos pretendidos foram obtidos sob a forma de um precipitado que se formou após 2h a 95 °C. Os complexos **InL5** e **InL6** foram obtidos após reacção dos ligandos estradiol-DOTAGA (**L5** e **L6**) com InCl<sub>3</sub> numa relação equimolar em solução de tampão acetato 0,4 M (pH 5) tendo-se formado um precipitado após 2h de reacção à temperatura de 95 °C. Os

sais formados e o  $\text{InCl}_3$  remanescente foram removidos por lavagem do precipitado com água. A síntese de **InL5** e **InL6** foi também estudada em água tendo-se, contudo, verificado que a utilização de tampão acetato 0,4M (pH 5) conduzia a rendimentos superiores, uma vez que se observou que os conjugados **L5** e **L6** não eram completamente solúveis em água.

Os complexos sintetizados foram depois caracterizados pelas técnicas analíticas usuais em química tais como, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , IV e ESI-MS.

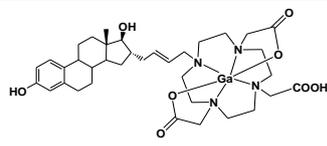
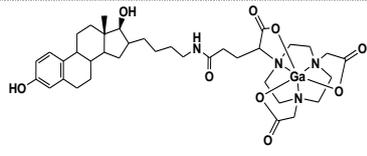
Todos os complexos de In foram obtidos, após liofilização, sob a forma de sólidos ligeiramente acastanhados e com rendimentos que variaram entre 43 e 71%. Todos os complexos mostraram ser insolúveis na maioria dos solventes orgânicos e parcialmente solúveis em DMSO.

### Complexos de Gálio

Os complexos de gálio, **GaL2** e **GaL7** foram obtidos por reacção dos ligandos estradiol-DOTA (**L2**) e estradiol-NODAGA (**L7**) em solução aquosa ou numa solução tampão acetato 0,4 M (pH 5), com nitrato de gálio,  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  numa relação molar de 1:3 (L:M), de acordo com estratégias descritas na literatura para outros conjugados.<sup>135,210</sup> Em ambos os casos, após 2h de agitação a 95°C formaram-se precipitados. Os sais formados e o  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  em excesso foram removidos por lavagem com água.

Na **tabela 2.2.** encontram-se descritas as condições experimentais utilizadas da síntese dos complexos de Ga, **GaL2** e **GaL7**.

**Tabela 2.2.-** Condições experimentais utilizadas na síntese dos complexos de Ga estabilizados por **L2** e **L7**, e respectivos rendimentos de reacção.

Ligando	Condições experimentais (solvente, pH, temperatura, tempo de reacção)	Complexo
<b>L2</b>	$\text{H}_2\text{O}$ , pH 5, 95°C, 2h	 <p style="text-align: right;"><b>GaL2</b> <math>\eta_r = 56\%</math></p>
<b>L7</b>	Tampão acetato de sódio 0,4M, pH 5, 95°C, 2h	 <p style="text-align: right;"><b>GaL7</b> <math>\eta_r = 33,3\%</math></p>

Os complexos de **GaL2** e **GaL7** foram obtidos, após liofilização, sob a forma de sólidos ligeiramente acastanhados e com rendimentos de 56% e 33,3%, respectivamente. Contrariamente ao complexo **GaL7**, solúvel em metanol, o complexo **GaL2** mostrou ser insolúvel na maioria dos solventes orgânicos e parcialmente solúvel em DMSO.

### 2.3.1.2. Caracterização dos complexos InL1-InL6, GaL2 e GaL7

A caracterização dos complexos de In e Ga foi feita, sempre que possível, por espectroscopia multinuclear de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , espectroscopia de IV e espectrometria de massa ESI-MS. Tal como referido anteriormente, os complexos de In e Ga apresentam elevada insolubilidade na maioria dos solventes orgânicos e limitada solubilidade em DMSO. Contudo, todos os complexos foram analisados por RMN de  $^1\text{H}$  utilizando DMSO- $d_6$  como solvente de referência. Os complexos, **InL1**, **InL2**, **InL6** e **GaL2**, foram também caracterizados por RMN de  $^{13}\text{C}$ . A complexidade dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , aliada à má resolução dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  para os restantes complexos de In e Ga, dificultou a sua caracterização inequívoca por esta técnica analítica. No entanto, foi possível identificar os sinais mais relevantes. Os resultados obtidos através dos espectros de IV e ESI-MS permitiram complementar a caracterização dos complexos.

De um modo geral, nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos **InL1-InL6**, **GaL2** e **GaL7**, é possível observar, em todos os espectros, vários multipletos relativos aos prótons  $\text{CH}_2^-$  do anel macrocíclico e dos prótons metilcarboxilato, alguns dos quais sobrepostos com o sinal do solvente, assim como vários multipletos correspondentes aos prótons do envelope esteróide.

Nas **Figuras 2.15.** e **2.16.**, são apresentados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos **InL2** e **GaL2**, como exemplo geral da caracterização dos complexos de In e Ga por esta técnica.

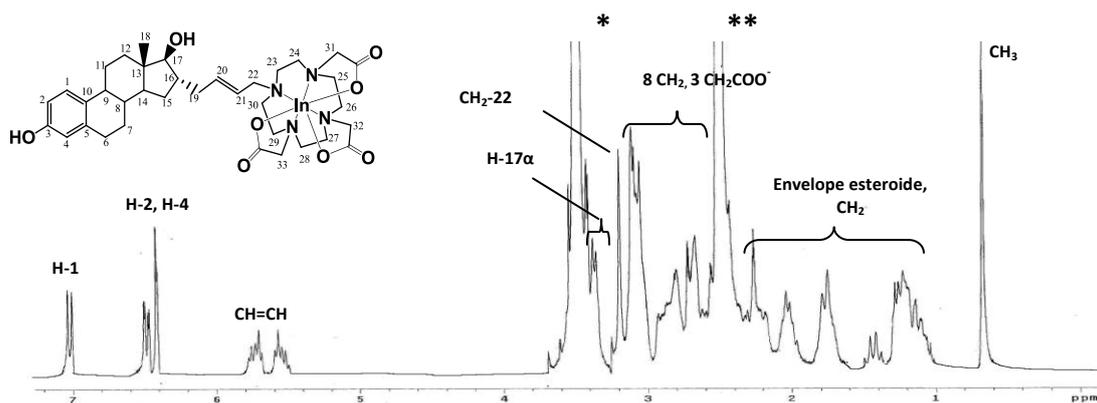


Figura 2.15.- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo **InL2** e respectivas atribuições. (\* $\text{H}_2\text{O}$ (DMSO-d6);\*\*DMSO-d6)

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **InL2**, observa-se a campo mais baixo, dois dupletos e um duplo duplo com desvios químicos a 7,03 ppm, 6,41 ppm e 6,49 ppm, correspondentes aos prótons H1, H4 e H2, respectivamente. O sinal dos prótons CH=CH, aparece sob a forma de um multipletto entre 5,57 e 5,70 ppm. Entre 2,67 e 3,19 ppm observa-se a existência de vários multipletos atribuíveis aos prótons  $\text{CH}_2$  da molécula macrocíclica, desviados para campo mais alto relativamente ao ligando livre **L2** (2,98- 4,23 ppm, ver **Figura 2.10**), o que é indicativo da coordenação de **L2** ao In(III). Entre 1,10 e 2,26 ppm aparecem os sinais correspondentes ao envelope esteróide e aos prótons  $\text{CH}_2$  da cadeia do espaçador. Por fim observa-se um singuleto a 0,67 ppm atribuível aos 3 prótons metilénicos  $\text{CH}_3$ . Este valor está de acordo com o descrito na literatura para a caracterização de moléculas derivadas de estradiol utilizando DMSO-d<sub>6</sub>.<sup>211</sup>

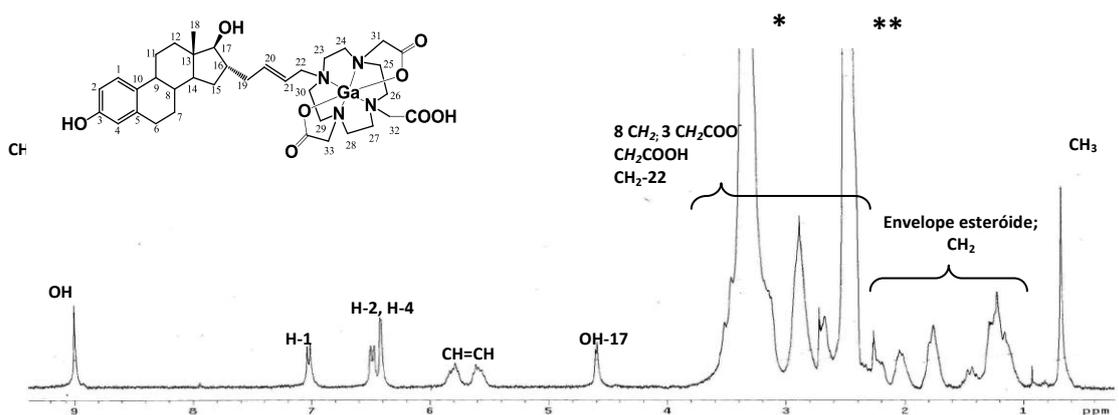


Figura 2.16.- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo **GaL2** e respectivas atribuições (\* $\text{H}_2\text{O}$ (DMSO-d6);\*\*DMSO-d6).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo de **GaL2**, tal como no espectro de **InL2**, observam-se vários multipletos, entre 2,67 e 3,50 ppm, atribuíveis aos prótons  $\text{CH}_2$  do anel

macrocíclico e aos prótons metilcarboxilato, que se encontram desviados para campo mais alto relativamente ao ligando **L2**. Esta observação é indicativa da coordenação de **L2** ao metal. Ao contrário dos espectros de RMN de **L2** e **InL2**, é possível identificar também, os sinais atribuíveis aos prótons hidroxilo presentes em C3 e C17, com desvios químicos de 8,99 ppm e 4,60 ppm, respectivamente. A 0,68 ppm aparece um singuleto, correspondente aos três prótons metílicos (CH<sub>3</sub>). Estes valores estão de acordo com o descrito na literatura para a caracterização de moléculas de estradiol utilizando DMSO-d<sub>6</sub>.<sup>211</sup>

Nas Figuras 2.17. e 2.18. são apresentados os espectros de RMN de <sup>13</sup>C dos complexos **InL1** e **InL2** em DMSO-d<sub>6</sub>, como exemplo geral da caracterização dos complexos por esta técnica.

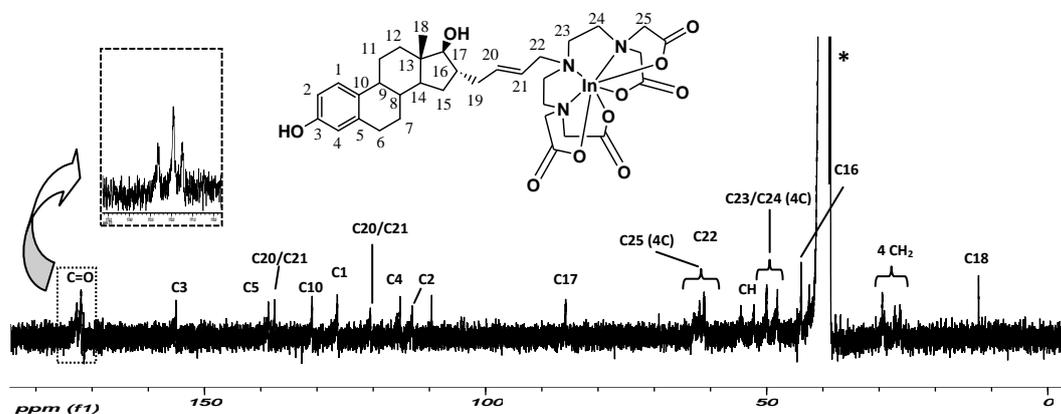


Figura 2.17.- Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do complexo **InL1** e respectivas atribuições. (\*DMSO-d<sub>6</sub>)

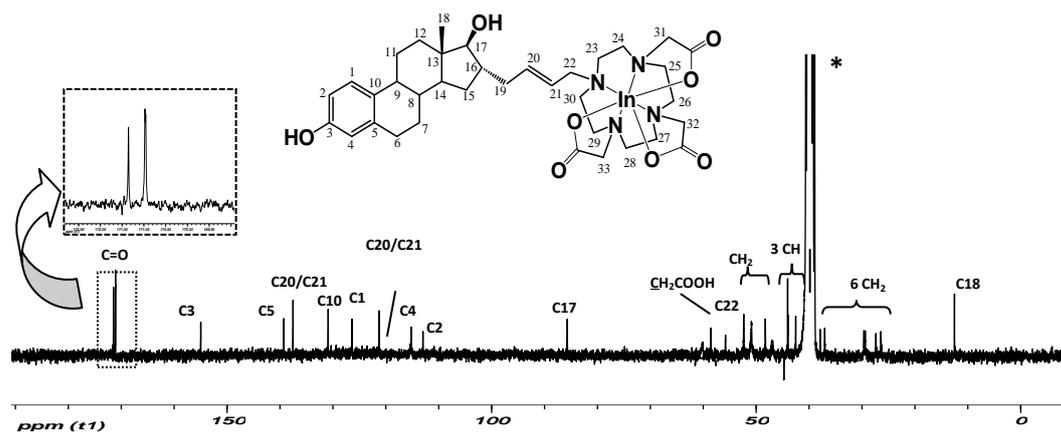


Figura 2.18. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do complexo **InL2** e respectivas atribuições. (\*DMSO-d<sub>6</sub>)

De um modo geral, a característica mais relevante nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C é a observação de um desvio para campo mais alto da ressonância relativa ao sinal do carbono carbonilo (C=O) relativamente ao desvio químico dos ligandos livres, consequência da

coordenação ao metal. Um efeito similar foi também observado para o sinal relativo aos carbonos CH<sub>2</sub>-carboxilato que se encontra também deslocado para campo mais alto.

No caso do espectro do complexo **InL1**, e ao contrário do observado no RMN de <sup>13</sup>C de **L1** (ver **Figura 2.10.**), verifica-se um desdobramento dos sinais correspondentes do carbono carbonilo, observando-se três ressonâncias com desvios químicos a 171,5 ppm, 171,9 ppm e 172,7 ppm devido à existência de uma maior rigidez da molécula. A não equivalência magnética destes carbonos, que não era observado no ligando **L1** ( $\delta$ = 179,6 ppm), é outro indicativo da coordenação de **L1** ao metal. Verifica-se também um desdobramento de sinais correspondentes aos carbonos metilcarboxilato observando-se dois sinais com desvios químicos de 61,14 ppm e 63,54 ppm. Em **L1** apenas se observava um sinal ( $\delta$ = 61,28 ppm) o que vem confirmar a coordenação de **L1** ao In.

Relativamente ao espectro de RMN do complexo **InL2**, as principais diferenças entre os espectros de RMN de <sup>13</sup>C de **InL2** e **L2** (ver **Figura 2.11.**) estão relacionadas com o sinal das ressonâncias correspondentes ao grupo carboxilato (C=O) e aos carbonos do grupo metilcarboxilato (CH<sub>2</sub>COO-). No espectro do complexo **InL2** apenas se observam duas ressonâncias com desvios químicos a 170,9 e 171,4 ppm, após coordenação de **L2** ao metal, enquanto no espectro do ligando se observavam três (179,66 ppm, 179,84 ppm e 179,92 ppm). Esta observação poderá estar relacionada com o facto de a ligação entre a cavidade macrocíclica e o metal, conferir uma maior rigidez à estrutura. A 58,30 ppm aparece um sinal largo, correspondente ao carbono metilcarboxilato que se encontra desviado para campo mais baixo relativamente a **L2** ( $\delta$ = 56,02 ppm e 57,36 ppm), após coordenação ao In.

A caracterização dos complexos por espectroscopia de IV foi efectuada utilizando amostras preparadas em pastilhas de KBr. Nestes espectros a característica mais importante é a presença de uma banda intensa que aparece na região 1580-1700 cm<sup>-1</sup>, associada à vibração de extensão  $\nu$ (C=O) dos grupos carboxilato do macrociclo, bem como uma banda larga na região 3200-3600 cm<sup>-1</sup>, correspondente ao grupo hidroxilo da molécula do estradiol. Como seria expectável, os grupos carboxilato participam na coordenação do ligando ao metal, pelo que após coordenação, as bandas de extensão  $\nu$ (C=O) são desviadas relativamente às do ligando livre. Na **Figura 2.19.** são apresentados, a título de exemplo, os espectros de IV dos complexos **InL2** e **GaL2** em comparação com o espectro de IV do ligando livre **L2**.

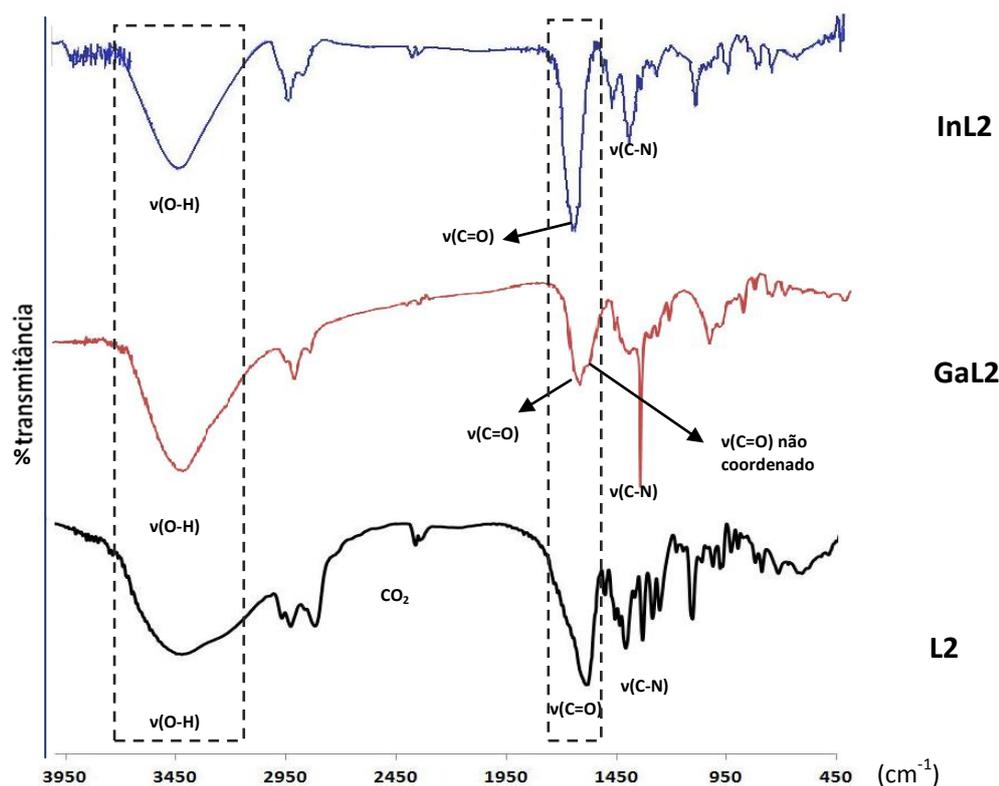


Figura 2.19.- Espectros de IV dos complexos **InL2** e **GaL2** e do ligando **L2** ( KBr).

Da análise dos espectros dos complexos **InL2** e **GaL2**, observa-se um desvio na banda de vibração de extensão  $\nu(\text{C}=\text{O})$  para frequências superiores, em comparação com o ligando **L2** ( $1584 \text{ cm}^{-1}$ ) confirmando a coordenação do ligando ao metal. No caso do complexo **InL2**, o desvio foi de  $71 \text{ cm}^{-1}$  relativamente ao **L2**. No caso do espectro de IV do complexo **GaL2** observam-se dois sinais na banda de vibração de extensão  $\nu(\text{C}=\text{O})$  a  $1662 \text{ cm}^{-1}$  (com um desvio de  $78 \text{ cm}^{-1}$  relativamente a **L2**) e  $1583 \text{ cm}^{-1}$ , atribuíveis aos grupos carboxilato coordenados e não coordenados, respectivamente.

Nos espectros de IV dos restantes complexos, observou-se igualmente um desvio, para frequências superiores, da banda de vibração de extensão  $\nu(\text{C}=\text{O})$  após coordenação dos ligandos **L2-L7** aos metais. Na **tabela 2.3**, encontram-se os sinais obtidos com os complexos **InL1-InL6** e **GaL2** no espectro de IV.

**Tabela 2.3.**- Caracterização dos complexos **InL1-InL6** e **GaL2** por espectroscopia de IV.

Complexo	IV	Desvio relativo ao ligando
<b>InL1</b>	1627 (s, $\nu_{C=O}$ ); 3418 (b, $\nu_{OH}$ )	$\Delta\nu_{CO}$ (L4) = 36 $\text{cm}^{-1}$
<b>InL2</b>	1655 (s, $\nu_{C=O}$ ); 3420 (b, $\nu_{OH}$ )	$\Delta\nu_{CO}$ (L1) = 71 $\text{cm}^{-1}$
<b>InL3</b>	1669 (s, $\nu_{C=O}$ ); 3446 (b, $\nu_{OH}$ )	$\Delta\nu_{CO}$ (L2) = 20 $\text{cm}^{-1}$
<b>InL4</b>	1636 (s, $\nu_{C=O}$ ); 3525 (b, $\nu_{OH}$ )	$\Delta\nu_{CO}$ (L3) = 49 $\text{cm}^{-1}$
<b>InL5</b>	1620 (s, $\nu_{C=O}$ ); 3427 (b, $\nu_{OH}$ )	$\Delta\nu_{CO}$ (L5) = 19 $\text{cm}^{-1}$
<b>InL6</b>	1620 (s, $\nu_{C=O}$ ); 3435 (b, $\nu_{OH}$ )	$\Delta\nu_{CO}$ (L6) = 17 $\text{cm}^{-1}$
<b>GaL2</b>	1583 (s, $\nu_{C=O}$ ); 1662 (br, $\nu_{C=O}$ ); 3421 (b, $\nu_{OH}$ )	$\Delta\nu_{CO}$ (L1) = 78 $\text{cm}^{-1}$

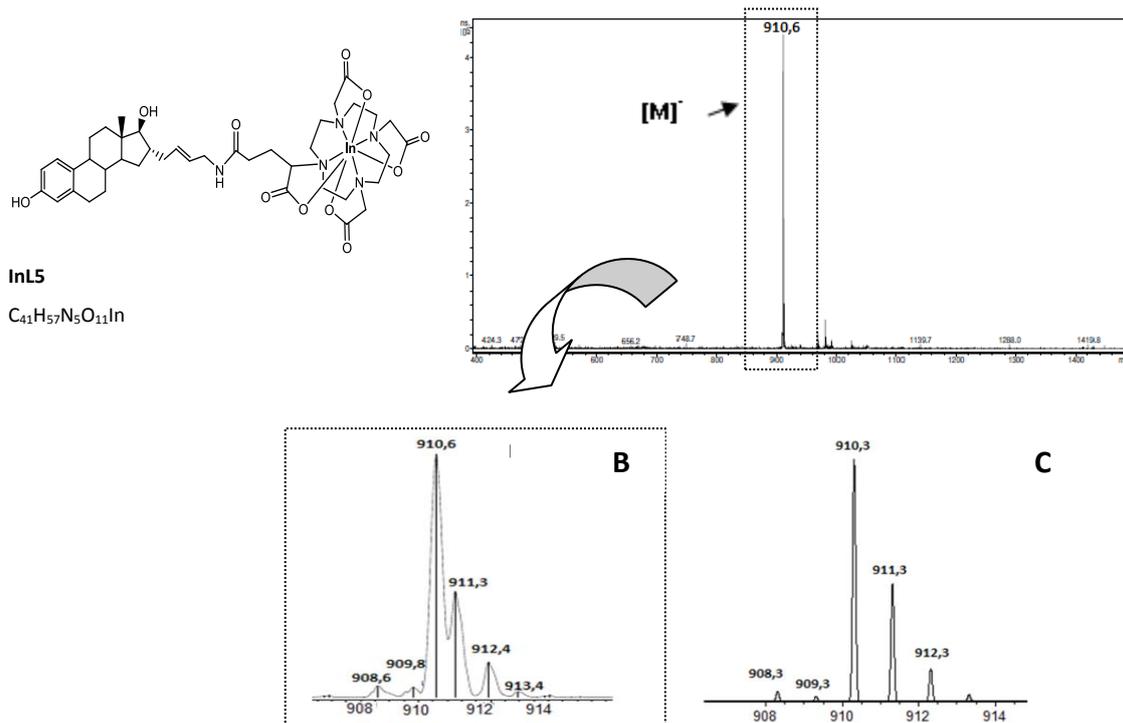
Por espectrometria de massa foi possível confirmar a formação dos complexos de **InL1-InL6**, **GaL2** e **GaL7** pretendidos. Nos espectros ESI-MS identificaram-se os picos correspondentes aos iões moleculares dos respectivos complexos, que apresentavam um desdobramento compatível com o esperado teoricamente. Na **tabela 2.4.** apresentam-se os valores de  $m/z$  obtidos experimentalmente para os complexos **InL1-InL6**, **GaL2** e **GaL7** comparativamente aos valores teóricos.

Tabela 2.4.- Caracterização dos complexos de InL1-InL6, GaL1 e GaL7 por ESI-MS.

Complexo	ESI-MS	
	Experimental	Teórico
InL1	m/z 770,4 [M] <sup>-</sup>	m/z 770,2 [M] <sup>-</sup>
InL2	m/z 783,4 [M+H] <sup>+</sup> m/z 805,4 [M+Na] <sup>+</sup> m/z 821,4 [M+K] <sup>+</sup>	m/z 783,3 [M+H] <sup>+</sup> m/z 805,3 [M+Na] <sup>+</sup> m/z 821,3 [M+K] <sup>+</sup>
InL3	m/z 819,5 [M+Cl] <sup>-</sup> m/z 863,6 [M+Br] <sup>-</sup>	m/z 819,3 [M+Cl] <sup>-</sup> m/z 863,2 [M+Br] <sup>-</sup>
InL4	m/z 835,6 [M+Na] <sup>+</sup>	m/z 835,3 [M+Na] <sup>+</sup>
InL5	m/z 910,6 [M] <sup>-</sup>	m/z 910,3 [M] <sup>-</sup>
InL6	m/z 912,7 [M] <sup>-</sup>	m/z 912,8 [M] <sup>-</sup>
GaL2	m/z 737,5 [M] <sup>+</sup> m/z 759,4 [M+Na-H] <sup>+</sup>	m/z 737,3 [M] <sup>+</sup> m/z 759,3 [M+Na-H] <sup>+</sup>
GaL7	m/z 789,6 [M + Na] <sup>+</sup>	m/z 789,8 [M + Na] <sup>+</sup>

A distribuição isotópica observada nos espectros de massa está de acordo com a distribuição isotópica dos metais de In e Ga.

Na **Figura 2.20**, é apresentado, a título de exemplo, o espectro de ESI-MS obtido em modo negativo para o complexo **InL5**. O espectro apresenta um pico maioritário a m/z=910,6 com carga -1 ([M]<sup>-</sup>), correspondente ao ião molecular para este composto (**Figura 2.20-A**). Este pico apresenta uma distribuição isotópica (**Figura 2.20-B**) que é concordante com a formulação proposta para o complexo como se pode confirmar com a simulação da respectiva série isotópica representada na **Figura 2.20-C**



**Figura 2.20.-** (A) Espectro ESI-MS do complexo **InL5** (modo negativo); (B) expansão do pico correspondente ao  $[M]^-$ ; (C) simulação da série isotópica do ião molecular  $[M]^-$ .

Concluindo, o conjunto dos resultados obtidos, pelas diversas técnicas de caracterização analítica, permitiram demonstrar a formação dos complexos de In e/ou Ga com os ligandos **L1-L7**.

### 2.3.2. Complexos de $^{111}\text{In}$ e $^{67}\text{Ga}$

Na síntese de complexos radioactivos para potencial aplicação clínica, para além dos requisitos inerentes à finalidade dessa aplicação, é necessário ter em consideração as características particulares conferidas pela presença de cada radionuclídeo o qual determina as condições experimentais da reacção de marcação, tais como: concentração de ligando, pH, a temperatura e o tempo de reacção.<sup>93</sup> Assim, no caso de complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  com conjugados de estradiol dirigidos ao RE é necessário preparar um complexo radioactivo em meio aquoso, com elevada actividade específica. De modo a evitar a saturação dos receptores, é importante que a quantidade de ligando livre em circulação seja a menor possível. Para garantir este requisito, a concentração do conjugado de estradiol a marcar deve ser muito baixa pois quanto menor for a concentração de ligando maior será a actividade especifica do complexo radioactivo. Eventualmente se tal não for possível, poderá recorrer-se, após

marcação, à separação do excesso de ligando não marcado. O complexo radioactivo deve também manter a especificidade para o receptor e possuir propriedades físico-químicas adequadas para atravessar as membranas celular e nuclear, de modo a garantir a possibilidade de interacção com o receptor.

Relativamente aos radionuclídeos  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$ , a principal limitação na síntese dos respectivos complexos relaciona-se com o controlo do valor de pH, como já foi referido anteriormente. Valores de pH inferiores a 4 ou superiores a 6 podem condicionar a coordenação dos ligandos ao metal podendo ocorrer hidrólise que conduz à formação de espécies radioquímicas insolúveis como por exemplo, hidróxidos de  $^{111}\text{In}$  ou  $^{67}\text{Ga}$ . É por isso recomendado utilizar soluções tampão acetato de sódio com pH compreendido entre 4-6 no decorrer da reacção de marcação.<sup>135</sup>

Por outro lado, a constante de estabilidade dos complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  formados é também um aspecto importante a considerar na avaliação do seu potencial interesse clínico. Estes metais, especialmente o gálio possuem grande afinidade para a transferrina. Por isso, a constante de estabilidade dos complexos deve ser elevada para evitar, após sua administração, a transquelatação dos radiometais para esta proteína presente na corrente sanguínea.

A síntese dos complexos radioactivos deve, sempre que possível, ser efectuada à temperatura ambiente e, no caso de serem necessárias temperaturas mais elevadas, o aquecimento deve decorrer num curto período de tempo. A utilização de temperaturas elevadas pode danificar os ligandos, principalmente se estiverem envolvidas moléculas biologicamente activas, como neste caso particular. Como já foi dito anteriormente, a cinética de coordenação de ligandos do tipo DTPA é relativamente rápida, podendo as reacções de marcação ocorrer à temperatura ambiente.<sup>93</sup> No caso dos conjugados com derivados de DOTA as reacções de marcação requerem, de um modo geral, temperaturas superiores.<sup>93</sup> Por outro lado, ligandos contendo derivados de NOTA também coordenam facilmente aos iões metálicos, como o  $^{67}\text{Ga(III)}$ , à temperatura ambiente.<sup>79,135</sup> Frequentemente a diminuição da temperatura implica um maior tempo de reacção e uma maior concentração do ligando, pelo que o balanço entre a temperatura e o tempo da reacção deve ser optimizado de modo a manter a integridade do composto radioactivo.

### 2.3.2.1. Síntese e caracterização dos complexos de $^{111}\text{In}$

Os complexos de  $^{111}\text{In}$  foram preparados por reacção dos ligandos **L1-L6** com  $^{111}\text{InCl}_3$  numa solução tampão acetato 0,4M, a pH 5. A reacção de complexação de **L1** ocorreu à temperatura ambiente enquanto as reacções de complexação dos ligandos **L2-L6** decorreram à temperatura de 95°C. A optimização das condições experimentais de reacção (tempo e concentração final de ligando) foi efectuada com base nos rendimentos de reacção e pureza radioquímica, por análise cromatográfica de RP-HPLC e ITLC-SG.

O estudo das condições reaccionais para cada um dos compostos foi efectuada em termos de concentração final de ligando variando numa gama entre  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  e  $1 \times 10^{-6}\text{M}$ . Os parâmetros avaliados na síntese de cada complexo e respectivas variações, estão descritos na **tabela 2.5**.

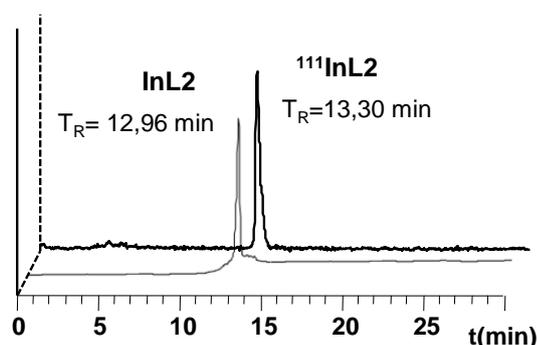
Nas condições reaccionais optimizadas todos os complexos foram obtidos com rendimentos elevados, quase quantitativos ( $\geq 95\%$ ) com concentrações finais de ligando relativamente baixas. Da análise dos dados da **tabela 2.5**, verifica-se que os complexos com os conjugados estradiol-DOTA ( $^{111}\text{InL2}$ - $^{111}\text{InL4}$ ) podem ser preparados com uma actividade específica superior à dos restantes complexos, obtendo-se rendimentos de marcação superiores a 95% com concentrações de ligando na ordem dos  $10^{-5}\text{M}$ . A síntese de complexos de  $^{111}\text{In}$  com conjugados estradiol-DOTAGA ( $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$ ) e estradiol-DTPA ( $^{111}\text{InL1}$ ) só ocorre com rendimento semelhante com concentrações finais de ligando mais elevadas, da ordem de  $10^{-4}\text{M}$ .

**Tabela 2.5.-** Condições experimentais estudadas na optimização da síntese dos complexos  $^{111}\text{InL1-}^{111}\text{InL6}$ .

Ligando	Concentração final de ligando (M)	Tempo de reacção	Rendimento (%)	Complexo
L1	$1 \times 10^{-4}$	10 min	98	$^{111}\text{InL1}$
	$1 \times 10^{-5}$		80	
L2	$1 \times 10^{-4}$	20 min	98	$^{111}\text{InL2}$
	$5 \times 10^{-5}$		98	
	$1 \times 10^{-5}$		97	
	$5 \times 10^{-6}$		10	
L3	$1 \times 10^{-4}$	20 min	98	$^{111}\text{InL3}$
	$5 \times 10^{-5}$		96	
L4	$1 \times 10^{-4}$	20 min	98	$^{111}\text{InL4}$
	$5 \times 10^{-5}$		98	
L5	$1 \times 10^{-4}$	20 min	95	$^{111}\text{InL5}$
	$5 \times 10^{-5}$		92	
L6	$1 \times 10^{-4}$	20 min	97	$^{111}\text{InL6}$
	$5 \times 10^{-5}$		92	

A identificação química dos complexos de  $^{111}\text{In}$  foi feita por análise em RP-HPLC, através da co-injeção dos complexos radioactivos com os complexos análogos inactivos, cuja caracterização a nível macroscópico foi descrita na secção 2.3.1.2. A caracterização dos complexos radioactivos está limitada à caracterização das espécies radioquímicas, devido à reduzida concentração molar de  $^{111}\text{In}$  em solução. Assim, a sua caracterização química, pelas técnicas convencionais não é possível. Assume-se que os complexos radioactivos correspondem à mesma estrutura química dos complexos inactivos, quando analisados por RP-HPLC, apresentem nas mesmas condições cromatográficas, comportamento idêntico. Os complexos de  $^{111}\text{In}$  foram detectados através da radiação gama que emitem enquanto os complexos inactivos de In são detectados por radiação ultravioleta-visível a 220 nm (UV/ Vis).

Na **Figura 2.21.** é mostrado, como exemplo geral de identificação dos complexos de  $^{111}\text{In}$ , o perfil cromatográfico por análise de RP-HPLC em coluna de fase reversa do complexo  $^{111}\text{InL2}$  em comparação com o do seu congénere inactivo que demonstra que as duas espécies possuem estrutura química idêntica.



**Figura 2.21.**-Cromatograma de RP-HPLC dos complexos  $^{111}\text{InL2}$  (detecção gama) e  $\text{InL2}$  (detecção UV/Vis) (coluna: EC 254/4 10-100 C18; gradiente de 0,1% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  e 0,1% TFA/ $\text{CH}_3\text{CN}$ ).

Os valores dos tempos de retenção obtidos para os complexos de  $^{111}\text{In}$  e dos complexos análogos inactivos são semelhantes. O pequeno desfasamento observado entre os tempos de retenção deve-se à ligeira diferença do percurso entre o detector da radiação gama utilizado para detectar a radiação emitida pelo decaimento do  $^{111}\text{In}$  e o detector UV utilizado para detectar os complexos de In inactivos.

Com base nos estudos realizados para a marcação dos ligandos **L1-L6** com  $^{111}\text{InCl}_3$ , na **tabela 2.6.** encontram-se sumarizadas as condições de reacção optimizadas para a síntese de cada complexo de  $^{111}\text{In}$  e os respectivos tempos de retenção ( $T_R$ ) no RP-HPLC.

**Tabela 2.6:** Condições experimentais de síntese dos complexos  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$

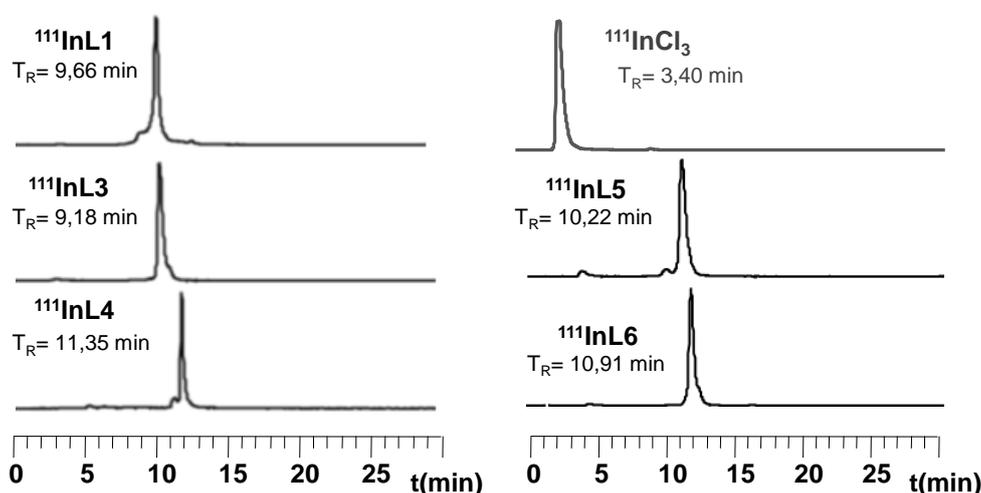
Complexo	Concentração de ligando final (M)	Temperatura/Tempo de reacção	Rendimento (%)	$T_R$ (min)
$^{111}\text{InL1}$	$[\text{L4}] = 1 \times 10^{-4}$	t.a., 10 min	$\geq 98$	<b>9,66/9,26*</b>
$^{111}\text{InL2}$	$[\text{L1}] = 5 \times 10^{-6}$	95°C, 20 min	$\geq 97$	<b>13,30/12,96*</b>
$^{111}\text{InL3}$	$[\text{L2}] = 5 \times 10^{-5}$	95°C, 20 min	$\geq 95$	<b>9,18/8,48*</b>
$^{111}\text{InL4}$	$[\text{L3}] = 5 \times 10^{-5}$	95°C, 20 min	$\geq 95$	<b>11,35/10,96*</b>
$^{111}\text{InL5}$	$[\text{L5}] = 1 \times 10^{-4}$	95°C, 20 min	$\geq 95$	<b>10,22/9,97*</b>
$^{111}\text{InL6}$	$[\text{L6}] = 1 \times 10^{-4}$	95°C, 20 min	$\geq 95$	<b>10,91/10,66*</b>

\*  $T_R$  dos complexos inactivos

Durante a síntese dos complexos de  $^{111}\text{In}$ , pode ocorrer a formação de impurezas radioquímicas, designadamente algumas espécies hidrolisadas de  $^{111}\text{In}$  (e.g.  $^{111}\text{In}(\text{OH})_3$ ) juntamente com o complexo pretendido. Neste caso, estas espécies não podem ser

identificadas por RP-HPLC uma vez que ficam retidas no topo da coluna. Assim, a presença de espécies hidrolisadas foi detectada por ITLC-SG, utilizando uma mistura de 0,9% NaCl/0,1N HCL (25:0,5 (v:v)) como fase móvel. Nestas condições, as espécies hidrolisadas ficam retidas no ponto de aplicação ( $R_f = 0$ ), enquanto o  $^{111}\text{InCl}_3$  migra na frente do solvente ( $R_f = 1$ ). Os radiocromatogramas obtidos dos complexos de  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$  mostraram a existência de um pico único ( $R_f$  entre 0,2 e 0,5) correspondente ao complexo radioactivo desejado. Este resultado, juntamente com a análise por RP-HPLC, permite confirmar a elevada pureza radioquímica dos complexos sintetizados.

Na **Figura 2.22** são apresentados os radiocromatogramas obtidos por RP-HPLC dos complexos  $^{111}\text{InL1}$ ,  $^{111}\text{InL3}$ - $^{111}\text{InL6}$  em comparação com o radiocromatograma do  $^{111}\text{InCl}_3$ .



**Figura 2.22.-** Cromatograma de RP-HPLC dos complexos  $^{111}\text{InL1}$ ,  $^{111}\text{InL3}$ - $^{111}\text{InL6}$  (detecção gama) (coluna: EC 254/4 10-100 C18; gradiente de 0,1% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  e 0,1% TFA/ $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL3}$  e  $^{111}\text{InL4}$ ) ou gradiente  $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_3\text{COOH}$  (2,1:2,8) e  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$ ))

### 2.3.2.2. Síntese e caracterização dos complexos de $^{67}\text{Ga}$

Na reacção de síntese dos complexos de  $^{67}\text{Ga}$ , foi utilizado cloreto de gálio-67 ( $^{67}\text{GaCl}_3$ ) como precursor. O  $^{67}\text{Ga(III)}$  foi fornecido sob a forma de citrato de  $^{67}\text{Ga}$ , tendo sido convertido a  $^{67}\text{GaCl}_3$  de acordo com uma metodologia descrita na literatura.<sup>212</sup> A utilização de citrato de  $^{67}\text{Ga}$  como precursor para a preparação de complexos de  $^{67}\text{Ga}$  requer geralmente a utilização de concentrações de ligando mais elevadas, na ordem de  $10^{-3}\text{M}$ <sup>210</sup> para forçar a substituição do citrato por esse ligando, o que diminui a actividade específica dos complexos de  $^{67}\text{Ga}$ . Já a

utilização de  $^{67}\text{GaCl}_3$  permite cinéticas de marcação mais rápidas e a utilização de concentrações finais de ligando inferiores para a síntese dos complexos de  $^{67}\text{Ga}$ .

Chan e Gonda descreveram um processo para a conversão de uma solução de citrato de  $^{67}\text{Ga}$  a  $^{67}\text{GaCl}_3$ , envolvendo adsorção a sílica de gel seguida de separação por centrifugação.<sup>213</sup> A necessidade de tal conversão relaciona-se com a formação de um complexo forte entre o citrato e o  $^{67}\text{Ga(III)}$  que dificulta a ligação do metal às moléculas para formação do complexo radioactivo.<sup>214</sup> Contudo, este processo de conversão era bastante moroso e Scasnár desenvolveu uma metodologia alternativa mais simples.<sup>212</sup> Assim, a conversão do citrato de  $^{67}\text{Ga}$  a  $^{67}\text{GaCl}_3$  foi realizada com base no método desenvolvido por Scasnár com algumas alterações.<sup>212</sup> A solução de citrato de  $^{67}\text{Ga}$  foi aplicada numa coluna Sep-Pak de sílica-gel. Os iões citrato foram removidos por extracção com  $\text{H}_2\text{O}$  ficando os iões  $^{67}\text{Ga(III)}$  adsorvidos na coluna. Em seguida, foi adicionada uma solução de  $\text{HCl}$  0,1N, para remover os iões  $^{67}\text{Ga(III)}$ , sendo estes eluídos sob a forma de  $^{67}\text{GaCl}_3$ .

O controlo da eficiência da conversão foi realizado por TLC em papel Whatman N°1 utilizando como fase móvel uma mistura de piridina/ $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:2:4). Neste sistema, o radiocromatograma obtido permite distinguir o citrato de  $^{67}\text{Ga}$  ( $R_f = 0,89$ ) do  $^{67}\text{GaCl}_3$  ( $R_f = 0,44$ ). Para detectar a eventual formação de colóides durante o processo de conversão, utilizou-se um sistema cromatográfico de ITLS-SG, utilizando como fase móvel, uma solução de 0,9%  $\text{NaCl}/0,1\text{N HCl}$  (25:0,5). Neste sistema, os colóides permanecem no ponto de aplicação ( $R_f = 0$ ) enquanto que o  $^{67}\text{GaCl}_3$  migra na frente do solvente ( $R_f = 1$ ).

Tal como para os complexos de  $^{111}\text{In}$ , as condições experimentais de preparação dos complexos de estradiol com  $^{67}\text{Ga}$  teve de ser otimizada para cada composto, para evitar a formação de espécies coloidais radioactivas (*e.g.*  $^{67}\text{Ga(OH)}_3$ ). Os complexos de  $^{67}\text{Ga}$  foram preparados por reacção dos ligandos **L2** e **L7** com  $^{67}\text{GaCl}_3$  numa solução de tampão acetato 0,4M, pH 5. No caso do composto **L2** a reacção decorreu a  $95^\circ\text{C}$  e no caso de **L7**, à temperatura ambiente, devido à natureza diferente da unidade quelante. A optimização das condições experimentais de reacção (tempo e concentração final de ligando) foi efectuada com base nos rendimentos de reacção e pureza radioquímica determinados por RP-HPLC e ITLC-SG.

Os parâmetros avaliados na síntese de cada complexo bem como as condições seleccionadas para prosseguir os estudos, estão descritas na **tabela 2.7**.

Tabela 2.7.- Condições experimentais estudadas na optimização da síntese dos complexos <sup>67</sup>GaL2 e

<sup>67</sup>GaL7

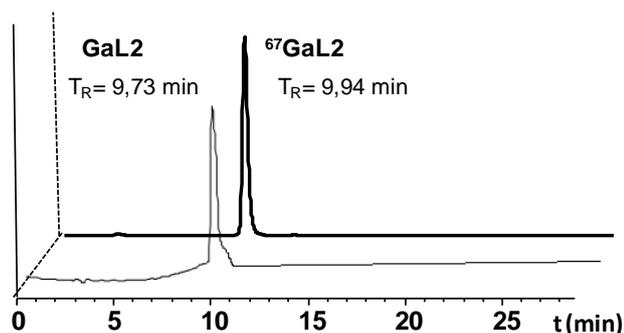
Ligando	Concentração de ligando final (M)	Temperatura/Tempo de reacção	Rendimento (%)	Complexo	T <sub>R</sub> (min)
<b>L2</b>	<b>1 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>95°C, 20 min</b>	<b>95</b>	<b><sup>67</sup>GaL2</b>	<b>9,94/9,73*</b>
		95°C, 30 min	78		
	9,0 x 10 <sup>-5</sup>	95°C, 20min	60		
		95°C, 30min	50		
	6,7 x 10 <sup>-5</sup>	95°C, 20 min	7		
	<b>L7</b>	<b>1 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>t.a., 5 min</b>		
t.a., 10 min			95		

\* T<sub>R</sub> dos complexos inactivos (a bold encontram-se as condições experimentais seleccionadas para prosseguir os estudos)

Nas condições reaccionais optimizadas, ambos os complexos foram obtidos com rendimentos elevados, quase quantitativos (≥ 95%), com concentrações finais de ligando 1 x 10<sup>-4</sup>M. A análise dos dados da **tabela 2.7** sugere que tempos de reacção mais longos na síntese dos complexos de <sup>67</sup>Ga não favorecem a cinética de marcação, observando-se mesmo uma diminuição do rendimento da reacção, no caso do **<sup>67</sup>GaL2**, o que pode indicar alguma degradação do composto. É também possível observar que a diminuição da concentração final de ligando **L2**, de 1 x 10<sup>-4</sup> M para 9 x 10<sup>-5</sup>M, conduziu a uma diminuição considerável do rendimento de marcação.

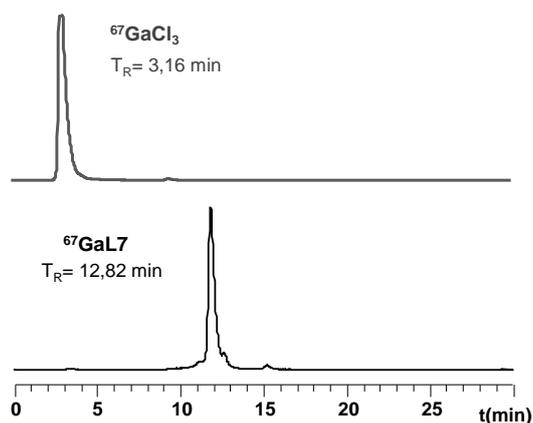
Tal como descrito para os complexos de <sup>111</sup>In, a identificação química dos complexos de <sup>67</sup>Ga também foi feita por análise em RP-HPLC, através da co-injeção dos complexos radioactivos com os complexos congéneres inactivos **GaL2** e **GaL7**, cuja caracterização a nível macroscópico foi descrita na secção 2.3.1.2.

A título de exemplo, apresenta-se na **Figura 2.23**. o perfil cromatográfico do complexo **<sup>67</sup>GaL2** (detecção da radiação γ) por análise de RP-HPLC em coluna de fase reversa e o do seu congénere inactivo **GaL2** (detecção UV a 220 nm).



**Figura 2.23.-** Cromatogramas de RP-HPLC dos complexos <sup>67</sup>GaL2 (detecção gama) e GaL2 (detecção UV/vis) (coluna: EC 254/4 10-100 C18; gradiente de 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O e 0,1% TFA/CH<sub>3</sub>CN)

Na **Figura 2.24** é apresentado o radiocromatograma obtido por RP-HPLC dos compostos <sup>67</sup>GaL7 e <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub>.



**Figura 2.24-** Cromatograma de RP-HPLC do complexo <sup>67</sup>GaL7 (detecção gama) (coluna: EC 254/4 10-100 C18; gradiente Et<sub>3</sub>N/CH<sub>3</sub>COOH (2,1:2,8) e CH<sub>3</sub>CN) e do <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub>.

Durante a síntese dos complexos de <sup>67</sup>Ga, pode também ocorrer a formação de algumas espécies hidrolisadas, juntamente com o complexo pretendido. Devido à sua natureza coloidal estas impurezas radioquímicas não podem ser identificadas por RP-HPLC. De modo a detectar a sua presença, os complexos de <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7 foram analisados no sistema cromatográfico anteriormente descrito, utilizando ITLC-SG como fase estacionária e a mistura de 0,9% NaCl/0,1N HCL (25:0,5 (v/v)) como fase móvel. Nestas condições analíticas, as espécies hidrolisadas ficam retidas no ponto de aplicação ( $R_f = 0$ ), enquanto o <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> migra na frente do solvente ( $R_f = 1$ ). A distribuição radioactiva ao longo dos cromatogramas evidenciaram a existência de um único pico ( $R_f$  entre 0,20 e 0,30) correspondente ao complexo radioactivo

desejado. Este resultado juntamente com a análise por RP-HPLC confirma a pureza radioquímica dos complexos sintetizados.

### 2.3.2.3. Estudos *in vitro* de caracterização e estabilidade dos complexos de $^{111}\text{In}$ e $^{67}\text{Ga}$

#### 2.3.2.3.1. Determinação da lipofilia

A fixação de um composto em determinado órgão ou tecido, e consequente distribuição biológica, é condicionada por diversos factores entre os quais se destaca o seu carácter lipo-hidrofílico, parâmetro que é usualmente avaliado através do coeficiente de partição desse composto entre uma solução orgânica e uma solução aquosa. As características lipo-hidrofílicas dos compostos dependem do seu equilíbrio ácido-base uma vez que espécies carregadas são mais hidrófilas que espécies neutras e a carga, em solução, varia em função do pH. Assim, a lipofilia/hidrofilia dos complexos radioactivos em estudo foi determinada pelo método de *shake flask*<sup>215</sup> com base nos seus coeficientes de partição no sistema bifásico n-octanol/PBS, a pH 7,4 e expressa através do seu logaritmo (Log  $D_{o/a}$ ). Os valores de log D determinados para cada complexo são apresentados na **tabela 2.8**.

**Tabela 2.8.**- Coeficientes de Partição (log  $D_{o/a}$ ) dos diferentes complexos, determinados a pH fisiológico.

Complexo	Log $D_{o/a}$
$^{111}\text{InL1}$	-0,99 ± 0,04
$^{111}\text{InL2}$	0,05 ± 0,01
$^{111}\text{InL3}$	-0,25 ± 0,02
$^{111}\text{InL4}$	0,43 ± 0,03
$^{111}\text{InL5}$	-0,72 ± 0,02
$^{111}\text{InL6}$	-0,99 ± 0,04
$^{67}\text{GaL2}$	-0,42 ± 0,04
$^{67}\text{GaL7}$	0,89 ± 0,05

Os valores de log D obtidos variaram entre -0,99 ± 0,04 ( $^{111}\text{InL1}$  e  $^{111}\text{InL6}$ ) e 0,89 ± 0,05 ( $^{67}\text{GaL7}$ ). Os complexos de  $^{111}\text{InL1}$ ,  $^{111}\text{InL3}$ ,  $^{111}\text{InL5}$ ,  $^{111}\text{InL6}$  e  $^{67}\text{GaL2}$ , têm carácter hidrofílico

enquanto os complexos  $^{111}\text{InL4}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  têm um carácter lipofílico moderado. O complexo  $^{111}\text{InL2}$  tem um carácter ligeiramente lipofílico.

Estes resultados indicam que tanto o tipo de quelato como a natureza do espaçador entre a molécula de estradiol e a unidade quelante, afectaram consideravelmente o carácter lipo-hidrofílico dos complexos derivados do estradiol. Os complexos  $^{111}\text{InL2}$  e  $^{111}\text{InL3}$  possuem na sua estrutura a mesma unidade quelante e como espaçador uma cadeia alifática com o mesmo número de átomos de carbono (quatro), diferindo apenas no grau de saturação. No caso do complexo  $^{111}\text{InL2}$  a cadeia alifática entre a biomolécula e o agente quelante é insaturada e no caso do complexo  $^{111}\text{InL3}$  é do tipo saturado. Esta pequena diferença estrutural parece interferir na lipofília/hidrofília dos complexos, sendo que o complexo  $^{111}\text{InL3}$  tem um carácter mais hidrofílico ( $\log D = -0,25 \pm 0,02$ ) que o complexo  $^{111}\text{InL2}$  ( $\log D = 0,05 \pm 0,01$ ). Resultado semelhante foi observado no caso dos complexos  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$ , que também possuem na sua estrutura o mesmo quelato e um espaçador com o mesmo número de átomos de carbono mas com diferente grau de saturação. O complexo  $^{111}\text{InL6}$  cujo espaçador contém uma cadeia saturada tem um carácter mais hidrofílico ( $\log D = -0,99 \pm 0,04$ ) que o complexo  $^{111}\text{InL5}$  ( $\log D = -0,72 \pm 0,02$ ), cujo espaçador é do tipo insaturado.

O aumento da cadeia carbonada do espaçador entre a biomolécula e o quelato na família de complexos do tipo estradiol-DOTA, de quatro átomos de carbono para seis átomos de carbono (complexo  $^{111}\text{InL4}$ ), conferiu um aumento do carácter lipofílico ( $\log D = 0,43 \pm 0,03$ ).

Os complexos  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  diferem no tamanho e tipo de espaçador e no tipo de quelato. O complexo  $^{67}\text{GaL7}$ , do tipo estradiol-NOTA possui características mais lipofílicas ( $\log D = 0,89 \pm 0,05$ ) do que o complexo  $^{67}\text{GaL2}$ , que pertence à família de complexos do tipo estradiol-DOTA e tem um carácter hidrofílico ( $\log D = -0,42 \pm 0,04$ ).

Os complexos  $^{111}\text{InL2}$  e  $^{67}\text{GaL2}$  têm em comum o mesmo ligando (**L2**). No entanto, o modo de coordenação de **L2** ao  $^{111}\text{In}$  é diferente do modo de coordenação ao  $^{67}\text{Ga}$  devido ao diferente número de coordenação dos radiometais, o que influencia o carácter lipo-hidrofílico dos respectivos complexos. O facto de no complexo  $^{67}\text{GaL2}$  existir um grupo ácido carboxílico livre, contribuiu para o aumento do carácter hidrofílico do complexo relativamente ao  $^{111}\text{InL2}$ , cujos grupos carboxilato se encontram todos coordenados ao metal.

Analisando os resultados de lipofília obtidos é possível prever que os complexos com maior facilidade para atravessar as membranas biológicas são os complexos  $^{111}\text{InL4}$  e  $^{67}\text{GaL7}$ , tendo em conta a sua lipofília mais elevada.

#### 2.3.2.3.2. Estudos de estabilidade *in vitro*

Os estudos de estabilidade *in vitro* permitem avaliar se os complexos radioactivos têm a capacidade de se manter intactos em condições aquosas e fisiológicas, requisito essencial no desenvolvimento de compostos com potencial aplicação clínica. Ou seja, permitem prever se são resistentes à degradação ou à hidrólise, evitando a formação de espécies radioquímicas indesejadas. A eventual formação de impurezas radioquímicas afecta a depuração sanguínea e de tecidos ou órgãos, assim como a distribuição biológica e as vias de excreção dos compostos. Por outro lado, é igualmente importante prever a estabilidade dos complexos face à transquelalação do  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  para substratos biológicos em circulação ou nos tecidos e que, eventualmente, actuem como competidores, tais como proteínas, aminoácidos ou outras moléculas biológicas.

A avaliação da estabilidade dos complexos radioactivos em diferentes meios foi efectuada com base na determinação da sua pureza radioquímica, ao longo do tempo, por análise cromatográfica.

#### ***Estabilidade *in vitro* em tampão fosfato salino e soro humano e estimativa da taxa de ligação às proteínas plasmáticas***

Procedeu-se ao estudo da estabilidade *in vitro* dos complexos em tampão fosfato salino (PBS) a pH 7,4 e na presença de soro humano. Os complexos radioactivos foram incubados a 37°C durante 120h. A estabilidade foi avaliada ao longo do tempo (1h, 3h, 24h e 120h) por análise da sua pureza radioquímica por RP-HPLC e ITLC-SG de alíquotas das misturas em incubação. Nos ensaios realizados em soro humano, as alíquotas foram tratadas com etanol, para precipitação das proteínas e após centrifugação, o sobrenadante foi analisado por RP-HPLC e ITLC-SG.

Nas Figuras 2.25. e 2.26. apresentam-se os gráficos com os resultados dos estudos de estabilidade dos complexos  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ ,  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  ao longo do tempo.

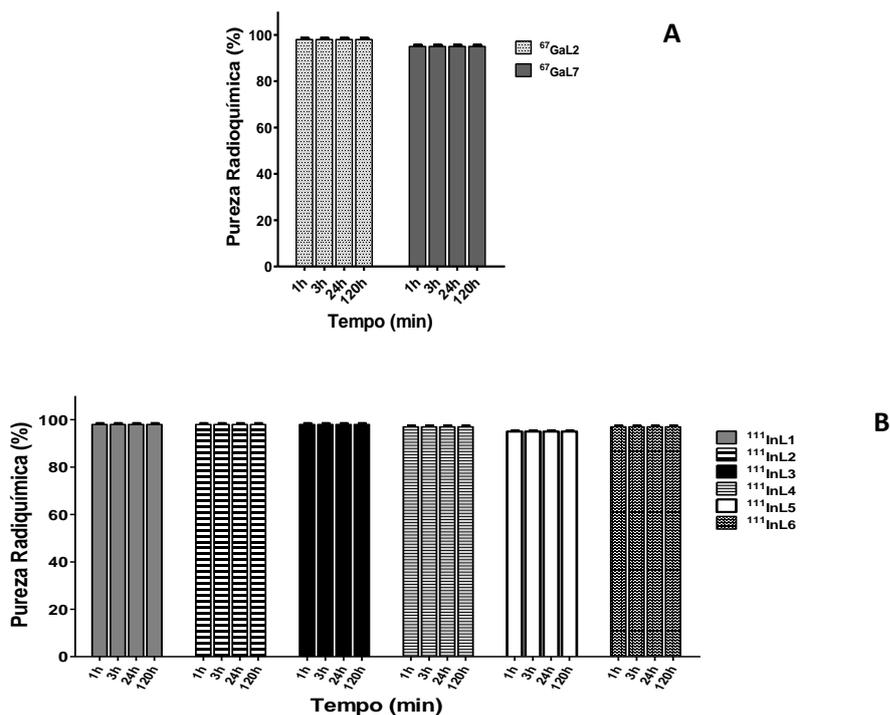


Figura 2.25.- Estabilidade dos complexos (B)  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$  e (A)  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  em PBS (pH 7,4) após 1h, 3h, 24h e 120h de incubação a 37°C.

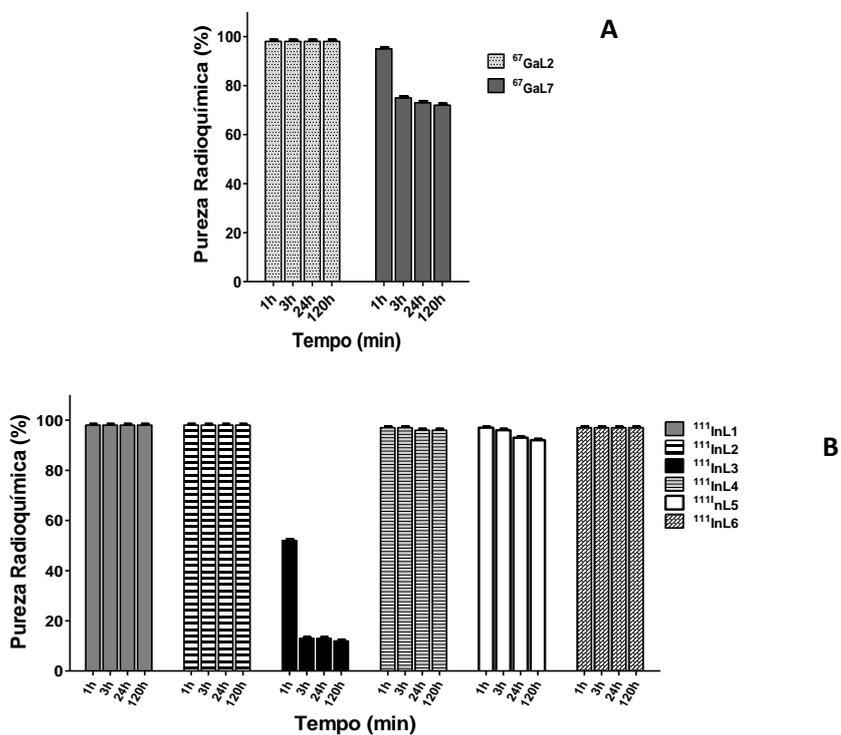


Figura 2.26.- Estabilidade dos complexos (B)  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$  e (A)  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  na presença de soro humano após 1h, 3h, 24h e 120h de incubação a 37°C.

A análise destes gráficos indica que os complexos  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ ,  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$ , mostraram ser bastante estáveis em PBS (pH 7,4) até 120h de incubação. Em soro humano também não se observou o aparecimento de qualquer outra espécie radioquímica, excepto no caso do complexo  $^{111}\text{InL3}$ , que mostrou ser instável a partir de 1h de incubação a 37°C. A análise dos radiocromatogramas de RP-HPLC do complexo  $^{111}\text{InL3}$  (Figura 2.27.) revelou a existência de duas espécies radioactivas após 1h de incubação a 37°C. Após 3h incubação verifica-se uma clara diminuição do pico correspondente ao complexo e o aumento do pico correspondente a outra espécie radioquímica não identificada, o que indica que poderá ter ocorrido metabolização e/ou degradação do composto na presença do soro humano.

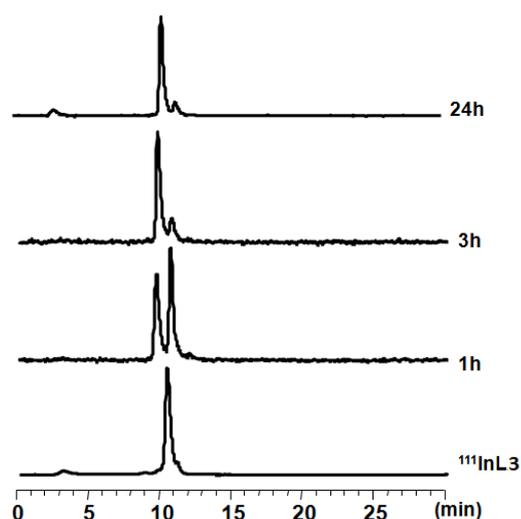


Figura 2.27.- Radiocromatogramas obtidos por análise de RP-HPLC da mistura do complexo  $^{111}\text{InL3}$  em soro humano às 1h, 3h e 24h de incubação.

A análise por RP-HPLC das alíquotas da mistura dos complexos com o soro humano requer a precipitação prévia das proteínas séricas com etanol o que permitiu ter uma estimativa aproximada da ligação dos complexos radioactivos a essas proteínas. Esta ligação foi determinada com base na razão entre a radioactividade associada ao precipitado (complexo ligado a proteínas séricas) e a radioactividade total adicionada ao soro. A medição da radioactividade no sedimento proteico mostrou que a taxa de ligação era relativamente baixa (< 35%) e que, em geral, não aumentava muito ao longo do tempo (tabela 2.9.) sugerindo que a ligação às proteínas plasmáticas não deverá comprometer a depuração sanguínea dos complexos quando administrados *in vivo*.

O valor mais elevado de ligação às proteínas foi encontrado para o  $^{111}\text{InL3}$  às 24h (60%). Tendo em consideração que a análise cromatográfica deste complexo na presença do

soro humano demonstrou a sua instabilidade após 1h de incubação (**Figura 2.27.**), o aumento de ligação às proteínas deste complexo poderá estar relacionado com o facto de o produto resultante da degradação/metabolização do  $^{111}\text{InL3}$  ter uma maior interacção com as proteínas do soro humano.

**Tabela 2.9.-** Radioactividade associada às proteínas do soro humano após 1h, 3h e 24h de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  com os complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$ .

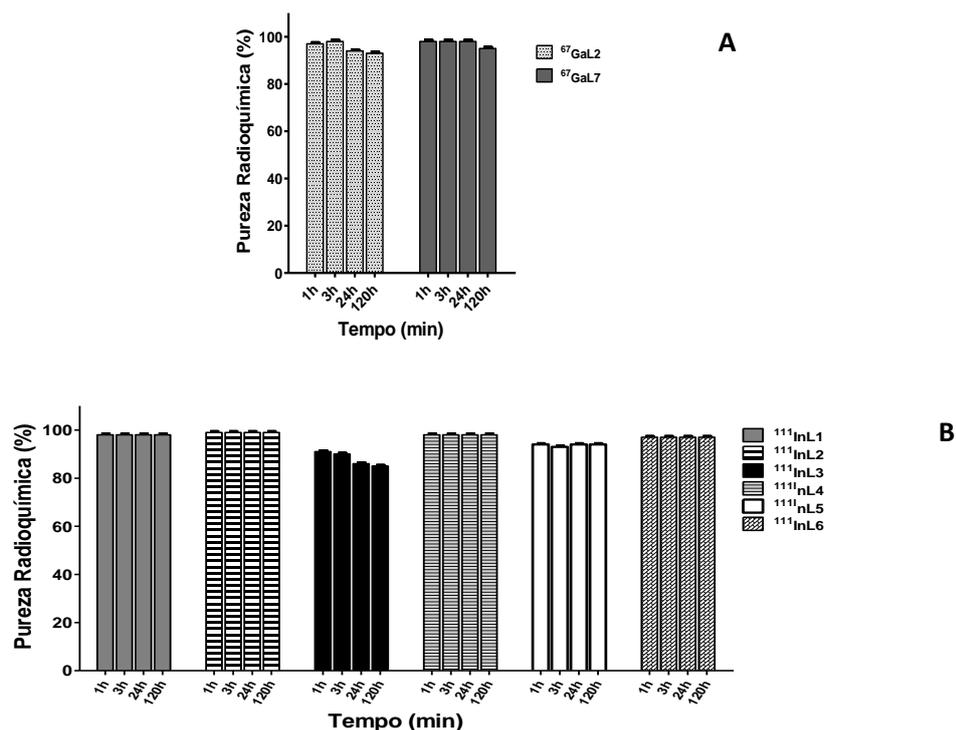
Complexo	Ligação às proteínas (%)		
	1h	3h	24h
$^{111}\text{InL1}$	10	9	6
$^{111}\text{InL2}$	30	26	29
$^{111}\text{InL3}$	27	35	60
$^{111}\text{InL4}$	16	21	21
$^{111}\text{InL5}$	13	12	17
$^{111}\text{InL6}$	19	18	20
$^{67}\text{GaL2}$	19	20	35
$^{67}\text{GaL7}$	16	20	23

#### ***Estabilidade in vitro na presença de apo-transferrina***

A transferrina é uma glicoproteína plasmática cuja principal função consiste no transporte de Fe(III) na corrente sanguínea. No entanto pode também transportar outros iões metálicos. Esta proteína, com um peso molecular de aproximadamente 80 kDa, possui dois domínios homólogos de coordenação aos iões metálicos. A sua ligação ao ião  $\text{Fe}^{3+}$  é muito forte mas ocorre de modo reversível permitindo o seu transporte às células dos vários tecidos. Por outro lado, em condições fisiológicas normais, cerca de dois terços dos locais de ligação específica não estão ocupados podendo coordenar outros iões metálicos. A proteína sob esta forma designa-se por apo-transferrina. Os iões  $\text{In}^{3+}$  e  $\text{Ga}^{3+}$  possuem uma elevada afinidade para a transferrina com constantes de estabilidade  $\log K_{\text{InL}}$  de 18,3 e 19,8, respectivamente.<sup>79</sup> Tendo em consideração a elevada afinidade dos radiometais para a transferrina, determinou-se a estabilidade dos complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  na presença de apo-transferrina utilizando um método competitivo, com o objectivo de antecipar o seu comportamento após administração *in vivo*. Os complexos em estudo foram incubados durante 120h, a  $37^{\circ}\text{C}$ , com uma solução

tampão de bicarbonato 10 mM, pH 7,4 contendo um excesso molar de apo-transferrina (1:15).<sup>216</sup> A estabilidade dos complexos foi estudada após 1h, 3h, 24h e 120h por análise da sua pureza radioquímica em RP-HPLC e ITLC-SG de alíquotas da mistura.

Na **Figura 2.28.** é apresentado o gráfico com os resultados do estudo de estabilidade dos complexos <sup>111</sup>InL1-<sup>111</sup>InL6, <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7 na presença de solução de apo-transferrina até 120h de incubação, a 37°C.

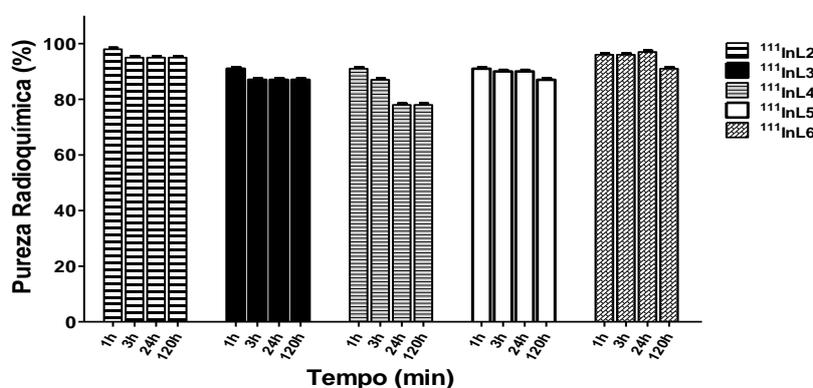


**Figura 2.28.-** Estabilidade dos complexos (B) <sup>111</sup>InL1-<sup>111</sup>InL6, (A) <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7 na presença de um excesso molar de apo-transferrina após 1h, 3h, 24h e 120h de incubação a 37°C.

A análise dos resultados obtidos demonstrou que a maioria dos complexos em estudo são estáveis na presença de excesso de apo-transferrina não se observando transquelatação do íon metálico para a proteína (pureza radioquímica >82%). No caso do complexo <sup>111</sup>InL3 detectou-se o aparecimento de uma ligeira percentagem de outra espécie radioquímica (variando entre 8 e 18%, após 1h e 120h de incubação, respectivamente) com um tempo de retenção inferior ( $R_T = 3,48$  min). Esta observação sugere que o aparecimento desta espécie radioquímica corresponde à transquelatação para a proteína.

**Estabilidade *in vitro* na presença de DTPA**

A estabilidade *in vitro* dos complexos de  $^{111}\text{In}$  foi também avaliada na presença de DTPA, um agente quelante com grande afinidade para o  $\text{In}^{3+}$  ( $\log K_{\text{InL}} = 29,0$ ), sendo esta superior à constante de estabilidade  $\text{DOTA-In}^{3+}$  ( $\log K_{\text{InL}} = 23,9$ ).<sup>79</sup> Assim, avaliou-se a estabilidade dos complexos  $^{111}\text{InL2}$ - $^{111}\text{InL4}$ ,  $^{111}\text{InL5}$ ,  $^{111}\text{InL6}$  na presença de um excesso molar de DTPA de 1:1000 durante 120h a 37°C. A estabilidade dos complexos foi avaliada por determinação da pureza radioquímica de alíquotas da mistura retiradas após 1h, 3h, 24h e 120h de incubação. Na **Figura 2.29**, apresenta-se o gráfico com os resultados do estudo de estabilidade dos complexos na presença de DTPA analisados por RP-HPLC e ITLC-SG.



**Figura 2.29.-** Estabilidade dos complexos  $^{111}\text{InL2}$ - $^{111}\text{InL4}$ ,  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$  na presença de um excesso de DTPA após 1h, 3h, 24h e 120h de incubação a 37°C.

Como se pode observar na representação gráfica, os complexos em estudo revelaram ser estáveis e cineticamente inertes na presença de DTPA até 120h de incubação, não se detectando o aparecimento de espécies radioquímicas correspondentes a degradação ou tranquelatação (pureza radioquímica >80%). No entanto, no caso dos complexos  $^{111}\text{InL3}$  e  $^{111}\text{InL4}$ , observa-se uma redução muito ligeira da pureza radioquímica (<20%), ao longo do tempo, devida ao aparecimento de uma pequena percentagem de espécies com tempo de retenção de 3,40 min.

Os resultados dos estudos de estabilidade *in vitro* em diferentes condições fisiológicas incentivaram a realização de estudos biológicos uma vez que a maioria dos complexos demonstraram ser estáveis ao longo do tempo permitindo antecipar que não serão susceptíveis de se degradar ou sofrer tranquelatação após administração *in vivo*.

## 2.4. Avaliação Biológica

### 2.4.1. Determinação da afinidade de ligação ao receptor de estrogénio dos conjugados de estradiol e de complexos de In(III) e Ga(III)

A introdução de modificações estruturais numa biomolécula pode comprometer consideravelmente a sua afinidade de ligação específica para os seus receptores pelo que a determinação deste parâmetro, comparativamente à molécula endógena, deve ser avaliado. No caso dos compostos em estudo no âmbito deste trabalho, a funcionalização da posição C16 do estradiol com diferentes espaçadores e agentes quelantes bifuncionais pode afectar a sua afinidade para o receptor de estrogénio. Assim, a afinidade de ligação dos conjugados do estradiol aos dois subtipos de receptor estrogénico, RE $\alpha$  e RE $\beta$ , foi determinada para avaliar o efeito das diferentes modificações introduzidas no ligando endógeno.

A afinidade de ligação para o subtipo  $\alpha$  do RE foi avaliada para todos os conjugados **L1-L7** e aqueles que apresentaram maior afinidade para o RE $\alpha$  foram também avaliados quanto à sua afinidade para o subtipo  $\beta$  para determinar a selectividade para o RE $\alpha$ . No caso dos ligandos **L5-L6** que mostraram ter uma considerável afinidade de ligação para o RE $\alpha$ , a afinidade dos respectivos complexos de índio foi também determinada. Relativamente ao complexo inactivo de gálio **GaL7**, a sua falta de solubilidade nos solventes do ensaio impediu a determinação da sua afinidade para o RE, apesar do ligando **L7** apresentar afinidade para RE $\alpha$ .

A afinidade de ligação dos conjugados **L1-L7** e dos complexos de índio (**InL5** e **InL6**) para os receptores foi determinada por um ensaio competitivo entre os compostos em estudo e o  $^3\text{H}$ -estradiol, para os locais de ligação ao receptor recombinante humano, comparativamente ao  $17\beta$ -estradiol. Assim, prepararam-se soluções dos conjugados **L1-L7**, dos complexos **InL5** e **InL6** e de  $17\beta$ -estradiol em tampão TRIS-HCl 10 mM, a pH 7,5 contendo 10% de glicerol, DTT 2 mM e BSA (1 mg/mL) com concentrações variáveis entre 1nM e 50  $\mu\text{M}$ . O ensaio consistiu na incubação destas soluções com uma mistura contendo o  $^3\text{H}$ -estradiol e o receptor isolado (RE $\alpha$  ou RE $\beta$ ), no mesmo tampão, durante uma noite a 4°C. Após este período separou-se o complexo receptor-ligando adicionando à mistura reaccional uma suspensão de hidroxiapatite (HAP) em tampão TRIS-HCl. Após diversas lavagens o sobrenadante contendo o  $^3\text{H}$ -estradiol livre foi removido e o precipitado de HAP foi suspenso em etanol, para dissolver o complexo  $^3\text{H}$ -estradiol-receptor. A actividade foi medida em contador de cintilação líquida.

Os resultados foram expressos em percentagem de  $^3\text{H}$ -estradiol ligado ao RE utilizando a seguinte equação:

$$^3\text{H} - \text{estradiol ligado ao RE} = \frac{B - \text{NSB}}{B_0 - \text{NSB}} \times 100$$

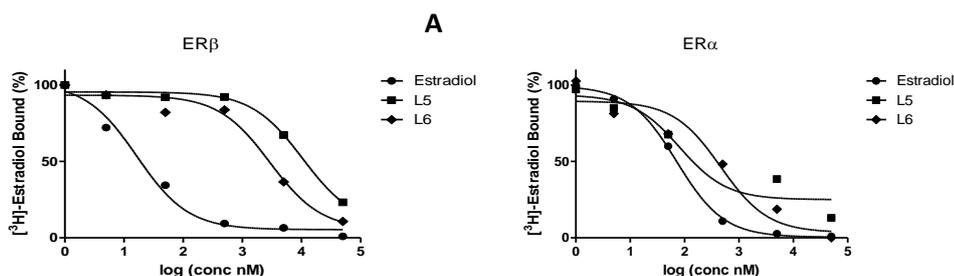
Onde,

**B**- valor de  $^3\text{H}$ -estradiol ligado ao RE (cpm)

**B<sub>0</sub>**- valor da ligação máxima de  $^3\text{H}$ -estradiol (cpm)

**NSB**- valor da ligação não específica, correspondente à concentração de 50 $\mu\text{M}$  de 17 $\beta$ -estradiol

A título de exemplo, na **Figura 2.30.** são apresentados os gráficos que representam a percentagem de  $^3\text{H}$ -estradiol ligado ao receptor (RE $\alpha$  ou RE $\beta$ ) em função da variação do logaritmo da concentração dos conjugados **L5** e **L6**. A partir da curva obtida é possível determinar para cada conjugado os valores de IC<sub>50</sub> (concentração de composto necessário para inibir em 50% a ligação máxima do  $^3\text{H}$ -estradiol ao receptor).



**Figura 2.30.-** Percentagem de  $^3\text{H}$ -estradiol ligado ao RE em função da variação do logaritmo da concentração de 17 $\beta$ -estradiol, **L5** e **L6** e respectivos valores de IC<sub>50</sub>. **(A)** RE $\alpha$ , **(B)** RE $\beta$ .

Os valores de IC<sub>50</sub> encontrados para os conjugados **L5**, **L6** e **L7** foram de 80,8 nM, 463 nM e 639 nM, respectivamente para o RE $\alpha$ , e de 11,7  $\mu\text{M}$ , 2,9  $\mu\text{M}$  e 4,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente para o RE $\beta$ , indicando que estes compostos mantêm afinidade para o RE. Com base nos valores de IC<sub>50</sub> obtidos foi possível calcular para cada composto em estudo o valor de afinidade de ligação relativa, designado por RBA (*Relative Binding Affinity*). O RBA é definido como a razão entre os valores de IC<sub>50</sub> do 17 $\beta$ -estradiol e o valor de IC<sub>50</sub> do composto em estudo.

$$\text{RBA} (\%) = \frac{\text{IC}_{50} \text{ 17}\beta - \text{estradiol}}{\text{IC}_{50} \text{ composto em teste}} \times 100$$

Os valores de RBA obtidos para os conjugados (**L1-L7**) e para os complexos de índio (**InL5** e **InL6**), assim como a respectiva selectividade para o subtipo  $\alpha$  do RE, expressa pela razão  $RBA_{\alpha}/RBA_{\beta}$ , são apresentados na **tabela 2.10**.

**Tabela 2.10.**- Valores de RBA, expressos em %, dos compostos **L1-L7** e dos complexos **InL5** e **InL6** para o  $RE_{\alpha}$  e  $RE_{\beta}$ , em comparação com o  $17\beta$ -estradiol.

Composto	$RE_{\alpha}$	$RE_{\beta}$	$\alpha/\beta$
<b><math>17\beta</math>-estradiol</b>	100	100	1
<b>L1</b>	$\leq 0$	n.d.	---
<b>L2</b>	$\leq 0$	n.d.	---
<b>L3</b>	$\leq 0$	n.d.	---
<b>L4</b>	$\leq 0$	n.d.	---
<b>L5</b>	88	0,1	880
<b>L6</b>	15	0,5	30
<b>L7</b>	2,5	0,3	8,3
<b>InL5</b>	44	n.d.	---
<b>InL6</b>	22	n.d.	---

*n.d.-não determinado*

Da análise destes resultados (**tabela 2.10.**) podemos concluir que os conjugados estradiol-DTPA (**L1**) e estradiol-DOTA (**L2- L4**) não apresentam afinidade relevante para o  $RE_{\alpha}$  ( $RBA \leq 0\%$ ). No entanto, a substituição da unidade quelante DOTA pelo seu derivado DOTAGA em **L5** e **L6** conduziu a valores de RBA de 88 e 15%, respectivamente. Este aumento de afinidade poderá estar relacionado com a diferente grau de saturação do espaçador entre a molécula do estradiol e a unidade quelante, uma vez que **L5** apresentou uma afinidade muito mais elevada que a do seu análogo saturado **L6**. A menor afinidade de **L6** para RE pode eventualmente ser atribuída à maior flexibilidade conformacional da cadeia alquílica. Resultados idênticos foram descritos na literatura, por Kuduk e colaboradores, que observaram uma melhor tolerância do receptor para derivados de estradiol  $16\alpha$ -substituídos com cadeias insaturadas em conjugados estradiol-geldamicina.<sup>217</sup> Um efeito semelhante foi também descrito para complexos de rénio derivados do estradiol, funcionalizado na posição  $17\alpha$ , por Ramesh e colaboradores.<sup>218</sup>

A substituição da unidade quelante DOTAGA no conjugado **L6** por NODAGA (**L7**) conduziu a uma diminuição da afinidade para o  $RE_{\alpha}$  (15% vs 2,5%, respectivamente). Tendo em consideração que os dois conjugados possuem o mesmo espaçador, a perda de afinidade

sugere que o tipo de unidade quelante também poderá influenciar a capacidade de ligação ao receptor.

Os resultados obtidos indicam também que os conjugados estradiol-DOTAGA (**L5** e **L6**) e estradiol-NODAGA (**L7**) apresentaram baixa afinidade para o subtipo  $\beta$  ( $RBA \leq 0.5\%$ ) o que se reflectiu numa considerável selectividade para o  $RE\alpha$ .

A determinação da afinidade dos complexos **InL5** e **InL6** para o RE sugere que a coordenação ao índio pelos ligandos **L5** e **L6** parece ser bem tolerada pelo  $RE\alpha$ . Tal como observado com **L5** e **L6**, a afinidade de ligação aparenta estar relacionada com o grau de saturação do espaçador. No caso do complexo **InL5** observou-se uma perda de afinidade relativamente a **L5** (44% vs 88%) no entanto, o complexo mantém ainda afinidade para  $RE\alpha$ . Resultados semelhantes foram obtidos com outros complexos metálicos funcionalizados na posição C16 $\alpha$  do estradiol. Huang e colaboradores demonstraram que complexos de rénio possuíam uma afinidade para o RE relativamente elevada, com uma concentração na ordem do nanomolar.<sup>155</sup> No caso do complexo **InL6** surpreendentemente a afinidade de ligação não diminui relativamente a **L6** (22% vs 15%). Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Zhang e colaboradores que verificaram que a introdução de diferentes metais (Pd, Ni e Zn) em derivados de estradiol funcionalizados em C17 $\alpha$  levava por vezes ao aumento da afinidade relativamente ao ligando livre.<sup>153</sup>

Devido à baixa solubilidade dos complexos **InL1-InL4**, **GaL2** e **GaL7** nos solventes de ensaio não foi possível determinar as suas afinidades de ligação ao RE. Contudo, o facto dos ligandos **L1-L4** não terem demonstrado afinidade para os RE sugerem-nos a hipótese de que os complexos **InL1-InL4**, **GaL2** também não possuiriam afinidade para o RE.

#### 2.4.2. Estudos de captação celular dos complexos de <sup>111</sup>In e <sup>67</sup>Ga

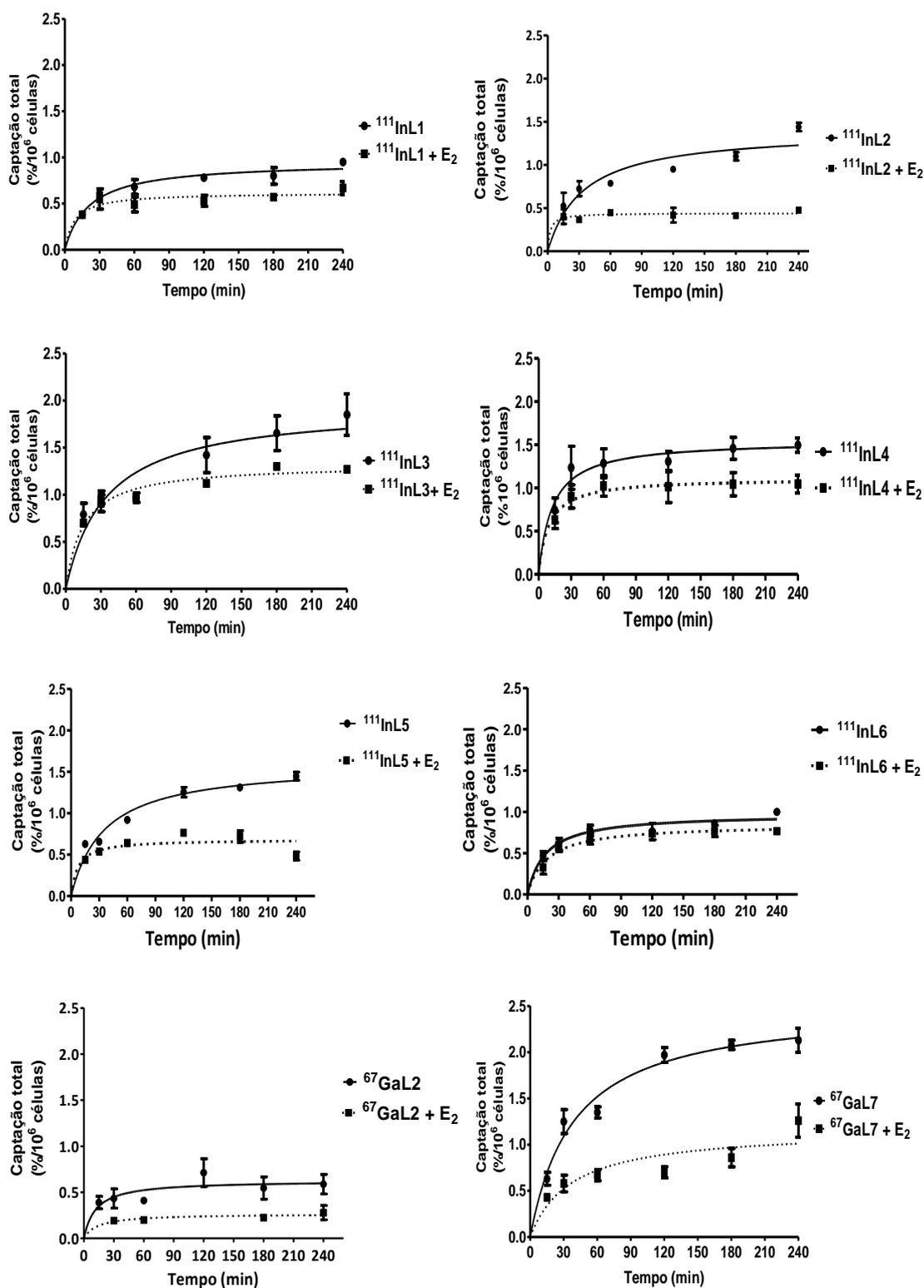
Os receptores de estrogénio localizam-se predominantemente ao nível do núcleo da célula. Consequentemente, qualquer composto para interaccionar com estes receptores tem de entrar na célula atravessando as suas membranas plasmática e nuclear. Os ensaios *in vitro* de captação celular permitem determinar a capacidade dos compostos de atravessarem a membrana plasmática das células, localizando-se no seu interior e avaliar a possibilidade dos novos complexos para se ligarem *in vivo* ao RE. Assim, efectuaram-se estudos *in vitro* de captação celular dos complexos de <sup>111</sup>In e <sup>67</sup>Ga em duas linhas celulares de adenocarcinoma da mama de origem humana: células MCF-7, que expressam  $RE\alpha$  e células MDA-MB-231, que não

expressam RE $\alpha$ , como modelos de células (RE+) e (RE-), respectivamente. Estes estudos permitiram avaliar a influência das modificações estruturais introduzidas na molécula de estradiol (diferentes espaçadores e diferentes quelatos) na sua capacidade para atravessar passivamente a membrana plasmática. Permitiram também obter informação adicional sobre a capacidade de ligação dos complexos ao RE.

A especificidade de ligação dos complexos aos receptores foi avaliada simultaneamente pela utilização das duas linhas celulares acima referidas (RE +) e (RE-) e pela saturação prévia dos receptores das células MCF-7, por incubação com um excesso de 17 $\beta$ -estradiol.

Os ensaios de captação total nas linhas celulares foram efectuados por incubação, ao longo do tempo, dos complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  em estudo, diluídos no meio de cultura sem vermelho de fenol e suplementado com soro bovino fetal tratado com carvão activado, sob atmosfera húmida de 5%  $\text{CO}_2$ , a 37°C, de acordo com o procedimento descrito na secção 6.6.1. Os ensaios na linha tumoral de cancro da mama MCF-7 foram realizados na presença e ausência de 17 $\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ). Após o período de incubação, removeu-se o meio de cultura e as células foram lavadas e neutralizadas com uma solução de PBS, mantido a 4°C, sendo de seguida lisadas com NaOH 1N. A radioactividade foi medida num contador gama. Para cada tempo de incubação foram feitos quatro replicados.

Na **Figura 2.31**, apresentam-se os resultados da captação total dos complexos  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ ,  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  na linha celular MCF-7.



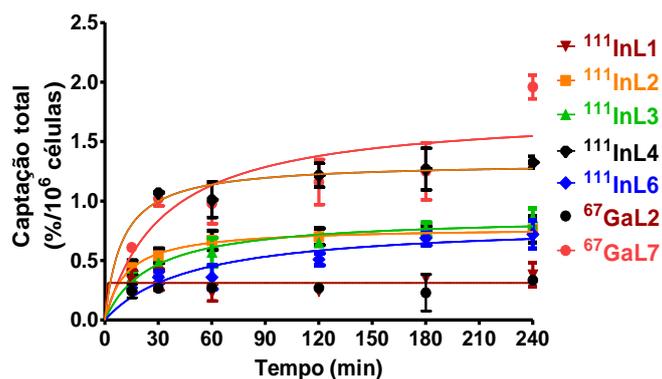
**Figura 2.31.-** Captação celular total dos complexos <sup>111</sup>InL1-<sup>111</sup>InL6, <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7 nas células MCF-7, previamente tratadas ou não com 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) em função do tempo de incubação, a 37°C, expressa em percentagem de actividade total adicionada por milhão de células.

A análise dos resultados apresentados nos gráficos da **Figura 2.31**, demonstra que de uma forma geral, a captação dos complexos em estudo pelas células MCF-7 aumentou com o tempo de incubação alcançando uma taxa de acumulação quase estacionária aproximadamente após 2h de incubação, no entanto o valor máximo é relativamente baixo. A percentagem máxima de captação foi obtida com o complexo <sup>67</sup>GaL7 (2,13% ± 0,13) após 4h de incubação. Este resultado relaciona-se provavelmente com o carácter mais lipofílico deste complexo. A menor captação celular observada pelos restantes complexos pode ser explicada pelo seu carácter hidrofílico. Os valores de captação celular mais baixos foram obtidos com o complexo <sup>67</sup>GaL2 (0,59% ± 0,11) após 4h de incubação.

A lipofilia, associada a uma estrutura adequada, favorece a difusão passiva através da bicamada lipídica da membrana plasmática. Assim sendo, e devido ao carácter hidrofílico dos complexos <sup>111</sup>InL1, <sup>111</sup>InL3, <sup>111</sup>InL5, <sup>111</sup>InL6 e <sup>67</sup>GaL2 não era expectável uma penetração elevada nas células por este mecanismo de transporte, já que a entrada no interior da célula é favorecida para compostos lipofílicos.

Quanto à especificidade de ligação para o RE $\alpha$  e apesar dos baixos valores de captação, de um modo geral, a percentagem de captação celular foi mais reduzida quando os receptores das células tumorais estão bloqueados com 17 $\beta$ -estradiol. Para além disso, a acumulação de actividade embora aumente linearmente nos primeiros minutos de incubação, tal como nas células não tratadas com estradiol, torna-se mais lenta atingindo a situação de estado estacionário entre os 15 e os 60 minutos. Estas observações sugerem que a captação destes compostos nas células MCF-7 poderá ser mediada pelos RE. As curvas de captação de <sup>111</sup>InL2, <sup>111</sup>InL5 e <sup>67</sup>GaL7 mostram claramente as diferenças existentes na cinética de captação entre as células com receptores saturados e não saturados. A acumulação nas células não tratadas atinge valores de 1,14% ± 0,05, 1,45% ± 0,05 e 2,14% ± 0,12, respectivamente. Enquanto nas células cujos receptores se encontravam bloqueados com excesso de estradiol foi possível observar um decréscimo da actividade acumulada para 0,48% ± 0,03, 0,48% ± 0,04 e 1,26% ± 0,18, respectivamente. Estes valores correspondem a uma diminuição de captação total que oscilou entre 41 e 67%. No caso de <sup>111</sup>InL5 esta acumulação pode estar directamente relacionada com a maior afinidade para o RE $\alpha$  determinada com o complexo análogo InL5. No entanto no caso do complexo <sup>111</sup>InL6, cujo análogo InL6 também demonstrou ter afinidade para o receptor isolado, não se observou redução na taxa de captação celular sugerindo que não haja ligação aos receptores *in vivo*.

O ensaio de captação celular dos complexos radioactivos na linha celular MDA-MB-231, permitiu avaliar o efeito da ligação não especifica nas células do cancro da mama. Na **Figura 2.32.** apresentam-se os resultados da captação total dos complexos em estudo na linha celular MDA-MB-231, ao longo do tempo. Na **tabela 2.11.** comparam-se os valores máximos de captação celular dos complexos em estudo, obtidos após 4h de incubação, nas duas linhas celulares de adenocarcinoma da mama (RE +) e (RE-).



**Figura 2.32.-** Captação celular total dos complexos <sup>111</sup>InL1- <sup>111</sup>InL4, <sup>111</sup>InL6 e <sup>67</sup>GaL7 nas células MDA-MB-231, em função do tempo de incubação a 37 °C, expressa em percentagem de actividade total adicionada por milhão de células.

A análise dos resultados apresentados no gráfico da **Figura 2.32.** e na **tabela 2.11.** mostra que, de um modo geral, a captação celular total dos complexos em estudo pelas células MDA-MB-231 foi ligeiramente inferior à observada na linha celular MCF-7, excepto no caso dos complexos com maior lipofilia, <sup>111</sup>InL4 e <sup>67</sup>GaL7, onde não se observou grande diminuição da taxa de captação celular. O valor de captação celular mais elevado foi observado com o complexo <sup>67</sup>GaL7 (1,96% ± 0,10) e o valor mais baixo foi obtido com o complexo <sup>67</sup>GaL2 (0,33% ± 0,02) sugerindo que a ligação às células é predominantemente não específica e indicando que a captação se relaciona essencialmente com o carácter lipofílico/ hidrofílico dos complexos.

**Tabela 2.11.-** Percentagem de captação celular, normalizada para milhão de células, dos complexos  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ ,  $^{67}\text{GaL1}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  após 4h de incubação nas linhas celulares MCF-7 (RE+) e MDA-MB-231 (RE-).

Complexo	Captação Total (%/milhão células)	
	MCF-7	MDA-MB-231
$^{111}\text{InL1}$	0,95 ± 0,01	0,38 ± 0,10
$^{111}\text{InL2}$	1,44 ± 0,05	0,76 ± 0,11
$^{111}\text{InL3}$	1,85 ± 0,22	0,86 ± 0,08
$^{111}\text{InL4}$	1,49 ± 0,08	1,20 ± 0,20
$^{111}\text{InL5}$	1,45 ± 0,05	-----
$^{111}\text{InL6}$	1,00 ± 0,03	0,72 ± 0,12
$^{67}\text{GaL2}$	0,59 ± 0,11	0,33 ± 0,02
$^{67}\text{GaL7}$	2,13 ± 0,13	1,96 ± 0,10

Concluindo, o conjunto dos resultados obtidos nos ensaios de captação celular sugerem que a acumulação de alguns dos complexos nas células MCF-7, poderá estar relacionada com um mecanismo mediado pelos receptores RE contudo, a baixa taxa de captação, consequência possivelmente do seu reduzido carácter lipofílico, não favorece a entrada dos complexos nas células.

### 2.4.3. Estudos de biodistribuição dos complexos de $^{111}\text{In}$ e $^{67}\text{Ga}$

O estudo da biodistribuição de compostos radioactivos em modelo animal é importante para a caracterização do seu comportamento *in vivo* pois permite obter informação relevante sobre a sua biocinética, através da determinação da velocidade de fixação e de depuração dos principais órgãos, tecidos e fluidos. Estes ensaios permitem também avaliar a estabilidade *in vivo* dos compostos, relativamente à hidrólise, metabolização ou transquelatação para biomoléculas presentes na corrente sanguínea ou nos tecidos. Permitem igualmente caracterizar a especificidade e selectividade para órgãos ou tecidos alvo. Em particular, possibilitam determinar a taxa de captação em órgãos ricos em receptores de estrogénio, tais como útero e ovários. Através do estudo da biodistribuição é possível determinar as taxas de depuração sanguínea e identificar as vias de excreção envolvidas na

eliminação dos compostos. De um modo geral, a depuração sanguínea de compostos radioactivos deve ser suficientemente rápida para minimizar a irradiação de órgãos não alvo e lenta o suficiente para permitir a interacção com o órgão alvo. Por outro lado, a via de excreção predominante deve ser renal para melhorar a razão órgão alvo/não alvo na região abdominal.

Com o objectivo de avaliar o seu comportamento biológico *in vivo* realizaram-se ensaios de biodistribuição dos complexos  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$ , uma vez que os respectivos complexos análogos de In(III) demonstraram afinidade *in vitro* para o RE. Como modelo animal utilizaram-se ratos fêmea imaturos, da estripe Sprague-Dawley (20-22 dias), para garantir a existência de baixos níveis de estrogénio endógeno. Nesta espécie animal o ciclo estral inicia-se cerca de 30 dias após o nascimento, assim os receptores de estrogénio presentes nos órgãos alvo não estariam saturados. Os compostos foram administrados por via endovenosa, na veia da cauda e os animais sacrificados após 1, 2 e 24 h. Os órgãos de interesse foram recolhidos, pesados e a sua actividade medida, de acordo com o procedimento descrito em 6.7.1.

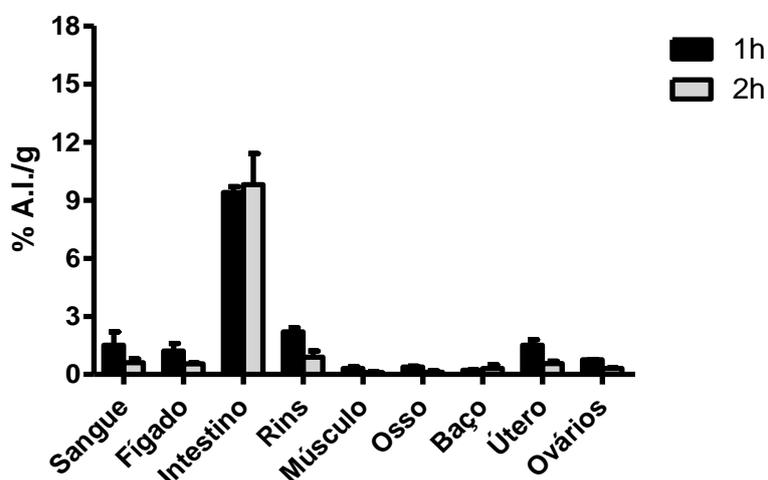
Com estes ensaios pretendeu-se estudar a distribuição biológica e a estabilidade *in vivo* dos complexos ao longo do tempo após administração, assim como a sua especificidade e selectividade para os órgãos alvo, útero e ovários, para determinar o seu potencial interesse no desenvolvimento de radiofármacos- $^{111}\text{In}$  para diagnóstico e/ou terapia de cancros RE+.

#### **Biodistribuição dos complexos $^{111}\text{InL5}$ e $^{111}\text{InL6}$**

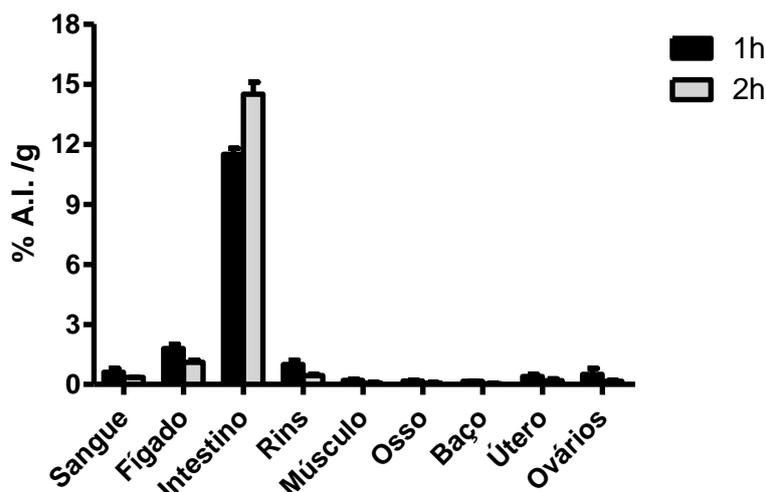
Os resultados da biodistribuição dos complexos  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$ , expressos em percentagem de actividade injectada por grama de órgão (% A.I./g) são apresentados na **tabela 2.12 e Figuras 2.33. e 2.34**

**Tabela 2.12.-** Resultados de biodistribuição e excreção total dos complexos  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$ , em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

Órgão	$^{111}\text{InL5}$ (% A. I./ g)			$^{111}\text{InL6}$ (% A. I./ g)	
	1 h	2 h	24 h	1 h	2 h
Sangue	1,50 $\pm$ 0,70	0,60 $\pm$ 0,20	0,05 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,20	0,35 $\pm$ 0,02
Fígado	1,20 $\pm$ 0,40	0,54 $\pm$ 0,05	---	1,80 $\pm$ 0,20	1,10 $\pm$ 0,10
Intestinos	9,40 $\pm$ 0,30	9,80 $\pm$ 1,60	0,30 $\pm$ 0,10	11,50 $\pm$ 0,30	14,50 $\pm$ 0,60
Baço	0,22 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,20	0,24 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01
Coração	0,32 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,10	0,05 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,02
Pulmões	0,69 $\pm$ 0,12	0,30 $\pm$ 0,10	0,10 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02
Rins	2,20 $\pm$ 0,20	0,90 $\pm$ 0,30	1,01 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,20	0,45 $\pm$ 0,05
Músculo	0,30 $\pm$ 0,10	0,10 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,06	0,07 $\pm$ 0,04
Osso	0,38 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,07	0,08 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,02
Estômago	0,50 $\pm$ 0,10	0,23 $\pm$ 0,02	---	0,20 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,03
Útero	1,50 $\pm$ 0,30	0,60 $\pm$ 0,10	0,06 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,10	0,20 $\pm$ 0,10
Ovários	0,76 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,30	0,15 $\pm$ 0,05
Excreção (%A.I.)	24,1 $\pm$ 0,50	42,5 $\pm$ 6,20	93,30 $\pm$ 1,50	16,10 $\pm$ 5,60	19,60 $\pm$ 2,70



**Figura 2.33.-** Biodistribuição do complexo  $^{111}\text{InL5}$ , em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

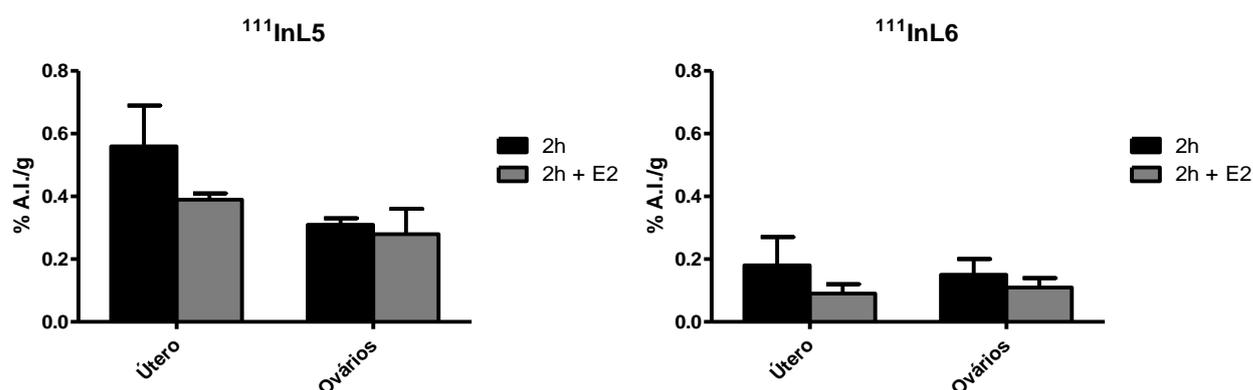


**Figura 2.34.-** Biodistribuição do complexo  $^{111}\text{InL6}$ , em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média  $\pm$  desvio padrão;  $n=3$ ).

Da análise comparativa destes resultados verificou-se que o perfil de biodistribuição dos complexos  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$  é bastante semelhante destacando-se uma rápida depuração sanguínea e rápida captação por via hepática seguida de eliminação intestinal. A percentagem de actividade injectada na corrente sanguínea 1h e 2h após administração foi respectivamente de  $1,5 \pm 0,7\%/g$  e  $0,6 \pm 0,2\%/g$ , no caso do  $^{111}\text{InL5}$  e de  $0,6 \pm 0,2\%/g$  e  $0,35 \pm 0,02\%/g$ , no caso do  $^{111}\text{InL6}$ . Esta rápida depuração sanguínea indica uma rápida distribuição pelos principais órgãos e reflecte uma baixa taxa de ligação a proteínas séricas e inércia cinética relativamente à permuta com a proteína transportadora de metais, a transferrina.

De um modo geral, a acumulação de actividade ocorreu nos órgãos relacionados com as vias de eliminação como os rins, o fígado e predominantemente o intestino, o que significa que a principal via de excreção é hepatobiliar, como se pode confirmar pelos elevados níveis de actividade detectados no fígado e intestino e pelo rápido aumento de actividade no intestino. No entanto, na excreção total da actividade observou-se uma importante contribuição da excreção urinária, em especial para o complexo  $^{111}\text{InL5}$ . A excreção por via renal manifesta-se pela actividade detectada nos rins 1h após administração que diminuiu para metade às 2h e pela percentagem de excreção total. A velocidade de excreção dos dois complexos é diferente sendo mais rápida no caso de  $^{111}\text{InL5}$  ( $24,1 \pm 0,5\%$  A.I. e  $42,5 \pm 6,2\%$  A.I., à 1h e 2h, respectivamente) enquanto a excreção média de  $^{111}\text{InL6}$  foi de aproximadamente 20% A.I., 2h após administração.

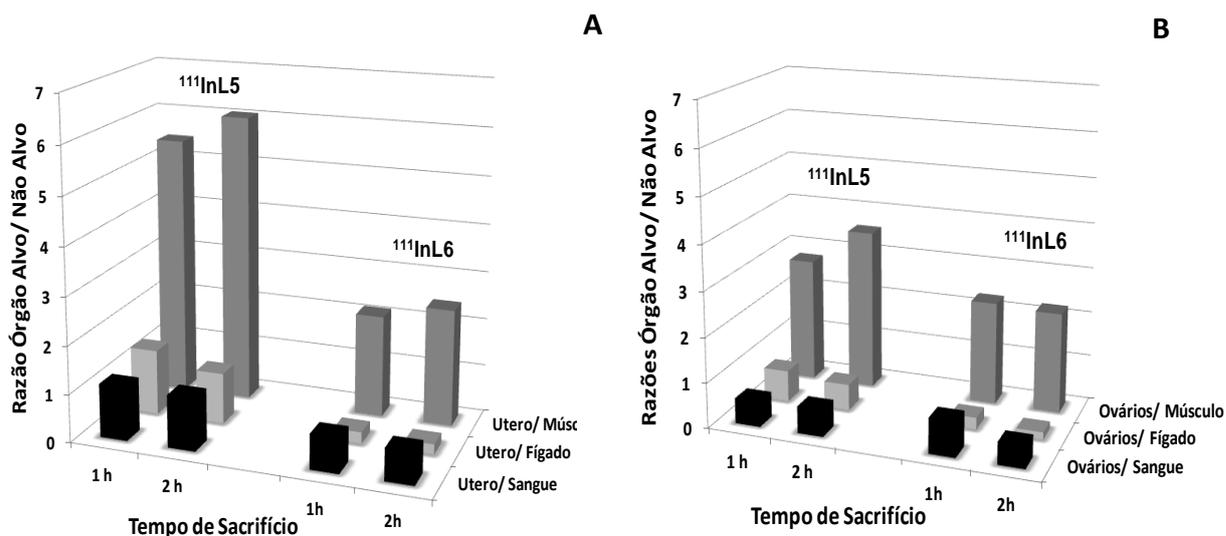
A análise dos resultados obtidos mostrou fixação no útero e ovários no caso do  $^{111}\text{InL5}$   $1,5 \pm 0,3\%/g$  e  $0,6 \pm 0,1\%/g$  à 1h e 2h, respectivamente. No caso de  $^{111}\text{InL6}$  esta fixação foi de  $0,4 \pm 0,1\%/g$  e  $0,2 \pm 0,1\%/g$ , à 1h e 2h, respectivamente. De modo a avaliar a especificidade desta fixação para os receptores estrogénicos, grupos separados de animais foram co-injectados com  $17\beta$ -estradiol para bloquear os locais de ligação aos receptores nos órgãos alvo e o ensaio de biodistribuição realizado em paralelo. Na **Figura 2.35.** apresenta-se a fixação nestes órgãos dos complexos  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$  em animais sem e com co-injecção de  $17\beta$ -estradiol.



**Figura 2.35.-** Efeito da saturação de receptores estrogénicos por co-injecção de  $17\beta$ -estradiol na fixação no útero e ovários dos complexos  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$ , em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, 2 h após administração (resultados expressos em % A.I./g; n=3).

Os resultados obtidos nos ensaios de bloqueamento mostraram uma ligeira redução na percentagem de fixação uterina e ovárica, contudo não é evidente o envolvimento dos receptores de estrogénio nesta fixação uma vez que a taxa de captação por estes órgãos é muito baixa, o que se correlaciona com o carácter hidrofílico dos complexos. Por outro lado, a percentagem de actividade diminuiu para aproximadamente metade nos ensaios realizados às 2h após administração, relativamente à 1 h, indicando que os complexos não ficaram retidos o que sugere que a fixação não seja mediada pelos receptores de estrogénio.

A selectividade de  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$  para os órgãos alvo foi avaliada através da determinação das razões de actividade útero/sangue, ovários/sangue, útero/músculo, ovários/músculo. Devido à rápida captação hepática e à localização anatómica do fígado no abdómen, foram também calculadas as razões útero/fígado e ovários/fígado. Estas razões são apresentadas nos gráficos da **Figura 2.36.**



**Figura 2.36.-** Razões de radioactividade útero/sangue, útero/ músculo, útero/fígado (A) e ovários/sangue, ovários/ músculo, ovários/fígado (B), em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, 1 e 2 h após administração dos complexos <sup>111</sup>InL5 e <sup>111</sup>InL6 (n=3).

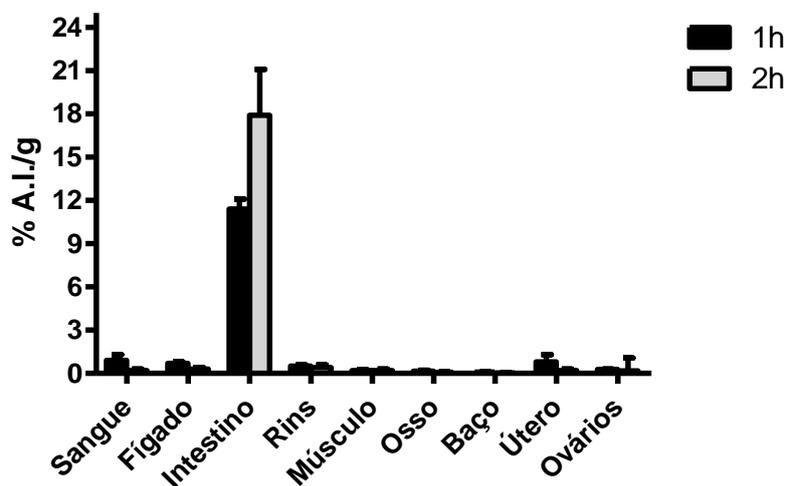
Como se pode observar na **Figura 2.36**, da rápida depuração sanguínea, da rápida eliminação hepática e da baixa taxa de captação muscular de <sup>111</sup>InL5 resultaram razões útero/músculo superiores a 5 e razões útero/sangue e útero/fígado superiores a 1 a partir da 1 h pós-administração, o que indica alguma selectividade para órgãos alvo. No caso de <sup>111</sup>InL6, estas razões são bastante inferiores, consequência principalmente da menor captação uterina deste complexo. As razões ovários/órgão não alvo foram inferiores sendo apenas superior a 2, no caso das razões ovários/músculo, o que demonstra uma menor selectividade de ambos os complexos para este órgão.

#### **Biodistribuição dos complexos <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7**

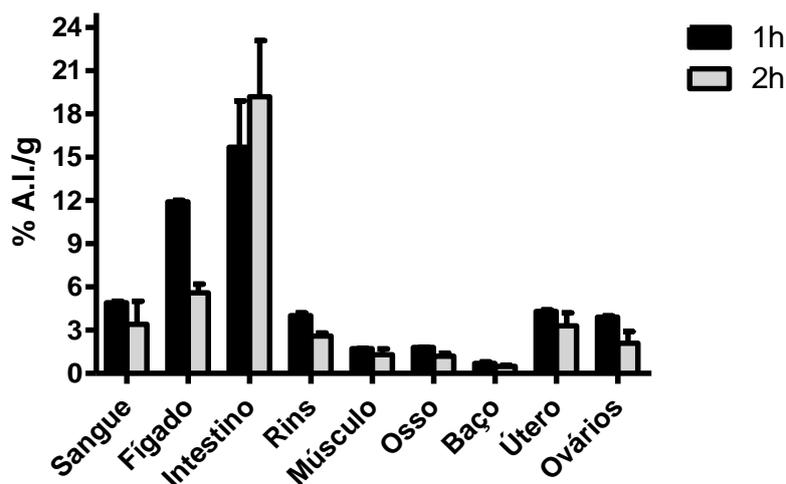
O perfil de biodistribuição dos complexos <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7 foi também estudado no mesmo modelo animal. Os resultados da biodistribuição dos complexos <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7, expressos em percentagem de actividade injectada por grama de órgão (%A.I./g) são apresentados na tabela 2.13 e Figuras 2.37.e 2.38.

**Tabela 2.13.-** Resultados de biodistribuição e excreção total dos complexos  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

Órgão	$^{67}\text{GaL2}$		$^{67}\text{GaL7}$	
	% A. I./ g		% A. I./ g	
	1 h	2 h	1 h	2 h
Sangue	0,9 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,1	4,90 $\pm$ 0,50	3,40 $\pm$ 1,60
Fígado	0,70 $\pm$ 0,10	0,30 $\pm$ 0,10	11,90 $\pm$ 1,80	5,60 $\pm$ 0,60
Intestinos	11,40 $\pm$ 0,70	17,9 $\pm$ 3,20	15,70 $\pm$ 2,20	19,20 $\pm$ 3,90
Baço	0,09 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,10	0,48 $\pm$ 0,09
Coração	0,16 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,02	1,60 $\pm$ 0,20	0,98 $\pm$ 0,22
Pulmões	0,27 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,03	2,43 $\pm$ 0,04	1,60 $\pm$ 1,10
Rins	0,50 $\pm$ 0,10	0,40 $\pm$ 0,20	4,00 $\pm$ 0,30	2,60 $\pm$ 0,20
Músculo	0,20 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,10	1,71 $\pm$ 0,02	1,30 $\pm$ 0,40
Osso	0,16 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,04	1,81 $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,20
Estômago	0,01 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,02	1,70 $\pm$ 0,20	0,60 $\pm$ 0,20
Útero	0,80 $\pm$ 0,50	0,20 $\pm$ 0,10	4,30 $\pm$ 2,30	3,30 $\pm$ 0,90
Ovários	0,28 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,09	3,90 $\pm$ 1,40	2,10 $\pm$ 0,80
Excreção (%A.I.)	21,1 $\pm$ 10,5	21,2 $\pm$ 3,80	---	9,60 $\pm$ 0,90



**Figura 2.37.-** Biodistribuição do complexo  $^{67}\text{GaL2}$ , em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).



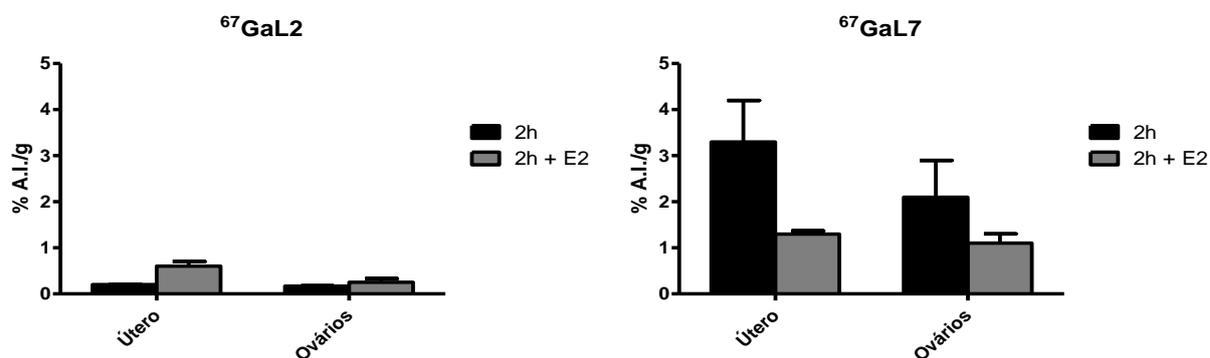
**Figura 2.38.**- Biodistribuição do complexo  $^{67}\text{GaL7}$ , em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, expressos em % A.I./g (média  $\pm$  desvio padrão;  $n=3$ ).

Os resultados obtidos mostraram que o comportamento *in vivo* de  $^{67}\text{GaL2}$  é muito semelhante ao dos complexos de  $^{111}\text{In}$  descritos anteriormente, apresentando um perfil de distribuição biológica idêntico. O complexo  $^{67}\text{GaL2}$  foi rapidamente eliminado da corrente sanguínea ( $0,9 \pm 0,4$  %/g e  $0,2 \pm 0,1$  %/g, 1h e 2h após administração, respectivamente) por via hepática com rápida eliminação através do intestino. A excreção total da actividade foi superior a 20% A.I., 1h após injeção. No entanto a fixação no útero e ovários foi baixa ( $0,8 \pm 0,5$  %/g e  $0,2 \pm 0,1$  %/g à 1h e 2h, respectivamente). Por outro lado esta fixação não diminuiu por co-injeção de  $17\beta$ -estradiol não radioactivo indicando claramente que o complexo não é específico nem selectivo para os órgãos alvo, tal como era expectável do estudo *in vitro* de afinidade para o receptor.

Os ensaios de biodistribuição do complexo  $^{67}\text{GaL7}$  em ratos fêmea imaturos mostraram que a sua depuração sanguínea foi consideravelmente mais lenta ( $4,9 \pm 0,5$  %/g e  $3,4 \pm 1,6$  %/g, 1h e 2h após administração, respectivamente) do que a dos complexos anteriores. A captação hepática foi muito rápida ( $11,9 \pm 1,8$  %/g e  $5,6 \pm 0,6$  %/g à 1h e 2h, respectivamente) sendo também eliminado através do intestino. A retenção de actividade em órgãos muito irrigados, tais como pulmões, coração e rins é consequência da menor depuração sanguínea. Por outro lado a depuração de outros órgãos, como por exemplo o músculo, também foi mais lenta. Este perfil de biodistribuição está concordante com o carácter lipofílico deste complexo. A excreção total da actividade foi bastante inferior ( $9,6 \pm 0,9$  %A.I. às 2h após administração) e ocorre predominantemente por via hepatobiliar. A contribuição da excreção

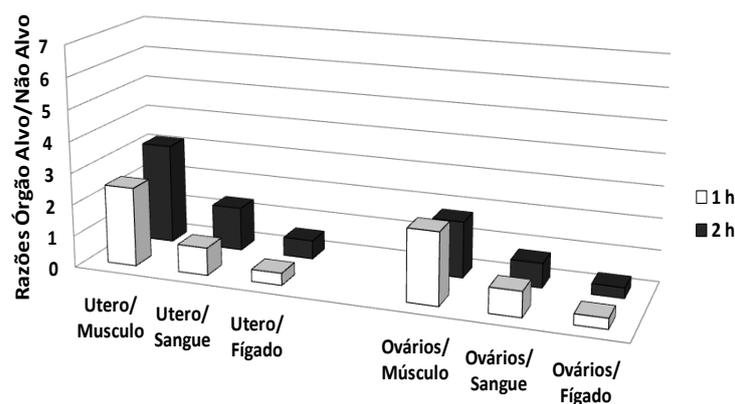
renal foi menor, o que se reflecte na percentagem de actividade detectada nos rins e na velocidade de excreção total.

Relativamente à fixação nos órgãos alvo, observou-se acumulação da actividade no útero ( $4,0 \pm 0,3\%/g$  e  $2,6 \pm 0,2\%/g$ , à 1h e 2h, respectivamente) e ovários ( $3,9 \pm 1,4\%/g$  e  $2,1 \pm 0,8\%/g$ , à 1h e 2h, respectivamente). Nos ensaios com co-injecção de  $17\beta$ -estradiol não radioactivo para saturar os receptores, verificou-se uma diminuição da fixação para aproximadamente metade, o que sugere que a acumulação do composto nestes órgãos seja mediada pelos receptores estrogénicos. Na **Figura 2.39.** mostra-se a fixação do complexo  $^{67}\text{GaL7}$  no útero e ovários em animais com e sem co-injecção de  $17\beta$ -estradiol.



**Figura 2.39.-** Efeito da saturação de receptores estrogénicos por co-injecção de  $17\beta$ -estradiol na fixação no útero e ovários dos complexos  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$ , em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, 2 h após administração (resultados expressos em % A.I./g;  $n=3$ ).

A selectividade de  $^{67}\text{GaL7}$  para o útero e ovários foi estudada por determinação das razões de actividade útero/sangue; ovários/sangue, útero/músculo, ovários/músculo, útero/fígado e ovários/fígado. Estas razões são apresentadas nos gráficos da **Figura 2.40.**

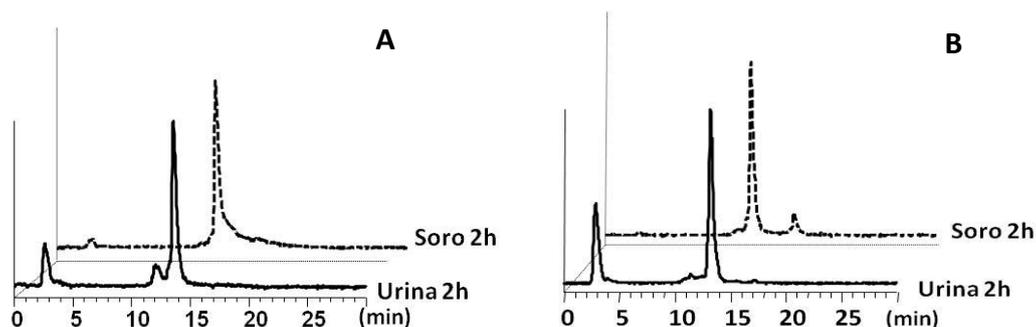


**Figura 2.40.-** Razões de radioatividade útero/sangue, útero/ músculo, útero/fígado e ovários/sangue, ovários/ músculo, ovários/fígado, em ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague Dawley, 1 e 2 h após administração do complexo  $^{67}\text{GaL7}$  ( $n=3$ ).

Em consequência da maior fixação hepática de  $^{67}\text{GaL7}$  e da sua depuração mais lenta, quer da corrente sanguínea quer do tecido muscular, resultaram razões órgão alvo/sangue ou órgão alvo/fígado relativamente baixas ( $< 0,6$ ), indicando que o complexo embora se localize nos órgãos ricos em receptores é pouco selectivo para estes órgãos. Apenas as razões útero/músculo e ovários/músculo variaram entre 2 e 3.

#### **Estabilidade *in vivo* dos complexos $^{111}\text{InL5}$ , $^{111}\text{InL6}$ , $^{67}\text{GaL2}$ e $^{67}\text{GaL7}$**

A estabilidade *in vivo* dos complexos  $^{111}\text{InL5}$ ,  $^{111}\text{InL6}$ ,  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$ , foi determinada por análise em RP-HPLC de amostras de soro de rato e de urina recolhidas no momento do sacrifício (1h e 2h após administração) após tratamento adequado segundo o procedimento descrito em 6.7.3. Na **Figura 2.41** apresentam-se, como exemplo geral desta avaliação, os radiocromatogramas de RP-HPLC correspondentes à análise de amostras de soro de rato e de urina recolhidas 2h após administração de dois dos complexos estudados,  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{67}\text{GaL7}$ .



**Figura 2.41.-** Radiocromatogramas obtidos por análise em RP-HPLC de amostras de soro de rato e de urina recolhidas 2h após administração de  $^{111}\text{InL5}$  (A) ou  $^{67}\text{GaL7}$  (B). (coluna: EC 254/4 10-100 C18; gradiente  $\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_3\text{COOH}$  (2,1:2,8) e  $\text{CH}_3\text{CN}$ ).

A análise dos radiocromatogramas de soro de rato indica que as espécies radioquímicas na corrente sanguínea correspondem quase exclusivamente ao complexo administrado no animal, uma vez que apresentaram tempo de retenção idêntico, demonstrando elevada estabilidade *in vivo* destes complexos. No entanto a análise de amostras de urina revelou a presença de espécies radioquímicas com tempo de retenção inferior ao dos complexos, em percentagem relativamente baixa (<30%). Assim é provável que a formação destas espécies mais hidrofílicas tenha ocorrido para facilitar a excreção dos complexos.

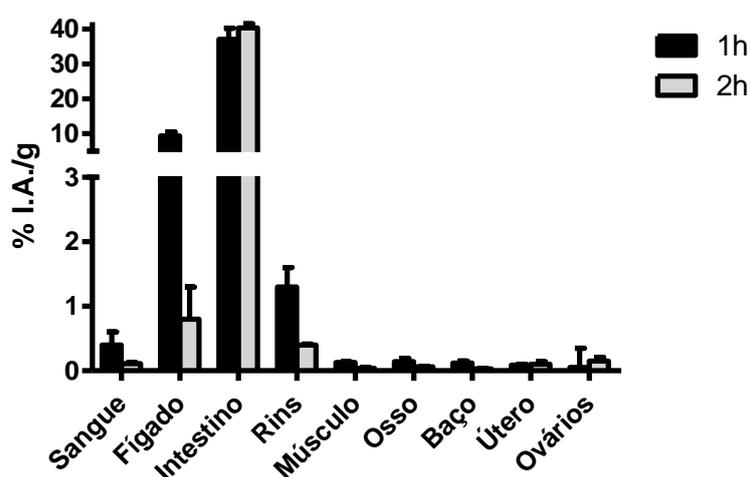
#### **Biodistribuição dos complexos $^{111}\text{InL1}$ e $^{111}\text{InL2}$**

Foram também realizados estudos de biodistribuição com os complexos  $^{111}\text{InL1}$  e  $^{111}\text{InL2}$  embora os conjugados de estradiol **L1** e **L2** não apresentassem afinidade para o RE por ensaio de afinidade *in vitro*. Como modelo animal utilizaram-se ratinhos fêmea da estirpe CD1. Estes ensaios foram realizados na perspectiva de avaliar a cinética de distribuição biológica destes complexos, a sua estabilidade *in vivo* e para confirmar a falta de selectividade para tecidos ricos em RE.

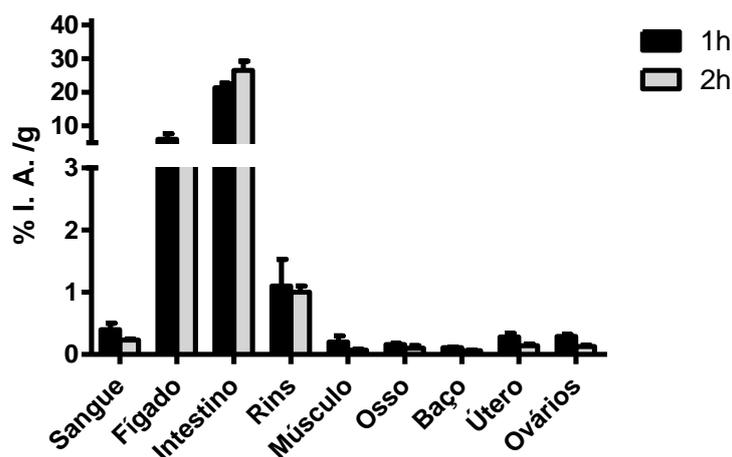
Os resultados da biodistribuição dos complexos  $^{111}\text{InL1}$  e  $^{111}\text{InL2}$  nos órgãos e tecidos mais relevantes, expressos em percentagem de actividade injectada por grama de órgão (%AI/g) são apresentados na **tabela 2.14** e nos gráficos das **Figuras 2.42** e **2.43**

**Tabela 2.14.-** Resultados de biodistribuição e excreção total dos complexos  $^{111}\text{InL1}$  e  $^{111}\text{InL2}$  em ratinhos fêmea da estirpe CD-1, expressos em % A.I./g (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

Órgão	$^{111}\text{InL1}$		$^{111}\text{InL2}$	
	% A. I./ g		% A. I./ g	
	1 h	2 h	1 h	2 h
Sangue	0,40 $\pm$ 0,20	0,11 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,10	0,23 $\pm$ 0,02
Fígado	9,30 $\pm$ 1,20	0,80 $\pm$ 0,50	6,00 $\pm$ 1,70	3,80 $\pm$ 0,20
Intestino	37,10 $\pm$ 3,20	40,40 $\pm$ 1,10	21,40 $\pm$ 1,30	26,50 $\pm$ 2,80
Baço	0,12 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01
Coração	0,11 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01
Pulmões	0,20 $\pm$ 0,10	0,10 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,02
Rins	1,30 $\pm$ 0,30	0,40 $\pm$ 0,01	1,10 $\pm$ 0,43	1,00 $\pm$ 0,10
Músculo	0,13 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,10	0,07 $\pm$ 0,02
Ossos	0,14 $\pm$ 0,05	0,06 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,04
Estômago	7,10 $\pm$ 0,50	0,60 $\pm$ 0,40	1,10 $\pm$ 0,40	0,46 $\pm$ 0,02
Útero	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,03
Ovários	0,50 $\pm$ 0,30	0,15 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,02
Excreção (%A.I.)	10,60 $\pm$ 1,10	11,50 $\pm$ 0,80	25,60 $\pm$ 0,80	26,20 $\pm$ 5,60



**Figura 2.42.-** Biodistribuição do complexo  $^{111}\text{InL1}$ , em ratinhos fêmea da estirpe CD1, expressos em % A.I./g (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).



**Figura 2.43.**- Biodistribuição do complexo  $^{111}\text{InL2}$ , em ratinhos fêmea da estirpe CD1, expressos em % A.I./g (média  $\pm$  desvio padrão;  $n=3$ ).

A análise destes resultados mostrou que os complexos  $^{111}\text{InL1}$  e  $^{111}\text{InL2}$  possuem perfis de distribuição biológica ligeiramente diferentes quanto à velocidade de eliminação. No entanto, a tendência de distribuição e os órgãos envolvidos são idênticos. Apresentaram uma rápida depuração sanguínea, não tendo sido detectada uma fixação preferencial em qualquer órgão excepto no intestino, fígado e em menor grau nos rins, órgãos relacionados com as principais vias de eliminação. A via de excreção predominante é a via hepatobiliar, padrão consistente com o padrão habitual de excreção dos derivados de estradiol. Tal como nos ensaios de biodistribuição descritos anteriormente, observou-se uma acumulação muito rápida da actividade nos intestinos, atribuível ao carácter hidrofílico dos compostos. Para além da rápida depuração sanguínea, observou-se também uma rápida depuração dos órgãos mais irrigados, tais como coração e pulmões. A fixação em órgãos ricos em RE foi muito baixa, inferior a 0,3%/g de útero e inferior a 0,5 %/g de ovários. A baixa fixação de actividade no fígado e pulmões, que diminuiu bastante às 2 h após administração, indica que não houve libertação do radiometal uma vez que este se localizaria nestes órgãos devido à sua elevada afinidade de ligação à transferrina. Por outro lado, a baixa fixação esplénica também indica ausência de colóides resultantes de espécies hidrolisadas. A taxa de excreção de  $^{111}\text{InL1}$  e  $^{111}\text{InL2}$  foi relativamente baixa ( $11,5 \pm 0,8\%$ A.I e  $26,2 \pm 5,6\%$ A.I, às 2h, respectivamente) mas é consideravelmente superior no caso de  $^{111}\text{InL2}$ .

A estabilidade *in vivo* dos complexos  $^{111}\text{InL1}$  e  $^{111}\text{InL2}$  foi confirmada por análise em RP-HPLC de amostras de soro de ratinho e de urina recolhidas no momento do sacrifício. Para

nenhum dos complexos foram detectadas espécies radioquímicas resultantes de metabolização

## 2.5. Conclusões

Em conclusão, ao longo do trabalho experimental descrito neste capítulo foram sintetizados com sucesso, sete novos derivados da molécula de estradiol (**L1-L7**) conjugados com diferentes agentes quelantes bifuncionais (DTPA, DOTA, DOTAGA e NOTA). Estes conjugados de estradiol foram utilizados na síntese de complexos de In/<sup>111</sup>In e Ga/<sup>67</sup>Ga. Assim, foram sintetizados e caracterizados os complexos inactivos **InL1-InL6**, **GaL2** e **GaL7**. Ensaio de ligação aos receptores de estrogénio dos conjugados de estradiol e de complexos de In(III) e Ga(III) revelaram que os ligandos **L5**, **L6** e **L7** têm afinidade e são selectivos para o subtipo  $\alpha$  do RE. Os complexos **InL5** e **InL6** mantiveram a afinidade para o RE $\alpha$ .

Os complexos radioactivos <sup>111</sup>InL1-<sup>111</sup>InL6, <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7 foram obtidos com elevado rendimento e pureza radioquímica, utilizando baixas concentrações de ligando. Os complexos <sup>111</sup>InL1, <sup>111</sup>InL2, <sup>111</sup>InL5, <sup>111</sup>InL6 e <sup>67</sup>GaL2 possuem carácter hidrofílico enquanto os complexos <sup>111</sup>InL2, <sup>111</sup>InL4 e <sup>67</sup>GaL7 têm carácter lipofílico ligeiro ou moderado. Todos os complexos, excepto <sup>111</sup>InL3, apresentaram elevada estabilidade radioquímica, por ensaio *in vitro*, na presença de PBS e soro humano. Na presença de apo-transferrina, a maioria dos complexos mostraram ser estáveis não se tendo observado transquelatação do ião metálico. A maioria dos complexos mostraram também ser cineticamente inertes em solução de DTPA.

O estudo da captação de <sup>111</sup>InL1-<sup>111</sup>InL6, <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7 em linhas celulares de adenocarcinoma da mama de origem humana, MCF-7 e MDA-MB-231, revelaram taxas de captação relativamente baixas, consistentes com o carácter hidrofílico da maioria dos compostos, o que não favorece a entrada nas células. Os níveis máximos de captação foram obtidos com o complexo <sup>67</sup>GaL7. No entanto, o conjunto dos resultados obtidos sugere que a acumulação de alguns dos complexos nas células MCF-7 poderá estar relacionada com um mecanismo mediado pelos receptores de estrogénio.

De um modo geral, os complexos <sup>111</sup>InL1, <sup>111</sup>InL2, <sup>111</sup>InL5, <sup>111</sup>InL6, <sup>67</sup>GaL2 e <sup>67</sup>GaL7 apresentaram elevada estabilidade *in vivo* e um perfil de biodistribuição semelhante destacando-se a rápida depuração sanguínea, rápida captação hepática e elevada fixação intestinal. A via de excreção predominante é hepatobiliar. O composto <sup>67</sup>GaL7 apresentou os

valores mais elevados de fixação no útero e ovários. Ensaio de saturação dos receptores apontaram para um mecanismo mediado pelo RE.

# ***Capítulo 3***

*Síntese e Avaliação Biológica  
de uma Molécula Híbrida  
Estradiol/Alaranjado de Acridina*



### **3. Síntese e Avaliação Biológica de uma Molécula Híbrida Estradiol/Alaranjado de Acridina**

---

O trabalho proposto para esta tese, tal como referido anteriormente, visava explorar a utilização da molécula de estradiol para veicular o radionuclídeo  $^{111}\text{In}$  e/ou unidades intercaladoras de ADN para os receptores de estrogénio presentes em células tumorais tendo por objectivo a terapia dirigida do cancro da mama. Neste capítulo abordam-se, de modo muito breve, alguns aspectos relacionados com a utilização de agentes citostáticos em quimioterapia. Em seguida apresenta-se a síntese e caracterização de uma molécula híbrida estradiol/ alaranjado de acridina e a sua avaliação biológica em células de adenocarcinoma da mama de origem humana.

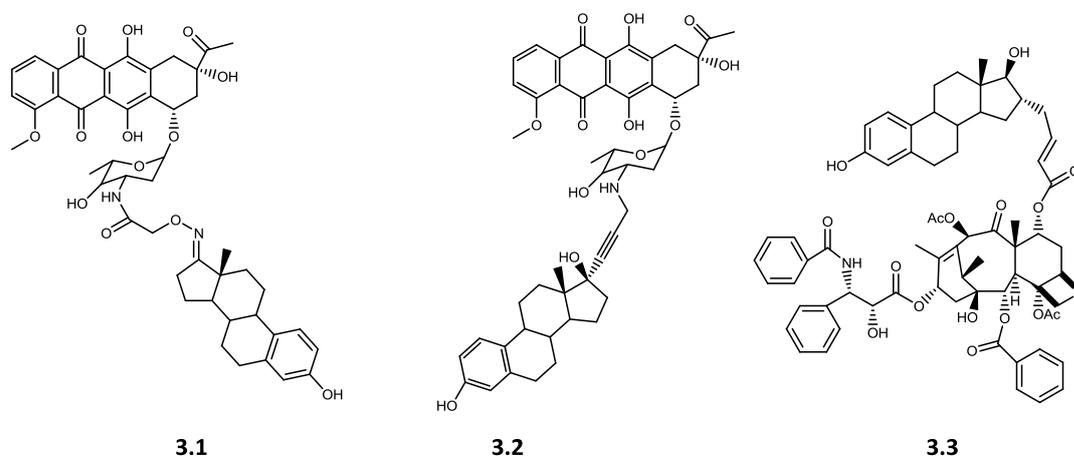
#### **3.1. Considerações Gerais**

O tratamento do cancro da mama requer obrigatoriamente uma abordagem multidisciplinar englobando a quimioterapia como uma modalidade terapêutica por via sistémica, que permite melhorar a sobrevivência das doentes com cancro da mama quando utilizada como terapia primária ou adjuvante. Nas doentes que desenvolvem metástases a quimioterapia é utilizada como terapia paliativa, possibilitando uma melhoria da qualidade de vida e um aumento da sobrevivência.<sup>219</sup>

Em quimioterapia são utilizados fármacos que interferem com os processos de divisão celular mediante interacção com o ADN. Deste modo podem suprimir a replicação de genes ou mesmo a sua transcrição, com vista à destruição de células tumorais. Estes fármacos podem apresentar diversos mecanismos de acção e englobam agentes alquilantes (e.g. mostardas de azoto), antimetabolitos (e.g. análogos do ácido fólico), antimitóticos (e.g. taxol), antibióticos antitumorais (e.g. daunorrobicina), inibidores da topoisomerase II (e.g. antraciclina) ou intercaladores de ADN.<sup>220</sup> O facto de as células tumorais se propagarem mais rapidamente do que as células normais torna-as mais susceptíveis à acção imunossupressora destes agentes quimioterapêuticos.

A aplicação clínica em quimioterapia da maioria dos agentes anticancerígenos está limitada pela sua falta de selectividade para as células tumorais e pelos efeitos secundários

adversos que lhe estão associados, nomeadamente os efeitos tóxicos em células normais, especialmente nos tecidos de proliferação rápida e pela eventual necessidade de administrar doses mais elevadas de fármaco com os consequentes riscos de toxicidade aguda. Estes riscos podem ser minimizados melhorando a selectividade para o tecido alvo. Uma das abordagens que tem sido seguida para esse efeito consiste na conjugação dos agentes antitumorais a moléculas com reconhecida selectividade para o tumor.<sup>221,222</sup> Da conjugação de duas estruturas biologicamente activas, uma biomolécula específica para o tumor e uma unidade antitumoral, deverá resultar um composto híbrido com propriedades quimioterapêuticas acrescidas. No caso particular de tumores que expressam receptores de estrogénios, esta estratégia envolve a conjugação de uma hormona esteróide a um agente quimioterapêutico, nomeadamente a intercaladores de ADN, complexos metálicos citotóxicos ou qualquer outro agente anticancerígeno.<sup>162,217,223-229</sup> Para que a molécula híbrida mantenha a eficácia terapêutica e aumente a selectividade para o tumor, as modificações químicas necessárias à reacção de conjugação não devem afectar a actividade biológica de cada uma das unidades. Alguns conjugados híbridos derivados do estradiol têm sido propostos como agentes quimioterapêuticos (**Figura 3.1.**).



**Figura 3.1.-** Compostos híbridos derivados do estradiol propostos como agentes quimioterapêuticos: *Estrona-daunorrubicina (3.1)*, *estradiol-daunorrubicina (3.2)*<sup>225</sup> e *estradiol-taxol (3.3)*<sup>223</sup>

Dos fármacos utilizados em quimioterapia, as antraciclina e os taxanos são os citostáticos mais eficazes no tratamento do cancro da mama metastático. O mecanismo de acção das antraciclina consiste essencialmente na inibição da replicação, reparação e transcrição de ADN, por inibição das enzimas topoisomerases II. A daunorrubicina e a doxorubicina (adriamicina®) pertencem à família de antibióticos da antraciclina que

intercalam com a molécula de ADN e são muito utilizadas em clínica devido às suas múltiplas aplicações. Estas antraciclinas são frequentemente utilizadas em quimioterapia tanto em regime de monoterapia como em quimioterapia combinada.<sup>230</sup> A principal desvantagem em termos de aplicação clínica destes compostos é a sua elevada cardiotoxicidade em consequência da produção de radicais livres de oxigénio o que limita a dose a administrar.  
331,332

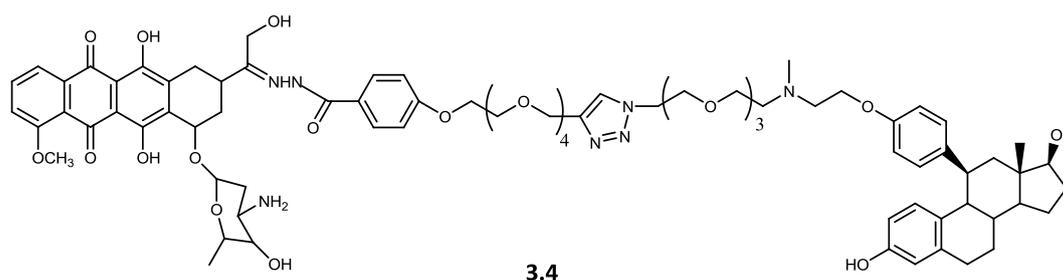
A daunorrubicina tem sido conjugada tanto a estrogénios, designadamente a derivados de estrona ou de estradiol (**Figura 3.1.**) como a antiestrogénios (e.g. derivados do tamoxifeno).<sup>225</sup> Contudo, a avaliação biológica revelou que a afinidade de ligação destes compostos para o RE é negligenciável ou muito fraca, não são selectivos para tumores da mama com positividade para o RE e que a citotoxicidade nas células tumorais é inferior à da daunorrubicina não conjugada.<sup>226, 229,233</sup>

A doxorrubicina tem uma estrutura química muito semelhante à da daunorrubicina mas é muito mais eficaz no tratamento de tumores sólidos. Contudo, os efeitos secundários e a resistência tumoral intrínseca ou adquirida após terapia têm limitado uma maior aplicação clínica. Na tentativa de aumentar a sua selectividade, a conjugação da doxorrubicina a ligandos específicos para tumores tem sido alvo de intensa investigação nos últimos anos.<sup>222, 234</sup>

Os taxanos possuem acção antimetabólica sobre as células inibindo a formação do fuso mitótico por estabilização dos polímeros da tubulina, conduzindo a morte celular. Para beneficiar simultaneamente das propriedades antimetabólicas do paclitaxel (Taxol®) e da elevada afinidade de ligação do estradiol para o RE, Kingstom e colaboradores prepararam conjugados de estradiol/paclitaxel (**Figura 3.1.**).<sup>223</sup> No entanto, estes conjugados mostraram ser menos potentes do que o paclitaxel não conjugado não apresentando selectividade para células que expressam este receptor.

Outros compostos híbridos preparados por conjugação da molécula do estradiol, a diversas unidades quimioterapêuticas foram também propostos como agentes antitumorais, nomeadamente conjugados estradiol/geldanamicina, estradiol/nitrosureias, estradiol/clorambucila, estradiol/nucleósidos, estradiol/platina. No entanto, até ao momento nenhum satisfaz os requisitos necessários à sua potencial aplicação terapêutica. Na maioria dos estudos, os compostos híbridos mostraram ser menos eficazes para o alvo em questão do que as moléculas biologicamente activas não ligadas. De um modo geral observou-se uma perda de afinidade para o receptor, falta de selectividade para as linhas celulares e até mesmo uma redução da citotoxicidade quando comparada com a da unidade terapêutica.

Hanson e colaboradores exploraram uma nova abordagem em que utilizaram derivados do estradiol com actividade antiestrogénica conjugados a diversas unidades terapêuticas, tais como mitomicina C, geldanamicina e doxorrubicina. Com um conjugado estradiol/doxorubicina (**Figura 3.2.**) obtiveram um composto híbrido que demonstrou em células do cancro da mama o efeito sinérgico entre o antiestrogénio que actuou como molécula vectorizante e a doxorubicina. A avaliação biológica confirmou o efeito citotóxico do composto e a sua captação celular.<sup>222,234</sup>

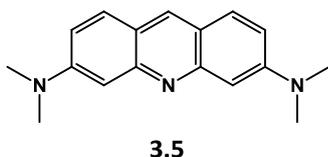


**Figura 3.2.-** Composto híbrido estradiol/doxorubicina (**3.4**).<sup>222,234</sup>

Os intercaladores de ADN constituem uma classe de compostos com grande relevância no desenvolvimento de agentes quimioterapêuticos. Geralmente estes intercaladores possuem estrutura planar policíclica em que vários anéis aromáticos estão fundidos entre si. A intercalação com o ADN envolve a introdução da molécula entre dois pares de bases vizinhas das cadeias de dupla hélice do ADN, interrompendo desse modo as suas funções biológicas. A ligação ocorre através de interacções hidrofóbicas, iónicas, ligações de van der Waals e pontes de hidrogénio provocando o alongamento da cadeia. Por outro lado a presença de grupos funcionais básicos, catiónicos ou electrofílicos favorece a intercalação.<sup>335</sup>

A acridina e seus derivados pertencem a uma classe de compostos cuja capacidade de interacção com o ADN é bem conhecida. Estes compostos encontram-se protonados no átomo de azoto da unidade aromática, mesmo em condições neutras, e os catiões resultantes são bons agentes intercaladores. A citotoxicidade da maioria destes compostos resulta da sua capacidade para suprimir a actividade das topoisomerases e consequentemente afectar a proliferação celular. A 3,6-dimetilaminoacridina, vulgarmente conhecida por alaranjado de acridina (**AO, Figura 3.3.**) é um composto catiónico que atravessa a membrana plasmática das células interagindo com o ADN por intercalação, e com o ARN através de interacções electrostáticas.<sup>87</sup> Devido às suas estruturas aromáticas planares apresentarem uma absorvidade molar moderadamente elevada na região do UV, o **AO** emite uma alta

intensidade de fluorescência que aumenta quando intercalado com o ADN.<sup>236,237</sup> O espectro de fluorescência apresenta um máximo de excitação ( $\lambda_{ex}$ ) a 502 nm e um máximo de emissão ( $\lambda_{em}$ ) a 525 nm. Apresenta também metacromismo ou seja, emite dois tipos de fluorescência: verde ( $\lambda_{em} = 530$  nm) quando intercala em cadeias duplas de ADN e vermelha ( $\lambda_{em} = 640$  nm) quando se associa a cadeias simples de ADN ou a ARN no mesmo comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{ex} = 488$  nm).<sup>236,238</sup> Devido às suas propriedades fluorescentes, o **AO** é utilizado como corante do ADN e na detecção de ADN celular tanto em ensaios *in vitro* como em ensaios celulares *in vivo* (e.g. microscopia de fluorescência, citometria de fluxo).



**Figura 3.3.-** Estrutura do alaranjado da acridina (**3.5**)

Devido à sua acção como intercaladores, análogos da acridina têm sido conjugados a outros compostos para promover a sua interacção com o ADN.<sup>87,117,144,238-243</sup> Esteves e colaboradores sintetizaram complexos de Re(I) e <sup>99m</sup>Tc(I) contendo a unidade intercaladora **AO** e um análogo da bombesina para alvejar especificamente os receptores de membrana do péptido de libertação da gastrina, GRP, em células tumorais. Estudos em células de adenocarcinoma da próstata PC-3 demonstraram a localização intracelular dos complexos com acumulação ao nível do núcleo.<sup>239</sup>

Tendo por objectivo alvejar o receptor estrogénico de modo selectivo para fins terapêuticos, explorou-se uma nova estratégia que consistiu na síntese e avaliação biológica de uma molécula híbrida derivada do estradiol funcionalizado na posição C16 com a unidade intercaladora alaranjado da acridina (**Figura 3.4.**). Com este estudo preliminar, pretendeu-se determinar se o receptor de estrogénio é tolerante à introdução do **AO** nesta posição da biomolécula e se o conjugado tem capacidade de atravessar as membranas plasmáticas e nuclear, requisito essencial para ocorrer a intercalação com o ADN. A escolha do **AO** está relacionada com a sua reconhecida capacidade de interagir com o ADN e com as suas propriedades fluorescentes que facilitam a sua detecção.

Assim, neste capítulo apresenta-se a síntese e caracterização da molécula híbrida estradiol/alaranjado de acridina. Seguidamente procedeu-se à avaliação biológica do conjugado estradiol/alaranjado da acridina através da realização de estudos de afinidade de ligação ao receptor de estrogénio, de determinação da inibição da proliferação celular e da determinação da localização intracelular, por microscopia de fluorescência confocal.

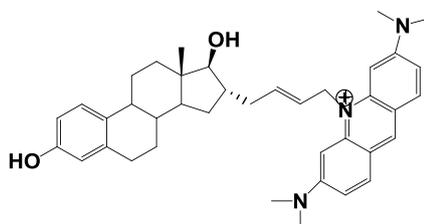
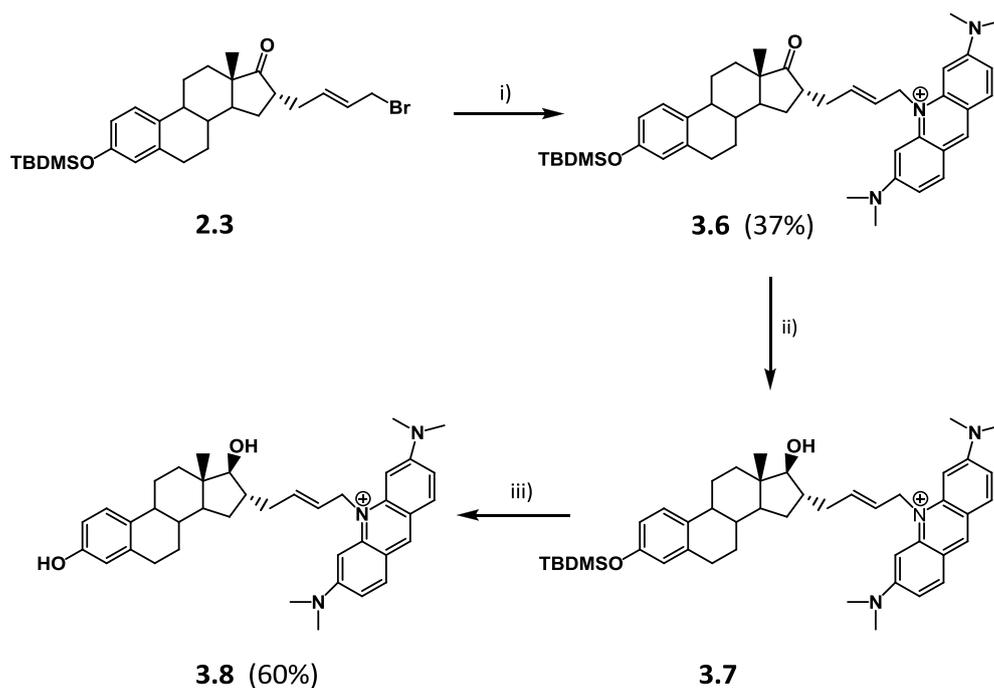


Figura 3.4.- Conjugado estradiol/alaranjado da acridina

## 3.2. Síntese e Caracterização do Composto Híbrido Estradiol/Alaranjado de Acridina

Nesta secção descreve-se a síntese e caracterização do composto híbrido estradiol/alaranjado de acridina resultante da conjugação de um derivado de estradiol com a unidade intercaladora de ADN, **AO**, para posterior avaliação biológica.

No **esquema 3.1.** apresenta-se a estratégia utilizada para a síntese do conjugado estradiol-**AO**. Resumidamente, o conjugado estradiol-**AO 3.8** foi obtido por *N*-alquilação da amina terciária do **AO** com o derivado do estradiol, 16 $\alpha$ -(4-bromobut-2-eno)estrona **2.3** (secção 2.2.1). Seguidamente procedeu-se à redução do grupo carbonilo em C17 a hidroxilo seguida de hidrólise ácida, para remoção do grupo *terc*-butildimetilsilano.



**Esquema 3.1.- Síntese do derivado estradiol-AO (3.8)**

**i)** Alaranjado da acridina,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaI}$ , *p*-xileno, refluxo, 40h; **ii)**  $\text{LiAlH}_4$ , THF seco,  $-78^\circ\text{C}$ , 30 min; **iii)**  $\text{HCl}/\text{MeOH}$  (2:98), t.a., 6h

Assim, o conjugado **3.6** foi obtido por *N*-alquilação da amina heterocíclica do **AO** com o brometo precursor **2.3**, na presença do solvente *p*-xileno. Como o **AO** é um composto pouco reactivo optou-se por utilizar o *p*-xileno para garantir a obtenção de temperaturas de refluxo superiores a  $140^\circ\text{C}$  favorecendo assim, a reacção de alquilação. Após purificação, por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando como eluente uma mistura de diclorometano/metanol, obteve-se o conjugado **3.6** com um rendimento total de 37% sob a forma de um sólido vermelho escuro.

O conjugado **3.6** foi caracterizado pelas técnicas analíticas usuais em química (RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , ESI-MS) que confirmaram a estrutura do composto pretendido. Da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **3.6** relativamente ao do precursor **2.3**, observa-se o aparecimento dos sinais adicionais entre 7,07 ppm e 8,29 ppm correspondentes aos prótons aromáticos do cromóforo alaranjado de acridina. A campo mais alto, observa-se um singuleto com um desvio químico de 3,12 ppm correspondente aos prótons metílicos ( $\text{CH}_3\text{-N}$ ) do cromóforo.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **3.6** salienta-se o aparecimento de 11 ressonâncias entre 112,94 ppm e 153,47 ppm correspondentes aos carbonos terciários e quaternários das

unidades aromáticas do **AO** e da estrona, assim como dos carbonos da cadeia insaturada. O sinal correspondente ao grupo carbonilo em C17 surge a campo mais baixo com um desvio químico de 220,71 ppm. A 29,67 ppm e 14,10 ppm observam-se as ressonâncias atribuíveis aos grupos metilo na unidade intercaladora **AO** e ao grupo metilo em C18 da molécula da estrona, respectivamente. Observam-se igualmente duas ressonâncias com desvios químicos de 25,68 ppm e -4,39 ppm correspondentes aos sinais dos carbonos dos grupos CH<sub>3</sub> presentes no grupo protector TBDMS.

A reacção seguinte consistiu na redução do grupo carbonilo em C17 a hidroxilo, na presença de um excesso de LiAlH<sub>4</sub>. O derivado **3.7**, obtido na reacção de redução, não foi isolado nem caracterizado e após tratamento adequado com água, para remoção do excesso de LiAlH<sub>4</sub>, o grupo TBDMS, em C3, foi removido por hidrólise ácida. O conjugado híbrido estradiol-AO **3.8** foi obtido com um rendimento de 60% a partir do composto **3.6** e caracterizado pelas técnicas usuais em química, tais como RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, DEPT e ESI-MS. A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H revelou-se muito complexa e de difícil interpretação não permitindo efectuar a caracterização inequívoca do composto **3.8**. Contudo foi possível observar o desaparecimento das ressonâncias correspondentes aos protões metílicos do grupo protector TBDMS. Na **Figura 3.5.** é apresentado o espectro de RMN de <sup>13</sup>C do composto híbrido **3.8**.

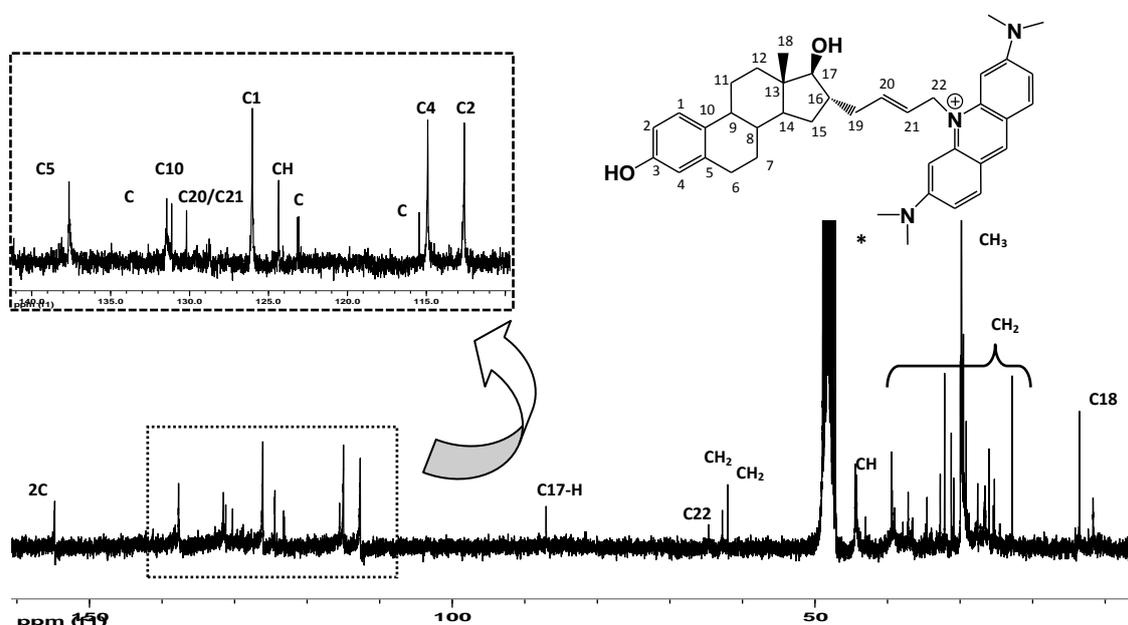


Figura 3.5.- Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do conjugado híbrido estradiol-AO **3.8** (\*CD<sub>3</sub>OD)

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  revelou-se crucial para a caracterização do conjugado híbrido estradiol-AO **3.8**. A atribuição das ressonâncias de  $^{13}\text{C}$  foi feita com o auxílio de uma experiência de DEPT. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do conjugado híbrido estradiol-AO **3.8** observam-se todos os sinais esperados, de acordo com a estrutura proposta. Destacam-se o aparecimento a 88,07 ppm do sinal correspondente ao carbono C17-H confirmando a configuração  $17\beta\text{-OH}$  da molécula<sup>191</sup> e o desaparecimento dos sinais devidos aos carbonos do grupo protector TBDMS.

No espectro de massa ESI-MS do conjugado **3.8**, obtido em modo positivo, detectou-se um pico maioritário correspondente ao ião molecular  $[\text{M}]^+$  ( $m/z$  590,4) que apresenta um desdobramento concordante com a estrutura esperada

### **3.3. Avaliação Biológica do Composto Estradiol/Alaranjado de Acridina**

Nesta secção descrevem-se os estudos biológicos realizados com o conjugado híbrido estradiol-AO **3.8**, que incluíram a determinação da afinidade de ligação para os receptores de estrogénio, por ensaio competitivo com  $^3\text{H}$ -estradiol, a determinação do seu efeito na viabilidade celular em linhas celulares de adenocarcinoma da mama de origem humana, MCF-7, pelo método de MTT e a sua localização intracelular por microscopia de fluorescência confocal.

#### **3.3.1. Determinação da afinidade de ligação ao receptor estrogénico**

A afinidade de ligação aos receptores de estrogénio, subtipos  $\text{RE}\alpha$  e  $\text{RE}\beta$ , foi determinada por um ensaio competitivo entre o conjugado híbrido **3.8** e o  $^3\text{H}$ -estradiol para os locais de ligação ao receptor isolado, comparativamente ao composto de referência  $17\beta$ -estradiol, segundo o método anteriormente descrito (secção 2.4.1). Os resultados foram expressos em termos de percentagem de  $^3\text{H}$ -estradiol ligado ao receptor.

Na **Figura 3.6**, apresentam-se os gráficos que mostram a percentagem de  $^3\text{H}$ -estradiol ligado aos receptores ( $\text{RE}\alpha$  e  $\text{RE}\beta$ ) em função da variação do logaritmo da concentração do conjugado **3.8**. A partir das curvas obtidas foi possível determinar os valores de  $\text{IC}_{50}$  para  $\text{RE}\alpha$  e  $\text{RE}\beta$ , respectivamente 199,3 nM e 3,1  $\mu\text{M}$ . Nas mesmas condições experimentais, os valores de

IC<sub>50</sub> obtidos para o 17β-estradiol foram de 20,3 nM e 16,3 nM para REα e REβ, respectivamente.

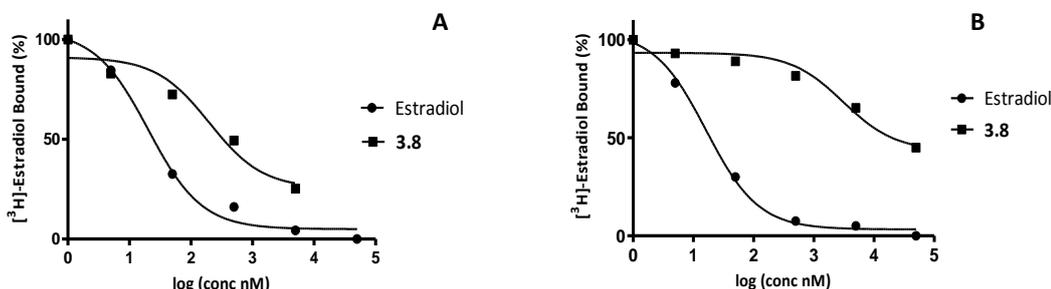


Figura 3.6.- Representação gráfica do <sup>3</sup>H-estradiol ligado ao RE (%) em função da variação do logaritmo da concentração do conjugado híbrido 3.8 no REα (A) e REβ (B)

Os valores de RBA calculados a partir dos valores de IC<sub>50</sub> encontrados experimentalmente, bem como a selectividade para o subtipo REα, são apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1.-Valores de RBA, expressos em %, determinados para o composto 3.8, em comparação com o 17β-estradiol para os receptores REα e REβ.

Composto	REα (%)	REβ (%)	REα/REβ
17β-estradiol	100	100	1
3.8	10,2	0,52	19,2

Da análise dos resultados (tabela 3.1.) verificamos que conjugado 3.8 apresenta um valor de RBA de aproximadamente 10% para o subtipo REα o que demonstra que este composto não perde totalmente a afinidade de ligação para este subtipo do receptor estrogénico. Por outro lado, apresenta alguma selectividade (α/β= 19,2) para o receptor REα. Os valores obtidos demonstram que o receptor tolera a introdução do alaranjado de acridina na posição C16 da molécula do estradiol e que a modificação estrutural necessária à reacção de conjugação não impede totalmente a ligação ao receptor. Estes resultados, quando comparados com estudos de afinidade de outros conjugados de estradiol para o RE, são bastante encorajadores uma vez que os valores de RBA são superiores aos valores descritos na literatura.<sup>229</sup> No entanto Hanson e colaboradores encontraram valores de afinidade de ligação

da mesma ordem de grandeza (RBA=7%) para um conjugado híbrido modificado na posição 11 $\beta$  do estradiol.<sup>245</sup>

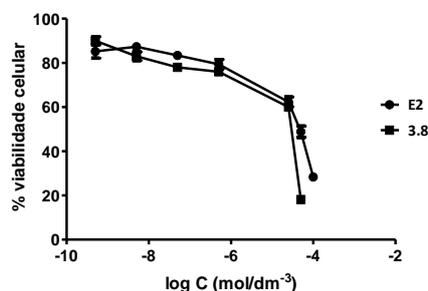
### 3.3.2. Determinação da inibição da proliferação celular

Um composto para actuar como agente anticancerígeno deve actuar como inibidor da proliferação das células tumorais. Assim, tendo em consideração a reconhecida citotoxicidade do alaranjado de acridina é expectável que o conjugado estradiol-AO, que apresenta alguma afinidade de ligação para o RE, tenha efeito citotóxico em células que sobreexpressam estes receptores.<sup>246</sup>

A citotoxicidade do conjugado estradiol-AO **3.8** foi avaliada através da sua capacidade para inibir a proliferação celular de células de cancro da mama de origem humana que expressam o receptor estrogénico (RE+) pelo teste de MTT. Este ensaio mede a quantidade de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) reduzido a formazan (cristais insolúveis de cor purpura) por acção das desidrogenases mitocondriais, enzimas localizadas na membrana mitocondrial das células metabolicamente activas e que estão envolvidas na fosforilação oxidativa, ou seja, a viabilidade celular é proporcional à redução de MTT.<sup>247</sup> Resumidamente, células tumorais MCF-7 foram incubadas com soluções do composto **3.8** em meio de cultura com concentrações variáveis (10 nM- 100  $\mu$ M). Após 72 horas a 37 °C, mediu-se a viabilidade celular por adição do MTT. Após 3 h de incubação a 37 °C, os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO e a absorvância das soluções foi medida a 570 nm. O número de células viáveis é proporcional à quantidade de cristais de formazan formados, sendo o valor estimado com base na absorvância medida. Os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis relativamente a células não sujeitas a qualquer tratamento.

A eficácia de **3.8** para inibir a proliferação celular de MCF-7 foi avaliada através da determinação do IC<sub>50</sub>, a concentração de composto necessária para inibir em 50% a proliferação celular. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados a partir das curvas de inibição, através do programa de software GraphPrism 5.0, e foram comparados com os valores de IC<sub>50</sub> obtidos com 17 $\beta$ -estradiol no mesmo ensaio. O 17 $\beta$ -estradiol foi utilizado como composto de referência devido à sua conhecida citotoxicidade e capacidade de danificar o ADN em consequência da sua actividade estrogénica.<sup>248</sup>

Na **Figura 3.7.** apresenta-se o gráfico que representa a percentagem de células viáveis em função da variação do logaritmo da concentração do conjugado **3.8.** e do composto de referência 17 $\beta$ -estradiol.



**Figura 3.7.-** Viabilidade das células MCF-7 na presença de concentrações crescentes dos compostos 17 $\beta$ -estradiol (**E<sub>2</sub>**) e **3.8**, após 72h de incubação a 37°C. Os resultados foram expressos em % de células viáveis em função do log C (mol/dm<sup>3</sup>).

Das curvas de inibição obtidas com as células MCF-7 foi possível determinar os valores de IC<sub>50</sub>, 30,7 ± 10,6  $\mu$ M e 42,6 ± 11,8  $\mu$ M respectivamente para o conjugado **3.8** e para o 17 $\beta$ -estradiol.

Estes resultados indicam que o composto **3.8** tem um efeito moderadamente citotóxico para concentrações superiores a 30,7  $\mu$ M sendo este valor da mesma ordem de concentração do resultado encontrado para o 17 $\beta$ -estradiol (42,6  $\mu$ M) no mesmo ensaio. Por outro lado, este valor de IC<sub>50</sub> para o 17 $\beta$ -estradiol é da mesma ordem de concentração do valor encontrado por Oda e colaboradores (IC<sub>50</sub> >50 $\mu$ M) em células de fibroblasto pulmonar V79.<sup>249</sup>

### 3.3.3. Estudos de captação celular e de localização intracelular

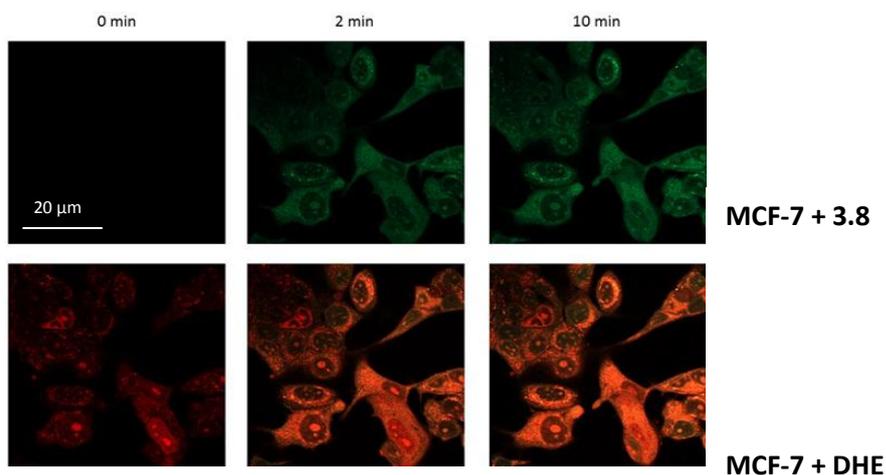
Com base na fluorescência intrínseca da unidade intercaladora **AO** conjugada à molécula do estradiol, recorreu-se à microscopia de fluorescência confocal para visualizar a captação celular do conjugado híbrido **3.8**. Através da obtenção de imagens de fluorescência avaliou-se a sua capacidade para atravessar a membrana celular, a sua distribuição e a sua localização no interior da célula a nível celular e subcelular, em tempo real.

Para este estudo utilizaram-se células MCF-7 vivas, de acordo com o procedimento descrito em 6.6.3. Após incubação das células durante 24h a 37°C, para total aderência à caixa

Petri, as células foram expostas a dois tipos de sondas fluorescentes, o dehidroetídio (DHE) ou o 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) durante um reduzido intervalo de tempo. Estas sondas emitem fluorescência a comprimentos de onda diferentes do comprimento de onda de emissão do conjugado estradiol-AO sendo por isso utilizadas como referência para visualizar a sua localização no interior das células. O DHE é um composto que se acumula no interior das células, é oxidado a etídeo, emitindo fluorescência vermelha. O DAPI é uma sonda fluorescente, comercialmente disponível, que emite fluorescência azul ciano permitindo a localização do núcleo da célula devido à sua forte ligação ao ADN.

As imagens sequenciais por microscopia de fluorescência confocal foram obtidas em cada minuto após adição de uma solução 100  $\mu\text{M}$  do composto **3.8**. A concentração de conjugado foi estabelecida com base nos resultados dos ensaios de inibição da proliferação celular descrito anteriormente (secção 3.3.2) de modo a garantir que a intensidade de fluorescência fosse adequada ao longo do tempo de duração do ensaio (1h-3h) e permitisse a aquisição das imagens, sem apresentar efeitos citotóxicos.

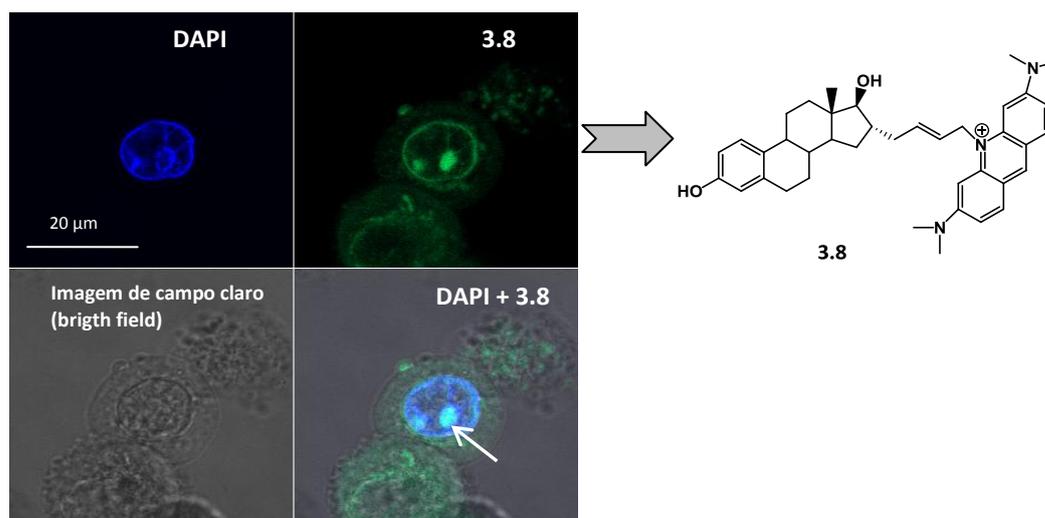
O ensaio de localização com o DHE permitiu determinar a distribuição do conjugado híbrido no interior das células. Na **Figura 3.8.**, são apresentadas as imagens de fluorescência de células MCF-7 após incubação com o composto **3.8** e com o composto DHE, até 10 min de incubação.



**Figura 3.8.-** Imagens obtidas por microscopia de fluorescência confocal de células MCF-7 ao longo de 10 min tratadas com uma solução de composto **3.8** 100  $\mu\text{M}$  (fluorescência verde) ou com uma solução de DHE (fluorescência vermelha)..

Pela análise das imagens, foi detectada fluorescência verde no citoplasma e no núcleo das células sendo possível afirmar que o conjugado **3.8**, atravessou rapidamente a membrana plasmática acumulando-se no interior das células, no citoplasma e no núcleo. A localização da sonda nas mesmas células foi detectada através da fluorescência vermelha do etídeo, confirmando a distribuição celular.

Na **Figura 3.9.**, são apresentadas as imagens obtidas por microscopia de fluorescência confocal do conjugado **3.8** e do composto DAPI.



**Figura 3.9.-** Imagens obtidas por microscopia de fluorescência confocal de células MCF-7 após exposição ao DAPI (fluorescência azul), exposição a uma solução 100 µM de composto **3.8** (fluorescência verde), durante 1 h seguida de co-localização com DAPI (em baixo à direita). A seta branca indica o núcleo.

Como se pode verificar pela análise das imagens apresentadas na **Figura 3.9.** foi detectada fluorescência verde no citoplasma e no núcleo das células. Esta observação confirma os resultados obtidos no ensaio anterior com o DHE. O composto **3.8** consegue atravessar as membranas celular e nuclear. As imagens sugerem ainda que o conjugado **3.8** mantém a capacidade de intercalar com o ADN uma vez que é detectada fluorescência verde no núcleo das células e o **AO**, devido a sua propriedade do metacromismo só emite fluorescência verde após intercalação com o ADN. Por outro lado, a sobreposição das imagens obtidas com DAPI, corante com reconhecida capacidade de ligação ao ADN, e **3.8** demonstrou a co-localização dos dois compostos.

### 3.4. Conclusões

Foi sintetizado e caracterizado um híbrido de estradiol funcionalizado na posição C16 com a unidade intercaladora de ADN, o alaranjado da acridina. Os estudos de avaliação biológica indicaram que o conjugado híbrido **3.8** é selectivo e possui moderada afinidade de ligação ao RE $\alpha$  (RBA= 10,2 %). Inibe a proliferação celular de células MCF-7 apresentando um IC<sub>50</sub> de 30,7 $\mu$ M, após 72h de incubação. As imagens obtidas por microscopia de fluorescência confocal revelaram que o composto **3.8**, após atravessar a membrana plasmática, se localiza no citoplasma e no núcleo da célula. As imagens obtidas sugerem também que **3.8** mantém a capacidade de interagir com o ADN da célula.

Estes resultados preliminares sugerem o potencial deste composto como agente quimioterapêutico perspectivando-se a confirmação da sua capacidade de interacção com a molécula de ADN através da utilização de outras técnicas analíticas, nomeadamente espectroscopia de UV-visível, fluorescência e dicroísmo circular e linear. Caso essa interacção se confirme, antecipa-se a síntese de novas sondas derivadas do estradiol que integrem simultaneamente a unidade intercaladora de ADN e um agente quelante para complexação de <sup>111</sup>In de modo a avaliar o eventual efeito sinérgico para terapia dirigida do cancro da mama com positividade para RE.



# ***Capítulo 4***

*Síntese e Avaliação Biológica de  
Derivados 16 $\alpha$ -Estradiol Conjugados  
a Sondas Fluorescentes*



## **4. Síntese e Avaliação Biológica de Derivados 16 $\alpha$ -Estradiol Conjugados a Sondas Fluorescentes**

---

O âmbito do trabalho apresentado nesta tese insere-se no desenvolvimento de novos ligandos para o receptor estrogénico tendo em vista o diagnóstico de tumores da mama. Considerando a estratégia definida, que tira partido da elevada afinidade do estradiol para este receptor, foram sintetizados compostos derivados do estradiol contendo uma sonda fluorescente. O objectivo final consistia na preparação de uma sonda bimodal que incorporasse simultaneamente a biomolécula, a sonda fluorescente e uma unidade quelante bifuncional capaz de estabilizar radiometais trivalentes. Neste capítulo descreve-se a síntese, caracterização e a avaliação biológica desta nova classe de compostos.

### **4.1. Considerações Gerais**

As sondas bimodais ao permitirem a obtenção de imagens por duas modalidades diferentes fornecem informação complementar melhorando a precisão do diagnóstico.<sup>250</sup> No caso particular de sistemas bimodais que combinam imagiologia óptica e nuclear podem ter aplicações clínicas e pré-clínicas importantes. Enquanto os radionuclídeos possibilitam a detecção inicial, os eventos subsequentes podem ser monitorizados longitudinalmente por imagiologia óptica.<sup>173</sup> Neste contexto, a concepção e síntese de novos agentes bimodais, susceptíveis de ser utilizados simultaneamente por SPECT ou PET e por imagiologia óptica, tem sido alvo de especial interesse nos últimos anos.<sup>172</sup> Mas apesar da sua elevada sensibilidade e natureza complementar a combinação destas duas modalidades de imagem é rara o que se pode atribuir especialmente a dificuldades de síntese.<sup>178</sup>

As técnicas de imagiologia óptica oferecem a possibilidade de seguir em tempo real os processos biológicos de modo não invasivo em organismos vivos. De entre estas técnicas a imagiologia de fluorescência baseia-se na detecção de uma sonda fluorescente após excitação luminosa a um determinado comprimento de onda. Assim, os compostos fluorescentes são bastante utilizados em imagiologia de fluorescência em estudos pré-clínicos uma vez que podem servir como biomarcadores específicos de moléculas, células ou receptores.<sup>251</sup> Sempre que um composto fluorescente se encontra no seu estado excitado ( $S_1$ ), após absorção de um

fotão, volta ao seu estado fundamental ( $S_0$ ) por emissão de fluorescência. O este processo ocorre em menos de  $10^{-7}$  s.

Actualmente existe uma ampla variedade de fluoróforos orgânicos disponíveis, cujo comprimento de onda (c.d.o) de emissão varia desde a zona do visível (400-700 nm) à zona de IV (700-1000 nm) com potencial para utilização como sondas ópticas. As principais famílias de cromóforos utilizados pertencem à família das cumarinas, fluoresceínas, cianinas e rodaminas. (Figura 4.1.).<sup>252</sup>

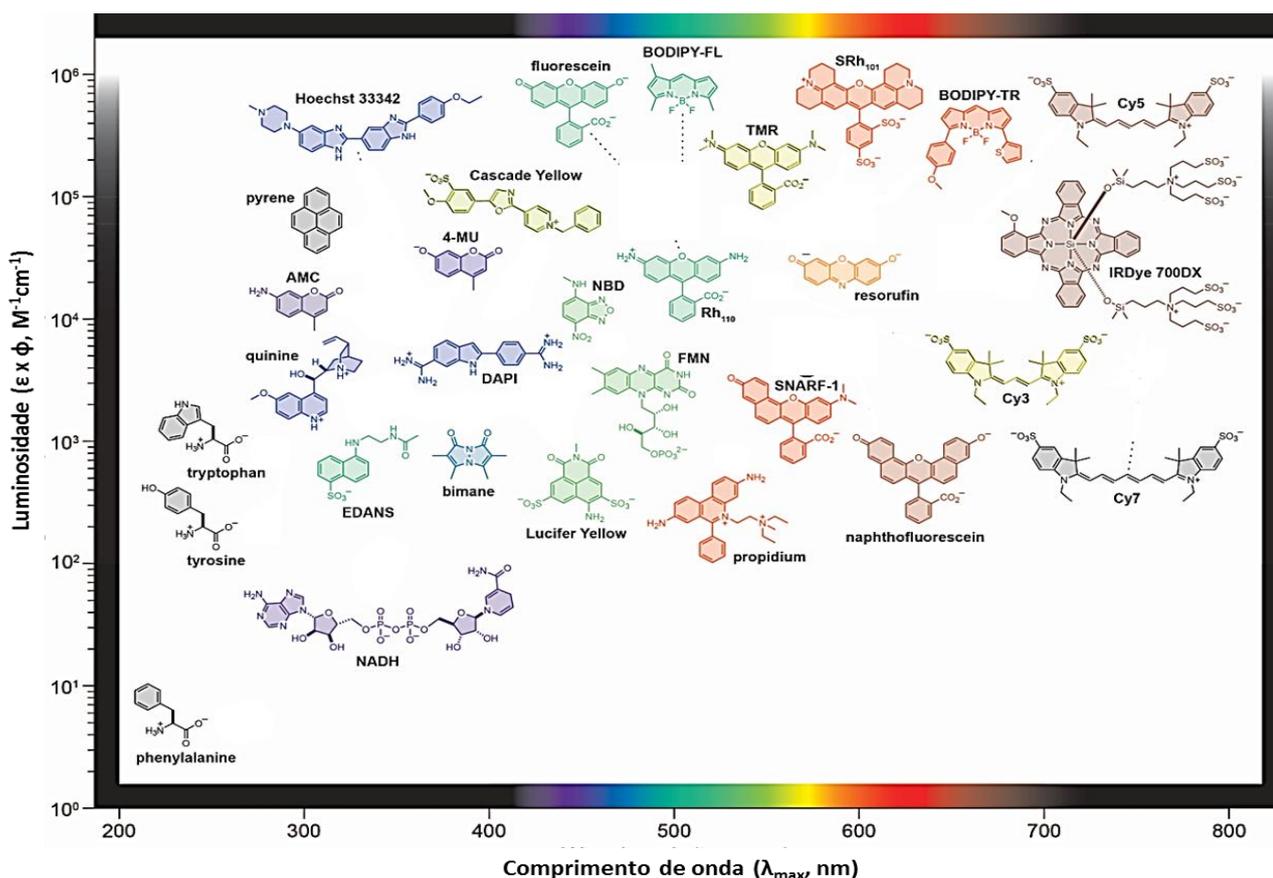
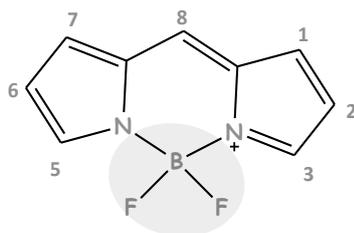


Figura 4.1.- Fluoróforos orgânicos mais comuns.<sup>252</sup>

No processo de fluorescência há que considerar vários aspectos nomeadamente o comprimento de onda máximo de absorção ( $\lambda_{max}$ ) e o comprimento de onda máximo de emissão ( $\lambda_{em}$ ). Normalmente, o  $\lambda_{em}$  é maior que o  $\lambda_{max}$ , devido à perda de energia na reorganização do solvente ou outros processos. A diferença entre o  $\lambda_{em}$  e o  $\lambda_{max}$  é designada de deslocação de Stokes. Um desvio de Stokes muito pequeno pode condicionar a utilização de certos fluoróforos no acoplamento às biomoléculas uma vez que estes são susceptíveis de se auto-extinguirem (*quenching*) por transferência de energia. Outro parâmetro importante a considerar num fluoróforo é o coeficiente de extinção ( $\epsilon$ ), que correlaciona a quantidade de

luz absorvida, num dado comprimento de onda, com a concentração do fluoróforo em solução assim como o rendimento quântico ( $\phi$ ).<sup>251</sup>

Das sondas fluorescentes disponíveis, os derivados 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY) apresentam excelentes características fotofísicas. O BODIPY pertence à classe dos fluoróforos orgânicos e é constituído por uma unidade dipirrometano que está estabilizada por um átomo de boro (**Figura 4.2.**).



**Figura 4.2.**-Estrutura química base dos derivados BODIPY com as posições onde têm sido introduzidos substituintes. (Adaptado de <sup>253</sup>)

Treibs e Kreuzer sintetizaram o primeiro derivado BODIPY, em 1968, por acetilação do 2,4-dimetilpirrolo com anidrido acético na presença de trifluoreto de boro e óxido de etileno.<sup>253</sup> As principais vantagens dos derivados BODIPY consistem na sua elevada estabilidade térmica e fotoquímica, elevado rendimento quântico, elevado coeficiente de extinção, bandas de emissão bem definidas e solubilidade em muitos solventes orgânicos. Desde então, o número de publicações relacionadas com derivados BODIPY é bastante grande devido às suas propriedades únicas.<sup>254-257</sup>

Em 1993, French e colaboradores sintetizaram um derivado 7 $\alpha$ -estradiol funcionalizado com um derivado BODIPY (**Figura 4.3.**) com afinidade para o RE (RBA=23%).<sup>258</sup> Os estudos preliminares (**4.1** da **Figura 4.3.**) mostraram que este composto apresentava rendimento quântico de fluorescência que variava entre 23 a 44%, dependendo do solvente utilizado. Os autores concluíram que o composto poderia ser utilizado em microscopia óptica de fluorescência no diagnóstico de tumores da mama.

Okonato e colaboradores sintetizaram também um derivado 7 $\alpha$ -estradiol funcionalizado com um derivado BODIPY (**4.2** da **Figura 4.3.**) para a visualização do RE por imagiologia de fluorescência.<sup>259</sup> O composto **4.2** tem um RBA de aproximadamente 76% e a sua avaliação por microscopia confocal de fluorescência mostrou que se localiza no núcleo das células sugerindo o seu potencial interesse no diagnóstico de cancro da mama RE+.

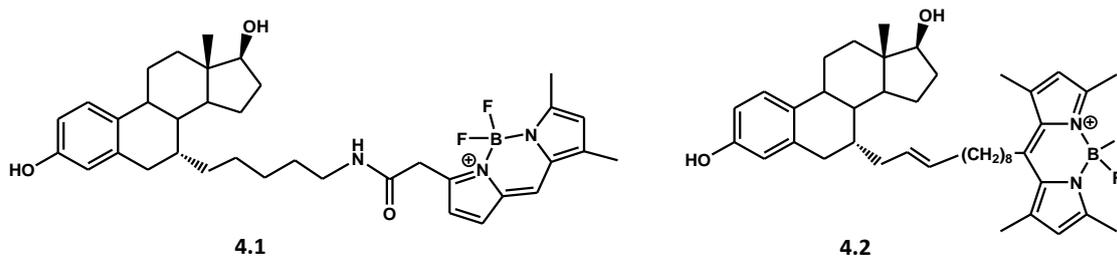


Figura 4.3.- Derivados 7 $\alpha$ -estradiol-BODIPY sintetizados por French (4.1) e Okonato (4.2).<sup>258,259</sup>

C. Bernhard e colaboradores conceberam recentemente um sistema BODIPY-DOTA para estabilizar os metais In(III), Ga(III) e Cu(II) formando complexos solúveis em meio aquoso e com propriedades fluorescentes adequadas para conjugação a biomoléculas.<sup>171</sup>

Neste capítulo descreve-se a síntese e caracterização de duas sondas fluorescentes derivadas do estradiol, funcionalizado na posição C16 com um derivado BODIPY, assim como a síntese de duas sondas bimodais derivadas da molécula de estradiol conjugada a um sistema BODIPY-DOTA para posterior complexação a <sup>67</sup>Ga ou <sup>111</sup>In (Figura 4.4.).

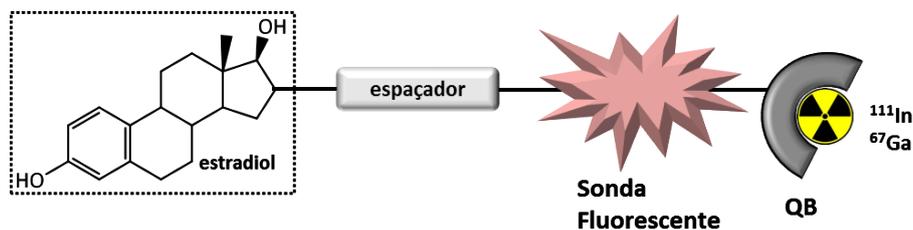


Figura 4.4.- Representação esquemática de um composto bimodal derivado do estradiol contendo uma sonda fluorescente e uma unidade quelante para complexação com diferentes radionuclídeos.

Seguidamente, procedeu-se à determinação do rendimento quântico das sondas fluorescentes. A avaliação biológica incluiu o estudo da sua afinidade de ligação para o receptor de estrogénio, da sua capacidade de inibição da proliferação celular e da determinação da localização intracelular por microscopia de fluorescência confocal.

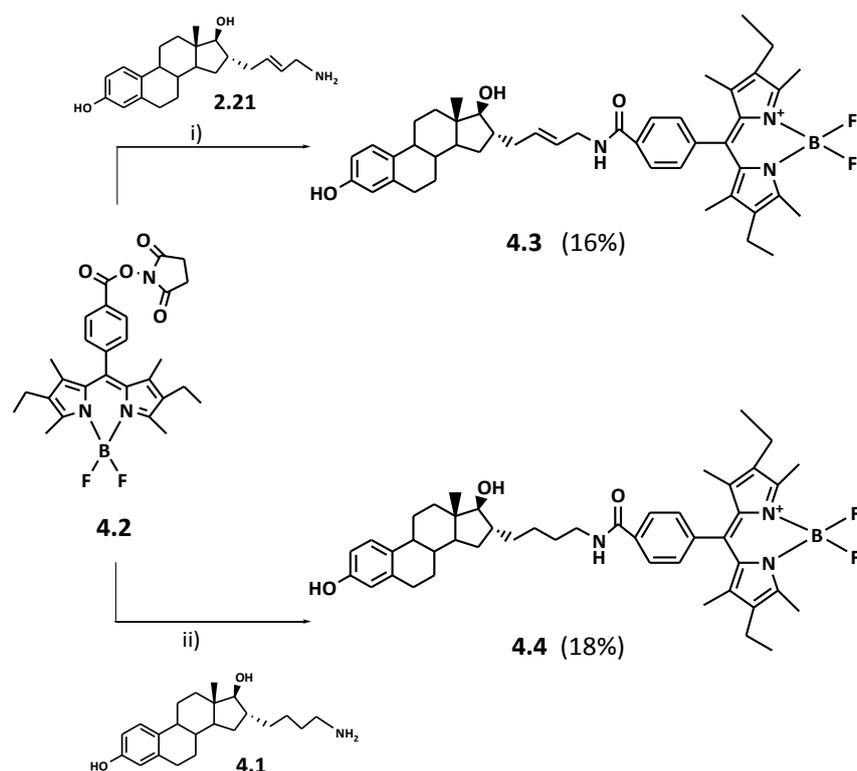
## **4.2. Síntese e Caracterização dos Compostos Estradiol/BODIPY**

Nesta secção descreve-se a síntese e caracterização dos compostos estradiol/BODIPY **4.3** e **4.4** resultantes da conjugação de derivados de estradiol funcionalizados em C16 com um derivado BODIPY, para posterior caracterização das propriedades fluorescentes e do comportamento biológico destes conjugados.

### **4.2.1. Síntese dos conjugados estradiol/BODIPY**

Na reacção de conjugação da molécula de estradiol ao derivado BODIPY utilizou-se um éster activado do BODIPY, o composto BODIPY-*N*-hidroxisuccinimida (NHS-BODIPY) (**4.2**), gentilmente cedido pelo professor Frank Denat do grupo P2DA da Universidade de Borgonha, em Dijon. Resumidamente, a conjugação do BODIPY à biomolécula ocorreu por reacção do éster activado NHS-BODIPY com a amina primária da cadeia substituinte dos compostos 4-(16' $\alpha$ -estradiol)aminobut-2-eno (**2.21**, síntese descrita na secção 2.2.2.1.) ou 4-(16' $\alpha$ -estradiol)aminobutano (**4.1**), formando-se uma ligação amida. Tendo em consideração que em condições acídicas os derivados BODIPY sofrem degradação com clivagem do grupo BF<sub>2</sub>.<sup>260</sup> foi necessário utilizar nesta reacção, derivados do estradiol com o grupo hidroxilo em C3 desprotegido. Assim, o composto **4.1** foi preparado por hidrólise ácida do composto **2.18** (secção 2.2.1.) numa solução metanólica contendo 2% HCl à temperatura ambiente, durante 18h. A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **4.1**, revelou o desaparecimento dos sinais correspondentes aos prótons metílicos do grupo tert-butildimetilsilano, comparativamente ao do precursor **2.18**. Após remoção do solvente, **4.1** foi obtido após purificação por RP-HPLC.

No **esquema 4.1**, apresenta-se a estratégia utilizada para a síntese dos conjugados estradiol/BODIPY.

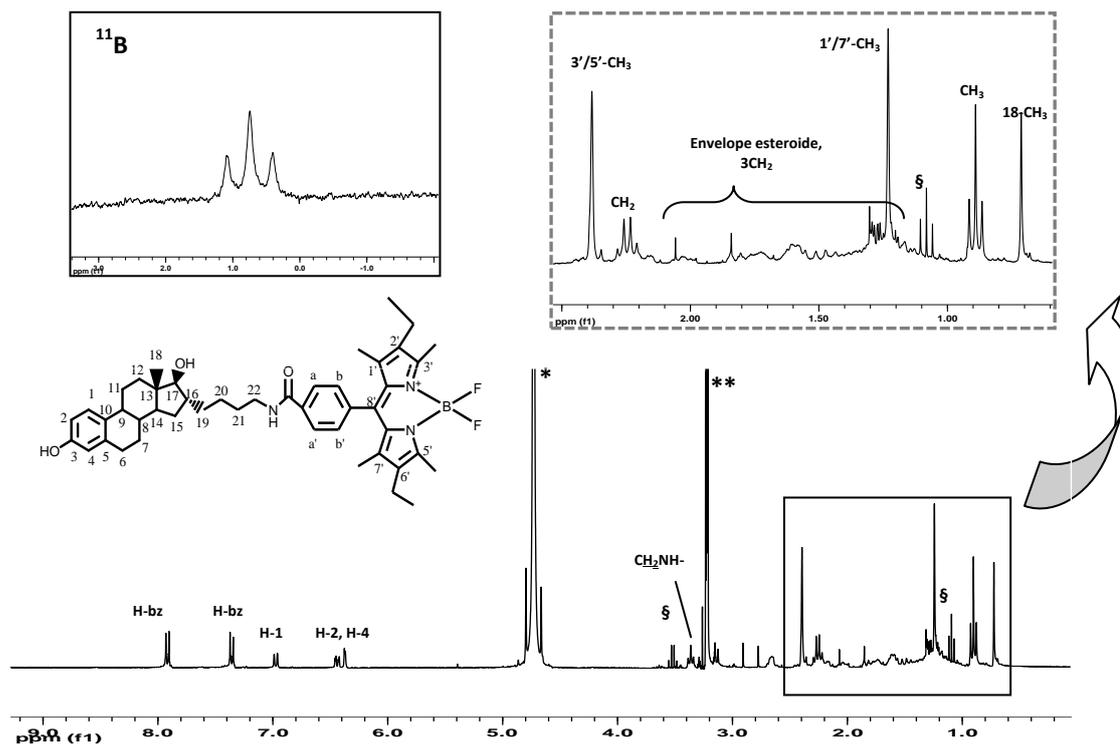


**Esquema 4.1.- Síntese dos derivados estradiol/BODIPY 4.3 e 4.4.**

*i)* 4-(16 $\alpha$ -estradiol)aminobut-2-eno **2.21**,  $NEt_3$ , DMF, t.a., 24h; *ii)* 4-(16 $\alpha$ -estradiol)aminobutano **4.1**,  $NEt_3$ , DMF, t.a., 24h.

Numa primeira abordagem, a síntese do composto **4.3** foi realizada utilizando quantidades equimolares de **2.36** e NHS-BODIPY (**4.2**) na presença de um excesso de DIPEIA (3 eq). No entanto, o rendimento de reacção após purificação, foi aproximadamente 10%. De modo a otimizar o rendimento da reacção, utilizou-se posteriormente trietilamina como base e um excesso dos precursores **2.21** e **4.1**. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de heptano e metanol, obtiveram-se os compostos **4.3** e **4.4**, sob a forma de um pó castanho avermelhado, com rendimentos totais de 16% e 18%, respectivamente. Os compostos **4.3** e **4.4** foram caracterizados pelas técnicas analíticas usuais em química, tais como RMN ( $^1H$ ,  $^{13}C$  e  $^{11}B$ ) e espectrometria de massa.

Os espectros de RMN  $^1H$  de **4.3** e **4.4** são muito semelhantes entre si. Na **Figura 4.5**, são apresentados a título de exemplo, os espectros de RMN de  $^1H$  e  $^{11}B$  do composto **4.4**.



**Figura 4.5.-** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (com inserção do espectro de  $^{11}\text{B}$ ) do composto **4.4** (\* $\text{H}_2\text{O}(\text{CD}_3\text{OD})$ ; \*\* $\text{CD}_3\text{OD}$ ;  $\delta\text{EtOH}$ )

Da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  salienta-se a campo mais baixo a presença de dois dupletos com desvios químicos a 8,01 ( $J=8,7$  Hz) e 7,45 ppm ( $J=8,4$  Hz) correspondentes aos prótons  $\text{H}_{a/a'}$  e  $\text{H}_{b/b'}$  do anel benzílico. O sinal relativo aos prótons adjacentes da ligação amida aparece com desvios químicos a 4,01 ppm e 3,45 ppm em **4.3** e **4.4**, respectivamente. A 2,61 ppm observa-se a existência de um singuleto, integrando seis prótons, correspondente aos dois grupos metilo das posições 3' e 5' da estrutura BODIPY. Este sinal encontra-se deslocado para campo mais baixo relativamente ao sinal correspondente aos outros dois grupos metilo das posições 1' e 7' ( $\delta=1,23$  ppm) uma vez que os prótons  $\text{CH}_3$  das posições 3' e 5' por influência dos átomos de azoto, se encontram mais desblindados. O sinal correspondente aos prótons  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$  da posição 2' e 6' da estrutura do BODIPY dos compostos **4.3** e **4.4** surgem sob a forma de um quarteto integrando quatro prótons com desvios químicos de 2,29 ppm e 2,33 ppm, respectivamente. A campo mais alto observa-se um tripuleto correspondente aos seis prótons metílicos da cadeia  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$  em 2' e 6' da estrutura BODIPY com um desvio químico de 0,96 ppm (**4.3**) e 0,97 ppm (**4.4**).

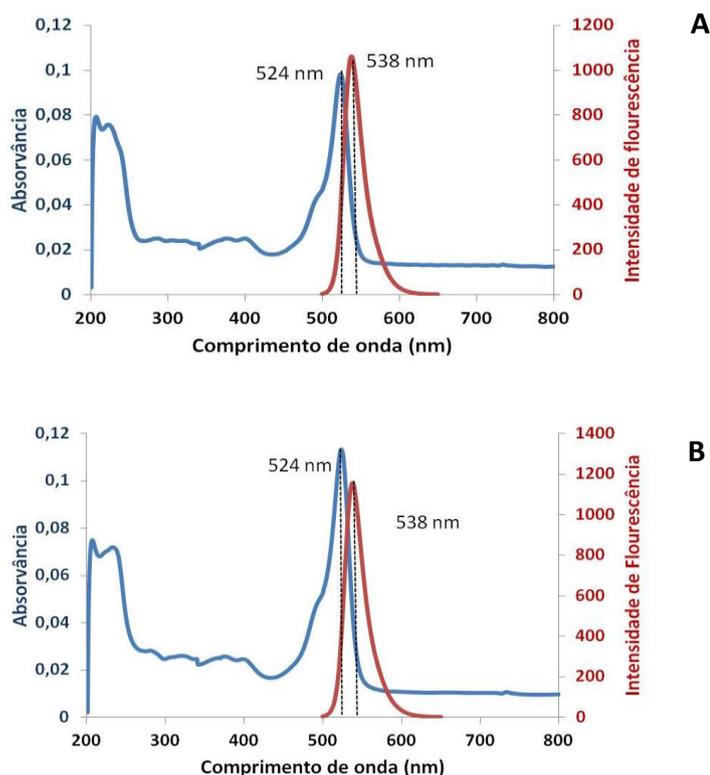
Nos espectros de RMN de  $^{11}\text{B}$  dos compostos **4.3** e **4.4** o sinal de  $^{11}\text{B}$  surge sob a forma de um tripleto ( $\delta = 0,74$  ppm) com uma constante de acoplamento ( $J_{\text{B-F}}$ ) de 33,2 Hz. Este resultado é característico das ligações  $\text{BF}_2$  estando concordante com a estrutura expectável para os compostos.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos **4.3** e **4.4** observaram-se todos os sinais esperados estando os dados espectrocópicos de acordo com as estruturas formuladas. O sinal correspondente ao grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) aparece com uma ressonância a 169,0 ppm no composto **4.3** e a 169,3 ppm no composto **4.4**. O sinal correspondente ao carbono C17-OH aparece com um desvio químico de 87,7 ppm e 88,9 ppm nos compostos **4.3** e **4.4**, respectivamente.

No espectro de MALDI-TOF do composto **4.3** obteve-se, em modo positivo, um pico  $m/z = 728,3$  correspondente ao ião molecular  $[\text{M-F}]^+$ . No caso do composto **4.4** detectaram-se os picos  $m/z 702,3$   $[\text{M-2F-B+H}]^+$ ,  $m/z 730,3$   $[\text{M-F}]^+$  e o pico molecular  $m/z 749,5$   $[\text{M}]^+$ , os quais estão de acordo com as estruturas esperadas.

#### **4.2.1.1 Caracterização por espectroscopia de UV-Vis e de fluorescência**

Os estudos de espectroscopia de UV-Vis e de fluorescência permitiram verificar as propriedades fluorescentes dos compostos **4.3** e **4.4**. Assim, foram traçados os espectros de absorção UV-Vis e de emissão de fluorescência dos compostos em estudo. Na **Figura 4.6**, são apresentados os espectros de absorção UV-Vis e de emissão de fluorescência dos compostos **4.3** e **4.4**.



**Figura 4.6.-** Espectros de absorção e de emissão dos composto **4.3 (A)** e **4.4 (B)**.

Como se pode observar nos espectros de absorção, os compostos **4.3** e **4.4** apresentam um pico máximo de absorção a 524 nm (zona fluorescente) para além de bandas de absorção a 228 e 240 nm e uma banda menos intensa a 385 nm. Estes resultados estão de acordo com as características típicas dos sistemas derivados de BODIPY. Os valores descritos na literatura para estes compostos referem absorções fortes entre os 520 e os 530 nm, atribuíveis à transição S0-S1 e bandas de absorção mais largas e menos intensas entre os 340 e 420 nm que podem ser atribuídas à transição S0-S2.<sup>261</sup>

A partir dos espectros de emissão entre 500 e 650 nm determinou-se o rendimento quântico de emissão de fluorescência ( $\phi$ ). O rendimento quântico de emissão mede a eficiência do processo de fluorescência e é definido como a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos. O valor máximo de rendimento quântico é 1,00 (100%) embora compostos cujo valor de rendimento quântico seja de 0,10 (10%) também possam ser considerados como sendo compostos fluorescentes.

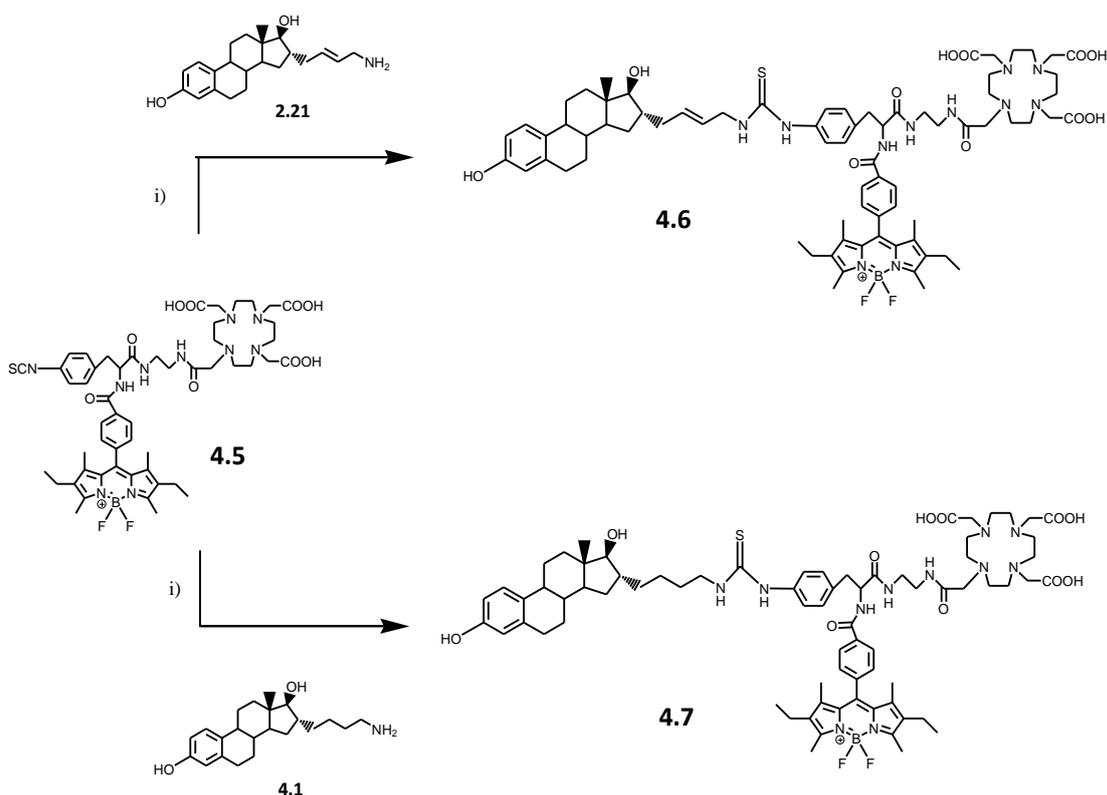
Os compostos **4.3** e **4.4** apresentaram um rendimento quântico superior de 0,54 (54%) e 0,55 (55%), respectivamente. Este resultado demonstrou que a conjugação do derivado

BODIPY **4.2** à molécula do estradiol, não alterou as suas propriedades fluorescentes ( $\phi=50\%$ ).<sup>171</sup>

### **4.3. Síntese e caracterização de derivados do estradiol bimodais**

Tendo em consideração o facto dos conjugados estradiol/BODIPY manterem as propriedades fluorescentes características dos sistemas BODIPY, explorou-se a possibilidade de desenvolver compostos bimodais com potencial interesse no diagnóstico e/ou terapia do cancro da mama de tumores com positividade para o receptor estrogénico. Neste subcapítulo descreve-se a síntese e caracterização de compostos bimodais que possuem na sua estrutura a molécula do estradiol funcionalizada na posição C16 com um derivado BODIPY-DOTA sintetizado por Bernhard e colaboradores.<sup>171</sup> Pelo facto de possuírem simultaneamente uma sonda fluorescente e uma unidade quelante que permite coordenação aos radionuclídeos <sup>111</sup>In ou <sup>67/68</sup>Ga, estes compostos poderão ser utilizados em imagiologia óptica de fluorescência e em SPECT ou PET.

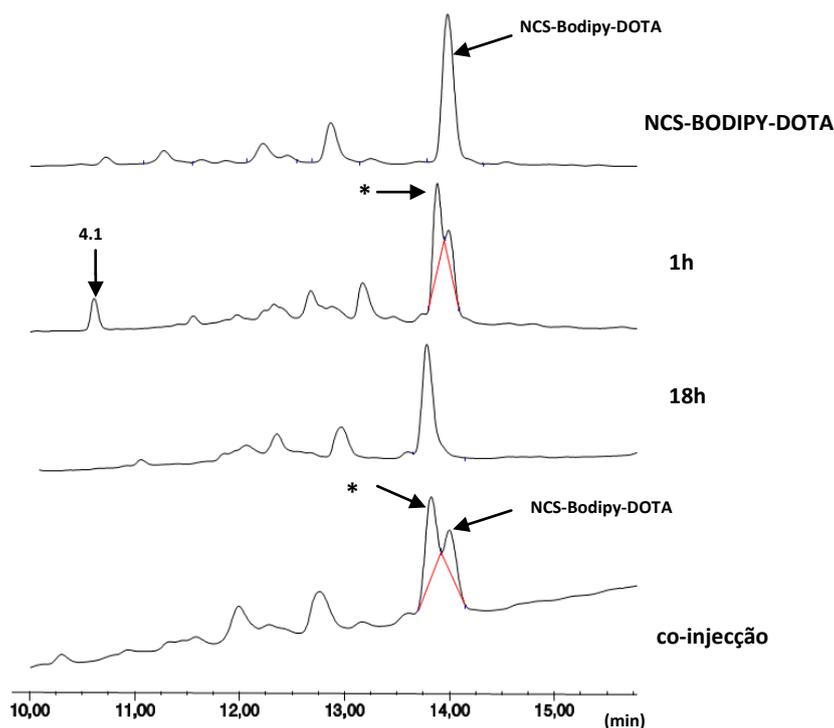
A abordagem utilizada na síntese dos derivados da molécula de estradiol com o sistema bimodal BODIPY-DOTA envolveu a formação de uma ligação tioureia através de uma reacção de conjugação entre a amina primária dos compostos **2.21** e **4.1** e o grupo funcional isotiocianato do composto SCN-bodipy-DOTA **4.5**. O composto bimodal funcionalizado com o grupo isotiocianato foi gentilmente cedido pelo professor Frank Denat do grupo P2DA da Universidade de Borgonha. A reacção de conjugação aos derivados de estradiol foi efectuada em DMF, na presença de trietilamina em excesso (10 eq), tal como ilustrado no **esquema 4.2**, tendo-se obtido os compostos bimodais **4.6** e **4.7**.



**Esquema 4.2.-** Estratégia de síntese dos derivados estradiol-DOTA-BODIPY **4.6** e **4.7**.

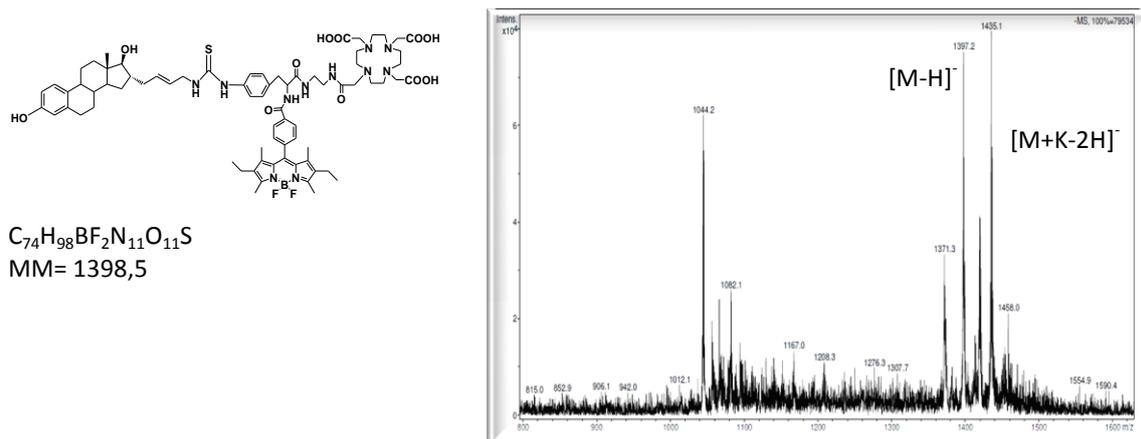
*i)* composto **2.21**,  $NEt_3$ , DMF, t.a., 28h; *ii)* composto **4.1**,  $NEt_3$ , DMF, t.a., 28h

A reacção de conjugação foi controlada através da análise de alíquotas da mistura reaccional por RP-HPLC ao longo do tempo. Na **Figura 4.7.**, a título de exemplo, são apresentados os cromatogramas do controlo da reacção por RP-HPLC da síntese do composto **4.7**. Ao fim de 1h de reacção observou-se o aparecimento de um novo pico com um tempo de retenção ( $T_R$ ) de 13,96 min em comparação com o  $T_R$  de 14,12 min do NCS-bodipy-DOTA (**4.5**). Após 18h de reacção deixou de ser possível distinguir os dois picos observando-se simultaneamente, a diminuição da intensidade do sinal correspondente ao precursor alquilamino **4.1**. A co-injecção de uma alíquota da mistura reaccional às 18h com uma amostra do reagente de partida NCS-bodipy-DOTA (**4.5**) veio comprovar que se obtivera um composto novo, tendo sido possível distinguir os dois compostos. Após 28h de reacção removeu-se o solvente e obteve-se um crude sob a forma de um pó castanho avermelhado.



**Figura 4.7.-** Controlo da reacção de conjugação do composto **4.1** ao composto **NCS-Bodipy-DOTA** para síntese do composto **4.7**, por RP-HPLC. Cromatogramas do composto **NCS-Bodipy-DOTA** ( $\lambda=530$  nm), da mistura reaccional após 1h de reacção ( $\lambda=220$  nm), mistura reaccional após 18h de reacção ( $\lambda=530$  nm) e co-injecção da mistura reaccional às 18h + **NCS-Bodipy-DOTA** ( $\lambda=530$  nm).

A formação dos conjugados bimodais **4.6** e **4.7** foi confirmada por espectrometria de massa ESI-MS. No caso da mistura reaccional para obtenção do composto **4.6**, foi possível observar, no modo negativo um pico  $m/z=1397,2$  correspondente ao ião  $[M-H]^-$  e um pico  $m/z=1435,1$  correspondente ao ião  $[M+K-2H]^-$ . No caso do conjugado **4.7** observou-se um pico  $m/z=1399,1$  correspondente ao ião  $[M-H]^-$  e um pico a  $1437,1$  correspondente ao ião  $[M+K-2H]^-$ . Na **Figura 4.8.** encontra-se, a título de exemplo, o espectro de ESI-MS do conjugado **4.6**.



**Figura 4.8.-** Espectro de massa (ESI-MS), no modo negativo, correspondente à análise da mistura reaccional da síntese do composto **4.6**.

A purificação da mistura reaccional foi feita por RP-HPLC preparativo utilizando uma coluna semi-preparativa C18 de fase reversa e uma mistura de eluentes 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O e 0,1%/CH<sub>3</sub>CN (pH 2). Contudo esta tentativa não foi bem sucedida uma vez que os picos isolados correspondiam, após análise por espectrometria de massa, a produtos secundários ou a produtos resultantes de degradação. Perante estes resultados pôs-se a hipótese de as condições utilizadas na purificação por RP-HPLC, nomeadamente o sistema de eluentes contendo TFA provocarem a clivagem do grupo BF<sub>2</sub>. Com o objectivo de otimizar as condições de purificação em RP-HPLC, evitando solventes ácidos, tentou-se purificar as misturas reaccionais utilizando como eluente uma solução tampão NEt<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>COOH (pH 4) e acetonitrilo. No entanto, análise dos cromatogramas obtidos mostrou não ser possível resolver os picos do cromatograma e portanto, não foi possível isolar os compostos **4.6** e **4.7** durante o período de tempo de execução do trabalho para esta tese. Os estudos de optimização das condições de purificação dos compostos **4.6** e **4.7** prosseguirão brevemente.

#### 4.4. Avaliação Biológica das Sondas Fluorescentes Estradiol/BODIPY

Nesta secção apresentam-se os estudos biológicos realizados com as sondas fluorescentes estradiol/BODIPY **4.2** e **4.3**, nomeadamente ensaios de afinidade de ligação aos receptores de estrogénio, determinação da viabilidade celular em células MCF-7 e a sua localização intracelular por microscopia de fluorescência confocal.

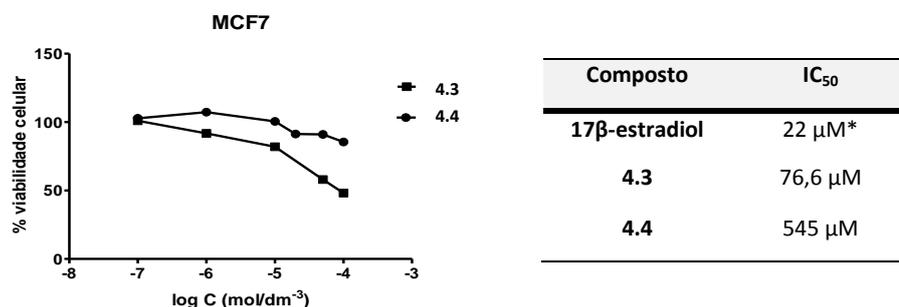
#### 4.4.1. Determinação da afinidade de ligação ao receptor estrogénico

A afinidade de ligação dos compostos **4.3** e **4.4** ao receptor de estrogénio, subtipo RE $\alpha$ , foi determinada por um ensaio competitivo com <sup>3</sup>H-estradiol, tal como descrito nos capítulos anteriores, utilizando o protocolo descrito na secção 6.4.

French<sup>258</sup> e Okonato<sup>259</sup> encontraram valores de RBA de 23% e 76%, respectivamente, para derivados do estradiol conjugados ao BODIPY, na posição 7 $\alpha$ , demonstrando que mantinham a afinidade para o RE. Contrariamente, os resultados de afinidade dos compostos **4.3** e **4.4** indicaram que a molécula de estradiol quando acoplada a um derivado BODIPY, na posição C16 do anel esteróide, perde a afinidade para o RE $\alpha$  uma vez que se encontraram valores de RBA  $\leq 0$ .

#### 4.4.2. Determinação da inibição da proliferação celular

A citotoxicidade dos compostos **4.3** e **4.4** foi estudada em células MCF-7, através do ensaio de MTT, com o objectivo de determinar a concentração máxima susceptível de ser utilizada nos estudos de microscopia de fluorescência confocal. Este ensaio permite avaliar a capacidade dos diferentes compostos para inibir a proliferação celular, segundo a técnica descrita na secção 6.6.2. Na **Figura 4.9**, apresentam-se os resultados obtidos sob a forma de um gráfico que representa a percentagem de viabilidade celular em função da concentração dos compostos **4.3** e **4.4**. Os respectivos valores de IC<sub>50</sub>, determinados a partir das curvas de inibição, são apresentados na tabela.



**Figura 4.9.-** Viabilidade das células MCF-7 na presença de concentrações crescentes dos compostos **4.3** e **4.4**, após 72h de incubação a 37 $^{\circ}$ C. Os resultados foram expressos em % de células viáveis em função do log C (mol/dm<sup>3</sup>). Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados através do programa de análise de dados GraphPad's Prism.

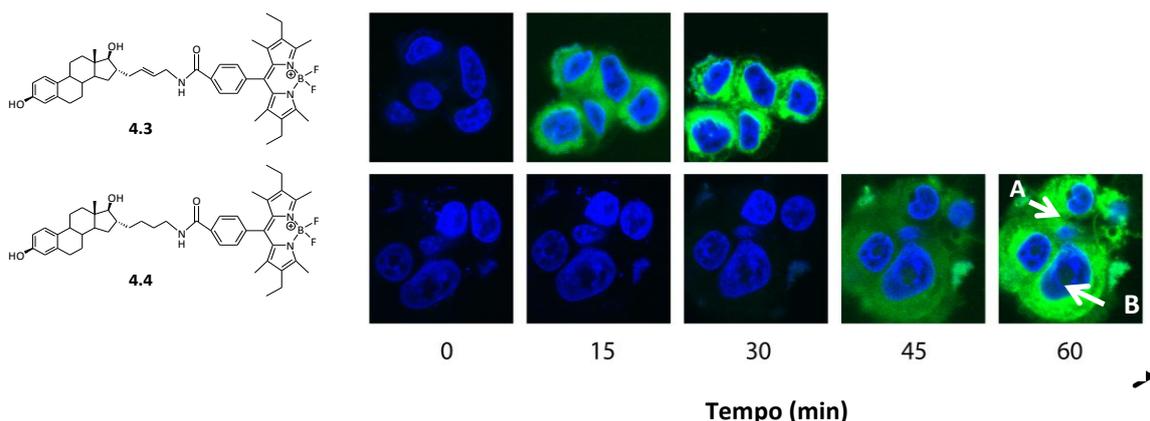
Os resultados obtidos indicam que o composto **4.3** é moderadamente citotóxico para a linha celular MCF-7 em concentrações superiores a 76,6  $\mu$ M enquanto o composto **4.4** só apresenta efeitos citotóxicos para concentrações da ordem de grandeza de  $10^{-5}$  M. No entanto estes efeitos de citotoxicidade verificaram-se após um período de incubação bastante longo (72h), podendo considerar-se que durante o período de incubação necessário à realização do estudo por microscopia de fluorescência confocal (aproximadamente 1h) não é provável que a viabilidade celular seja afectada.

#### **4.4.3. Estudos de captação celular e de localização intracelular**

A captação celular dos compostos **4.3** e **4.4** e a sua distribuição subcelular em células MCF-7 foi feita recorrendo à microscopia de fluorescência confocal que permite detectar a fluorescência da unidade BODIPY. Este estudo foi realizado utilizando células vivas, de acordo com o procedimento descrito em 6.6.3.

Durante os ensaios de microscopia de fluorescência utilizou-se uma concentração dos compostos equivalente a  $7 \times 10^{-5}$  M que, segundo os estudos de MTT, garantia a aquisição de imagens ao longo do estudo sem comprometer a viabilidade das células. Uma solução da sonda Hoechst 33342 em EtOH (1 $\mu$ L/2ml de meio celular sem vermelho de fenol) foi adicionada às células MCF-7. Após 10 min de incubação a 37°C, o meio foi aspirado e as células foram lavadas com PBS. Esta sonda, Hoechst 33342, liga-se ao ADN presente no núcleo das células emitindo fluorescência azul ( $\lambda_{em}$ , 460-490 nm). Este composto emite fluorescência numa gama de comprimentos de onda diferente do comprimento de onda dos compostos em estudo, tendo sido utilizado como sonda nuclear. Verificou-se então a co-localização do Hoechst 33342 e dos compostos em estudo. Os compostos **4.3** e **4.4** foram detectados por aquisição de imagens de fluorescência verde ao longo do tempo.

Na **Figura 4.10**, são apresentadas as imagens de fluorescência em células MCF-7, ao longo do tempo, após incubação com a sonda Hoechst 33342 e com os compostos **4.3** e **4.4**.



**Figura 4.10.-** Imagens de células MCF-7 obtidas por microscopia de fluorescência confocal dos compostos **4.3** e **4.4** (fluorescência verde) e da sonda Hoechst 33342 (fluorescência azul), ao longo do tempo. A seta **A** indica o citoplasma e a seta **B** o núcleo da célula.

Como se pode observar nas imagens, os compostos **4.3** e **4.4** atravessaram a membrana plasmática da célula localizando-se no citoplasma. Não se observou internalização nuclear de nenhum dos compostos. A análise dos resultados obtidos por microscopia de fluorescência confocal sugere que a entrada dos compostos na matriz celular poderá acontecer por difusão passiva.

Foi também possível observar que a cinética de entrada do composto **4.3** na matriz celular é mais rápida que a do composto **4.4**. Aparentemente, a pequena diferença ao nível estrutural entre os compostos, diferente grau de saturação da cadeia alquílica entre a molécula de estradiol e o derivado BODIPY, parece alterar consideravelmente a sua cinética de internalização. Este comportamento provavelmente está associado à maior rigidez da cadeia conferida pela presença da cadeia dupla, no composto **4.3**. Este composto foi detectado no citoplasma da célula após 15 min de incubação enquanto o composto **4.4** necessitou de um período mais longo, aproximadamente 45 min.

## 4.4. Conclusões

Foram sintetizados e caracterizados dois compostos derivados da molécula de estradiol conjugados na posição C16 a uma sonda fluorescente, um derivado BODIPY, os compostos **4.3** e **4.4**. Foram também sintetizados dois compostos bimodais resultantes da

conjugação da molécula de estradiol ao sistema bimodal BODIPY-DOTA, os compostos **4.6** e **4.7**. Contudo, por questões de tempo não foi possível encontrar as condições experimentais necessárias à purificação destes compostos bimodais e prosseguir os estudos de caracterização e avaliação biológica.

A caracterização dos novos compostos **4.3** e **4.4** indica que as propriedades fluorescentes do derivado BODIPY não foram alteradas após conjugação à molécula de estradiol. Os estudos preliminares realizados mostraram que estes dois compostos possuem elevados rendimentos quânticos (< 50%) podendo, portanto, ser utilizados em microscopia de fluorescência. No entanto a sua avaliação biológica indicou que a molécula de estradiol quando ligada ao BODIPY na posição C16 perde a afinidade para o RE $\alpha$ . Os estudos de captação celular e de localização subcelular por microscopia de fluorescência confocal revelaram que os compostos **4.3** e **4.4**, atravessam a membrana plasmática, com cinéticas de internalização diferentes, e se localizam no citoplasma.



# ***Capítulo 5***

*Conclusões e Perspectivas*



## 5. Conclusões e Perspectivas

---

O objectivo principal do trabalho apresentado nesta tese consistiu no desenvolvimento de novas moléculas da família do estradiol com afinidade para o receptor de estrogénio, biomarcador do cancro da mama com reconhecida relevância clínica, na perspectiva da avaliação do seu potencial interesse para imagiologia molecular e/ou terapia sistémica de tumores da mama estrogénio-dependentes.

O cancro da mama, pela sua incidência e taxa de mortalidade, constitui uma doença do foro oncológico com grande impacto social o que motiva intensa investigação no sentido de desenvolver modalidades de diagnóstico não invasivas e/ou de tratamento dirigidas a alvos moleculares que garantam o diagnóstico precoce, a selecção de doentes e a eficácia terapêutica personalizada minimizando os efeitos secundários. O desenvolvimento de radiofármacos específicos capazes de interagir com receptores sobre-expressos em tumores mamários pode contribuir para a caracterização molecular tumoral antecipando a sua resposta ao tratamento. Por outro lado, se incluírem na sua composição radionuclídeos com propriedades nucleares adequadas para terapia podem ter aplicação em tratamentos dirigidos a esses alvos moleculares. Recentemente os avanços na oncologia molecular permitiram classificar os carcinomas da mama em subtipos moleculares que se correlacionam com biomarcadores já bem identificados.<sup>12,262,263</sup> O principal biomarcador, que é simultaneamente um bom alvo tumoral, é o receptor de estrogénio (RE).<sup>52</sup> Assim, utilizaram-se compostos derivados da molécula de estradiol, ligando endógeno do RE, para veicular radionuclídeos, <sup>111</sup>In e <sup>67</sup>Ga, emissores tanto de radiação gama como de electrões Auger, para células ou tecidos que expressam RE, na perspectiva de determinar o seu potencial interesse para diagnóstico e/ou terapia tumoral.

No âmbito deste trabalho foram sintetizados seis complexos de <sup>111</sup>In e dois de <sup>67</sup>Ga com novos derivados da molécula de estradiol utilizando a aproximação bifuncional. Esta aproximação consiste na conjugação de um agente quelante bifuncional com capacidade, por um lado, de estabilizar os radiometais <sup>111</sup>In e <sup>67</sup>Ga e por outro, de se ligar covalentemente à biomolécula. Entre a unidade quelante e a molécula é frequente existir um espaçador de natureza diversa que pode contribuir para facilitar a interacção com o receptor e/ou influenciar a farmacocinética dos compostos. Para a concretização deste objectivo foram preparados os conjugados de estradiol **L1-L7** com diferentes agentes quelantes bifuncionais do

tipo poliaminocarboxilatos acíclicos (DTPA) e cíclicos (DOTA, DOTAGA e NOTAGA) visando a posterior formação de complexos de  $\text{In}^{111}\text{In}$  e  $\text{Ga}^{67}\text{Ga}$  com afinidade para o RE.

Nesse sentido, foram sintetizados inicialmente precursores derivados de estrona ou estradiol, funcionalizados na posição C16 com diferentes substituintes, para a conjugação aos agentes quelantes. Os substituintes eram constituídos por cadeias alquílicas de comprimento variável (4 a 6 átomos de carbono) saturadas ou insaturadas, com um átomo de bromo (**2.3**, **2.9**, **2.15**) ou uma grupo amina (**2.17**, **2.18**) terminais.

A conjugação aos diferentes agentes quelantes bifuncionais ocorreu por *N*-alquilação da amina secundária do ligando estabilizador do metal, obtendo-se os compostos **L1-L4**, ou por formação de uma ligação amida entre a amina do derivado do estradiol e um grupo carboxilato do quelante, no caso dos compostos **L5-L7**.

Estes conjugados de estradiol foram utilizados na síntese dos complexos de  $\text{In}^{111}\text{In}$  e  $\text{Ga}^{67}\text{Ga}$ . Os complexos inactivos **InL1-InL6**, **GaL2** e **GaL7** foram sintetizados com a dupla finalidade de confirmar a identidade dos respectivos análogos radioactivos e de determinar a afinidade de ligação aos receptores de estrogénio. Os complexos inactivos foram obtidos com rendimentos que variaram entre 43,4% (**InL3**) e 71,3% (**InL1**) por reacção dos compostos **L1-L6** com  $\text{InCl}_3$  e dos compostos **L2** e **L7** com  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ . Tal como expectável de um composto contendo na sua estrutura a unidade quelante acíclica DTPA, a cinética de coordenação do ligando **L1** ao In foi mais rápida e ocorreu à temperatura ambiente. No caso dos compostos contendo unidades quelantes macrocíclicas, **L2-L7**, a complexação com os metais necessitou de um período de incubação mais longo e de temperatura elevada. Os complexos inactivos foram caracterizados pelas técnicas analíticas usualmente utilizadas em química.

A afinidade dos conjugados **L1-L7** e dos complexos de índio, **InL5** e **InL6**, para os dois subtipos de receptores de estrogénio ( $\text{RE}\alpha$  e  $\text{RE}\beta$ ) foi determinada *in vitro* por ensaio de ligação competitiva com o  $^3\text{H}$ -estradiol, comparativamente ao  $17\beta$ -estradiol. Neste estudo os compostos **L5**, **L6** e **L7** apresentaram valores de RBA de 88%, 15% e 2,5%, respectivamente, indicando que possuíam afinidade elevada a moderada para o subtipo  $\alpha$  do RE. Por outro lado, estes compostos demonstraram também uma considerável selectividade para este subtipo do receptor uma vez que apresentavam baixa afinidade para o subtipo  $\text{RE}\beta$ . Os complexos correspondentes **InL5** e **InL6** mantiveram a afinidade para o  $\text{RE}\alpha$  com valores de RBA de 44% e 22%, respectivamente. Devido à baixa solubilidade do complexo **GaL7**, nos solventes de ensaio, não foi possível determinar a sua afinidade para o RE.

Os resultados deste estudo sugeriram que tanto a unidade quelante como o comprimento e o grau de saturação da cadeia espaçadora entre a molécula de estradiol e o quelato podem influenciar a afinidade para o RE. O aumento da afinidade mostrou ser directamente proporcional ao aumento do comprimento da cadeia alquílica do espaçador indicando que o receptor é tolerante a substituições na posição C16, desde que o quelato esteja suficientemente afastado do núcleo esteróide. A maior flexibilidade conformacional da cadeia alquílica em análogos saturados parece corresponder a uma menor afinidade para o RE. Estes resultados estão concordantes com estudos anteriormente descritos na literatura para outros derivados de estradiol.

Para avaliar o potencial dos novos compostos para a detecção de tumores da mama com positividade para RE procedeu-se à síntese e à avaliação radioquímica e biológica dos complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  com **L1-L7**. Os complexos  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$  e  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  foram obtidos com elevado rendimento utilizando concentrações de ligando que variaram entre  $5 \times 10^{-6}\text{M}$  e  $1 \times 10^{-4}\text{M}$ , por reacção dos ligandos **L1-L6** com  $^{111}\text{InCl}_3$  e dos ligandos **L2** e **L7** com  $^{67}\text{GaCl}_3$ . A caracterização estrutural dos complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  foi feita por comparação dos tempos de retenção nos perfis cromatográficos de HPLC com os dos complexos análogos inactivos.

Os valores de log D encontrados indicaram que a maioria dos complexos possuem um carácter hidrofílico (log D < 0) à excepção dos complexos  $^{111}\text{InL2}$ ,  $^{111}\text{InL4}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  que apresentam carácter mais lipofílico (log D = 0,05; 0,43 e 0,89, respectivamente).

Os complexos radioactivos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  revelaram-se bastante estáveis *in vitro*, tal como demonstrado por estudos de estabilidade em PBS e soro humano, até 5 dias, excepto o complexo  $^{111}\text{InL3}$  que mostrou ser instável em soro humano. Por outro lado, os complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  mostraram também ser estáveis na presença de apo-transferrina, não se tendo observado transquelatação do ião metálico, até 5 dias. A maioria dos complexos mostrou também ser cineticamente inerte na presença de DTPA.

Os estudos de captação celular dos complexos  $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ ,  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  foram realizados em linhas celulares de carcinoma da mama de origem humana, MCF-7 e MDA-MB-231. As células MCF-7 expressam RE e os ensaios foram realizados em paralelo com e sem saturação dos receptores para avaliar a especificidade da captação. Obtiveram-se taxas de captação relativamente baixas, resultados que se correlacionam com o carácter hidrofílico da maioria dos compostos que não favorece a difusão passiva através da membrana celular. A maior taxa de captação foi obtida com o complexo  $^{67}\text{GaL7}$  que possui carácter mais lipofílico.

No entanto os ensaios de saturação de receptores nas células MCF-7 indicaram uma redução da acumulação de actividade nas células sugerindo que a captação dos complexos poderá estar relacionada com um mecanismo mediado pelos receptores de estrogénio. De um modo geral, os resultados nas células MDA-MB-231, que não expressam RE, confirmaram esta hipótese uma vez que as taxas de captação foram mais reduzidas mas evidenciaram a importância da lipofilia neste processo. Em suma, a captação celular parece ser mediada por um mecanismo associado ao RE, no entanto a localização intracelular deste receptor requer que os compostos atravessem a membrana plasmática para entrarem nas células. No entanto, o carácter hidrofílico da maioria dos compostos, em especial de  $^{111}\text{InL5}$  e  $^{111}\text{InL6}$  que demonstraram ter afinidade para o RE, limita a interacção com o receptor.

Os ensaios de experimentação animal permitiram avaliar a estabilidade *in vivo* e o perfil de biodistribuição dos complexos  $^{111}\text{InL1}$ ,  $^{111}\text{InL2}$ ,  $^{111}\text{InL5}$ ,  $^{111}\text{InL6}$ ,  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$ . Todos os complexos apresentaram elevada estabilidade *in vivo* e uma biocinética semelhante entre si. De um modo geral, do perfil de biodistribuição destacou-se uma rápida depuração sanguínea e rápida captação por via hepática seguida de eliminação intestinal. A via de excreção predominante foi hepatobiliar, com uma ligeira contribuição urinária. Em consequência da rápida depuração sanguínea, observou-se alguma selectividade dos complexos para os órgãos alvo, útero e ovários, apesar da reduzida fixação atribuível ao carácter hidrofílico dos compostos. De acordo com esta consideração, o composto  $^{67}\text{GaL7}$ , mais lipofílico, apresentou os valores mais elevados de fixação no útero e ovários. Os ensaios de saturação dos receptores apontaram para um mecanismo mediado pelo RE.

Tendo em consideração a afinidade dos complexos  $^{111}\text{InL5}$ ,  $^{111}\text{InL6}$  e provavelmente do  $^{67}\text{GaL7}$  para o RE seria expectável que fossem úteis na concepção de sondas radioactivas para a detecção *in vivo* de tumores da mama que sobreexpressem RE. No entanto, os resultados de biodistribuição obtidos em ratos fêmea imaturos, da estirpe Sprague-Dawley, com taxas de fixação e retenção nos órgãos ricos em receptores de estrogénio relativamente baixas, apesar de apresentarem alguma selectividade, não foram suficientemente promissores para encorajarem a sua avaliação em modelo animal com tumores induzidos que expressem RE.

Perspectiva-se, num futuro próximo, efectuar alterações na estrutura química dos derivados de estradiol por forma a melhorar o seu perfil biológico designadamente a sua afinidade para o RE e o seu carácter hidrofílico. Por exemplo, seria de grande interesse preparar e avaliar a influência do acoplamento das unidades quelantes noutras posições do anel esteróide que toleram modificações estruturais sem comprometer a sua actividade

biológica, nomeadamente nas posições C17, C11 e C7. Para modelar o carácter lipo/hidrofílico dos compostos deveriam ser utilizadas cadeias espaçadoras insaturadas de maior comprimento. Atendendo a que os derivados do estradiol funcionalizados com DOTAGA e NODAGA apresentaram os perfis biológicos mais promissores, estes deveriam ser os principais agentes quelantes bifuncionais a testar.

Na segunda parte do trabalho explorou-se uma estratégia que consistiu na síntese e avaliação biológica de uma molécula híbrida derivada do estradiol funcionalizado na posição C16 com a unidade intercaladora de ADN, o alaranjado da acridina (**AO**) com o objectivo de alvejar o receptor de estrogénio de modo selectivo para fins terapêuticos. Com este estudo, pretendeu-se determinar se o receptor de estrogénio é tolerante à introdução do **AO** nesta posição da biomolécula e se o conjugado tem capacidade de atravessar as membranas plasmática e nuclear, requisito essencial para interagir com o ADN. A escolha desta unidade intercaladora relacionou-se com a sua reconhecida capacidade de interagir com o ADN e com as suas propriedades fluorescentes que facilitam a sua detecção.

O híbrido estradiol/alaranjado de acridina, **3.8** foi obtido por *N*-alquilação da amina terciária do **AO** com o brometo precursor derivado do estradiol.

Os estudos de afinidade para o receptor (RBA) mostraram que o composto **3.8** é selectivo e possui uma afinidade moderada para o subtipo RE $\alpha$  (RBA= 10,2%). Ensaio de inibição da proliferação celular em células MCF-7 demonstraram que tem um efeito moderadamente citotóxico apresentando um IC<sub>50</sub> de 42 $\mu$ M, após 72h de incubação. Este valor de concentração é da mesma ordem de grandeza do encontrado para o 17 $\beta$ -estradiol (34,7  $\mu$ M) no mesmo ensaio.

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência confocal em células MCF-7 vivas demonstraram que o composto **3.8**, após atravessar a membrana plasmática, se localizou no citoplasma e no núcleo da célula. As imagens obtidas sugeriram também que **3.8** mantém a capacidade de interagir com o ADN da célula.

Concluindo, os resultados preliminares da avaliação biológica de **3.8** mostraram que este composto pode ser promissor como agente quimioterapêutico no tratamento de tumores da mama que expressem RE uma vez que possui afinidade para o receptor e consegue atravessar as membranas plasmáticas e nucleares localizando-se no núcleo da célula. No entanto para confirmar se o intercalador mantém a capacidade de interacção com a molécula

do ADN após a sua conjugação à molécula de estradiol, é necessário realizar estudos adicionais, utilizando por exemplo técnicas de espectroscopia UV-visível e fluorescência e de dicroísmo circular ou linear. Estes estudos poderão dar informação complementar sobre o modo de intercalação entre o conjugado **3.8** e o ADN.

Por fim, foram sintetizados e avaliados derivados de estradiol funcionalizados na posição C16 com uma sonda fluorescente, com o objectivo final de preparar uma sonda bimodal que incorporasse na biomolécula, simultaneamente, uma sonda fluorescente e uma unidade quelante bifuncional capaz de estabilizar radiometais trivalentes. Pretendia-se avaliar o seu potencial interesse no diagnóstico de cancro da mama utilizando duas técnicas imagiológicas distintas.

Nesse contexto, foram sintetizados e caracterizados inicialmente dois derivados de estradiol, **4.3** e **4.4**, conjugados na posição C16 a uma sonda fluorescente, um derivado BODIPY. A conjugação ocorreu por reacção do éster activado BODIPY-*N*-hidroxisuccinimida com a amina terminal do derivado 16 $\alpha$ -estradiol.

A caracterização por espectroscopia de UV-Vis e de fluorescência dos compostos **4.3** e **4.4** permitiu verificar que as propriedades fluorescentes do derivado BODIPY não foram alteradas após conjugação à molécula de estradiol. Os estudos preliminares mostraram que estes dois compostos possuem elevados rendimentos quânticos (< 50%) podendo ser utilizados em microscopia de fluorescência. No entanto, os estudos de avaliação biológica indicaram que a molécula de estradiol quando ligada ao BODIPY na posição C16, perde a afinidade para o RE $\alpha$ . Por outro lado, os ensaios de captação celular e de localização subcelular por microscopia de fluorescência confocal revelaram que os compostos **4.3** e **4.4**, atravessam a membrana plasmática, com cinéticas de internalização diferentes, e se localizam no citoplasma não se observando internalização nuclear.

Foram também sintetizados dois compostos bimodais (**4.6** e **4.7**) resultantes da conjugação da molécula de estradiol ao sistema bimodal BODIPY-DOTA. O passo seguinte seria a sua purificação, caracterização e avaliação biológica. Contudo, por questões de tempo não foi possível purificar os compostos bimodais e prosseguir o seu estudo.

Como conclusão geral do trabalho desta tese, pode considerar-se que foi atingido com sucesso o objectivo de sintetizar pela primeira vez complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$ , estabilizados por diversas moléculas de estradiol funcionalizadas com agentes quelantes bifuncionais, contribuindo para a avaliação do seu comportamento biológico *in vitro* e *in vivo* em modelos celulares e animais. Demonstrou-se a possibilidade de preparar compostos com afinidade para

o receptor de estrogénio. No entanto as suas propriedades físico-químicas, em especial o seu carácter hidrofílico, afectaram a sua captação por células e tecidos ricos em receptores de estrogénio não tendo sido possível avaliar o potencial terapêutico destes complexos como emissores de electões Auger.

Para além disso, foi alcançado o objectivo de conjugar uma unidade intercaladora de ADN à molécula de estradiol mantendo a afinidade para o receptor de estrogénio e a capacidade de internalização celular e nuclear.

Beneficiando do facto do receptor de estrogénio ser tolerante à introdução na posição C16, quer do alaranjado de acridina, quer do agente quelante bifuncional DOTAGA, podemos perspectivar a síntese de novas sondas derivadas do estradiol, dirigidas ao RE, que integrem simultaneamente uma unidade intercaladora de ADN e um agente quelante para complexação de  $^{111}\text{In}$ . Deste modo, espera-se a obtenção de compostos específicos com propriedades físico-químicas adequadas a um perfil biológico mais favorável para terapia Auger de tumores com positividade para RE.



# ***Capítulo 6***

*Parte Experimental*



## 6. Parte Experimental

---

### 6.1. Solventes e Reagentes

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

Todos os reagentes químicos e solventes utilizados eram de qualidade pró-análise e foram usados sem qualquer purificação adicional, excepto quando indicado.

Os solventes foram pré-secos e destilados sob atmosfera de azoto de acordo com métodos descritos na literatura.<sup>264</sup> Resumidamente:

- **THF** foi submetido a pré-secagem com peneiros moleculares 4Å e destilado após refluxo na presença de sódio e benzofenona sendo imediatamente utilizado;
- **CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** e o **CH<sub>3</sub>CN** foram submetidos a pré-secagem com peneiros moleculares 4Å e 3Å, respectivamente. Em seguida, foram secos com CaH<sub>2</sub> durante 48h e destilados em atmosfera de azoto na presença de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e colocados em contacto prolongado (uma semana) com peneiros moleculares 4Å e 3Å, respectivamente;
- **MeOH** foi submetido a pré-secagem com peneiros moleculares 4Å e durante 24h com CaSO<sub>4</sub>. Seguidamente a 100 mL de MeOH pré-seco foi adicionado 1 g de Mg activado (400°C) e 100 mg de I<sub>2</sub> sublimado. Deixou-se refluxar durante várias horas e adicionou-se MeOH até perfazer 800 mL. Refluxou-se durante várias horas destilou-se e armazenou-se sob peneiros moleculares 4Å;
- **DMF** foi utilizado após pré-secagem prolongada em peneiros moleculares 4Å.

O 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacetato de *terc*-butilo (**DO<sub>3</sub>A(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>**), o ácido 2,2',2''-(10-(2,6-dioxo-tetra-hidro-2H-piran-3-il)-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) triacético (**anidrido de DOTAGA**) e o 1,4,7-triazaciclononano-4,7-diatetato de *terc*-butilo (**NO<sub>2</sub>A(<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>**) foram obtidos comercialmente à Chematech. Os restantes reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich. A diisopropilamina foi utilizada após destilação sob atmosfera de azoto na presença de NaOH conforme o procedimento descrito por Perkin<sup>59</sup> e o imidazolo foi

re-cristalizado numa mistura de acetona e éter de petróleo após aquecimento.

Os compostos **NHS-Bodipy** (composto **4.2**) e **NCS-Bodipy-DOTA** (composto **4.5**) foram gentilmente fornecidos pelo professor Franck Denat do grupo P2DA do Institut de Chimie Moléculaire de la Université de Bourgogne

As proteínas recombinantes humanas (RE $\alpha$  e RE $\beta$ ) foram obtidas na Invitrogen.

## 6.2. Técnicas de Purificação e Caracterização

### Cromatografia em Camada Fina (TLC)

A cromatografia em camada fina (TLC) foi utilizada para monitorizar as reacções de síntese química e para identificar os produtos de reacção através da utilização de placas de sílica-gel 0,25 mm da Merck, em suporte de alumínio (60 F<sub>254</sub>). Os cromatogramas resultantes foram revelados com radiação UV no comprimento de onda de 254 nm numa câmara Spectroline (Model ENF-240 C/FE) e no caso de compostos não fluorescentes por revelação com vapores de iodo ou através de solução etanólica contendo 5% de ácido sulfúrico seguido de aquecimento.

### Cromatografia em Coluna

A purificação de alguns compostos resultantes da síntese química foi realizada por cromatografia em coluna, utilizando sílica-gel 60 com granulometria 0,060 mesh (Merck). As colunas de vidro, com tamanho adequado à quantidade de amostra a purificar, foram cheias com uma mistura de sílica-gel embebidas em eluente apropriado para a purificação do composto em estudo. Após aplicação da amostra no topo da coluna, a eluição foi feita por acção da gravidade e os compostos recolhidos em fracções. As fracções recolhidas foram analisadas por TLC e as que correspondiam aos compostos pretendidos foram secas sob vácuo no evaporador rotativo (Büchi) e/ou na linha de vácuo. A pureza destas fracções foi confirmada por HPLC, RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), ESI-MS e IV.

### Cromatografia Líquida de Alta-Pressão (HPLC)

A análise por HPLC dos compostos derivados do estradiol e dos complexos de In/<sup>111</sup>In e Ga/<sup>67</sup>Ga foi realizado num sistema cromatográfico equipado com uma bomba Perkin-Elmer LC 200 acoplado a dois detectores em série: um detector de radiação  $\gamma$  (Berthold LB-507 A), e um

detector UV (LC 290) ou num sistema cromatográfico equipado com uma bomba ULTIMATE 3000 (DIONEX) e um detector UV Ultimate 3000 Diode Array. Todos os solventes utilizados foram de qualidade HPLC. A água utilizada para a preparação dos solventes aquosos foi bi-distilada em um bidestilador de quartzo. Os solventes foram filtrados por filtro Nucleopore de 0,22 µm e desarejadas com hélio ou com aparelho adequado para o efeito (*Vacum degasser* Perkin series 200).

As condições cromatográficas para HPLC analítico foram as seguintes:

Método A

**Coluna:** Analítica de fase reversa EC 250/4 Nucleosil 100-10 C18

**Fluxo:** 1 mL/min

**Detecção UV:** 254 ou 220 nm

**Eluentes:** **A-** TFA 0,1% em água; **B-** 0,1% TFA em CH<sub>3</sub>CN

**Gradiente de eluição:**

Step	Tempo (min)	%A	%B	Gradiente
0	5	85	15	
1	1,0	85	15	
2	15,0	0	100	1,0
3	7,0	0	100	
4	7,0	15	15	1,0

Método B

**Coluna:** Analítica de fase reversa EC 250/4,6 NucleoDur 100-5 C18ec

**Fluxo:** 1 mL/min

**Detecção UV:** 215 nm, 220 nm, 254 nm e 530 nm

**Eluentes:** **A:** 0,1 % TFA em CH<sub>3</sub>CN; **B:** 0,1% TFA em água

**Gradiente de eluição:**

Step	Tempo (min)	%A	%B	Gradiente
0	5	20	80	
1	1,0	20	80	
2	15,0	100	0	1,0
3	7,0	100	0	
4	2,0	20	80	1,0
5	5,0	20	80	

Método C

**Coluna:** Analítica de fase reversa EC 250/4 Nucleosil 100-10 C18

**Fluxo:** 1 mL/min

**Detecção UV:** 220 nm

**Eluentes:** **A-** Et<sub>3</sub>N/CH<sub>3</sub>COOH (2.1:2,8 (v:v)) em água; **B-** CH<sub>3</sub>CN

**Gradiente de eluição:**

Step	Tempo (min)	%A	%B	Gradiente
0	5	85	15	
1	1,0	85	15	
2	15,0	0	100	1,0
3	7,0	0	100	
4	7,0	15	15	1,0

Para a purificação dos compostos utilizaram-se os seguintes métodos:

Método D

**Coluna:** Semi-preparativa de fase reversa EC 250/8 Nucleosil 100-10 C18

**Fluxo:** 2,0 mL/min

**Detecção UV:** 220 nm

**Eluentes:** **A:** 0,1 % TFA em água; **B:** 0,1% TFA em CH<sub>3</sub>CN

**Gradiente de eluição:**

Step	Tempo (min)	%A	%B	Gradiente
0	0	85	15	
1	1,0	85	15	
2	20,0	0	100	1,0
3	7,0	0	100	
4	7,0	85	15	1,0
5	5,0	85	15	

Método E

**Coluna:** semi-preparativa de fase reversa VP 250/10 NucleoDurr 100-5 C18ec

**Fluxo:** 2,5 mL/min

**Detecção UV:** 215nm, 220 nm, 254 nm e 530 nm

**Eluentes:** **A:** 0,1 % TFA em água; **B:** 0,1% TFA em CH<sub>3</sub>CN

Gradiente de eluição:

Step	Tempo (min)	%A	%B	Gradiente
0	0,0	80	20	
1	1,0	80	20	
2	19,0	0	100	1,0
3	8,0	0	100	
4	2,0	80	20	1,0
5	5,0	80	20	

### Cromatografia em Camada Fina Instantânea (ITLC)

A eficiência de marcação, a pureza radioquímica e a estabilidade dos compostos radioactivos foi monitorizada por ITLC utilizando tiras de sílica-gel 0,25 mm, Polygram® Sil G da Macherey-Nagel ou papel Whatman Nº1. A distribuição da radioactividade no cromatograma fez-se com um detector Berthold LB 2723 equipado com um cristal de cintilação NaI(Tl).

### Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (1D e 2D- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  g-cosy),  $^{13}\text{C}$  e  $^{11}\text{B}$  foram obtidos num espectrometro Varian Unity Plus 300, operando a 299,938 MHz, 75,428 MHz e 96,294 MHz para  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{11}\text{B}$ , respectivamente. Os espectros foram obtidos a 20°C. Os desvios químicos ( $\delta$ ) são apresentados em ppm relativamente as ressonâncias residuais dos solventes  $\text{CDCl}_3$  ( $^1\text{H}$   $\delta$  7,24 ppm;  $^{13}\text{C}$   $\delta$  77,0 ppm),  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $^1\text{H}$   $\delta$  3,31 ppm;  $^{13}\text{C}$   $\delta$  49,0 ppm),  $\text{DMSO-d}_6$  ( $^1\text{H}$   $\delta$  2,50 ppm;  $^{13}\text{C}$   $\delta$  39,52 ppm) relativo ao tetrametilsilano (TMS). Os espectros de  $^{11}\text{B}$  foram calibrados usando  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  (0,0 ppm) como referência externa.

### Infra-Vermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos a partir de amostras dos compostos em estudo preparadas sob a forma de pastilhas de KBr, num espectrómetro Bruker Tensor 27 com transformada de Fourier.

### Espectrometria de Massa

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro ESI/QITMS (*electrospray single ionization/quadrupole ion trap mass spectrometry*) Bruker HCT, com ionização por electrospray pelo Doutor Joaquim Marçalo ou pela Doutora Célia Fernandes ( $\text{C}^2\text{TN}$ ) ou por

MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/ Time of Flight*) com um espectrômetro Bruker DALTONICS Ultraflex II, pela Doutora Christine Goze do ICMUB, em Dijon.

### Espectrometria UV-Vis

Os espectros de absorção foram obtidos num espectrômetro VARIAN CARY 50

### Fluorescência e Determinação do rendimento quântico

Os espectros de emissão fluorescente foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Flourológ®-3. O rendimento quântico ( $\phi_F$ ) foi calculado a partir da equação 1. Como sistema de referência utilizou-se a rodamina 6G ( $\phi_{ref} = 0,78$  em água,  $\lambda_{exc} = 488$  nm).

$$\frac{\phi_F}{\phi_{FR}} = \frac{n^2}{n_R^2} \times \frac{\int_0^\infty I_F(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F}{\int_0^\infty I_{FR}(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F} \times \frac{1 - 10^{-A_R(\lambda_E)}}{1 - 10^{-A(\lambda_E)}}$$

sendo,

$$\frac{\int_0^\infty I_F(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F}{\int_0^\infty I_{FR}(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F} = \frac{F}{F_R}$$

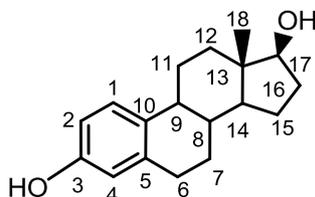
#### Equação 1

Onde,

- $\phi_F$  e  $\phi_{FR}$  são os valores do rendimento quântico do composto e do composto de referência, respectivamente.
- $n$  é o índice de refração do meio ( $n = 1,33$  água;  $n = 1,32$  MeOH).
- $I_F$  e  $I_{FR}$  são as intensidades fluorescentes do composto e da referência, respectivamente.
- $F$  e  $F_R$  corresponde à área do espectro de fluorescência do composto e da referência, respectivamente.
- $A(\lambda_E)$  e  $A_R(\lambda_E)$  é o valor de absorção no comprimento de onda de excitação do composto e da referência, respectivamente.

### 6.3. Síntese e Caracterização

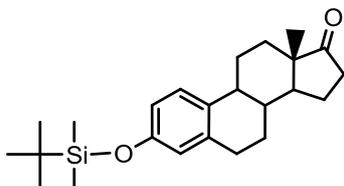
Para uma melhor identificação dos sinais atribuídos na caracterização por RMN dos compostos descritos nesta tese, apresenta-se a título de exemplo na **Figura 6.1.**, a numeração da estrutura química do estradiol.



**Figura 6.1.**- Estrutura química da molécula de estradiol e respectiva numeração

#### 6.3.1. Síntese dos derivados de estradiol funcionalizados em C16

##### 6.3.1.1. Síntese do 3-(*terc*-dimetilsililoxi)estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (2.2)



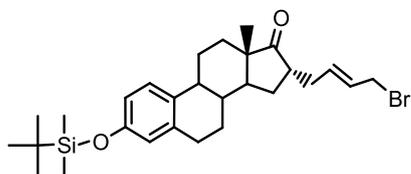
A uma solução de DMF (4 mL) contendo 800 mg de estrona (2,9 mmol) adicionou-se 656 mg de cloreto de *terc*-butildimetilsilano (TBDMSCl) (4,23 mmol) e 592 mg de imidazolo (8,7 mmol). A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente durante aproximadamente 6h, observando-se a formação de um precipitado branco. Verteu-se a mistura reaccional em cerca de 50 mL de H<sub>2</sub>O e extraiu-se com acetato de etilo (EtOAc) (3x 100mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), filtrada e o solvente removido sob vácuo, tendo-se obtido o composto pretendido sob a forma de um sólido branco.

**Rendimento:** 80% (892 mg; 2,32 mmol).

**R<sub>f</sub>** (n-hexano/EtOAc (8:1)): 0,22

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,20 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,93 (s, 2H, CH<sub>3</sub>-18), 0,99 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,44-2,80, 2,81-2,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 6,58 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, H-4), 6,64 (dd, 1H, *J* = 2,7, *J* = 8,4 Hz, H-2), 7,13 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-1)

**6.3.1.2. Síntese do 4-[3'-(*terc*-butilidimetilsililoxi)-17-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha$ -il]bromobut-2-eno (2.3)<sup>185</sup>**



O composto **2.3** foi obtido segundo o método descrito por Fevig com algumas modificações.<sup>185</sup> A uma solução de THF seco (8 mL), contendo 180  $\mu$ L de diisopilamina recentemente destilada (1,80 mmol) e

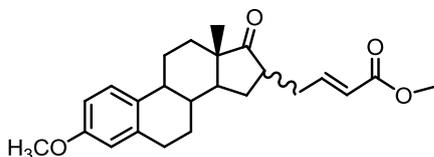
arrefecida a 0°C, adicionou-se 720  $\mu$ L de *n*-butilitio (solução 1,6M em hexano, 1,12 mmol). Após 30 min em agitação a 0°C adicionou-se **2.2** (570 mg, 1,5 mmol). A mistura reaccional ficou em agitação durante 1h a 0°C. Após este período, arrefeceu-se a mistura reaccional a -45°C (mistura de acetona/gelo seco) e adicionou-se gota-a-gota uma solução de 1,4-dibromobut-2-eno (754 mg, 3,54 mmol) dissolvido em 4 mL de THF seco durante aproximadamente 30 min. A reacção prosseguiu a temperatura inferior a -35°C durante 3h. Verteu-se a mistura reaccional em 30 mL de H<sub>2</sub>O e fez-se uma extracção com EtOAc (3x 50 mL). Secou-se a fase orgânica com MgSO<sub>4</sub>, filtrou-se e removeu-se o solvente no evaporador rotativo. O composto pretendido foi obtido após coluna cromatográfica de sílica-gel utilizando o sistema de eluição *n*-hexano/CHCl<sub>3</sub>/éter (15:2:1). **Rendimento:** 35% (269 mg; 0,52 mmol).

**Rf** (*n*-hexano/CHCl<sub>3</sub>/éter dietílico 10:2:1): 0,32

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 0,17 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,95 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,40-1,53, 1,57-1,95; 1,96-2,58; 2,81-2,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,91-3,94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 5,71-5,75 (m, 2H, CH=CH); 6,55 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, H-4), 6,60 (dd, 1H, *J* = 2,4, *J* = 8,4 Hz, H-2), 7,09 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-1)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): -4,41 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,99; 14,56 (C18); 18,42; 25,68 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 26,39; 26,58; 29,43; 31,54; 32,82; 33,15; 38,23; 43,98; 44,01; 47,55; 48,64; 117,28 (C2); 120,00 (C4); 126,09 (C1); 128,35 (CH=CH); 132,69 (C10); 133,77 (CH=CH); 137,60 (C5); 153,46 (C3); 220,99 (C=O)

### 6.3.1.3. Síntese do 4-[3'-metoxi-17'-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha/\beta$ -il]but-2-enoato de metilo (**2.5**)<sup>184</sup>



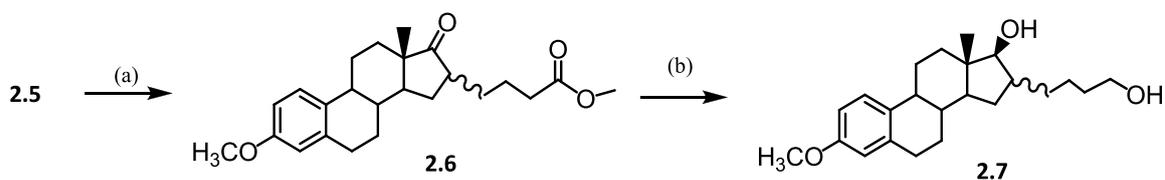
O composto **2.5** foi obtido segundo o método descrito por Tremblay.<sup>184</sup> A 15 mL de THF seco adicionou-se 0,480 mL de diisopropilamina destilada (3,4 mmol).

Colocou-se a solução a -25°C (mistura de acetona/gelo seco) e adicionou-se 2,125 mL de *n*-butilítio (solução 1,6M em hexanos; 3,4 mmol). Após 30 min em agitação, a mistura reacional foi arrefecida a -78°C (mistura de acetona/gelo seco). Adicionou-se 800 mg de 3-metoxi-estrone (**2.4**) (2,8 mmol) dissolvida em 30 mL de THF seco. Após 1h em agitação, a 0°C, a mistura reacional foi novamente colocada a -78°C e adicionou-se gota-a-gota, 0,591 mL de HMPA pré-seco (3,4 mmol) e 0,387 mL de 4-bromo metilcrotonato a 85% (2,8 mmol) diluído em 5 mL de THF seco. A mistura reacional ficou em agitação, sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub>, até atingir a temperatura ambiente (12h). A reacção foi interrompida após adição de H<sub>2</sub>O e extracção com EtOAc (3x 100mL). Efectuou-se a lavagem da fase orgânica com uma solução saturada de NaCl (1x 300 mL). Secou-se a fase orgânica com MgSO<sub>4</sub>, filtrou-se e removeu-se o solvente no evaporador rotativo. O composto pretendido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel, utilizando como eluente uma mistura de éter de petróleo e EtOAc (85:15). Obteve-se uma mistura de isómeros  $\alpha/\beta$  de **2.5** na proporção de 4:1 sob forma de um óleo amarelo. **Rendimento:** 43% (460 mg; 1,20 mmol).

**R<sub>f</sub>** (éter petróleo/EtOAc (85:15)): 0,36

**<sup>1</sup>H-RMN:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 0,91 e 0,97 (2s, 3H, CH<sub>3</sub>-18, 16 $\beta$ :16 $\alpha$ , 1:4); 1,38-1,58; 1,68-1,96; 1,97-2,38; 2,40-2,71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CH), 2,89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,72 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>); 3,76 (s, CH<sub>3</sub>OAr), 5,86 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H, CH=CH), 6,62 (d, 1H, *J* = 2,7 Hz, H-4), 6,70 (dd, 1H, *J* = 2,7, *J* = 8,7 Hz, H-2), 6,94 (m, 1H, CH=CH), 7,18 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-1)

**6.3.1.4. Síntese do 4-[3'-metoxi-17' $\beta$ -hidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha/\beta$ -il]butanol (2.7)<sup>184</sup>**



O composto **2.7** foi sintetizado com base no método descrito por Tremblay em dois passos sucessivos:

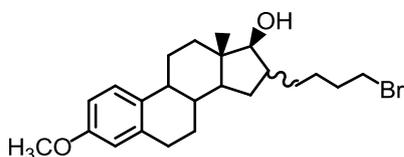
(a) Redução da dupla ligação: Uma suspensão de **2.5** (1,117 g; 2,9 mmol) contendo 160 mg de Pd/C 10% em 160 mL de MeOH foi borbulhada com H<sub>2</sub> durante 18h, à temperatura ambiente. Após este período, filtrou-se a suspensão, sob celite, e o solvente foi removido a pressão reduzida obtendo-se o composto intermediário **2.6** (não caracterizado);

(b) Redução dos grupos cetona e éster: Dissolveu-se o composto **2.6**, obtido em (a) em 40 mL de THF seco e adicionou-se lentamente 9,3 mL de LiAlH<sub>4</sub> (solução 1,0M em THF, 9,3 mmol). A mistura reaccional ficou durante 2h, em agitação a -78°C (mistura de acetona/gelo seco). De seguida colocou-se a mistura reaccional à temperatura de 0°C e deixou-se em agitação durante 1h. Interrompeu-se a reacção por adição de H<sub>2</sub>O seguido, de extração com EtOAc (3x 100 mL). Lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de NaCl e removeu-se o solvente no evaporador rotativo. O composto pretendido foi obtido após purificação por cromatografia de coluna com sílica-gel utilizando-se como eluente uma mistura de n-hexano/EtOAc (60:40).  
**Rendimento**: 42% (437 mg; 1,22 mmol).

**Rf** (n-hexano/EtOAc (60:40)): 0,13

**<sup>1</sup>H-RMN**: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 0,76 e 0,79 (2s, 3H, CH<sub>3</sub>-18, 16 $\beta$ :16 $\alpha$ , 1:3); 1,26-1,41; 1,43-1,88; 2,07-2,19; 2,81-2,85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,19 (d, 1H, *J*=9,9 Hz; H<sub>17 $\alpha$ /16 $\alpha$ ); 3,26 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, H<sub>17 $\alpha$ /16 $\beta$</sub> ); 3,64 (t, 2H, *J*=6,7 Hz, CH<sub>2</sub>OH); 3,75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>OAr), 6,61 (d, 1H, *J*= 3 Hz, H-4), 6,69 (dd, 1H, *J*= 3 Hz, *J*= 8,7 Hz, H-2); 7,18 (d, 1H, *J*= 8,7 Hz, H-1)</sub>

### 6.3.1.5. Síntese 4-[3'-metoxi-17' $\beta$ -hidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha/\beta$ -il]bromobutano (**2.8**)<sup>184</sup>

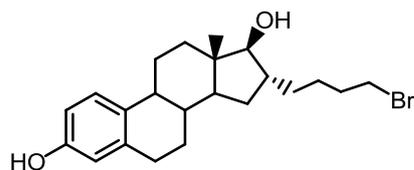


A uma solução de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (40 mL) contendo o composto **2.7** (432 mg; 1,2 mmol) adicionou-se trifenilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ) (629 mg; 2,4 mmol) e tetrabromometano (769 mg; 2,4 mmol), a  $0^\circ\text{C}$ . Após 3h em agitação, sob atmosfera inerte, removeu-se o solvente sob vácuo. O composto pretendido foi obtido após purificação por cromatografia de coluna de sílica-gel utilizando-se uma mistura de n-hexano (70->50) e EtOAc (30->50) como eluente. **Rendimento:** 53% (270 mg; 0,64 mmol).

**Rf** (n-hexano/EtOAc (80:20)): 0,23

**$^1\text{H-RMN}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,76 e 0,79 (2s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18, 16 $\beta$ :16 $\alpha$ , 1:3); 1,21-1,61; 1,83-1,92; 2,18-2,31; 2,82-2,85 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3,19 (d, 1H,  $J=9,9$  Hz;  $\text{H}_{17\alpha/16\alpha}$ ); 3,25 (d, 1H,  $J=7,5$  Hz,  $\text{H}_{17\alpha/16\beta}$ ); 3,42 (t, 2H,  $J=6,7$  Hz  $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 3,76 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{OAr}$ ), 6,64 (d, 1H,  $J=2,7$  Hz, H-4), 6,72 (dd, 1H,  $J=2,7, J=8,5$  Hz, H-2); 7,21 (d, 1H,  $J=8,7$  Hz, H-1)

### 6.3.1.6. Síntese do 4-[3',17' $\beta$ -dihidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha$ -il]bromobutano (**2.9**)<sup>184</sup>

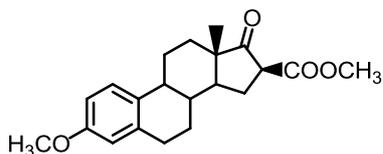


A uma solução de 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco contendo 60 mg de **2.8** (0,014 mmol) adicionou-se, gota-a-gota, uma solução de tetrabrometo de boro ( $\text{BBr}_4$ ) 1M dissolvido em 1mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco. A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente, durante 90 min. Em seguida adicionou-se  $\text{H}_2\text{O}$  e fez-se uma extracção com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x 20 mL). A fase orgânica foi seca com  $\text{MgSO}_4$  e o solvente removido no evaporador rotativo. O composto pretendido foi obtido após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando como eluente uma mistura de n-hexano/EtOAc (80:20). **Rendimento:** 77% (45 mg; 0,011 mmol).

**Rf** (n-hexano/EtOAc (80:20)): 0,13

**$^1\text{H-RMN}$ :** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,78 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 1,21-1,65; 1,83-1,82; 2,18-2,31; 2,82-2,85 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3,25 (d, 1H,  $J=7,5$  Hz, CH-17 $\alpha$ ); 3,45 (t, 2H,  $J=6,7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 6,64 (d, 1H,  $J=2,3$  Hz, H-4), 6,72 (dd, 1H,  $J=2,6, J=8,6$  Hz, H-2); 7,21 (d, 1H,  $J=8,4$  Hz, H-1)

**6.3.1.7. Síntese do 1-[3'-metoxi-17'-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16'β-il]metanoato de metilo (2.10)**<sup>184,193</sup>



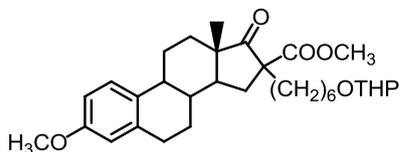
A 8 mL de THF seco adicionou-se 0,240 mL de diisopropilamina destilada (1,68 mmol). Colocou-se a solução a -25°C (gelo seco + acetona), e adicionou-se 1,100 mL de n-butilitio (solução 1,6M em hexanos; 1,68 mmol).

Após 30 min, a mistura reaccional foi colocada a -78°C (mistura de acetona/gelo seco) e adicionou-se 400 mg de 3-metoxi-estrone (1,4 mmol) dissolvida em 10 mL de THF seco. Após agitação, a 0°C sob atmosfera de azoto a durante 1h, a mistura reaccional foi colocada novamente a -78°C. Adicionou-se, gota-a-gota, 0,240 mL de HMPA (pré-seco em peneiros) (1,4 mmol) e 0,120 mL de cianoformiato de metilo (CNCOOMe) (1,4 mmol). Após 2h em agitação a -78°C, adicionou-se H<sub>2</sub>O e fez-se uma extracção com EtOAc (3x 30 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaCl e seca com MgSO<sub>4</sub>. O composto pretendido foi obtido na forma de um sólido branco amorfo após 2 purificações sucessivas em coluna de sílica-gel, utilizando como eluente uma mistura de n-hexano (90->85) e EtOAc (10->15).  
**Rendimento:** 49% (236 mg; 0,69 mmol).

**Rf** (n-hexano/EtOAc (85:15)): 0,29

**<sup>1</sup>H-RMN:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,42-1,61; 1,96-2,10; 1,28-2,87; 2,87-2,90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,19 (dd, 1H, CH-16α), 3,74 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3,76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>OAr), 6,65 (d, 1H, J= 2,7 Hz, H-4), 6,72 (dd, 1H, J= 2,7, J= 8,7 Hz, H-2), 7,21 (d, 1H, J= 8,7 Hz, H-1)

**6.3.1.8. Síntese do 6-[3'-metoxi-17'-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16'α/β-il-16'α/β-(metoxicarbonil)-]-1-[(tetrahidro-2'H-piran-2'-il)oxi]hexano (2.11)**<sup>184,193</sup>



A uma solução de hidreto de potássio (KH) (128 mg, 3,21 mmol) em 35 mL de THF seco, adicionou-se 500 mg de **2.10** (1,46 mmol) e 367 mg de 18-coroa-6 (1,39 mmol).

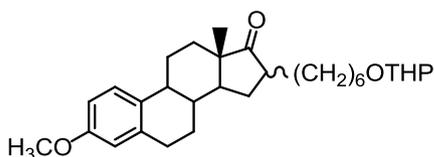
Após 1h à temperatura de refluxo, adicionou-se 640 μL de éter tetrahidropirano-6-bromo-1-hexanol (Br(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OTHP). A mistura reaccional permaneceu à temperatura de refluxo durante 1 noite. De seguida adicionou-se H<sub>2</sub>O para eliminar o KH em excesso. Após extracção com EtOAc lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de NaCl. Secou-se a fase orgânica com MgSO<sub>4</sub>, filtrou-se e removeu-se o solvente no evaporador

rotativo. O composto pretendido foi obtido sob a forma de um óleo amarelo após purificação em coluna de sílica-gel utilizando como eluente uma mistura de n-hexano (90->0) e EtOAc (10->100). **Rendimento:** 60% (463 mg; 0,88 mmol).

**Rf** (n-hexano/EtOAc (95:5)): 0,30

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,23-1,69; 1,87-1,89; 1,96-2,5; 2,83-2,97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,36, 3,48, 3,71, 3,83 (4m, 4H, OCH<sub>2</sub>- THP), 3,70 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3,76 (s, CH<sub>3</sub>OAr), 4,54 (t, 1H, CH-THP), 6,63 (d, 1H, J= 2,3 Hz, H-4), 6,69 (dd, 1H, J= 3 Hz, J= 8,7 Hz, H-2), 7,17 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-1)

### 6.3.1.9. Síntese do 6-[(3'-metoxi-17'-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16'α/β-il)-1-tetrahidro-2'H-piran-2'-il]oxi]hexano (2.12)<sup>184,193</sup>



Dissolveu-se o composto **2.11** (400 mg, 0,76 mmol) em 100mL de DMF seco e adicionou-se cloreto de lítio (644 mg, 15,2 mmol) e H<sub>2</sub>O (0, 276 mL, 15,2 mmol).

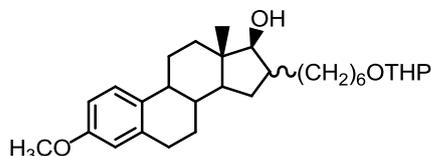
Após 2 dias em agitação, à temperatura de refluxo, colocou-se a mistura reaccional a 0°C e adicionou-se EtOAc. A fase orgânica foi extraída com uma solução de HCl 1N e lavada com uma solução saturada de NaCl. Secou-se a fase orgânica com MgSO<sub>4</sub>, filtrou-se e removeu-se o solvente no evaporador rotativo. Após cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando como eluente uma mistura de n-hexano/ EtOAc na proporção de 90:10, obteve-se uma mistura isomérica α/β (1:4) do composto pretendido na forma de um óleo amarelo. **Rendimento:** 45% (159 mg; 0,34 mmol).

**Rf** (n-hexano/EtOAc (90:10)): 0,31

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,84 e 0,91 (2s, 3H, CH<sub>3</sub>-18, 16β:16α, 4:1); 1,23-1,61; 1,68-2,5; 2,85-2,87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,21 (m, 1H, CH-16α); 3,34; 3,47; 3,69; 3,86 (4m, 4H, OCH<sub>2</sub>- THP); 3,75 (s, CH<sub>3</sub>OAr); 4,55 (t, 1H, CH-THP); 6,62 (d, 1H, J= 2,7 Hz, H-4); 6,71 (dd, 1H, J= 3Hz, J= 8,7 Hz, H-2); 7,18 (d, 1H, J= 8,7 Hz, H-1)

**ESI-MS (+):** m/z 491,4 [M+Na]<sup>+</sup> (calculado: 491,3)

**6.3.1.10. Síntese do 6-[(3'-metoxi-17' $\beta$ -hidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\alpha/\beta$ -il)]-1-[tetrahidro-2'H-piran-2'-il]oxi]hexano (2.13)<sup>184,193</sup>**

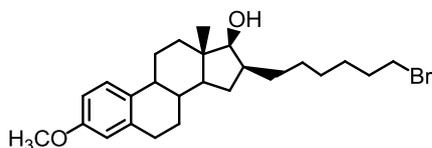


A uma solução de 40 mL de THF seco contendo o composto **2.12** (232 mg, 0,49 mmol) a  $-78^{\circ}\text{C}$  (mistura de acetona/gelo seco) adicionou-se, gota-a-gota, 2 mL de  $\text{LiAlH}_4$  (solução 1M; 2 mmol) diluído em 3 mL de THF seco. Após 1h a  $-78^{\circ}\text{C}$ , sob atmosfera inerte, adicionou-se EtOAc e  $\text{H}_2\text{O}$ , à temperatura ambiente, por forma a eliminar o  $\text{LiAlH}_4$  em excesso, seguido de extracção com EtOAc (3x 60 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e removeu-se o solvente. O composto pretendido foi obtido sob a forma de um sólido branco após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel usando como eluente uma mistura de éter de petróleo/acetona (80:20). **Rendimento:** 57% (132 mg; 0,28 mmol).

**Rf** (éter de petróleo/acetona (80/20)): 0,30

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,84 e 0,91 (2s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18,  $16\beta:16\alpha$ , 4:1); 1,23-1,58; 1,66-2,29; 2,82-2,84 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3,34; 3,47; 3,69; 3,86 (4m, 4H,  $\text{OCH}_2$ -THP); 3,76 (s,  $\text{CH}_3\text{OAr}$ ); 4,55 (t, 1H, CH-THP); 6,61 (d, 1H,  $J = 2,7$  Hz, H-4); 6,69 (dd, 1H,  $J = 2,7$ Hz,  $J = 8,4$  Hz, H-2); 7,18 (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz, H-1)

**6.3.1.11. Síntese do 6-[(3'-metoxi-17' $\beta$ -hidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\beta$ -il]bromohexano (2.14)<sup>184</sup>**



A síntese do composto **2.14** ocorreu em dois passos sequenciais baseado no método descrito por Tremblay.<sup>184</sup>

(a) Dissolveu-se o composto **2.13** (134 mg; 0,28 mmol) em 10 mL de uma solução metanólica de HCl (2%) e manteve-se a solução em agitação, à temperatura ambiente, durante 5h. Adicionou-se  $\text{H}_2\text{O}$  e fez-se uma extracção com  $\text{CHCl}_3$  (3x 50 mL). Após lavagem da fase orgânica com uma solução saturada de NaCl e secou-se com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Removeu-se o solvente no evaporador rotativo. Não foi feita qualquer purificação do crude obtido.

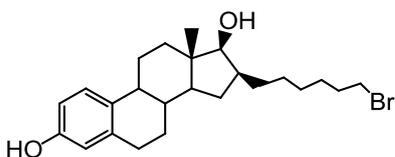
**Rf** (éter petróleo/acetona (70:30)): 0,38

(b) O crude obtido em (a) foi re-dissolvido em 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco ao qual se adicionou  $\text{PPh}_3$  (173 mg; 0,66 mmol). Colocou-se a mistura reaccional a  $0^\circ\text{C}$  e adicionou-se, gota-a-gota,  $\text{CBr}_4$  (219 mg; 0,66 mL) em 4 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco. Após 2h em agitação a  $0^\circ\text{C}$ , sob atmosfera inerte, removeu-se o solvente sob vazio. O composto pretendido foi obtido, após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando como eluente uma mistura de éter de petróleo/acetona, na proporção de 80:20, sob a forma de um sólido ligeiramente amarelado. **Rendimento:** 24% (31 mg; 0,07 mmol).

**Rf** (éter petróleo/acetona (70:30)): 0,68

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,74 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18,); 0,83-0,94; 0,98-1,59; 1,80-2,30; 2,81-2,86 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3,39 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 3,76 (s,  $\text{CH}_3\text{OAr}$ ), 6,61 (d, 1H,  $J=3$  Hz, H-4), 6,70 (dd, 1H,  $J=2,7$ ,  $J=8,7$  Hz, H-2), 7,18 (d, 1H,  $J=8,4$  Hz, H-1)

### 6.3.1.12. Síntese do 6-[(3',17' $\beta$ -dihidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16' $\beta$ -il]bromohexano (2.15)<sup>184</sup>

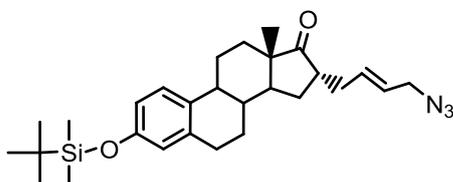


A uma solução de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (15 mL) contendo o composto **2.14** (104 mg; 0,23 mmol) a  $0^\circ\text{C}$ , adicionou-se lentamente uma solução de  $\text{BBr}_3$  1M (0,1 mmol) diluído em 2 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco. Após 3h em agitação à temperatura ambiente, adicionou-se  $\text{H}_2\text{O}$  e fez-se uma extracção com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x 50 mL). A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e o solvente removido no evaporador rotativo. O composto pretendido foi obtido sob a forma de um sólido branco após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando como eluente uma mistura de n-hexano (85->60) e EtOAc (15->40). **Rendimento:** 44% (44 mg; 0,10 mmol).

**Rf** (n-hexano/EtOAc (70:30)): 0,30

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,70 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 0,81-1,06; 1,17-1,59; 1,76-2,30; 2,73-2,76 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3,34 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 3,67 (d, 1H,  $J=9,9$  Hz, CH-17 $\alpha$ ); 6,49 (d, 1H,  $J=2,7$  Hz, H-4); 6,55 (dd, 1H,  $J=2,7$ ,  $J=8,4$  Hz, H-2); 7,08 (d, 1H,  $J=8,4$  Hz, H-1)

**6.3.1.13. Síntese do 4-[3'-(*tert*-butildimetilsililoxi)-17'-oxoestra-1',3',5'(10')trien-16' $\alpha$ -il]azidobut-2-eno (2.16)<sup>185</sup>**

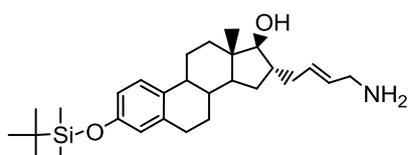


Dissolveu-se o composto **2.3** (174 mg, 0,38 mmol) numa mistura de DMSO:THF:H<sub>2</sub>O (15mL: 6mL: 3mL). Adicionou-se 221 mg de azida de sódio (3,4 mmol) e a mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente durante 20h. Verteu-se a mistura reaccional em 240 mL de H<sub>2</sub>O e extraiu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 200mL). A fase orgânica foi depois extraída com uma solução saturada de NaCl, seca com MgSO<sub>4</sub> e o solvente foi posteriormente removido sob vácuo no evaporador rotativo. O produto obtido foi re-dissolvido em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e filtrado numa coluna de pequenas dimensões de sílica-gel utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente. Após remoção do solvente obteve-se **2.16** sob a forma de um sólido branco acastanhado. **Rendimento:** 84% (156 mg; 0,32 mmol).

Verteu-se a mistura reaccional em 240 mL de H<sub>2</sub>O e extraiu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 200mL). A fase orgânica foi depois extraída com uma solução saturada de NaCl, seca com MgSO<sub>4</sub> e o solvente foi posteriormente removido sob vácuo no evaporador rotativo. O produto obtido foi re-dissolvido em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e filtrado numa coluna de pequenas dimensões de sílica-gel utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente. Após remoção do solvente obteve-se **2.16** sob a forma de um sólido branco acastanhado. **Rendimento:** 84% (156 mg; 0,32 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 0,17 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,96 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,38-1,53; 1,77-1,81; 1,84-1,96; 1,96-2,5; 2,80-2,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,70 (d, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, *J* = 6,0 Hz); 5,55-5,70 (m, 2H, CH=CH); 6,55 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, H-4), 6,60 (dd, 1H, *J* = 2,4, *J* = 8,4 Hz, H-2), 7,08 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-1)

**6.3.1.14. Síntese do 4-[3'-(*tert*-butildimetilsililoxi)-17' $\beta$ -hidroxiestra-1',3',5'(10')trien-16' $\alpha$ -il]but-2-enilamina (2.17)<sup>185</sup>**



Dissolveu-se o composto **2.16** (82 mg, 0,17 mmol) em 4,5 mL de THF seco. Colocou-se a solução a -80°C (mistura de acetona/gelo seco) e adicionou-se hidreto de alumínio lítio sólido (LiAlH<sub>4</sub>) (19 mg, 0,51 mmol). A mistura reaccional ficou em agitação a -80°C sob atmosfera inerte, durante 30 min, para promover a redução do grupo cetona a hidróxilo. Colocou-se a mistura reaccional a -10°C (mistura de gelo/NaCl) deixando-a em agitação por mais 3h a -10°C de modo a ocorrer a redução do grupo azida a amina. Após este período, adicionou-se H<sub>2</sub>O, gota-a-gota, para eliminar o LiAlH<sub>4</sub> em excesso. Adicionou-se a mistura reaccional a uma solução saturada de NaCl e extraiu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 30 ml). Secou-se a fase orgânica com MgSO<sub>4</sub>, filtrou-se e removeu-se o solvente. Obteve-se o composto pretendido sob a forma de um sólido acastanhado cristalino. **Rendimento:** 80% (63 mg; 0,14 mmol).

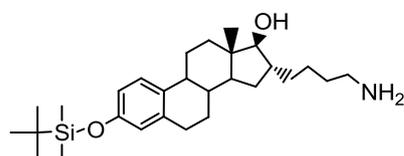
deixando-a em agitação por mais 3h a -10°C de modo a ocorrer a redução do grupo azida a amina. Após este período, adicionou-se H<sub>2</sub>O, gota-a-gota, para eliminar o LiAlH<sub>4</sub> em excesso. Adicionou-se a mistura reaccional a uma solução saturada de NaCl e extraiu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 30 ml). Secou-se a fase orgânica com MgSO<sub>4</sub>, filtrou-se e removeu-se o solvente. Obteve-se o composto pretendido sob a forma de um sólido acastanhado cristalino. **Rendimento:** 80% (63 mg; 0,14 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,17 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,96 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,81-2,28; 2,76-2,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,27 (d, 1H, *J*=7,5Hz, CH-17α); 3,30-3,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 5,27-5,61 (m, 2H, CH=CH); 6,55 (d, 1H, *J*= 2,4 Hz, H-4), 6,60 (dd, 1H, *J*= 2,4, *J*= 8,4 Hz, H-2), 7,09 (d, 1H, *J*= 8,4 Hz, H-1)

ESI-MS (+): *m/z* 456,2 [M+H]<sup>+</sup> (calculado: 456,3)

HPLC (Método B): 18,12 min

### 6.3.1.15. Síntese do 4-[3'-(*terc*-butildimetilsililoxi)-17'β-hidroxiestra-1',3',5'(10')trien-16'α-il]butilamina (2.18)



Dissolveu-se o composto **2.17** (356 mg, 0,78 mmol) em 65 mL de MeOH e adicionou-se 65 mg de Pd/C 10%. Borbulhou-se a solução durante 10h com H<sub>2</sub>. Após esse período a solução ficou em agitação durante uma noite

em atmosfera saturada em H<sub>2</sub>. Filtrou-se sob celite e evaporou-se o solvente. O composto pretendido foi obtido sob a forma de um sólido amarelado cristalino. **Rendimento:** 87% (311 mg; 0,68 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,16 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,95 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,25-1,91 ; 2,15-2,27; 2,69; 2,76-2,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,20 (1H, CH-17α, *J*= 7,5 Hz); 3,30-3,75 (br, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 6,53 (d, 1H, *J*= 8,7 Hz, H-4), 6,58 (dd, 1H, *J*= 2,4, *J*= 8,4 Hz, H-2), 7,09 (d, 1H, *J*= 8,4 Hz, H-1)

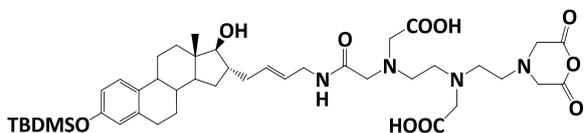
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): -4,41 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 11,97 (C18); 18,15; 25,69 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 26,14; 27,64; 29,60; 30,18; 33,59; 34,95; 35,63; 38,53; 42,00; 43,65; 44,15; 48,38; 77,21; 86,04 (C17-OH); 117,11 (C2); 119,91 (C4); 126,06 (C1); 133,06 (C10); 137,81 (C5); 153,26 (C3)

ESI-MS (+): *m/z* 458, 4 [M+H]<sup>+</sup> (calculado: 458,8)

HPLC (Método B): 17,78 min

## 6.3.2. Síntese e caracterização dos conjugados de estradiol

### 6.3.2.1. Síntese conjugado TBDMS-E2-DTPA anidro (2.19)



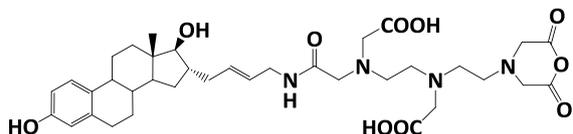
A uma suspensão de di-anidrido de DTPA, em 2 mL de DMF seco (267 mg; 0,75 mmol) e Et<sub>3</sub>N (100 µL, 0,75 mmol) adicionou-se

gota-a-gota a o composto **2.17** (63 mg; 0,11 mmol) em 1 mL de DMF seco. A mistura reaccional ficou sob agitação em atmosfera inerte durante 24 h. Após este período, o solvente foi removido sob vácuo e o crude obtido lavado várias vezes com água (5x 10 mL). O composto pretendido foi obtido sob a forma de um sólido branco acastanhado.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 0,19 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,97 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,23-1,38; 1,72-2,30; 2,77-3,90; 5,48 (m, 2H, CH=CH); 6,53-6,63 (m, 2H); 7,76 (m, 1H); 8,26 (m, 1H)

ESI-MS (+) (m/z): 813,7 [M + H]<sup>+</sup> (calculado: 813,4)

### 6.3.2.2. Síntese do conjugado E2-DTPA anidro (2.20)



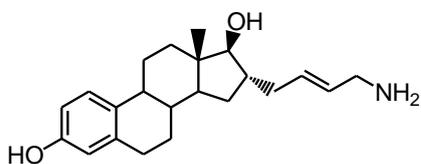
A uma suspensão de **2.19** (60 mg; 0,073 mmol) em 5mL de CH<sub>3</sub>CN adicionou-se o ácido *p*-toluenosulfónico (*p*-TSA) (29 mg; 0,15

mmol). A mistura reaccional ficou em agitação, à temperatura de refluxo, durante 24h. Verificou-se a formação de um precipitado amarelo. O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação e seco sob vácuo. O composto **2.20** foi obtido após purificação por HPLC (Método D) sob forma de um pó branco. **Rendimento:** 24% (12 mg; 0,018 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 0,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,23-1,38; 1,72-2,30; 2,77-3,90; 5,48 (m, 2H, CH=CH); 6,53-6,63 (m, 2H); 7,76 (m, 1H); 8,26 (m, 1H)

ESI-MS (+) (m/z): 669,7 [M + H]<sup>+</sup> (calculado 669,4)

### 6.3.2.3. Síntese do 4-[3',17'β-dihidroiestra-1',3',5'(10')trien-16'α-il]but-2-enilamina (2.21)

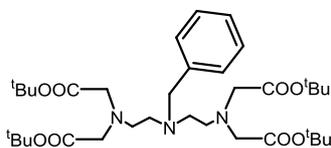


Em 4 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dissolveu-se o composto **2.17** (50 mg; 0,11 mmol). Adicionou-se 1 mL de TFA e a mistura reaccional ficou em agitação, à temperatura ambiente, durante 6h. Removeu-se o solvente sob vazio. Após purificação do crude obtido por HPLC (Método E), obteve-se a amina pretendida (**2.21**) pura. **Rendimento:** 7% (3 mg; 0,008 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,25-1,47; 1,86-1,93; 2,11-2,44; 2,75-2,77 (m, 2H), 3,52 (d, 1H, H-17α; *J*=6,9 Hz), 5,55-5,65 (m, 1H, CH); 5,93-6,03 (m, 1H, CH); 6,48 (d, 1H, *J*=2,7 Hz, H-4); 6,54 (dd; 1H; *J*= 2,4 Hz; *J*=8,1 Hz, H-2); 7,06 (d, 1H, *J*= 8,4 Hz, H-4)

HPLC (método B): 8,88 min

### 6.3.2.4. Síntese de dietilenotriamino-*N*-benzil-*N'*,*N''*,*N''*-tetraacetato de *terc*-butilo (2.23)



A uma solução de di-*terc*-butil-2-dibromoetiliminodiacetato (384 mg; 1,1 mmol) em 10 mL de CH<sub>3</sub>CN seco adicionou-se benzilamida (0,056 mL; 0,52 mmol) e *N,N*-diisopropiletilamida (DIPEIA) (0,225 mL; 1,29 mmol). A mistura reaccional ficou, em agitação, durante 12h a 50 °C e depois concentrada sob vazio. O composto pretendido foi obtido sob a forma de um óleo amarelo após purificação por coluna de sílica-gel utilizando como eluente uma mistura de *n*-hexano(3->0) e EtOAc (2->1). **Rendimento:** 45% (325 mg; 0,50 mmol).

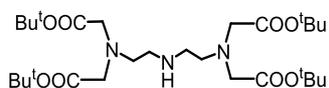
R<sub>f</sub> (*n*-hexano/ EtOAc (70:30)): 0,32

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,38 (s, 36H, <sup>t</sup>Bu); 2,57 (t, 4H, *J*= 7,1 Hz, CH<sub>2</sub>N); 2,79 (t, 4H, *J*= 7,1 Hz, CH<sub>2</sub>N); 3,36 (s, 8H, CH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu); 3,57 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ar); 7,19-7,27 (m, 5H, Ar)

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 28,1 (CH<sub>3</sub>); 51,9 (CH<sub>2</sub>); 52,7 (CH<sub>2</sub>); 56,1 (CH<sub>2</sub>); 59,0 (CH<sub>2</sub>Ar); 80,74 (C-<sup>t</sup>Bu); 126,8; 128,1; 128,8 (CH (Ar)); 139,5 (C-Ar); 170,7 (C=O)

ESI-MS (+) (*m/z*): 650,4 [M + H]<sup>+</sup> (calculado: 650,4)

### 6.3.2.5. Síntese de dietilenotriamino-*N,N,N',N'*-tetraacetato de *terc*-butilo (2.24)

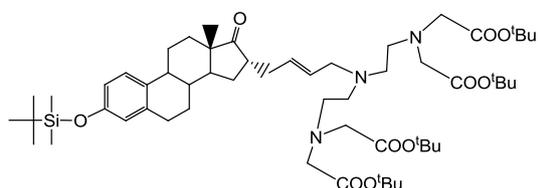


Uma solução de **2.23** e Pd/C 10% (45 mg) em MeOH (45 mL) foi borbulhada com H<sub>2</sub>, durante 24h. Filtrou-se a mistura reaccional sob celite e removeu-se o solvente no evaporador rotativo. O composto **2.24** foi obtido sob a forma de um óleo ligeiramente amarelado. **Rendimento:** 91% (178 mg; 0,32 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,44 (s, 36H, <sup>t</sup>Bu); 2,80-2,96 (m, 8H, CH<sub>2</sub>N); 3,44 (s, 8H, CH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu)

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 27,9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 46,8 (CH<sub>2</sub>); 52,9 (CH<sub>2</sub>); 56,3 (NCH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu); 80,9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 170,8 (C=O)

### 6.3.2.6. Síntese de *N*-{4-[3'-(*terc*-butildimetilsililoxi)-17'-oxoestra-1',3',5'(10')-trien-16'α-il]but-2-enil}-dietilenotriamina-*N',N',N'',N''*-tetraacetato de *terc*-butilo (2.25)



A 120 mg do composto **2.24** (0,21 mmol) dissolvido em 5 mL de CH<sub>3</sub>CN seco adicionou-se *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEIA) (0,058 mL; 0,44 mmol). Colocou-se a solução a 0°C e adicionou-se, gota-a-gota, o composto **2.3** (57 mg; 0,11 mmol) dissolvido em 2 mL de CH<sub>3</sub>CN seco. A mistura reaccional ficou em agitação, à temperatura ambiente, durante 6h. Após concentração da mistura reaccional a pressão reduzida, obteve-se **2.25** sob forma de um óleo amarelo após purificação em coluna de sílica-gel utilizando EtOAc como eluente. **Rendimento:** 89% (189 mg; 0,19 mmol).

Rf (CHCl<sub>3</sub>/MeOH (90:10)): 0,60

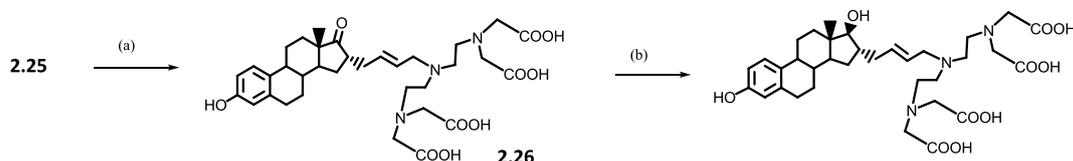
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,16 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,92, (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,95 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,42 (s, 36H, <sup>t</sup>Bu); 1,49-2,56; 2,80-2,82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,03 (t, 4H, *J*=10,8 Hz, CH<sub>2</sub>N); 3,21 (t, 4H, *J*= 10,2 Hz, CH<sub>2</sub>N); 3,42 (s, 8H, CH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu); 5,73-5,78 (m, 1H, CH=CH); 6,18-6,23 (m, 1H, CH=CH); 6,54 (d, 1H, *J*= 2,1 Hz, H-4); 6,59 (dd, 1H, *J*= 2,4 Hz, *J*= 10,8, H-2); 7,07 (d, 1H, *J*= 7,1 Hz, H-1)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): -4,41 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 14,5 (C18); 18,1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 25,7; 26,5; 27,6 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 28,1 (CH<sub>3</sub>); 29,4; 38,2; 43,6; 44,0; 48,0; 48,7; 48,8; 51,4; 55,9 (NCH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu); 56,3, 61,8; 77,2; 81,7 (C<sup>t</sup>Bu); 117,3 (C2); 118,4 (CH=CH); 120,0 (C4); 126,1 (C1); 132,4 (C10); 137,6 (C5); 14,4 (CH=CH); 153,5 (C3), 170,4 (COO<sup>t</sup>Bu); 220,7 (C=O)

**ESI-MS (+)** (m/z): 996,7 [M + H]<sup>+</sup> (calculado: 696,6)

**HPLC (metodo A):** 22,8 min

### 6.3.2.7. Síntese do ácido-*N*-{4- [3',17'β-dihidroxiestra-1',3',5'(10')-trien-16'α-il]but-2-enil}-dietilenotriamina-*N',N'',N''',N''''*-tetraacético (**L1**)



**(a)** Adicionou-se TFA (0,300 mL) e *i*-Pr<sub>3</sub>SiH (0,004 mL) a uma solução do composto **2.25** (75 mg; 0,076 mmol) em 0,200 mL de CHCl<sub>3</sub>, a 0°C. A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente, durante 12h, tendo-se obtido o composto intermédio **2.26**, que não foi isolado nem caracterizado.

**(b)** Após este período concentrou-se a solução sob vazio, re-dissolveu-se o crude em EtOH (2 mL) e adicionou-se NaBH<sub>4</sub> (22 mg; 0,59 mmol). A suspensão ficou em agitação, a 4°C, durante 48h. Fez-se o “quenche” da reacção adicionando-se acetona para eliminar o NaBH<sub>4</sub> em excesso. Concentrou-se a mistura reaccional sob vazio e redissolveu-se o crude numa mistura de H<sub>2</sub>O/MeOH (1:3). Fez-se uma purificação por Sep-Pak C<sub>18</sub> (2g) utilizando como eluente uma mistura de H<sub>2</sub>O(100->0%) e MeOH (0->100%). Obteve-se **L1** sob forma de um pó branco após liofilização das frações correspondentes ao composto pretendido. **Rendimento:** 44% (22 mg; 0,033 mmol).

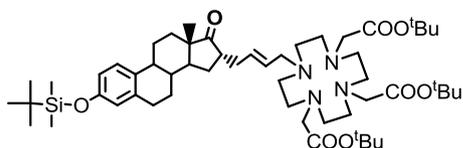
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,80 (CH<sub>3</sub>-18); 1,26-2,13, 2,76 (m, 8H, CH<sub>2</sub>N); 3,19; (s, 8H, CH<sub>2</sub>COOH); 3,25 (d, 1H, *J*= 6,0 Hz, CH<sub>α</sub>-17); 5,1-5,82 (m, 2H, CH=CH); 6,46 (d, 1H, *J*= 2,1 Hz, H-4); 6,52 (dd, 1H, *J*= 2,4 Hz, *J*= 10,8 Hz, H-2); 7,06 (d, 1H, *J*= 8,4 Hz, H-1)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 11,4 (C18); 26,3; 27,4; 29,0; 29,5; 37,0; 37,4; 39,2; 42,7; 44,0; 44,3; 52,4; 53,8; 61,3 (NCH<sub>2</sub>COOH); 87,6 (C17-OH); 113,7 (C2); 116,1 (C4); 125,6 (CH=CH); 127,2 (C1); 132,6 (C10); 136,0 (CH=CH); 138,8 (C5); 155,9 (C3); 179,6 (COOH)

**ESI-MS (-)** (m/z): 658,6 [M-H]<sup>-</sup> (calculado: 658,4)

IV ( $\text{cm}^{-1}$ , pastilha KBr): 1591 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ), 2863, 2925 (b,  $\nu_{\text{COOH}}$ ) 3,405 (b,  $\nu_{\text{OH}}$ )

**6.3.2.8. Síntese do 1-[4'-(3''-terc-dimetilsililo)-17''-oxoestra-1'',3'',5''(10'')trien-16'' $\alpha$ -il]but-2'-enil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacetato de terc-butilo (2.27)**



Adicionou-se 57 mg do composto **2.3** (0,11 mmol) e 50 mg de  $\text{DO}_3\text{A}(\text{tBu})_3$  (0,1 mmol). Em 15 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  seco. Após a completa dissolução dos compostos, adicionou-se carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) (61 mg;

0,44 mmol). A mistura reaccional ficou em agitação, sob atmosfera inerte de azoto, a  $65^\circ\text{C}$ , durante 24h. Filtrou-se a mistura reaccional, para remover-se o  $\text{K}_2\text{CO}_3$  em excesso e removeu-se o solvente sob vazio. O composto pretendido foi obtido após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando como eluente uma mistura de clorofórmio (98->90%) e metanol (2->10%). **Rendimento:** 82% (85 mg; 0,09 mmol).

**Rf** ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (90:10)): 0,33

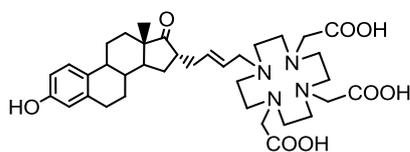
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,16 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ); 0,92 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 0,94 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 1,40-1,45 (m, 27H,  $\text{COO}(\text{CH}_3)_3$ ); 1,74-2,00, 2,17-2,49; 2,76-3,08, 3,27 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 5,46-5,62 (m, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ); 6,53 (d, 1H,  $J=2,4$  Hz, H-4); 6,60 (dd; 1H;  $J=2,4$  Hz;  $J=8,4$  Hz, H-2); 7,08 (d, 1H,  $J=8,4$  Hz, H-1);

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): -4,45 ( $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ); 14,53 (C18); 18,41; 25,63 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 26,50; 26,74; 27,77-28,13 ( $-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$ ); 29,33; 29,63; 31,63; 33,77; 38,08; 44,07; 44,22; 48,09; 48,66; 49,69; 50,01-53,95, 55,71-56,24; 82,21-82,57 ( $-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$ ); 117,35 (C2); 119,97 (C4); 126,05 (C1); 127,53 ( $\text{CH}=\text{CH}$ ); 132,13 (C10); 133,86 ( $\text{CH}=\text{CH}$ ); 137,38 (C5); 153,50 (C3); 172,64; 173,72 ( $\text{COO}^t\text{Bu}$ ); 220,83 (C=O)

**ESI-MS (+) (m/z):** 951,7  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; 973,8  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calculado: 951,6; 973,6)

**HPLC (método A):** 17,03 min

**6.3.2.9. Síntese do ácido 1-[4'-(3''-hidroxi-17''-oxoestra-1'',3'',5''(10'')trien-16'' $\alpha$ -il]but-2'-enil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacético (2.28)**



Dissolveu-se o composto **2.27** (61 mg; 0,06mmol) em 0,700 mL de TFA. A mistura reaccional ficou em agitação, à temperatura ambiente, durante 1 noite. Após este

período removeu-se o TFA sob vázio. O crude foi lavado várias vezes com EtOH (10x 5 mL) para remover o TFA remanescente e o solvente foi removido sob vázio. O composto pretendido foi obtido após purificação por Sep-Pak C<sub>18</sub> (2g) utilizando como eluente uma mistura de H<sub>2</sub>O (100->0%) e MeOH (0->100%). Após liofilização das fracções correspondentes obteve-se **2.28** sob a forma de um pó branco amarelado. **Rendimento:** 47% (22 mg; 0,033 mmol).

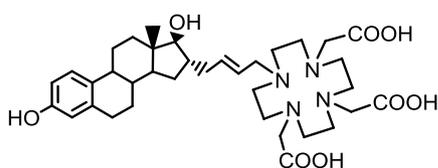
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,25-1,52; 1,77-1,99; 2,19-2,45; 2,65-2,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2,99-3,93; 4,21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N); 5,72-5,79 (m, 1H, CH=CH); 6,14-6,22 (m, 1H, CH=CH); 6,48 (d, 1H, J=2,4 Hz, H-4); 6,54 (dd; 1H; J= 2,4 Hz; J=8,4 Hz, H-2); 7,07 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-1);

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 15,06 (C18); 18,18; 26,80; 27,45; 28,06; 30,12; 30,34; 32,59; 34,81; 39,56; 40,15; 45,03; 45,32; 50-17-50,77; 56,60-57,05; 113,79 (C2); 116,09 (C4); 122,37 (CH=CH); 127,31 (C1); 132,33 (C10); 138,94 (C5); 141,27 (CH=CH); 155,31 (C3); 171,76 (COOH); 174,31 (COOH); 225,83 (C=O)

ESI-MS (+) (m/z): 669,4 [M+H]<sup>+</sup> (calculado: 669,4)

HPLC (método A): 10,07 min

### 6.3.2.10. Síntese do ácido 1-[4'-(3'',17β''-dihidroiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il)but-2'-enil]- 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacético (L2)



Dissolveu-se o composto **2.28** (0,044 g; 0,067 mmol) em 5 mL de EtOH. Colocou-se a solução a 4°C (mistura de gelo/NaCl) e adicionou-se NaBH<sub>4</sub> (0,020g; 0,526 mmol). A solução ficou em agitação a 4°C, durante

aproximadamente 48h. Parou-se a reacção adicionando acetona à mistura reaccional de modo a eliminar o NaBH<sub>4</sub> em excesso. Removeu-se o solvente sob vázio. O crude obtido foi purificado por Sep-Pak C<sub>18</sub> (2g) utilizando como eluente uma mistura de H<sub>2</sub>O (100->0%) e MeOH (0->100%). Após liofilização das fracções correspondentes obteve-se o composto pretendido sob a forma de um pó branco. **Rendimento:** 82% (36 mg; 0,054 mmol) .

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,27-1,39; 1,62-1,71 (m, 1H, CH-16β); 1,84-1,99; 2,27-2,41; 2,75-2,76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2,98-3,21; 3,28 (d, 1H, J=7,6 Hz, H-17α); 3,36-3,43, 3,55-3,73; 3,79-3,92, 4,23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-22); 5,76 e 6,20 (2m, 2H, CH=CH); 6,47 (d, 1H, J=2,4 Hz, H-4); 6,52 (dd; 1H; J= 2,4 Hz; J=8,4 Hz, H-2); 7,05 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-1);

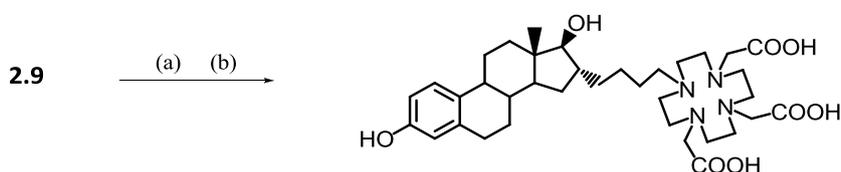
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 12,65 (C18); 27,51; 28,64; 30,33; 30,74; 38,20; 38,76; 40,31; 43,97; 45,26; 45,48; 49,69; 50,87-51,02 ; 52,33; 57,36; 60,36 (CH<sub>2</sub>COOH); 87,74 (C17-OH); 113,74 (C2); 116,07 (C4); 127,18 (C1); 129,18 (CH=CH); 132,54 (C10); 134,95 (CH=CH); 138,79 (C5); 155,94 (C3); 179,66 (COOH); 179,84 (COOH); 179,92 (COOH)

ESI-MS (+) (m/z): 671,4 [M+H]<sup>+</sup> (calculado: 671,3)

IV (cm<sup>-1</sup>, pastilha KBr): 1584,75 (s, ν<sub>C=O</sub>), 2816,77-2927,17 (b, ν<sub>COOH</sub>) 3,420 (b, ν<sub>OH</sub>)

HPLC (método A): 9,67 min

### 6.3.2.11. Síntese do ácido 1-[4'-(3'',17β''-dihidroiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il)butil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacético (L3)



O composto **L3** foi obtido após duas reacções sequenciais.

(a) Colocou-se o DO<sub>3</sub>A(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> (0,043 g; 0,09 mmol) e o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,057 mg; 0,41 mmol) em 5 mL de CH<sub>3</sub>CN seco. Adicionou-se gota-a-gota o composto **2.9** (40 mg; 0,09 mmol) dissolvido em 5 mL de CH<sub>3</sub>CN seco. A mistura reaccional ficou em agitação a 65°C durante uma noite. Após este período, a mistura reaccional foi filtrada para remover o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em excesso, adicionou-se H<sub>2</sub>O e fez-se uma extracção com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 30 mL). Secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e removeu-se o solvente.

(b) Ao crude obtido (77 mg) adicionou-se a TFA concentrado (0,400 mL). Após uma noite em agitação à temperatura ambiente, o TFA remanescente foi removido sob vácuo e o crude lavado várias vezes com MeOH (5 x 10 mL). **L3** foi obtido após purificação por HPLC (método D) e liofilização das fracções correspondentes, sob a forma de um sólido branco amarelado.

**Rendimento:** 9% (5 mg; 0,008 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,18-1,52; 1,58-1,67; 1,72-1,89; 2,31-2,22; 2,70-2,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2,80-3,24; 3,41-3,48 (m, 4H, CH<sub>2</sub>COOH); 3,53-3,54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 3,61-3,68; 4,19 (br, 2H, CH<sub>2</sub>-DOTA); 6,46 (d, 1H, J=2,4 Hz, H-4); 6,52 (dd; 1H; J= 2,4 Hz; J=8,3 Hz, H-2); 7,06 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-1);

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 12,63 (C18); 19,29; 24,41; 26,48; 27,50; 28,44; 28,57; 30,72; 31,10; 36,34; 38,12; 40,31; 43,71; 45,36; 45,45; 51,28; 52,85; 53,95 (CH<sub>2</sub>-DOTA); 56,02; 57,36;

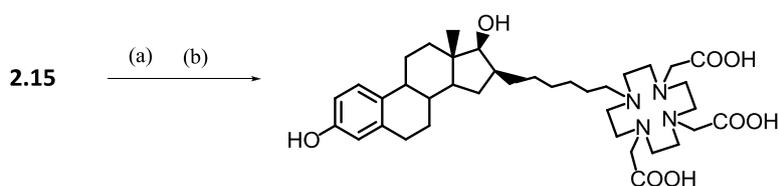
88,86 (C17-OH), 113,74 (C2); 116,04 (C4); 127,20 (C1); 132,53 (C10); 138,76 (C5); 155,94 (C3); 169,74 (COOH); 174,78 (COOH)

ESI-MS (+) (m/z): 673,6 [M+H]<sup>+</sup> (calculado: 673, 8)

IV (cm<sup>-1</sup>, pastilha KBr): 1685 (s, ν<sub>C=O</sub>), 3450 (b, ν<sub>OH</sub>)

HPLC (método A): 10,21 min

### 6.3.2.12. Síntese do ácido 1-[4'-(3'',17β''-dihidroiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il)hexil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-triacético (L4)



O composto **L4** foi obtido após duas reacções sequenciais.

(a) A 5 mL de CH<sub>3</sub>CN seco adicionou-se DO<sub>3</sub>A(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> (0,043 g; 0,09mmol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,057 g; 0,41 mmol). Colocou-se mistura a 0°C e adicionou-se, gota-a-gota, o composto **2.15** (0,040 g; 0,09 mmol) dissolvido em 5 mL de CH<sub>3</sub>CN seco. A mistura reaccional ficou em agitação a 65°C, durante uma noite. Após este período, filtrou-se a mistura reaccional para remover o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em excesso, adicionou-se água e extraiu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 30 mL). Secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e removeu-se o solvente a pressão reduzida.

(b) Ao crude obtido (77 mg) adicionou-se TFA concentrado (0,400 mL). Após uma noite em agitação à temperatura ambiente, o TFA remanescente foi removido sob vácuo e o crude lavado várias vezes com MeOH (5x 10 ml). O crude obtido foi purificado por Sep-Pak C<sub>18</sub> (2g) utilizando como eluente uma mistura de H<sub>2</sub>O (100->0%) e MeOH (0->100%). O composto pretendido foi obtido, após liofilização das fracções correspondentes, sob a forma de um pó branco. **Rendimento:** 33% (18 mg; 0,030 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,22-1,52; 1,78-1,87; 2,08-2,44; 2,70-2,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2,88-3,15; 3,17-3,34; 3,37-3,41 (m, 4H, CH<sub>2</sub>COOH); 3,49-3,57, (m, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 3,58-3,67; 4,18 (br, 2H, CH<sub>2</sub>-DOTA); 6,47 (d, 1H, J=2,4 Hz, H-4); 6,53 (dd; 1H; J= 2,4 Hz; J=8,4 Hz, H-2); 7,06 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-1);

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 13,66 (C18); 18,43; 24,70; 27,35; 27,75; 28,64; 29,18; 30,37; 30,66; 32,57; 33,19; 38,68; 39,68; 39,81; 45,06; 45,29; 51,11; 53,42 (CH<sub>2</sub>-DOTA); 55,87; 56,15;

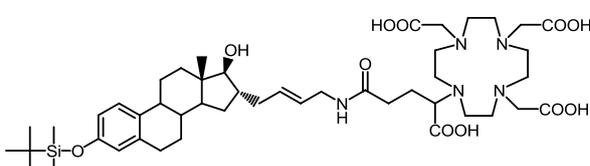
58,37; 89,09 (C17-OH), 113,86 (C2); 116,10 (C4); 127,25 (C1); 132,18 (C10); 138,69 (C5); 156,08 (C3); 168,78 (COOH); 174,86 (COOH)

ESI-MS (+) (m/z): 701,7 [M+H]<sup>+</sup> (calculado: 701,9)

IV (cm<sup>-1</sup>, pastilha KBr): 1172 (s,  $\nu_{C=O}$ ), 2895-2926 (b,  $\nu_{COOH}$ ), 3433 (b,  $\nu_{OH}$ )

HPLC (método A): 13,58 min

**6.3.2.13. Síntese do ácido 1-[3''-(*terc*-butildimetilsiloxi)-17 $\beta$ ''-hidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16'' $\alpha$ -il]-N-[(*but*-e-enil)propanoil)amino]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-tetracético (2.32)**



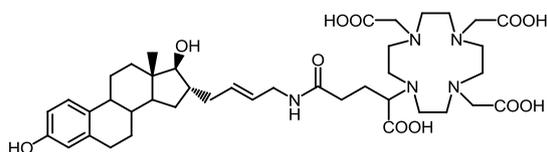
Dissolveu-se anidrido de DOTAGA (30 mg, 0,072 mmol) em 10 mL de DMF a 40°C (parcialmente solúvel) durante 30 min.

Adicionou-se Et<sub>3</sub>N (47 $\mu$ L, 0,195 mmol) e o composto **2.17** (30 mg; 0,065 mmol). A mistura reaccional ficou em agitação durante 3h, a 70°C, tendo-se observado a completa dissolução dos reagentes de partida. Evaporou-se o solvente sob vácuo no evaporador rotativo, adicionou-se H<sub>2</sub>O e liofilizou-se. A presença do composto foi confirmada por MALDI-TOF e HPLC. Não foi feita qualquer purificação.

**MALDI-TOF:** 914,57 [M + H]<sup>+</sup>; 976,49 [M + K + Na - H]<sup>+</sup>; 990,48 [M + 2K - H]<sup>+</sup>; 998,47 [M + 2Na + K - 2H]<sup>+</sup>; 1020,46 [M + 3Na + K - 3H]<sup>+</sup>

HPLC (método B): 15,12 min

**6.3.2.14. Síntese do ácido 1-[3'', 17 $\beta$ ''-dihidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16'' $\alpha$ -il]-N-[(*but*-e-enil)propanoil)amino]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-tetracético (L5)**



Dissolveu-se 25 mg do composto **2.32** (0,027 mmol) em 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e adicionou-se 1 mL de TFA. A solução ficou em agitação durante uma noite, à temperatura ambiente. Removeu-se o solvente e o TFA, a pressão reduzida e lavou-se o precipitado formado com éter (5x 1mL).

Obteve-se o composto pretendido, sob a forma de um pó acastanhado, após purificação por Sep-Pak C<sub>18</sub> (2g) utilizando como eluente uma mistura de H<sub>2</sub>O (100->0) e MeOH (0->100) e liofilização das fracções correspondentes. **Rendimento:** 54% (12 mg; 0,015mmol).

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,25-1,54 (m, 8H); 1,65-2,05 ; 2.15-2,35 ; 2,63-3,2; 2,92 ; 2,93-3,06 3,23 (d, 1H, H17α, J=7,5 Hz), 5,47-5,66 (m, 2H, CH=CH); 6,49 (d, 1H, J=2,4 Hz, H-4); 6,56 (dd; 1H; J= 2,1 Hz; J=8,4 Hz, H-2); 7,07 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-1);

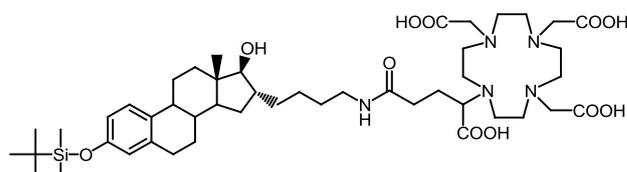
**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 12,63 (C18), 27,50; 28,52; 30,43-30,71; 38,13; 38,67; 40,29; 41,42; 42,35; 43,88; 45,24; 45,44; 46,16; 51,12 (CH<sub>2</sub>); 54,27(CH<sub>2</sub>); 55,71-56,29 (CH<sub>2</sub>COOH); 87,88 (C17-OH); 113,88 (C2); 116,10 (C4); 127,22 (C1); 128,01 (CH=CH); 132,58 (C10); 132,85 (CH=CH); 138,83 (C5); 155,93 (C3); 170,60 (COOH); 174,58 (COOH)

**IV (cm<sup>-1</sup>, pastilha KBr):** 1645-1684 (b, ν<sub>COOH</sub>), 3442 (b, ν<sub>OH</sub>)

**ESI-MS (-)** (m/z): 798,7 [M-H]<sup>-</sup>, 820,7 [M + Na - 2H]<sup>-</sup>, 886,6 [M + K - 2H]<sup>-</sup> (calculado: 798,9; 820,9; 886,9)

**HPLC (método B):** 11,37 min

### 6.3.2.15. Síntese do ácido 1-[3''-(*terc*-butildimetilsiloxi)-17β''-hidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]-N-[(*butil*)propanoil]amino]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-tetracético (2.33)

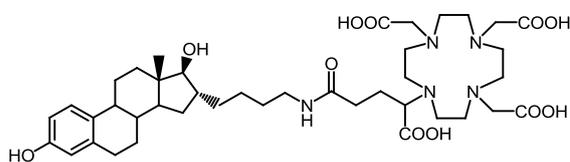


Dissolveu-se o anidrido de DOTAGA (33 mg, 0,072 mmol) em 10 mL de DMF a 40°C (parcialmente solúvel). Após 30 min em agitação, adicionou-se Et<sub>3</sub>N (27 μL, 0,195 mmol) e o composto **2.18** (30 mg; 0,066 mmol). A mistura reaccional ficou em agitação, durante 3h, a 70°C tendo-se observado a completa dissolução dos reagentes de partida. Evaporou-se o solvente no evaporador rotativo, adicionou-se água e liofilizou-se. A presença do composto pretendido foi confirmada por MALDI-TOF. Não foi feita qualquer purificação.

**MALDI-TOF:** 916,57 [M + H]<sup>+</sup>; 954, 46 [M + K]<sup>+</sup>

**HPLC (método B):** 15,46 min

**6.3.2.16. Síntese do ácido 1-[3'', 17β''-dihidroiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]-N-[(butil)propanoil]amino]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,7,10-tetracético (L6)**



Dissolveu-se 35 mg do composto **3.33** (0,038 mmol) numa solução metanólica contendo 2% de HCl 12N. A mistura reacional ficou em agitação à temperatura ambiente, durante

5h. Obteve-se o composto pretendido, sob a forma de um pó acastanhado, após purificação por Sep-Pak C<sub>18</sub> (2g) utilizando como eluente uma mistura de H<sub>2</sub>O (100->0) e MeOH (0->100) e liofilização das fracções pretendidas. **Rendimento:** 47% (14 mg; 0,018 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,25-1,54 (m, 8H); 1,65-2,05 m, 8H); 2,15-2,35 ; 2,63-3,2 ; 2,92 ; 2,93-3,06; 3,23 (d, 1H, H-17α, J=7,5 Hz), 6,46 (d, 1H, J=2,4 Hz, H-4); 6,52 (dd; 1H; J= 2,4 Hz; J=8,4 Hz, H-2); 7,06 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-1);

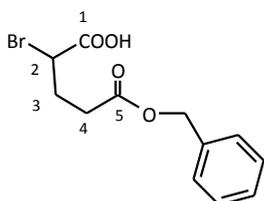
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 12,63 (C18), 26,87; 27,51; 28,54; 30,64; 30,73; 31,09; 33,85 (C20/C21); 36,56; 38,16; 39,96; 40,32; 40,61; 44,02; 45,27; 44,33; 45,44; 46,44; 52,32 (CH<sub>2</sub>); 54,21(CH<sub>2</sub>); 55,75-56,20 (CH<sub>2</sub>COOH); 88,90 (C17-OH); 113,73 (C2); 116,04 (C4); 127,19 (C1); 132,58 (C10); 138,77 (C5); 155,91 (C3); 174,79 (COOH)

**IV (cm<sup>-1</sup>, KBr):** 1653 (b, í<sub>COOH</sub>), 3447 (b, ν<sub>OH</sub>)

**ESI-MS (-) (m/z):** 418,8 [M + K - 2H]<sup>-2</sup>; 838,6 [M + K - 2H]<sup>-</sup>

**HPLC (método B):** 8,73 min

**6.3.2.17. Síntese do ácido 5-(benziloxi)-2-bromo-5-oxopentanóico (2.35)<sup>205</sup>**



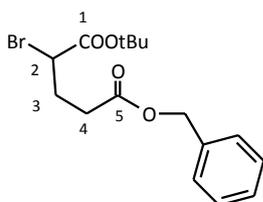
Dissolveu-se 6g de ácido L-glutâmico do éster benzílico (25,9 mmol) e 9,1 g de brometo de sódio (88,5 mmol) em 45 mL de ácido brómico (HBr) 1M. Colocou-se a mistura a 0°C e adicionou-se lentamente e sob agitação constante, 3,175g de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (46 mmol).

Após 3h em agitação a 0°C, adicionou-se 2,225 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e efectuou-se uma extracção com éter dietílico (3x 250 mL). Lavou-se a fase orgânica com uma solução salina saturada de NaCl. O solvente foi removido sob vácuo no evaporador rotativo após filtração. Obteve-se o composto pretendido, após purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando uma mistura de n-hexano/EtOAc (3:1) como eluente, sob a forma de um óleo amarelo. **Rendimento:** 50% (3,900 g; 2,95 mmol).

Rf (n-hexano/EtOAc (3:1)): 0,04

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 2,25-2,47 (m, 2H, CH-CH<sub>2</sub>); 2,59 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-COO-CH<sub>2</sub>-Ph); 4,38 (dd, 1H, CH); 5,12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Bz); 7,28-7,38 (m, 5H, Bz)

### 6.3.2.18. Síntese do 5-(benziloxi)-2-bromopentanoato de *terc*-butilo (**2.36**)<sup>205</sup>

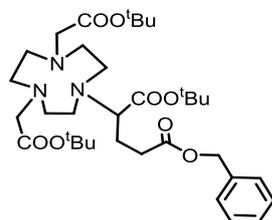


A uma solução do composto **2.33** (3,81 g; 6,04 mmol) em 10 mL de CHCl<sub>3</sub> adicionou-se, gota-a-gota, tricloroacetoimidato de *terc*-butilo (TBTA) (2,819g; 12,93 mmol) dissolvido em 10 mL de ciclo-hexano. Observou-se a formação de um precipitado branco. O precipitado formado foi então dissolvido por adição de dimetilacetamida (DMA) (3 mL). De seguida, adicionou-se 0,300 mL de trifluoreto de boro-dietil-eterato (BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>). Após 3 dias em agitação à temperatura ambiente evaporaram-se os solventes. A DMA residual foi extraída com n-hexano (3x 20 mL) e a fase orgânica seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Obteve-se o composto pretendido sob a forma de um óleo incolor após separação em coluna de sílica-gel utilizando uma mistura de n-hexano (95->10) e EtOAc (5->90) como eluente. **Rendimento:** 43% (1,95 g; 5,5 mmol).

Rf (n-hexano/EtOAc (75:25)): 0,55

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,46 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)); 2,25-2,47 (m, 2H, CH-CH<sub>2</sub>); 2,53 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-COO-CH<sub>2</sub>-Ph); 4,38 (dd, 1H, CHBr); 5,11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph); 7,32-5,35 (m, 5H, Ph)

### 6.3.2.19. Síntese do 5-benzil-2-[4,7-bis(2-*terc*-butoxi-2-oxoetil)]-1,4,7-triazaciclono-nano-1-il)pentacetato de *terc*-butilo (**2.38**)



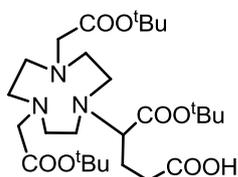
Dissolveu-se o NO<sub>2</sub>A(<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub> (0,300 g; 0,84 mmol) em 10 mL de CH<sub>3</sub>CN seco e adicionou-se K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,232 g; 1,68 mmol). Após 30 min em agitação adicionou-se, gota-a-gota, o composto **2.36** (0,300 g; 0,84 mmol) dissolvido em 5 mL de CH<sub>3</sub>CN. A mistura reacional ficou em agitação à temperatura ambiente, sob atmosfera inerte, durante 2 dias. Removeu-se o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em excesso por filtração e removeu-se o solvente no evaporador rotativo. Purificou-se o composto pretendido por coluna de sílica-gel utilizando como eluente uma mistura de CHCl<sub>3</sub>/MeOH (90:10). Obteve-se o composto pretendido sob a forma de um óleo amarelo viscoso. **Rendimento:** 76% (403 mg; 0,64 mmol).

R<sub>f</sub> (CHCl<sub>3</sub>/MeOH (90:10)): 0,34

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,42 (2s, 27H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,63-1,99 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,48-3,10 (m, 12H, CH<sub>2</sub>); 3,18 (t, 1H, CH); 3,25-3,30 (m, 4H, CH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu); 5,09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Bz) 7,32-7,34 (m, 5H, CH-bz)

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 25,38 (CH<sub>2</sub>); 27,97-28,11 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 31,07 (CH<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>Ph, CH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu); 77,21 (CH<sub>2</sub>Ph); 81,94 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 128,13-128,48 (Bz); 135,71 (Bz); 171,53; 172,51; 172,70 (COO<sup>t</sup>Bu, C=O)

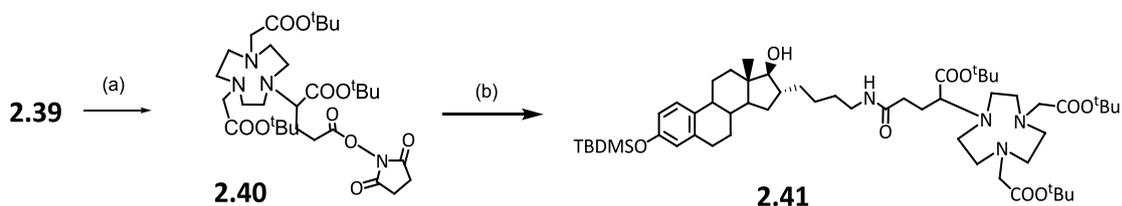
### 6.3.2.20. Síntese do ácido 4-[(4',7'-di-*tert*-butoxi)-2-oxoetil]-1',4',7'-triazaciclo nonano-1'-il]-5-(*tert*-butoxi)-5-oxopentanóico (2.39)



Uma solução de isopropanol (60 mL) contendo 0,403 g do composto **2.38** (0,64 mmol) e 130 mg de Pd/C a 10% foi borbulhada com H<sub>2</sub>, durante 12h. Obteve-se o composto pretendido, sob a forma de um sólido castanho, após filtração sob celite e remoção do solvente a pressão reduzida. **Rendimento:** 70% (242 mg; 0,45 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,44 (s, 27H, CH<sub>3</sub>); 2,02-2,06 (m, 2H, CH<sub>2</sub>COOH); 2,54-2,55 (m, 2H, NCHCH<sub>2</sub>); 3,01-3,15 (m, 12H, CH<sub>2</sub>), 3,49-3,77 (m, 5H, CHNCH<sub>2</sub> + CH<sub>2</sub>COO<sup>t</sup>Bu)

### 6.3.2.21. Síntese do 1-[3''-(*tert*-butildimetilsiloxi)-17β''-hidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]-N-[(*tert*-butil)propanoil)amino]-1,4,7-ciclodononano-1,4,7-triacetato de *tert*-butilo (2.40)



A síntese do composto **2.41** foi obtido após dois passos sequenciais.

(a) A 0,070 g de **2.39** (0,13 mmol) em 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco a 0°C, adicionou-se N-hidroxisuccinimida (NHS-OH) (0,020 g; 0,26 mmol) e 1-etil-3(3-

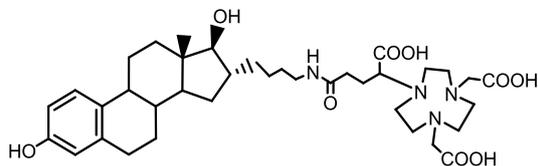
dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (0,050 g; 0,26 mmol). A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente, durante 24h. Após este período, removeu-se o solvente sob vazio. Redissolveu-se o crude em 20 mL de  $\text{CHCl}_3$  e fez-se uma extração com  $\text{H}_2\text{O}$  (3x 20 mL), para remover o NHS-OH e EDC em excesso. A fase orgânica foi seca com  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e o solvente removido sob vazio.

**ESI-MS (+) (m/z):** 641,5[M + H]<sup>+</sup> (calculado: 641,4)

(b) Dissolveu-se o crude obtido em (a) em 8 mL de DMF seco e adicionou-se 0,111 mL de trietilamina (0,80 mmol). Após 5 min em agitação adicionou-se o composto **2.18** (0,036 g; 0,08 mmol). A mistura reaccional ficou em agitação, sob atmosfera inerte de  $\text{N}_2$ , durante 48h. Após este período, removeu-se o solvente. A cinética de reação foi controlada por análise de alíquotas por HPLC. O composto pretendido foi identificado por ESI-MS. Não se fez qualquer tipo de purificação.

**ESI-MS (+) (m/z):** 983,9 [M+H]<sup>+</sup> (calculado: 983,7)

### 6.3.2.22. Síntese do ácido -1-[3'', 17β''-dihidroxiestra-1'',3'',5''(10'')trien-16''α-il]-N-[(butilpropanoil)amino]-1,4,7-triazanociclononano-1,4,7-triacético (L7)



Dissolveu-se 70 mg do composto **2.41** em 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e adicionou-se 1 mL de TFA e 4  $\mu\text{L}$  de  $i\text{-Pr}_3\text{SiH}$ . Após 12h em agitação à temperatura ambiente, removeu-se o  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e o TFA sob pressão reduzida e lavou-se o crude com éter dietílico (5x 5 mL). O composto pretendido foi obtido após purificação por Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  (2g) utilizando como eluente uma mistura de  $\text{H}_2\text{O}$  (100->0) e MeOH (0->100) e liofilização das fracções correspondentes. **Rendimento:** 18% (17 mg; 0,024 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 0,79 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 1,25-1,38; 1,51-1,63 ; 1,72-1,92; 1,98-2,18; 2,55-2,29 ; 2,38-2,43 ; 3,57 (t, 1H,  $\text{CHCOOH}$ ); 3,57-3,89 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 6,46 (d, 1H,  $J=2,1\text{Hz}$ , H-4); 6,62 (dd, 1H,  $J=2,4\text{Hz}$ ,  $J=8,4\text{ Hz}$ , H-2); 7,06 (d, 1H,  $J=8,1\text{ Hz}$ , H-1)

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 12,63 (C18), 26,67; 26,84; 28,56; 30,20-30,35; 30,71-30,74; 31,09; 33,66; 36,55; 38,16; 40,34-40,49; 44,06; 45,29-45,46; 46,19; 52,24; 56,13; 64,72; 88,92 (C17-OH); 113,74 (C4); 116,07 (C2); 127,19 (C1); 132,64 (C10); 138,83 (C5); 155,92 (C3); 175,09; 175,19 (COOH)

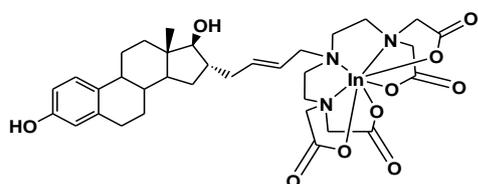
ESI-MS (-) (m/z): 699,5 [M – H]<sup>-</sup> (Calculado: 699,4)

IV (cm<sup>-1</sup>, KBr pellet): 1637,5 (b,  $\nu_{\text{COOH}}$ ), 3429,3 (b,  $\nu_{\text{OH}}$ )

### 6.3.3. Síntese e caracterização dos complexos de Índio e Gálio

#### 6.3.3.1. Síntese dos complexos de Índio

##### 6.3.3.1.1. Síntese do complexo *InL1*



Dissolveu-se 15 mg de **L1** (0,02 mmol) em 3 mL de água e ajustou-se o pH a 5 com uma solução de HCL 1N. Adicionou-se uma quantidade equimolar de InCl<sub>3</sub> anidro e a mistura ficou em agitação à temperatura ambiente até se observar a formação de um precipitado branco (30 min). A mistura reaccional foi sujeita a centrifugação (10 min, 3000 rpm) e o precipitado lavado sucessivamente com H<sub>2</sub>O. O complexo pretendido foi obtido sob forma de um pó branco.

**Rendimento:** 71,3%.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 0,68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,12-3,41; 5,52-5,57 (m, 2H, CH=CH); 6,41 (m, 1H, *J* = 2,7 Hz, H-1); 6,48 (m, 1H, H-2); 7,02 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-4)

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 12,1 (C18); 26,1; 27,1; 28,8; 29,5; 36,2; 37,8; 42,3; 43,7; 47,9; 49,8; 52,1; 55,0; 61,1; 62,9; 63,5 (NCH<sub>2</sub>COOH); 85,5 (C17-OH); 112,8 (C2); 114,9 (C4); 120,4 (CH=CH); 126,1 (C1); 130,6 (C10); 137,3 (CH=CH); 138,3 (C5); 155,0 (C3), 171,5 (C=O); 171,9 (C=O); 172,7 (C=O)

ESI-MS (-) (m/z): 770,4 [M] (calculado: 770,2)

IV (cm<sup>-1</sup>, KBr pellet): 1627 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ), 2925 (b,  $\nu_{\text{COOH}}$ ), 3418 (b,  $\nu_{\text{OH}}$ )

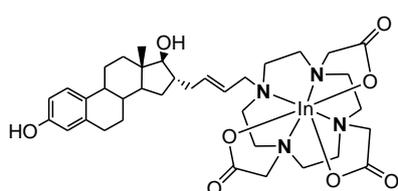
HPLC (Método A): 9,26 min

##### 6.3.3.1.2. Síntese dos complexos *InL2-InL4*

Os complexos de **InL2-InL4** foram obtidos segundo o procedimento descrito em 5.3.3.1.1. mas com ligeiras alterações. De um modo geral dissolveu-se 1 eq de **L2-L4** em 1 mL de água. Ajustou-se o pH a 5 com uma solução de HCl 1N e adicionou-se 3 eq de InCl<sub>3</sub> dissolvido em 1 mL de água, observando-se de imediato a formação de um precipitado branco e descida do pH

para 3. Ajustou-se novamente o pH a 5 através da adição de uma solução de NaOH 1N e elevou-se a temperatura para 95°C. Após 2h a esta temperatura os complexos de Índio foram obtidos sob a forma de um pó branco, após sucessivas lavagens do precipitado formado com água para eliminação do excesso de  $\text{InCl}_3$  e dos sais formados.

### **Complexo InL2**



**Rendimento:** 54,7%

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 0,67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 1,10-1,45; 1,75-1,79; 2,01-2,26; 2,67-3,09, 3,19 (m largo, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 3,36 (d, 1H,  $J=6,9$  Hz, H-17 $\alpha$ ); 5,52-5,57 (m, 1H, CH=CH); 5,68-5,75 (m, 1H, CH=CH); 6,41 (d, 1H,  $J=2,7$  Hz, H-4); 6,48 (dd; 1H;  $J=2,4$  Hz;  $J=8,4$  Hz, H-2); 7,02 (d, 1H,  $J=8,4$  Hz, H-1);

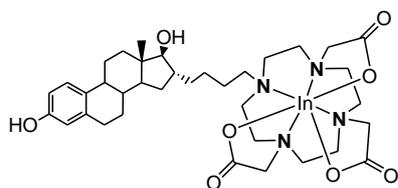
**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 12,19 (C18); 26,12; 27,06; 29,1; 29,33; 36,74; 37,61; 42,24; 43,69; 43,77; 47,98; 50,62; 52,07; 55,53; 58,30; 59,73; 85,47 (C17-OH); 114,99 (C2); 121,07 (C4); 122,07 (C1); 126,21 (CH=CH); 130,72 (C10); 137,37 (CH=CH); 139,11 (C5); 154,83 (C3); 170,97 (C=O); 170,99 (C=O); 171,38 (C=O)

**ESI-MS (+)** (m/z): 783,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calculado: 783,3) ; 805,4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calculado: 805,3); 821,4  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (calculado: 821,3)

**IV ( $\text{cm}^{-1}$ , KBr pellet):** 1654,92 (br,  $\nu_{\text{C=O}}$ ), 3419,78 (b,  $\nu_{\text{OH}}$ )

**HPLC (Método A):** 12,96 min

### **Complexo InL3**



**Rendimento:** 43,4 %

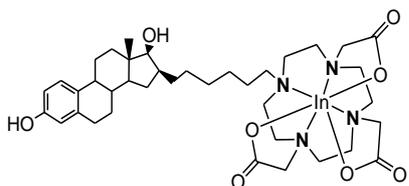
**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 0,68 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 1,22 (m largo); 1,45-1,76 (m); 1,89-2,48 (m); 2,62-3,08 (m); 3,17 (2H,  $\text{CH}_2\text{-DOTA}$ ); 4,42 (d, 1H,  $J=5,4$  Hz, H-17 $\alpha$ ); 6,42 (d, 1H,  $J=2,7$  Hz, H-4); 6,48 (dd; 1H;  $J=2,4$  Hz;  $J=8,3$  Hz, H-2); 7,02 (d, 1H,  $J=8,1$  Hz, H-1); 8,96 (s, 1H)

**ESI-MS (-):** 890,5  $[\text{M}+\text{Cl}]^-$  (calculado: 890,3); 863,6  $[\text{M}+\text{Br}]^-$  (calculado: 863,3)

**IV ( $\text{cm}^{-1}$ , KBr pellet):** 1653 (s,  $\nu_{\text{C=O}}$ ), 3446 (b,  $\nu_{\text{OH}}$ )

**HPLC (Método A):** 8,48 min

### Complexo de InL4



Rendimento: 57,1%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 0,65 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (C18)); 0,84-1,42 (m); 1,62-2,36 (m); 2,68-3,01 (m); 3,07 (2H, CH<sub>2</sub>-DOTA); 4,39 (d, 1H, H-17α; J=3,9 Hz); 6,42 (d, 1H, J=2,7 Hz, H-4); 6,48 (dd; 1H; J= 2,4 Hz; J=8,4 Hz, H-2); 7,02 (d, 1H, J=

8,4 Hz, H-1); 8,97 (s, 1H)

ESI-MS (+) (m/z): 835,6 [M+Na]<sup>+</sup> (calculado: 835,5)

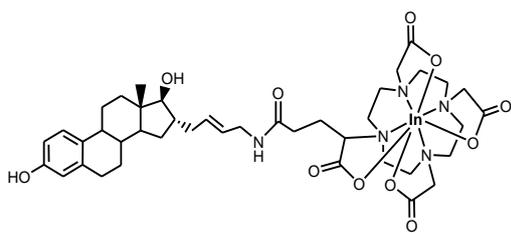
IV (cm<sup>-1</sup>, KBr pellet): 1636 (br, ν<sub>C=O</sub>), 3451 (b, ν<sub>OH</sub>)

HPLC (Método A): 10,96 min

#### 6.3.3.1.3. Síntese dos complexos InL5 e InL6

Os complexos de InL5 e InL6 foram obtidos de modo semelhante ao descrito em 6.3.3.1.2.. De um modo geral, a uma solução de de InCl<sub>3</sub>, em solução tampão acetado 0,4M, a pH 5 adicionou-se uma quantidade equimolar dos ligandos L5 ou L6 numa mistura contendo 1,5 mL de solução tampão acetado 0,4M a pH 5 e 0,500 mL de EtOH. Colocou-se a mistura reaccional durante 2h a 95°C observando-se a formação de um precipitado. Obtiveram-se os complexos pretendidos sob a forma de um pó branco após sucessivas lavagens do precipitado formado com água.

### Complexo de InL5



Rendimento: 50,4%

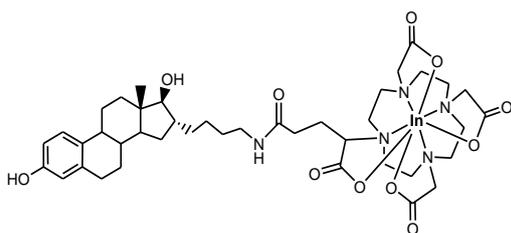
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 0,67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,80-0,83; 1,37-1,43; 1,68-1,81; 1,89-2,01; 2,25 (m largo); 2,66-2,71; 5,30-5,49 (m, 2H, CH=CH); 6,41 (m, 1H, H-4, J= 2,7 Hz, H-1); 6,48 (m,

1H, H-2); 6,64 (s, 1H); 6,99 (d, 1H, H-1, J= 8,4 Hz, H-4); 7,19 (s, 1H); 8,97 (s largo, 1H, NH)

ESI-MS (-) (m/z): 910,6 [M]<sup>-</sup> (calculado: 910,3)

IV (cm<sup>-1</sup>, KBr pellet): 1620 (s, ν<sub>C=O</sub>), 2856, 2927 (b, ν<sub>COOH</sub>), 3427 (b, ν<sub>OH</sub>)

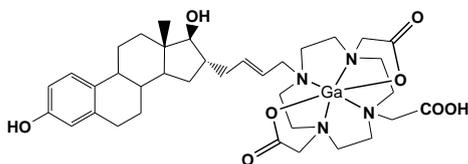
HPLC (Método A): 9,97 min

**Complexo de InL6****Rendimento:** 43,8%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 0,68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C18); 1,14-2,26 (m); 2,56-3,08 (m); 5,30-5,49 (m, 2H, CH=CH); 6,41 (m, 1H, H-4, *J* = 2,7 Hz); 6,48 (m, 1H, H-2); 6,99 (d, 1H, H-1, *J* = 8,4 Hz); 7,81 (s, 1H);

8,97 (s largo, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 12,79 (C18); 26,68; 27,61; 29,89; 36,57; 37,61; 42,24; 43,95; 44,35; 48,57; 52,41; 87,17 (C17-OH); 113,39 (C2), 115,62 (C4); 126,71 (C1); 131,16 (C10); 137,84 (C5); 155,53 (C3); 173,09 (C=O)

**ESI-MS** (-) (m/z): 912,7 [M]<sup>-</sup> (calculado: 912,8)**IV (cm<sup>-1</sup>, KBr pellet):** 1620 (s, ν<sub>C=O</sub>), 2856, 2927 (b, ν<sub>COOH</sub>), 3435 (b, ν<sub>OH</sub>)**HPLC (Método A):** 10,66 min**6.3.3.2. Síntese dos complexos de Gálio***6.3.3.2.1. Síntese do complexo GaL2*

Dissolveu-se 15 mg do composto **L2** (0,022 mmol) em 1,5 mL de água. Ajustou-se o pH a 4 com uma solução de HCL 1N. Adicionou-se 29 mg de Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·10H<sub>2</sub>O (0,066 mmol) observando-se a

formação de um precipitado branco e a descida de pH para 2,5. Ajustou-se o pH até 4 com uma solução de NaOH 1N. Colocou-se a mistura reaccional durante 2h a 95°C. O complexo **GaL2** foi obtido sob a forma de um pó branco após sucessivas lavagens do precipitado formado com água. **Rendimento:** 56%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 0,65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,15-1,22; 1,76; 2,04; 2,26; 2,67-2,71, 2,88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 4,59 (d, 1H, H-17α; *J* = 5,1 Hz); 5,61-5,78 (m, 2H, CH=CH); 6,42 (d, 1H, *J* = 2,7 Hz, H-4); 6,47 (dd; 1H; *J* = 2,4 Hz; *J* = 8,4 Hz, H-2); 7,02 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H-1);

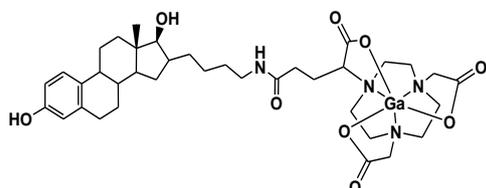
**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 12,06 (C18); 26,17; 26,95; 29,05; 29,23; 36,61; 37,31; 38,26; 42,19; 43,63; 47,80; 51,83; 54,74; 59,87; 85,45 (C17-OH); 104,3; 112,69 (C2); 114,92 (C4); 121,33 (CH=CH); 126,03 (C1); 130,45 (C10); 137,14 (CH=CH); 138,59 (C5); 154,90 (C3); 170,16 (C=O); 170,25 (C=O)

**ESI-MS** (+) (m/z): 737, 5 [M]<sup>+</sup> (calculado: 737,3); 759,4 [M+Na]<sup>+</sup> (calculado: 759,3)

IV (cm-1, KBr pellet): 1582,75 (s,  $\nu_{C=O}$ ), 1663,33 (br,  $\nu_{C=O}$ ), 3421 (b,  $\nu_{OH}$ )

HPLC: 9,73 min

#### 6.3.3.2.2. Síntese do complexo **GaL7**



Dissolveu-se 6 mg do composto **L7** (0,003 mmol) numa mistura contendo 1,5 mL de solução tampão acetato 0,4M a pH 5 e 0,500 mL de EtOH.

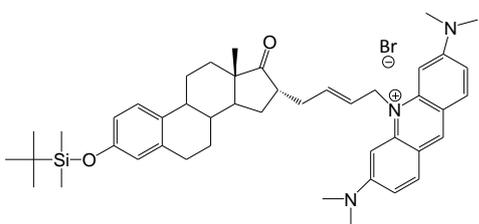
Adicionou-se 4 mg de  $Ga(NO_3)_3 \cdot 10H_2O$  (0,009 mmol) e colocou-se a mistura reaccional, durante 2h a 95°C. Observou-se a formação de um precipitado. O precipitado foi separado da fase aquosa por centrifugação, durante 10 min, a 3000 rpm. Após análise por ESI-MS verificou-se que o complexo **GaL7** estava na fase aquosa. A fase aquosa foi liofilizada e o complexo foi recuperado após extracção em coluna Sep-Pak C<sub>18</sub> (2g) utilizando 100% H<sub>2</sub>O seguido de 100% EtOH. **Rendimento:** 33,3%

ESI-MS (+) (m/z): 789,6 [M+Na]<sup>+</sup>

HPLC (Método C): 12, 67 min

### 6.3.4. Síntese e Avaliação Biológica de uma Molécula Híbrida Estradiol/Alaranjado de Acridina

#### 6.3.4.1. Síntese do *N*-{4'-[3''-(terc-butildimetilsilioxi)-17''-oxoestra-1'',3'',5''(10'')-trien-16'' $\alpha$ -il]but-2'-enil]-3,6-bis(dimetilamino)acridina (**3.6**)



A uma solução de alaranjado da acridina (30 mg, 0,11 mmol), carbonato de sódio (12 mg) e iodeto de sódio (32 mg) em 4 mL de *p*-xileno anidro adicionou-se uma solução do composto **2.3** (57 mg, 0,11 mmol) em 2 mL de *p*-xileno. Após 48 h em refluxo,

removeu-se o solvente na linha de vazio. O composto pretendido foi obtido após coluna de sílica-gel utilizando uma mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100-95 %) e MeOH (0-5%) na forma de um sólido cor-de-vinho. **Rendimento:** 35% (31 mg; 0,039 mmol).

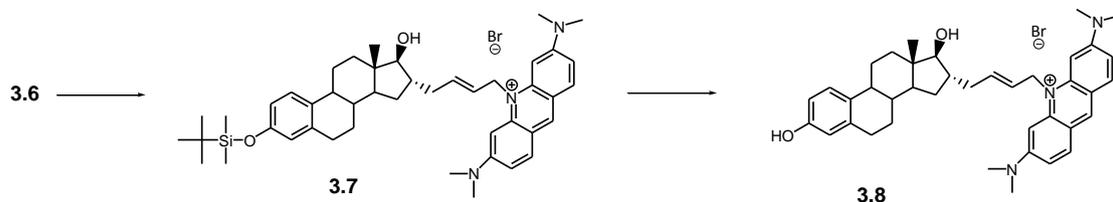
Rf (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH 50:5:1): 0,74

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,16 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0,90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,96 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,23-1,66; 1,03-1,92; 2,59-3,06, 3,12 (s, 12H, CH<sub>3</sub>); 5,10-5,68 (m, 2H, CH=CH); 6,58 (m, 2H, H-2, H-4); 7,04-7,10 (m, 5H, CH + H-1); 7,67 (d, 2H, J= 9,3 Hz, CH); 8,29 (s, 1H, CH)

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): -4,78 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 14,02 (C18); 14,60; 18,15; 25,68 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 26,73; 29,34, 29,68 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 31,90; 37,83; 40,38; 44,07; 48,39-48,95; 68,15 (CH); 112,94 (CH); 114,91 (CH); 115,34 (CH); 117,30 (C2); 119,98 (C4); 126,05 (C1); 128,08 (CH=CH); 130,87 (CH); 132,42 (C10); 137,55 (C5); 153,47 (2C); 221,71 (C=O)

ESI-MS (+) (m/z): 702, 6 [M]<sup>+</sup> (calculado 702,45)

### 6.3.4.2. Síntese do *N*-{4'-[3'', 17''β-dihidroiestra-1'', 3'', 5''(10'')-trien-16''α-il]but-2'-enil]-3,6-bis(dimetilamino)acridina (3.8)



O composto **3.8** foi obtido após dois passos sequenciais.

(a) A uma solução do composto **3.6** (48 mg; 0,07mmol) em 5 mL de THF seco adicionou-se LiAlH<sub>4</sub> sólido (10 mg, 0,18 mmol). A mistura reaccional foi mantida em agitação sobre atmosfera inerte a -78°C (mistura de acetona/CO<sub>2</sub>) durante 1h. Adicionou-se H<sub>2</sub>O para eliminar o LiAlH<sub>4</sub> em excesso e extraiu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 50 mL). Secou-se a fase orgânica com MgSO<sub>4</sub>, filtrou-se e removeu-se o solvente tendo-se obtido um pó acastanhado.

(b) O crude obtido foi redissolvido numa solução metanólica contendo 2% de HCl 12N. A mistura reaccional ficou em agitação, à temperatura ambiente, durante 6h. Adicionou-se H<sub>2</sub>O e fez-se uma extracção com EtOAc (3x 50 mL). O composto final foi obtido sob a forma de um sólido vermelho, após remoção do solvente. **Rendimento:** 60% (28 mg; 0,042 mmol).

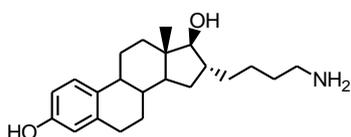
Rf (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH 50:5:1): 0,14

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 1,23-1,66; 1,03-1,92; 2,73 (m, 2H), 3,23 (s, 12H, CH<sub>3</sub>); 3,61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-AO); 5,10-5,68 (m, 2H, CH=CH); 6,45 (d, 1H, J=9 Hz, H-2); 6,51 (dd, 1H, J=3 Hz, J=9,3 Hz, H-4); 6,62 (br, 2H, CH); 7,03 (d, 2H, J= 9,3 Hz, H-1); 7,21 (m, 2H, CH); 7,82 (m, 2H, CH); 8,64 (s, 1H, CH)

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 12,58; 14,46 (C18); 23,74; 26,19; 26,33; 26,96; 27,50; 28,50; 30,76 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 31,81; 32,15; 33,07; 33,66; 38,09; 40,31; 43,97; 45-21-45,43; 63,02 (CH<sub>2</sub>); 63,75 (CH<sub>2</sub>); 65,66 (CH<sub>2</sub>-AO); 88,07 (C17-OH); 113,73 (C2); 116,04 (C4); 116,59 (2C); 124,22 (C); 125,51 (C); 127,17 (C1); 131,24 (CH=CH); 132,28 (C10); 132,42 (C); 138,80 (C5); 153,47 (2C)  
ESI-MS: (+) (m/z): 590, 5 [M]<sup>+</sup> (calculado 590,4)

### 6.3.5. Síntese e Caracterização Derivados 16α-Estradiol Conjugados a Sondas Fluorescentes

#### 6.3.5.1. Síntese do 4-(3',17'β-dihidroxiestra-1',3',5'(10')trien-16α-il)butamina (4.3)



Dissolveu-se o composto **2.18** (0,090g; 0,20 mmol) em 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> numa solução metanólica contendo 2% de HCl 12 N. A solução ficou em agitação, à temperatura ambiente durante 6h.

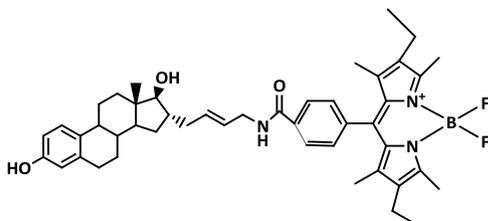
Adicionou-se H<sub>2</sub>O e extraiu-se com EtOAc (2x). Secou-se a fase orgânica com MgSO<sub>4</sub>, filtrou-se e removeu-se o solvente. **Rendimento:** 45% (31 mg; 0,09 mmol).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,21-1,95 (m, 17H), 1,82-2,31 (m, 2H), 2,75-2,77 (m, 2H), 2,94 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3,22 (d, 1H, H-17α; J=6,9 Hz), 6,48 (d, 1H, J=2,7 Hz, H-4); 6,54 (dd; 1H; J= 2,4 Hz; J=8,4 Hz, H-2); 7,06 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-1);

**Maldi-MS:** 343,9 [M+H]<sup>+</sup> (calculado: 343,2)

**HPLC (método B):** 9,04 min

#### 6.3.5.2. Síntese do E2-bodipy-1 (4.3)



Dissolveu-se 20 mg de **2.28** (0,06 mmol) em 3 mL de DMF. Adicionou-se 17 μL de Et<sub>3</sub>N (0,18 mmol) por forma para obter um pH entre 8-9. Em seguida, adicionou-se gota-a-gota 20 mg de NHS-Bodipy (0,04 mmol) dissolvido em 2 mL de DMF. A mistura

reacional ficou em agitação à temperatura ambiente durante 24h. O tempo de reacção foi controlado por TLC utilizando como eluente uma mistura de heptano/EtOAc (4:6). O composto pretendido foi obtido sob a forma de um pó cor-de-tijolo após purificação por coluna de sílica-

gel utilizando como eluentes uma mistura de heptano/EtOAc na proporção de 6:4.

**Rendimento:** 17% (5 mg; 0,007 mmol).

**Rf** (heptano/EtOAc (40:60)): 0,31

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,98 (t, 6H, CH<sub>3</sub>); 1,32 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 1,14-1,38; 1,73-2,07, 2,35 (q, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,48 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 2,72-2,74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 4,01 (d, 2H, CH<sub>2</sub>NH); 5,61-5,84 (m, 2H, CH=CH); 6,47 (d, 1H, *J*=2,5 Hz, H-4); 6,52 (dd; 1H; *J*= 2,5 Hz; *J*=8,4 Hz, H-2); 7,05 (d, 1H, *J*= 8,9 Hz, H-1); 7,44 (d, 2H, *J*= 8,1 Hz); 8,01 (d, 2H, *J*= 8,1 Hz)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 12,15 (C18); 12,59 (CH<sub>3</sub>); 15,01; 17,79; 23,80; 27,51; 28,51; 30,38; 30,75; 30,79; 32,29 (CH<sub>2</sub>); 33,08 (CH<sub>2</sub>); 38,14; 38,46; 40,37; 40,44; 42,86; 43,89; 45,28; 45,44; 87,71 (COH-17); 113,73; 116,04; 127,22 (C4); 128,11 (C1); 129,37 (C10); 130,01 (CH=CH); 132,62; 134,32 (CH=CH); 138,79 (CH); 139,54 (CH); 140,35 (CH); 155,29 (C3); 155,95 (CH); 169,03 (C=O)

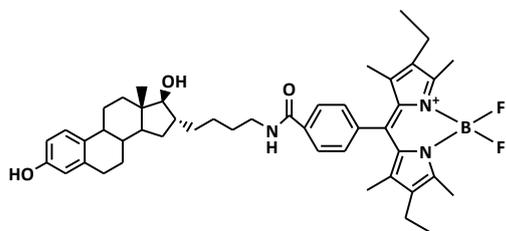
**<sup>11</sup>B-RMN** (CD<sub>3</sub>OD): 0,74 (t, *J*<sub>B,F</sub> = 33,2 Hz)

**MALDI-TOF:** 728,25 [M-F]<sup>+</sup> (calculado: 728,4)

**UV-Vis (CH<sub>3</sub>OH), λ (nm):** 523; 382; 223

**HPLC (método B):** 21,77 min

### 6.3.5.3. Síntese do E2-bodipy-2 (4.4)



Dissolveu-se 18 mg do composto **4.1** (0,052 mmol) em 2,5 mL de DMF. Adicionou-se 24 μL de Et<sub>3</sub>N (0,26 mmol). Adicionou-se, gota-a-gota, 20 mg de NHS-Bodipy (0,029 mmol) dissolvido em 2,5 mL de

DMF. A mistura reaccional ficou em agitação, à temperatura ambiente, durante 24h. Controlou-se o tempo de reacção por TLC utilizando como eluente uma mistura de heptano/EtOAc (50:50). Fez-se uma primeira purificação em coluna de sílica-gel utilizando como eluentes uma mistura de heptano/EtOAc na proporção de 60:40 seguida de purificação por HPLC (Método E). O composto pretendido foi obtido sob a forma de um pó cor-de-tijolo, após evaporação do solvente a pressão reduzida.

**Rendimento:** 18% (5 mg; 0,007 mmol)

**Rf** (heptano/EtOAc (50:50)): 0,35

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 0,81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,98 (t, 6H, CH<sub>3</sub>); 1,33 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 1,33-1,38; 1,67-1,93, 2,33 (q, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,48 (s, 6H, CH<sub>3</sub>); 2,73-2,78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3,22 (d, 1H, H-17α, J=9,2 Hz); 3,45 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>NH); 6,46 (d, 1H, J=2,5 Hz, H-4); 6,52 (dd; 1H; J= 2,4 Hz; J=8,4 Hz, H-2); 7,06 (d, 1H, J= 8,4 Hz, H-1); 7,44 (d, 2H, J= 8,4 Hz); 7,99 (d, 2H, J= 8,7 Hz)

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 12,16 (C18); 12,59 (CH<sub>3</sub>); 14,99 (CH<sub>3</sub>); 17,78; 18,69; 26,84; 27,51; 28,51; 30,64; 30,72; 31,03; 36,47; 38,15; 40,33; 41,11; 44,09; 45,26; 45,45; 46,18; 88,90 (C17-OH); 113,71; 116,02 (C2); 127,16 (C4); 129,27 (C1); 129,95; 132,58 (C10); 134,32; 136,46 (C5); 138,75 (CH); 139,46 (CH); 140,21 (CH); 155,21 (C3); 155,91 (CH), 169,34 (C=O)

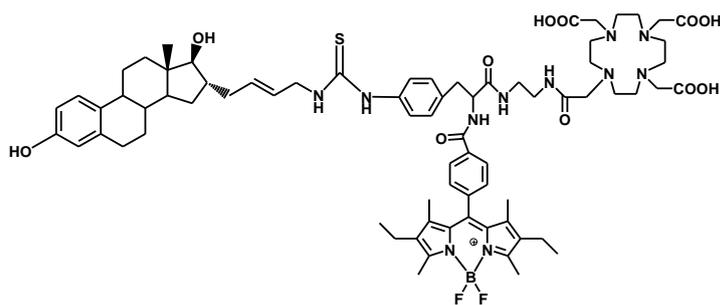
<sup>11</sup>B-RMN: 0,74 (t, J<sub>B,F</sub> = 33,1 Hz)

MALDI-TOF: 749,45 [M]<sup>+</sup> (calculado: 749,4), 730,27 [M-F]<sup>+</sup> (calculado:730,3)

UV-Vis (CH<sub>3</sub>OH), λ (nm): 523; 376; 232

HPLC (método B): 19,78 min

#### 6.3.5.4. Síntese do E2-Bodipy-DOTA-1 (4.6)

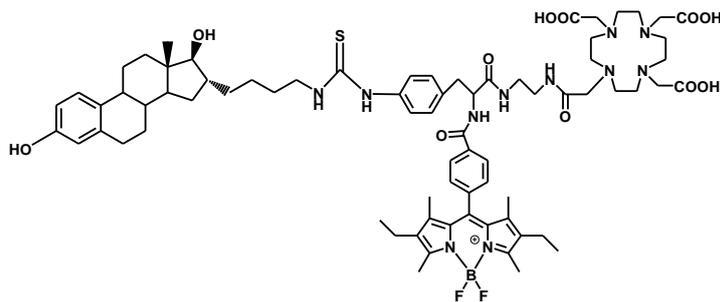


A 0,250 mL de DMF contendo 1 mg de **2.28** ( $2,9 \times 10^{-3}$  mmol) adicionou-se Et<sub>3</sub>N ( $4,3 \times 10^{-2}$  mmol, 6μL). Após 10 min em agitação, adicionou-se o NCS-Bodipy-DOTA (**4.5**) (4,6 mg,

$4,3 \times 10^{-3}$  mmol). A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente. A cinética de reacção foi controlado por HPLC utilizando-se o Método B. Após 28h em agitação, o solvente foi removido e crude analisado.

ESI-MS (-): m/z 1397,2 [M-H]<sup>-</sup> (calculado: 1397,5); 1435,1 [M+K-2H]<sup>-</sup> (calculado: 1435,5)

HPLC (método B): 13,86 min

**6.3.5.5. Síntese do E2-Bodipy-DOTA-2 (4.7)**

A uma solução de 0,250 mL de DMF contendo contendo 1 mg de **4.1** ( $2,6 \times 10^{-3}$  mmol) adicionou-se  $\text{Et}_3\text{N}$  ( $4,3 \times 10^{-2}$  mmol). Após 10 min em agitação, adicionou-se o 1,5 eq

de NCS-Bodipy-DOTA (**4.5**) (4,5 mg,  $4,3 \times 10^{-3}$  mmol). A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente. A cinética de reacção foi controlada por HPLC utilizando-se o Método B. Após 24h em agitação, removeu-se o solvente e obteve-se 6 mg de crude castanho avermelhado.

A análise por ESI-MS de alta resolução demonstrou a formação do composto pretendido.

**ESI-MS (-):** m/z 1399,2 [ $\text{M-H}^-$ ] (calculado: 1399,5); 1437,1 [ $\text{M+K-2H}^-$ ] (calculado: 1437,5)

**HPLC (método B):** 13,98 min

## 6.4. Determinação da afinidade de ligação aos receptores de estrogénio ( $\text{RE}\alpha$ e $\text{RE}\beta$ )

Os ensaios de ligação competitiva aos receptores de estrogénio foram baseados num método descrito na literatura com ligeiras modificações.<sup>265</sup> Uma solução do composto em estudo numa mistura de  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (10 mM) foi diluída para várias concentrações (1 nM-50  $\mu\text{M}$ ) com uma solução tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5, contendo 10% glicerol, 2 mM DTT, e 1mg/mL de BSA. A 50  $\mu\text{L}$  de cada uma dessas soluções adicionou-se 45  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $^3\text{H}$ -estradiol ( $(2,4,6,7\text{-}^3\text{H})\text{E}_2$ , GE Healthcare) diluído no mesmo tampão (23,8 nM) e 5  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo o receptor  $\alpha$  ou o receptor  $\beta$  isolado (0,25 pmol). A ligação não específica foi determinada pela adição de estradiol não radioactivo na concentração de 50  $\mu\text{M}$  (**NSB**). A mistura foi incubada a 4 °C durante cerca de 18h após o que se adicionou 200  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de hidroxiapatite (HAP) (Calbiochem) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, e agitou-se a mistura três vezes durante 15 min, a 4°C. Seguidamente adicionou-se 1 mL de um tampão de lavagem, Tris-HCl 40 mM, pH 7,4 e 100 mM KCl ( $\text{RE}\alpha$ ) ou Tris-HCl 40 mM, pH 7,4 ( $\text{RE}\beta$ ). A mistura foi agitada e centrifugada a 10000g durante 10 min e o sobrenadante, contendo o  $^3\text{H}$ -

estradiol não ligado ao receptor, foi desprezado. A lavagem foi repetida duas vezes. Os precipitados de HAP foram resuspenso em 750 µL de EtOH frio, para extrair o complexo <sup>3</sup>H-estradiol-receptor. Após agitação durante 20 min e posterior centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para tubos contendo o líquido de cintilação (4 mL) e a actividade foi medida num contador de cintilação líquido (Packard Tri-CARB 3770 TR/SL). Os ensaios foram realizados em triplicado. Cada ensaio foi realizado usando o 17β-estradiol como referência. A actividade medida foi expressa em cpm.

A determinação da quantidade de <sup>3</sup>H-estradiol ligado foi determinada pela equação seguinte:

$${}^3\text{H} - \text{estradiol ligado (\%)} = \frac{B - \text{NSB}}{B_0 - \text{NSB}} \times 100$$

Em que,

- **B** = valor de contagem de <sup>3</sup>H-estradiol ligado ao receptor (cpm)
- **B<sub>0</sub>** = valor de contagem da ligação máxima de <sup>3</sup>H-estradiol (cpm)
- **NSB** = ligação não específica, correspondente aos tubos contendo a concentração de 50 µM de 17β-estradiol.

Os valores obtidos foram expressos em percentagem de ligação específica de <sup>3</sup>H-estradiol ao receptor vs logaritmo da concentração do composto em estudo ou do composto referência. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados através do programa de análise de dados GraphPad's Prism e representam a concentração de composto necessário para reduzir em 50% a ligação de <sup>3</sup>H-estradiol ao receptor.

Os valores de RBA foram determinados pela razão entre a concentração de 17β-estradiol e a concentração do composto em teste necessárias para inibir 50% a ligação ao receptor.

$$\text{RBA} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ 17}\beta - \text{estradiol}}{\text{IC}_{50} \text{ composto em teste}} \times 100$$

## 6.5. Síntese, caracterização e avaliação biológica dos complexos radioactivos

Todos os procedimentos que envolveram a utilização de compostos radioactivos foram efectuados de acordo com as regras de protecção e segurança radiológica estabelecidas no

Programa de Protecção Radiológica do Laboratório de I&D em Radiofarmácia para a utilização de fontes radioactivas não seladas.

### 6.5.1. Medição da Actividade das Soluções Radioactivas

A actividade das soluções radioactivas de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$ , foi medida numa câmara de ionização (Aloka, Curimeter IGC3, Tokyo, Japan). Todas as amostras, cuja actividade era inferior a 1  $\mu\text{Ci}$ , foram medidas num contador gama (Berthold, LB2111, Germany).

### 6.5.2. Procedimento Geral para a Síntese dos Complexos de $^{111}\text{In}$

A 190  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão acetato 0,4 M, pH 5 adicionou-se 5-15  $\mu\text{L}$  duma solução stock de ligando (**L1-L6**), seguida da adição de 10-30  $\mu\text{L}$  de solução de  $^{111}\text{InCl}_3$ . As condições experimentais utilizadas para obtenção dos respectivos complexos de  $^{111}\text{In}$  estão descritas na **tabela 5.1**. Os complexos de  $^{111}\text{In}$  foram obtidos com rendimentos <95%.

**Tabela 5.1:** Condições experimentais utilizadas na preparação dos complexos de  $^{111}\text{In}$  ( $^{111}\text{InL1}$ - $^{111}\text{InL6}$ )

Complexo	Concentração de ligando	Condições experimentais	Rendimento (%)
$^{111}\text{InL1}$	[L1] = $1,0 \times 10^{-4}\text{M}$	pH 5, t.a., 10 min	$\geq 98$
$^{111}\text{InL2}$	[L2] = $5,5 \times 10^{-5}\text{M}$	pH 5, 95°C, 20 min	$\geq 97$
$^{111}\text{InL3}$	[L3] = $5,5 \times 10^{-5}\text{M}$	pH 5, 95°C, 20 min	$\geq 95$
$^{111}\text{InL4}$	[L4] = $5,5 \times 10^{-5}\text{M}$	pH 5, 95°C, 20 min	$\geq 95$
$^{111}\text{InL5}$	[L5] = $1,0 \times 10^{-4}\text{M}$	pH 5, 95°C, 20 min	$\geq 95$
$^{111}\text{InL6}$	[L6] = $1,0 \times 10^{-4}\text{M}$	pH 5, 95°C, 20 min	$\geq 95$

### 6.5.3. Procedimento Geral para a Síntese dos Complexos de $^{67}\text{Ga}$

#### 6.5.3.1. Conversão do citrato de $^{67}\text{Ga}$ a cloreto de $^{67}\text{Gálio}$ ( $^{67}\text{GaCl}_3$ )<sup>212</sup>

A conversão do citrato de  $^{67}\text{Ga}$  a  $^{67}\text{GaCl}_3$  foi efectuada segundo o método descrito por Scasnár com ligeiras modificações.<sup>212</sup> Numa coluna Sep-Pak de sílica-gel adicionou-se 2 mL de citrato- $^{67}\text{Ga}$ . Em seguida eluiu-se a coluna com 10 mL de água de modo a remover os iões citrato. Os iões  $^{67}\text{Ga(III)}$  foram depois removidos com 3 mL de uma solução 0,1N de HCl e recolhidos em fracções de 0,500 mL. A taxa de conversão de citrato- $^{67}\text{Ga}$  a  $^{67}\text{GaCl}_3$  foi superior a 90%, não se observando a presença de colóides nem de citrato de  $^{67}\text{Ga}$  livre, após análise da pureza radioquímica nos seguintes sistemas de ITLC:

ITLC-SG (piridina/EtOH/H<sub>2</sub>O (1:2:4)):citrato de  $^{67}\text{Ga}$  ( $R_f= 0,89$ );  $^{67}\text{GaCl}_3$  ( $R_f= 0,44$ )

ITLC-SG (0,9 % NaCl/0,1 N HCl (25:0,5)). Colóides ( $R_f=0$ );  $^{67}\text{GaCl}_3$  ( $R_f= 1$ )

#### 6.5.3.2. Síntese dos complexos de $^{67}\text{Ga}$

A 190  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão acetato 0,4 M a pH 5 adicionou-se 10-15  $\mu\text{L}$  duma solução-mãe de ligando (**L2** ou **L7**), seguida da adição de 250  $\mu\text{L}$  de solução de  $^{67}\text{GaCl}_3$ . Sucintamente, as condições reaccionais para a obtenção dos complexos de  $^{67}\text{Ga}$  estão descritas na **tabela 5.2**.

**Tabela 5.2:** Condições experimentais utilizadas na preparação dos complexos de  $^{67}\text{Ga}$  ( $^{67}\text{GaL2}$ - $^{67}\text{GaL6}$ )

Complexo	Concentração de Ligando	Condições Experimentais	Rendimento (%)
$^{67}\text{GaL2}$	[L2] = $1,0 \times 10^{-4}\text{M}$	pH 5, 95°C, 20 min	<95
$^{67}\text{GaL7}$	[L7] = $5,5 \times 10^{-5}\text{M}$	pH 5, 95°C, 20 min	<95

### 6.5.4. Determinação da Pureza Radioquímica

A pureza radioquímica dos complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  foi determinada por RP-HPLC e ITLC de acordo com as condições descritas neste capítulo (secção 5.2.). Os complexos de  $^{111}\text{In}$  e

$^{67}\text{Ga}$  foram caracterizados por comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção dos complexos análogos não radioactivos de In e Ga tal como apresentados nas tabelas 2.5. e 2.7. (secção 2.3.1.).

### 6.5.5. Determinação da Lipofilia dos Complexos Radioactivos

A lipofília dos complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  foi avaliada por determinação do coeficiente de partição ( $D_{o/a}$ ) no sistema bifásico *n*-octanol (*o*)/ PBS (*a*), a pH = 7,4. Para esse efeito, efectuaram-se duas extracções sucessivas em *n*-octanol/PBS 0,1M a pH 7,4. Para a 1ª extracção, adicionou-se a 1 tubo de centrífuga, 1 mL de *n*-Octanol (fase orgânica) e 1 mL de PBS (fase aquosa). Agitou-se energicamente em vortex durante um minuto adicionando-se depois, 100  $\mu\text{L}$  de solução de complexo radioactivo. Após agitação durante um minuto, para permitir a partição do complexo radioactivo pelas duas fases, centrifugou-se depois durante 10 minutos a 3000 rpm (CR4 11, Jouan) de forma a garantir uma separação eficiente entre as fases. Retiraram-se 3 alíquotas de igual volume de cada fase e mediu-se a radioactividade de ambas num contador gama (Berthold, LB 2111, Germany). Para a 2ª extracção, retirou-se 500  $\mu\text{L}$  da fase com maior actividade à qual se adicionou 500  $\mu\text{L}$  de fase oposta, *n*-Octanol ou PBS, repetindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para a primeira extracção.

O Coeficiente de Partição foi calculado segundo a expressão seguinte:

$$D_{o/a} = C_o/C_a$$

Em que:

- $D_{o/a}$  = coeficiente de partição,
- $C_o$  = radioactividade na fase orgânica
- $C_a$  = radioactividade na fase aquosa

Os resultados foram expressos em  $\log D_{o/a}$ .

### 6.5.6. Ensaios de Estabilidade *in vitro*

A estabilidade *in vitro* dos complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  foi estudada por determinação da sua pureza radioquímica, avaliada por HPLC e ITLC-SG ao longo do tempo de incubação, a 37°C. Os estudos de estabilidade *in vitro* foram efectuados por diluição do 50 $\mu\text{L}$  de cada complexo em 500  $\mu\text{L}$  de PBS e soro humano. Foi também avaliada a transquelatação na presença de excesso de DTPA e apo-transferrina.

Após diferentes períodos de incubação, efectuou-se o controlo de qualidade por HPLC e ITLC-SG para avaliar a presença de eventuais impurezas radioquímicas.

#### **6.5.6.1. Estabilidade em PBS**

A 500 µL de tampão PBS (pH 7,4) adicionou-se 50 µL de solução de cada complexo de  $^{111}\text{In}$  ou  $^{67}\text{Ga}$  e incubou-se a 37°C em banho termostaticado. Retiram-se alíquotas após 1h, 3h, 24h e 120h, que foram analisadas por HPLC e ITLC-SG para avaliar a presença de eventuais impurezas radioquímicas.

#### **6.5.6.2. Estabilidade em soro humano**

A 500 µL de soro humano adicionou-se 50 µL de solução de cada complexo de  $^{111}\text{In}$  ou  $^{67}\text{Ga}$  e incubou-se a 37°C em banho termostaticado. Ao fim de 1h, 3h, 24h, 120h retiraram-se alíquotas de 60µL as quais foram tratadas com 120 µL de etanol mantido a 4 °C para precipitar as proteínas séricas. Seguidamente centrifugaram-se a 3000 rpm durante 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi analisado HPLC e ITLC-SG.

#### **6.5.6.3. Transquelatação para DTPA**

A 500 µL de uma solução de tampão acetato, pH 5, contendo um excesso molar de 1000x de DTPA (0,05M-0,1M) adicionou-se 50 µL de solução de cada complexo de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$ . e incubou-se a 37°C em banho termostaticado. Retiram-se alíquotas após 1h, 3h, 24h e 120h, que foram analisadas por HPLC e ITLC-SG para avaliar a presença de eventuais impurezas radioquímicas

#### **6.5.6.4. Transquelatação para a apo-transferrina**

A 200 µL de uma solução de apo-transferrina (3mg/mL tampão bicarbonato pH 7.4) adicionou-se 50 µL de solução radioactiva. A solução foi incubada a 37°C e a estabilidade analisada por HPLC e ITLC-SG em alíquotas após de 1h, 3h, 24h e 120h de incubação.

## 6.6. Estudos em Células Tumorais

### ***Linhas Celulares***

**MCF-7:** linha celular humana do adenocarcinoma da mama, que expressa receptores de estrogénio, subtipo  $\alpha$  (RE $\alpha$  +), adquirida na American Type Culture Collection (ATCC, Barcelona, Spain)

**MDA-MB-231-** linha celular humana do adenocarcinoma da mama, que não expressa receptores de estrogénio (RE-)

### ***Culturas de Células***

As linhas celulares MCF-7 e MDA-MB-231- foram cultivadas em condições de assepsia no meio de cultura DNEM Glutamax I (Gibco, *Invitrogen life- Technologies*, reino Unido) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) (Gibco, *Invitrogen Life- Technologies*, Reino Unido) inactivado pelo calor e 1% (v/v) de solução de antibióticos de Penicilina (100U/mL)/Estreptomicina (10 $\mu$ g/mL).

As linhas celulares foram mantidas numa incubadora em atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (Heraeus, Germany). O meio de cultura foi mudado de 2 em 2 dias ou de 3 em 3 dias.

Em cada fase de crescimento (P0, P1, P2,...), o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS, pH= 7,2 (tampão fosfato em solução salina). Em seguida, incubaram-se as células com 1 mL de tripsina-EDTA (Gibco) até que as células se destacassem do frasco adicionando-se depois 3 mL de meio de cultura para inactivar a acção da tripsina. As células foram transferidas para outro frasco de cultura adicionando-se mais meio ou utilizadas para os ensaios de captação celular após a contagem do número de células e estudo da viabilidade celular. As células utilizadas nos ensaios encontram-se em fase de crescimento logarítmico.

Após contagem e determinação da viabilidade celular, foram preparadas suspensões celulares das células MCF-7 e MBA-MB-231 nas seguintes condições: meio DNEM sem indicador de pH vermelho de fenol e suplementado com 10% (v/v) de FBS inactivado pelo calor e tratado com carvão activado e 1% (v/v) de solução de antibióticos de penincilina (100U/mL)/Estreptomicina (10 $\mu$ g/mL), com uma concentração de aproximadamente 4 x 10<sup>5</sup> células/mL. As suspensões foram de seguida repartidas por placas de poços (0,5 mL/poço) e incubadas durante 48 horas em estufa com atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, antes da realização dos ensaios de captação celular.

### **Contagem das Células e Determinação da Viabilidade Celular**

A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com corante azul de tripano. A 30 µL de suspensão celular adicionou-se igual volume de azul de tripano 0,4% (Sigma Chemical, St Louis, EUA). A suspensão corada foi colocada num hemocitómetro (câmara de NEUBAUER) e observada num microscópio óptico. O princípio deste método baseia-se na entrada do corante apenas nas células não viáveis cuja membrana se encontra danificada. Assim, enquanto as células não viáveis coram de azul, as viáveis permanecem não coradas. A viabilidade é expressa em percentagem de células não coradas relativamente ao número total de células.

As células foram contadas nos quatro quadrantes dos cantos do hemocitómetro e o número de células foi calculado de acordo com a seguinte expressão:

$$n^{\circ} \text{ células} = n^{\circ} \text{ médio de células em cada quadrante} \times \text{diluição} \times 10^4$$

Os resultados foram expressos em nº de células/mL de suspensão celular.

#### **6.6.1. Estudos de Captação Celular**

Após remover o meio de cultura procedeu-se à adição de soluções dos compostos em estudo, diluídos nos respectivos meios de cultura (25 kBq/mL). Após 15min, 30min, 1h, 2h e 3h, a 37°C sob atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi removido e recolhido num tubo, as células lavadas e neutralizadas com 2x 500µL de tampão PBS, mantido a 4°C, sendo depois lisadas com 500µL de NaOH 1N. as células solubilizadas foram recolhidas num tubo e a actividade captada medida num contador gama. Para cada tempo de incubação foram realizados quatro replicados. Para verificar se a captação dos compostos nas células era mediado pelos RE, foram realizados ensaios em paralelo, em que as células foram previamente saturadas pela adição de 100 µL de uma solução 10 µM de estradiol. A % de captação total foi calculada segundo a expressão seguinte:

$$\% \text{ Captação Total} = \frac{\text{Radioactividade medida no sedimento celular (cpm)}}{\text{Radioactividade total (cpm)}} \times 100$$

Com os dados experimentais traçaram-se curvas de % captação por milhão de células vs tempo de incubação.

### **6.6.2. Inibição da Proliferação Celular**

A inibição da proliferação celular foi determinada pelo método de MTT, utilizando a linha celular MCF-7. As células foram cultivadas em placas de 96 poços com 200  $\mu$ L de meio DMEM completo e incubadas a 37°C durante 24h para permitir a aderência das células. Após esse período, adicionaram-se soluções dos compostos em estudo preparadas a partir de uma solução stock de 10mM em DMSO/EtOH através de seis diluições sucessivas em DMEM/F12 sem vermelho de fenol e suplementado com FBS tratado com carvão activado. A concentração final de DMSO no meio de cultura celular não excedeu 1%. Os grupos de controlo, com ou sem DMSO (1%) foram incluídos nos ensaios. Análise de sobrevivência celular foi realizada ao fim de 72 h de exposição celular aos compostos através do método do MTT [brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]. Em resumo, uma solução de MTT dissolvida em PBS (0,5 mg/mL) foi adicionado a cada poço (200  $\mu$ l) e as placas foram incubadas a 37°C durante 3-4 h. Após este tempo, o meio foi descartado e 200  $\mu$ L de DMSO foi adicionado a cada poço para dissolver os cristais de formazan. A absorvância foi medida a 570 nm com um espectrofotómetro de placas (Power Wave Xs, BioTek). Cada experiência foi repetida pelo menos duas vezes e cada concentração foi testada com pelo menos seis replicados. Os resultados foram expressos em percentagem de sobrevivência em relação aos controlos (células sem tratamento) na ausência do composto. Os valores de IC<sub>50</sub> (concentração do composto que induz 50% de morte celular) foram calculados a partir de curvas construídas traçando a sobrevivência das células (%) vs. a concentração do composto (M). Os valores de IC<sub>50</sub> foram analisados com o software GraphPad Prism.

### **6.6.3. Determinação de Captação Celular por Microscopia de Fluorescência Confocal com Células Vivas**

A avaliação da captação celular por microscopia de fluorescência confocal foi efectuada pelos Doutores Fernanda Marques e José Rino no Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

A captação celular dos compostos **3.8**, **4.3** e **4.4** foi visualizada através da realização de imagens de fluorescência em “time-lapse” de células MCF-7 vivas. Resumidamente, cerca de  $10^5$  células/mL foram cultivadas em placas de Petri estéreis de 35 mm (MatTek, Ashland, MA).

No caso do composto **3.4**, após 24 h de incubação a 37°C, as células foram tratadas com duas sondas fluorescentes diferentes, o dehidroetídio (DHE) ( $\lambda_{\text{ex}}$  500;  $\lambda_{\text{em}}$  600) ou o DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol;  $\lambda_{\text{ex}}$  350 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  480nm) (Molecular Probes, Invitrogen) na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  durante 10 min a 37°C. O DHE é um composto que entra no citoplasma sendo depois oxidado a etídio que tem emissão de fluorescência no vermelho.

No caso dos compostos **4.3** e **4.4**, foi utilizado o marcador Hoechst (Molecular Probes, Invitrogen). Após a marcação, as células foram lavadas três vezes com PBS e mantidas em meio DMEM/F12 sem vermelho de fenol para a realização das imagens ao vivo com os compostos.

As células foram então fotografadas com um microscópio Zeiss LSM 510 META, um microscópio de varrimento a laser confocal invertido (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com uma incubadora para controlo de temperatura a 37°C (Pecon, Alemanha) utilizando um PlanApochromat 63 $\times$ /1.4 com uma objectiva de imersão a óleo. O etídio foi detectado utilizando a linha de laser (45 mW de potência nominal) a 514 nm e de um filtro a 615 nm. O DAPI foi detectado utilizando um diodo laser (50 mW de potência nominal) de 405 nm e um filtro de 420-480 nm. A fluorescência dos compostos foi detectada utilizando a linha de laser 488 nm (**3.8**) do mesmo filtro e um laser de Argon de 500-550 nm ou a 514 nm (**4.3** e **4.4**) com um laser de Argón (45 mW de potência nominal) e um filtro 530-600 nm.

Após a adição dos compostos **3.8**, **4.3** e **4.4** na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , foram adquiridas imagens sequenciais em cada minuto durante um período de tempo de 1h a verde (**3.8**), vermelho (etídio) e azul (DAPI ou Hoechst) e verde (**4.3** e **4.4**).

## 6.7. Estudos de Biodistribuição

O comportamento *in vivo* dos complexos de  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$  em estudo foi avaliado em grupos de 3-4 ratos fêmea imaturos da estirpe Sprague-Dawley ou em ratinho da estirpe CD-1, adquiridos à Charles River Laboratories, França.

As condições experimentais de realização dos ensaios biológicos satisfizeram as orientações técnicas relativas ao alojamento e cuidados a prestar a pequenos roedores,

definidas no Decreto-Lei nº 113/2013 de 7 de Agosto, que transpõe para a ordem jurídica interna a Directiva nº2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece as regras relativas ao bem-estar dos animais utilizados em procedimentos científicos reforçando as normas mínimas relativas à sua protecção.

No decorrer dos ensaios os animais foram mantidos com dieta normal *ad libitum*.

### **6.7.1. Biodistribuição em rato**

A distribuição biológica dos complexos  $^{111}\text{InL5}$ ,  $^{111}\text{InL6}$ ,  $^{67}\text{GaL2}$  e  $^{67}\text{GaL7}$  foi efectuada por administração intravenosa na veia da cauda de 0,7-5,0 MBq (20-135  $\mu\text{Ci}$ ) em aproximadamente 100 $\mu\text{L}$  de solução de NaCl 0,9%, a grupos de 3 ratos fêmea imaturos da estripe Sprague Dawley. Os animais utilizados tinham aproximadamente 40 a 50 gramas de massa. A actividade administrada a cada animal (diferença entre a actividade medida na seringa cheia e a medida da seringa vazia) foi medida em câmara de ionização. Após administração dos compostos (1, 2 e 24 horas), os animais foram sacrificados por excesso de anestésico. A um grupo de animais os receptores de estrogénio foram previamente bloqueados por administração de 5 mg de estradiol em solução de soro fisiológico contendo 10% de etanol. Os animais foram dissecados, recolhidos os órgãos de interesse, pesados e medida a actividade dos mesmos em contador gama. Os resultados foram expressos em termos de percentagem de actividade injectada por grama de órgão (% AI/ g órgão). Sempre que possível recolheu-se a urina imediatamente após o sacrifício para posterior análise por HPLC.

### **6.7.2. Biodistribuição em ratinho**

A distribuição biológica dos complexos  $^{111}\text{InL1}$  e  $^{111}\text{InL2}$ , foi estudada por administração intravenosa na veia da cauda de 0,7-2,8 MBq (20-75  $\mu\text{Ci}$ ) em aproximadamente 100 $\mu\text{L}$  de solução de NaCl 0,9%, a grupos de 3 ratinhos fêmea da estripe CD1 da Charles River. Os animais utilizados tinham entre 20 e 25 dias de idade e aproximadamente 20 gramas de massa. A actividade administrada a cada animal foi medida em câmara de ionização. Após administração dos compostos (1 e 2 horas), os animais foram sacrificados por deslocação cervical. Os órgãos de interesse foram dissecados, recolhidos, pesados e medida a actividade dos mesmos em contador gama. Os resultados foram expressos em termos de percentagem

de actividade injectada por grama de órgão (% AI/ g órgão). Sempre que possível recolheu-se a urina no momento de sacrifício para posterior análise por HPLC.

### 6.7.3. Ensaios de Estabilidade *in vivo*

A estabilidade *in vivo* dos complexos radioactivos foi avaliada por análise em RP-HPLC de amostras de urina e de soro dos ratinhos. Assim, no momento do sacrifício recolheram-se amostras de sangue por punção cardíaca e amostras de urina.

**Urina:** A urina foi centrifugada durante 10 min a 3000 rpm e o sobrenadante analisado por HPLC.

**Sangue:** Após retracção do coágulo, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 min para separar o soro. Retiraram-se alíquotas de 100 µL de soro, as quais foram tratadas com 200 µL de etanol mantido a 4°C para precipitar as proteínas séricas. Seguidamente centrifugaram-se a 3000 rpm durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi analisado por HPLC.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



## Referências Bibliográficas

---

- [1] World Health Organization, Fact sheet nº297, *Cancer*, 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> consultado a 03 Dez 14
- [2] F. Bray, J.-S. Ren, E. Massueyer, J. Ferlay, "Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008", *Int. J. Cancer*, **2013**, 132, 1133-1145
- [3] GLOBOCAN 2012
- [4] <http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama.html> Portal de Oncologia Português, consultado a 26 Jul 2013
- [5] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lorlet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W.. Coebergh, H. Comber, D. Forman, F. Bray, "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012", *Eur. J. Cancer*, **2013**, 49, 1374-1403
- [6] R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal "Cancer statistics, 2013", *CA CANCER*, **2013**, 63, 11-30
- [7] S. Cunha, L. Gano, G. R. Morais, T. Thiemann, M. C. Oliveira; "Progesterone receptor targeting with radiolabelled steroids: An approach in predicting breast cancer response to therapy", *J of Steroid Biochem Mol Biology*, **2013**, 137, 223-241
- [8] G. Tinoco, S. Warsch, S. Glück, K. Avancha, A. J. Montero, "Treating breast cancer in the 21<sup>st</sup> century: emerging biological therapies", *J. Cancer*, **2013**, 4, 117-132
- [9] M. Dowsett, A. K. Dunbier, "Emerging biomarkers and new understanding of traditional markers in personalized therapy for breast cancer", *Clin. Cancer Res.*, **2008**, 14, 8019-8026
- [10] N. L. Henry, D. F. Hayes, "Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer", *The Oncologist*, **2006**, 11, 541-552
- [11] N. O. Keely, M. J. Meegan, "Targeting tumors using estrogen receptor ligand conjugates", *Current Cancer Drug Targets*, **2009**, 9, 370-380
- [12] M. T. Weigel, M. Dowsett, "Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction", *Endocrin. Related Cancer*, **2010**, 17, R245-R262
- [13] F. Silva, S. Carvalho, F. Milanezi, F. C. Schmitt, "Carcinoma da mama tipo basal", *Acta Med. Port.*, **2008**, 21, 373-378
- [14] P. Eroles, A. Boch, J. A. Pérez-Fidalgo, A. Lluch, "Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways", *Cancer Treat. Rev.*, **2012**, 38, 698-707
- [15] V. Veronesi, P. Boyle, A. Goldhirsch, R. Olecchia, G. Viale, "Breast cancer", *The Lancet*, **2005**, 365, 1727-1741
- [16] A.R. Cervino, M. Burei, L. Mansi, L. Evangelista, "Molecular pathways and molecular imaging in breast cancer: an update", *Nucl. Med. Biol.*, **2013**, 40, 581-591
- [17] R. Sainsbury, "The development of endocrine therapy for women with breast cancer", *Cancer Treat Rev.*, **2013**, 39, 507-517

- [18] M. E. McManaway, E. M. Jagoda, A. Kasid, W. C. Eckelman, B. E. Francis, S. M. Larson, R. E. Gibson, R. C. Reba, M. E. Lippman, “[<sup>125</sup>I]17 $\alpha$ -iodovinyl 11 $\beta$ -methoxyestradiol interaction in vivo with estrogen receptors in hormone-independent MCF-7 human breast cancer transfected with the v-ras<sup>H</sup> oncogene”, *Cancer Res.*, **1987**, 47: 2945-2949
- [19] J.D. Yager, N.E. Davidson, “Estrogen carcinogenesis in breast cancer”, *N. Engl. J. Med.*, **2006**, 354, 270–282
- [20] S. R. D. Johnston, “Enhancing the Efficacy of Hormonal Agents with Selected Targeted Agents”, *Clinical Breast Cancer*, **2009**, 9, S28-S36
- [21] G. Castoria, A. Migliaccio, P. Giovanelli and F. Auricchio, “Cell proliferation regulated by estradiol receptor: therapeutic implications”, *Steroids*, 2010, 75, 524-527
- [22] M.M. Gottesman, “Mechanism of cancer drug resistance”, *Annu Rev Med*, **2002**, 53, 615-627
- [23] A. E. Gururaj, S. K. Rayala, R. K. Vadlamudi, R. Kumar, “Novel mechanisms of resistance to endocrine therapy: genomic and nongenomic consideration”, *Clin Cancer Res*, **2006**, 12, 1001s-1007s
- [24] D. Wang, L. Hu, G. Zhang, L. Zhang, C. Chen, “G protein-coupled receptor 30 in tumor development”, *Endocr*, **2010**, 38, 29-37
- [25] American Cancer Society, *Cancer Facts & Figures*, **2014**
- [26] R. Kumar, “Targeted functional imaging in breast cancer”, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34, 346-353
- [27] E. Abraúl, D. Raimundo, C. Frutuoso, “Tratamento médico no cancro da mama”, capítulo 38, p289-304
- [28] EBCT Group, “Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials”, *The Lancet*, **2005**, 365, 1687-1717
- [29] C. Palmieri, D. K. Patten, A. Januszewski, G. Zucchini, S. J. Howell, “Breast cancer: current and future endocrine therapies”, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2014**, 382, 695-723
- [30] R. C. Coombes, E. Hall, L. J. Gibson, M. Phil, R. Paridaens, J. Jassen, T. Delozier, et al, “A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer”, *N. Engl. J. Med.*, **2004**, 350, 1081-1092
- [31] M. J. Sexton, R. B. Gherman, “Selective estrogen receptor modulators: the ideal estrogen replacement?”, *Prim. Care Update Ob/Gyns*, **2001**, 8, 25-30
- [32] B. S. Katzenellenbogen, M. M. Montano, K. Ekena, M. E. Herman, E. M. McInemey, “Antiestrogens mechanisms of action and resistance in breast cancer”, *Breast Cancer Research Treat*, **1997**, 44, 23-38
- [33] D. M. Wolf, V. C. Jordan, L. William, “Drug resistance to tamoxifen during breast cancer”, *Breast Cancer Res. Treat*, **1993**, 27, 27-40
- [34] M. P. Goetz, C. L. Loprinzi, “Aromatase inhibitors and tamoxifen: where do we go from here?”, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **2007**, 4, 626-627

- [35] S. Chumsri, T. Howes, T. Bao, G. Subnis, A. Brodie, "Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer", *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2011**, 125, 13-22
- [36] A. E. Wakeling, M. Dukes, J. A. Bowler, "A potent specific pure antiestrogen with clinical potential", *Cancer Res.*, **1991**, 51, 3867-3873
- [37] M.S.U. Hassan, J. Ansari, D. Spooner, S.A. Hussain, "Chemotherapy for breast cancer (Review)", *Oncology Reports*, **2010**, 24, 1121-1131
- [38] J. Mackey, D. Mcleod, J. Ragaz, K. Gelmon, S. Verma, K. Pritchard, K. Laing, L. Provencher, L. F. Charbonneau, "Adjuvant target therapy in early breast cancer", *Cancer*, **2009**, 115, 1154-1168
- [39] C. Chung, M. S. H. Lam, "Pertuzumab for the treatment of human epidermal growth factor receptor type 2-positive metastatic breast cancer", *Am. J. Health Syst. Pharm.*, **2013**, 70, 1579-1587
- [40] C. K. Anders, L. A. Carey, "Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer", *Clin. Breast Cancer*, **2009**, 9, S73-S81
- [41] O. Engebraaten, H. K. Vollan, A.L. Boeresen-Dale, "ripple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets", *Am. J. Pathol.*, **2013**, 183, 1064-1074
- [42] M- Liu, Q.-G. Mo, C.-Y. Wei, Q.-H. Qin, Z. Hung, J. He, "Platinum- based chemotherapy in triple-negative breast cancer: a meta-analysis", *Oncol. Lett.*, **2013**, 5, 983-991
- [43] S.A. Pierre, P.M. McGowan, M- Cotton, L. O'Driscoll, J. Grown, M. J. Duffy, "Comparative antiproliferative effects of inipurib and olaparib on panel of triple-negative and non-triple-negative breast cancer cell lines", *Cancer Biol. Ther.*, **2013**, 14, 537-545
- [44] D. Wang, L. Hu, G. Zhang, L. Zhang, C. Chen, "G-protein-coupled receptor 30 in tumor development", *Endocrine*, **2010**, 38, 29-37
- [45] M. C. Oliveira, C. Neto, G. R. Morais, T. Thiemann, "steroid receptor ligands for breast cancer targeting: an insight into their potential role as PET imaging agents", *Curr. Med. Chem.*, **2013**, 20, 222-245
- [46] J. M. Olefsky, "Nuclear receptor minireviews series", *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 36863-36864
- [47] E. R. Prossnitz, J. B. Arterburn, H. O. Smith, T. I. Oprea, L. A. Sklar, H. J. Hathaway, "Estrogen signaling through the transmembrane G-protein-coupled receptor GPR30", *Annu. Rev. Physiol*, **2008**, 70, 165-190
- [48] D. Toft, J. Gorski, "A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1966**, 55, 1574-1581
- [49] G.G. Kuiper, "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ ", *Endocrinol.*, **1997**, 138, 863-870
- [50] J.A. Gustafsson, "Estrogen receptor  $\beta$ - a new dimension in estrogen mechanism of action", *J. Endocrinol.*, **1999**, 163, 379-383
- [51] S. T. Pearce, V. C. Jordan, "The biological role of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer", *Critical Rev. Oncology/Hematology*, **2004**, 50, 3-22
- [52] Z. Bai, R. Gust, "Breast cancer, estrogen receptor and ligands", *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **2009**, 342, 133-149

- [53] S. Mosselman, J. Polman, R. Dijkema, "ER $\beta$  identification and characterization of a novel human estrogen receptor", *FEBS Letters*, **1996**, 392, 49-53
- [54] M. Muramatsu, S. Inoue, "Estrogen Receptors: How Do They Control Reproductive and Nonreproductive Functions?", *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **2000**, 270, 1-10
- [55] M. Maggiolini, D. Picard, "The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor", *J. Endocrinol.*, **2010**, 204, 105-114
- [56] E. R. Prossnitz, J. B. Arterburn, B. S. Edwards, L. A. Sklar, T. I. Oprea, "Steroid-binding G-protein-Coupled receptors: new drugs discovery targets for old ligands", *Expert Opin. Drug Discov.*, **2006**, 137-150
- [57] P. Thomas, Y. Pang, E. J. Filardo, J. Dong, "Identify of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells", *Endocrinol.*, **2005**, 146, 624-632
- [58] C. Ramesh, T. K. Nayak, R. Burai, M. K. Dennis, H. J. Hathaway, L. A. Sklar, E. R. Prossnitz, J. B. Arterbur, "Synthesis and Characterization of Iodinated Tetrahydroquinolines Targeting the G Protein-coupled Estrogen Receptor GPR30", *J. Med. Chem.*, **2010**, 43, 1004-1014
- [59] R. Burai, C. Ramesh, T. K. Nayak, M. K. Dennis, B. K. Bryant, ; E. R. Prossnitz, J. B. Arterburn, "Synthesis and Characterization of Tricarbonyl-Re/Tc(I) Chelate Probes Targeting the G Protein-Coupled Estrogen Receptor GPER/GPR30", *PLoS One*, **2012**, 7, e46861
- [60] T. Ignatov, S. Modl, M. Thuling, C. Weibenborn, O. Treeck, O. Ortmann, A. C. Zenclussen, S. Dan Costa, T. Kalinski, A. Ignatov, "PPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer", *J. Ovarian Res.*, **2013**, 6, 51-61
- [61] T. Ignatov, C. Weibenborn, A. Poehlmann, A. Lemke, A. Semczuk, A. Roessner, S. Dan Costa, T. Kalinski, A. Ignatov, "GPER-1 expression decreases during breast cancer tumorigenesis", *Cancer Invest.*, **2013**, 31, 309-315
- [62] T. Giraldi, P. Giovannelli, M. Di Donato, G. Castoria, A. Migliaccio, F. Auricchio, "Steroid signaling activation and intracellular localization of sex steroid receptors", *J. Cell Commun. Signal*, **2010**, 4, 161-172
- [63] G.B. Saha, "Fundamentals of nuclear pharmacy", 5<sup>th</sup> edition, Springer-Verlag Inc., **2003**, 383pp
- [64] E. Marinho, "Elementos da física nuclear", edição de autor, ITN, **1999**, 61pp
- [65] R. J. Kowalsky, S. W. Falen, "Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine", 2<sup>nd</sup> edition, American Pharmacists Association (APhA), **2004**, 825pp
- [66] C. F. Ramogida, C. Orvig, "Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy", *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 4720-4739
- [67] S. Juisson, D. Berning, W. Jia, D. Ma, "Coordination compounds in nuclear medicine", *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1137-1156
- [68] C. S. Cutler, H. M. Hennkens, N. Sisay, S. Huclier-Markai, "Radiometals for combined imaging and therapy", *Chem. Rev.*, **2013**, 113, 858-883
- [69] C. J. Anderson, M. J. Welch, "Radiometal-labeled agents (non-technetium) for diagnostic imaging", *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2219-2234

- [70] W. Wadsak, M. Mitterchauser, "Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT", *Eur. J. Radiology*, **2010**, 73, 461-469
- [71] B. M. Zeglis, J. S. Lewis, "A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography", *Dalton Transactions*, **2011**, 40, 6168-6195
- [72] M. J. Clarke, P. J. Sadler, "Metallopharmaceuticals II: diagnosis and therapy", Springer-Verlay, **1999**, 216pp
- [73] S. Liu, "The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals", *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33, 445-461
- [74] S. Bhattacharyya, M. Dixit, "Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceutical", *Dalton Transactions*, **2011**, 40, 6112-6128
- [75] S. L. Pimlott, A. Sutherland, "Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease", *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 149-162
- [76] A. Valentini, D. Pucci, A. Crispini, G. Federici, S. Bernardini, "Acridine orange based platinum (II) complexes inducing cytotoxicity and cell cycle perturbation in spite of GSTP1 up-regulation", *Chem. Biol. Interact.*, **2006**, 161, 241-250
- [77] F. Buchegger, F. Perillo-Adamer, Y. M. Dupertuis, A. B. Delaloye, "Auger radiation targeted into DNA: a therapy perspective", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.*, **2006**, 33, 1352-1363
- [78] A. Crispini, D. Pucci, S. Sessa, A. Cataldi, A. Napoli, A. Valentini, M. Ghedini, "Synthesis and characterization of new transition metal complexes containing DNA intercalators of acridine family", *New J. Chem.*, **2003**, 27, 1497-1503
- [79] M. J. Welch C.S. Redvanly, "Handbook radiopharmaceuticals: radiochemistry and application", New York, NY: J. Wiley, **2003**, 848 pp
- [80] W. A. Volkert, T. J. Hoffman, "Therapeutic radiopharmaceutical", *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2269-2292
- [81] M. T. Ercan, M. Caglar, "Therapeutic radiopharmaceuticals", *Curr. Pharm. Design*, **2000**, 6, 1085-1121
- [82] G. Ferro-Flores, C. A. Murphy, L. Melendez-Alafort, "Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy", *Curr. Pharm. Analysis*, **2006**, 2, 339-352
- [83] F. Rösch, J. Brocmann, N. Lebedev, S. Quim, "production and radiochemical separation of Auger electron emitter  $^{140}\text{Nd}$ ", *Acta Oncol.*, **2000**, 39, 727-730
- [84] A. I. Kassis, "Molecular and cellular radiobiological effects of Auger emitting radionuclides", *Radiat. Prot. Dosimetry*, **2011**, 143, 241-247
- [85] A. I. Kassis, "The amazing world of Auger electrons", *Int. J. Radiat. Biol.*, **2004**, 80, 789-803
- [86] S. Lee, X. Chen, "Dual-Modality probes for in vivo molecular imaging", *Molecular Imaging*, **2009**, 8, 87-100
- [87] M. Wu, W. Wu, X. Gao, X. Lin, Z. Xie, "Synthesis of a novel fluorescent probe based on acridine skeleton used for sensitive determination of DNA", *Talanta*, **2008**, 75, 995-1001
- [88] S. Svenson, "Theranostics": are we there yet?", *Mol. Pharmaceutics*, **2013**, 10, 848-856

- [89] S. Bhattacharyya, M. Dixit, "Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals", *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 6112-6128
- [90] W. R. Harris, U. L. Pecorano, "Thermodynamic binding constants for gallium transferrin" *Biochemistry*, **1983**, 22, 292-299
- [91] W. R. Harris, Y. Chen, K. Wein, "Equilibrium constants for the binding of indium (III) to human serum transferrin", *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 4991-4998
- [92] W.R. Harris, L. Messori, "A comparative study of aluminum (III), gallium (III), indium (III), and thallium (III) binding to human serum transferrin", *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 228, 237-262
- [93] E. W. Price, C. Orvig, "Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals", *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 260-290
- [94] F. Rösch, "<sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generators and <sup>68</sup>Ga radiopharmaceutical chemistry on their way into new century", *J. Postgraduated Med., Education and Research*, **2013**, 47, 18-25
- [95] F. Rösch, "Past, present and future of <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generators", *Applied Radiation and Isotopes*, **2013**, 76, 24-30
- [96] S. Liu, "Bifunctional Coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides", *Adv. Drug Del. Rev.*, **2008**, 60, 1347-1370
- [97] R. D. Neumann, J. D. Kempt, R. E. Weiner, "Gallium-67 imaging for detection of malignant disease" In *Diagnostic Nuclear Medicine*, M. P. Sandler, R. E. Coleman, FJTh Wackers, J. A. Patton, A. Gottschalk, P. B. Hoffer (eds), **1995**, 3<sup>rd</sup> ed., Williams & Wilkins, Baltimore, pp1243-1260
- [98] N. P. Alazraki, "Gallium-67 imaging in infection". In *principles and practice of nuclear medicine*, P. J. Early and D. B. Sodee (eds), **1995**, Mosby, St Louis, pp702-713
- [99] K.-P. Eisenwiener, M. I. M. Prata, I. Buschmann, H.-W. Zhang, A. C. Santos, S. Wenger, J. C. Reubi, H. R. Macke, "NODAGATOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labeled with [<sup>67/68</sup>Ga] and [<sup>111</sup>In] for SPECT, PET, and targeted therapeutic applications of somatostatin receptor (hsst2) expressing tumors", *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 530-541
- [100] A. Cavallaro, A. Zanghi, M. Cavallaro, E. Lo Menzo, I. Di Carlo, M. Di Vita, F. Cardi, G. Piccolo, P. Di Mattia, A. Cappellani, "The role of 68-Ga-DOTATOC CT-PET in surgical tactic for gastric neuroendocrine tumors treatment: our experience: a case study", *International J. of Surgery*, **2014**, 12, S225-S231
- [101] V. Ambrosin, S. Fanti, "68Ga-DOTA-peptides in the diagnosis of NET", *PET Clin.*, **2014**, 9, 37-42
- [102] A. Cappello, E. P. Krenning, W. A. P. Breeman, B. F. Bernard. M. de Jong, "Peptide receptor radionuclide therapy in vitro using [<sup>111</sup>In-DTPA]octreotide", *J. Nucl. Med.*, **2003**, 44, 98-104
- [103] E. P. Krenning, P. P. Kooij, W. H. Bakker, W. A. Breeman, P. T. E. Postema, D. J. Kwekkeboom et al, "Radiotherapy with radiolabeled somatostatin analogue, [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe1]-octreotide. A case history", *Ann. NY. Acad. Sci.*, **1994**, 733, 496-506
- [104] M. Jamous, U. Haberkoen, W. Mier, "Synthesis of peptide radiopharmaceuticals for the therapy and diagnosis of tumor diseases", *Molecules*, **2013**, 18, 3379-3409

- [105] M. Fani, H. R. Maecke, "Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2012**, 39(supl 1), S11-S39
- [106] W. A. Breeman, M. de Jong, D. J. Kwekkeboom, T. J. Visser, E. P. Krenning, "Preclinical comparison of (111)In-labeled DTPA-or DOTA-bombesin analogs for receptor targeted scintigraphy and radionuclide therapy", *J. Nucl. Med.*, **2002**, 43, 1650-1656
- [107] M. de Visser, H. F. Bernard, J. L. Erion, M. A. Schmidt, A. Srinivasan, B. Waser, J. C. Reubi, E. P. Krenning, M. de Jong, "Novel <sup>111</sup>In-labelled bombesin analogues for molecular imaging of prostate tumors", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, 34, 1228-1238
- [108] S. Chakraborty, J. Shi, Y. S. Kim, Y. Zhou, B. Jia, F. Wang, S. Liu, "Evaluation of <sup>111</sup>In-labeled cyclic RGD peptides: tetrameric not tetravalent", *Bioconjug. Chem.*, **2010**, 21, 969-978
- [109] J. Shi, Y. Zhou, S. Chakraborty, Y. S. Kim, B. Jia, F. Wang, S. Liu, "Evaluation of In-labelled cyclic RGD peptides: effects of peptide and linker multiplicity on their tumor uptake, excretion kinetics and metabolic stability", *Theranostics*, **2011**, 1, 322-340
- [110] F. Ashoukr, A. Prignon, L. Brans, A. Jallane, S. Mendes, J. N. Talbot, D. Tourwé, J. Barbet, A. Gruaz-Guyon, "Novel DOTA-neurotensin analogues for 111in Scintigraphy and 68Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors", *Bioconjug. Chem.*, **2011**, 22, 1374-1385
- [111] M. de Visser, P. J. Janssen, A. Srinivasan, J. C. Reubi, B. Wasa, J. L. Erion, M. A. Schimidt, E. P. Krenning, M. de Jong, "Stabilised <sup>111</sup>In-labelled DTPA- and DOTA- conjugated neurotensin analogues for imaging and therapy of exocrine pancreatic cancer", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2003**, 30, 1334-1339
- [112] P. Leverman, L. Joasten, A. Eck, S. Roosenburg, P. K. Peiti, T. Main, H. Mäcke et al, "Comparative, biodistribution of 12 111In-labelled gastrin/CCK2 receptor-targeting peptides", *Eur. J. Nucl. Med. Mol imaging*, **2011**, 38, 1410-1416
- [113] J. A. O'Donoghue, T. E. Wheldon, "Targeted radiotherapy using Auger electron emitters", *Phys. Med. Biol.*, **1996**, 41, 1973-1992
- [114] M. Ginja, K. Hinni, S. Tshumi, S. Schulz, H. R. Maecke, "Trifunctional somastatin-based derivatives designed for targeted radiotherapy using Auger electron emitters", *J. Nucl. Med.*, **2005**, 46, 2097-2103
- [115] D. L. Costantini, C. Chan, Z. Cai, K. A. Vallis, R. Reilly, "111in-labeled transtuzumab (Herceptin) modified with nuclear localization sequences (NLS): an Auger electron-emitting radiotherapeutic agent for HER2/neu-amplified breast cancer", *J. Nucl. Med.*, **2007**, 48, 1357-1368
- [116] J. U. Leyton, M. Hu, C. Gao, P. V. Turner, J. E. Dick, M. Minden, R. M. reilly, "Auger electron radioimmunotherapeutic agent specific for the CD123+/CD131-phenotype of the leukemia stem cell population", *J. Nucl. Med.*, **2011**, 52, 1465-1473
- [117] . Esteves, F. Marques, A. Paulo, J. Rino, P. Nando, C. J. Smith, I. Santos, "Nuclear targeting with cells-specific multifunctional tricarbonyl M(I) (M is Re, 99mTc) complexes: synthesis, characterization, and cells studies", *J. Biol., Inorg. Chem.*, **2011**, 16, 1141-1153
- [118] Y. He, I. G. Panyulin, A. Karavana, W. Demidou, R. D. Neumann, "2Sequence-specific DNA strand cleavage by 111In-labeled peptide nucleic acids", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2004**, 31, 837-845

- [119] L. Lattuada, A. Borge, G. Gravotto, G. B. Giovenzona, L. Tei, "The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents", *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 3019-3049
- [120] S. Liu, "Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, 60, 1347-1370
- [121] S. Liu, D. S. Edwards, "Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals", *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 7-34
- [122] W. W. Wong, S. E. Schild, S. A. Vora, Ga. A. Ezzell, B. D. Nguyen, P. C. Ram, M. C. Roarke, "Image-Guided Radiotherapy for Prostate Cancer: A Prospective Trial of Concomitant Boost Using Indium-111–Capromab Pendetide (ProstaScint) Imaging, International J. of Radiation Oncol. Biol. Physics, **2011**, 81, 423-429
- [123] Y- Arano, T. Vezono, H. Akizawa, M. Ono, K. Wakisaka, M. Nakayama, H. Sakahara, J. Kanishi, A. Yokoyama, "Reassessment of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) as a chelating agent for indium-111 labeling of polypeptides using a newly synthesized monoreactive DTPA derivative", *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 3451-3460
- [124] M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, "Backbone-substituted DTPA ligands for Yttrium-90 radioimmunotherapy", *Bioconjugate Chem.*, **1994**, 2, 187-194
- [125] A. Safavy, D. C. Smith Jr, A. Bazooband, D. J. Buchsbaum, "De Novo synthesis of a new diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) bifunctional chelating agent", *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 317-326
- [126] A. Safavy, D. C. Smith Jr, A. Bazooband, D. J. Buchsbaum, "Synthesis of the first diethylenetriaminepentahydroxamic acid (DTPH) bifunctional chelating agent", *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 327-332
- [127] E. N. Sabbah, J. Kadouche, D. Ellison, C. Finucane, D. Decaudin, S. J. Mather, "In vitro and *in vivo* comparison of DTPA- and –DOTA-conjugated antiferritin monoclonal antibody for imaging and therapy of pancreatic cancer, *Nucl. Med. Biol.*, **2007**, 34, 293-304
- [128] M. A. Williams, H. Rapoport, "Synthesis of enantiomerically pure diethylenetriaminepentaacetic acid analogs. L- Phenylalanine as the educt for substitution at the central acetic acid", *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 1151-1158
- [129] J. Fichtel, A. Janecka, "Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging", *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 14, 3-17
- [130] J. C. Timmons, T. J. Hubin, "Preparations and applications of synthetic linked azamacrocyclic ligands and complexes", *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, 254, 1661-1685
- [131] A. E. Martell, R. J. Motobaitis, E. T. Clarke, R. Delgado, Y. sun, R. Ma, "Stability constants of metal complexes of macrocyclic ligands with pedent donor groups", *Supramol. Chem.*, **1996**, 6, 353-363
- [132] E. T. Clarke, A. E. Martell, "Stabilities of trivalent metal complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 14- and 14- member tetraazamacrocyclic", *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 190, 37-46
- [133] E. Balogh, R. Tripiet, R. Ruloff, E. Toth, "kinetics of formation and dissociation of lanthanide (III) complexes with the 13- membered macrocyclic ligand TRITA<sup>4-</sup>", *Dalton Trans.*, **2005**, 1058

- [134] R. Delgado, J. Costa, K. P. Guerra, L. M. P. Lima, "Lanthanide complexes of macrocyclic derivatives useful for medical applications", *Pure Appl. Chem.*, **2005**, 77, 569-579
- [135] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, "Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease", *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2858-2902
- [136] K.-P. Eisenviener, P. Powell, H. R. M. A convenient synthesis of novel bifunctional prochelators for coupling to bioactive peptides for radiometal labelling", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 2133-2135
- [137] M. C. Oliveira, C. Neto, L. Gano, F. Marques, I. Santos, T. Thiemann, A. C. Santos, F. Botelho, C. F. Oliveira, "Estrogen receptor ligands for targeting breast tumours: a brief outlook on radioiodination strategies", *Curr. Radiopharm.*, **2012**, 5, 124-141
- [138] G. M. Anstead, K. E. Carlson, J. A. Katzenellenbogen, "The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site", *Steroids*, **1997**, 62, 268-303
- [139] J. P. Raynaud, T. Ojasoo, "The design and use of sex-steroid antagonists", *J. Steroid Biochem.*, **1986**, 25, 811-833
- [140] H. Ali, J. Rousseau, T. G. Gantchev, J. E. Van Lier, "2- and 4-fluorinated 16 $\alpha$ -[<sup>125</sup>I]iodoestradiol derivatives: synthesis and effect on estrogen receptor binding and receptor-mediated target tissue uptake", *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 4255-4263
- [141] H. F. VanBoklin, A. Liu, M. J. Welch, J. P. O'Neil, J. A. Katzenellenbogen, "The synthesis of 7 $\alpha$ -methyl-substituted estrogens labeled with fluorine-18: potential breast tumour imaging agents", *Steroids*, **1994**, 59, 34-45
- [142] H. Ali, J. Rousseau, T. G. Gantchev, J. E. Van Lier, "7 $\alpha$ -Methyl- and 11 $\beta$ -ethoxy- substitution of iodine 125-labeled [<sup>125</sup>I]16 $\alpha$ -iodoestradiol: effect on estrogen receptor-mediated target tissue uptake", *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 264-271
- [143] J.A. Schwartz, D.F. Skafar, "Ligand mediated modulation of estrogen receptor conformation by estradiol analogs" *Biochemistry*, **1993**, 32, 10109-10115
- [144] H.F. VanBrocklin, K.E. Carlson, J.A. Katzenellenbogen, M.J. Welch, "16 $\beta$ - ([<sup>18</sup>F]Fluoro)estrogens: systematic investigation of a new series of fluorine-18-labelled estrogens as potential imaging agents for estrogen-receptor positive breast tumours" *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1619-1629
- [145] H. Ali, J. Rousseau, J.E. van Lier, "Synthesis of A-ring fluorinated derivatives of (17 $\alpha$ ,20E/Z)-[125I]iodovinylestradiols: effect on receptor binding and receptor-mediated target tissue uptake. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 3061-3072
- [146] C. J. Mathias, M. J. Welch, J. A. Katzenellenbogen, J. W. Brodack, M.R. Kilbourn, K. E. Carlson, D. O. Kiesewetter, "Characterization of the uptake of 16 $\alpha$ -([<sup>18</sup>F]fluoro)-17 $\beta$ -estradiol in DMBA-induced mammary tumors", *Int. J. Rad. Appl. Instrum.*, **1987**, 14, 15-25
- [147] F. Dehdashti, A. H. McGuire, H. F. VanBrocklin, B. A. Siegel, D. P. Andriole, L. K. Griffeth, M. G. Pomper, J. A. Katzenellenbogen, M. J. Welch, "Assessment of 21-[<sup>18</sup>F]fluoro-16 $\alpha$ -ethyl-19-

norprogesterone as a positron-emitting radiopharmaceutical for the detection of progesterin receptors in human breast carcinomas", *J. Nucl. Med.*, **1991**, 32, 1532-1537

[148] M. Dixit, J. Shi, L. Wei, G. Afari, S. Bhattacharyya, "Synthesis of clinical-grade [<sup>18</sup>F]-fluoroestradiol as a surrogate PET biomarker for the evaluation of estrogen receptor-targeting therapeutic drug", *Int. J. Mol. Imaging*, **2013**, ID 278607, 10 pages

[149] D. A. Mankoff, T. J. Tewson, J. F. Eary, "Analysis of blood clearance and labeled metabolites for the estrogen receptor tracer [F-18]-16 $\alpha$ -fluoroestradiol (FES)", *Nucl. Med. Biol.*, **1997**, 24, 341-348

[150] R. J. Bennink, L. J. Rijks, G. van Tierhoven, L. A. Noordwyn, A. G. Janssen, G. W. Sloof, "Estrogen receptor status in primary breast cancer: iodine 123-labeled cis 11 $\beta$ -methoxy-17 $\alpha$ -iodovinyl estradiol scintigraphy", *Radiology*, **2001**, 220, 274-2779

[151] R. J. Bennink, G. van Tienhoven, L. J. Rijks, A. L. Noorduynd, A. G. Janssen, G. W. Sloof, "In vivo prediction of response to antiestrogen treatment in estrogen receptor-positive breast cancer", *J. Nucl. Med.*, **2004**, 45, 1-7

[152] F. Le Bideau, S. Dagonne, "Synthesis of Transition-Metal Steroid Derivatives", *Chemical Rev.*, **2013**, 113, 7793-7850

[153] X. Zhang, Z. Zuo, J. Tang, K. Wang, C. Wang, W. Chen, C. Li, W. Xu, X. Xiong, K. Yantai, J. Huang, X. Lan, H.-B. Zhou, "Design, synthesis and biological evaluation of novel estrogen-derived steroid metal complexes", *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **2013**, 23, 3793-3797

[154] C. Neto; M. C. Oliveira; L. Gano; F. Marques; T. Thiemann; I. Santos, "Novel estradiol based metal complexes of Tc-99m", *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 111, 1-9

[155] L. Huang, H. Zhu, Y. Zhang, X. Xu, W. Cui, G. Yang, Y.-M. Shen, "Synthesis and binding affinities of Re(I) and <sup>99m</sup>Tc(I)-containing 16 $\alpha$ -substituted estradiol complexes: models for potential breast cancer imaging agents", *Steroids*, **2010**, 75, 905-911

[156] T. Nayak, H. J. Hathaway, C. Ramesh, J. B. Asteburn, D. Dai, L. A. Skalar, J. P. Norenberg, E. R. Prossnitz, "Preclinical development of neutral, estrogen receptor-targeted, tridentate <sup>99m</sup>Tc(I)-estradiol-pyridin-2-yl hydrazine derivative for imaging of breast and endometrial cancers", *J. Nucl. Med.*, **2008**, 49, 978-986

[157] M. B. Skaddan, F. R. Wüst, S. Jonson, R. Syhre, M. J. Welch, H. Spies, J. A. Katzenellenbogen, "Radiochemical synthesis and tissue distribution of Tc-99m-labeled 7 $\alpha$ - substituted estradiol complexes", *Nucl. Med. Biol.*, **2000**, 27, 269-279

[158] J. B. Arterburn, C. Corona, K. V. Rao, K. E. Carlson, J. A. Katzenellenbogen, "Synthesis of 17 $\alpha$ -substituted estradiol-pyridin-2-yl hydrazine conjugates as effective ligands for labeling with Alberto's complex *fac*-[Re((OH)<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> in water", *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 7063-7070

[159] A. Jackson, J. Davis, R. J. Pither, A. Rodger, M. J. Hannon, "Estrogen-derived steroidal metal complexes: agents for cellular delivery of metal centers to estrogen receptor-positive cells", *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 3964-3973

- [160] H. M. Bigott, E. Parent, L. G. Luyt, J. A. Katzenellenbogen, M. J. Welch, "Design and synthesis of functionalized cyclopentadienyl tricarbonylmetal complexes for technetium-94m PET imaging of estrogen receptors", *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 255-264
- [161] L. G. Luyt, H. M. Bigott, M. J. Welch, J. A. Katzenellenbogen, "7 $\alpha$ - and 17 $\alpha$ -substituted estrogens containing tridentate tricarbonyl rhenium/technetium complexes: synthesis of estrogen receptor imaging agents and evaluation using microPET with technetium-94m", *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 4977-4989
- [162] S. Banerjee, T. Das, S. Chakraborty, G. Samuel, A. Korde, M. Venkatesha, M. R. A. Pillai, "An estradiol-conjugate for radiolabelling with <sup>177</sup>Lu: an attempt to prepare a radiotherapeutic agent", *Bioorg. Medicinal Chem.*, **2005**, 13, 4315-4322
- [163] C. Gunanathan, A. Pais, E. Furman-Haran, D. Seger, E. Eyal, S. Mukhopadhyay, Y. Ben-David, G. Leituss, H. Cohen, A. Vilan, H. Degani, D. Milstein, "Water-soluble contrast agents targeted at the estrogen receptor for molecular magnetic resonance imaging", *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 18, 1361-1365
- [164] J. Tang, S. Top, A. Vessières, N. Sellier, J. Vaissermann, G. Jaouen, "Synthesis of 17 $\alpha$ -Ruthenocenyl-17 $\beta$ -oestradiol and its Potential as a Radiopharmaceutical Agent", *Applied Organometallic Chem.*, **1997**, 11, 771-781
- [165] S. Top, H. El Hafa, A. Vessières, M. Huché, J. Vaissermann, G. Jaouen, "Novel estradiol derivatives labeled with Ru, W, and Co Complexes influence on hormone-receptor affinity of several organometallic groups at the 17 $\alpha$  position", *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 5241-5249
- [166] I. Ott, R. Gust, "Preclinical and clinical studies on the use of platinum complexes for breast cancer treatment", *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2007**, 7, 95-110
- [167] M. Kvasnica, L. Rarova, J. Oklestkova, M. Budesinsky, L. Kohout, "Synthesis and cytotoxic activities of estrone and estradiol cis-dichloroplatinum(II) complexes", *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 6969-6978
- [168] C. Descôteaux, V. Leblanc, G. Bélanger, S. Parent, É. Asselin, G. Bérubé, "Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum(II) complexes showing potent cytotoxic activity and affinity for the estrogen receptor alpha and beta", *Steroids*, **2002**, 73, 1077-1089
- [169] A. J. Studwell, D. N. Kotton, "A shift from cell cultures to creatures: *in vivo* imaging of small animals in experimental regenerative medicine", *Molecular Therapy*, **2011**, 19, 1933-1941
- [170] L. E. Jennings, N. J. Long, "Two is better than one- probes for dual-modality molecular imaging", *Chem. Commun.*, **2009**, 3511-3524
- [171] C. Bernhard, C. Goze, Y. Rouselin, F. Denat, "First bodipy-DOTA derivatives as probes for bimodal imaging", *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 8267-8269
- [172] A. Louie, "Multimodality imaging probes: design ND Challenges", *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 3146-3195
- [173] Culver, W. Akeus, S. Achilefu, "Multimodality molecular imaging with combined optical and SPECT/PET modalities", *J. Nucl. Med.*, **2008**, 49, 1609-172

- [174] S. L. Troyan, V. Kianzad, S. L. Gibbs-Strauss, S. Gioux, A. Matsui, R. Oketokoun, L. Ngo, A. Khamene, F. Azar, J. V. Frangioni, "The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node imaging", *Ann. Surg. Oncol.*, **2009**, 16, 2943-2952
- [175] W. B. Cai, K. Chen, Z. B. Li, S. S. Gambhir, X. Y. Chen, "Dual-function probe for PET and near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature", *J. Nucl. Med.*, **2007**, 48, 1862-1870
- [176] M. Liang, X. Liu, D. Cheng, G. Liu, S. Dou, Y. Wang, M. Rusckowski, D. J. Hnatowich, "Multimodality nuclear and fluorescence tumor imaging in mice using a streptavidin nanoparticle", *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 1385-1388
- [177] K. R. Bhushan, P. Misra, F. Liu, S. Mathur, R.E. Lenkinski, J. V. Frangioni, "Detection of breast cancer microcalcifications using a dual-modality SPECT/NIR fluorescent probe", *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 17648-17649
- [178] W. Wang, S. Ke, S. Hwon, S. Yallampalli, A. G. Cameron, K.-E. Adms, M. E. Mawad, E. M. Sevick-muraca, "Flourescence nanoparticles for multiplexed bacteria monitoring", *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 18, 397-301
- [179] S. Achilefu, W. B. Edwards, W. J. Akers, Y. P. Ye, P. P. Cheney, S. Bloch, B. G. Xu, R. Laforest, S. Achilefu, "Multimodal imaging of integrin receptor-positive tumors by bioluminescence, fluorescence, gamma scintigraphy, and single-photon emission computed tomography using a cyclic RGD peptide labeled with near-infrared fluorescent dye and a radionuclide", *Molecular Imaging*, **2009**, 8, 101-110
- [180] S. Achilefu, H. N. Jimenez, R. B. Dorshow, J. E. Bugaj, E. G. Webb, R. R. Wilhelm, R. Rajagopalan, J. Jöhler, J. L. Erion, "Synthesis, *in vitro* receptor binding, and *in vivo* evaluation of fluorescein and carbocyanine peptide-based optical contrast agents", *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 2003-2015
- [181] Y. Ye, S. Bloch, B. Xu, S. Achilefu, "Novel near-infrared fluorescent integrin-targeted DFO analogues", *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 225-234
- [182] R. H. Kimura, Z. Miao, Z. Cheng, S. S. Gambhir, J. R. Cachran, "A dual-labeled knottin peptide for PET and near-infrared fluorescence imaging of integrin expression in living subjects", *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 436-444
- [183] H. Xu, K. Baidoo, A. J. Gunn, C. A. Bosuell, D. E. Milenic, P. L. Chayde, M. W. Brechbied, "Design, synthesis, and characterization of a dual modality positron emission tomography and fluorescence imaging agent for monoclonal antibody tumor-targeted imaging", *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 4759-4765
- [184] M. R. Tremblay, S. Auger, D. Poirier, "Synthesis of 16-(bromoalkyl)-estradiols having inhibitory affect on human placental estradiol 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD type 1)", *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, 505-523
- [185] T. L. Fevig, J. A. Katzenellenbogen, "A short, stereoselective route to 16 $\alpha$ -(substituted-alkyl)estradiol derivatives", *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 247-251
- [186] P. Dionne, B. T. Ngatcha, D. Poirier, "D-ring allyl derivatives of 17 $\beta$ - and 17 $\alpha$ -estradiols: chemical synthesis and <sup>13</sup>C NMR data", *Steroids*, **1997**, 62, 674-681

- [187] T. L. Fevig, M. K. Mao, J. A. Katzenellenbogen, "Estrogen receptor binding tolerance of 16 $\alpha$ -substituted estradiol derivatives", *Steroids*, **1988**, 51, 471-497
- [188] M. R. Tremblay, D. Poirier, "Synthesis of 16-[carbamoyl(bromomethyl)alkyl]estradiol: a potential dual-action inhibitor designed to blockade estrogen action and biosynthesis", *J. Chem. Soc., Perkin Tran. 1*, **1996**, 2765-2771
- [189] M. R. Tremblay, D. Poirier, "Overview of a rational approach to design type I 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors without estrogenic activity: chemical synthesis and biological evaluation", *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **1998**, 66, 179-191
- [190] K.-M. Sam, R. P. Boivin, M. R. Tremblay, S. Auger, D. Poirier, "C16 and C17 derivatives of estradiol as inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: chemical synthesis and structure-activity relationships", *Drug Design and Discovery*, **1998**, 15, 157-180
- [191] G. Goto, K. Yoshiona, K. Hiraga, T. Moki, "A stereoselective synthesis and nuclear magnetic resonance spectral study of four epimeric 17-hidroxy-16-ethylestranes", *Chem. Pharm. Bull.*, **1977**, 6, 1295-1301
- [192] K.-M Sam, R.P. Boivin, S. Auger, D. Poirier, "16 $\alpha$ -propyl derivatives of estradiol as inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 2129-2132
- [193] M. R. Tremblay, S. Auger, D. Poirier, "A convenient synthetic method for alpha-alkylation of steroidal 17-ketone: preparation of 16 $\beta$ (THPO-heptyl)-estradiol", *Synth. Commun.*, **1995**, 25, 2483-2495
- [194] R. Appel, "Tertiary phosphane/tetrachloromethane, a versatile reagent for chlorination, dehydration, and P-N linkage", *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1975**, 14, 801-811
- [195] L.F. Tietze, J. Wolfling, G. Schneider, M. Noltemeyer, "Synthesis of new 16-spirosteroids", *Steroids*, **1994**, 59, 305-309
- [196] A.P. Krapcho, G. A. Glynn, B. J. Grenon, "The decarbethoxylation of geminal dicarbethoxy compounds", *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 8, 215-217
- [197] P. P. Hazari, G. Shukla, V. Goel, K. Chuttani, N. Kumar, R. Sharma, A. K. Mishra, "Synthesis of specific SPECT-radiopharmaceutical for tumor imaging based methionine: <sup>99m</sup>Tc-DTPA-bis(methionine)", *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 229-239
- [198] F. Z. Biber, P. Unak, T. Ertay, E. I. Medine, F. Zihnioglu, C. Tasci, H. Durak, "Synthesis of an estradiol glucuronine derivative and investigation of its radiopharmaceutical potential", *Appl. Radiat. Isotopes*, **2006**, 64, 778-788
- [199] J. L. Buss, B. B. Hasinogg, "The one-ring open hydrolysis product intermediates of the cardioprotective agent ICRF-187 (dexrazoxane)displace iron from iron-anthracycline complexes", *Agents actions*, **1993**, 40, 86-95
- [200] S. Liu, D. S. Edwards, "Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals", *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 7-34
- [201] M. Bérubé, F. Delagoutte, D. Poirier, "Preparation of 16 $\beta$ -estradiol derivatives libraries as bisubstrate inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 using the multidetachable sulfamate linker", *Molecules*, **2010**, 15, 1590-1631

- [202] V. Jacques, J. F. Desreux, "Complexation of Thorium(IV) and Uranium(IV) by a hexaacetic hexaaza macrocycle: kinetic and thermodynamic topomers of actinide chelates with a large cavity ligand", *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 7205-7210
- [203] J. Henig, E. Toth, J. Engelmann, S. Gottschak, H. A. Mayer, "Macrocyclic Gd<sup>3+</sup> chelates attached to a silsesquioxane core as potential magnetic resonance imaging contrast agents: synthesis, physicochemical, characterization, and stability studies", *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 6124-6138
- [204] F. Carniato, L. Tei, M. Cossi, L. Marchese, M. Botta, "A chemical strategy for the relaxivity enhancement of Gd<sup>III</sup> chelates anchored on mesoporous silica nanoparticles", *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 10727-10734
- [205] K.-P. Eisenwiener, P. Powell, H. R. Mäcke, "A convenient synthesis of novel bifunctional prochelators for coupling to bioactive peptides for radiometal labeling", *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **2000**, 10, 2133-2135
- [206] K. Abiraj, H. Jaccard, M. Kretzschmar, L. Helm, H. R. Maecke, "Novel DOTA-based prochelator for divalent peptide vectorization synthesis of dimeric bombesin analogues for multimodality tumor imaging and therapy", *Chem. Commun.*, **2008**, 3248-3250
- [207] C. Bernhard, M. Moreau, D. Lhenry, C. Goze, F. Boschetti, Y. Rousselin, F. Brunotte, F. Denat, "DOTAGA-anhydride: a valuable building block for the preparation of DOTA-like chelating agents", *Chem. Eur. J.*, **2012**, 7834-7841
- [208] J. D. Pelletier, D. Poirier, "Synthesis and evaluation of estradiol derivatives with 16 $\alpha$ -(bromoalkylamide), 16 $\alpha$ -(bromoalkyl) or 16 $\alpha$ -(bromoalkynyl) side chain as inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 without estrogenic activity", *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, 4, 1617-1628
- [209] R. Garcia, V. Kubicek, B. Drahos, L. Gano, I. C. Santos, P. Campello, A. Paulo, É. Tóth, I. Santos, "Synthesis, characterization and biological evaluation of In(III) complexes anchored by DOTA-like chelators bearing a quinazoline moiety", *Metallomics*, **2010**, 2, 571-580
- [210] R. Garcia, P. Fousková, L. Gano, A. Paulo, P. Campello, É. Tóth, I. Santos, "A quinazoline-derivative DOTA-type gallium(III) complex for targeting epidermal growth factor receptors: Synthesis, characterization and biological studies", *J Biol. Inorg. Chem*, **2009**, 14, 261-271
- [211] J. Guo, R. I. Duclos Jr., V. K. Vemuri, A. Makriyannis, "The conformations of 17 $\beta$ -estradiol as determined by solution NMR", *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 3465-3469
- [212] V. Scasnár, J. E. van Lier, "The use of SEP-PAK SI cartridges for the preparation of gallium chloride from the citrate solution", *Eur. J. Nucl. Med*, **1993**, 20, 273
- [213] H-K Chan, I. Gonda, "A simple method for the preparation of gallium chloride from the citrate solution", *Eur. J. Nucl. Med.*, **1991**, 18, 860
- [214] M. A. Green, M. J. Welch, "Gallium radiopharmaceutical chemistry", *Nucl. Med. Biol.*, **1989**, 16, 435-448
- [215] D. E. Troutner, W.A. Volkert, T. J. Hoffman, R.A. Holmes, "A neutral lipophilic complex of 99mTc with multidentate amine oxime", *The International J. Applied rRadiation and Isotopes*, **1984**, 35, 467-470

- [216] C. L. Ferreira, E. Lamsa, M. Woods, Y. Duan, P. Fernando, C. Bensimon, M. Kordos, K. Guenter, P. Jurek, G. E. Kiefer, "Evaluation of bifunctional chelates for the development of gallium-based radiopharmaceuticals", *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 531-536
- [217] S. D. Kuduk, F. F. Zheng, L. Sepp-Lorenzino, N. Rosen, S. J. Danishefsky, "Synthesis and evaluation of geldanamycin-estradiol hybrids", *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **1999**, 9, 1233-1238
- [218] C. Ramesh, B. Bryant, T. Nayak, C. M. Revankar, T. Anderson, K. E. Carlson, J. A. Katzenellenbogen, L. A. Sklar, J. P. Norenberg, E. R. Prossnitz, J. B. Arterburn, "Linkage effects on binding affinity and activation of GPR30 and estrogen receptors ER $\alpha$ / $\beta$  with tridentate pyridin-2-yl hydrazine tricarbonyl-Re/<sup>99m</sup>Tc(I) chelates", *J Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 14476-14477
- [219] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/c-hemotherapyprinciplesanin-depthdiscussionofthetechniquesanditsroleintreatment/chemotherapy-principles-goals-of-chemo>, consultado a 15 de Outubro de 2014
- [220] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/c-hemotherapyprinciplesanin-depthdiscussionofthetechniquesanditsroleintreatment/chemotherapy-principles-types-of-chemo-drugs>, consultado a 15 Outubro de 2014
- [221] L. F. Tietze, H. P. Bell, S. Chandrasekhar, "Natural product hybrids as new leads for drug discovery", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 3996-4028
- [222] K.-L. Dao, R. R. Sawant, J. A. Hendricks, V. Ronga, V. P. Torchilin, R. N. Hanson, "Design, synthesis and initial biological evaluation of a steroidal anti-estrogen-doxorubicin bioconjugate for targeting estrogen receptor-positive breast cancer cells", *Bioconjugate Chem.*, **2012**, 23, 785-795
- [223] C. Liu, J. S. Strobl, S. Bane, J. K. Schilling, M. McCracken, S. K. Chatterjee, R. Rahim-Bata, D. G. I. Kingston, "Design, synthesis and bioactivities of steroid linked taxol analogs as potential target drugs for prostate and breast cancer", *J. Nat. Prod.*, **2004**, 12, 152-159
- [224] H. Ali, N. Ahmed, G. Tessier, J. E. Vanlier, "Synthesis and biological activities of nucleoside estradiol conjugates", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 317-319
- [225] K. M. Kasiotis, P. Magiatis, H. Pratsinis, A.-L. Skaltsounis, V. Abadji, A. Charalambous, P. Moutsatsou, S. A. Haroutounian, "Synthesis and biological evaluation of novel daunorubicin-estrogen conjugates", *Steroids*, **2001**, 66, 785-791
- [226] P. J. Burke, T. H. Kock, "Design, synthesis, and biological evaluation of doxorubicin-formaldehyde conjugates targeted to breast cancer cells", *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 1193-1206
- [227] A. Delbarre, R. Oberlin, B. P. Roques, J.-L. Borgna, H. Rochefort, J.-B. Le Pecq, A. Jacquemin-Sablon, "Ellipticine derivatives with an affinity to the estrogen receptor, an approach to develop intercalating drugs with a specific effects on the hormone-dependent breast cancer", *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 752-761
- [228] R. Devraj, J. F. Barret, J. A. Fernandez, J. A. Katzenellenbogen, M. Cushman, "Design, synthesis, and biological evaluation of ellipticine-estradiol conjugates", *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3367-3374
- [229] K.-L. Dao, R. N. Hanson, "Targeting the estrogen receptor using steroid-therapeutic drug conjugates (hybrids)", *Bioconjugate Chem.*, **2012**, 23, 2139-2158

- [230] L. Lenaz, J. Page, "Cardiotoxicity of adriamycin and related anthracyclines", *Cancer Treat. Rev.*, **1976**, 3, 111
- [231] S. Jayaprakash, X. Wang, W. D. Heston, A. P. Kozikowski, "Design and synthesis of a PSMA inhibitor-doxorubicin conjugate for targeted prostate cancer therapy", *ChemMedChem*, **2006**, 1, 299-302
- [232] A. Skaladanowski, J. Konopa, "Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells", *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, 46, 375-382
- [233] N. G. Hartman, L.H. Patterson, P. Workman, A. Suarato, F. Angelucci, "Doxorubicin-3'-NH-oestrone-17-oxime-ethyl-carbonyl, a doxorubicin-oestrone conjugate that does not redox cycle in rat liver microsomes", *Biochem. Pharm.*, **1990**, 40, 1164-1167
- [234] R. Soudy, C. Chen, K. Kaur, "Novel peptide-Doxorubicin conjugates for targeting breast cancer cells including the multidrug resistant cells", *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 7564-7573
- [235] J. Sheng, J. Gan, Z. Huang, "Structure-based DNA-targeting strategies with small molecule ligands for drug discovery", *Medicinal Research Rev*, **2013**, 33, 1119-1173
- [236] H. Ihmels, D. Otto, "Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA- general principles and recent developments", *Top Curr. Chem.*, **2005**, 258, 161-204
- [237] C. V. Kumar, E. H. Punzalan, W. B. Tan, "Adenine-thymine base pair recognition by an anthryl probe from the DNA minor groove", *Tetrahedron*, **2000**, 56, 7027-7040
- [238] A. K. El-Naggar, J. G. Batsakis, K. Taegue, G. Giacco, V. F. Guinee, D. Swanson, "Acridine orange flow cytometric analysis of renal cell carcinoma", *Am. J. Pathol.*, **1990**, 137, 275-280
- [239] T. Esteves, C. Xavier, S. Gama, F. Mendes, P. D. Raposinho, F. Marques, A. Paulo, J. C. Pessoa, J. Rino, G. Viola, I. Santos, "Tricarbonyl M(II) (M = Re, <sup>99m</sup>Tc) complexes bearing acridine fluorophores: synthesis, characterization, DNA interaction studies and nuclear targeting", *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 4104-4116
- [240] N. Agorastos, L. Borsig, A. Renard, P. Antoni, G. Viola, B. Spinnngler, P. Kurtz, R. Alberto, "Cell-specific and nuclear targeting with [M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M=<sup>99m</sup>Tc, Re)-based complexes conjugated to acridine Orange and bombesin", *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 3842-3852
- [241] H. Ghaneolhosseini, W. Tjarks, S. Sjöberg, "Synthesis of novel boronated acridines- and spermidines as possible agents for BNCT", *Tetrahedron*, **1998**, 54, 3877-3884
- [242] Z. Ma, J. R. Choudury, M. W. Wright, C.S. Day, G. Saluta, G. L. Kucera, U. Bierbach, "A non-cross-linking platinumium-acridine agent with potent activity in non-small-cell lung cancer", *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 7574-7580
- [243] T. Bentin, P.E. Nielson, "Superior duplex DNA strand invasion by acridine conjugated peptide nucleic acids", *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 21, 6378-6379
- [244] N. Desbois, M Gardette, J. Papon, P. Labarre, A. Maisonial, P. Auzeloux, C. Lartigue, B. Bouchon, E. Debiton, Y. Blanche, O. Chavignon, J.-C. Teulade, J. Maublant, J.-C. Madelmont, N. Moins, J.-M. Chezal, "Design, synthesis and preliminary biological evaluation of acridine compounds as potential agents for

combined targeted chemoradionuclide therapy approach to melanoma”, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 7671-7690

[245] R. N. Hanson, E. Hua, D. Labaree, R. B. Hochberg, K. Proffitt, J. M. Essigmann, R. G. Croy, “Convergent synthesis of a steroidal antiestrogen-mitomycin C hybrid using “click” chemistry”, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 8501-8508

[246] W. A. Denny, “Acridine-4-carboximides and the concept of minimal DNA intercalators”, in: M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson (eds) DNA and RNA binders. Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, 482-302

[247] A. Lansiaux, F. Tanius, Z. Mishal, L. Dassonneville, A. Kumar, C. E. Stephens, Q. Hu, W. D. Wilson, D. W. Boykin, C. Bailly, “Distribution of furamidine analogues in tumor cells: targeting of the nucleus or mitochondria depending on the amidine substitution”, *Cancer Res.*, **2002**, 62, 7219-7229

[248] T. Iso, T. Watanabe, T. Iwamoto, A. Shimamoto, Y. Furuichi, “DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity” *Biol. Pharm. Bull.*, **2006**, 29, 206-210

[249] T. Oda, N. Ikeda, S. Nakashima, Y. Sato, “Cytotoxicity of estradiol, equilin, equilenin, and their derivatives on Chinese hamster V79 cells”, *Drug and Chem. Toxicology*, **2002**, 25, 75-82

[250] P. Sabbaha, H. Foehrenbach, G. Dutertrec, C. Niochea, O. DeDreuilb, N. Bellegouc, J.F. Mangind, C. Levêquea, T. Faillotc, J.F. Gaillardb, M. Desgeorgesc, Y.S Cordoliana, “Multimodal anatomic, functional, and metabolic brain imaging for tumor resection”, *Clinical Imaging*, **2002**, 26 6–12

[251] J. R. Lakwicz, “Principles of fluorescence spectroscopy”, **2009**, 3<sup>rd</sup> edition, Springer, 954pp

[252] L. Lavish, R. Raines, “Bright ideas for chemical biology”. *ACS Chem Biol*, **2008**, 3, 142-155

[253] A. Treibs, F.-H. Kreuzer, “Difluorborborly-komplexe van di-und tripyrrylmethanen”, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 718, 208-223

[254] G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, “The chemistry of fluorescent Bodipy dyes: versatility unsurpassed”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 1184-1201

[255] R. Ziessel, G. Ulrich, A. Harriman, “The chemistry of Bodipy: a new El Dorado for fluorescence tools”, *New J. Chem.*, **2007**, 31, 496-501

[256] A. Loudet, K. Burgess, “Bodipy dyes and their derivatives: synthesis and spectroscopic properties”, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 4891-4982

[257] N. J. Meltula, A. E. Soiri, P. E. Hänninen, “Synthesis of novel dipyrromethene-BF<sub>2</sub> dyes and their performance as labels in two-photon excited fluoroimmunoassay”, *J. Fluorescence*, **2004**, 14, 129-138

[258] A. N. French, S. R. Wilson, M. J. Welch, J. A. Katzenellenbogen, “A synthesis of 7 $\alpha$ -substituted estradiols: synthesis and biological evaluation of 7 $\alpha$ -pentyl-substituted BODIPY fluorescent conjugate and a fluorine-18-labeled 7 $\alpha$ -pentylestradiol analog”, *Steroids*, **1993**, 58, 157-169

[259] M. Okamoto, S. Kobayashi, H. Ikeuchi, S. Yamada, K. Yamanouchi, K. Nagasawa, S. Maekawa, T. Kato, I. Shimizu, “Synthesis and bioassay of boron-dipyrromethene derivative of estradiol for fluorescence imaging in vivo”, *Steroids*, **2012**, 77, 845-849

[260] L. Yang, R. Simionescu, A. Lough, H. Yan, “Some observations relating to the stability of BODIPY fluorophore under acidic and basic conditions”, *Dyes and Pigments*, **2011**, 91, 264-267

- [261] A. Cui, X. Peng, J. Fan, X. Chen, Y. Wo, B. Guo, "Synthesis, spectral properties and photostability of novel boron-dipyrromethene dyes", *J Photochem. Photobiol. A*, 2007, 186, 85
- [262] V. Kaklamani, R. H. Regan, "New targeted therapies in breast cancer", *Seminars in oncology*, 2004, 31, 20-25
- [263] J. Sledge, W. George, L. W. MaGuire, K. George, W. Sidney, "Steroid hormone receptors in human breast cancer", In *advances in cancer reasherach*, Academic Press, 1983, vol 38, pp 61-65
- [264] D. D. Perrin, W. L. Armarego, "Purification of Laboratory Chemicals", 3rd edition, Pergamon Press, Oxford 1988
- [265] Z.-J. Liu, T. Zhu, "Concentration-dependent mitogenic and antiproliferative actions of 2-methoxyestradiol in estrogen receptor-positive human breast cells", *J. Steroid Biochem. Med. Biol.*, 2004, 88, 265-275