

RESUMO

A Telomerase está envolvida na síntese de ADN telomérico que confere estabilidade aos cromossomas. Atualmente, é bem reconhecido que a inibição da telomerase pode impedir processos carcinogénicos, sendo por isso um alvo relevante para novas terapias anti-cancerígenas.

Uma possibilidade para inibir a telomerase baseia-se na utilização de compostos que se conseguem ligar seletivamente a estruturas de ADN G-quadruplexo (ADN-G4). A estabilização de G4 torna-se, assim, importante no impedimento da progressão de alguns dos eventos que têm potencial de desencadear o processo neoplásico, **uma vez que o ADN deixa de estar na sua forma linear, dificultando o processo de maquinarias como é o caso da transcrição.**

As indolo[3,2-c]quinolinas são uma de entre muitas classes de compostos que têm vindo a ser estudadas como potenciais estabilizadores de G4, devido à sua estrutura planar, que os torna bons candidatos ao estabelecimento de interações π - π *stacking* com as bases de guanina.

As bis(tiossemicarbazonas) (BTS) são compostos versáteis com interesse farmacêutico considerável. Este tipo de compostos denominam-se ligandos bifuncionais que podem atuar como ligandos tetradentados formando complexos de Cu(II), com estabilidade suficiente para serem explorados em aplicações biomédicas.

Os complexos de cobre que incorporam estes ligandos têm demonstrado ser especialmente promissores para diversos fins farmacológicos, especialmente como radiofármacos na teranóstica de cancro.

Nos dias de hoje, o desenvolvimento de ligandos seletivos para G-quadruplexos é um desafio que se reveste de inequívoca importância em Química Farmacêutica.

Os complexos foram sintetizados com cobre natural – metal com importância crescente no design de novos radiofármacos (nomeadamente de Cu-64). Concomitantemente com o supra-referido, esta proposta de trabalho engloba a síntese, caracterização e **avaliação biológica** de complexos de Cu(II) estabilizados por agentes quelantes adequados que contêm fragmentos heteroaromáticos com afinidade estabelecida para ADN G4.

Neste sentido, o principal objetivo deste projeto é elucidar a relevância de quelatos bifuncionais de Cu(II) que atuam como ligandos seletivos de ADN G4 no design de novas ferramentas e, contribuir para a descoberta de novas estratégias para teranóstica de cancro.

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

ABSTRACT

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

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleíco
ARN	Ácido ribonucleico
BOC	terc-butoxicarbonilo
BTS	Bis(tiossemicarbazonas)
C	Citosina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
¹ H- ¹ H COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear de próton
Cu	Cobre
Cu-BTS	Complexos de cobre(II) com ligandos bis(tiossemicarbazona)
⁶⁴ Cu	Cobre radioativo
⁶⁴ Cu-ATSM	⁶⁴ Cu-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone)
⁶⁴ Cu-PTSM	⁶⁴ Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone)
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dA	Deoxi-adenosina
dC	Deoxi-citidina
dd	Dupleto de dupletos
dG	Deoxi-guanidina
dT	Deoxi-timidina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida Hidroclorada
eq.	Equivalente(s)
ESI-MS	Espectrometria de massa com ionização por electrospray (do inglês <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>).
EtOH	Etanol

eV	elétron-volt
FRET	Transferência de Energia de Ressonância de Förster
G	Guanina
G4	G-quadruplexo
Hex	Hexano
HMQC	Espectroscopia de correlação heteronuclear múltiplo-quântica
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
LET	Transferência Linear de Energia (do inglês <i>Linear Energy Transfer</i>)
m	multiplete
M	Molar
MeOH	Metanol
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
N	Azoto
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NHS	N-Hidroxisuccinimida
PDB	Protein Data Bank
PET	Tomografia por emissão de positrão (do inglês <i>Positron Emission Tomography</i>)
p.f.	Ponto de fusão
PPA	Ácido polifosfórico
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
quint	Quintuplete
RMN (¹ H-, ¹³ C-)	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (de próton e de carbono-13, respetivamente)
s	Singuleto
S	Enxofre
SAR	Relação estrutura-atividade (do inglês <i>structure-activity relationship</i>)
SOD	Superóxido dismutase
SPECT	Tomografia Computorizada por Emissão de Fóton Único (do inglês <i>Single Photon Emission Computer Tomography</i>)

t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
T	Timina
TEA	Trietilamina
TEP	Tomografia por emissão de positrões
TFO	Oligonucleótido formador de triplexos
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês <i>thin layer chromatography</i>)

Símbolos

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

PREÂMBULO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A Medicina Nuclear é uma especialidade imagiológica, cada vez mais revestida de inequívoca importância quer na descoberta e desenvolvimento de fármacos, quer no diagnóstico precoce e terapêutica de inúmeras patologias.

A importância de metais de transição em processos biológicos está bem estabelecida, sendo que, a incorporação de centros metálicos em ligandos G4 oferece a possibilidade de explorar uma grande variedade de características estruturais e funcionais com o objetivo de obter uma ligação G4 ideal.

No âmbito das patologias oncológicas, têm sido investigados complexos inorgânicos de Cu, muito em prol do seu potencial de diagnóstico e terapêutica (teranóstica). Os complexos de Cu têm demonstrado ser efetivos na terapêutica do cancro devido à sua ação citotóxica, em células cancerígenas – essencialmente o ^{64}Cu -ATSM, como emissor de eletrões Auger.

Uma das principais aplicações de complexos metálicos em Medicina convencional é a teranóstica de cancro. No presente trabalho de investigação, vai utilizar-se o cobre-64 como radiomarcador de pequenas moléculas com potencial no *design* de novos radiofármacos.

Em suma, pretende-se com este trabalho contribuir para a descoberta de mais estratégias efetivas para teranóstica do cancro.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO

1.1. Mutações genéticas e Cancro

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

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

As alterações ou mutações no ADN das células podem conduzir ao cancro. Algumas destas mutações são herdadas diretamente, mas a maior parte delas é provocada por produtos residuais da química do organismo ou por toxinas do meio ambiente. Considera-se atualmente que, dos cerca de 100 000 genes existentes em cada uma das nossas células, mais de 20 genes específicos podem conduzir ao cancro, em consequência de mutações sofridas.

O cancro consiste na multiplicação caótica das células. Embora a maioria dos tipos de cancro não sejam de facto hereditários, uma pessoa pode herdar susceptibilidade para com alguns deles.

Pensa-se que há dois tipos de genes envolvidos no desenvolvimento do cancro: os proto-oncogenes e os antioncogenes. Os proto-oncogenes promovem o crescimento normal e a divisão das células. Na maior parte do tempo, estes genes estão inativos ou “desligados”. Mas, pode verificar-se uma mutação num proto-oncogene e ele ficar permanentemente “ligado”, transformando-se em oncogene. Os oncogenes – que atuam como um acelerador de automóvel que ficou preso – provocam a divisão celular excessiva característica do cancro.

Os antioncogenes atuam normalmente como travões, a fim de manter sob controlo a divisão celular. Ora, quando uma mutação torna inativo um antioncogene, ele deixa de assegurar a ação de impedir a divisão celular incontrolada, culminando no processo neoplásico a que se chama cancro.

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

1.2. ADN – Polimorfismo e Topologias

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

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

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

A estrutura primária do ADN, ou seja, a ordem de encadeamento ou sequência dos nucleótidos, é variável consoante os seres vivos.

Podemos, pois, dizer que cada ser vivo tem uma diferente estrutura primária do ADN, embora os seus componentes químicos fundamentais sejam sempre os mesmos (bases, pentoses, fosfatos).

A composição em bases é muito heterogénea nas espécies eucariotas, o que parece ser devido a quatro classes de sequências de ADN: (1) altamente repetitivas, (2) moderadamente repetitivas, (3) únicas, (4) repetitivas invertidas.

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

A composição em bases heterocíclicas é, portanto, característica de cada organismo, embora todas as células de um mesmo organismo, em todas as circunstâncias biológicas, tenham um ADN com composição idêntica de bases.

1.2.1. Duplexos de ADN

A identificação da estrutura helicoidal do ADN nativo – macromolécula linear em cadeia dupla, constituída por sequências polinucleotídicas complementares e antiparalelas – que culminou em 1953 com os trabalhos de Watson e Crick, marca o início de uma nova era das ciências biológicas.

O modelo molecular da dupla hélice do ADN (ADN Duplex), permitiu a Crick enunciar, em 1958, o princípio universal que designou por Dogma Central da Biologia Molecular.

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

As bases heterocíclicas são bastante hidrofóbicas e, como tal, orientam-se para o interior das hélices, enquanto que os resíduos de fosfato, como são polares, orientam-se para o exterior da hélice, isto é, para o meio aquoso.

As duas hélices do ADN são complementares e antiparalelas (em sentido oposto) apresentando um eixo de simetria à volta do qual se enrolam as hélices.

A maioria dos ADN Duplex – nas formas A-, B-, ou Z-ADN – é composta por cadeias complementares que se associam exclusivamente através de emparelhamento de bases Watson-Crick.

A conformação mais comum, presente na maioria das moléculas do ADN Duplex, a pH neutro e concentrações de sal fisiológicas é a conformação B-ADN. Esta é a conformação clássica da estrutura de dupla hélice, com enrolamento para a direita e em que os pares de bases se encontram dispostos perpendicularmente à dupla hélice.

Nesta conformação, o emparelhamento de bases de Hoogsteen exigiria a rotação da base púrica sobre a ligação glicosídica χ da conformação *anti* para a conformação *syn* e, no caso de emparelhamento G-C, a protonação do N₃ da citosina. As ligações de hidrogénio no emparelhamento de bases de Hoogsteen são

formadas entre a base púrica N₇ para a base pirimídica N₃ e ou a A N₆ para a T O₆ ou a G O₄ para a C N₄.

Em suma, o B-ADN não só é o polimorfismo de ADN Duplex mais comum no genoma humano, como também é o mais estável em condições fisiológicas.

Relativamente à conformação A-ADN, esta apresenta-se na forma de duplex mais espesso, com enrolamento para a direita e menor distância entre os pares de bases e, está descrito para os duplexos ARN-ADN e ARN-ARN.

O ADN duplex nas formas A- ou B-ADN apresentam uma estrutura helicoidal com enrolamento para a direita e estas conformações podem ser distinguidas pelo espaçamento entre pares de bases, sendo que o A-ADN forma uma estrutura muito mais compacta e ordenada em meios de baixa humidade relativa. Ao contrário do que sucede com estruturas de B-ADN, o A-ADN tende a ter as suas bases azotadas desviadas do eixo helicoidal, conduzindo ao aumento da sulco maior e diminuição da sulco menor.

A principal diferença entre as formas A-ADN e B-ADN é a conformação da pentose – neste caso desoxirribose. Esta está na endoconformação C'₂ para B-ADN, enquanto que na forma A-ADN está na endoconformação C'₃. Na forma A-ADN, a ascensão axial por nucleótido é cerca de 2.59-3.59 Å, enquanto que na forma B-ADN varia entre 3.03 e 3.37 Å. Na forma A-ADN, a rotação por nucleótido sobre o eixo da hélice é apenas 30°, ao passo que na forma B-ADN aumenta para 36-45°.

A terceira conformação de ADN Duplex é surpreendentemente diferente das restantes estruturas de duplexos, apresentando uma estrutura helicoidal com duas cadeias com enrolamento para a esquerda e, ao contrário do que se verifica para os dois polimorfos anteriores, não possui todas as suas bases azotadas na posição *syn* em relação às respectivas pentoses, mas sim uma mistura de *syn* e *anti* que lhe confere uma estrutura em ziguezague (daí a sua designação) pronunciada no esqueleto de fosfodiéster. Esta conformação – intitulada Z-ADN – é formada por extensões de bases púricas e pirimídicas alternadas na sequência onde se forma, como por exemplo: CGCGC e, de facto os nucleótidos G e C estão em diferentes conformações, conduzindo a um padrão de ziguezague. A estrutura de Z-ADN tem como resultado uma menor flexibilidade conformacional em relação à forma B-ADN. A alternância de bases GC favorece particularmente a formação de Z-ADN, contudo algumas modificações químicas de bases e determinados solutos podem também estabilizar esta forma de ADN Duplex.

Relativamente a esta conformação, sabe-se que apenas uma pequena quantidade de ADN nas células existe na forma de Z-ADN.

A conformação Z-ADN é muito imunogénica e os anticorpos para esta conformação são capazes de detetar Z-ADN no núcleo das células durante a diferenciação celular e transformação maligna (processos carcinogénicos). Muito em prol desta característica, tem sido tentadora a proposta de que esta estrutura diferente está envolvida, de alguma forma, na regulação de algumas funções celulares, como é o caso da transcrição.

Não obstante, ainda não estão disponíveis evidências conclusivas a favor ou contra esta proposta.

No que concerne a diferenças estabelecidas de Z-ADN, relativamente aos polimorfismos supra-referidas, pode afirmar-se que a principal diferença reside no nucleótido G.

A forma Z-ADN tem a pentose na endoconformação C'₃ – tal como a forma A-ADN e em contraste com a forma B-ADN – e a base de G está na conformação *syn*.

Isto coloca a G para trás sobre o anel de açúcar, em contraste com a conformação *anti* habitual, observada nas formas A- e B-ADN.

É de realçar que, ter a base na conformação *anti* coloca-a na posição onde pode facilmente formar ligação de hidrogénio com a base complementar na cadeia oposta.

O duplex na forma Z-ADN tem que acomodar a distorção do nucleótido G na conformação *syn*. A citosina no nucleótido adjacente de Z-ADN está no C'₂ endo “normal” em conformação *anti*.

Em contraste com estruturas macromoleculares proteicas, o ADN é uma molécula extremamente versátil e conformacionalmente diversa, deste modo e para ilustrar o supra-mencionado, em seguida pode observar-se a Figura 1 – Estruturas de ADN duplex, que correspondente às conformações possíveis para ADN Duplex.

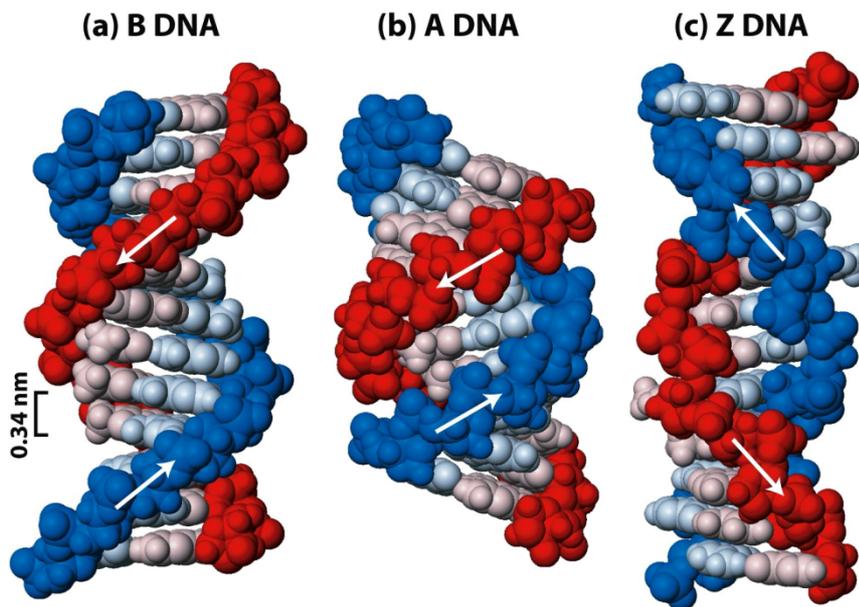


Figura 1: Estrutura de ADN duplex. A) B-ADN (PDB ID:1BNA); B) A-ADN (PDB ID:371D); C) Z-ADN (PDB ID:1D48). Adaptado de Molecular Cell Biology, 6thed.

1.2.2. Triplexos de ADN

Os triplexos, são estruturas de maior ordem frequentemente adoptadas pelas moléculas de ADN.

Esta topologia de ADN está implicada numa panóplia de funções celulares, tais como: regulação da transcrição, processamento de ARN pós-transcricional, modificação da cromatina ou reparação do ADN.

Os triplexos são constituídos por uma dupla hélice com uma terceira cadeia ligada ao sulco maior do duplexo, que irá formar ligações de hidrogénio de Hoogsteen com a cadeia rica em bases púricas. São possíveis duas configurações, a saber: a configuração de Hoogsteen promove a ligação da terceira cadeia numa orientação paralela à cadeia poli-púrica da hélice dupla, enquanto que uma orientação anti-paralela é estabelecida por ligações de Hoogsteen reversas.

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

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

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

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

1.2.3. G-Quadruplexos de ADN

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

Os ADN-G4 constituem formas de ADN de maior ordem, particularmente relevantes em áreas do genoma como os telómeros, regiões promotoras de oncogenes e promotores de chaperoninas de oncogenes.

Estas estruturas são constituídas por empilhamentos de núcleos de deoxiguanidina ligados entre si por ligações de Hoogsteen de modo a formar tétrades.

Estas estruturas consistem num arranjo em quadrado de guaninas – G-tétrade ou G-quarteto– estabilizado por ligações de hidrogénio.

As estruturas de G4 têm sido também identificadas em diversas sequências de oncogenes, a saber: *c-Myc*, *c-Kit*, *bcl-2* e *KRAS*.

Posto isto, a estabilização de G4 nos telómeros e oncogenes reveste-se de inequívoca importância, uma vez que esta estabilização induz a interrupção do ciclo celular – que irá culminar em morte celular por apoptose – o que se pretende que aconteça em células cancerígenas. Deste modo, é crucial a síntese de ligandos de G4 que exerçam seletivamente uma atividade anti-proliferativa e quimiossensibilizante, em modelos de células cancerígenas, sem efeitos secundários consideráveis para as células normais.

Os G-quartetos empilham-se uns no topo dos outros para formar estruturas de ADN-G4, as quais exibem um elevado grau de polimorfismo que depende das características da estequiometria da cadeia e das ansas e, dos catiões metálicos coordenados com os G4. Os G4 podem ser formados por enrolamento de uma

sequência única rica em guaninas (intramolecular) ou por associação de duas ou quatro cadeias separadas (intermolecular). O polimorfismo pode também ser criado pelo arranjo relativo da polaridade das cadeias de várias formas: todas paralelas, três paralelas e uma anti-paralela, paralela adjacente ou paralela alternada.

Desse modo, dependendo da direção das cadeias – ou partes da cadeia – que formam as tétrades, as estruturas podem ser descritas como paralelas ou anti-paralelas.

Os quadruplexos designam-se como anti-paralelos quando pelo menos uma das quatro cadeias está posicionada anti-paralelamente às outras, o que pode ser observado na maior parte das estruturas de quadruplexos intra-moleculares, caracterizado até ao momento.

Por seu curso, as variações de polaridade das cadeias afetam a localização apropriada das ansas, entre segmentos ricos em guaninas e formados a partir de uma cadeia única ou a partir de duas cadeias. Deste modo, cadeias de guaninas paralelas requerem uma ansa de ligação para ligar o sulco inferior do G-quarteto ao topo do mesmo, criando ansas de reversão da orientação da cadeia (dupla cadeia reversa).

Cadeias anti-paralelas ricas em guaninas podem ser ligadas por ansas laterais ou diagonais, dependendo se as cadeias estão adjacentes ou opostas diagonalmente. Para contextualizar o supra-mencionado, pode observar-se a Figura 2 – Topologias de G-quadruplexos intramoleculares.

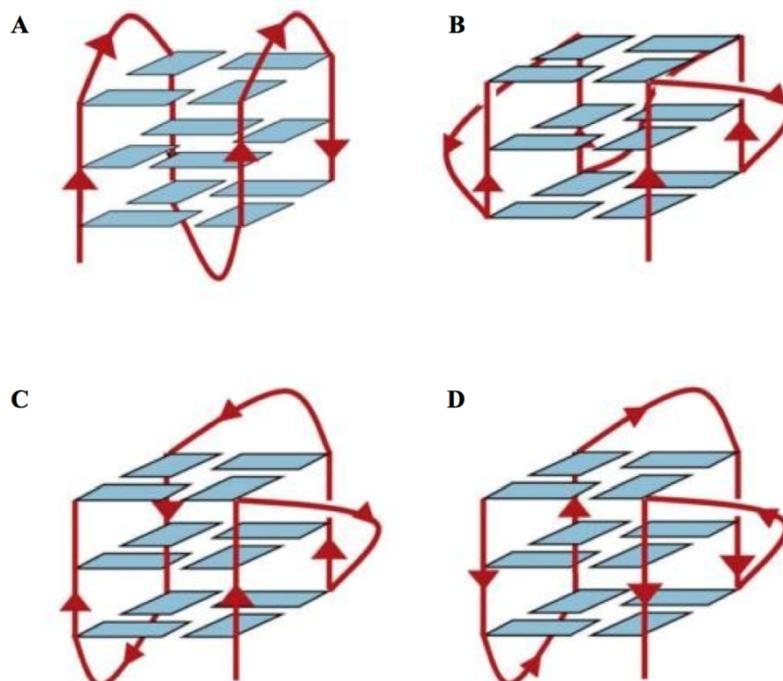


Figura 2: Topologias de G-quadruplexos intramoleculares. A) Antiparalela; B) Paralela; C) e D) Híbridas. Adaptado de Neidle (2009).

A sequência e tamanho das ansas tem habitualmente um papel dominante na determinação da topologia dos quadruplexos.

Os resíduos das ansas podem, eles próprios, formar interações *stacking* e ligações de hidrogénio. Para além disso, os G4 podem ser caracterizados pela coordenação de catiões monovalentes, habitualmente K^+ e Na^+ . Seguidamente, na Figura 3 – G4 estabilizado por iões K^+ , pode observar-se uma estrutura que ilustra a estabilização de G4 por um catião monovalente, neste caso o K^+ .

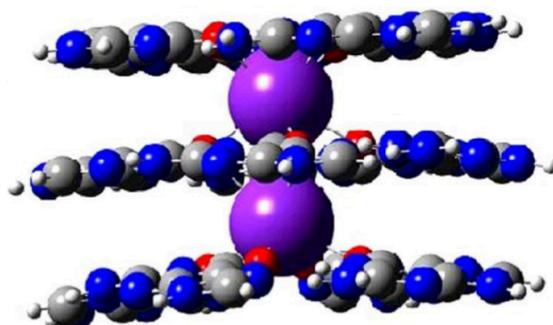


Figura 3: G4 estabilizado por iões K^+ . Adaptado de Clay et al. 2005.

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

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

A variabilidade da topologia de G4, a partir de uma mesma sequência, pode surgir devido a diferentes características de coordenação do cátion metálico no G-quarteto. Deste modo, surge em seguida a Figura 4 – Tétrade de guanina com um cátion monovalente no centro.

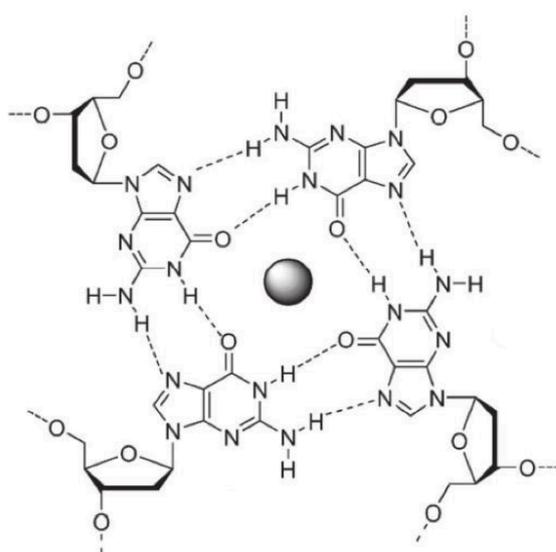


Figura 4: Tétrade de guanina com um cátion monovalente no centro.

Adaptado de Murat et al. 2011.

Por exemplo, a sequência de ADN telomérico humano, d[AGGG (TTAGGG)₃] forma uma topologia anti-paralela com uma ansa diagonal e duas laterais em solução de Na⁺, denominadas “tipo cesto”. Por outro lado, o complexo de potássio com esta sequência tem estruturas variáveis e complicadas, incluindo estrutura anti-paralela “tipo cesto” ou “tipo cadeira”, estrutura cristalográfica paralela tipo hélice e estrutura do tipo “misto” com uma hélice e duas ansas laterais.

Devido aos fatores supra-mencionados, todos os quadruplexos paralelos têm guaninas com ângulos de torção glicosídica numa conformação *anti*. Por outro lado, os G-quartetos em quadruplexos anti-paralelos são encontrados em ambas as conformações *syn* e *anti*, que estão dispostos numa topologia específica e um conjunto orientações da cadeia.

Para além disso, há quatro sulcos nas estruturas de quadruplexos, definidas como cavidades delimitadas por esqueletos fosfodiéster.

As dimensões dos sulcos são variáveis, dependendo da topologia global e natureza das ansas.

1.3. Telomerase

A Telomerase – complexo de ribonucleoproteína com cerca de 170 kDa – intervêm no processo de transformação neoplásica e, à luz do que se vai conhecendo sobre essa participação, pode afirmar-se que são alvos anti-cancerígenos únicos, recebendo maior foco de atenção e investigação, na década de 90.

No âmbito da patologia tumoral maligna, a Telomerase surge como um potencial alvo para fins de diagnóstico e terapêutica, cada vez mais, revestida de uma importância extraordinária. Sendo, deste modo, proposta como um novo alvo potencialmente seletivo para a terapia anti-cancerígena.

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

A Telomerase sintetiza ADN telomérico, que confere estabilidade aos cromossomas. Na ausência da Telomerase, os telómeros encurtam em cada ciclo de replicação do ADN, conduzindo à interrupção do ciclo celular (senescência) ou à morte celular por apoptose.

A Telomerase, por si só, não é um oncogene, mas a sua repressão ou regulação rigorosa em humanos, pode funcionar como supressor de tumores.

As vantagens chave de utilizar a Telomerase como alvo – em comparação com a panóplia de alvos em processos oncológicos – são a sua relativa universalidade, originalidade e especificidade para células cancerígenas.

A Telomerase surge sobre-expressa em muitos tumores – cerca de 80-90% de praticamente todos os tipos de cancro, incluindo células estaminais cancerígenas – e é necessária para a manutenção a longo-prazo dos telómeros, que por sua vez são fundamentais para a sobrevivência a longo-prazo de células cancerígenas.

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

Em suma, a Telomerase é codificada por genes não-redundantes (únicos) de maneira a que os carcinomas se tornem menos propensos a desenvolver resistência a terapias que têm como alvo a Telomerase, relativamente a outros alvos

cancerígenos que são membros de uma família de genes tais como recetores do fator de crescimento ou enzimas de transdução de sinais.

Todos estes fatores sugerem que fármacos anti-cancerígenos que atuem ao nível da inibição da Telomerase podem ter uma ampla janela terapêutica. Neste sentido, a investigação de novos inibidores da telomerase - com melhores efeitos anti-cancerígenos e um perfil de segurança melhor estabelecido - é ainda o cerne da questão.

1.4. Ligandos seletivos para G-Quadplexos

O design de ligandos seletivos para G4 focou-se, inicialmente, na diferenciação entre ADN Duplex e G4.

Com um número crescente de quadruplexos identificados no genoma, o design de ligandos tem sido igualmente dirigido à seletividade entre diferentes espécies de quadruplexos.

O número de ligandos G4 conhecidos aumentou recentemente. Muitos destes ligandos apresentam uma grande superfície aromática plana, cargas catiónicas e capacidade para adotar um modo de *stacking* terminal.

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

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

1.4.1. Pequenas moléculas que estabilizam os G-quadruplexos

Existe uma enorme variedade de pequenas moléculas orgânicas, assim como complexos metálicos que foram desenvolvidos como potenciais agentes estabilizadores de G-quadruplexos.

Se inúmeras pequenas moléculas conseguem estabilizar os G4, algumas ligam-se aos *i-motifs* – estruturas formadas por resíduos de citidina que se associam em forma de duplex paralelo, formando pares C•CH⁺. Cada um destes duplexos associa-se anti-paralelamente de modo a formar quadruplexos a pH ácido ou neutro.

As indolo[3,2-c]quinolinas são um grupo de compostos que, pela sua estrutura aromática e por poderem suportar diferentes tipos de derivatização, se tornam atractivas como núcleo central para ligandos G4.

1.4.1.1. Indoloquinolinas

As indoloquinolinas são compostos tetracíclicos planares – de origem natural – que na sua estrutura possuem um núcleo de indole e outro de quinolina.

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

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

Estratos desta planta têm sido usados desde há bastante tempo, na medicina tradicional na África Central e Ocidental, no combate a diversas doenças – nomeadamente doenças infecciosas – incluindo a malária. Em adição à sua atividade antiplasmódica, a criptolepina por si só tem capacidade para atuar como agente anti-bacteriano, anti-fúngico e anti-cancerígeno.

5-metil-indolo[3,2-c]quinolina (IQc), também conhecida como isocriptolepina, foi posteriormente isolada a partir da mesma espécie de arbusto. Compostos contendo IQcs, carecem ainda de investigação, pois só recentemente estas moléculas começaram a integrar compostos químicos.

Em suma, o potencial citotóxico de alguns derivados de indoloquinolinas, pensa-se que seja devido às interações estabelecidas por estas moléculas com o ADN genómico, conduzidas por interações π - π *stacking* favoráveis – do esqueleto de indoloquinolina intercalado com os pares de bases do ADN.

Em adição, para além da ligação ao ADN Duplex, os derivados de indoloquinolinas também demonstraram capacidade para estabelecer ligações com triplexos de ADN, assim como com estruturas G4, com elevada afinidade. Despertando assim, para perspetivas interessantes em direção ao desenvolvimento de ligandos de ADN com base em indoloquinolinas – com inúmeras aplicações potenciais em diagnóstico, terapêutica e microbiologia. Não obstante, o conhecimento concreto acerca de alvos celulares específicos para os seus múltiplos mecanismos de ação no interior das células, continua por explorar, apesar de o ADN ser o maior alvo potencial para a ação de indoloquinolinas.

Relativamente a estudos existentes com indolo[3,2-c]quinolinas, recentemente o grupo de Lavrado demonstrou que:

Uma biblioteca de IQcs – com vários padrões de substituição de cadeias laterais de alquildiamina – foi avaliada em relação ao modo de ligação e eficiência para G4.

Ensaio de fluorescência por Transferência de Energia de Ressonância de Frörster (FRET) demonstraram que as IQcs com carga positiva no núcleo heteroaromático e duas cadeias laterais fracamente básicas, são estabilizadores potentes e seletivos de G4 nos telómeros humanos e em genes promotores.

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

As indolo[3,2-b]quinolinas (IQb) alcalóides são uma classe de ligandos de G4 bem estabelecida e tem emergido – com potenciais aplicações – como agentes anti-cancerígenos. Um dos primeiros estudos com base nestes compostos foi efetuado

por Neidle et al, os quais demonstraram que os derivados de IQb estabilizam os G4 teloméricos. Estudos subsequentes exploraram as IQbs como estabilizadores de G4 nos telómeros e em regiões promotoras de oncogenes e avaliada a sua bioatividade. Estudos recentes em torno de derivados de IQb di- e tri-substituídos sugerem que o tipo, número e posição relativa de cadeias laterais protonadas, constituem fatores importantes que comandam a eficiência de ligação e seletividade inter-G4.

Apesar de existirem numerosos estudos de ligação a G4 envolvendo derivados de IQb, a capacidade de ligação do isómero natural IQc permanecia muito por explorar. Neste sentido, o grupo de Lavrado, decidiu avaliar a ligação de derivados de IQc a várias estruturas de G4, recorrendo também a estudos de modelação molecular onde as IQcs interagem com os G4. O trabalho desenvolvido por Lavrado et al suporta a ideia da necessidade de exploração adicional dos efeitos em células cancerígenas induzidos por estabilização de G4. Reforçando a ideia de desenvolvimento e otimização de muitas estratégias com mais seletividade e potencial anti-cancerígeno.

No âmbito da repressão do oncogene KRAS, foi ainda avaliado o papel de IQcs associadas a G4. Este estudo – igualmente desenvolvido por Lavrado et al – demonstrou que a superfície heteroaromática plana prolongada das IQcs pode interagir com os G4 através de interações π -stacking em direção ao terminal dos G-quartetos e as cadeias laterais básicas podem formar ligações de hidrogénio e estabelecer interações eletrostáticas com o esqueleto fosfatado e as ansas/sulcos de ADN-G4, diretamente ou mediado por moléculas de água.

Com base nos estudos supra-referidos, recorreu-se à síntese destes compostos com o objetivo de os utilizar como núcleo central, sendo relevantes na estabilização de G4, pela sua estrutura tetracíclica planar, que permite a introdução de substituintes de modo a formar ligandos protonáveis *in situ* ou N-metilados.

Tudo isto, aliado ao facto de o seu tetraciclo não ser simétrico, estes compostos permitem a construção de bibliotecas quimicamente diversas de potenciais ligandos de G4, nomeadamente com vista à sua aplicação na terapêutica anti-cancerígena.

1.4.1.2. Bis(tiossemicarbazonas) (BTS)

As Bis(tiossemicarbazonas) (BTS) são compostos versáteis com interesse farmacêutico considerável devido às suas diversas atividades biológicas, a saber: anti-*alzheimer*, anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-viral, anti-inflamatória, anti-malária e anti-cancerígena. A ação inibitória que lhe está inerente, pode ser atribuída às suas propriedades quelantes.

O grupo funcional das BTS, com átomos doadores de N ou S conduz a vários potenciais ligandos. Estes ligandos e os seus complexos metálicos têm sido intensivamente estudados nos últimos anos, essencialmente devido às interessantes propriedades biológicas supra-mencionadas.

As BTS atuam, habitualmente, como um quelato – ou ligando quelante – com íons metálicos de transição, estabelecendo ligação através dos átomos de S e N da hidrazina. Estes ligandos, na qualidade de tiona neutra ou tiolato ionizado, coordenam-se através dos átomos de N (imino) ou S de modo simétrico, até mesmo para espécies binucleares.

Este tipo de compostos pode assumir a designação de ligandos bifuncionais, que podem atuar como ligandos tetradentados formando complexos de Cu(II), neutros e com estabilidade suficiente para serem explorados em aplicações biomédicas. Para além de que, a marcação com Cu pode ser conseguida à temperatura ambiente, ao longo de um intervalo de pH, ocorrendo em minutos e com rendimentos quantitativos próximos.

Os complexos de cobre que incorporam estes ligandos têm demonstrado ser especialmente promissores para diversos fins farmacológicos, especialmente como radiofármacos na terapêutica de cancro.

As BTS – como ligandos bifuncionais – podem também ser bastante úteis na conjugação de péptidos, conduzindo a metalo-conjugados, com índice de captação tumoral específica.

1.5. Medicina Nuclear na Teranóstica de Cancro

A Medicina Nuclear é uma especialidade imagiológica, cada vez mais revestida de inequívoca importância quer na descoberta e desenvolvimento de fármacos, quer no diagnóstico precoce e terapêutica de inúmeras patologias.

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

Para contextualizar, um radiofármaco consiste numa preparação farmacêutica que pela sua qualidade e quantidade de radiação emitida, poderá ser utilizada no diagnóstico e terapêutica de diversas patologias.

Um radiofármaco contém um radionuclídeo (emissor de radiação que é detetada no exterior do corpo) – podendo este ser um emissor γ , fornecendo imagens dos órgãos ou tecidos em que se localiza e, neste caso, a sua aplicação é para fins de diagnóstico ou um emissor de partículas alfa (α), beta (β) ou eletrões Auger com capacidade de destruir células cancerígenas, sendo neste caso a sua aplicação para terapêutica – e um vector químico (biomolécula ou ligando orgânico) que permite a incorporação do radionuclídeo numa forma química adequada, levando à fixação preferencial no órgão ou sistema que se pretende estudar (ex.: moléculas radioiodadas, sal de tálio, complexos de tecnécio, péptidos marcados), em suma, o vector químico é o componente que confere as propriedades ao radiofármaco para que este seja processado adequadamente.

Dentro das técnicas de imagiologia não invasiva disponíveis para utilização clínica, pode referir-se que a tomografia computadorizada de emissão de fóton único (*SPECT*) e a Tomografia por emissão de positrão (PET) são as mais comuns, muito em prol da sua maior sensibilidade, sendo as mais promissoras uma vez que permitem fazer a quantificação *in vivo* dos alvos moleculares bem como obter informação funcional do sistema que está a ser analisado. Estas técnicas utilizam radiofármacos, que são formulações farmacêuticas que incluem um radionuclídeo na sua composição que pode ser um emissor de radiação gama (γ) para SPECT ou de positrões (β^+) para PET.

No âmbito da Medicina Nuclear, o termo teranóstica – por definição – refere-se ao emprego do mesmo fármaco para fins simultaneamente de diagnóstico e terapêutica; sendo frequentemente associado à utilização de um vector químico

marcado com um radionuclídeo específico de diagnóstico para avaliar a doença e seguidamente assegurar o acompanhamento da resposta do paciente à terapêutica, com recurso ao mesmo vector químico marcado com um radionuclídeo específico para terapêutica. Muitos radionuclídeos utilizados em terapia permitem também a aquisição de imagens, assegurando o acompanhamento da resposta do paciente à terapêutica (é um bom exemplo o ^{131}I que traduz a definição teórica do termo teranóstica). Na Tabela 1: Radiofármacos aprovados para uso clínico em Terapia em Medicina Nuclear, pode observar-se exemplos de radiofármacos aprovados para uso clínico em Terapia.

Tabela 1: Radiofármacos aprovados para uso clínico em Terapia, em Medicina Nuclear.

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

1.5.1. Radiofármacos úteis em Terapia Auger

Atualmente, a radioterapia convencional assume um papel preponderante, sendo a modalidade que domina o esquema de terapêutica com radiação, aplicada a patologias oncológicas. Não obstante, sabe-se que esta terapêutica não atua ao nível de patologias secundárias (metástases). Por seu curso, os agentes radiofarmacêuticos, de aplicação sistémica, são desenvolvidos para apresentarem seletividade para as células de determinado tipo de tumor, estejam estas circunscritas à área do tumor primário, ou disseminadas por outras localizações anatómicas.

Os radionuclídeos usados clinicamente para fins terapêuticos são emissores de partículas carregadas (pouco penetrantes), como é o caso dos emissores de partículas beta (β^-), uma vez que devido à elevada transferência linear de energia (LET), estas partículas permitem uma destruição eficaz dos tecidos celulares, mesmo sem uma fixação altamente seletiva nos tecidos alvo – são exemplos o ^{90}Y , ^{131}I , ^{153}Sm , ^{166}Ho , $^{186/188}\text{Re}$. Tal pode depreender-se com a análise da Tabela 2: Propriedades físicas de alguns radionuclídeos emissores de electrões Auger.

Tabela 2: Propriedades físicas de alguns radionuclídeos emissores de electrões Auger

Radionuclídeo	$T_{1/2}$	Nº. médio de electrões Auger emitidos por decaimento
^{99m}Tc	6,0 horas	4
^{67}Ga	78 horas	4,7
^{55}Fe	2,7 anos	5,1
^{111}In	67 horas	14,7
^{123}I	13,2 horas	14,9
^{125}I	59,4 dias	24,9
^{201}Tl	73 horas	36,9

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

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

Dado que os electrões Auger apenas percorrem curtas distâncias nos tecidos humanos, o radionuclídeo emissor de electrões Auger tem necessariamente que ser transportado para o núcleo da célula, de forma a causar danos no material genético. Neste sentido, a maior exigência na seletividade da biodistribuição destas partículas deve-se à diferença no grau de penetração das partículas α , β e electrões Auger.

Nos últimos anos, temos assistido a um grande esforço por parte da comunidade científica para explorar as propriedades ionizantes dos emissores de electrões Auger com o objetivo de se conseguir implementar um esquema de terapia com radionuclídeos, cuja atuação seja convenientemente seletiva e dirigida ao órgão/tecido alvo, essencialmente dirigida ao ADN na teranóstica de cancro.

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

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

O principal desafio para este esquema terapêutico é a exigência de atingir uma elevada percentagem de todas as células cancerígenas.

Numa visão global das abordagens terapêuticas com emissores de eletrões Auger da passada década, demonstra diversas direções de pesquisa e vários veículos dirigidos. Os últimos incluem hormonas, péptidos, nucleótidos halogenados, oligonucleótidos e anticorpos.

Até ao momento, não existem radiofármacos comercializados cujos radionuclídeos sejam emissores de eletrões Auger, no entanto a concepção de radiofármacos baseados nos eletrões Auger constitui uma área ativa de investigação.

1.5.2. Complexos de cobre

No âmbito de complexos metálicos, surgem em realce os complexos de cobre como potenciais e efetivos agentes anti-cancerígenos. Na tabela 1, pode observar-se os diferentes isótopos de cobre, bem como os respetivos tipos de decaimento e aplicação clínica.

O cobre (Cu) é um metal de transição que pode existir em estados oxidados e reduzidos. Isto permite-lhe participar em reações redox e química catalítica, tornando-o um co-fator conveniente para uma vasta diversidade de enzimas e moléculas. Para além de que, todos os organismos necessitam de cobre como co-fator catalítico, em diferentes processos biológicos, como a respiração celular, transporte de ferro ou proteção contra o stress oxidativo.

É de ressaltar a importância de Cu para a função de várias enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo, respiração e síntese de ADN. Notavelmente: a citocromo oxidase, superóxido dismutase (SOD), ascorbato oxidase e tirosinase.

As principais funções de moléculas biológicas contendo cobre, envolvem reações de oxidação-redução, nas quais reagem diretamente com o oxigénio molecular para produzir radicais livres. Deste modo, o cobre requer mecanismos homeostáticos, altamente monitorizados para garantir fontes adequadas, sem quaisquer efeitos tóxicos associados.

No que respeita a patologias oncológicas, têm sido investigados complexos inorgânicos de Cu, muito em prol do seu potencial de diagnóstico e terapêutica.

Estudos recentes, referem cada vez mais a utilização de complexos de Cu, pelo seu papel efetivo como agentes seletivos na terapêutica anti-cancerígena, devido à sua ação citotóxica em células cancerígenas.

De entre os vários elementos com interesse em Medicina Nuclear, o cobre oferece uma combinação única de radionuclídeos que são potencialmente convenientes para utilização em fins de diagnóstico e radioterapia dirigida, especificamente: ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{62}Cu , ^{61}Cu e ^{60}Cu . Estes radioisótopos de cobre apresentam propriedades nucleares relativamente diversas, incluindo tempos de vida-média ($T_{1/2}$) variando entre 10 minutos e 62 horas. Em termos de decaimento radioativo, sabe-se que o cobre é um emissor de positrão (β^+) – útil em diagnóstico – ou um emissor partículas (β^-) – útil em radioterapia.

Adicionalmente, a distribuição regional nos tecidos, de todos estes radioisótopos de cobre podem ser avaliadas por técnicas de imagiologia, como o caso de PET.

O radioisótopo ^{64}Cu – com um tempo de vida média de cerca de 12.8 horas – tem uma longa história de aplicações como traçadores biomédicos, notavelmente no uso de $^{64}\text{Cu}^{2+}$, para avaliar a absorção de cobre, assim como o seu metabolismo e excreção. A maioria dos complexos radioativos de cobre, explorados no desenvolvimento de radiofármacos, são espécies de Cu(II) devido à sua maior inércia química.

Comparativamente à prata ou ao ouro, a química dos radiofármacos de cobre é uma área de investigação muito atrativa, motivada por diversas razões, a saber: uma gama variada de propriedades nucleares dos radioisótopos de cobre; diversidade da química de coordenação do cobre; capacidade técnica para produzir

os radionuclídeos; interesse crescente pelo uso de radiofármacos específicos emissores β^- , em radioterapia interna; expansão das unidades de PET.

Na Tabela 3: Propriedades físicas e potenciais aplicações de isótopos de cobre, pode observar-se as propriedades físicas e potenciais aplicações de isótopos de cobre.

Tabela 3: Propriedades físicas e potenciais aplicações de isótopos de cobre

Isótopo	$T_{1/2}$	β^- MeV (%)	β^+ MeV (%)	CE (%)	γ MeV (%)	Aplicação
^{60}Cu	23.4 min	---	2.00 (69%) 3.00 (18%) 3.92 (6%)	7.4%	0.511 (186%) 0.85 (15%) 1.33 (80%) 1.76 (52%) 2.13 (6%)	Marcação radioativa de pequenas moléculas para estudos repetidos sobre diferentes condições fisiológicas
^{61}Cu	3.32 h	---	1.22 (60%)	40%	0.284 (12%) 0.38 (3%) 0.551(120%)	Marcação radioativa de pequenas moléculas
^{62}Cu	9.76 min	---	2.91 (97%)	2%	0.511 (194%)	Estudos repetidos sobre diferentes condições fisiológicas
^{64}Cu	12.7 h	0.573 (39.6%)	0.655 (17.4%)	41%	0.511 (34.8%) 1.35 (0.6%)	Marcação radioativa de pequenas moléculas, péptidos e anticorpos
^{67}Cu	62.0 h	0.395 (45%) 0.484 (35%) 0.577 (50%)	---	---	0.184 (40%)	Marcação radioativa de péptidos e anticorpos

Os complexos de cobre(II) com ligandos bis(tiossemicarbazona) (Cu-BTS) já são conhecidos desde a década de 50, tendo sido propostos na década de 70 como agentes anti-cancerígenos. No entanto, nenhum destes complexos veio a ser usado clinicamente.

Na década de 80, iniciaram-se estudos de complexos Cu-BTS, com cobre radioativo. Estes estudos envolveram uma família alargada de ligandos e identificaram o complexo ^{62}Cu -PTSM (piruvaldeído bis(tiossemicarbazona)) como um ótimo candidato para o estudo da perfusão cerebral e da perfusão do miocárdio.

Os complexos de Cu-BTS, são conhecidos por terem um largo espectro de actividades biológicas, mas foi o seu uso como veículos de entrega de núcleos de

cobre radioactivos, testados como radiofármacos de cobre, que gerou entusiasmo junto da comunidade científica. O seu núcleo de cobre apresenta uma geometria quadrangular plana quando coordenado a ligandos bis(tiossemicarbazona).

No entanto, é devido à sua especificidade por tecidos hipóxicos – tecidos com baixa concentração de oxigénio – acrescido da possibilidade de se coordenar a um núcleo radioactivo de cobre, que está a promover o seu desenvolvimento numa nova geração de agentes de diagnóstico de imagem com potencial específico para tecidos hipóxicos. O complexo de cobre(II) diacetil bis(4-metil-3-tiossemicarbazona) [CuATSM] é um bom exemplo desta família.

A visualização de tecidos em hipóxia (baixo teor de oxigénio, mitocôndrias anormalmente redutoras), tem interesse clínico em oncologia, neurologia ou cardiologia. Para este tipo de aplicação é necessário haver seletividade na retenção da radioatividade nos tecidos em hipóxia face aos tecidos normais.

A facilidade de penetração celular e o baixo potencial redox dos complexos do tipo Cu(II)-BTS tornou-os bons candidatos para o desenvolvimento de radiofármacos para deteção da hipoxia. No entanto, a fixação do ^{62}Cu -PTSM não apresenta seletividade entre tecidos em hipóxia e tecidos “normais”. A introdução de um grupo $-\text{CH}_3$ adicional na estrutura do PTSM conduziu ao complexo ^{62}Cu -ATSM que apresenta um potencial redox inferior ao ^{62}Cu -PTSM e permite visualizar seletivamente tecidos em hipóxia.

O núcleo de cobre apresenta uma geometria quadrangular plana quando coordenado a ligandos BTS. É devido à sua especificidade para tecidos hipóxicos, acrescido da possibilidade de se coordenar a um núcleo radioativo de cobre, que está a promover o seu desenvolvimento numa nova geração de agentes de diagnóstico, em imagiologia de Medicina Nuclear, com potencial específico para tecidos hipóxicos.

O cobre apresenta-se como um agente seletivo na terapêutica de cancro, sendo um co-fator essencial na angiogénese do tumor.

A imagem em Medicina Nuclear – em particular a PET – permite a deteção e monitorização de uma variedade de processos biológicos e patofisiológicos.

No que respeita à descoberta e desenvolvimento de fármacos, o uso de radiofármacos para marcação radioativa de agentes alvo tornou-se uma ferramenta essencial na identificação, *screening* e desenvolvimento de novos agentes alvo.

Neste sentido, o ^{64}Cu ($t_{1/2} = 12.7\text{h}$) foi identificado como um isótopo que está a emergir em PET. A sua vida média é suficientemente longa para marcação

radioativa de uma variedade de agentes alvo e a sua facilidade de produção e química adaptável faz com que este seja um radioisótopo excelente para utilização em imagiologia molecular.

Atualmente, está bem estabelecido o papel fundamental que os iões metálicos desempenham na estabilização G-quadruplexos. Esta afirmação é também demonstrada pelo facto de que as espécies de guanosina-monofosfato auto-associam-se em estruturas helicoidais de G4 em solução aquosa, reforçando a importância ligação de catiões.

A importância de metais de transição em processos biológicos está bem estabelecida, não obstante, segundo os meus conhecimentos, a existência de ligandos G4 incorporando radiometais, ainda não foi reportada na literatura.

A incorporação de centros metálicos em ligandos G4 oferece a possibilidade de explorar uma grande variedade de características estruturais e funcionais com o objetivo de obter uma ligação G4 ideal. Para além de que, no caso de radiometais, suscetíveis de ser usados para imagem e/ou terapia, é possível prever ligandos G4 radiomarcados para teranóstica de cancro.

1.5.2.1. Cu-ATSM e a Terapia Auger

Os isótopos radioativos de cobre (II) (diacetil-bis N4-metiltiossemicarbazona) (Cu-ATSM) foram originalmente desenvolvidos para imagiologia de tumores em hipóxia – essencialmente por serem emissores β^+ em PET. Tendo em conta que o decaimento radioativo do ^{64}Cu passa não só pela emissão de positrões (partículas β^+), mas também de eletrões Auger, este radionuclídeo reveste-se de um grande potencial como agente para teranóstica. Contudo, o sucesso da terapia de radiação interna com recurso ao ^{64}Cu -ATSM estará dependente da contribuição dos eletrões Auger para a morte das células cancerígenas.

Segundo o estudo de McMillan et al, foi possível confirmar a ocorrência de quebras/danos na dupla hélice do ADN, causados pelos eletrões Auger provenientes do decaimento de ^{64}Cu , para além de que foram observadas aberrações cromossómicas após exposição ao ^{64}Cu -ATSM.

Deste modo, pode concluir-se que – tal como Obata et al havia concluído em 2005 – os eletrões Auger provenientes do decaimento do ^{64}Cu são considerados como radiação com elevado LET inerente. Assim, quando o ^{64}Cu atinge os núcleos celulares, ocorrerá morte celular por exposição a eletrões Auger, mas não por outros tipos de radiação. Concomitantemente com estudos prévios, McMillan et al demonstrou que o ^{64}Cu -ATSM induz a morte celular devido à exposição das células

cancerígenas a elétrons Auger com elevado LET, apresentando fortes evidências de que o ^{64}Cu -ATSM danifica o ADN – através dos elétrons Auger – o que suporta a ideia de considerar este radiofármaco como um agente eficaz para modalidade de terapia anti-cancerígena em tumores em hipóxia.

Em suma, perspectivas futuras de investigação experimental e clínica devem focar-se na aplicação terapêutica de ^{64}Cu -ATSM, em teranóstica associada a tumores radiorresistentes. A Figura : Estrutura do Cu-ATSM, ilustra o complexo de cobre com a BTS pretendida.

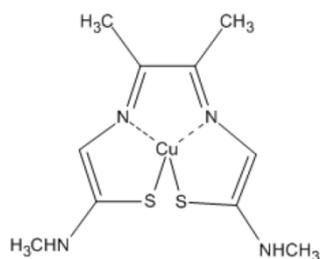


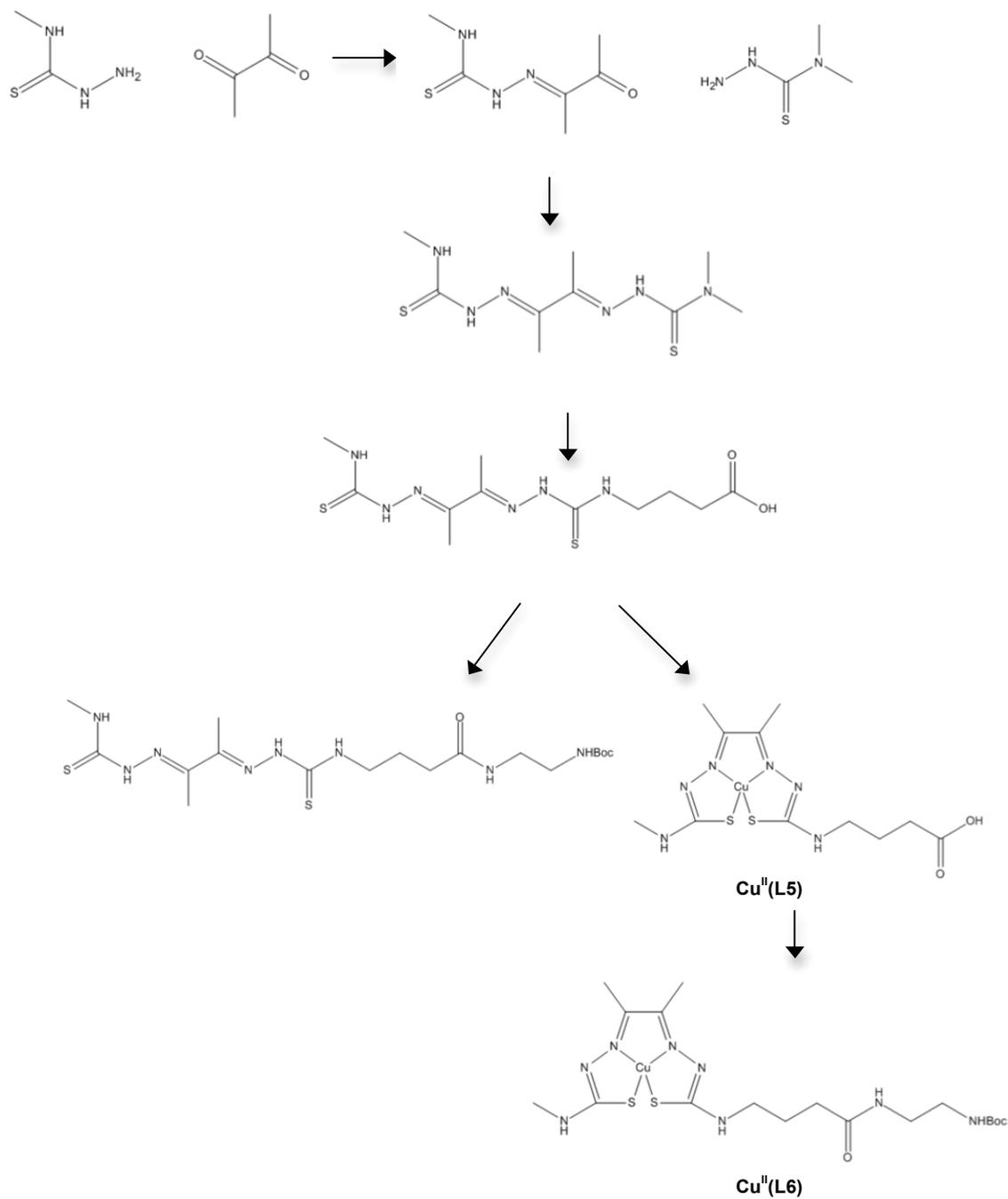
Figura 5: Estrutura do Cu-ATSM. Adaptado de Obata et al. 2005

Assim, é primeiramente proposta a síntese de ligandos bifuncionais – bistiossemicarbazonas – para posterior conjugação aos derivados tri-substituídos de indolo[3,2-c]quinolinas.

Não obstante a tentativa e esforço constantes para cumprir todos os objetivos supramencionados, todo o processo de síntese química acarretou alguns contratempos que, associados à limitação temporal do prazo de entrega da presente dissertação, conduziram a alterações e pequenos contornos relativamente ao que estava previamente postulado. Esta dissertação, contemplará apenas a síntese química dos compostos utilizados, sem descrição de ensaios biológicos adjacentes.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SÍNTESE DE LIGANDOS BIFUNCIONAIS – BIS(TIOSSEMICARBAZONAS)



Esquema 1: Síntese da BTS L7 e complexos de cobre $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L5})$ e $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L6})$.

Na síntese dos ligandos pretendidos (ver **Objectivos do trabalho**) foi utilizado o método descrito por Paterson et al. (2010).

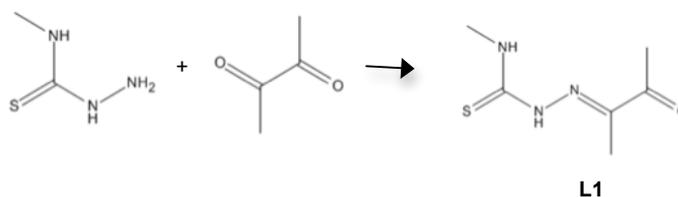
Com vista à obtenção do ligando final: **Diacetil-4-ácidobutírico-4'-metilbis(tiossemicarbazona)Etilenodiamina** (É ESTA A DESIGNAÇÃO?), o esquema sintético dos ligandos bifuncionais iniciou-se com uma reação de transaminação seletiva do precursor – BTS dissimétrica central – L2. Os novos derivados contêm um ácido carboxílico alifático como grupo funcional, tal como pode constatar-se na estrutura de L3.

A progressão de todos os passos reacionais foi seguida por cromatografia em camada fina (TLC).

Os ligandos e complexos de cobre sintetizados foram caracterizados com recurso a técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de protão (^1H -) e de carbono (^{13}C -), espectrometria de massa (ESI-MS) e análises de C, H e N.

Os espectros destes compostos podem ser consultados no Anexo I: Espectros de RMN (^1H -) e (^{13}C -), espectrometria de massa (ESI-MS) e análises de C, H e N, dos compostos de L1 a L7.

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



Esquema 2: Procedimento sintético para obtenção de Diacetil-mono-4-metil-3-tiossemicarbazona (**ligando L1**). Condições reacionais: água destilada, conc. HCl (36%), 5°C.

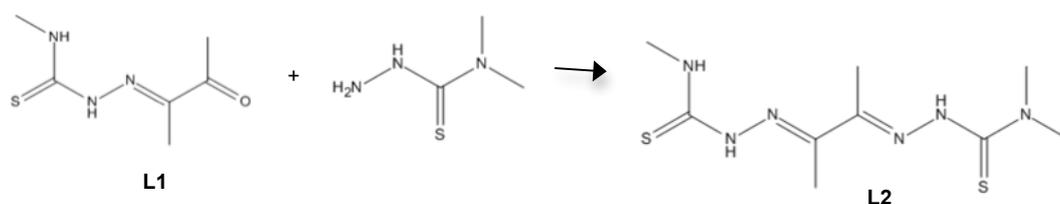
O procedimento sintético inicia-se com uma reação de transaminação entre a bis(tiossemicarbazona): 4-metil-3-tiossemicarbazida (composto de partida) e 2,3-butanediona, originando o ligando L1, com um rendimento reacional de 47%.

O espectro de RMN de ^1H do composto L1 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- dois singuletos (s), o primeiro a $\delta=1,95$ ppm e o segundo a $\delta=2,41$ ppm, com integração para três prótons cada, correspondendo aos prótons dos grupos metilo (CH_3);
- um duplete (d) a $\delta=3,03$ ppm, com integração para três prótons e $^3J_{\text{HH}}=12,8\text{Hz}$, correspondendo aos prótons do grupo metilo acoplados ao NH;

- um multiplete (m) a $\delta=8.62$ ppm, com integração para um próton, que remete para o próton de um dos grupos NH.
- por fim, pode constatar-se a presença de um singulato (s) a $\delta=10,61$ ppm, com integração para um próton, remetendo igualmente para o próton de um dos grupos NH.

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



Esquema 3: Procedimento sintético para a obtenção de Diacetil-4,4-dimetil-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (**ligando L2**). Condições reacionais: DMF e ácido acético (glacial), 48h.

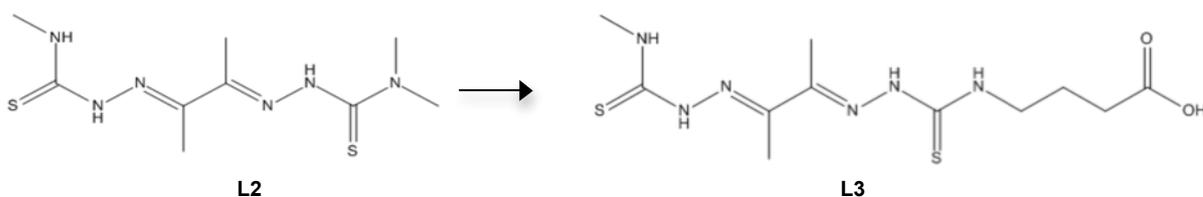
A BTS dissimétrica central para reações de transaminação seletivas (L2) foi preparada por condensação de diacetil-mono-4-metil-3-tiossemicarbazona com 4,4-dimetil-3-tiossemicarbazida e ácido acético catalítico em Dimetilformamida (DMF), à temperatura ambiente (t.a.), obtendo-se o ligando L2 pretendido, com um rendimento reacional de %

O espectro de RMN de ^1H do composto L2 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- dois singuletos (s), o primeiro a $\delta=2,14$ ppm e o segundo a $\delta=2,19$ ppm, com integração para três prótons cada, correspondendo aos prótons dos grupos metilo (CH_3);
- um duplete (d), a $\delta=3,03$ ppm, com integração para três prótons e $^3J_{\text{HH}}=4.2\text{Hz}$, correspondendo aos prótons do grupo metilo acoplados ao NH;
- um singuleto (s), a $\delta=3,27$ ppm, com integração para seis prótons, correspondendo ao grupo $(\text{CH}_3)_2$;
- um duplete (d), a $\delta=8.37$ ppm, com integração para um próton e $^3J_{\text{HH}}=4.2\text{Hz}$, que remete para NH-CH_3 ;
- um singuleto (s), a $\delta=9,49$ ppm, com integração para um próton, que remete para o próton de um dos grupos NH;

- por fim, pode constatar-se a presença de um singulato (s) a $\delta=10,20$ ppm, com integração para um próton, remetendo igualmente para o próton de um dos grupos NH.

3.1.3. Síntese de Diacetil-4-ácidobutirico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (L3)



Esquema 4: Procedimento sintético para a obtenção de Diacetil-4-ácidobutirico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (**ligando L3**). Condições reacionais: terc-butil-2-aminoetilcarbamato(1.6 equiv), acetonitrilo, refluxo.

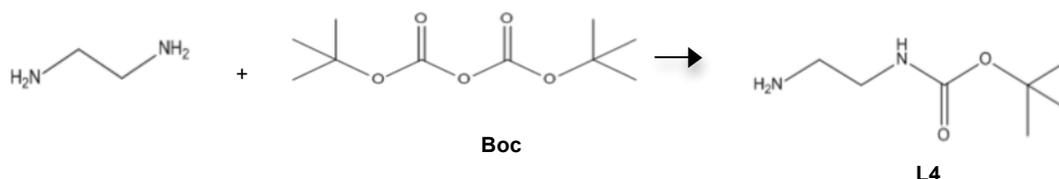
A reação de L2 com o ácido 4-aminobutírico permite o isolamento de novos ligandos com substituintes alquilo de ácidos carboxílicos, conduzindo à obtenção do composto L3.

O espectro de RMN de ^1H do composto L3 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- um multiplete (m), a $\delta=1,81$ ppm, com integração para dois prótons, correspondendo a $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$;
- um singuleto (s), a $\delta=2,20$ ppm, com integração para seis prótons, correspondendo ao grupo CH_3 ;
- um tripleto (t), a $\delta=2,25$ ppm, com integração para dois prótons e $^3J_{\text{HH}}=7.4\text{Hz}$, que remete para $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$;
- um duplete (s) a $\delta=3,03$ ppm, com integração para três prótons e $^3J_{\text{HH}}=4.5\text{Hz}$, que remete para NH-CH_3 ;
- um multiplete (m), a $\delta=3,59$ ppm, com integração para dois prótons, correspondendo a $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$;
- um quadruplete (q), a $\delta=8,39$ ppm, com integração para um próton e $^3J_{\text{HH}}=4.5\text{Hz}$ e que remete para NH-CH_3 ;
- um tripleto (t), a $\delta=8,45$ ppm, com integração para um próton e $^3J_{\text{HH}}=6\text{Hz}$, que remete para NH-CH_2 ;

- por fim, pode constatar-se a presença de dois singletos (s) o primeiro a $\delta=10,17$ ppm e o segundo a $\delta=10,22$ ppm, com integração para um próton cada, remetendo para os prótons dos grupos NH.

3.1.4. Síntese de Etilendiamina protegida com Boc (L4)



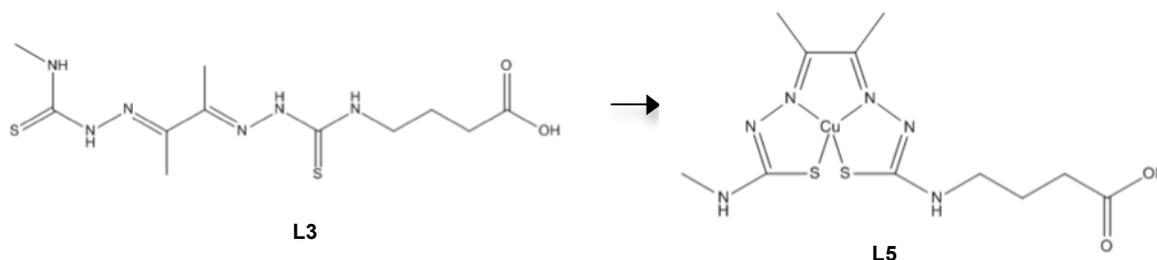
Esquema 5: Procedimento sintético para a obtenção de Etilendiamina protegida com Boc (**ligando L4**). Condições reacionais: Dioxano, Boc, 22h.

O composto L4 foi obtido com um rendimento reacional de 68%.

O espectro de RMN de ^1H do composto L4 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- dois singletos (s), o primeiro a $\delta=1,36$ ppm, com integração para nove prótons, correspondendo aos prótons de $(\text{CH}_3)_3$ do Boc; o segundo a $\delta= 1,44$ ppm e com integração para dois prótons, correspondendo aos prótons de NH_2 ;
- um quadrupeto (q) a $\delta=2,72$ ppm, com integração para dois prótons e $J_{\text{HH}}= 4.5\text{Hz}$, correspondendo aos prótons de $\text{CH}_2\text{-NHBoc}$;
- um um (d) a $\delta=$ ppm.
- por fim, um tripleto (t), a $\delta=$ ppm, com integração para dois prótons e $J_{\text{HH}}= \text{Hz}$, correspondendo aos prótons do grupo CH_2 .

3.1.5. Síntese de Diacetil-4-ácido butírico-4'-metilbis(tiossemicarbazonato)-cobre(II) [$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L3})$] (L5)



Esquema 6: Procedimento sintético para a obtenção de Diacetil-4-ácidobutirico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (**Complexo L5**). Condições reacionais: DMF, t.a., 17h.

O complexo L5 foi obtido com um rendimento reacional de 76%.

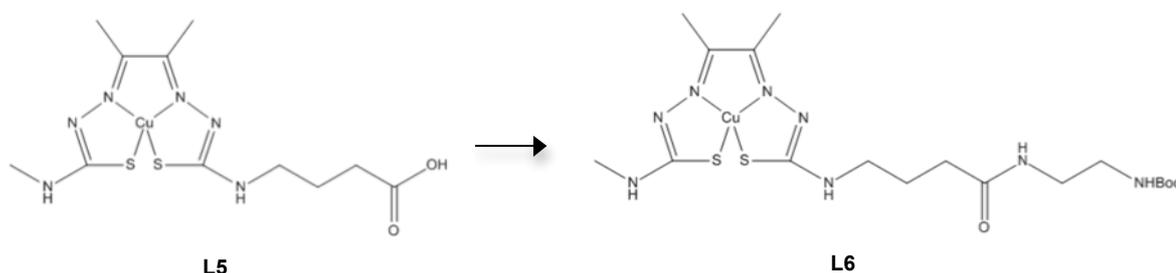
A pureza do complexo L5 pôde ser confirmada por análise de ESI-MS.

No espectro de massa do complexo L5 – obtido em modo positivo – detetou-se um pico maioritário a $m/z = 394,2$ que corresponde ao ião molecular $[M+H]^+$ e um pico de menor intensidade a $m/z = 396,2$ correspondente ao ião $[M+3H]^+$. Neste espectro foram ainda detetadas outras espécies catiónicas com menor intensidade a $m/z = 395,2$, a $m/z = 397,2$ e a $m/z = 398,2$.

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

A partir destas análises, pode concluir-se que os espectros ESI-MS de L5 apresentam um desdobramento compatível com o teoricamente esperado (calculado), de acordo com a distribuição isotópica dos compostos. Neste sentido, a título de exemplo, apresentam-se na Figura .. – ESI-MS do complexo L5: (A) Modo positivo; (B) Modo negativo.

3.1.6. Síntese de NÃO SEI QUE NOME DÊ A ESTE COMPOSTO! PODE SER : **Diacetil-4-ácidobutirico-4'-metilbis(tiossemicarbazonato)-cobre(II)- EtilenodiaminaBoc ?(L6)**



Esquema 7: Procedimento sintético para a obtenção de **Diacetil-4-ácidobutirico-4'-metilbis(tiossemicarbazonato)-cobre(II)-EtilenodiaminaBoc** (**Complexo L6**).

Condições reacionais: EDC, NHS, DMF, Etilenodiamina-Boc, t.a., atmosfera de N_2 .

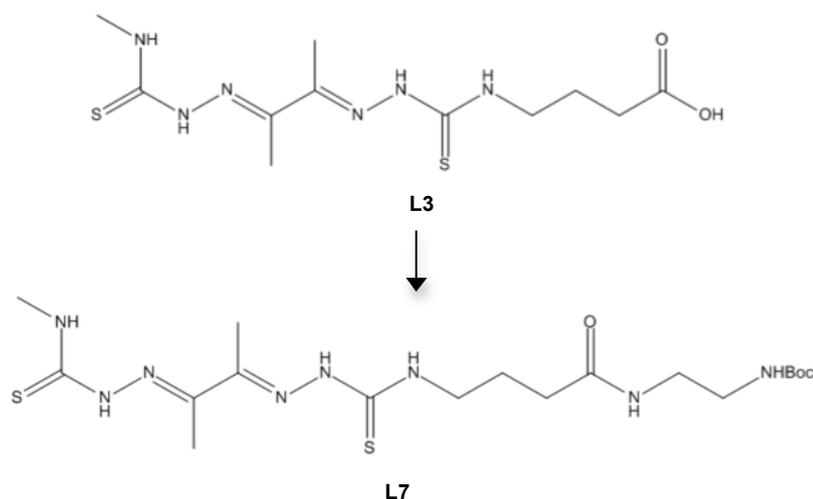
O complexo L6 foi obtido com um rendimento reacional de %.

A pureza do complexo L6, tal como para L5, pôde ser confirmada por análise de ESI-MS.

No espectro de massa do complexo L6 – obtido em modo negativo – observou-se um pico maioritário a $m/z=534,1$ correspondente ao ião molecular $[M-2H]^-$ e duas espécies aniónicas, de menor intensidade, a $m/z=535,2$ correspondente a $[M-H]^-$ e a $m/z=536,2$ correspondente a $[M]^-$.

A partir desta análise, pode concluir-se que o espectro ESI-MS de L6 apresenta um desdobramento compatível com o teoricamente esperado (calculado), de acordo com a distribuição isotópica dos compostos. Neste sentido, a título de exemplo, apresenta-se na Figura .. – ESI-MS do complexo L6: Modo positivo.

3.1.7. Síntese de **Diacetil-4-ácidobutírico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) Etilenodiamina ??? NÃO SEI SE O NOME ESTÁ CORRETO (L7)**



Esquema 8: Procedimento sintético para a obtenção de **Diacetil-4-ácidobutírico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) Etilenodiamina (ligando L7)**. Condições reacionais: EDC, NHS, DMF, Etilenodiamina-Boc, t.a., atmosfera de N_2

O espectro de RMN de 1H do composto L7 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- dois singletos (s), o primeiro a $\delta=$ ppm, com integração para protões, correspondendo aos protões de ; o segundo a $\delta=$ ppm e com integração para protões, correspondendo aos protões de .
- um quadrupeto (q) a $\delta=$ ppm, com integração para e

- um tripleto (t), a δ = ppm, com integração para dois prótons e
- por fim, um (d) a δ = ppm;

A fim de avaliar a pureza do complexo L7, foi também realizada uma análise de ESI-MS.

No espectro de massa do composto L7 – obtido em modo negativo – detetou-se um pico maioritário a m/z = 473,2 que corresponde ao ião molecular $[M-H]^-$.

A partir destas análises, pode concluir-se que o espectro ESI-MS de L7 apresentam um desdobramento compatível com o teoricamente esperado (calculado), de acordo com a distribuição isotópica dos compostos. Neste sentido, a título de exemplo, apresenta-se na Figura .. – ESI-MS do composto L7: Modo negativo.

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

Na síntese dos compostos pretendidos (ver **Objectivos do trabalho**) foi utilizado o método descrito por Lavrado et al. (2015).

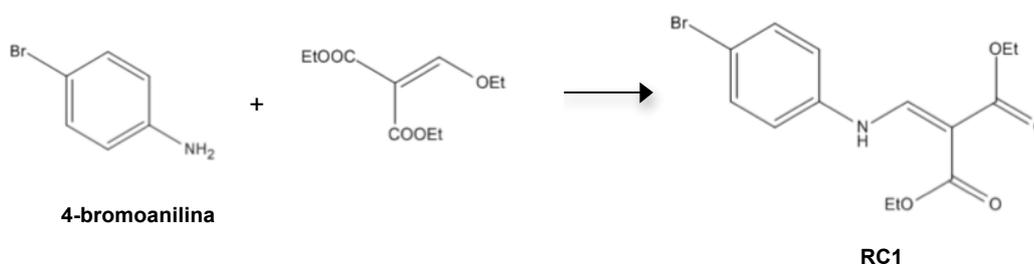
Numa descrição sumária da estratégia de síntese seguida, é de ressaltar a síntese dos derivados 2,8- e 2,9-dibromoindolo[3,2-c]quinolina por ciclização dos derivados 4-(1*H*-Benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-il)bromoquinolina (RC7-1 e RC7-2) obtidos, por sua vez, por uma reação entre a 6-Bromo-4-cloroquinolina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

A 4-cloroquinolina (RC5) foi, por sua vez, sintetizada em cinco passos a partir de 4-bromoanilina e dietil-2-(etoximetileno)malonato, de acordo com a reação de Gould-Jacobs. O esquema sintético completo [pode ser observado na figura...](#)

A progressão de todos os passos reacionais foi seguida por cromatografia em camada fina (TLC).

Todos os compostos sintetizados foram caracterizados com recurso a técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de próton (¹H-). Os espectros destes compostos podem ser consultados no Anexo II: Espectros de RMN (¹H-) dos compostos de RC1 a RC7.

3.2.1. Síntese de Dietil-2-[[4-bromofenil]amino]metileno]malonato (RC1)



Esquema : Procedimento sintético para a obtenção de Dietil-2-[[4-bromofenil]amino]metileno]malonato (**composto RC1**). Condições reacionais: refluxo.

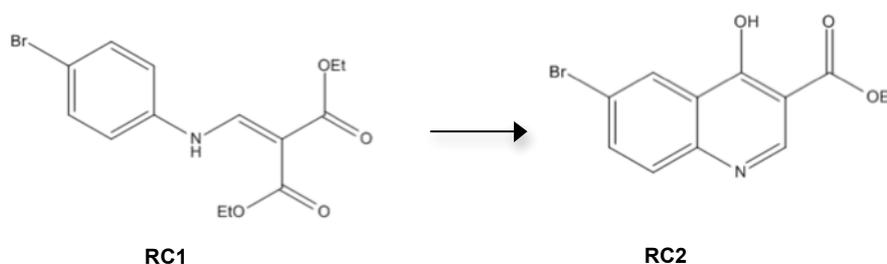
O procedimento sintético inicia-se com uma reação de substituição nucleofílica do grupo etoxi pela amina de 4-bromoanilina (composto de partida), originando o composto RC1 com um rendimento reacional de 87%.

O espectro de RMN de ^1H do composto RC1 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- dois quartetos (q) sobrepostos (δ entre 4.23 e 4.08 ppm) com integração para quatro prótons e dois tripletos (t) sobrepostos (δ entre 1.28, $J=7.1$ Hz e 1.21 ppm, $J=7.1$ Hz) com integração para três prótons cada, correspondendo aos dois grupos etilo dos ésteres;
- dois dupletos (d) a $\delta=7.55$ ppm, $J=9$ Hz e $\delta=7.35$ ppm, $J=9$ Hz com integração para 2 prótons cada, correspondendo aos prótons do anel aromático;
- por fim, pode constatar-se ainda a presença de dois dupletos restantes com $\delta=10.66$ ppm, $J=13.8$ Hz e $\delta=8.35$ ppm, $J=13.8$ Hz, com integração para um próton cada, correspondendo aos prótons dos grupos amina e vinilo.

De acordo com a análise supra-referida, pode constatar-se a presença do produto pretendido.

3.2.2. Síntese de Etil-6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-carboxilato (RC2)



Esquema : Procedimento sintético para a obtenção de Etil-6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-carboxilato (**composto RC2**). Condições reacionais: difenil éter, refluxo.

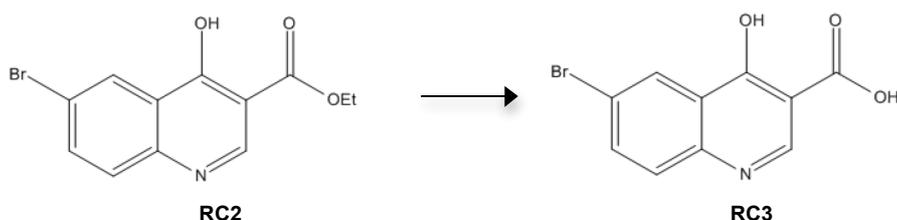
O segundo passo sintético contempla uma ciclização, a elevadas temperaturas ($\approx 260^\circ\text{C}$), com o objetivo de formar a quinolina RC2, com um rendimento reacional de 79%.

O espectro de RMN de ^1H do composto RC2 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- quatro sinais – correspondentes aos quatro prótons aromáticos – que, pela análise da sua multiplicidade, pode atribuir-se o singuleto (s) a $\delta=8.59$ ppm ao H₂; o duplete a $\delta=8.22$ ppm e J=2.1 Hz ao H₅; o duplo duplete (dd) a $\delta=7.87$ ppm e J=9, 2.1 Hz; o duplete (d) a $\delta=7.60$ ppm e J=9 Hz; com integração para um próton cada;
- pode ainda observar-se um quarteto a $\delta=4.22$ ppm e J=7.2 Hz com integração para dois prótons e um triplo a $\delta=1.28$ ppm e J=7.2 Hz, com integração para três prótons, sendo compatível com a presença do grupo etilo do éster.

Após esta análise e concomitantemente com o descrito por Lavrado et al. (2015), pode constatar-se a presença do composto pretendido. Não obstante, deparamo-nos com contaminação por presença vestígios do composto RC4 no nosso espectro.

3.2.3. 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-acido carboxílico (RC3)



Esquema 3: Procedimento sintético para a obtenção de 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-acido carboxílico (**composto RC3**). Condições reacionais: NaOH 10%, reflux.

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

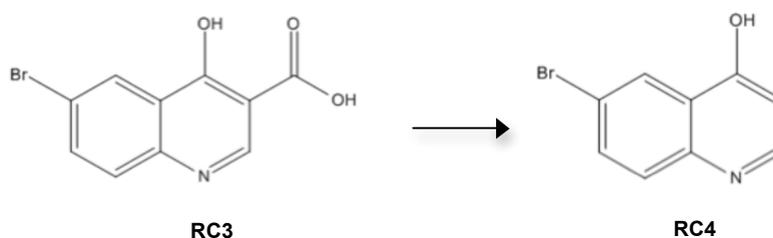
O espectro de RMN de ¹H do composto RC3 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- quatro sinais – correspondentes aos quatro prótons aromáticos – que, pela análise da sua multiplicidade, pode atribuir-se o duplete (d) a $\delta=7.79$ ppm e J=8.9 Hz; o duplo duplete (dd) a $\delta=8.05$ ppm e J=8.9, 2.4 Hz; o duplete a $\delta=8.36$ ppm e J=2.4 Hz e o singuleto (s) a $\delta=8.94$ ppm, com integração para um próton cada;
- comparativamente ao espectro do composto RC2, pode constatar-se a ausência do quarteto a $\delta=4.22$ ppm e do triplo a $\delta=1.28$ ppm e presença do

sinal do próton do ácido carboxílico, na forma de singuleto (s) a $\delta=13.60$ ppm.

A análise deste espectro revela a formação do composto RC3.

3.2.4. Síntese de 6-bromoquinolina-4-ol (RC4)



Esquema : Procedimento sintético para a obtenção de 6-bromoquinolina-4-ol (**composto RC4**). Condições reacionais: difenil éter, refluxo.

O quarto passo sintético consiste numa descarboxilação térmica, com conseqüente obtenção do composto RC4 com um rendimento reacional de 80%.

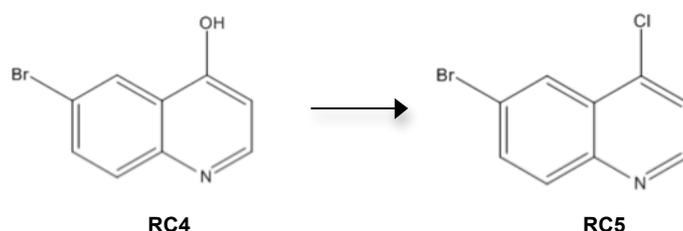
O espectro de RMN de ^1H do composto RC4 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- a permanência dos quatro sinais mais um adicional, que pela análise da sua multiplicidade, podem atribuir-se aos prótons do anel aromático, com integração para um próton cada, a saber: quatro dupletos (d) a $\delta=8.16$ ppm e $J=2.4$ Hz, a $\delta=7.95$ ppm e $J=7.5$ Hz, a $\delta=7.52$ ppm e $J=8.7$ Hz e a $\delta=6.08$ ppm e $J=7.5$ Hz e, um duplo duplete a $\delta=7.79$ ppm e $J=8.7, 2.4$ Hz;
- por comparação com o espectro referente ao composto RC3, pode denotar-se que surge adicionalmente um singuleto (s) a $\delta=11.94$ ppm, com integração para um próton e que remete para o próton do álcool.

É, ainda, ausente o sinal a $\delta=13.60$ ppm referente ao próton do ácido carboxílico, o que confirma a descarboxilação eficaz de RC3.

A análise deste espectro revela a formação do composto RC4.

3.2.5. 6-bromo-4-cloroquinolina (RC5)



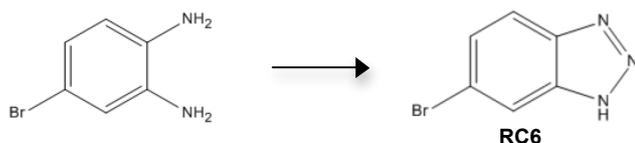
Esquema : Procedimento sintético para a obtenção de 6-bromo-4-cloroquinolina (**composto RC5**). Condições reacionais: POCl₃, refluxo.

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

O espectro de RMN de ¹H do composto RC5 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- a permanência dos cinco sinais, que pela análise da sua multiplicidade, podem atribuir-se aos prótons do anel aromático, com integração para um próton cada, a saber: três dupletos a $\delta=8.88$ ppm e $J=4.7$ Hz, a $\delta=8.32$ ppm e $J=2.1$ Hz, a $\delta=8.06$ ppm e $J=9.0$ Hz e a $\delta=7.82$ ppm e $J=4.7$ Hz e um duplo duplo (dd) a $\delta=8.00$ ppm e $J=9.0, 2.1$ Hz;
- por comparação com o espectro referente ao composto RC4, pode denotar-se a halogenação da quinolina, sendo ausente o sinal a $\delta=11.94$ ppm correspondente ao próton do álcool;

3.2.6. 6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (RC6)



4-bromo-1,2-diaminobenzeno

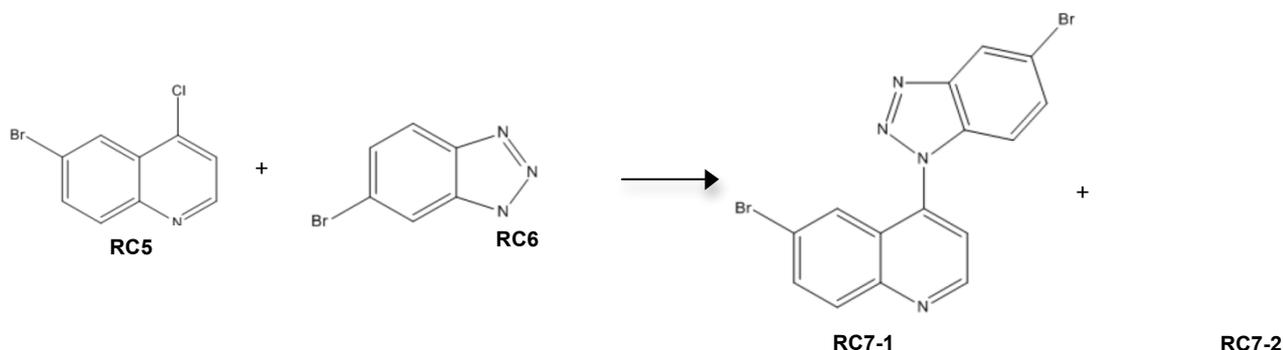
Esquema : Procedimento sintético para a obtenção de 6-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (composto RC6). Condições reacionais: NaNO₃, AcOH, sonicado (35Hz).

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

O espectro de RMN de ¹H do composto RC5 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

- um singuleto (s) largo a $\delta=15.91$ ppm, correspondendo ao protão do grupo NH que integra o triazol;
- três sinais – correspondentes aos três protões aromáticos – que, pela análise da sua multiplicidade, pode atribuir-se três singuletos a $\delta=8.2$ ppm, a $\delta=7.91$ ppm e a $\delta=7.5$ ppm

3.2.7. 6-bromo-4-(5-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (RC7)



Esquema : Procedimento sintético para a obtenção de 6-bromo-4-(5-bromo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)quinolina (compostos RC7-1 e RC7-2). Condições reacionais: 120°-145°C.

No último passo deste esquema sintético, procede-se ao acoplamento da quinolina RC5, com o benzotriazol RC6. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna, dando origem a três frações, as quais foram analisadas por RMN de ¹H. Após esta análise, concluiu-se a presença dos compostos RC7-1 e RC7-2, com um rendimento reacional de % e de %, respetivamente.

O espectro de RMN de ^1H do composto RC7-1 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

-

O espectro de RMN de ^1H do composto RC7-2 apresenta sinais a desvios químicos e multiplicidade de acordo com o descrito na literatura de referência, nomeadamente:

-

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES E ANÁLISE CRÍTICA

No início do desenvolvimento da presente Dissertação, postulou-se, *à priori*, como objetivo principal, elucidar a relevância de quelatos bifuncionais de Cu(II) que atuassem como ligandos seletivos de ADN G4 no design de novas ferramentas e na descoberta de novas estratégias, de modo a contribuir de alguma forma para a pesquisa incessante de inúmeros investigadores na construção de um arsenal terapêutico suficientemente eficaz para “combater” o cancro.

Alicerçada nos estudos em torno do papel da Telomerase na manutenção de células cancerígenas – que comprovavam claramente o seu elevado potencial como alvo terapêutico – e sedimentada em conhecimentos adquiridos no decurso da análise crítica da revisão literária que serviu de base à presente investigação, foi possível constatar que, sendo os G4 particularmente relevantes em áreas do genoma como os telómeros, regiões promotoras de oncogenes e promotores de chaperoninas de oncogenes e sendo a Telomerase responsável pela manutenção dos telómeros, terapias dirigidas aos ADN-G4 – assim como à inibição da Telomerase – são alvos com um papel cada vez melhor estabelecido e potencial acrescido na teranóstica de cancro.

Por todas as razões supra-mencionadas – que revestem os G4 de uma importância fulcral como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos anti-cancerígenos – numerosas investigações no sentido de conseguir ligandos bifuncionais estabilizadores de G4, têm recebido uma atenção crescente entre a comunidade científica.

Neste sentido, a estabilização de G4 por ligandos seletivos, é fulcral para impedir a proliferação celular descontrolada, comumente associada a patologias oncológicas.

Como análise crítica, pode constatar-se que a descoberta de mais agentes, capazes de atuar ao nível do ADN-G4 nos telómeros – com consequente inibição da telomerase – é verdadeiramente urgente para o estudo de mecanismos específicos de diagnóstico de patologias oncológicas, recorrendo a complexos de Cu-BTS e associando indoloquinolinas, como biomoléculas capazes de estabilizar eficazmente os G4.

A atividade biológica significativa de muitos derivados de indoloquinolinas – tanto naturais como sintéticas – parece dever-se, essencialmente, às interações destas moléculas com o ADN genómico. Contudo, é possível verificar que estruturas alternativas de ADN também constituem alvos com elevada afinidade, fazendo com que as moléculas de indoloquinolinas tetracíclicas com forte capacidade de intercalação, se tornem estruturas-modelo atrativas no desenvolvimento de ligandos de ADN para diversos fins farmacológicos.

Um núcleo de indoloquinolina carregado positivamente e com deficiência de eletrões tem demonstrado, em muitos casos, aumentar as interações π - π *stacking* não só com os pares de bases dos quadruplexos de Hoogsteen.

Em adição, para que haja força de ligação, a seletividade da ligação constitui um parâmetro crítico para qualquer potencial aplicação das indoloquinolinas.

Tendo em mente que o seu isómero natural – IQb – atuava eficazmente na estabilização de G4, com potencial anti-cancerígeno e seletividade considerável e, uma vez que o papel das IQcs ainda estava por explorar, seguiu-se o esquema sintético de Lavrado et al como modelo de síntese de derivados de IQcs com o objetivo de serem utilizados como biomoléculas a acoplar a bistiossemicarbazonas, atuando estas últimas como ligandos bifuncionais, integrando complexos de cobre.

Até ao momento, os ligandos para G4 reportados na literatura, possuem características únicas e adaptadas à necessidade de otimização da interação com as estruturas G4. Na sua maioria, estes ligandos incorporam grupos aromáticos volumosos com vários anéis, de modo a permitir o estabelecimento de interações π - π *stacking* com as tétrades de G. Alguns destes ligandos encontram-se estabilizados por metais com carga positiva, com o objetivo de ajudar na estabilização do G4 por coordenação com o centro metálico. A interação com as ansas é também valorizada, conduzindo à existência de ligandos com cadeias laterais carregadas positivamente, de modo a permitir interações iónicas com os grupos fosfato dos diversos nucleótidos, bem como oxigénios e azotos de bases não envolvidas diretamente na formação de G4.

No âmbito de complexos metálicos, surgem em realce os complexos de cobre – nomeadamente complexos Cu-BTS – que são moléculas revestidas de uma importância extraordinária, por terem um largo espectro de actividades biológicas, essencialmente como potenciais e efetivos agentes anti-cancerígenos.

Apesar dos esforços e dedicação da comunidade científica a esta temática, deparei-me com uma vastidão de conhecimentos por adquirir. Por outras palavras, muitos são os mistérios inerentes à oncologia que ainda estão por desvendar; não obstante, o desenvolvimento e estudo da interligação entre o ADN-G4, complexos de Cu-BTS e indoloquinolinas foi um passo importante nesse sentido.

CAPÍTULO 5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Condições gerais

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

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

5.1.1. Solventes e Reagentes

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

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

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

5.1.2. Técnicas de caracterização e Equipamentos

5.1.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

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

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

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

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

Compostos sintetizados no C²TN:

Os espectros de RMN de ^1H - e ^{13}C - foram registados num espectrómetro Varian Unity, pertencente ao Instituto Superior Técnico de Lisboa.

O equipamento exibe uma frequência de ressonância de 300 MHz ou 400 MHz e os espectros foram obtidos a 20°C.

Segundo indicado no procedimento sintético de referência e de acordo com a solubilidade do composto em estudo, utilizou-se como solventes deuterados – nas avaliações de RMN – o DMSO e o clorofórmio (CDCl_3).

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

5.1.2.2. Espectrometria de massa (ESI-MS):

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

5.1.2.3. Análise elementar de C, H e N:

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

5.1.3. Técnicas de Purificação

5.1.3.2. Cromatografia em coluna

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

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

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

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

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

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

Compostos sintetizados no C²TN:

A cromatografia em coluna foi realizada com recurso a sílica-gel 60, com granulometria 0,060 mesh ASTM (Merck). Para este efeito foram utilizadas colunas de vidro com a dimensão apropriada à quantidade de amostra a purificar. O enchimento foi preparado com uma mistura de sílica-gel e de eluente (CDCl₃) adequado para permitir a separação do composto pretendido. O sistema de eluentes foi selecionado de acordo com as características (polaridade) do composto a purificar.

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

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

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

Os compostos L6 e L7

5.1.3.3. Recristalização por par de solventes – FFUL:

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

5.1.3.4. Recristalização por gradiente térmico - C²TN:

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

5.1.4. Técnicas de Monitorização das reações

5.1.4.1. Cromatografia em camada fina (TLC)

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

5.2. Síntese Química

5.2.1. Síntese de Ligandos bifuncionais – BTS:

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

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

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

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

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

Por último, o produto foi recolhido por filtração, lavado com *N*-pentado e seco para se obter o composto (1) (2,125g; mmol), com um rendimento reacional de 47%.

5.2.1.2. Síntese de Diacetil-4,4-dimetil-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (H₂L¹)

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

A suspensão foi arrefecida num banho de gelo e, posteriormente, o sólido “amarelo translúcido” foi recolhido por filtração, lavado com água (1x), com etanol (2x) e com dietil éter (3x) e seco para originar o composto (H_2L^1) (g; mmol), com um rendimento reacional de %.

5.2.1.3. Síntese de Diacetil-4-ácidobutírico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) (H_2L^2)

O composto (H_2L^1) (0,28g; 1,0mmol) foi diluído em AcOEt (30mL) e colocado sob agitação. Em seguida, foi adicionado a esta solução o ácido 4-aminobutírico (0,21g; 2,0mmol; 2eq.). A suspensão amarela resultante foi aquecida em refluxo, durante 34h, sob uma atmosfera de N_2 .

O composto resultante foi arrefecido à temperatura ambiente e o sólido branco foi recolhido por filtração, lavado com HCl (3%; 3x 3,5mL), AcOEt (1x) e dietil éter (3x) e seco para originar o composto (H_2L^2) (0,26g; 0,78mmol), com um rendimento reacional de 78%.

5.2.1.4. Síntese de Etilenodiamina protegida com Boc

A uma solução de etilenodiamina (12,5mL; mol) em dioxano (34mL), foi adicionado – durante cerca de duas horas, com recurso a uma ampola de adição – uma solução de dicarbonato de tert-butil (Boc) (5g; mol) em dioxano (30mL).

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

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

O precipitado resultante foi recolhido por filtração, extraído com diclorometano (DCM) (5 x 60mL) e seco com Na_2SO_4 .

Por fim, o composto foi colocado no evaporador rotativo durante cerca de 30 minutos, com o objetivo de retirar todo o DCM e posteriormente foi colocado na linha de vazio para originar a etilenodiamina protegida com Boc (2,498g; 15,59mmol), na forma de um óleo, com um rendimento reacional de 68%.

5.2.1.5. Síntese de Diacetil-4-ácidobutírico-4'-metilbis(tiossemicarbazonato)-cobre(II) [$Cu^{II}(L^2)$]

A uma solução de H_2L^2 (0,11g; 0,3mmol) em DMF (2mL) – sob agitação e à temperatura ambiente – foi adicionado $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,07g; 0,3mmol).

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

Com a finalidade de obter um precipitado, foi adicionada água (40mL) à solução anterior. Obteve-se um sólido castanho que foi recolhido por filtração; lavado com água, etanol e dietil etér e seco para originar o complexo $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L}^2)$ (0,09g; 0,23mmol), com um rendimento reacional de 76%

5.2.1.6. Síntese de NÃO SEI QUE NOME DÊ A ESTE COMPOSTO! PODE SER : Diacetil-4-ácidobutirico-4'-metilbis(tiossemicarbazonato)-cobre(II)- EtilenodiaminaBoc ?

Ao complexo $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L}^2)$ (0,045g; 0,114mmol) – sob atmosfera de N_2 e em agitação – foi adicionada N-Hidroxisuccinimida (NHS) (1,2eq.; 0,016g; 0,1368mmol) em DMF seco (2mL).

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

A solução permaneceu sob agitação, em atmosfera de N_2 e à temperatura ambiente durante cerca de 4 horas.

Findo este período de tempo, foi adicionada à solução anterior Etilenodiamina-Boc (1,5eq.; 0,027g; 0,171mmol) em DMF seco (5mL). Seguidamente, foi medido o pH (≈ 10) e a solução permaneceu sob agitação durante cerca de 12h.

Após este período de tempo, a solução foi colocada na linha de vazio, obtendo-se um sólido castanho (g; mmol), com um rendimento reacional de %.

5.2.1.7. Síntese de Diacetil-4-ácidobutirico-4'-metilbis(tiossemicarbazona) Etilenodiamina ??? NÃO SEI SE O NOME ESTÁ CORRETO

Ao composto H_2L^2 (0,150g; 0,4512mmol) – sob atmosfera de N_2 e em agitação – foi adicionada N-Hidroxisuccinimida (NHS) (1,2eq.; 0,062g; 0,5414mmol) em DMF seco (5mL).

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

A solução permaneceu sob agitação, em atmosfera de N_2 e à temperatura ambiente durante cerca de 4 horas.

Findo este período de tempo, foi adicionada à solução anterior Etilenodiamina-Boc

(1,5eq.; 0,108g; 0,675mmol) em DMF seco (2mL). Seguidamente, foi medido o pH (7-8) e a solução permaneceu sob agitação durante cerca de 12h.

Após este período de tempo, a solução foi colocada na linha de vazio, obtendo-se um sólido castanho (0,200g; mmol), com um rendimento reacional de %.

5.2.2. Síntese de derivados de Indolo[3,2-c]quinolinas

5.2.2.1. Síntese de Dietil-2-[[4-bromofenil]amino]metileno]malonato (RC1)

A 5.0516g (29 mmol) de 4-bromoanilina, foram adicionados 6.5 mL de Dietil-2-(etoximetileno)malonato (6.91g, 6.5mL, 32mmol, 1.1eq). A mistura reacional foi colocada em refluxo, durante 1h. Findo este período de tempo, a mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e adicionada ao hexano (150mL).

O precipitado formado é filtrado (sob condições de vácuo), lavado com hexano e seco para obter 8.6695g (87%) do composto 5 puro, na forma de sólido branco. ¹H RMN (400MHz, DMSO) δ 10.65(d, J=Hz, 1H), 8.35(d, J=Hz, 1H), 7.56-7.53(m, 2H), 7.37-7.34(m, J=Hz, 2H), 4.23-4.08(m, 4H), 1.23(dd, J=Hz, 6H)

5.2.2.2. Síntese de Etil-6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-carboxilato (RC2)

A solução de 5 (1g, 2.9mmol) foi diluída em difenil éter (10mL). A mistura reacional foi colocada em refluxo, durante 1h. Findo este período de tempo, a mistura reacional foi arrefecida e adicionada ao hexano (35mL). O precipitado formado é filtrado (sob condições de vácuo), lavado com hexano e seco para obter 0.8680g (%) do composto 6, na forma de sólido branco. ¹H RMN (400MHz, DMSO) δ 8.61(s,1H), 8.23(d, J=Hz, 1H), 7.82(d, J=Hz,1H), 7.55(dd, J=Hz, 1H), 4.23(q, 2H), 1.28(t, J=Hz, 3H)

5.2.2.3. Síntese de 6-bromo-4-hidroxiquinolina-3-acido carboxílico (RC3)

A solução de 6 (0.8680g, 2.9mmol) foi diluída em NaOH 10% (12mL). A mistura reacional foi colocada em refluxo, durante 1h. Findo este período de tempo, a mistura reacional foi arrefecida entre 0-5°C, o pH foi ajustado para 1 com recurso a HCl 10M. O precipitado formado é filtrado (sob condições de vácuo), lavado com água e seco para obter 0.4906g (62%) do composto 7, na forma de sólido branco. ¹H RMN (400MHz, DMSO) **FALTA-ME O PICO DOS 14.99->> ESTE FOI O ESPECTRO ANALISADO PELA PROF ANA PAULA** δ 13.60(s, 1H), 8.94(s, 1H), 8.36(d, J=Hz, 1H), 8.05(dd, J=Hz, 1H), 7.79(d, J=Hz, 1H)

5.2.2.4. Síntese de 6-bromoquinolina-4-ol (RC4)

A solução de 7 (0.4815g, 1.8mmol) foi diluída em difenil éter (6mL). A mistura reacional foi colocada em refluxo, durante 1h. Findo este período de tempo, a mistura reacional foi arrefecida e adicionada ao hexano (40mL)O precipitado formado é filtrado (sob condições de vácuo), lavado com hexano e seco para obter 0.3237g (80%) do composto 8, na forma de sólido branco. ¹H RMN (400MHz, DMSO) δ 11.96(s, 1H), 8.16(d, J=Hz, 1H), 7.96(d, J=Hz, 1H), 7.78(dd, J=Hz, 1H), 7.51(d, J=Hz, 1H), 6.08(d, J=Hz, 1H)

5.2.2.5. Síntese de 6-bromo-4-cloroquinolina (RC5)

A solução de 8 (0.3237g, 1.4mmol) foi diluída em POCl₃ (3.5mL). A mistura reacional foi colocada em refluxo, durante 2h; sob agitação a 120°C, com recurso a banho de parafina (tendo por base o ponto de ebulição dos reagentes). Findo este período de tempo, a mistura reacional foi arrefecida, adicionada à água (35mL) e neutralizada com uma solução fria de KOH (sat.). O precipitado formado é filtrado (sob condições de vácuo), lavado com água e seco para obter 0.2175g (64%) do composto 9, na forma de sólido castanho claro. ¹H RMN (400MHz, DMSO) δ 8.88(d, J=Hz, 1H), 8.33(d, J=Hz, 1H), 8.06(d, J=Hz, 1H), 8.01(dd, J=Hz, 1H), 7.83(d, J=Hz, 1H).

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

A solução de 4-bromo-1,2-diaminobenzeno (10, 0.5g, 2.67mmol) e NaNO₂ (nitrito de sódio, 0.46g, mmol, 2.5eq) foi diluída em AcOH (5mL); posteriormente a mistura reacional foi sonicada a 35KHz, durante 20 minutos. Após este período de tempo, a mistura reacional foi adicionada à água (62.5mL) e extraída com EtOAc (3x50mL). Após remoção do solvente a baixa pressão, o produto foi purificado por recristalização a partir de EtOH em ebulição, com água para obter 0.4818g (90%) do composto 11b, na forma de sólido castanho claro. ¹H RMN (400MHz, DMSO) δ 15.92(s boad, NH), 8.18(s, 1H), 7.94(d, J=Hz, 1H), 7.56(dd, J=Hz, 1H).

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

A mistura reacional de 9 (0.2175g, 0.90mmol) com 11b (0.1775g, 0.90mmol) foi homogeneizada e aquecida a 140°C, durante 20 minutos. O produto formado foi purificado via cromatografia em coluna flash, em sílica gel, utilizando o hexano:acetato de etilo (8:2) como eluente, para obter g (%) do composto 12b, na forma de sólido castanho claro. ^1H RMN (400MHz, DMSO) δ