

João Gabriel Costa Baptista

# SÍNTESE DE COMPLEXOS METÁLICOS DE SALENS E SALANS PARA ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



João Gabriel Costa Baptista

# SÍNTESE DE COMPLEXOS METÁLICOS DE SALENS E SALANS PARA ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química,  
Área de especialização em Química Avançada e Industrial

Orientação:

Doutora Maria Elisa da Silva Serra

Setembro de 2015

Universidade de Coimbra



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied in the condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgment.



*“Recomeça  
Se poderes,  
Sem angústia e sem pressa.  
E os passos que deres,  
Nesse caminho duro  
Do futuro.  
Dá-os em liberdade  
Enquanto não alcances  
Não descanses.  
De nenhum fruto queiras só metade.”*

**Miguel Torga**





# Agradecimentos

O trabalho apresentado nesta dissertação dividiu-se em duas partes. A primeira parte foi realizada no grupo de Química Orgânica do Centro de Química de Coimbra, no Departamento de Química na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra enquanto a segunda parte foi realizada na UB (Unidade de Biofísica) do IBILI (*Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences*) sedado na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

À Professora Doutora Maria Elisa Serra quero agradecer por me ter aceitado e recebido para a realização deste trabalho, pela integração no ambiente de trabalho, pela orientação, pelo ensino, pela atenção e conselhos dados, que foram fundamentais no aperfeiçoamento dos meus métodos de trabalho de laboratório e no trabalho em si. Agradeço toda a ajuda disponibilizada na escrita do desta dissertação. Agradeço também toda a simpatia disponibilizada que foi um fator que contribuiu para a minha enorme vontade em realizar este trabalho no sentido de obter os melhores resultados.

À Professora Doutora Dina Murtinho agradeço pela orientação, pelas dúvidas que me esclareceu, pelos conselhos, pela transmissão da sua simplicidade, que me ajudou imenso na melhoria dos meus métodos de trabalho de laboratório, e pelo interesse aliado à sua simpatia, em seguir as etapas do meu trabalho e oferecer auxílio sempre que necessitei.

À Mestre Ana Salomé Pires quero agradecer pela orientação e integração na UB, pelo apoio na execução do meu trabalho nos testes *in vitro*, pelo rigor expresso e transmitido, pela paciência demonstrada, pelos conselhos, críticas e ensinamentos que melhoraram a minha capacidade de trabalhar em grupo, numa área diferente de química. Agradeço, também, por toda a intensa ajuda que me prestou na escrita deste documento e no esclarecimento de dúvidas.

Ao Mestre João Encarnação quero agradecer pela ajuda na minha integração na UB, pela paciência, pela motivação e preocupação constantes na obtenção dos melhores resultados possíveis e pelo apoio incontestável que demonstrou na segunda parte do meu trabalho.

Agradeço à Doutora Clara Rocha pela realização da análise estatística.

Quero agradecer a todos os elementos do grupo do laboratório de investigação em Química Orgânica que deram o seu contributo na minha integração, principalmente pelo seu enorme apoio e contributo para a minha formação. Um especial obrigado ao Mestre Emanuel Sousa, não só como colega no grupo, mas também como amigo, à Mestre Ana Rita Ferreira e à Sr.<sup>a</sup> Lurdes Cortesão.

Agradeço também a todos os meus colegas da UB que me ajudaram na minha integração no grupo, por contribuírem para a minha capacidade de trabalhar em grupo, pela transmissão de conhecimentos na área de ciências biomédicas e pelo apoio e interesse em seguir o meu trabalho.

Por fim, agradeço à minha família e a todos os meus amigos fora do ambiente de trabalho que, como sempre, se preocupam em prestar o seu apoio para a concretização dos meus objetivos.



# Índice

	Página
Índice	i
Abreviaturas	iii
Resumo	vii
Abstract	ix
<b>Capítulo 1: Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Cancro: Causas e Epidemiologia	1
1.2. Cancro Colorretal	2
1.3. Cancro da Mama	4
1.4. Quimioterapia	6
1.4.1. Tipos de Morte Celular	6
1.4.2. Quimioterapia do Cancro Colorretal	7
1.4.3. Quimioterapia do Cancro da Mama	7
1.4.4. Caraterísticas dos Fármacos usados em Quimioterapia	8
1.4.4.1. 5-FU	8
1.4.4.2. Irinotecano	9
1.4.4.3. Antraciclinas	10
1.4.4.4. Taxanos	12
1.4.4.5. Complexos Metálicos de Platina	13
1.5. Complexos Metálicos	14
1.5.1. Novos complexos de Platina	15
1.5.2. Complexos com Outros Centros Metálicos	16
1.5.3. Complexos de Cobre	19
1.6. Complexos Metálicos de Salens e Salans	23
1.6.1. Ligandos Salens e Salans	23
1.6.2. Complexos Metálicos Salens e Salans	24
1.7. Átomos de Halogéneo em Química Medicinal	27
<b>Capítulo 2: Síntese de Complexos de Cu(II) Derivados do Ácido (+)-Canfórico</b>	<b>31</b>
2.1. Síntese da Diamina derivada do Ácido (+)-Canfórico	32
2.2. Síntese de Derivados Clorados do Salicilaldeído	33
2.2.1. Síntese de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído	33
2.2.2. Tentativa de síntese de 5-cloro-2-hidroxibenzaldeído	35
2.3. Síntese de Salens Derivados do Ácido (+)-Canfórico	36
2.4. Síntese de Salans Derivados do Ácido (+)-Canfórico	37
2.5. Síntese de Complexos de Cu(II) Derivados do Ácido (+)-Canfórico	38

<b>Capítulo 3: Síntese de Complexos de Cu(II) Derivados do Ácido <i>L</i>-Tartárico</b>	<b>41</b>
3.1. Síntese da Diamina derivada do Ácido <i>L</i> -Tartárico	42
3.2. Síntese de Salens Derivados do Ácido <i>L</i> -Tartárico	44
3.3. Síntese de Complexos de Cu(II) Derivados do Ácido <i>L</i> -Tartárico	45
<b>Capítulo 4: Estudos <i>in vitro</i></b>	<b>47</b>
4.1. Determinação da Proliferação Celular	47
4.2. Avaliação da viabilidade celular	51
4.3. Avaliação do ciclo celular	54
4.4. Discussão dos Resultados Obtidos nos Estudos <i>in vitro</i>	56
<b>Capítulo 5: Conclusões</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 6: Experimental</b>	<b>65</b>
6.1. Técnicas de Identificação e Caracterização	65
6.2. Purificação e Secagem de Solventes	66
6.3. Procedimentos Experimentais	67
6.3.1. Síntese da Diamina Derivada do Ácido (+)-Canfórico	67
6.3.2. Síntese da Diamina Derivada do Ácido <i>L</i> -Tartárico	68
6.3.3. Síntese de Derivado de Salicilaldeído	71
6.3.4. Síntese de Salens	72
6.3.5. Síntese de Salans	76
6.3.6. Síntese de Complexos de Cu(II)	79
6.4. Estudos <i>in vitro</i>	83
6.4.1. Culturas Celulares	83
6.4.2. Estudos de citotoxicidade	84
6.4.2.1. Determinação da Proliferação Celular	85
6.4.2.2. Avaliação da Viabilidade Celular	86
6.4.2.3. Avaliação do Ciclo Celular	88
6.4.3. Análise Estatística	89
<b>Bibliografia</b>	<b>91</b>

# Abreviaturas

15-PGDH - *15-prostaglandin dehydrogenase*

5-FU - 5-Fluorouracilo

AnV – Anexina V

APAF-1 - *Apoptotic protease activating factor 1*

APC - *Adenomatous polyposis coli*

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATM – *Ataxia telangiectasia mutated*

BRIP1 – *BRCA1-interacting protein 1*

CHEK2 – *Chekpoin kinase 2*

DNA – *Desoxyribonucleic acid*

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPD - Di-hidropirimidina desidrogenase

DHFU - Di-hidrofluorouracilo

EGF – *Endothelial growth factor*

EGFR – *Endothelial growth factor receptor*

ER – *Estrogen receptor*

FADD/MORT1 – *Fas-associated protein with death domain*, também designado por MORT1

FAP - *Familial adenomatous polyposis*

FdUMP - Fluorodesoxiuridina monofosfato

FdUTP - Fluorodesoxiruidina trifosfato

FTTC - fluorocromo isotiocianato de fluoresceína

FSC – *Forward Scatter*

FUTP - Fluorouridina trifosfato

GATA3 – *GATA Binding protein 3*

HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

IC<sub>50</sub> – *Half maximal inhibitory concentration*

IP – Iodeto de Propídeo  
IV – Espectroscopia de infra-vermelho  
K-Ras - *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
LV - Leucoverina  
MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*  
MLH1 – *MutL homolog 1*  
MSH2 – *MutS homolog 2*  
MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*  
NADH – *Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form*  
NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form*  
PALB2 – *Partner and localizer of BRCA2*  
PBS - *Phosphate Buffer Saline*,  
PI3K – *Phosphoinositide 3-kinase*  
PI3KCA – *Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit alpha*  
P.f. – Ponto de fusão  
PR- *Progesterone receptor*  
PTEN – *Phosphatase and tensin homolog*  
RMN<sup>1</sup>H – Espectroscopia de ressonância nuclear protónica  
RMN<sup>13</sup>H – Espectroscopia de ressonância nuclear de carbono 13  
RNA – *Ribonucleic acid*  
SCC – *Side Scatter*  
STK11- *Serine/threonine kinase 11*  
TFA – *Trifluoroacetic acid*  
TNF- $\alpha$  - *Tumor necrosis factor alpha*  
TNM – *Tumour node metastasis*  
TGF-  $\beta$  – *Transforming growth factor  $\beta$*   
TGFBR2 – *Transforming growth factor  $\beta$  receptor 2*  
THF - *Tetrahydrofurano*  
Ts – *Tosilo*  
TLC – *Cromatografia camada fina*  
TMS – *Tetrametilsilano*  
TP53 - *Cellular tumor antigen p53*

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR - *Vascular endothelial growth factor receptor*

**Utilizaram-se as seguintes abreviaturas na espectroscopia de magnética ressonância nuclear protónica:**

d – Duplete

m – Multiplete

s – Singuleto

dd – Duplo duplete





# Resumo

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo. O cancro colorretal e o cancro da mama são dois dos tipos de cancro mais incidentes e mortais. Cisplatina, oxaliplatina e carboplatina são os únicos complexos metálicos presentemente usados no tratamento do cancro. Estes, bem como outras opções em quimioterapia do cancro colorretal e da mama, como as fluoropirimidinas, o irinotecano, os taxanos e as antraciclinas, caracterizam-se por diversos efeitos adversos bem como o fácil desenvolvimento da resistência aos fármacos por parte das células tumorais. Nos últimos anos, os complexos de cobre têm demonstrado ser uma boa alternativa às atuais opções quimioterapêuticas. Os complexos metálicos de ligandos do tipo bases de Schiff têm apresentado resultados interessantes e complexos de ligandos do tipo salen estão a emergir como potenciais agentes antitumorais. O efeito citotóxico pode ser mais expressivo na presença de átomos de halogéneo, que atribuem características às moléculas ativas, que favorecem a sua farmacocinética e farmacodinâmica.

Em trabalhos anteriores no grupo de Química Orgânica do Centro de Química de Coimbra, os complexos de Cu(II) demonstraram uma maior atividade antitumoral em relação aos complexos correspondentes de Mn(III) e Fe(III). A diferença reside na geometria planar que o cobre confere ao complexo, que pode facilitar a sua interação com os alvos biológicos. Prosseguindo os estudos, demonstrou-se que um complexo de Cu(II) dibromado análogo aos anteriormente estudados era 3 a 5 vezes mais efetivo que o complexo de Cu(II) não-halogenado correspondente, confirmando que os átomos de halogéneo oferecem características favoráveis à atividade citotóxica de uma determinada molécula ativa.

O plano de trabalho que deu origem a esta dissertação visou a síntese de novos complexos salen e salen halogenados de Cu(II) derivados do ácido (+)-canfórico e do ácido *L*-tartárico com o objetivo de serem sujeitos a testes *in vitro* a fim de avaliar a sua citotoxicidade em linhas celulares do cancro do cólon (WiDr e LS1034) e da mama (MCF-7 e HCC1806). Posto isto, o trabalho focalizou a continuidade dos trabalhos anteriores, levando-nos a debruçar sobre os derivados halogenados, a fim de avaliar o efeito do tipo e da quantidade de átomos de halogéneo na atividade antitumoral dos complexos metálicos. Para além disso, preocupámo-nos em preparar salans (forma reduzida dos salens), de modo a perceber a influência de pequenas alterações do esqueleto do ligando na atividade antitumoral.

A primeira parte do trabalho consistiu na síntese de complexos de Cu(II) derivados do ácido (+)-canfórico. Para isso, foi sintetizada a diamina derivada do ácido (+)-canfórico, através da reação de Schmidt. De seguida, prepararam-se os salens por condensação da diamina com derivados do salicilaldeído, numa reação sob ultrassons, condição que leva a um menor tempo de reação e rendimentos mais elevados. Obtidos os salens, procedeu-se à sua redução a salans. Por fim, os ligandos foram complexados com Cu, dando origem aos complexos de Cu(II) correspondentes.

A segunda parte deste trabalho teve como objetivo a síntese de complexos salen de Cu(II) derivados do ácido *L*-tartárico. Sintetizou-se a diamina derivada deste composto através de uma sequência sintética de cinco passos. Com as mesmas condições utilizadas para os derivados do ácido (+)-canfórico, foram preparados os salens derivados do ácido *L*-tartárico. Finalmente, foram sintetizados os diversos complexos de Cu(II) correspondentes.

A última parte do trabalho consistiu na avaliação da citotoxicidade dos complexos de Cu(II) sintetizados em duas linhas celulares de cancro colorretal (WiDr e LS1034) e em duas linhas celulares de cancro da mama (MCF-7 e HCC1806) através da realização de testes *in vitro*. Foram testados três complexos halogenados do tipo salen de Cu(II) derivados do ácido (+)-canfórico. Os testes *in vitro* consistiram no estudo da citotoxicidade dos complexos metálicos para os quais se definiram dois planos de trabalho, sendo o primeiro a avaliação da atividade metabólica, a partir da qual foi possível determinar os valores de IC<sub>50</sub>. Posteriormente, procedeu-se à avaliação da viabilidade celular e do ciclo celular, com recurso à técnica de citometria de fluxo. Os complexos de Cu(II) exibiram elevada atividade antiproliferativa nas linhas em estudo, apresentando uma gama de IC<sub>50</sub> entre 0.63 e 1.64 µM após 48 horas de exposição. A presença dos átomos de halogéneo nas estruturas dos complexos de Cu(II) mostrou-se fundamental na inibição da proliferação celular, sendo os complexos 3 a 6 vezes mais eficientes que os não halogenados. O complexo tetraclorado de Cu(II) derivado do ácido (+)-canfórico foi o que apresentou resultados mais promissores na inibição da proliferação celular e foi sujeito a estudos de viabilidade celular que demonstraram que o composto atua, ativando apoptose nas células de cancro de mama para concentrações correspondentes ao IC<sub>50</sub>. Os resultados com a linha celular quimiorresistente LS1034 demonstraram que a viabilidade celular é significativamente reduzida com indução de apoptose, quando estas são expostas ao referido complexo. Os resultados do ciclo celular confirmaram que o composto induz apoptose, contudo não tem a capacidade de bloquear o ciclo celular. Tendo em conta as características da linha LS1034 e a resposta apresentada na presença do complexo tetra-halogenado de Cu(II), este poderá ser um composto promissor como alternativa aos fármacos convencionais usados presentemente no tratamento de tumores quimiorresistentes.

# Abstract

Cancer is one of the leading worldwide causes of death. Colorrectal and breast cancer are two of the most incident and mortal types of cancer. Cisplatin, oxaliplatin and carboplatin are the only metal complexes currently used in the treatment of cancer. These as well as other chemotherapeutic compounds, namely fluoropyrimidines, irinotecan, taxanes and anthracyclines, present several adverse effects, as well as growing resistance to the pharmaceuticals used. In the last years, Cu complexes have emerged as good alternatives to Pt complexes and complexes with Schiff base ligands have shown interesting results. Salen-type complexes are emerging as potential antitumour compounds. The cytotoxic effect can be improved by the presence of halogen atoms which give certain properties to active molecules, leading to better pharmacodynamic and pharmacokinetic properties.

Studies carried out in the Organic Chemistry group of Centro de Química de Coimbra, have shown that Cu(II) complexes have higher antitumour activity than the corresponding Mn(III) and Fe(III) complexes. The difference is due to the square planar geometry of Cu(II) complexes which can favour the interaction of the molecule with biological targets. Furthermore, a dibrominated Cu(II) complex analogous to those previously studied has shown a higher anti-proliferative effect, by 3-5 fold, when compared with the non-halogenated Cu(II) complex.

The work plan that gave rise to this dissertation aimed at the synthesis of new halogenated salen and salan Cu (II) complexes, of derivatives of (+)-camphoric and L-tartaric acid, to be subjected to *in vitro* testing to assess their cytotoxicity on colon (WiDr and LS1034) and breast (MCF-7 and HCC1806) cancer cell lines. In the continuation of previous studies, our work focused on the halogenated derivatives, in order to evaluate the effect of the type and amount of halogen atoms on the antitumor activity of the metal complexes. In addition, we prepared salan ligands (reduced form of salens), so as to evaluate the effect of small changes in ligand skeleton on the antitumor activity.

Firstly, the workplan consisted in synthesizing Cu(II) complexes derived from (+)-camphoric acid. For this, we prepared the diamine derived from (+)-camphoric acid by Schmidt reaction and subsequently salen ligands through condensation with salicylaldehyde derivatives under ultrasound irradiation, to reduce time and improve yields. Salen-type ligands were then reduced to salans and, finally, salens and salans were complexed with Cu(II).

The second part of the workplan involved the synthesis of salen-type Cu(II) complexes derived from *L*-tartaric acid. Thus, the diamine was prepared by a sequence of several reactions. Using the same conditions as for the (+)-camphoric acid derived ligands, salens were prepared and complexed with Cu(II) to give the corresponding Cu(II) complexes.

*In vitro* tests consisted in studying the cytotoxicity of the metal complexes using two working plans. The first was the assessment of metabolic activity, from which it was possible to determine IC<sub>50</sub> values. Subsequently, the evaluation of cell viability and cell cycle was carried out using flow cytometry. The Cu (II) complexes exhibited high cytotoxic activity on the cancer cell lines under study, presenting IC<sub>50</sub> values between 0.63 and 1.64  $\mu$ M. The presence of halogen atoms in the structures of the complexes proved essential in the inhibition of cell proliferation, the complex being 3 to 6 times more efficient than the corresponding non-halogenated ones. The tetra-chlorinated (+) – camphoric acid derived Cu (II) complex showed the most promising results in the inhibition of cell proliferation and, when subjected to cell viability studies, showed that the compound acts by activating apoptosis in breast cancer cells for concentrations corresponding to the IC<sub>50</sub>. The results demonstrate that cell viability of the chemoresistant LS1034 cell line is significantly reduced upon exposure to the Cu(II) complex, due to the evident induction of apoptosis. The results of the cell cycle studies confirmed that the compound induces apoptosis, but indicated that the compound does not have the ability to block the cell cycle. Given the characteristics of the LS1034 line and the response shown in the presence of the tetra-halogenated Cu (II) complex, this may be a promising compound as an alternative to conventional drugs presently used in the treatment of chemoresistant tumors.

# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1. Cancro: Causas e Epidemiologia

O cancro, é uma doença provocada por células que proliferam sem controlo e se multiplicam de maneira autónoma, invadindo localmente e à distância outros tecidos.<sup>1-3</sup>

O cancro é, atualmente, uma das maiores problemáticas da sociedade, pois é uma das principais causas de morte, globalmente. É exetável que a ocorrência de cancro aumente devido ao envelhecimento da população e à prevalência de certos comportamentos e hábitos de risco tais como má alimentação, tabagismo, obesidade, sedentarismo e mudanças nos padrões da reprodução devido à redução na formação de novos casais e nascimentos numa idade mais tardia.<sup>4</sup>

Nos últimos anos, o cancro de pulmão, da mama, colorretal e da próstata são os tipos de cancro mais incidentes, em todo o mundo. O cancro de pulmão é o mais mortal em homens, a nível mundial. O cancro da mama é o mais mortal em países subdesenvolvidos e o segundo em países desenvolvidos, no sexo feminino. O cancro colorretal apresenta-se, também, como um dos tipos de cancro mais mortíferos, a nível global, em ambos os sexos.<sup>4,5</sup>

Em Portugal, prevê-se que a incidência de cancro, atualmente em cerca de 45000 doentes, evolua para um número superior a 50000 doentes, em 2030, devido ao envelhecimento da população, bem como devido às alterações no estilo de vida e adoção dos hábitos de risco acima referenciados. Em homens portugueses, o cancro da próstata é o mais incidente, sendo o cancro colorretal o segundo, seguido do cancro do pulmão. Em mulheres portuguesas, o cancro de mama é o tipo de cancro mais incidente, seguido do cancro colorretal. Dados referentes a 2012, revelam que o cancro do pulmão é o tipo de cancro mais mortal em indivíduos do sexo masculino, ao contrário

do sexo feminino que é o cancro da mama. O cancro da próstata é o segundo mais mortal no sexo masculino, seguido do cancro colorretal. Já no sexo feminino, o cancro colorretal é o segundo tipo de cancro mais mortal, seguido do cancro de pulmão.<sup>6</sup>

## 1.2. Cancro Colorretal

Como referido, o cancro colorretal faz parte dos mais incidentes e dos mais mortais não só em Portugal, mas em todo o mundo. Este tipo de cancro, que engloba o cancro do reto e o cancro do cólon, tem origem nas células do revestimento da mucosa intestinal, podendo invadir e comprometer outros órgãos, por metastização. As causas são maioritariamente esporádicas (até 95% dos casos), nas quais se incluem comportamentos de risco, já referenciados anteriormente.<sup>7</sup> Cerca de 2% dos casos têm causas em inflamações intestinais e os restantes casos de cancro colorretal têm origem em causas hereditárias. Os sinais e sintomas dependem da localização do tumor no intestino e em pessoas com mais de 50 anos incluem a presença de sangue nas fezes, diminuição do seu calibre, perda de peso, perda de apetite, nasofaringite e náusea e vômitos.<sup>8</sup>

O cancro colorretal tem origem em pólipos adenomatosos benignos que se desenvolvem, originando adenomas com crescimento celular descontrolado que, posteriormente evoluem a cancro invasivo. Segundo a classificação de tumores malignos (*Tumour node metastasis*, TNM), existem diferentes estádios no cancro colorretal. O estádios I e II deste tipo de cancro são curáveis por excisão cirúrgica, pois ainda se encontram localizados na parede do cólon, contudo, se não forem tratados metastizam para os nódulos linfáticos (estadio III) e, numa fase mais avançada, para locais mais distantes (estadio IV). O estadio III é curável em 73% dos casos por cirurgia combinada com quimioterapia, todavia os casos no estadio IV são geralmente incuráveis.<sup>9</sup>

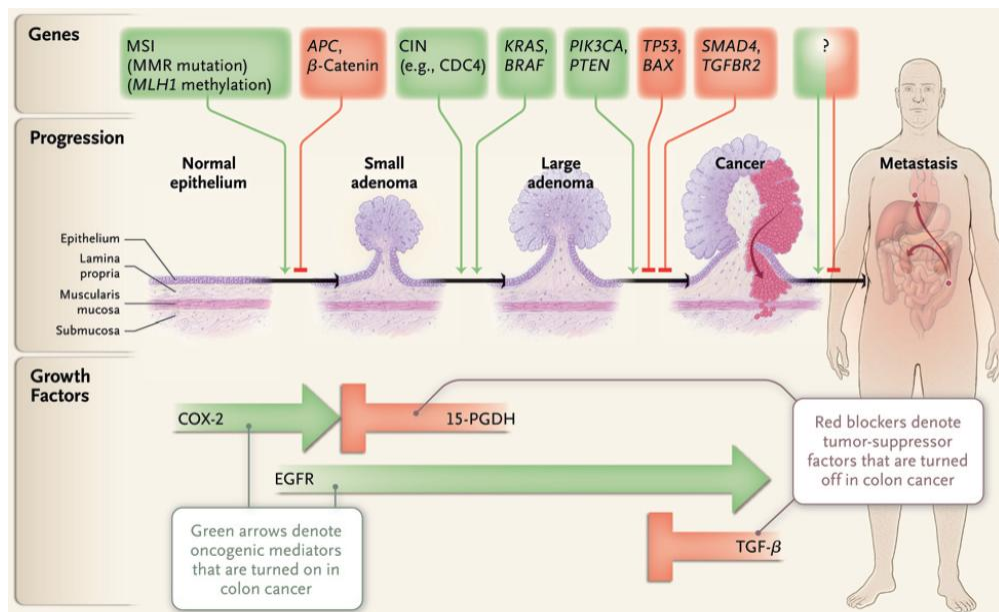
O cancro colorretal tem origem em múltiplas mutações que originam a inativação de genes supressores tumorais, ativação de oncogenes, sobreexpressão de fatores de crescimento que favorecem a proliferação celular, bem como defeitos na reparação do DNA.<sup>9</sup>

O cancro colorretal resulta, mais frequentemente, do aumento da atividade da via de sinalização Wnt, consequência de mutações no gene que codifica a proteína *Adenomatous polyposis coli* (APC). A APC desempenha um papel fundamental no controlo dos níveis da oncoproteína  $\beta$ -catenina, que quando é sobreexpressa, induz a ativação da via de sinalização Wnt, e consequentemente, crescimento e proliferação celulares descontrolados. A inativação da via da proteína P53 é a segunda causa mais importante na formação deste tipo de cancro. A proteína P53 é uma proteína com um peso de 53 kDa, presente em organismos multicelulares que é crucial na regulação do ciclo celular, podendo funcionar como um supressor tumoral. Mutações no gene *TP53* estão na origem de mais 50% de tipos tumorais, sendo que a ocorrência destas coincidem com a

transição de adenomas para cânceros invasivos. Até agora, foram referidas mutações em genes supressores tumorais, porém, o câncer colorretal pode ocorrer com base na ativação de vias oncogênicas através da ocorrência de mutações em *KRAS* e *BRAF* e *PI3KCA*, que levam ao crescimento e proliferação celulares descontrolados. Mutações no gene *PTEN* também constituem um passo na oncogênese, pois o gene codifica a proteína supressora tumoral PTEN.<sup>9</sup>

A ativação de fatores de crescimento é comum no câncer colorretal. O aumento da atividade da enzima COX-2 é encontrada em dois terços deste tipo de câncer e a sua função é levar ao aumento da síntese da prostaglandina E<sub>2</sub>, um agente fortemente associado ao câncer colorretal. A proteína EGF e o seu receptor EGFR são encontrados em subgrupos deste tipo de câncer. VEGF, um fator de crescimento importante na angiogênese, também tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento do carcinoma.<sup>9</sup>

A inativação de genes requeridos para a reparação de erros no emparelhamento de DNA também constitui uma das causas da formação de células tumorais. Este tipo de patologias resultam de causas hereditárias e exemplo dessas doenças é a síndrome de Lynch. Esta é independente da formação de pólipos e caracteriza-se pela existência de defeitos nos genes *MLH1* e *MSH2* com um risco de câncer colorretal associado em cerca de 80%, tendo transmissão autossômica dominante. Além disso, os fatores supressores tumorais como os codificantes de TGF- $\beta$ , TGFBR2, e BAX podem estar inativados, derivado de defeitos na reparação do DNA. O câncer pode ter, também, causa hereditária em que há desenvolvimento de inúmeros pólipos – polipose adenomatosa familiar (FAP). Um mecanismo da inativação de genes é a metilação aberrante de DNA, em que ocorre metilação de bases de citosina, o que bloqueia a expressão do gene *MLH1*, pois este está metilado. Na Figura 1.1 encontram-se esquematizados os mecanismos que levam ao desenvolvimento de carcinogênese ao nível do intestino.<sup>9,10</sup>



**Figura 1.1. Vias de sinalização implicadas na formação e progressão do cancro colorretal.** Os genes codificantes de APC, P53 são supressores tumorais. Vias oncogénicas ocorrem por mutações em *KRAS* e *BRAF* que levam ao desencadeamento da cascata de sinalização da proteína MAPK e mutações no gene *PIK3CA* que induz um aumento da expressão da proteína PI3K, levando ao crescimento, proliferação e diferenciação celulares descontrolados. Mutações no gene supressor tumoral codificante de TGF- $\beta$  inativam nomeadamente o recetor TGFBRF2 ou os componentes da via SMAD4, SMAD3 e SMAD2. COX-2 promove um aumento da prostaglandina E2 que é degradada pela 15-PGDH. EGFR também ajuda no desenvolvimento tumoral. A metilação de *MLH1* presente na Síndrome de Lynch leva ao desenvolvimento de cancro colorretal.<sup>9</sup>

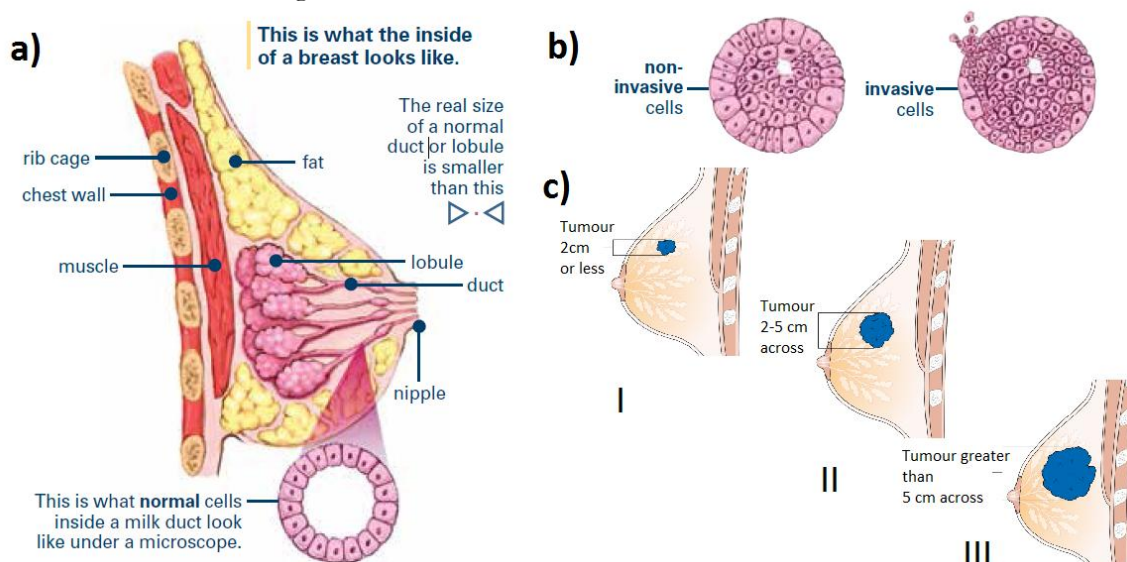
### 1.3. Cancro da Mama

O cancro da mama é das doenças mais incidentes e apresenta-se, de um modo geral, como o tipo de cancro mais mortal, em mulheres. O cancro da mama é um tipo de cancro que se desenvolve no tecido mamário, em mulheres.<sup>11</sup> À semelhança da generalidade dos tipos de cancro, o risco de contrair cancro da mama aumenta com a idade. As causas esporádicas estão na origem da maioria dos casos de cancro da mama e essas incluem: níveis altos de certas hormonas, a primeira menstruação numa idade precoce, ter o primeiro filho numa idade avançada ou não ter filhos e os comportamentos de risco anteriormente referenciados. Cerca de 10% dos casos de cancro da mama têm causas hereditárias.<sup>12</sup> Os sinais de cancro da mama incluem protuberância e mudança de forma na mama, ondulações na pele, fluído proveniente do mamilo e manchas avermelhadas na pele e, num estadio mais avançado da doença, dores ósseas, aumento dos nódulos linfáticos e pele amarelada.<sup>13</sup>

Geralmente, o cancro de mama desenvolve-se em lóbulos que são glândulas produtoras de leite ou nos seus ductos, isto é, os canais que ligam os lóbulos ao mamilo (Figura 1.2 a)). Baseado na dimensão do cancro e no grau de invasão das células tumorais (Figura 1.2 b)) é possível definir



vários estádios para este tipo de cancro, segundo o sistema de classificação TNM: o estadio 0 refere-se à presença de células tumorais não invasivas; o estadio I caracteriza-se pela invasão das células tumorais no tecido mamário; nos estádios II e III verifica-se a invasão para os nódulos linfáticos, dependendo da dimensão tumoral e tipo de nódulo linfático invadido; e no estadio IV, as células tumorais alcançam outros órgãos.<sup>11</sup>



**Figura 1.2. Representação anatómica da mama:** a) morfologia da mama e de ductos mamários saudáveis; b) presença de células não invasivas nos ductos mamários (estadio 0 do cancro da mama) e de células invasivas no ducto mamário; e c) evolução da dimensão tumoral nos estádios I-III do cancro da mama.<sup>adaptado de 11</sup>

Mais de 85% dos casos de cancro da mama derivam de causas esporádicas. Nestes casos são encontradas mutações em mais de 30 genes diferentes, dos quais se incluem *PI3KCA*, *TP53* e *GATA3*, que são três genes cujas mutações somáticas incidem em mais de 10% dos casos de cancro de mama.<sup>14</sup> O cancro da mama apresenta características particulares e as suas células podem expressar recetores de estrogénio (cancro é designado de ER-positivo) e de progesterona (cancro é designado de PR-positivo) que ajudam na mediação do crescimento, diferenciação e sobrevivência dessas células.<sup>11</sup> A amplificação do proto-oncogene *HER-2* e a consequente sobreexpressão da proteína *HER-2* ocorrem em 15% a 25% dos casos de cancro de mama.<sup>11,15,16</sup> Estes recetores encontram-se sobre-expressos em células mamárias tumorais e promovem o crescimento e divisão celular de forma descontrolada.<sup>11,15</sup>

Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* ocorrem em até 90% dos casos hereditários, sendo que os restantes devem-se a mutações genéticas *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1* e *PALB2*.<sup>12,17</sup> As mutações genéticas *BRCA1* e *BRCA2* também estão nas causas hereditárias do cancro do ovário. A perda de função destes genes traduzem-se em instabilidade cromossómica derivada de reparações deficientes do DNA quando este é danificado ou mal replicado, ou seja, há perda de controlo do ciclo celular, sobretudo durante as fases S e G2, pois as proteínas codificadas

por esses genes (*BRCA1* e *BRCA2*) participam na sinalização de DNA danificado e na sua reparação, bem como no processo de transcrição e metabolismo de RNA. Estas alterações promovem o desenvolvimento neoplásico.<sup>17</sup>

## 1.4. Quimioterapia

Os tipos de cancro discutidos podem ser tratados com recurso a quimioterapia e, de um modo geral, esta pode ser adjuvante, neoadjuvante ou aplicada em casos de cancro numa fase avançada. A quimioterapia adjuvante refere-se ao tratamento quimioterapêutico de doentes depois de serem submetidos a cirurgia e que não apresentam evidência de cancro, no sentido de eliminar qualquer célula tumoral que não tenha sido removida e que não seja detetável. Quimioterapia neoadjuvante é semelhante à adjuvante, contudo, esta é realizada antes da intervenção cirúrgica, pois promove a diminuição do tamanho da área afetada pelo cancro possibilitando uma cirurgia menos extensa, bem como permite a observação da resposta do cancro ao tratamento quimioterapêutico. Doentes com cancro numa fase avançada ou metastática também podem ser sujeitos a quimioterapia.<sup>18</sup>

### 1.4.1. Tipos de Morte Celular

Antes de referir quais as opções quimioterapêuticas no tratamento do cancro colorretal e do cancro da mama e de caracterizar em detalhe os compostos químicos utilizados em quimioterapia, de forma a entender os seus mecanismos de ação, são apresentados os tipos de morte celular. Existem diferentes tipos de morte celular que são classificados de acordo com as suas características biológicas e bioquímicas. Apoptose e necrose são os tipos de morte mais relevantes.<sup>19</sup>

A necrose é um tipo de morte celular provocada por um estímulo ou agente nocivo que causa nas células uma lesão tão grave que não se pode reparar ou curar. Durante a necrose, é libertado o conteúdo celular da célula, danificando as células vizinhas, o que leva a uma reação inflamatória local.<sup>19,20</sup>

A apoptose, ao contrário da necrose, é um tipo de morte celular programado extremamente regulado que envolve a interação de muitos fatores. Durante o processo, há a diminuição do volume celular e, após outros acontecimentos, há formação de corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos e removidos sem iniciar um processo inflamatório. A apoptose pode ocorrer por uma via extrínseca ou por uma via intrínseca, sendo que a via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligandos específicos a recetores que ativam a cascata das caspases, na qual a caspase-3, leva à morte celular por apoptose, enquanto a via intrínseca, ocorre pela ação da mitocôndria, que através do citocromo c ativa a caspase 3, levando à apoptose. A apoptose pode ser um mecanismo de defesa

antineoplásica, em que agentes quimioterapêuticos agem através da indução deste tipo de morte celular.<sup>19</sup>

A seguir, são apresentadas as opções em quimioterapia do cancro colorretal e do cancro da mama em que são detalhadas as características de alguns fármacos.

### **1.4.2. Quimioterapia do Cancro Colorretal**

O tratamento por quimioterapia do cancro colorretal no estadio III pode ser adjuvante ou neoadjuvante. Casos de cancro colorretal no estadio II também podem ser tratados recorrendo a quimioterapia, no entanto, esta só é aplicada a um subconjunto de indivíduos cujo risco de reincidência da doença é elevado.<sup>21</sup> Os agentes quimioterapêuticos mais utilizados para tratamento do cancro colorretal são fluoropirimidinas (ex<sup>o</sup>. 5-fluorouracilo, 5-FU), irinotecano e oxaliplatina. A administração intravenosa ou oral de 5-FU combinada com leucovorina ou outros fármacos compreendem a base da quimioterapia neste tipo de cancro para estadios iniciais. As diferentes combinações podem ser entre 5-FU, leucovorina e oxaliplatina (FOLFOX), 5-FU, leucovorina e irinotecano (FOLFIRI), capecitabina (pró-fármaco de 5-FU) e oxaliplatina (CapeOx ou XELOX) e 5-FU, leucovorina, oxaliplatina e irinotecano (FOLFOXIRI).<sup>22</sup> O FOLFOX apresenta-se como a escolha mais comum para uma primeira linha de tratamento que, no caso de insucesso, é sucedida por FOLFIRI, como segunda linha de tratamento.<sup>23</sup> Na terapia de cancro colorretal numa fase avançada ou metastática, é adicionado ao plano de quimioterapia inibidores de angiogénese (anti-VEGF), sendo o mais comum o bevacizumab, bem como inibidores de recetores de fatores de crescimento epidermal (anti-EGFR), sendo o cetuximab o mais utilizado.<sup>22</sup>

### **1.4.3. Quimioterapia do Cancro da Mama**

À semelhança do cancro colorretal, a quimioterapia adjuvante e neoadjuvante no tratamento de cancro de mama é feita com recurso a combinações de fármacos, sendo que as respostas ao tratamento e sobrevivência dos doentes não permite considerar a existência de uma combinação ótima. O tratamento é feito recorrendo a antraciclina (e.g. epirrubina e doxorubicina), taxanos (e.g. paclitaxel/taxol e docetaxel) combinados entre si e/ou com uma fluoropirimidina (5-FU), ciclofosfamida e/ou carboplatina. A quimioterapia para cancro de mama em estadios mais avançados dispõe de um espectro mais alargado de fármacos, nos quais se incluem antraciclina, taxanos, complexos de platina, fluoropirimidinas, análogos nucleosídicos, fármacos anti-mitóticos, entre outros.<sup>24</sup>

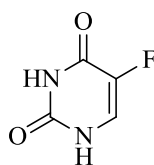
Para cancro de mama HER2 positivo, usualmente são administrados anticorpos monoclonais (trastuzumab ou pertuzumab) em combinação com um taxano. Trastuzumab é administrado numa

fase inicial do cancro de mama, mas também em estadios mais avançados, em que pode ser combinado com pertuzumab. Estes anticorpos monoclonais são direcionados a alvos específicos e possuem efeitos adversos menos severos.<sup>24</sup>

#### 1.4.4. Caraterísticas dos Fármacos usados em Quimioterapia

##### 1.4.4.1. 5-FU

O 5-fluorouracilo (5-FU) (**1.1**) é um análogo do uracilo com um átomo de flúor na posição C-5.<sup>25</sup>

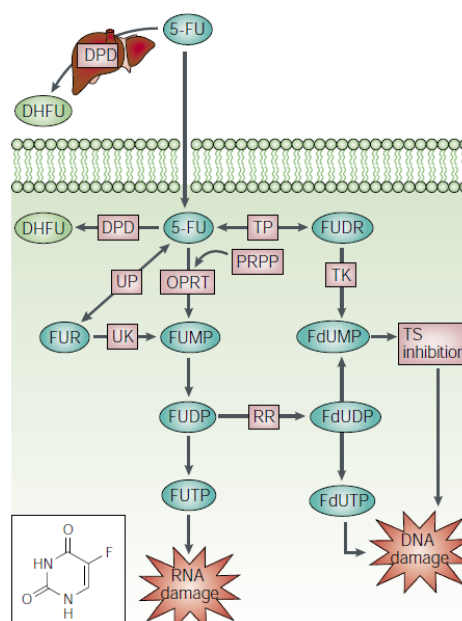


**1.1**

5-FU é fortemente catabolizado no fígado (mais de 80% da quantidade administrada) pela enzima di-hidropirimidina desidrogenase (DPD) convertendo-o a di-hidrofluorouracilo (DHFU). Apesar disso, 5-FU é uma molécula que rapidamente entra na célula por um mecanismo de transporte facilitado semelhante ao do uracilo. Dentro da célula, é convertido a vários metabolitos ativos: – estes metabolitos quebram a síntese de RNA e inibem a ação da timidilato sintetase, uma enzima envolvida na síntese de nucleótidos de pirimidinas (Figura 1.3). No entanto, mais de 80% de 5-FU é catabolizado no fígado pela enzima di-hidropirimidina desidrogenase (DPD) que converte 5-FU a di-hidrofluorouracilo (DHFU).<sup>25</sup>

O 5-FU é administrado com leucovorina, que é responsável por otimizar a ligação entre o metabolito ativo FdUMP e a timidilato sintetase.<sup>21,25</sup> Há duas formas de administração de 5-FU: oral e intravenosa. Existe pouca diferença entre a qualidade de vida durante e após tratamento e o custo destas duas formas de administração, contudo, a infusão de 5-FU promove uma melhor resposta e sobrevivência nos doentes com cancro numa fase metastática. No sentido de ultrapassar o problema do catabolismo de 5-FU pela DPD têm sido adotadas duas estratégias: administração oral de um pró-fármaco que não é catabolizado pela DPD (e.g. Capecitabina) e a co-administração de um inibidor de DPD (uracilo) em conjunto com administração oral de 5-FU.<sup>21</sup>

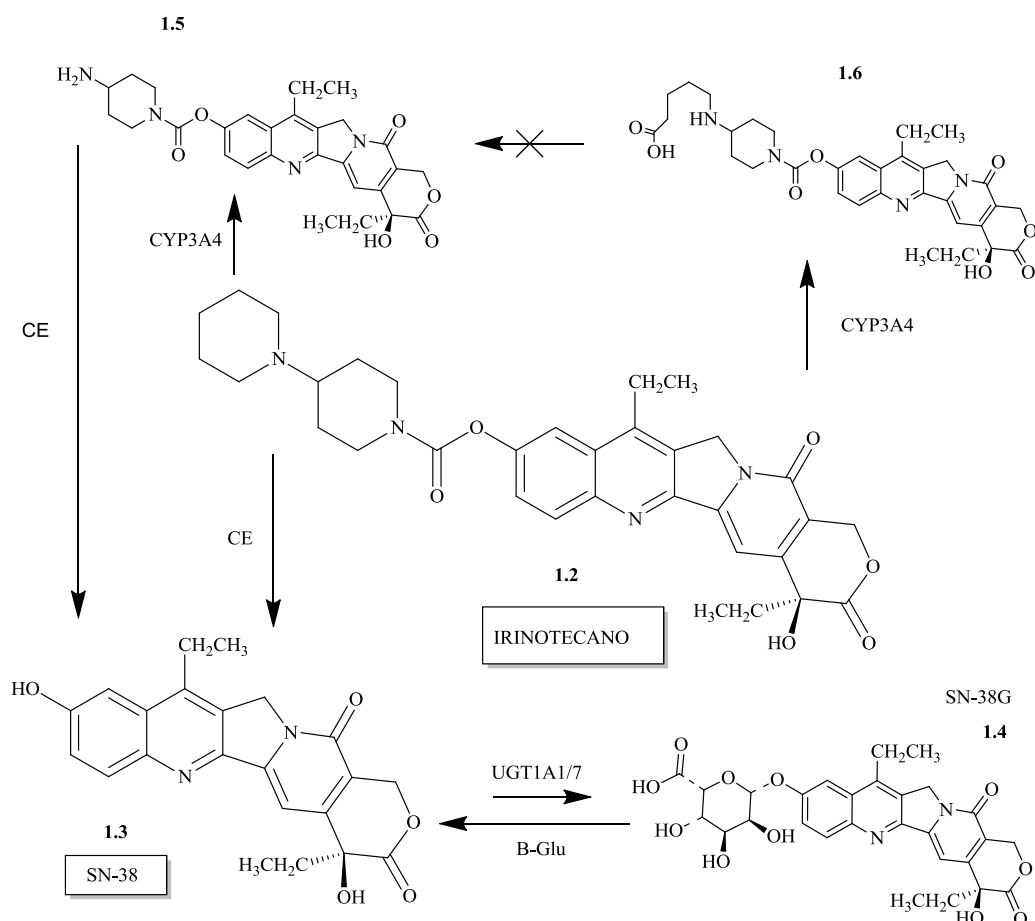
As duas formas de administração de 5-FU apresentam diversos efeitos adversos: neutropenia, estomatite, diarreia (mais frequentes na administração oral), vermelhidão, inchaço e dor nos pés e mãos (síndrome mão-pé) e erupções cutâneas.<sup>21</sup>



**Figura 1.3.** 5-FU é convertido a três metabolitos ativos: FdUMP, FdUTP e FUTP. Inicialmente há uma conversão de 5-FU a fluorouridina monofosfato (FUMP) pela ação da enzima OPRT em conjunto com o cofator PRPP ou indiretamente via fluoruridina (FUR) através da ação das enzimas UP e, posteriormente, UK. FUMP é depois fosforilada a fluoruridina difosfato (FUDP) que pode ser fosforilada novamente a FUTP ou convertida a FdUDP pela enzima RR. FdUDP pode ser fosforilada ou desfosforilada para gerar metabolitos ativos FdUTP e FdUMP, respectivamente. Uma via alternativa envolve a conversão de 5-FU a fluorodesoxiuridina (FUDR) que é depois fosforilada pela enzima TK a FdUMP. Cerca de 80% de 5-FU administrado é catabolizado pela DPD a DHFU.<sup>25</sup>

#### 1.4.4.2. Irinotecano

O irinotecano, também designado por CPT-11 (**1.2**), é um derivado semi-sintético da camptotecina, um alcaloide natural que inibe a enzima topoisomerase I.<sup>21</sup> Derivado das propriedades químicas da camptotecina, análogos desta molécula são lipofílicos e possuem a habilidade de atravessar a membrana celular por difusão passiva, pelo que a captação celular de irinotecano é bastante favorecida. O irinotecano é um pró-fármaco de SN-38 (**1.3**), sendo este 100 a 1000 vezes mais citotóxico que o irinotecano. Pela inibição da topoisomerase I, uma enzima que catalisa a clivagem e religação de cadeias de DNA durante a sua replicação, SN-38 causa a fragmentação do mesmo e leva a apoptose. Posto isto, o irinotecano tem demonstrado um espectro alargado de atividade antitumoral em modelos pré-clínicos, bem como em modelos clínicos com respostas a vários tipos de cancro, incluindo o colorretal.<sup>21, 26</sup> O irinotecano apresenta um perfil farmacológico complexo, que é dependente de uma série de enzimas (Figura 1.4) e proteínas de transporte ativo, regulando a absorção intestinal e a secreção biliar.



**Figura 1.4.** Vias metabólicas e estruturas químicas do irinotecano (1.2) e seus metabolitos. O irinotecano é convertido ao metabolito ativo SN-38 (1.3) pelas carboxilesterases (CE). SN-38 pode ser glucoronado pelas enzimas UGT1A1/7 e tornar-se na forma inativa - SN-38G (1.4). O irinotecano também pode ser oxidado aos compostos identificados por 1.5 e 1.6 pela ação de CYP3A4.

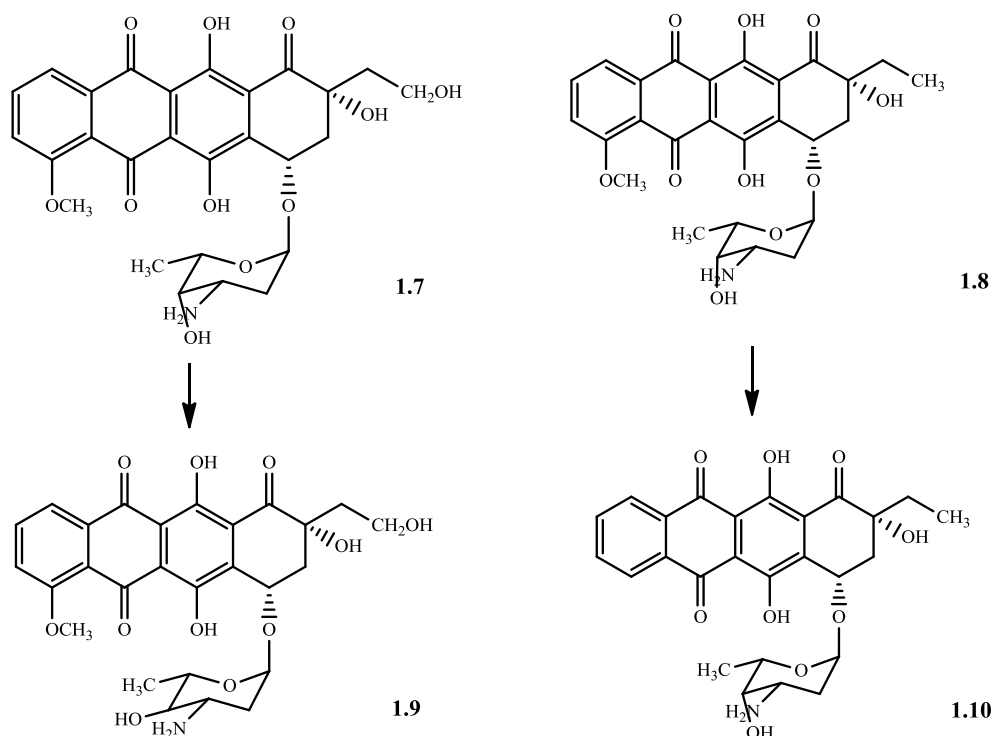
O metabolismo de SN-38 ocorre, predominantemente no fígado, onde é inativado por glucoronadação e excretado pelo sistema biliar. A administração de irinotecano pode ser oral ou por infusão e tem servido de complemento ao tratamento com 5-FU.<sup>26</sup>

Os efeitos adversos mais frequentes são vômitos, diarreia, desidratação, mielosupressão e perda de cabelo.<sup>26</sup>

### 1.4.4.3. Antraciclina

As antraciclina são uma família de compostos que derivam de bactérias *Streptomyces peucetius*. Existem muitas antraciclina tais como a doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina entre outras, que se diferenciam estruturalmente e conformacionalmente. A doxorubicina e a daunorubicina são isoladas diretamente das bactérias enquanto as restantes são análogos sintéticos destas.<sup>27</sup>

As antraciclina são compostas por uma porção glicolítica, devido à presença de um anel de daunosamina e outra porção não glicolítica (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** Estruturas químicas de doxorubicina (1.7), daunorubicina (1.8), epirubicina (1.9) e idarubicina (1.10). Epirubicina é um derivado semi-sintético obtido pela epimerização axial-equatorial do grupo hidroxilo no anel de daunosamina da doxorubicina. A idarubicina é um análogo da daunorubicina obtido pela remoção do grupo metoxi.<sup>27</sup>

As antraciclina são muito utilizadas em quimioterapia, porém, os mecanismos de ação são assunto de controvérsia. Vários mecanismos podem ser considerados: intercalação com o DNA, inibindo a síntese de várias macromoléculas; produção de radicais livres levando a danos no DNA ou peroxidação lipídica; alquilação e ligação ao DNA; reticulação com o DNA; interferência com o desenrolamento do DNA, separação de cadeias ou com a atividade da helicase; efeitos diretos na membrana celular; inibição da DNA topoisomerase II, com danos no DNA e indução de apoptose.<sup>27</sup>

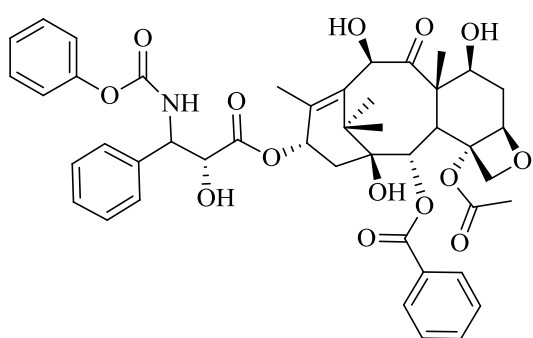
As diferentes antraciclina podem apresentar diferentes modos de ação. A terminação de um grupo lateral com hidroxilo ou metilo que distingue as estruturas químicas da doxorubicina e daunorubicina é importante no espectro de atividade destas moléculas ativas. Como já referido, adoxorubicina é usada no tratamento de cancro de mama, mas também linfomas e sarcomas e a daunorubicina apresenta atividade em leucemias.<sup>27</sup>

O uso clínico de antraciclina acarreta vários efeitos adversos, sendo os mais evidentes cardiotoxicidade, além da toxicidade de outros tecidos saudáveis, cardiomiopatia crónica e falha

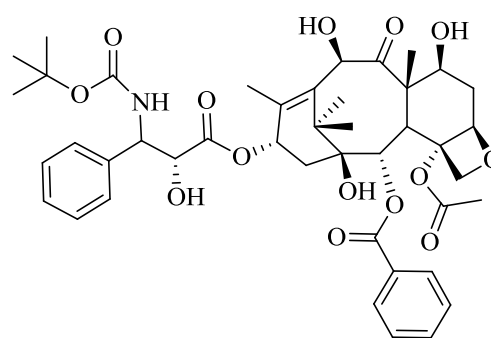
cardíaca congestiva. No sentido de ultrapassar estas problemáticas bem como a resistência desenvolvida pelas células tumorais, têm sido desenvolvidas novas antraciclinas com maior atividade e tolerância cardíaca comparando com as usadas atualmente.<sup>27</sup>

#### 1.4.4.4. Taxanos

Os taxanos são diterpenos obtidos da planta *Taxus brevifolia*. O paclitaxel (**1.11**) e o docetaxel (**1.12**) são taxanos usados como agentes quimioterapêuticos. O paclitaxel é isolado diretamente da planta e o docetaxel é um derivado semi-sintético do 10-deacetilbacatin (taxano precursor inativo obtido de *Taxus baccata*) por esterificação da sua cadeia lateral.<sup>28</sup>



**1.11**



**1.12**

Estes compostos têm como função a ligação a microtúbulos, que são polímeros proteicos cuja função é muito importante em atividades celulares como o movimento, manutenção da forma celular, sinalização e mitose. Esta ligação resulta na inibição da sua função, impedindo a progressão do ciclo celular e levando a célula à apoptose.<sup>28</sup>

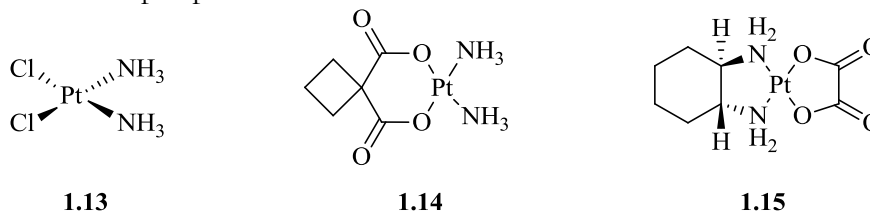
O paclitaxel é um composto hidrofóbico e é administrado em solução cujos solventes são o etanol e um óleo de rícino, no sentido de aprimorar a absorção e a distribuição. É metabolizado no fígado e excretado pelo sistema biliar. O óleo de rícino causa reações de hipersensibilidade. O docetaxel, com estrutura química semelhante, também é hidrofóbico e, por isso, é administrado em solução cujos solventes são o etanol e polisorbato 80, causando muito menos reações de hipersensibilidade. Porém, o docetaxel possui uma farmacocinética linear ao contrário do paclitaxel e tem um tempo de meia vida de eliminação de 1h, muito menor que o do paclitaxel que é de 15 a 50h.<sup>28</sup>

A resistência por parte das células tumorais aos taxanos é comum e o tratamento com estes compostos está associado a vários efeitos adversos no doente como perda de cabelo, mielosupressão, sintomas gastrointestinais, neutropenia, neuropatia, edema, retenção de fluidos e implicações na pele.<sup>28, 29</sup>



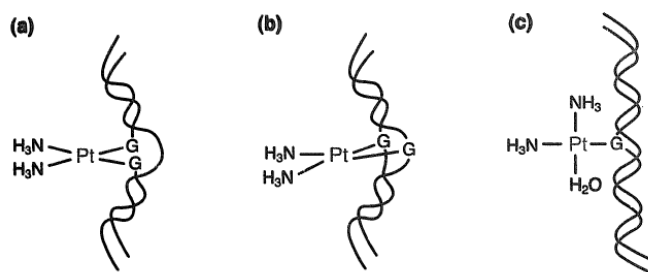
#### 1.4.4.5. Complexos Metálicos de Platina

Os complexos metálicos têm sido aplicados durante séculos como agentes citotóxicos, dos quais complexos metálicos como a cisplatina (**1.13**), carboplatina (**1.14**) e oxaliplatina (**1.15**) apresentam grande sucesso como agentes antitumorais, sendo os únicos complexos metálicos usados globalmente, na prática clínica.<sup>30,31</sup> No entanto, estes complexos metálicos apresentam múltiplos efeitos adversos e são compostos com eficácia limitada, uma vez que há desenvolvimento de resistência ao fármaco por parte das células tumorais.<sup>30</sup>



A cisplatina foi descrita pela primeira vez em 1845 por M. Peyrone. Na década de 1960, Rosenberg, descobriu que, o até então chamado sal de Peyrone, possuía atividade citoestática e passados anos de investigação, descobriu-se que este era um composto muito eficaz, com grande sucesso na área de quimioterapia. Desta forma, este composto tem sido utilizado no tratamento do cancro testicular, ovárico, vesicular, cabeça e pescoço, esofágico, pulmonar, de mama, cervical, de estômago e próstata, assim como linfomas, sarcomas e melanomas.<sup>32</sup>

A cisplatina e oxaliplatina têm mecanismos de ação semelhantes e atuam pela ligação ao DNA.<sup>31,33</sup> Já o mecanismo de ação da carboplatina não é totalmente conhecido, mas pensa-se que interage com o DNA, tubulina e outras proteínas.<sup>34</sup> Há vários tipos de ligações que se estabelecem entre o a cisplatina/oxaliplatina e a molécula de DNA. A principal ligação que se estabelece com o DNA (>90%) é a 1,2-intracadeia (Figura 1.6a), na qual a platina é covalentemente ligada ao átomo de azoto da posição 7 das purinas (adenina, guanina). Outros adutos formados entre cisplatina e DNA compreendem a ligação monofuncional, intercadeia (Figura 1.6) entre outras.<sup>32</sup> A ligação de complexos de platina ao DNA ativa várias vias de sinalização, incluindo a da P53, MAPK, ativação da caspase 8, entre outras que culminam em apoptose.<sup>35</sup>



**Figura 1.6.** Adutos de cisplatina-DNA: a) ligação 1,2-intracadeia; b) ligação intercadeia; c) ligação monofuncional.<sup>32</sup>

Apesar dos complexos metálicos de platina se apresentarem como agente quimioterapêuticos de grande sucesso, estes apresentam efeitos adversos severos, além de ser muito comum o desenvolvimento de resistência aos mesmos por parte das células tumorais. Os efeitos adversos mais comuns do uso de cisplatina apresenta muitos efeitos adversos são náuseas, vômitos, diminuição das células sanguíneas, mielossupressão, imunossupressão, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e perda de cabelo.<sup>36</sup> A oxaliplatina apresenta-se como um complexo de platina com atividade antitumoral superior à cisplatina, principalmente porque as células tumorais mais dificilmente desenvolvem resistência. Por essa razão, a oxaliplatina tem sido utilizada em linhas celulares resistentes à cisplatina. Por outro lado, os efeitos secundários induzidos por este complexo são consideravelmente inferiores aos da cisplatina.<sup>33,37</sup> A carboplatina, comparativamente aos seus análogos, tem a vantagem de demonstrar efeitos adversos reduzidos – é menos nefrotóxica, neurotóxica e induz alopecia (perda de cabelo) mais reduzida, não deixando de ser utilizada num espectro alargado de diferentes tipos de carcinoma.<sup>33</sup>

## 1.5. Complexos Metálicos

Tendo em conta o sucesso da cisplatina, a exploração e o desenho de novas moléculas capazes de interagir com ácidos nucleicos, despoletando morte celular por apoptose é, atualmente, uma das estratégias mais promissoras na descoberta de novos compostos ativos contra o cancro, no tratamento por quimioterapia.<sup>38</sup>

A cisplatina é um dos compostos químicos mais eficazes utilizados em quimioterapia e desde o seu descobrimento e do desenvolvimento dos seus análogos, tem sido sintetizada uma grande variedade de complexos metálicos. A avaliação da atividade antitumoral destes complexos tem sido feita, no sentido de aprimorar o seu efeito terapêutico com redução dos efeitos adversos provocados pela cisplatina e com o objetivo de combater a resistência desenvolvida pelas células tumorais.<sup>39</sup> Para além disso, é também objetivo encontrar compostos mais seletivos para as células tumorais com propriedades farmacocinéticas melhoradas a fim de promover tratamentos mais eficazes no combate ao cancro.

A química inorgânica medicinal tem explorado as propriedades de iões metálicos para o desenvolvimento de novos complexos metálicos. Os complexos metálicos têm algumas vantagens, quando comparados com os compostos ativos orgânicos, pois existe uma ampla gama de números de coordenação e geometrias possíveis, estados redox, características termodinâmicas e características intrínsecas do ligado e do catião metálico a serem exploradas.<sup>39</sup>

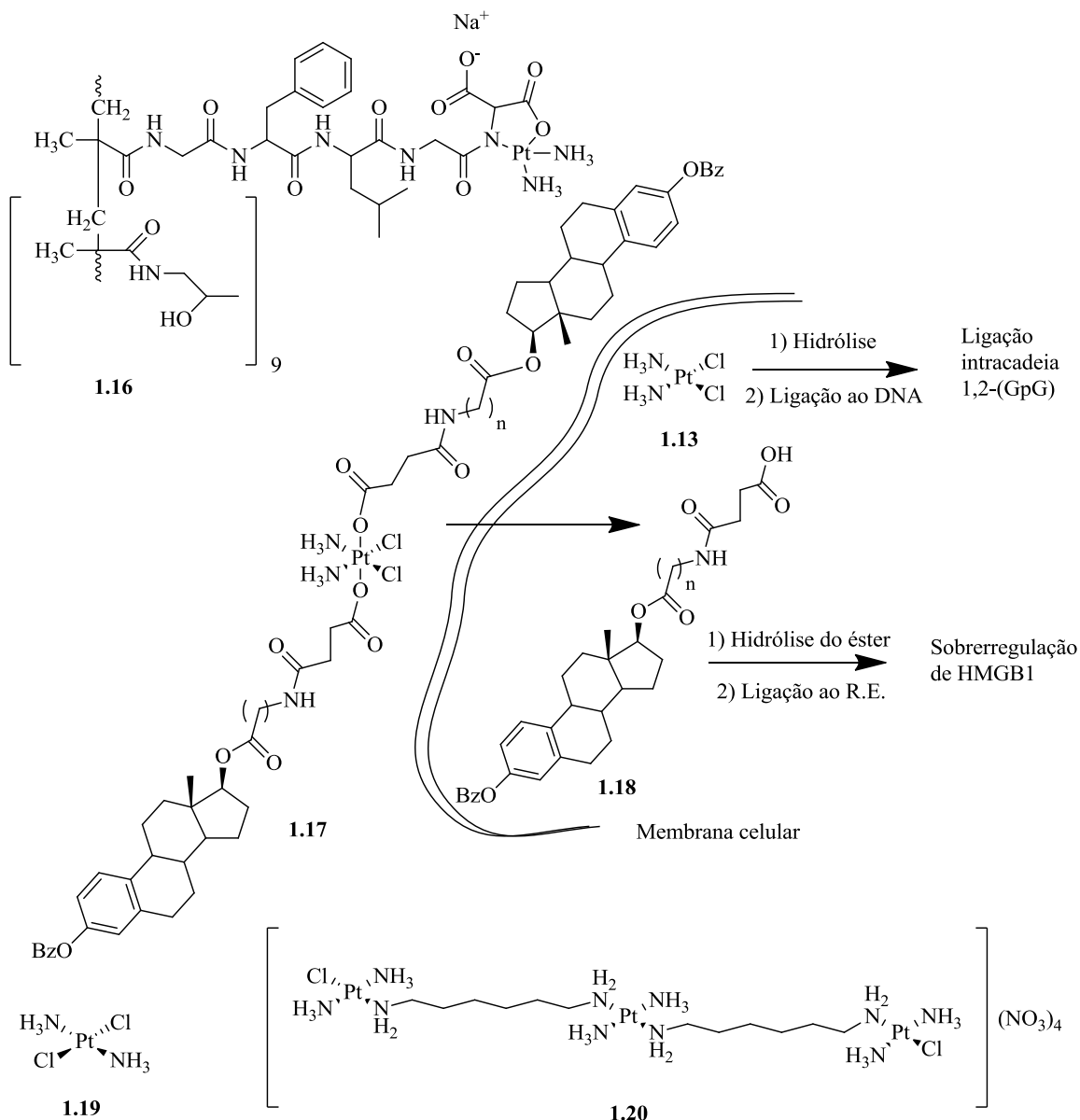
### 1.5.1. Novos Complexos de Platina

A cisplatina, carboplatina e oxaliplatina são os únicos complexos metálicos antitumorais usados na clínica. Durante as últimas décadas, muitos esforços têm sido feitos na tentativa de desenvolver compostos de platina inovadores na luta contra o cancro, em alternativa aos disponíveis no mercado. Milhares de complexos metálicos de Pt foram sintetizados e investigados em ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, contudo, as hipóteses de encontrar complexos metálicos de platina ativos com melhores propriedades terapêuticas têm vindo a desaparecer. Consequentemente, adotaram-se, mais recentemente, duas novas estratégias que constituem a base da descoberta de complexos de Pt: síntese de complexos de platina cujos ligandos confirmam seletividade tumoral e, desenvolvimento de complexos de Pt não-clássicos (i.e., que não sejam análogos da cisplatina), violando a relação estrutura-atividade clássicas.<sup>40</sup>

A seletividade para células tumorais pode ser alcançada com base nas diferenças existentes entre as células normais e as células tumorais. As junções célula-célula nas células tumorais são mais fracas, o que constituiu uma estratégia para o desenvolvimento de complexos de platina macromoleculares em que fragmentos de complexos de Pt (II) são coordenados com copolímeros, que têm como objetivo apresentar maior permeabilidade e retenção nas células tumorais.<sup>40, 41</sup> Um exemplo é o AP5280 (**1.16**). A formulação de complexos de Pt com especificidade para recetores celulares ou órgãos é outra estratégia, tendo sido desenvolvidos complexos de platina para tumores hepáticos, do osso, de mama, do endométrio e da próstata, sendo os recetores hormonais o alvo destes três últimos, como é o caso da sobre-expressão de HER-2, no cancro de mama.<sup>40</sup> O complexo de Pt(IV) (**1.17**) é um exemplo de seletividade para células tumorais, pois tem na sua constituição estrogénios, que vão proporcionar um transporte para o interior das células ER+ e desencadear o efeito citotóxico (Figura 1.7).<sup>39, 42</sup>

Os complexos de Pt (IV) são pró-fármacos, pois podem ser reduzidos aos complexos de Pt(II) correspondentes com libertação dos ligandos axiais, em condições de hipóxia, que é característica das células tumorais.<sup>40</sup>

A transplatina (**1.19**) é o protótipo dos complexos não-clássicos de Pt e não possui atividade antitumoral. Contudo, este composto adquire-a quando é irradiado com radiação UVA, dentro das células. Esta foto-ativação resulta na ligação intercadeia com o DNA. Interações diferentes da cisplatina com o DNA, são conseguidas com análogos da transplatina. O complexo BBR3464 (**1.20**) é um complexo com dois locais de ligação separados por um espaçador. A unidade central tetramina Pt(II) tem carga positiva e interage com o DNA que possui grupos fosfato com carga negativa. Este composto tem um modo de ação diferente do da cisplatina e tem sido estudado em ensaios clínicos em vários tipos de cancro, apresentando-se ser uma a duas ordens de magnitude mais potente que a cisplatina.<sup>40</sup>

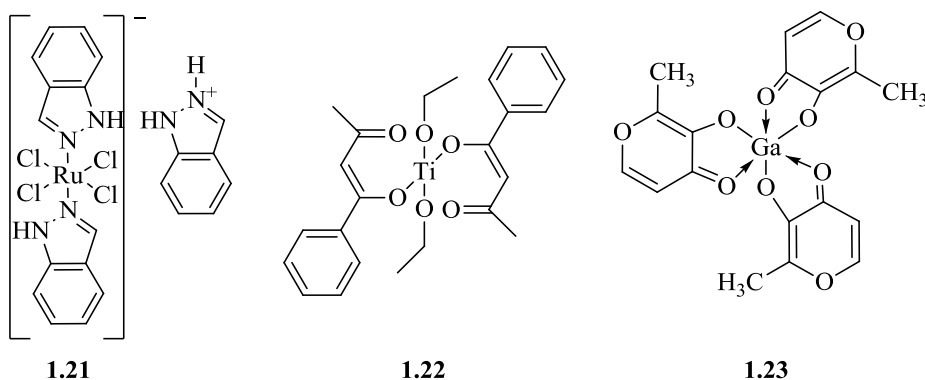


**Figura 1.7.** Estruturas moleculares de: AP5280 (1.16); complexo de Pt(IV) com estrogénios na sua estrutura (1.17) e proposta de mecanismo de ação: dentro da célula é reduzido a cisplatina com libertação de dois equivalentes de estradiol (1.18), que sobre regula HMGB1 e impede o reparo de DNA causado pelos danos da cisplatina; transplatin (1.19); e BBR3464 (1.20).<sup>41,42</sup>

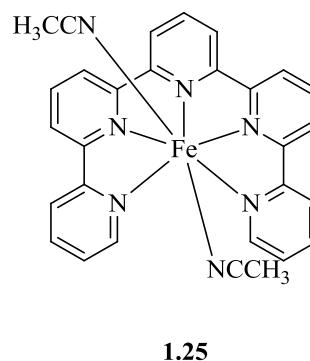
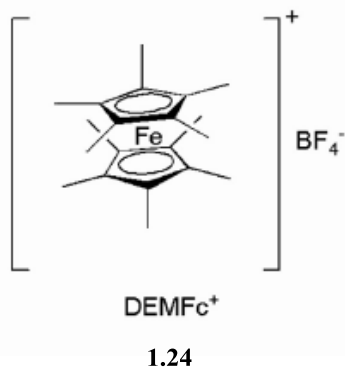
### 1.5.2. Complexos com outros Centros Metálicos

Muitos complexos de Pt desenvolvidos não têm tido sucesso nos testes clínicos, sendo a maioria análogos da cisplatina.<sup>40</sup> Até à data nenhum complexo metálico que não possua como metal central a Pt, foi aprovado para o tratamento do cancro.<sup>43</sup> Contudo, outros elementos de transição têm sido considerados no desenvolvimento futuro de fármacos quimioterapêuticos. Desde há três décadas, tem sido prestada maior atenção a complexos de Ru, Ga e Ti.<sup>40,43</sup> Complexos com estes

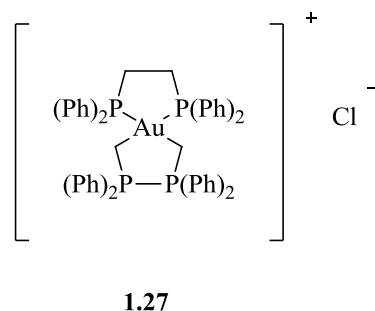
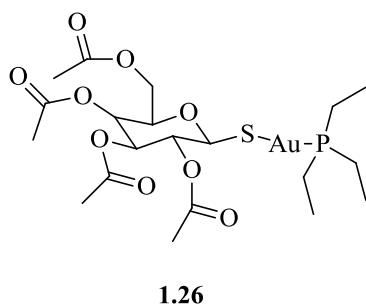
centros metálicos possuem diferenças em relação aos de Pt, permitindo estabelecer interações com outros alvos além do DNA.<sup>43</sup> Os complexos de Ru são menos tóxicos que os complexos de Pt, têm uma coordenação octaédrica em contraste com a quadrangular planar dos complexos de Pt, são acessíveis a vários estados de oxidação (2+, 3+ e 4+) em condições fisiológicas o que permite diferentes potenciais redox e ligam a biomoléculas como a transferrina do soro humano, o que contribui para a diminuição da toxicidade.<sup>40</sup> Os complexos de Ga permitem uma estabilização no estado de oxidação 3+, pois Ga(III) possui uma configuração eletrônica estável ( $d^{10}$ ). Assim, possuem características de coordenação semelhantes ao ferro(III), pelo que se acredita que o metabolismo do Ga(III) seja semelhante ao do Fe(III) competindo na ligação à transferrina, o que é crucial para a captação celular e posterior atividade antineoplásica dos complexos de Ga(III).<sup>40,43</sup> KP1019 (**1.21**), budotitânio (**1.22**) e gálio maltolato (**1.23**) têm sido testados nas fases I e II dos ensaios clínicos.<sup>40,43</sup>



Mais recentemente, outros complexos metálicos têm vindo a ser estudados no sentido de desenvolver novos compostos antineoplásicos. Complexos de Fe, ouro Au e Co têm sido sujeitos a testes pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*. Os ligandos do tipo ferroceno têm demonstrado atividade antitumoral. O mecanismo de ação não é baseado na ligação direta ao DNA, mas sim na capacidade de gerar espécies reativas de oxigénio, levando à oxidação do DNA. DEMFc+ (**1.24**) é um exemplo de um complexo metálico do tipo ferroceno. Complexos de Fe(II) com ligandos piridil pentadentados (**1.25**) possuem uma alta atividade citotóxica, com indução de apoptose.<sup>44</sup>

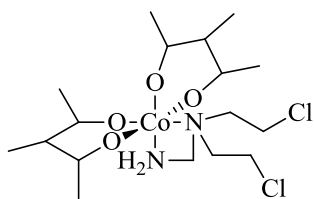


A auranofina (**1.26**), um complexo de Au(I) fosfínico usado no tratamento da artrite reumatoide, demonstrou atividade antitumoral inibindo a replicação de DNA, transcrição e síntese proteica. Contudo, ao contrário de outros complexos de Au, este não interage diretamente com o DNA. O complexo  $[\text{Au}(\text{dppe})_2]\text{Cl}$  (**1.27**) é citotóxico, atuando diretamente com o DNA – forma ligações, levando à quebra das suas cadeias, mas também inibe a replicação, transcrição e síntese proteica. Um outro aspeto interessante sobre os complexos de Au é que estes possuem a capacidade de inibir a enzima tioredoxina redutase, envolvida em vários processos fisiológicos incluindo o crescimento anormal de células cancerígenas. Os complexos de Au(III) também atuam, inibindo esta enzima e têm demonstrado forte atividade antiproliferativa em células cancerígenas, mostrando serem potenciais agentes antitumorais.<sup>44</sup>

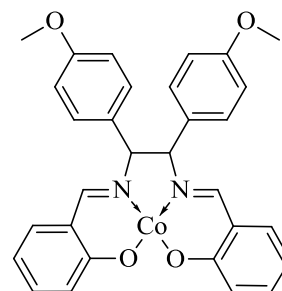


Os complexos de Co(III) têm sido apontados como agentes antitumorais seletivos para células tumorais em condições de hipóxia. O desenho estrutural destes compostos é baseado no facto de as células tumorais desenvolverem resistência à quimioterapia, quando em condições anaeróbias. Sob estas condições, os complexos de Co(III) são reduzidos a Co(II), com libertação de ligandos neutros. Deste modo, foram desenvolvidos complexos de Co(III) com ligandos azotados nas suas estruturas, como é o caso de **1.28**. O meio ligeiramente ácido das células tumorais também ativa estes complexos, através da formação de radicais livres, causando fragmentação de DNA. Bases de Schiff têm sido usadas como ligandos no desenvolvimento de complexos de Co. Um importante

tipo de base de Schiff é o salen, cujos complexos de cobalto mostraram relações estrutura-atividade muito interessantes em estudos de proliferação celular.<sup>44</sup> Um exemplo é o **1.29**.



**1.28**



**1.29**

### 1.5.3. Complexos de Cobre

De entre os complexos metálicos estudados, estão os complexos de Fe e Co, cujos elementos metálicos são importantes biologicamente (e.g., Fe e Co constituem a hemoglobina e vitamina B12, respetivamente).<sup>45</sup> A escolha do centro metálico na formulação de um complexo com atividade biológica pode ser facilitada tendo em conta a sua importância biológica. Os metais são essenciais em muitos processos fisiológicos do corpo humano. Há um grupo principal de metais biologicamente ativos que engloba Na, K, Mg e Ca que constituem numa quantidade considerável e são altamente necessários no funcionamento do organismo humano.<sup>45</sup> Existe outro grupo de metais essenciais em processos fisiológicos designado de metais vestigiais, que compreende 9 metais de transição: Zn, Fe, Mn, Co, Cu, Mo, Cr, V e Ni, embora a essencialidade do Cr, V e Ni seja difícil de estabelecer uma vez que existem no organismo em quantidades muito pequenas.<sup>45</sup> O excesso ou deficiência destes metais no organismo humano estão associados a inúmeras patologias.<sup>45</sup> O Cu, em particular, participa numa grande variedade de funções catalíticas e interações moleculares, uma vez que é co-fator de diversas enzimas e proteínas envolvidas em metabolismo, respiração celular e replicação de DNA.<sup>46-48</sup> A concentração de Cu no corpo humano é fortemente regulada a nível das células e órgãos, uma vez que iões livres de Cu são potencialmente prejudiciais devido às suas propriedades redox e afinidade para a ligação em locais que deveriam ser ocupados por outros metais.<sup>48</sup>

Baseado no pressuposto que os complexos de metais endógenos são menos tóxicos para as células normais do que os complexos de Pt e no papel biológico que o Cu assume no organismo humano, os investigadores têm trabalhado ativamente na formulação e no estudo de complexos de Cu, desde há alguns anos.<sup>47,48</sup> Alternativamente, os complexos de Cu são utilizados na modulação da homeostase de Cu no cérebro, protegendo da neurodegeneração e no aumento da atividade da

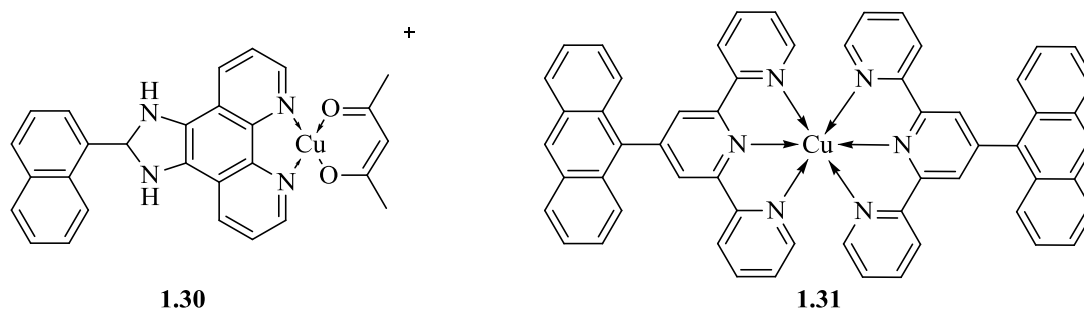
superóxido dismutase (SOD) que resulta no alívio do stress oxidativo e, fator muito importante na terapia da doença coronária.<sup>47</sup>

Quimicamente, estes complexos apresentam, na sua maioria o Cu no estado de oxidação 2+, dado que a química de coordenação deste elemento é dominada pelos derivados de Cu(II), existindo, também, alguns exemplos de compostos de Cu(I). Ligandos que possuam átomos doadores moles como o P, C, S de grupos tioéter e aminas aromáticas facilmente complexam com Cu(I), levando, preferencialmente, à formação de complexos metálicos com geometria tetraédrica. Os complexos de Cu(II) podem ter um número de coordenação de quatro a seis, incluindo as geometrias planar quadrada (n=4), trigonal bipyramidal (n=5) e octaédrica (n=6), o que admite ligandos mono a hexadentados e com átomos doadores como N, S, O ou halogéneos.<sup>48</sup>

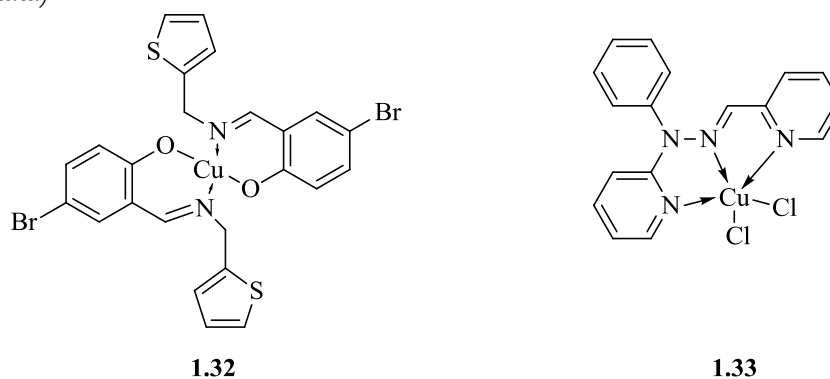
Atualmente, têm-se desenvolvido complexos de Cu com ligandos doadores S, O, N,O, N, polidentados e/ou macrocíclicos, P fosfínicos, C N-heterocíclicos e ligandos que são bases de Schiff. Destes ligandos, alguns apresentam atividade biológica, pois, um dos critérios usados na escolha de ligandos é feito com base na sua atividade biológica, pelo que certos ligandos são fármacos anti-inflamatórios, de origem natural, agentes antitumorais, e moléculas que tenham DNA como alvo ou com base em moléculas que tenham capacidade de interagir com outros alvos além do DNA, com a capacidade de estabilizar o estado de oxidação do Cu, e que consigam atribuir uma determinada lipofilicidade ao complexo de Cu.<sup>48</sup>

A maioria dos complexos de Cu desenvolvidos são complexos de Cu(II). Neste âmbito, complexos dos quais incluem ligandos de base de Schiff e tiosemicarbazonas (doadores S) induzem citotoxicidade até a um nível nanomolar. A planaridade dos ligandos diimina é crucial, como demonstrado pela alta eficácia dos derivados de fenantrolina (phen) – o complexo de geometria quadrangular planar **1.30** atua, ligando-se ao DNA, clivando-o sem nenhum aditivo exógeno, mostrando uma potente atividade antiproliferativa em linhas celulares MCF-7 (cancro de mama), HeLa (cancro da cervical), HL-60 (leucemia promielocítica) com valores de IC<sub>50</sub> entre 1.86 e 3.54 μM, em que a morte celular é a apoptose.<sup>48,49</sup> Outro complexo com estrutura planar (grupos antrilo), o **1.31** atua ligando parcialmente o DNA, demonstrando, ainda assim, uma forte atividade antiproliferativa nas linhas celulares MCF-7, HeLa, SiHa (cancro da cervical), CaSki (cancro da cervical), HepG2 (cancro do fígado) e H1299 (cancro do pulmão) com valores de IC<sub>50</sub> entre 0.7 e 6.3 μM.<sup>48,50</sup>



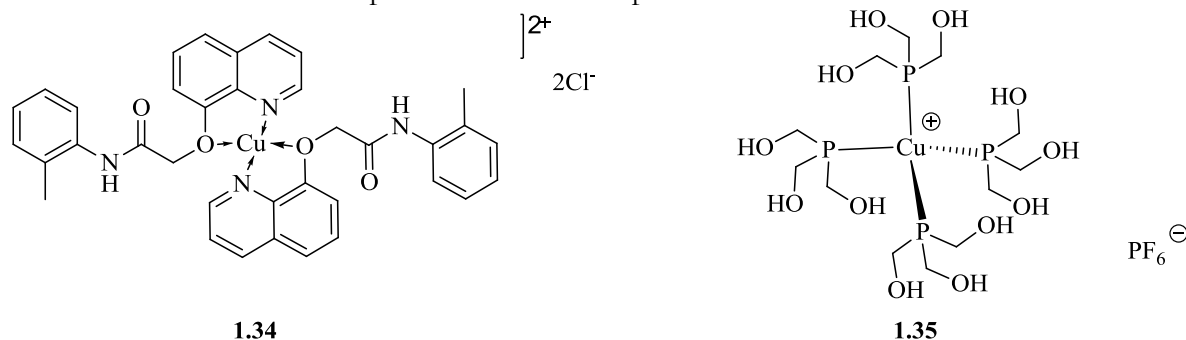


Alguns complexos de Cu(II) com ligandos do tipo bases de Schiff demonstraram uma potente atividade antitumoral. É o caso do complexo **1.32** cujos estudos citotóxicos em células de cancro da laringe indicaram um  $IC_{50}$  na ordem submicromolar.<sup>50</sup> Outro exemplo é o **1.33** que possui uma atividade antiproliferativa com valores de  $IC_{50}$  próximos de 5  $\mu$ M em linhas celulares MCF-7 e PC3 (cancro da próstata).<sup>50,51</sup>



Os exemplos apresentados possuem uma potente atividade citotóxica, porém, o processo antiproliferativo não garante seletividade para as células tumorais. Alguns complexos Cu desenvolvidos foram testados em células normais e demonstraram seletividade para as tumorais, tais como os complexos de Cu com ligandos N,O doadores e doadores P fosfínicos. Os complexos de Cu com ligandos N, O doadores derivados da 8-hidroxiquinolina - um agente quelante bidentado com atividade anti-cancerígena<sup>52</sup> -, mais especificamente, compostos derivados de benzilamina bis(8-hidroxiquinolina) substituída, mostraram uma atividade citotóxica mais eficiente que os seus análogos e, em particular, o complexo **1.34** demonstrou induzir morte celular e supressão do crescimento tumoral em células de cancro de mama MDA-MB-231, mas não em células normais de mama MCF-10, mostrando ser um composto seletivo para a linha celular MDA-MB-231.<sup>48,53</sup> Outro exemplo de complexo seletivo para células tumorais é o **1.35**, cuja atividade citotóxica foi avaliada em várias linhas celulares de cancro do cólon correspondentes a diversos estadios da doença, demonstrando indução de morte celular mais eficiente do que a cisplatina e oxaliplatina, com valores de  $IC_{50}$  entre 0.23 e 1.33  $\mu$ M, e seletividade para as células tumorais, com menor toxicidade que a

cisplatina e oxaliplatina nas células normais.<sup>48,54</sup> Além disso, este complexo demonstrou superar a resistência celular desenvolvida pelas células aos complexos de Pt.<sup>48,54</sup>



Apesar de existir um grande número de testes *in vitro*, investigações *in vivo* de complexos de Cu ainda é pouco praticada, não havendo ainda complexos de Cu na fase I dos testes clínicos.

### Alvos Biológicos dos Complexos de Cu

Os complexos de Cu apresentam um espectro de atividade mais amplo e com menor toxicidade que a cisplatina, o que leva à hipótese destes complexos possuírem diferentes mecanismos de ação da cisplatina, que liga covalentemente ao DNA.<sup>48</sup>

Foram apresentados exemplos de complexos de Cu que intercala o DNA, desencadeando o mecanismo de apoptose. Analogamente à cisplatina, foi demonstrada, em 1991, a formação de uma ligação entre o  $\text{CuCl}_2$  e DNA, na qual o Cu liga ao átomo de azoto na posição 7 da guanina, mostrando também afinidade pelas bases de adenina.<sup>55</sup> Desde então, um grande número de complexos de Cu têm sido desenvolvidos e testados como agentes antitumorais. Os complexos de Cu ligam o DNA através de ligações não covalentes – intercalativas, electroestáticas e ligações através de ranhuras. O metal age como um modificador inorgânico do ligando, tornando-o mais específico e com maior afinidade pelo DNA. Ligandos doadores N, em especial as diiminas (ou bases de Schiff) têm sido destaque entre os complexos de Cu desenvolvidos, pois mostram uma alta interação com o DNA e eficiência antitumoral em ensaios *in vitro*. Em muitos casos, a intercalação com o DNA, leva à deformação da sua estrutura, favorecendo o processo de clivagem. Essa clivagem pode ser: oxidativa, derivado das propriedades oxidativas dos complexos de Cu; hidrolítica.<sup>48</sup>

As topoisomerasas e o proteassoma têm surgido como novos alvos dos complexos de Cu. As topoisomerasas são enzimas nucleares essenciais que regulam o enrolamento do DNA – a topoisomerase I cria quebras numa cadeia enquanto a topoisomerase II cria quebras nas duas cadeias de DNA, permitindo ao DNA que se replique. Estas enzimas têm sido identificadas como alvos importantes no tratamento por quimioterapia. Alguns complexos de Cu possuem a capacidade

de atuar como inibidores destas moléculas, contudo ainda é uma área de investigação recente.<sup>48</sup> O proteassoma é um extenso complexo multiproteína localizado no núcleo e citoplasma que modula e degrada proteínas intracelulares. As células tumorais são mais sensíveis à inibição do proteassoma do que as células normais, pelo que o desenvolvimento de moléculas ativas que tenham o proteassoma como alvo tem sido de extensa investigação.<sup>48</sup>

## 1.6. Complexos Metálicos de Salens e Salans

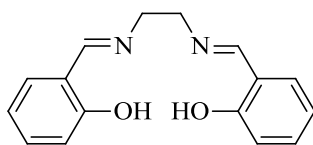
Verificou-se que complexos metálicos de bases de Schiff (também designadas de iminas) demonstram uma forte atividade antitumoral. Estas moléculas representam uma classe importante de compostos em química medicinal devido às suas propriedades farmacológicas tais como antibacterianas, antifúngicas, antitumorais e antivirais.<sup>44, 49</sup> Este tipo de compostos foram descobertas por Hugo Schiff, e têm na sua estrutura um ou mais grupos azometino ( $-C=N-$ ) que resultam da condensação entre aminas primárias e grupos carbonílicos ativos de aldeídos ou cetonas.<sup>56, 57</sup>

As bases de Schiff coordenam com um metal através do átomo de azoto da imina e com um átomo de outro grupo, normalmente oxigénio, próximo do grupo imina.<sup>56</sup> É capaz de formar complexos estáveis com a maioria dos metais de transição, o que é ideal para utilizar em quimioterapia.<sup>59</sup>

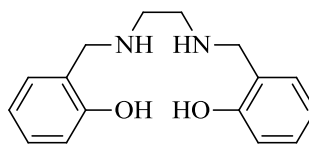
### 1.6.1. Ligandos Salens e Salans

As bases de Schiff tetradentadas derivadas de *N,N'*-bis(salicilideno)etilenodiamina), que se designam, usualmente, por salen (**1.36**), são um tipo destes compostos muito utilizado na química de coordenação.<sup>60</sup> Estes compostos foram descobertos, em 1889, por Combes quando estudava o efeito de diaminas em dicetonas. Posteriormente, preparou o complexo de Cu correspondente. Desde então vários derivados salen e seus complexos metálicos foram sintetizados e usados em catálise, particularmente os ligandos salen quirais, devido ao crescente interesse na obtenção de compostos enantiomericamente puros nas indústrias farmacêuticas e agroquímicas. Os salens também têm demonstrado grande potencial como agentes citotóxicos.<sup>60</sup>

Os compostos salan são tetra-hidro derivados dos salen, isto é, resultam da redução dos grupos imina (**1.37**). São mais resistentes à decomposição hidrolítica e são estruturalmente mais flexíveis devido à ligação simples, bem como podem apresentar uma melhor atividade catalítica e seletividade que os salen, enquanto catalisadores.<sup>62, 63</sup>



1.36



1.37

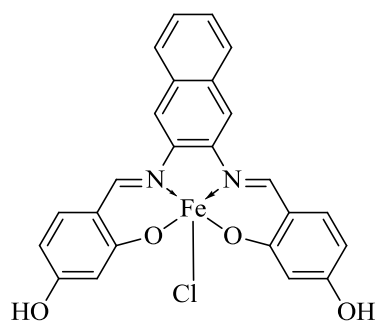
## 1.6.2. Complexos Metálicos de Salens e Salans

Os salens e salans são capazes de complexar metais de transição, sendo os mais encontrados na literatura os complexos de Fe, Mn, Cu, V, Ni, Co, Ti e Ru.<sup>61-63</sup> Estes e seus complexos metálicos têm aplicação em catálise, particularmente os que possuem ligandos quirais, devido ao crescente interesse na obtenção de compostos enantiomericamente puros nas indústrias farmacêuticas e agroquímicas.<sup>55</sup> São usados como catalisadores de reações em epoxidações de alcenos, hidroxilações, hetero Diels-Alder, oxidações, trimetilsilicianações, alquilações de aldeídos entre outras reações mais específicas.<sup>61-64</sup>

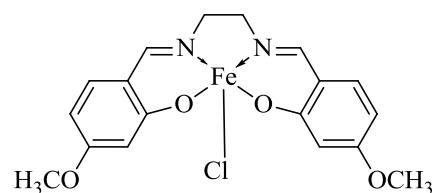
Tendo em conta as propriedades destes ligandos, estudos de atividade biológica de complexos metálicos de salens e salans têm aumentado, durante a última década. Estudos têm demonstrado que estes complexos apresentam atividade antitumoral e têm sido apontados como uma alternativa credível aos complexos metálicos de Pt usados na clínica. Foi demonstrado que este tipo de compostos tem como alvo o DNA de dupla hélice.<sup>65,66</sup>

Atualmente, tem sido estudada a atividade antitumoral de complexos de Fe, Mn, Cu, V, Co, Ni de salens. Contudo, os complexos de Fe e Mn têm sido os mais estudados.<sup>67-73</sup>

Complexos salen de Fe(III) demonstraram uma potente atividade citotóxica contra células MCF-7, cujo tipo de morte celular observado foi apoptose. O complexo de Fe(III) **1.38** mostrou uma forte atividade antiproliferativa nesta linha celular com um  $IC_{50}$  de  $0.2\mu M$ , num período de incubação das células de 96h.<sup>67</sup> Num estudo posterior, outro conjunto de complexos de Fe(III) com estrutura semelhante aos anteriores foram sujeitos a estudos em células normais de mama (MCF-10) e não revelaram seletividade pelas células tumorais, à exceção de dois. O complexo **1.39** demonstrou boa seletividade, sendo 3 vezes mais tóxico em células tumorais, com um valor de  $IC_{50}$  de  $12\mu M$ , que é um pouco inferior ao da cisplatina ( $18\mu M$ ).<sup>68</sup>

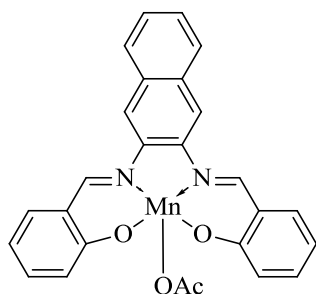


**1.38**

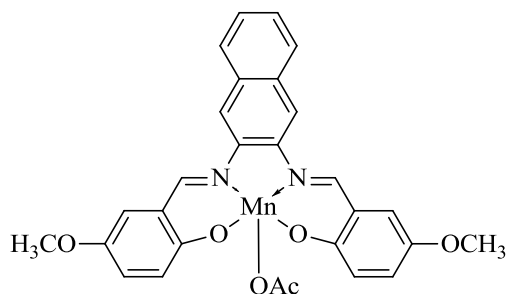


**1.39**

Complexos de Mn(III) de salens também têm mostrado atividade proliferativa em células MCF-7, tendo sido incubadas sob efeito dos complexos durante 96h. Foi mostrado que existe uma grande atividade das caspases 3 e 7 e liberação de citocromo c no citosol, o que significa que ocorre morte celular por apoptose através da via intrínseca. O complexo de Mn(III) **1.40** apresenta um forte efeito antiproliferativo com um valor  $IC_{50}$  de 11  $\mu$ M. Interessantemente, este complexo apresenta seletividade para as células tumorais, tendo um efeito citotóxico aproximadamente cinco vezes superior ao das células normais de mama (valor de  $IC_{50}$  na linha MCF-10 é 49  $\mu$ M). Contudo, comparado com os valores de  $IC_{50}$  da cisplatina (18  $\mu$ M em MCF-7 e 91  $\mu$ M em MCF-10), conclui-se que não é superior em seletividade para células tumorais. O complexo **1.41** demonstra uma atividade citotóxica semelhante à da cisplatina em células tumorais MCF-7 ( $IC_{50}$  de 19  $\mu$ M) e é mais seletivo para células tumorais, embora que ligeiramente ( $IC_{50}$  de 101  $\mu$ M em células MCF-10).<sup>69</sup>



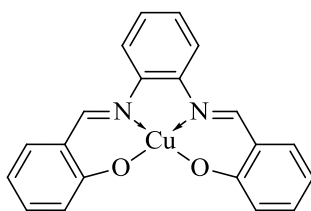
**1.40**



**1.41**

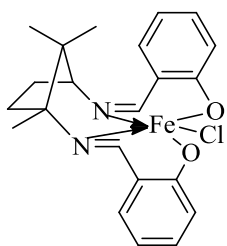
Anteriormente, foi referido que têm sido desenvolvidos complexos de Cu de sistemas de bases de Schiff dadas as características que estes ligandos proporcionam ao complexo metálico. Porém, ainda não foi desenvolvido um grande número de complexos de Cu do tipo salen com aplicação antitumoral.

O complexo de Cu(II) **1.42** demonstrou atividade antiproliferativa em linhas celulares MCF-7, MDA-MB-231 e HT-29, depois de uma incubação de 48h. Os autores deste trabalho, não estudaram o mecanismo de ação e a viabilidade celular decorrentes do efeito deste complexo metálico.<sup>70</sup>

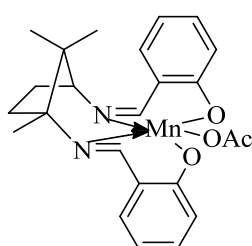


**1.42**

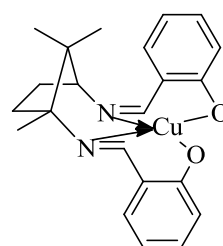
Tendo em conta a potencialidade dos complexos de Cu como agentes antitumorais, anteriormente discutida, o efeito do centro metálico na atividade citotóxica do complexo tem sido confirmado, numa investigação recente no grupo de Química Orgânica do Centro de Química de Coimbra, pela comparação da atividade antiproliferativa de três complexos com o mesmo ligando, mas com centros metálicos diferentes em células nas linhas WiDr (cancro colorretal), MCF-7, C2BBel (cancro colorretal) e A375 (melanoma). Os ligandos derivados do ácido (+)-canfórico foram complexados com Fe (**1.43**), Mn (**1.44**) e Cu (**1.45**). Neste estudo, o período de incubação das células expostas aos complexos foi de 48h e o complexo de Cu(II) demonstrou ser o mais efetivo em todas as linhas celulares com valores de  $IC_{50}$  entre 3.32-6.71  $\mu$ M. Comparado com os compostos usados em quimioterapia convencional (dos quais se incluem 5-FU e epirrubicina), o complexo de Cu (II) mostrou ser vinte vezes mais efetivo. Os valores de  $IC_{50}$  para os complexos de Fe(III) e Mn(III) são uma ordem de grandeza superior que o de Cu(II), em que o complexo de Fe(III) mostrou ser mais efetivo para as linhas celulares WiDr e MCF-7, enquanto o de Mn(III) mostrou ser mais efetivo para as linhas celulares C2BBel e A375. Foi demonstrado também, em estudos de viabilidade celular que, o tipo de morte é apoptose quando a concentração de complexo administrada não é muito superior ao  $IC_{50}$ , caso contrário, o tipo de morte é necrose.<sup>71</sup>



**1.43**



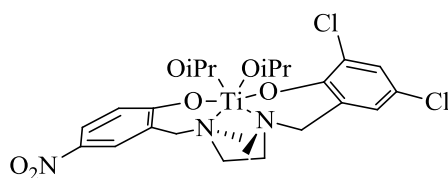
**1.44**



**1.45**

Pensa-se que as diferenças da atividade antitumoral entre o complexo de Cu(II) e o de Fe(III) e Mn(III) podem dever-se à geometria do complexo. Além da planaridade do ligando, também parece ser importante a geometria planar que o centro metálico confere ao complexo, pois uma geometria quadrangular planar é importante na capacidade de ligação a alvos biológicos, como os ácidos nucleicos.<sup>65,71,75</sup>

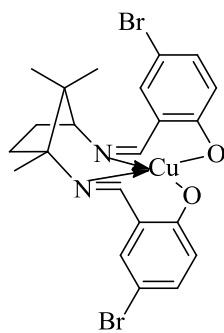
A investigação em complexos metálicos salan ainda é recente e não existe um número considerável de trabalhos reportados. Ti tem sido o centro metálico mais escolhido na formulação de complexos metálicos salan.<sup>76-78</sup> O complexo salan de Ti(IV) (**1.46**) com um anel aromático nitrado e outro anel aromático diclorado demonstrou uma alta atividade antitumoral em células HT-29 (câncer colorretal), com incubação durante 72h. O composto é trinta vezes mais efetivo em células tumorais que a cisplatina, com um valor de  $IC_{50}$   $0.7\mu M$ .<sup>78</sup>



**1.46**

## 1.7. Átomos de Halogéneo em Química Medicinal

Na sequência dos estudos realizados no grupo de Química Orgânica dos complexos de ligandos derivados do ácido canfórico foi sintetizado um complexo de Cu(II) dibromado (**1.47**). Este complexo mostrou, num período de ação de 48h, atividade antitumoral superior aos **1.43**, **1.44** e **1.45**. A atividade citotóxica foi avaliada em células MCF-7, WiDr, A375, HCC1806 (câncer de mama) e LS1034 (câncer do cólon), apresentando-se com valores de  $IC_{50}$  entre 0.78 e  $2.32\mu M$ .<sup>79</sup>



**1.47**

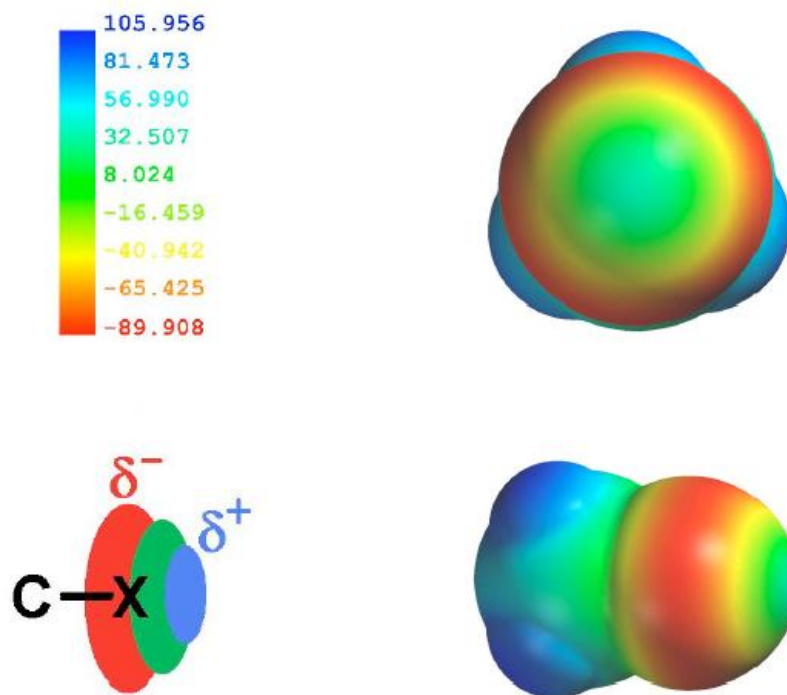
Os dois átomos de bromo introduzidos na estrutura do composto original têm um efeito notável na atividade biológica do complexo. De facto, um grande número de fármacos e fármacos em desenvolvimento são estruturas halogenadas. A otimização das interações intermoleculares existentes na complexação droga-alvo é um pré-requisito fundamental e, portanto, os átomos halogéneo ajudam no processo de otimização de determinada droga, tendo em conta a possibilidade de estabelecer ligações de halogéneo. Além disso, a inserção deste tipo de átomos em estruturas orgânicas é realizada para explorar os efeitos estéreos, dada a capacidade que estes átomos

volumosos possuem em ocupar alvos moleculares. A inserção destes átomos em novos princípios ativos pode levar a mudanças conformacionais e no volume da molécula, ou seja, este tipo de átomos tendem a ocupar os locais ativos de alvos moleculares, inclusive os mais profundos. Em relação à molécula ativa original, a inserção de átomos halogéneo pode induzir efeitos agonistas ou antagonistas. Além da ligação com o alvo molecular, a halogenação numa estrutura ativa é frequentemente usada para aumentar a lipofilicidade e conseqüente permeabilidade de membrana o que se traduz no aumento da absorção oral, bem como induzir permeabilidade na barreira hematoencefálica, o que é necessário para as drogas cuja função se desempenha no sistema nervoso central.<sup>80</sup>

As ligações de halogéneo são ligações intermoleculares com características semelhantes às ligações de hidrogénio, que os átomos de halogéneo são capazes de estabelecer. A ligação de halogéneo é um tipo de ligação não-covalente estabelecida entre átomos halogéneo (ácido de Lewis) e bases de Lewis neutras ou aniónicas. À semelhança do átomo de hidrogénio na ligação de hidrogénio, o átomo halogéneo é o átomo aceitador de eletrões na ligação de halogéneo. O esquema  $D^{\cdots}X-Y$  também se aplica a este tipo de ligação, sendo que D é o átomo dador de eletrões (base de Lewis) e aceitador da ligação de halogéneo, X é o átomo halogéneo, aceitador de eletrões (ácido de Lewis) e dador da ligação de halogéneo e Y é o átomo ao qual o átomo halogéneo está ligado covalentemente.<sup>81</sup> Quanto mais forte for a ligação  $D^{\cdots}X$ , mais curta será. A ligação de halogéneo é muito forte e, conseqüentemente, pode prevalecer sobre ligações de hidrogénio na seleção, aquando do envolvimento em processos de reconhecimento. A força da ligação depende do átomo halogéneo envolvido na ligação, sendo que a tendência para a força de ligação segue a ordem:  $I > Br > Cl > F$ . As moléculas di-halogenadas (e.g.  $Cl_2$ ) estabelecem ligações de halogéneo muito fortes. Contudo, este tipo de ligação é sensível a impedimentos estereoquímicos dada a dimensão dos átomos halogéneo.<sup>81</sup>

O estabelecimento da ligação de halogéneo pode ser racionalizado segundo dois aspetos: ao longo do eixo da ligação C-X, existe um potencial eletroestático positivo, no final do átomo de halogéneo, que é também denominado por “buraco  $\sigma$ ”; a distribuição anisotrópica da densidade eletrónica à volta do átomo halogéneo. Ao longo do eixo da ligação C-X existe um carácter eletrofílico, contudo existe um carácter nucleofílico ao longo dos vetores perpendiculares ao eixo de ligação – esquematizado na Figura 1.8, para o exemplo do brometo de metilo. Assim é possível, estabelecer ligações lineares com nucleófilos, mas também é possível estabelecer ligações com eletrófilos (e.g. ligação de hidrogénio ou interação dipolo-dipolo) perpendicularmente ao eixo da ligação C-X.<sup>80,82</sup>





**Figura 1.8.** Representação das superfícies de potencial eletrostático ab initio da molécula de brometo de metilo e energias com as respectivas cores para as superfícies de potencial eletrostático negativo (vermelho), neutro (verde) e positivo (azul). A geometria foi otimizada usando a base de funções HF/6-31G (d) e a superfície de potencial eletrostático foi gerado por mapeamento de superfícies vDW, utilizando o programa Spartan'08 v1.0.0 (Wavefunction, Irvine, CA).<sup>80</sup> (adaptado)



# Capítulo 2

## Síntese de Complexos de Cu(II) Derivados do Ácido (+)-Canfórico

O objetivo do trabalho que deu lugar a esta dissertação consistiu em sintetizar novos complexos de Cu(II) de ligandos derivados do ácido (+)-canfórico, no sentido de dar continuidade a trabalhos efetuados no grupo de Química Orgânica.

No Capítulo 1, salientou-se a interessante atividade antitumoral de vários complexos de Cu recentemente investigados, bem como a potenciação do efeito pelo sistema de ligandos no complexo, com destaque particular para as bases de Schiff. Além disso, mostrou-se a importância que os átomos de halogéneo podem ter na constituição de moléculas ativas. Os complexos salen de Cu(II) derivados do ácido (+)-canfórico não halogenado (**1.44**) e dibromado (**1.46**), sintetizados e estudados pelo grupo apresentaram resultados de citotoxicidade interessantes relativamente aos complexos com outros centros metálicos. O complexo **1.46** mostrou ser 3 a 5 vezes mais efetivo na inibição de proliferação de células tumorais do que **1.44**, devido à presença de 2 átomos de bromo na sua estrutura. Seria interessante avaliar a influência do tipo e da quantidade de átomos de halogéneo na atividade citotóxica de uma molécula ativa.

Deste modo, de forma a complementar os anteriores trabalhos efetuados no grupo, foi proposto sintetizar novos complexos salen de Cu(II) derivados do ácido (+)-canfórico, variando em cada estrutura o tipo e o número de halogéneos, dando origem a compostos tetrabromados, di- e tetraclorados.

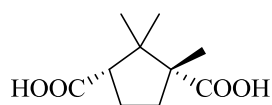
De forma a estudar o efeito do ligando na atividade antitumoral do complexo metálico, foi também proposto, sintetizar ligandos salen derivados do ácido (+)-canfórico e ligandos salen

derivados do ácido *L*-tartárico e seus respectivos complexos de Cu(II). A presença do tipo e do número de halogêneos nos complexos salin derivados do ácido (+)-canfórico e complexos salen derivados do ácido *L*-tartárico também foi considerada, com o objetivo de confirmar a influência do tipo de átomos e da quantidade, a nível citotóxico. Tendo sintetizado os complexos de Cu(II), estes foram sujeitos a estudos de citotoxicidade em linhas celulares do cancro do cólon e da mama.

Neste capítulo é apresentada a primeira parte do trabalho de síntese deste projeto, que consistiu na obtenção dos complexos de Cu(II) cujos ligandos são os salens e salans derivados do ácido (+)-canfórico.

O ácido (+)-canfórico (**2.1**), também conhecido como ácido (*1R,3S*)-1,2,2-trimetilciclopentano-1,3-dicarboxílico, foi isolado pela primeira vez por Vauquelin e é um composto quiral obtido a partir da oxidação, com ácido nítrico, da cânfora, que é um composto natural.

O ácido (+)-canfórico tem aplicações farmacêuticas, pois é utilizado no tratamento de distúrbios nas glândulas sudoríferas e funciona como antisséptico local de nariz e garganta. Tem uma toxicidade baixa e, por essa razão, substitui a cânfora neste tipo de aplicações. Derivados do ácido (+)-canfórico também são muito utilizados como auxiliares quirais em catálise enantiosseletiva.<sup>83</sup>

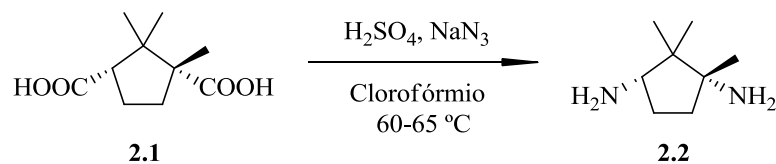


**2.1**

Inicialmente, procedeu-se à síntese da diamina derivada do ácido (+)-canfórico (**2.2**). Seguidamente, efetuou-se a condensação de **2.2** com o salicilaldeído e alguns derivados halogenados deste, fim de obter uma variedade de salens e salans. Os ligandos assim obtidos, foram complexados com Cu(II). Alguns destes complexos metálicos foram sujeitos a estudos de citotoxicidade em linhas de celulares do cancro do cólon e da mama.

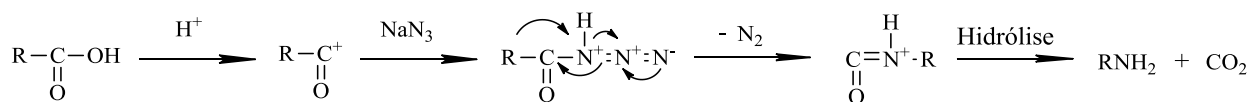
## 2.1. Síntese da Diamina Derivada do Ácido (+)-Canfórico

O (*1R,3S*)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano (**2.2**), a diamina derivada do ácido (+)-canfórico, foi obtida por tratamento de **2.1** com azida de sódio e ácido sulfúrico, uma reação conhecida por reação de Schmidt.<sup>61,83</sup> O ácido canfórico dissolveu-se em clorofórmio, na presença de ácido sulfúrico que atua como catalisador. A reação realizou-se a uma temperatura entre os 60 °C e 65 °C durante uma noite (Figura 2.1). Obteve-se um óleo amarelo claro com um rendimento de 68%. A sua formação foi confirmada por RMN<sup>1</sup>H após tratamento da diamina com HCl.



**Figura 2.1.** Representação esquemática da síntese de *(1R,3S)*-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano (**2.2**) a partir de ácido (+)-canfórico (**2.1**).

A reação de Schmidt é caracterizada pela adição de ácido hidrazóico ( $\text{HN}_3$ ) a ácidos carboxílicos, aldeídos ou cetonas, assim como a álcoois e olefinas. Nesta reação, os ácidos carboxílicos formam aminas através do rearranjo de Curtius, cujo intermediário é o isocianato (Figura 2.2). Primeiramente o ácido carboxílico forma o ião acilo, com eliminação de água. Depois há ataque da azida de sódio (base conjugada de  $\text{HN}_3$ ) ao ião acilo. De seguida, ocorre o rearranjo de Curtius, formando o intermediário isocianato, com libertação de azoto molecular. Por fim, este intermediário sofre hidrólise, formando a amina, com libertação de dióxido de carbono. O rearranjo ocorre com retenção de configuração, ou seja, a amina **2.2** é óticamente pura e tem a mesma configuração que o ácido de partida.<sup>83</sup>



**Figura 2.2.** Representação mecânica na reação de Schmidt.

## 2.2. Síntese de Derivados Clorados do Salicilaldeído

Sabendo da importância de compostos halogenados na química farmacêutica, como já foi referido interessou-nos sintetizar derivados clorados e bromados de salens.

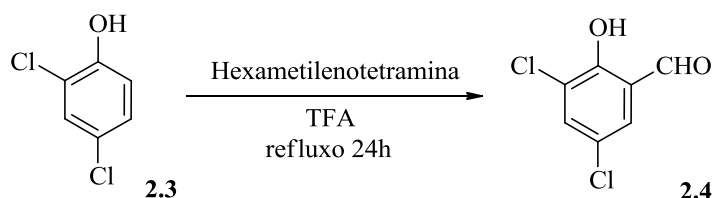
Neste trabalho, foi sintetizado o 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído (**2.4**) e tentou-se sintetizar o 5-cloro-2-hidroxibenzaldeído, por inviabilidade económica em adquirir estes reagentes.

### 2.2.1. Síntese de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído

Na síntese de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído, formilou-se o 3,5-diclorofenol através da reação de Duff modificada. A reação de Duff é uma reação utilizada na síntese de benzaldeídos em que a hexametenotetramina é a fonte do carbono do grupo formilo.<sup>84,85</sup> Na via modificada desta reação, utiliza-se ácido trifluoroacético (TFA) como solvente na formilação de fenóis 4-substituídos,

em vez de glicerol ou ácido acético.<sup>86</sup> A formilação ocorre na posição *orto* em relação ao grupo hidroxilo.

A reação entre o 3,5-diclorofenol (**2.3**) e 1 equivalente de hexametilenoctetramina em refluxo de TFA, em atmosfera inerte, durante 24h, deu origem ao 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído, confirmado por TLC e RMN<sup>1</sup>H, tendo-se obtido um sólido amarelo com rendimento de 79.5%.



**Figura 2.3.** Esquema representativo da síntese de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído (**2.4**) a partir de 3,5-diclorofenol (**2.3**).

O mecanismo da reação de Duff (Figura 2.4) envolve uma substituição eletrofílica aromática, em que a espécie eletrofílica é o ião imínio  $\text{CH}_2\text{NR}_2^+$ , formado a partir da hexametilenoctetramina, responsável por doar um grupo metino ao anel aromático. Esta adição resulta na formação intermediária de benzilamina que é posteriormente hidrolisada, oxidando ao benzaldeído correspondente.<sup>84</sup> Importa referir que a reação é facilitada pela presença do grupo hidroxilo, responsável por ativar o anel aromático, uma condição necessária para que a formilação ocorra. A formilação ocorre preferencialmente na posição *orto*, caso estas posições do fenol estejam livres.<sup>87</sup>

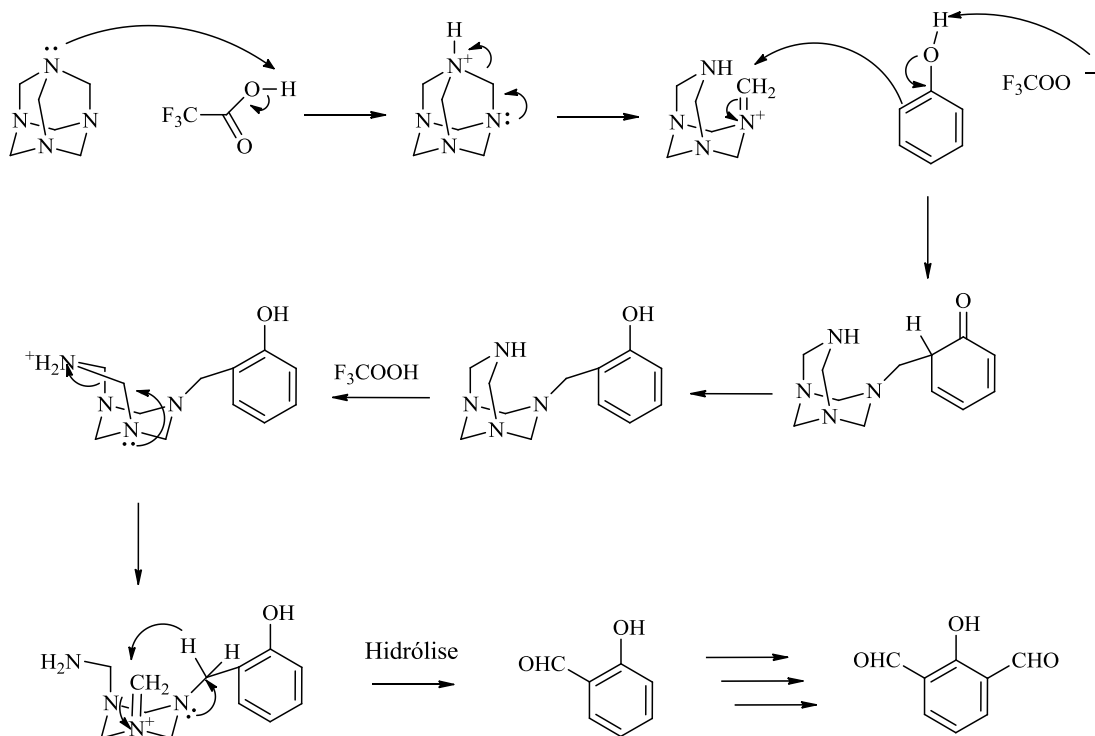
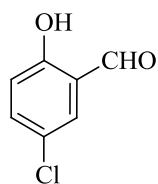


Figura 2.4. Representação mecanística da reação de Duff.

### 2.2.2. Tentativa de síntese de 5-cloro-2-hidroxibenzaldeído

Pela reação de Duff, nas mesmas condições anteriormente descritas, tentou-se sintetizar o 5-cloro-2-hidroxibenzaldeído (**2.5**), partindo do 5-clorofenol. No entanto, por TLC, verificou-se a formação de vários produtos. Numa segunda tentativa, a reação foi controlada por TLC de 2 em 2h, durante 24h de forma a tentar minimizar produtos secundários. Numa terceira tentativa, o tempo de reação foi de 48h, e também não se verificou diferenças produto em relação às outras tentativas. Tentou-se uma recristalização em etanol e verificou-se a formação de um sólido verde fluorescente. O TLC do produto obtido mostrou a existência da mesma mistura, sendo uma mancha mais intensa. A análise RMN<sup>1</sup>H desta mistura indicou a presença do produto pretendido, entre outros resíduos na linha de base. Não foi possível fazer a purificação por cromatografia em coluna devido à proximidade das manchas no TLC correspondente à mistura, tendo-se tentado utilizar vários eluentes diferentes. Posteriormente, adquiriu-se comercialmente o 5-cloro-2-hidroxibenzaldeído.



**2.5**

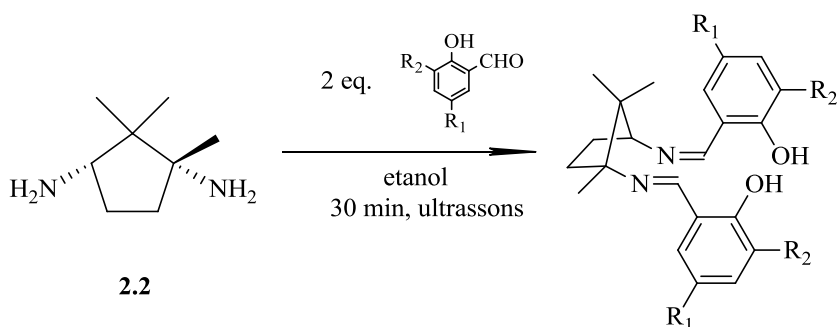
35

### 2.3. Síntese de Salens Derivados do Ácido (+)-Canfórico

Obtida a diamina **2.2** e o derivado do salicilaldeído **2.4**, procedeu-se à síntese de diversos salens, utilizando para além do **2.4**, o salicilaldeído, o 3,5-dibromo-2-hidroxibenzaldeído, o 5-bromo-2-hidroxibenzaldeído e o 5-cloro-2-hidroxibenzaldeído.

Todos os salens foram sintetizados segundo um procedimento semelhante, reação de um equivalente de diamina com dois equivalentes de salicilaldeído ou derivados. Recorreu-se ao uso de ultrassons na síntese destes ligandos, pois é um processo mais conveniente devido aos tempos de reação mais curtos, menor consumo de energia e facilidade no isolamento dos produtos, ao contrário do processo de síntese clássico de salens que podem levar desde 2 até 24 horas, dependendo do tipo de reagentes. Existe uma grande poupança de tempo nestas reações mediadas por ultrassons pois ocorrem em 30 minutos, apresentando rendimentos superiores aos rendimentos das reações promovidas pelo procedimento tradicional.<sup>61</sup> Utilizando este procedimento, obtiveram-se os salens **2.6-2.10**, como sólidos amarelos, característica deste tipo de compostos. Todos os salens foram, posteriormente, confirmados por RMN<sup>1</sup>H. Os rendimentos obtidos foram entre 47% e 86% (Esquema 2.1).

A adição de diamina aos salicilaldeídos, ocorre com libertação de água, de modo que esta pode hidrolisar o ligando formado.<sup>61</sup> Neste tipo de reações é geralmente utilizado gel de sílica de modo a impedir a hidrólise, contudo, neste caso as reações são rápidas e os ligandos formados nestas reações apresentam boa estabilidade e não foi necessária a sua utilização.



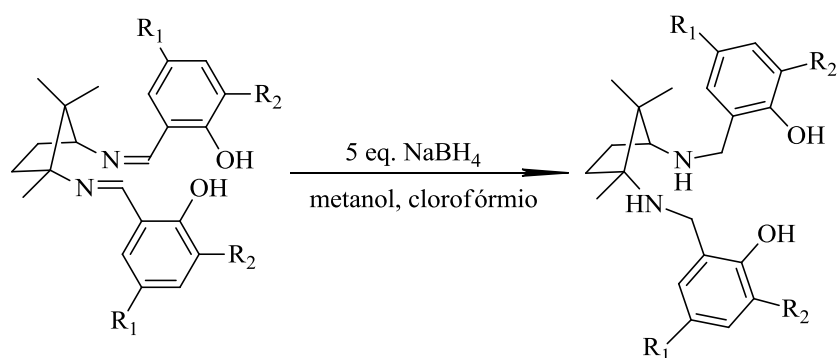
Salen	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Rendimento
<b>2.6</b>	H	H	60 %
<b>2.7</b>	Cl	H	68 %
<b>2.8</b>	Cl	Cl	47 %
<b>2.9</b>	Br	H	86 %
<b>2.10</b>	Br	Br	67%

**Esquema 2.1.** Esquema representativo da síntese de (*1R,3S*)-*N,N'*-bis[salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano (**2.6**) e seus derivados halogenados (**2.7-2.10**).



## 2.4. Síntese de Salans Derivados do Ácido (+)-Canfórico

Prepararam-se os salans através da redução dos grupos imina dos salens correspondentes. O agente redutor utilizado nas sínteses dos salans **2.11-2.13** a partir dos salens **2.6, 2.7 e 2.9** foi o boro-hidreto de sódio. A quantidade utilizada foi de 5 equivalentes para 1 equivalente de salen. A reação de redução de **2.6** a **2.11** ocorreu durante 1h à temperatura ambiente, numa mistura de clorofórmio e metanol (1:1). Já a reação de redução de **2.7 e 2.9** a **2.11 e 2.13**, respetivamente, ocorreu durante 4-5h. As reações foram controladas por TLC e os produtos obtidos **2.11-2.13** foram confirmados por RMN<sup>1</sup>H. Obtiveram-se sólidos de cor branca com rendimentos entre 25% e 98% (Esquema 2.2).



Salan	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Rendimento
<b>2.11</b>	H	H	71 %
<b>2.12</b>	Cl	H	98 %
<b>2.13</b>	Br	H	25 %

**Esquema 2.2.** Esquema representativo da síntese (*1R,3S*)-*N,N'*-bis[2-(1-hidroxifenil)metil]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano (**2.11**) e seus derivados halogenados (**2.12** e **2.13**).

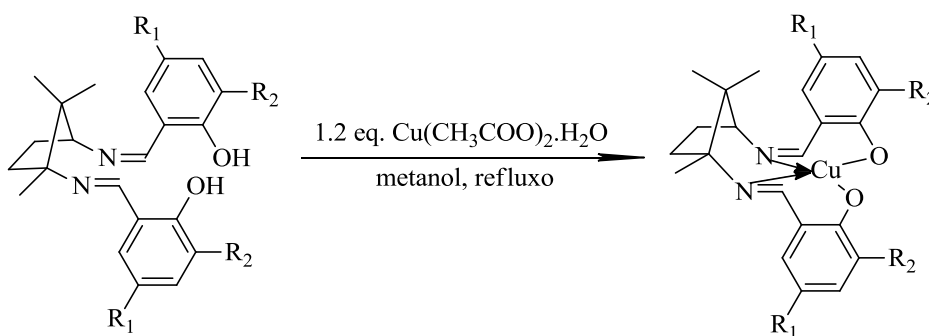
Com as condições acima descritas não se conseguiu reduzir os salens **2.8** e **2.10** aos salans correspondentes. Então, tentaram-se outras condições de reação. Numa primeira tentativa, aumentou-se o tempo de reação para 24h. Numa segunda tentativa, utilizou-se 10 equivalentes de boro-hidreto de sódio, e após a adição a 0°C, colocou-se a reação à temperatura de refluxo, durante 24h. No entanto, em nenhum destes casos se obteve o produto pretendido.

Uma alternativa ao boro-hidreto de sódio, na redução dos respetivos salens, passaria pela utilização de hidreto de alumínio e lítio, porém, por limitações de tempo, não foi possível tentar esta alternativa.

## 2.5. Síntese de Complexos de Cu(II) Derivados do Ácido (+) canfórico

Após a síntese dos salens **2.6-2.10** e dos salans **2.11-2.13**, foram preparados os respectivos complexos de Cu(II). Embora os complexos de Cu(II) de **2.6** e **2.9** já tenham sido anteriormente preparados no grupo de investigação, os salans correspondentes ainda não tinham sido sintetizados. Assim, **2.6** e **2.9** foram preparados para redução aos salans correspondentes **2.11** e **2.13**, para a posterior complexação com Cu(II).

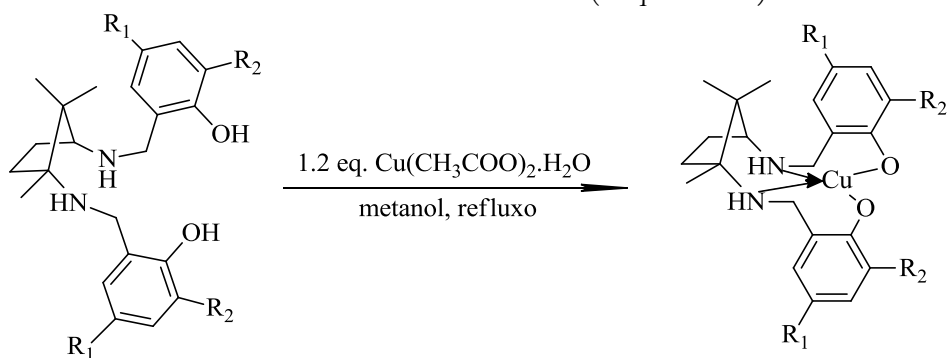
Para a síntese dos complexos de Cu(II), fez-se reagir 1 equivalente do ligando com 1.2 equivalentes de  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  em metanol. As reações ocorreram em refluxo, durante 2h a 3h. Usou-se excesso de metal, de modo a simplificar o processo de purificação. Verificou-se que o acetato de cobre mono-hidratado não é solúvel em diclorometano, ao contrário do complexo metálico, que é. Assim, para purificar o complexo dissolveu-se o sólido obtido por evaporação do metanol, em diclorometano e filtrou-se o excesso de sal metálico. O complexo metálico **2.15** precipitou diretamente em metanol, não havendo necessidade de tomar o sólido em diclorometano. Recorreu-se ao TLC para averiguar a existência de excesso de ligando e/ou metal. Os produtos obtidos (**2.14-2.16**) foram, depois, confirmados por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS). Obtiveram-se sólidos de cor castanha escura nas sínteses realizadas, com rendimentos entre 58% e 95% (Esquema 2.3).



Complexo de Cu(II)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Rendimento
<b>2.14</b>	Cl	H	95 %
<b>2.15</b>	Cl	Cl	58 %
<b>2.16</b>	Br	Br	87 %

**Esquema 2.3.** Esquema representativo da síntese dos complexos salen halogenados de Cu(II) (**2.13-2.15**) a partir dos ligandos salen correspondentes (**2.7**, **2.8** e **2.10**).

Com o mesmo procedimento, sintetizaram-se os complexos de Cu(II) **2.17-2.19** a partir dos ligandos salan correspondentes (**2.11**, **2.12** e **2.13**). Estes complexos metálicos são sólidos de cor verde escura e foram obtidos com rendimentos de 53-90% (Esquema 2.4).



Complexo de Cu(II)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Rendimento
<b>2.17</b>	H	H	84 %
<b>2.18</b>	Cl	H	90 %
<b>2.19</b>	Br	H	53 %

**Esquema 2.4.** Esquema representativo da síntese dos complexos salan halogenados de Cu(II) (**2.17-2.19**) a partir dos ligandos salan correspondentes (**2.10**, **2.11** e **2.12**).

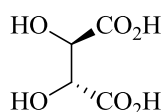


# Capítulo 3

## Síntese de Complexos de Cu(II) Derivados do Ácido *L*-Tartárico

Neste capítulo é descrita a segunda parte do trabalho de síntese, a preparação de ligandos salen derivados do ácido *L*-tartárico. Estes ligandos foram posteriormente complexados com Cu, dando origem aos complexos de Cu(II) correspondentes.

O ácido *L*-tartárico (**3.1**), é um composto natural abundante, obtido a partir do depósito da fermentação das uvas e a partir da extração de plantas nas formas de ácido bem como na forma dos respectivos sais de potássio, cálcio ou magnésio.<sup>88</sup> Foi isolado pela primeira vez por Scheele e é um composto utilizado na preparação de bebidas efervescentes e como condimento de comida.<sup>83</sup> É um composto quiral de fácil acessibilidade, sendo largamente utilizado como precursor de ligandos quirais e como agente de resolução uma vez que forma, com racematos, sais diastereoisoméricos facilmente separáveis.<sup>83</sup>

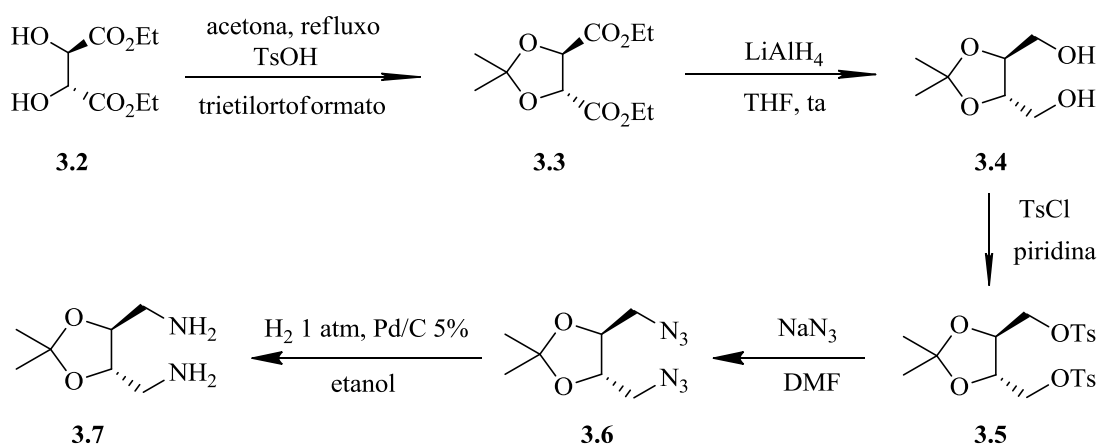


**3.1**

Em primeiro lugar foi sintetizada a diamina derivada do ácido *L*-tartárico. Os ligandos salen foram obtidos através da reação da diamina sintetizada com o salicilaldeído e com os diferentes derivados halogenados de salicilaldeído referidos no capítulo anterior. Posteriormente, foram preparados complexos de Cu(II) dos salens sintetizados.

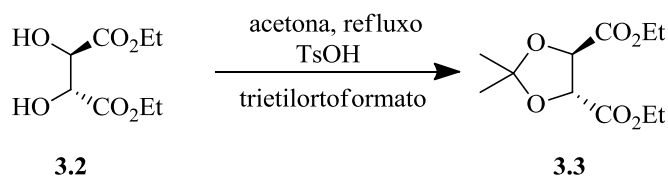
### 3.1. Síntese da Diamina Derivada do Ácido *L*-Tartárico

A diamina do ácido *L*-tartárico, (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diaminobutano, obteve-se a partir de uma seqüência de reações (Esquema 1) tendo como precursor o tartarato de etilo (**3.2**). Todas estas reações já foram realizadas e otimizadas no grupo de Química Orgânica.<sup>83,89</sup> Os compostos resultantes de cada passo da reação foram confirmados por RMN<sup>1</sup>H.



**Esquema 3.1.** Sequência de reações da Síntese de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diaminobutano.

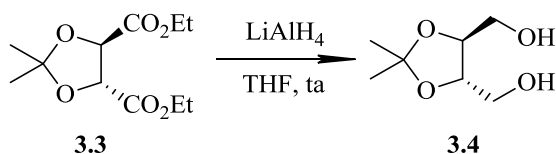
O (*R,R*)-2,3-*O*-Isopropilideno-tartarato de etilo (**3.3**) foi obtido por de proteção dos grupos hidroxilo de **3.2**. Usou-se acetona como reagente e solvente, na presença de ácido *p*-toluenossulfônico. Dada a reversibilidade destas reações usou-se trietilortoformato como elemento de captura de água de forma a tornar a reação menos reversível e apresentar um melhor rendimento. A reação ocorreu em refluxo durante 24 h, tendo-se obtido um óleo acastanhado com rendimento de 93.5%.



**Figura 3.2** Esquema representativo da síntese de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diaminobutano (**3.3**) a partir do tartarato de etilo.

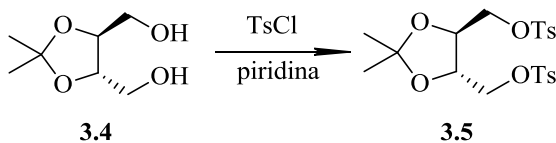
De seguida sintetizou-se o (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-di-hidroxi-butano (**3.4**) a partir de (**3.3**) por reação com hidreto de alumínio e lítio. O solvente utilizado foi THF e a reação ocorreu a temperatura ambiente durante uma noite. O produto **3.4** foi isolado de acordo com o método de Micovic e Mihailovic, que consiste na adição sequencial de quantidades definidas de água, hidróxido

de sódio 15%, e novamente água. Obteve-se um líquido amarelo pálido com um rendimento de 49%.



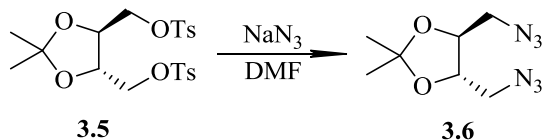
**Figura 3.3.** Esquema representativo da síntese de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-di-hidroxibutano (**3.4**) a partir de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diaminobutano (**3.3**).

Procedeu-se de seguida à síntese de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-ditosiloxibutano (**3.5**) a partir (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-di-hidroxibutano (**3.4**). Nesta etapa, dissolveu-se diol em piridina seca e foi adicionado cloreto de tosilo, a 0°C de forma a evitar uma subida brusca de temperatura que ultrapassasse os 5°C. A reação permaneceu durante uma noite no frigorífico. O cloreto de tosilo foi recristalizado de forma a maximizar o rendimento da reação. O objetivo da transformação é introduzir grupos tosilo que são bons grupos abandonantes, constituindo uma etapa necessária para a seguinte reação. Obteve-se um sólido branco cristalino com rendimento de 50%.



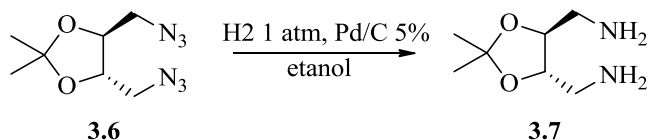
**Figura 2.4.** Esquema representativo da síntese de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-ditosiloxibutano (**3.5**) a partir de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-di-hidroxibutano (**3.4**).

O (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diazidobutano (**3.6**) obteve-se a partir de **3.5**. Depois de dissolvido o composto **3.5** em DMF seca, foi adicionada azida de sódio. A reação ocorreu durante 18h, a 90 °C, em atmosfera inerte. Trata-se de uma reação de substituição nucleofílica para formar uma diazida, por substituição de dois grupos tosilo. Obteve-se um óleo castanho claro com rendimento de 52%.



**Figura 3.5.** Esquema representativo da síntese de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diazidobutano (**3.6**) a partir de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-ditosiloxibutano (**3.5**).

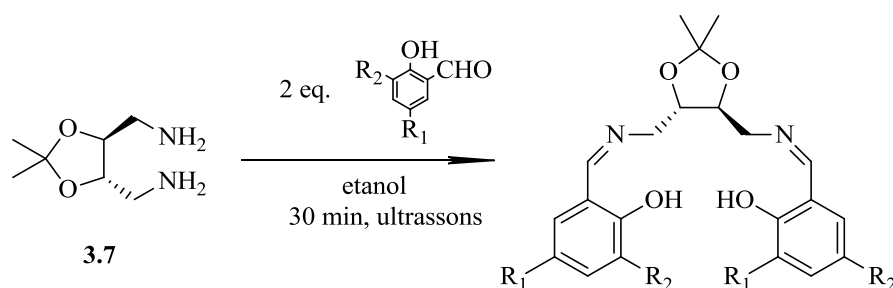
Finalmente, procedeu-se à hidrogenólise de **3.6**, dissolvida em etanol, com Pd/C 5% e 1 atm de H<sub>2</sub>, para dar origem a (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diaminobutano (**3.7**). Obteve-se, assim, um óleo amarelo claro com um rendimento de 87%.



**Figura 2.6.** Esquema representativo da síntese de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diaminobutano (**3.6**) a partir de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diazidobutano (**3.7**).

## 3.2. Síntese de Salens Derivados do Ácido *L*-Tartárico

Obtida a diamina **3.7**, sintetizaram-se os ligandos salen **3.8** e **3.9**, usando um procedimento idêntico ao descrito na secção 2.3 do Capítulo 2. Reagiu-se 1 equivalente de diamina com 2 equivalentes de salicilaldeído e derivados halogenados durante 30 minutos, sob ultrassons, para dar origem a **3.8** e **3.9**. Os ligandos, de cor amarela foram confirmados por RMN<sup>1</sup>H, com rendimentos ente 9% e 83% (Esquema 3.2).



Salen	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Rendimento
<b>3.8</b>	H	H	9 %
<b>3.9</b>	Cl	Cl	83 %

**Esquema 3.2.** Esquema representativo da síntese de (*2S, 3S*)-*N,N'*-bis[salicilideno]-1,4-diaminobutano-2,3-*O*-isopropilideno (**3.8**) e seus derivados halogenados (**3.8** e **3.9**).

Nas nossas condições, para a síntese de salens, não foi possível obter de forma pura os salens pretendidos. O processo de isolamento por cromatografia em coluna não possibilitou o isolamento dos salens, pois poderá ter acontecido hidrólise no decorrer do processo. Inicialmente pensou-se que poderia haver ser um problema de solubilidade adequada em eluentes de AcOEt/hexano para a realização da cromatografia, no entanto, tentou-se com eluentes de AcOEt/diclorometano em que a



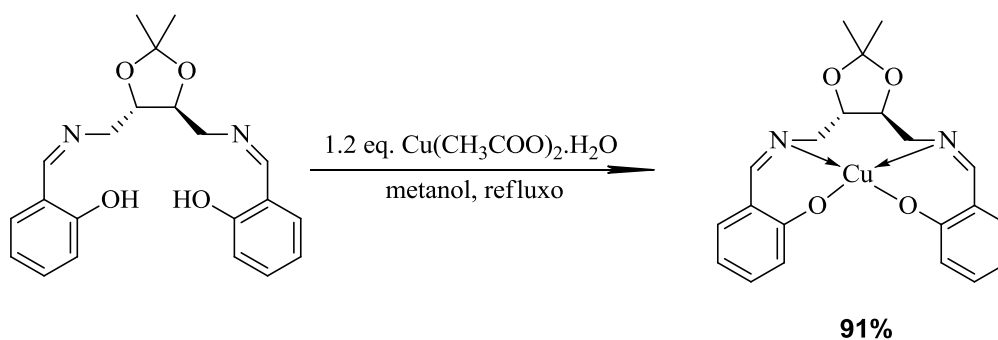
solubilidade foi adequada, e não foi possível isolar os salens com sucesso. Contudo, o isolamento dos salens **3.8** e **3.9** foi bem sucedido e, de alguma forma poderá estar relacionado com a estabilidade que diferentes substituintes nos anéis aromáticos poderão conferir às respectivas iminas. Ainda assim, o salen **3.8** apresentou alguma ineficiência na reação, dado o baixo rendimento e o seu isolamento foi realizado através de uma filtração, dada a solubilidade da diamina **3.7** e do salicilaldeído em metanol, ao contrário dos outros derivados de salicilaldeído.

### 3.3. Síntese de Complexos de Cu(II) Derivados do Ácido *L*-Tartárico

Após a síntese dos ligandos salen, foi tentada a sua complexação com Cu(II). Com o mesmo procedimento descrito no sub-capítulo 2.5 sintetizou-se com sucesso complexo de Cu(II) **3.10**. A formação do complexo foi acompanhada da precipitação de ambos no solvente utilizado, o metanol. A formação foi acompanhada e confirmada por TLC. Obteve-se um sólido castanho com um rendimento de 91%.

A complexação do ligando salen (*2S, 3S*)-*N,N'*-bis[3,5-diclorosalicilideno]-1,4-diaminobutano - 2,3-*O*-isopropilideno com Cu(II) não se conseguiu realizar com sucesso. Obteve-se um sólido muito pouco solúvel em água ou qualquer solvente orgânico. Por TLC, verificou-se que o ligando não foi totalmente consumido, mesmo com excesso de metal.

Por limitações de tempo não foi possível fazer tentativas adicionais de síntese do complexo pretendido.



**Esquema 3.3.** Esquema representativo da síntese do complexo salen de Cu(II) (**3.10**) a partir do ligando salen correspondente (**3.8**).



# Capítulo 4

## *E*studos *in vitro*

Os complexos salen halogenados de Cu(II) derivados do ácido (+)-canfórico **2.14** (diclorado), **2.15** (tetraclorado) e **2.16** (tetrabromado) foram sujeitos a estudos de citotoxicidade e comparados com o complexo não halogenado de Cu(II) (**1.45**) e com o complexo dibromado de Cu(II) (**1.47**) previamente estudados e disponíveis na literatura.<sup>71,79</sup> Estes estudos *in vitro* incluíram a determinação do efeito dos complexos na proliferação celular das linhas celulares WiDr e LS1034 (cancro do cólon) e MCF-7 e HCC1806 (cancro da mama). Para além disso, incluíram também a avaliação da viabilidade celular e do ciclo celular após exposição ao composto que apresentou um efeito mais promissor na inibição da proliferação celular nas mesmas linhas celulares.

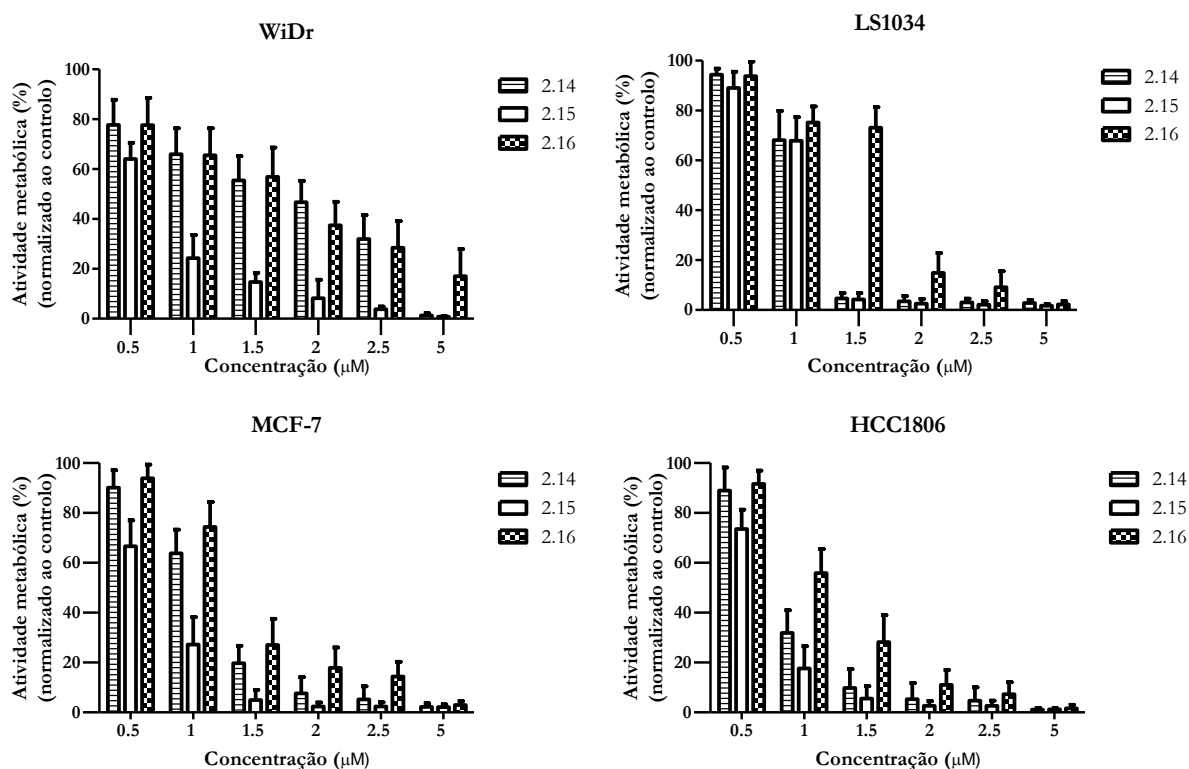
### 4.1. Determinação da Proliferação Celular

A avaliação da proliferação celular foi realizada através do estudo da atividade metabólica, por colorimetria, através do ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), que possibilita medir as células metabolicamente ativas, através da quantificação de cristais formazano produzidos, pois existe uma relação de proporcionalidade direta entre a quantidade de cristais e a atividade metabólica das células. Este ensaio possibilitou a obtenção de valores de proliferação celular, em percentagem, relativamente às culturas celulares incubadas em condição controlo.

As culturas celulares foram incubadas com concentrações crescentes do complexo diclorado de Cu(II) **2.14**, do complexo tetraclorado de Cu(II) **2.15** e do complexo tetrabromado de Cu(II) **2.16**

cujos valores de concentração variaram entre 0.5 e 5  $\mu\text{M}$ , para os três complexos metálicos. O tempo de incubação foi de 48h. Para a realização das experiências e obtenção dos dados foi necessário um controle, correspondendo este às células que não foram sujeitas à ação dos compostos, sendo tratadas apenas com o solvente dos complexos metálicos (DMSO), às quais se atribuiu o valor de proliferação celular de 100%.

Através da análise da Figura 4.1, verifica-se que os complexos de Cu(II) em estudo induzem efeito citotóxico nas quatro linhas celulares, dada a diminuição da atividade metabólica com o aumento da concentração. É também possível verificar que o complexo de Cu(II) tetraclorado (**2.15**) tem um efeito citotóxico muito evidenciado comparativamente aos restantes complexos em estudo. Nota-se que, de uma maneira geral, o complexo de Cu(II) diclorado (**2.14**) é mais citotóxico que o complexo tetrabromado (**2.16**). Na linha celular LS1034, existe uma diminuição acentuada da atividade metabólica da concentração 1 para 1.5  $\mu\text{M}$ , à exceção de **2.16**.

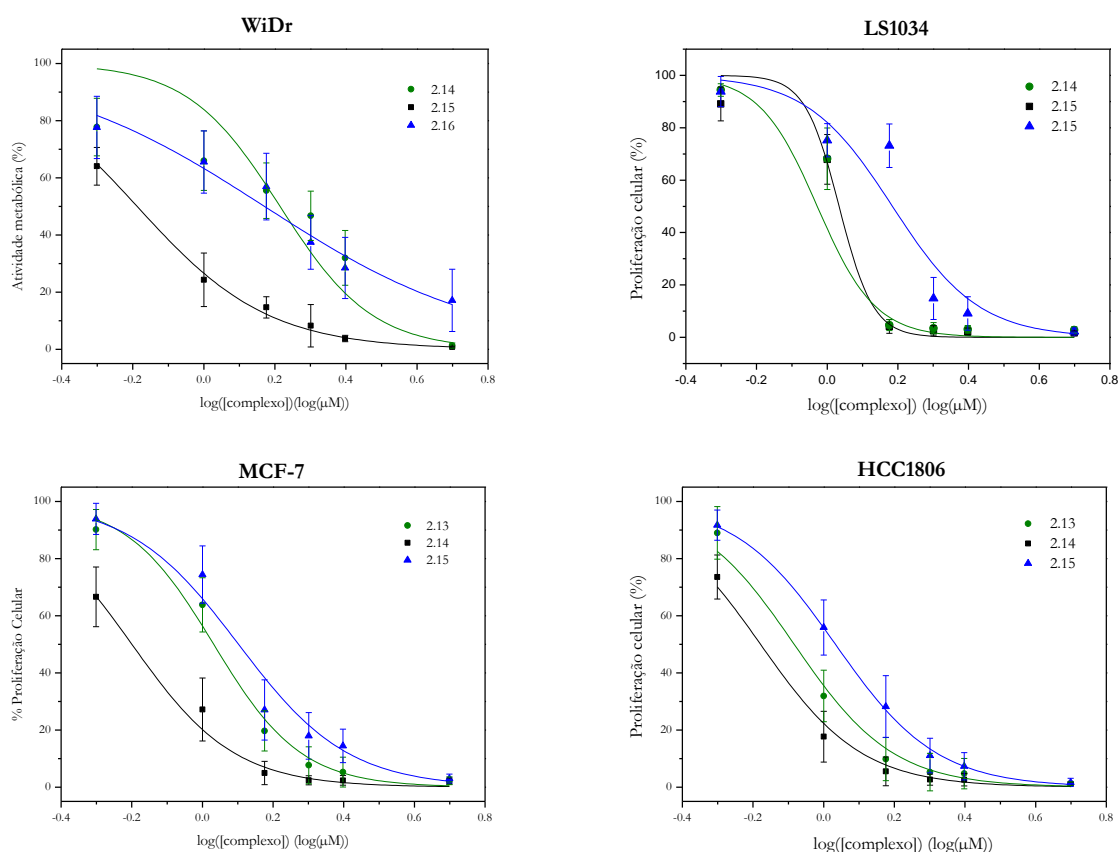


**Figura 4.1.** Avaliação da atividade metabólica nas linhas celulares em estudo após 48h de incubação com uma gama de concentrações (0.5-5 $\mu\text{M}$ ) dos complexos de Cu(II) diclorado (**2.14**), tetraclorado (**2.15**) e tetrabromado (**2.16**). Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado ( $n \geq 6$ ).

Os valores percentuais obtidos permitiram traçar as curvas dose-resposta obtidas para as linhas celulares tumorais, que foram calculadas recorrendo ao *software* OriginPro v. 8.5, o qual através do processamento dos resultados obtidos possibilitou a obtenção da curva de melhor ajuste aos resultados experimentais (Figura 4.2). Assim, foi possível determinar os valores de  $\text{IC}_{50}$  dos três

complexos de Cu(II), ou seja, a concentração de composto necessária para inibir 50% da proliferação celular, cujos valores estão apresentados na Tabela 4.1.

Através da análise da Figura 4.2, é possível concluir que os três complexos metálicos induzem inibição da atividade metabólica. O complexo **2.15** é o que apresenta um efeito mais notório ao nível da inibição da proliferação celular, sendo evidenciado pelas curvas dose-resposta nas linhas celulares WiDr, MCF-7 e HCC1806. Para a linha celular LS1034, o complexo **2.14** é o que apresenta melhor atividade antiproliferativa. Através das curvas obtidas também é possível concluir que não existem diferenças nos efeitos induzidos pelos complexos de Cu dependentes do tipo de cancro.



**Figura 4.2.** Curvas dose-resposta referentes à percentagem de atividade metabólica das quatro linhas celulares tumorais WiDr, LS1034, MCF-7 e HCC1806 em resposta à incubação com três complexos halogenados de Cu(II): diclorado (**2.14**), tetraclorado (**2.15**) e tetrabromado (**2.16**), durante 48h. Os resultados expressam a média e o desvio-padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado ( $n \geq 6$ ).

A Tabela 4.1 apresenta os valores de  $IC_{50}$  dos três complexos sintetizados e em estudo, bem como os valores de  $IC_{50}$  dos complexos de Cu(II) estudados previamente (estruturas estão representadas no Capítulo 1) após administração às mesmas linhas celulares tumorais, durante 48h. Os coeficientes de determinação das curvas de ajuste ( $r^2$ ) também são apresentados.

Verifica-se que os complexos halogenados de Cu(II) são mais eficazes que o não halogenado, na inibição da proliferação celular das linhas WiDr e MCF-7, pois apresentam uma gama de valores de IC<sub>50</sub> entre 0.65 µM e 1.64 µM para a linha WiDr e 1.26 µM e 0.63 µM para a linha LS1034, enquanto o complexo não halogenado de Cu(II) apresenta um valor de 4.29 µM e 4.66 µM, respetivamente.

Dentro dos complexos halogenados de Cu(II), o complexo tetraclorado de Cu(II) **2.15** é o mais citotóxico nas linhas WiDr, MCF-7 e HCC1806, com valores de IC<sub>50</sub> 0.65 µM, 0.63 µM e 0.66 µM, respetivamente. O complexo diclorado de Cu(II) **2.14** demonstra ser o mais eficaz na inibição da proliferação celular da linha celular quimiorresistente LS1034, com um valor de IC<sub>50</sub> de 0.94 µM que, é um valor inferior aos obtidos nas linhas MCF-7 e WiDr, sendo que a última é a mais resistente a este complexo. O complexo dibromado de Cu(II) **1.46** demonstra ser o segundo complexo mais citotóxico nas linhas WiDr e MCF-7 com valores de IC<sub>50</sub> de 1.24 µM e 0.95 µM, respetivamente, contudo é menos efetivo que o complexo tetrabromado de Cu(II) **2.16**, para as linhas LS1034 e HCC1806. A gama de valores de IC<sub>50</sub> é maior para os complexos bromados de Cu(II) com valores entre 0.94 µM e 2.32 µM comparativamente ao complexos clorados de Cu(II) com valores entre 0.63 µM e 1.64 µM.

**Tabela 4.1.** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos após a incubação das linhas celulares WiDr e MCF-7 com **1.44**, **1.46**, **2.14**, **2.15** e **2.16** e LS1034 e HCC1806 com **1.46**, **2.14**, **2.15** e **2.16**, durante 48h. Estão também representados os valores de r<sup>2</sup> associados.<sup>71</sup>

Linha celular	Complexo não halogenado de Cu(II) <b>1.45</b>		Complexo dibromado de Cu(II) <b>1.47</b>		Complexo diclorado de Cu(II) <b>2.14</b>		Complexo tetrabromado de Cu(II) <b>2.16</b>		Complexo tetraclorado de Cu(II) <b>2.15</b>	
	IC <sub>50</sub> (µM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µM)	r <sup>2</sup>
WiDr	4.29	0.97	1.24	0.95	1.64	0.9	1.48	0.96	0.65	0.99
LS1034	--	--	2.32	1	0.94	0.98	1.52	0.96	1.09	0.94
MCF-7	4.66	0.99	0.95	0.97	1.07	0.98	1.26	0.99	0.63	0.89
HCC1806	--	--	1.28	0.75	0.82	0.97	1.07	0.99	0.66	0.94

A Tabela 4.2 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> obtidos da determinação da atividade metabólica após incubação das células WiDr e MCF-7 com os atuais fármacos convencionais usados no tratamento do cancro colorretal e cancro da mama, bem como os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para o

complexo de Cu(II) que demonstrou ser o mais eficaz na inibição da proliferação celular – o tetraclorado **2.15**.

Verifica-se que os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para **2.15** são inferiores ao do 5-FU (86.96 µM) e à da cisplatina (18 µM), nas linhas celulares WiDr e MCF-7, respetivamente. Apesar dos dados de IC<sub>50</sub> da cisplatina se referirem a uma incubação das células MCF-7 durante 96h, a comparação torna-se plausível dado que o efeito citotóxico da cisplatina nas mesmas células em 48h por lógica seria menos evidenciado. No entanto, o valor de IC<sub>50</sub> de **2.15** é superior ao da epirrubicina (0.32 µM), no tratamento da linha MCF-7.

**Tabela 4.2.** Valores de IC<sub>50</sub> para a incubação das linhas celulares WiDr e MCF-7 com o complexo tetraclorado de Cu(II) (**2.15**), durante 48h e com fármacos de quimioterapia convencional.

a: incubação de WiDr com 5-FU, durante 48h;<sup>71</sup>

b: incubação de MCF-7 com cisplatina, durante 96h;<sup>69</sup>

c: incubação de MCF-7 com epirrubicina, durante 48h.<sup>71</sup>

Linha celular	<b>2.15</b>		Quimioterapia convencional	
	IC <sub>50</sub> (µM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µM)	r <sup>2</sup>
<b>WiDr</b>	0.65	0.99	86.96 <sup>a</sup>	0.86
<b>MCF-7</b>	0.63	0.89	18 <sup>b</sup>	--
			0.32 <sup>c</sup>	0.93

De acordo com os dados obtidos, apenas o complexo tetraclorado de Cu(II) **2.15** foi escolhido para a realização dos estudos sobre o efeito que este composto provoca na viabilidade celular e no ciclo celular das quatro linhas celulares tumorais em estudo.

Os resultados são apresentados nos subcapítulos seguintes.

## 4.2. Avaliação da Viabilidade Celular

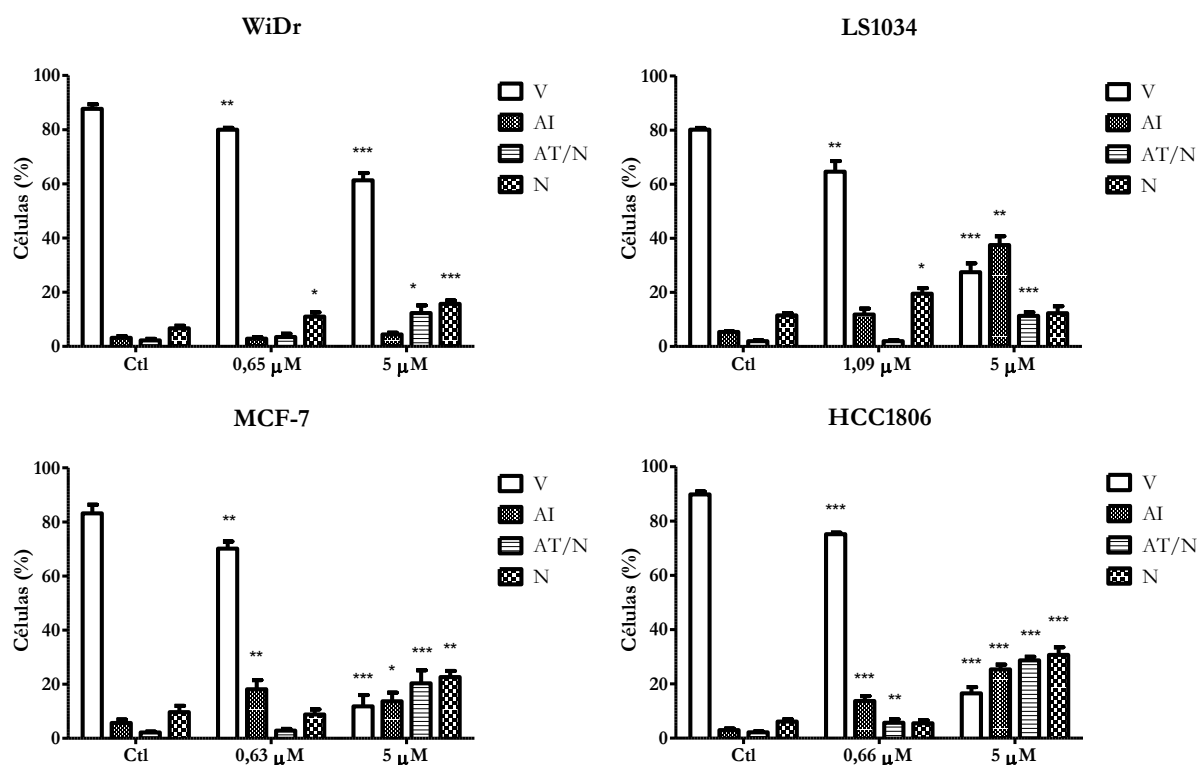
A viabilidade celular foi avaliada a partir da dupla marcação com AnV e IP por citometria de fluxo. A marcação diferencia as populações celulares existentes em células viáveis (V), células em apoptose inicial (AI), células em apoptose tardia/necrose (AT/N) e células em necrose (N). Assim, foi possível avaliar o tipo de morte celular induzido nas células quando estas são expostas a **2.15**, durante 48h. Nesse intervalo de tempo, as células das quatro linhas celulares foram tratadas sem qualquer administração de composto ou solvente (células controlo), com uma concentração de **2.15** correspondente ao seu IC<sub>50</sub> (variável em cada linha) e com a concentração de 5 µM (fixa para todas as linhas celulares). A Figura 4.3 apresenta os resultados dos estudos de viabilidade celular efetuados. Estes estudos revelaram, em primeira análise, que o aumento da concentração do complexo metálico induz diminuição da percentagem de células viáveis em todas as linhas celulares.

Na linha celular WiDr, a população de células viáveis é cerca de 88% no controlo, verificando-se uma diminuição das mesmas em cerca de 8% aquando da incubação com a concentração 0.65  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) de **2.15** ( $p=0.001$ ), e em cerca de 28% para as que foram incubadas com concentração de 5  $\mu\text{M}$  ( $p<0.001$ ). Não se verificam alterações estatisticamente significativas relativamente à percentagem de células em apoptose inicial, nas três condições. Quando as células são tratadas com 5  $\mu\text{M}$  de composto, observa-se um aumento da população celular em apoptose tardia/necrose em relação ao controlo ( $p=0.012$ ) e ao tratamento com 0.65  $\mu\text{M}$  ( $p=0.040$ ). Podemos também observar um aumento em 5% e em 9% da população de células em necrose em relação ao controlo, quando incubadas com 0.65  $\mu\text{M}$  ( $p=0.022$ ) e com 5  $\mu\text{M}$  ( $p<0.001$ ), respetivamente.

Na linha celular quimiorresistente LS1034, a população de células viáveis é de aproximadamente 80% no controlo, e verifica-se uma diminuição em cerca de 15% quando tratadas com 1.09  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) de **2.15** ( $p=0.001$ ) e de 53% quando tratadas com 5  $\mu\text{M}$  de **2.15** ( $p<0.001$ ). Com esta mesma concentração, há um aumento significativo das células em apoptose inicial, com diferenças significativas em relação ao controlo ( $p<0.001$ ) e à concentração intermédia ( $p=0.001$ ), e um aumento em cerca de 9% do número de células em apoptose tardia/necrose ( $p<0.001$ ), em relação ao controlo. A incubação das células com 1.09  $\mu\text{M}$  de **2.15** não resulta em diferenças estatisticamente significativas das populações de células em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose em relação ao controlo, contudo, para a mesma concentração observa-se um aumento de 8% da população de células em necrose em relação ao controlo ( $p=0.025$ ), que diminui em aproximadamente 7% quando são tratadas com 5  $\mu\text{M}$  ( $p=0.042$ ).

A população de células viáveis na linha celular MCF-7 no controlo é cerca de 83%, e é reduzida em 13% quando tratadas com 0.63  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) de **2.15** ( $p=0.006$ ). Esta população celular diminui significativamente relativamente ao controlo em cerca de 71%, quando incubada com 5  $\mu\text{M}$  de **2.15** ( $p<0.001$ ). A população de células em apoptose inicial aumenta em cerca de 2% quando as células são tratadas quer com 0.63  $\mu\text{M}$  ( $p=0.003$ ) quer com 5  $\mu\text{M}$  ( $p=0.035$ ) de **2.15**, não existindo diferenças estatisticamente significativas desta população entre as duas condições de tratamento. Na população de células em apoptose tardia/necrose, não existe significado estatístico entre a população no controlo e a população após incubação com 0.63  $\mu\text{M}$  de **2.15**, contudo, a incubação com 5  $\mu\text{M}$  resulta num aumento significativo desta população de células em relação ao controlo ( $p<0.001$ ). Um comportamento semelhante se verifica para a população de células em necrose, com o aumento de 13% do número de células em necrose da condição controlo para a condição de tratamento com 5  $\mu\text{M}$  ( $p=0.025$ ).





**Figura 4.3.** Avaliação da viabilidade celular. Os resultados estão representados em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N), após 48 h de incubação sem tratamento (Ctl) e com tratamento com diferentes concentrações (IC<sub>50</sub> e 5 μM) do complexo tetraclorado **2.15**, para as linhas celulares WiDr, LS1034, MCF-7 e HCC1806. Os resultados expressam a média e o erro-padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado (n≥6). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas por: \* para p<0.05; \*\* para p<0.01; \*\*\* para p<0.001.

Na linha celular HCC1806, observa-se 90% das células viáveis no controlo, uma população que diminui aproximadamente 14% quando estas são expostas a 0.66 μM (IC<sub>50</sub>) de **2.15** (p<0.001) e cerca de 73% quando tratadas com 5 μM (p<0.001). O tratamento das células com 0.66 μM de **2.15** traduz-se num aumento em cerca de 11% da população de células em apoptose inicial (p<0.001) e de cerca de 4% da população de células em apoptose tardia/necrose (p=0.002), em relação ao controlo. O aumento destas populações em relação ao controlo é também significativo, quando as células são tratadas com 5 μM de **2.15** (p<0.001, em ambos os casos). Com esta condição de tratamento também se verifica uma população de células em necrose cerca de 5 vezes superior à mesma população no controlo (p<0.001). Não existem diferenças estatisticamente significativas entre a população de células em necrose no controlo e quando tratadas com 0.66 μM.

Comparando os resultados obtidos entre as quatro linhas em estudo após tratamento com 5 μM de **2.15** verifica-se que a linha celular WiDr, curiosamente, apresenta um número significativamente maior de células viáveis, comparativamente com as células LS1034 (p=0.016), HCC1806 (p<0.001) e MCF-7 (p<0.001), evidenciando ser a menos sensível ao complexo. A linha LS1034 apresenta uma percentagem de células em apoptose inicial cerca de 1.5 vezes maior que a

população da linha HCC1806 ( $p=0.006$ ), e significativamente maior que a mesma população celular das linhas MCF-7 ( $p<0.001$ ) e WiDr ( $p<0.001$ ). Nestas condições, a população de células em apoptose tardia/necrose é superior na linha HCC1806, apresentando significância estatística relativamente às linhas WiDr ( $p=0.018$ ) e LS1034 ( $p=0.007$ ). Relativamente à população de células em necrose, a linha LS1034 apresenta um número de células próximo à da população na linha WiDr, mas muito inferior às das linhas MCF-7 ( $p=0.021$ ) e HCC1806 ( $p<0.001$ ).

### 4.3. Avaliação do Ciclo Celular

Com o propósito de verificar qual a fase em que as células das linhas celulares se encontram após exposição ou não ao tratamento com **2.15**, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo com a marcação com IP/RNAase. Este estudo serve de complemento aos estudos de citotoxicidade anteriormente efetuados. Os resultados estão representados na Figura 4.4.

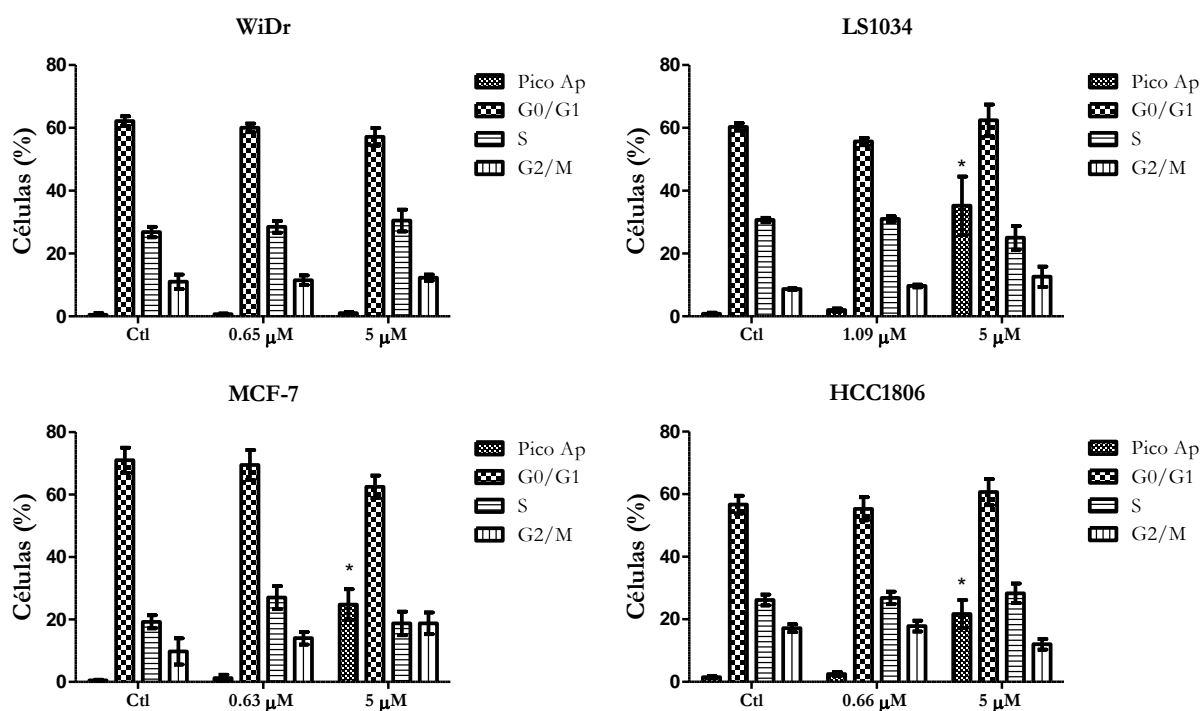
Na linha celular WiDr, verifica-se a ausência de pico apoptótico (pico ap) nas células controlo bem como na população de células sujeitas à ação das duas concentrações de **2.15**. Nas 3 condições, a população de células em fase G0/G1 é aproximadamente 60%, a população de células em fase S é próximo de 30% e a população de células em fase G2/M é cerca de 10%. Não existem variações estatisticamente significativas entre as populações de células em cada fase, nas condições consideradas.

Na linha celular LS1034, todos os resultados para a incubação das células com 5  $\mu\text{M}$  de **2.15** são considerados preliminares ( $n=5$ ). Nesta linha, verifica-se um aumento significativo do pico apoptótico, no tratamento das células com 5  $\mu\text{M}$  de **2.15**, em relação ao controlo, ( $p<0.001$ ), facto que não se verifica quando são tratadas com valor correspondente ao seu  $\text{IC}_{50}$ , não apresentando significado estatístico em relação ao controlo. Nas 3 condições, a população de células em fase G0/G1 é aproximadamente 60%, a população de células em fase S aproxima-se de 30% e a população de células em fase G2/M ronda os 10%. As pequenas alterações verificadas não apresentam significado estatístico.

Na linha celular MCF-7, observa-se um aumento significativo do pico apoptótico quando as células são sujeitas a 5  $\mu\text{M}$  de **2.15** em relação às células controlo ( $p<0.001$ ) e às células tratadas com 0.63  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) ( $p=0.001$ ). A população de células em fase G0/G1 é aproximadamente 70% na condição controlo e nas células incubadas com 0.63  $\mu\text{M}$ , havendo um ligeiro decréscimo no tratamento com 5  $\mu\text{M}$  de **2.15**. A população de células em fase S é próxima de 19%, no controlo e para a concentração de 5  $\mu\text{M}$ , sendo que no tratamento com 0.63  $\mu\text{M}$  o número de células nesta fase sobe cerca de 8%. As variações da população de células em fase G2/M com o aumento da concentração não são estatisticamente significativas.

Na linha celular HCC1806, há um aumento significativo do pico apoptótico nas células incubadas com 5  $\mu\text{M}$  de **2.15** em relação ao controlo ( $p < 0.001$ ) e em relação às células tratadas com a concentração correspondente ao  $\text{IC}_{50}$  ( $p = 0.001$ ). A população de células em fase G0/G1 é ligeiramente inferior a 60% na condição controlo e nas células incubadas com 0.66  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ), ascendendo a 61% no tratamento com 5  $\mu\text{M}$  de **2.15**. O número de células em fase S é muito próximo, nas três condições, não existindo variações com significado estatístico. A população de células em fase G2/M diminui com o tratamento de 5  $\mu\text{M}$  de **2.15**, em cerca de 5% em relação às células tratadas com 0.66  $\mu\text{M}$  ( $p = 0.026$ ), que apresenta o mesmo número de células nesta fase comparativamente ao controlo.

Estabelecendo uma comparação entre linhas celulares observa-se que em todas elas, na condição controlo, não existe pico apoptótico. A população de células em G0/G1 é próxima nas 4 linhas, não apresentando diferenças estatisticamente significativas. A população de células em fase S é maior na linha LS1034, sendo ligeiramente superior a WiDr e HCC1806 ( $p = 0.003$ ) e cerca de 10% superior a MCF-7 ( $p = 0.045$ ). A população de células em G2/M é superior em MCF-7, apresentando significado estatístico em relação à população de células na mesma fase na linha LS1034 ( $p = 0.045$ ).



**Figura 4.4.** Avaliação do ciclo celular. Os resultados estão representados em percentagem (%) de células em cada uma das fases do ciclo celular, 48 h de incubação sem tratamento (Ctl) e com tratamento com diferentes concentrações ( $\text{IC}_{50}$  e 5  $\mu\text{M}$ ) do complexo tetraclorado **2.15**, para as linhas celulares WiDr, LS1034, MCF-7 e HCC1806. Os resultados expressam a média e o erro-padrão de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado ( $n \geq 6$ ), à exceção da linha LS1034 ( $n = 5$ ). As diferenças significativas em relação ao controlo estão representadas por \* para  $p < 0.001$ .

No tratamento das células com o respetivo IC<sub>50</sub> de **2.15**, não se verificam alterações significativas do pico apoptótico entre as 4 linhas. Também não existem variações significativas estatisticamente nas populações em fase G0/G1 e em fase S nas linhas em estudo. O mesmo é observável para as populações de células em fase G2/M, contudo a população na linha MCF-7 é significativamente superior em relação às restantes ( $p=0.010$ ).

Na incubação das células com 5  $\mu$ M, a única diferença estatisticamente significativa entre as linhas celulares é o aumento significativo do pico apoptótico nas linhas LS1034 ( $p<0.001$ ), MCF-7 ( $p<0.001$ ) e HCC1806 ( $p=0.001$ ) em relação à linha WiDr. Nas populações de células nas diferentes fases do ciclo celular, não existem diferenças estatisticamente significativas assinaláveis, na comparação das 4 linhas.

#### 4.4. Discussão dos Resultados obtidos nos Estudos *in vitro*

Como referido na introdução, os fármacos utilizados no tratamento do cancro colorretal e do cancro da mama apresentam múltiplos efeitos adversos e de uma forma comum a todos eles, desenvolvimento de resistência pelas células tumorais ao tratamento por quimioterapia. Deste modo, é responsabilidade da área científica desenvolver e investigar novas opções quimioterapêuticas menos tóxicas para os doentes, diminuindo o potencial risco de mortalidade e morbidade quando sujeitos a tratamento por quimioterapia. O combate à quimiorresistência é outra preocupação aquando da formulação de um novo princípio ativo. Assim, o objetivo primordial do presente trabalho passou pela síntese de complexos de Cu que oferecessem vantagens não só aos complexos de Pt utilizados, bem como aos restantes fármacos usados no tratamento do cancro colorretal e do cancro de mama.

A determinação da atividade metabólica permitiu concluir que o complexo tetraclorado de Cu(II) **2.15** é o que tem um efeito mais notório na inibição da proliferação das linhas celulares tumorais em estudo, à exceção da linha LS1034, facto que pode ser devido à sua principal característica – a quimiorresistência por aumento de expressão de uma proteína de efluxo (glicoproteína-P).<sup>90</sup> O composto mais citotóxico nesta linha celular é o complexo diclorado de C(II) **2.14**, contudo, a diferença entre o seu efeito e o efeito antiproliferativo induzido pelo **2.15** é muito semelhante. O valor de IC<sub>50</sub> para esta linha celular, quando incubada com **2.15**, durante 48h aproximadamente 1.7 vezes superior aos valores obtidos para as outras linhas em estudo. Para as linhas celulares WiDr, MCF-7 e HCC1806, **2.15** apresenta valores de IC<sub>50</sub> na ordem de grandeza submicromolar, uma ordem de grandeza inferior aos restantes complexos metálicos, de um modo geral. A resposta destas três linhas celulares ao complexo **2.15** é muito semelhante o que sugere que o efeito do complexo metálico é independente do tipo de cancro. Por outro lado, depois de

verificado o efeito antiproliferativo do complexo **2.15** é deveras importante avaliar até que ponto esse efeito se traduzirá também num efeito citotóxico com indução de morte celular, resultados discutidos adiante.

Um dos objetivos desta dissertação passa por verificar o efeito da presença de átomos de halogéneo numa determinada estrutura ativa. O efeito causado pela presença deste tipo de átomos nas estruturas dos complexos de Cu(II) está saliente quando os valores de IC<sub>50</sub> obtidos são comparados (Tabela 4.1), pois os complexos halogenados apresentam um efeito antiproliferativo 3 a 6 vezes mais eficiente que o complexo não halogenado de Cu(II), previamente estudado. A justificação para o efeito causado pela presença de átomos de halogéneo nestas estruturas ativas pode residir nas características lipofílicas que este tipo de átomos podem atribuir aos complexos metálicos, facilitando assim a permeabilidade da membrana celular e conseqüente interação com o alvo biológico.<sup>80</sup> Uma estratégia para validar esta justificação seria a realização de estudos de captação celular, em que se poderia recorrer à técnica de espectroscopia de absorção atômica como modo de quantificar o complexo metálico que permeia para o interior das células. O tipo de halogéneo também pode ser importante, visto que as estruturas cloradas apresentam, de uma forma geral, um efeito antiproliferativo mais expressivo, tendo em conta que a gama de valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os complexos clorados de Cu(II) foi mais baixa que a dos complexos bromados de Cu(II). A influência do número de átomos de cloro na capacidade antiproliferativa das células tumorais é evidenciada quando os resultados dos complexos **2.14** e **2.15** são comparados. A presença de 4 cloros promoveu uma maior inibição da proliferação celular comparativamente à presença de 2 cloros (à exceção da linha LS1034, como já foi discutido no parágrafo anterior). Por outro lado, comparando a influência do número de átomos de bromo pela análise dos resultados obtidos com os complexos **1.46** e **2.16**, o mesmo não se verifica. Neste caso o complexo com 4 bromos apresentou maior efeito antiproliferativo apenas nas linhas LS1034 e HCC1806, comparativamente ao complexo dibromado de Cu(II). A avaliação da proliferação celular após exposição aos diversos complexos metálicos permitiu também inferir que o seu efeito citotóxico não foi dependente do tipo de cancro, tendo em conta que a resposta inibitória obtida pelas 4 linhas celulares em estudo foi muito semelhante. De salientar que a linha celular do cancro do cólon LS1034 foi a que apresentou maior resistência à maioria dos complexos metálicos, contudo, como supracitado esse facto poderá ser inerente às características da própria linha celular e não ao tipo de cancro.

De uma forma geral, verificou-se que em termos de atividade metabólica, **2.15** apresentou-se como sendo o complexo de Cu(II) mais eficaz, na medida em que induziu um efeito antiproliferativo mais evidente na maioria das linhas celulares. Assim, comparou-se o efeito inibitório do complexo sintetizado com alguns dos atuais e convencionais fármacos usados em quimioterapia para tratamento do cancro colorretal e do cancro da mama. Verificámos que o complexo **2.15** induz uma maior inibição na proliferação celular que o 5-FU e a cisplatina, nas linhas

celulares WiDr e MCF-7, respetivamente. O mesmo não se verificou quando comparado o IC<sub>50</sub> do **2.15** ao da epirrubicina, na medida em que este fármaco apresenta um efeito antiproliferativo 2 vezes superior, após o mesmo tempo de incubação em células MCF-7.

A determinação da atividade metabólica constituiu, assim, a primeira análise dos complexos sintetizados, no entanto, a atividade metabólica é insuficiente para avaliar a citotoxicidade do composto, tendo em conta que a diminuição da atividade metabólica pode não se traduzir em morte celular. Para além disso, um certo composto pode ter um mecanismo de ação que leva as células à morte celular, mas também pode desencadear um efeito que leva as células a pararem metabolicamente e isto pode estar diretamente relacionado com a paragem do ciclo celular. Deste modo, os testes de viabilidade celular e ciclo celular complementam os testes de determinação da proliferação celular, definindo se o composto em estudo é citotóxico ou citostático, ou seja, se o composto causa a morte celular ou proporciona apenas a paragem do metabolismo celular. Como referido, **2.15** foi o que apresentou, de uma maneira geral, uma maior inibição da proliferação celular. Por poupança de recursos e limitação de tempo, apenas este composto foi sujeito a estudos de viabilidade celular e análise do ciclo celular nas quatro linhas celulares em estudo.

Para as quatro linhas celulares verifica-se que o aumento da concentração do complexo tetraclorado de Cu(II) **2.15** resulta na diminuição da viabilidade celular.

A linha do cancro colorretal WiDr foi a que demonstrou maior resistência ao **2.15**, visto que apresenta menor diminuição da população de células viáveis, com o aumento da concentração do composto. A incubação destas células com **2.15** demonstra um perfil necrótico induzido por este complexo metálico. A diminuição da viabilidade celular foi por isso acompanhada pelo aumento das populações de células em apoptose tardia/necrose e necrose, mais evidente quando as células são expostas a 5 µM de **2.15**. Por outro lado, nesta linha celular verificou-se que não houve alteração do número de células em apoptose, facto que é corroborado na análise do ciclo celular pela inexistência de pico apoptótico após o tratamento das células com **2.15** a diferentes concentrações. Para além disso, verificou-se que não há paragem do ciclo celular visto que não existem alterações com significado estatístico nas restantes populações de células com o aumento da concentração de **2.15**.

Um comportamento diferente é observado na linha quimiorresistente LS1034. Nesta linha celular, o perfil da condição controlo é semelhante ao perfil resultante da incubação com IC<sub>50</sub> de **2.15**. Existe uma diminuição do número de células viáveis acompanhado de um ligeiro aumento da população de células em apoptose inicial e em necrose. Contudo, um perfil apoptótico é observado na incubação das células LS1034 com 5 µM de **2.15**. A presença de apoptose após exposição das células LS1034 à maior concentração testada é confirmada pela existência do pico apoptótico na análise do ciclo celular que aumentou de forma significativa em relação ao controlo e ao IC<sub>50</sub>. Em suma, é possível afirmar que quando as células são tratadas com maiores concentrações, estas revelam um perfil apoptótico como consequência da ação do composto. Além disso, a sensibilidade

das células LS1034 ao complexo **2.15** constitui só por si um resultado muito promissor, dada a resistência a fármacos destas células, tornando-o possivelmente um bom candidato para o tratamento de tumores com características semelhantes às desta linha celular.

Na linha de cancro da mama MCF-7, os dados da viabilidade celular indicam que a incubação das células com concentração de **2.15** correspondente ao IC<sub>50</sub> diminui a viabilidade celular e triplica a população das células em apoptose inicial, em relação ao controlo. Este perfil já não se verifica na incubação com 5 µM de **2.15**. Neste caso, verifica-se uma diminuição significativa da viabilidade celular, contudo o tipo de morte predominante é a apoptose tardia/necrose (10 vezes superior à do controlo) e necrose (aproximadamente 2 vezes superior ao controlo). O aumento percentual de células em apoptose tardia/necrose e apoptose inicial quando incubadas com esta concentração é evidenciada pela presença do pico apoptótico, contudo não se verificou um bloqueio do ciclo celular em nenhuma das fases. Portanto, em conclusão, pode dizer-se que nesta linha celular o composto induz as células para a apoptose, porém, concentrações mais elevadas do mesmo conduzem as células igualmente para uma morte mais descontrolada por necrose. Tal como nas linhas celulares supracitadas, afere-se que o complexo **2.15** não induz alterações ao nível do ciclo celular.

Na outra linha de cancro da mama, a HCC1806, verifica-se que a morte celular predominante resultante da incubação com concentrações intermédias é a apoptose. Porém, para concentrações mais elevadas de **2.15**, a viabilidade celular diminui com conseqüente aumento da morte celular por necrose, sendo que existe um perfil semelhante nas células MCF-7, para a mesma condição. Apesar da necrose ser o tipo de morte predominante, observou-se uma elevada percentagem de células em apoptose tardia/necrose e em apoptose inicial. O elevado número de células em apoptose é evidenciado pela existência do pico apoptótico na análise ao ciclo celular. Uma vez mais não se verificou paragem do ciclo celular. O composto acaba por desencadear uma resposta idêntica à observada pelas células MCF-7, isto é, para o tratamento com a concentração correspondente ao IC<sub>50</sub>, a morte celular predominante é apoptose, porém para a incubação com 5 µM de **2.15** há o desencadeamento de uma morte celular predominantemente necrótica, apesar de existir morte celular por apoptose de uma forma considerável. A inexistência de diferenças consideráveis entre estas duas linhas celulares do cancro da mama dá uma conclusão preliminar que o composto é estranho às diferenças existentes entre as duas linhas, ou seja, possivelmente não estabelece interações com os recetores existentes na linha celular MCF-7 e ausentes em HCC1806.

Como referido na introdução, apoptose e necrose são dois tipos de morte celular. Enquanto a apoptose é um tipo de morte celular programado extremamente regulado, a necrose resulta de estímulos ou agentes nocivos que causam nas células uma lesão irreparável, em que ocorre libertação do conteúdo celular da célula, levando a uma reação inflamatória local.<sup>19,20</sup> É fácil perceber que o efeito ideal desencadeado nas células quando incubadas com um certo composto seja um estímulo que proporcione, de forma controlada, a morte celular, ou seja, por outras palavras, que promova a

apoptose, pois este tipo de morte celular normalmente não induz inflamação e é o tipo de morte adequado para a renovação celular. O alvo clássico dos complexos metálicos é o DNA. Como referido no Capítulo 1, alguns complexos de Cu apresentam novos alvos, contudo o DNA é comum e continua a ser o principal.<sup>48</sup> A formação de adutos entre o centro metálico e o DNA é responsável pelas alterações e consequente perda de integridade do ácido nucleico. Esta ação constitui um estímulo para a célula desencadear os mecanismos da apoptose.

À exceção da linha WiDr, as linhas LS1034, MCF-7 e HCC1806 apresentam pico apoptótico quando tratadas com 5  $\mu$ M de **2.15**, o que significa que há presença de corpos apoptóticos, que são produtos formados pelo processo de apoptose. Este fato poderia ser mais concretamente analisado com recurso à microscopia com a avaliação morfológica pelo método May–Grünwald–Giemsa. Os resultados obtidos para a linha WiDr não são conclusivos quanto ao efeito causado por **2.15**, uma vez que não se assiste a uma redução considerável de células viáveis com o aumento da concentração de **2.15**, e os gráficos apresentam um comportamento de uma resposta necrótica face à presença do complexo metálico. Como já foi referido, as concentrações do composto testadas não causam efeitos muito significativos, na viabilidade celular.

O perfil necrótico nas linhas do cancro da mama MCF-7 e HCC1806 quando tratadas com 5  $\mu$ M de **2.15** pode estar relacionado com o estímulo forte que é causado pelas moléculas, derivado à concentração elevada. A concentração que foi administrada é aproximadamente 8 vezes superior ao  $IC_{50}$  para estas linhas. O mesmo mecanismo de ação pode dar origem a tipos de morte celular diferentes, dependendo do número de interações que forem estabelecidos entre o princípio ativo e o alvo, pelo que está dependente da concentração de composto administrado. Um maior número destas interações tem maior probabilidade de causar uma lesão muito mais grave, e deste modo, desencadear o processo de morte celular por necrose.

Pode justificar-se a diferença entre a resposta desencadeada pelas linhas do cancro da mama e a resposta desencadeada pela linha LS1034 à presença de **2.15**, com base na quimiorresistência da LS1034. Na verdade, o valor de  $IC_{50}$  obtido nesta linha celular é cerca de 1.7 vezes superior aos obtidos para as linhas MCF-7 e HCC1806 e a concentração de 5  $\mu$ M usada nos testes com LS1034 é quase 5 vezes superior ao  $IC_{50}$  para esta linha, contrastando com o fato de ser quase 8 vezes superior ao  $IC_{50}$  das linhas MCF-7 e HCC1806. Portanto, são compreensíveis as diferenças existentes entre as respostas das linhas do cancro da mama e a LS1034 quando incubadas com 5  $\mu$ M de **2.15**, pois para as linhas MCF-7 e HCC1806, significa a indução de danos mais agressivos e é compreensível a existência de um perfil essencialmente necrótico. Com isto se quer dizer, que **2.15** poderá atuar num determinado alvo possibilitando uma regulação dos mecanismos de apoptose, como no caso da linha LS1034. Concentrações mais elevadas de **2.15** poderão promover a morte celular por necrose, como no caso das MCF-7 e HCC1806.



Tendo em conta a análise e a discussão já efetuadas é provável que o alvo biológico de **2.15** seja comum a todas as linhas celulares. Contudo os dados obtidos não certificam que o alvo seja o DNA, como será expetável dado que se trata de um complexo metálico, mesmo tendo em conta que os processos apoptóticos são ativados em todas as linhas celulares, com exceção da WiDr.

O facto de não existir bloqueio do ciclo celular poderia pôr em causa o facto de o alvo biológico do composto em estudo ser o DNA. Porém, sabe-se que as linhas WiDr e LS1034 expressam a proteína P53 mutada e a linha HCC1806 não expressa esta proteína. Como referido na introdução, a proteína P53 é crucial na regulação do ciclo celular, pois reconhece o DNA quando este é lesado, parando o ciclo celular para a sua reparação ou caso não seja possível sinaliza a célula para entrar em apoptose. Uma mutação no gene que codifica a proteína P53 resulta em alterações nesta proteína que torna impossível a capacidade de parar o ciclo celular ou desencadear apoptose quando o DNA é lesado. Dadas as características das linhas em estudo, a indução de danos no DNA por parte de **2.15** não significam a paragem do ciclo celular. Como há redução do número de células viáveis com o aumento da concentração de **2.15** e como não há paragem do ciclo celular, é possível concluir que o complexo metálico não é citostático e sim citotóxico. Dadas estas observações e a capacidade de indução de apoptose, a capacidade de **2.15** interatuar com o DNA não está excluída, todavia, também não é excluída a interação com outros alvos biológicos. Porém, seria interessante, no futuro, analisar a existência de danos no DNA que possam ser causados pela ação dos complexos metálicos com a realização de, por exemplo, ensaios cometa.<sup>91,92</sup>

A apoptose tem sido o tipo de morte predominante e referenciado por complexos de Cu, se bem que os autores têm tido a preocupação de realizar um estudo mais profundo sobre os mecanismos de ativação causados pelos complexos de Cu, sendo que muitos confirmam a ativação da via intrínseca através da análise das caspases -3 e -9.<sup>48</sup> Além destes, no estudo da atividade citotóxica dos complexos salen de Mn(III) **1.40** e **1.41** foi confirmada a morte celular por apoptose com confirmação da atividade das caspases -3 e -7.<sup>69</sup> Tendo em conta os resultados obtidos, seria interessante perceber a forma como a apoptose é ativada, pela análise das proteínas pró- e anti-apoptóticas BAX e BCL-2 bem como a quantificação das caspases -3 e -9, por imunocitoquímica, Western Blot e citometria de fluxo.<sup>93-95</sup> Seria importante estudar a interação entre **2.15** e o DNA através de estudos de complexação.

Pode afirmar-se que **2.15** traz vantagens sobre as atuais opções em quimioterapia, contudo seria fundamental a avaliação da sua seletividade para células tumorais, avaliando a citotoxicidade deste composto numa linha celular normal do cólon e numa linha celular normal de mama isoladas de indivíduos adultos, de forma a aproximar às características que teriam as células normais dos indivíduos de quem foram isoladas as linhas tumorais deste trabalho.

Assim se conclui que o complexo salen tetracolorado de Cu(II) derivado do ácido (+)-canfórico apresenta-se como uma alternativa promissora às atuais opções quimioterapêuticas no tratamento de

tumores que facilmente desenvolvam quimiorresistência, tendo em conta os resultados obtidos. Este foi o complexo metálico que apresentou um efeito inibitório da proliferação celular mais expressivo quando comparado com os restantes complexos que foram sujeitos a estudos *in vitro*, neste trabalho. E, mais importante, esse efeito inibitório é mais acentuado quando comparado com alguns dos fármacos usados no tratamento do cancro colorretal e do cancro da mama. Demonstrou, também, promover uma resposta apoptótica por parte de células de linhas celulares de cancro da mama MCF-7 e HCC1806 para concentrações correspondentes ao  $IC_{50}$  e mais elevadas, se bem que, neste último caso tenha também desencadeado uma resposta necrótica. O resultado mais notório foi a capacidade de induzir apoptose de uma maneira acentuada em células quimiorresistentes de cancro colorretal, para concentrações elevadas e como tal, neste âmbito, constituía-se um caminho a tomar em futuros trabalhos.

# Capítulo 5

## Conclusões

Este trabalho teve como objetivo a síntese de novos complexos metálicos com potencial aplicação no tratamento do cancro colorretal e do cancro da mama, no sentido de se apresentarem como alternativas viáveis aos complexos de Pt e às restantes opções quimioterapêuticas presentemente utilizadas nestes tipos de cancro. Os complexos de Cu têm demonstrado potencialidades na área de química medicinal e, portanto, ao longo deste trabalho foram sintetizados complexos de Cu(II) do tipo salen e salan para avaliar a sua citotoxicidade em linhas celulares tumorais do cancro colorretal e da mama. Neste sentido, foram sintetizados dois conjuntos de ligandos derivados do ácido (+)-canfórico (**2.2**), um constituído pelos salens **2.6-2.10** e o outro pelos salans **2.11-2.13**, contendo dois ou quatro átomos de cloro ou bromo. Foram subsequentemente sintetizados os complexos de Cu(II) destes ligandos **2.14-2.19** por reação com  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

Foi também sintetizado um conjunto de ligandos do tipo salen derivados do ácido *L*-tartárico (**3.1**). Um deles foi complexado com  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  para originar o complexo de Cu(II) correspondente (**3.10**).

Alguns dos complexos de cobre sintetizados foram submetidos a estudos *in vitro*. Estes estudos constituem a determinação da proliferação celular, avaliação da viabilidade celular e o estudo do ciclo celular nas linhas celulares tumorais do cancro colorretal WiDr e LS1034 e do cancro da mama MCF-7 e HCC1806.

Os resultados dos estudos *in vitro* demonstraram que o complexo salen tetraclorado de Cu(II) derivado do ácido (+)-canfórico apresenta-se, nesta fase embrionária do desenvolvimento de uma molécula ativa, como uma alternativa viável aos fármacos convencionais usados, atualmente no tratamento de tumores que facilmente desenvolvam quimiorresistência, tendo em conta os

resultados obtidos. Este foi o complexo metálico que apresentou uma atividade antiproliferativa mais acentuada com valores de  $IC_{50}$  de  $0.63 \mu M$  a  $1.09 \mu M$  nas quatro linhas celulares tumorais. Estes valores são de uma ordem de grandeza inferior aos de alguns fármacos usados no tratamento destes tipos de cancro. Os resultados de viabilidade celular e ciclo celular confirmaram a capacidade citotóxica deste composto que despoleta as células tumorais a morrerem por apoptose, mas cujo mecanismo não passa pelo bloqueio do ciclo celular. A apoptose é bastante evidenciada quando as células da linha quimiorresistente são expostas ao fármaco para concentrações maiores, e por isso é que este composto é apontado como promissor no combate à quimiorresistência.

Como referido, o composto ainda se encontra na fase inicial de testes biológicos, e portanto a descoberta do mecanismo de ação e da seletividade para células tumorais constituem perspectivas futuras de trabalho.

# Capítulo 6

## Experimental

Este capítulo diz respeito às técnicas de identificação e caracterização utilizadas neste trabalho (ponto de fusão, espectroscopia de ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , IV), fazendo referência dos aparelhos utilizados nas mesmas, à purificação e secagem de solventes, procedimentos experimentais usados na síntese dos compostos descritos neste trabalho, aos materiais e métodos usados no estudos *in vitro*, características das linhas celulares utilizadas, à técnica de citometria de fluxo e a todos os aparelhos utilizados na quantificação celular.

### 6.1. Técnicas de Identificação e Caracterização

#### **Espectros de ressonância magnética nuclear**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram realizados com um espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz, usando como padrão interno o TMS.

#### **Pontos de fusão**

Os pontos de fusão foram determinados num dispositivo FALC.

### **Espetros de infravermelho**

Os espetros de infravermelho foram efetuados no espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR. Foram utilizadas pastilhas de KBr.

### **Espetros de massa**

Os espetros de massa de alta resolução foram registados no aparelho Finnigan MAT95 S.

### **Cromatografia**

Nas cromatografias em coluna foi utilizada gel de sílica (0.040-0.063 mm) fornecido por Merck ou Fluka.

Foram utilizadas placas de gel de sílica 60 F264, com suporte alumínio fornecidas pela Merck para cromatografia de camada fina (TLC) no seguimento e controlo da evolução de reações.

### **Citometria de fluxo**

O instrumento utilizado na citometria de fluxo para deteção das sondas fluorescentes utilizadas neste trabalho foi o citómetro FACSCalibur .

## **6.2. Purificação e Secagem de Solventes**

### **Acetato de etilo**

Foi refluxado na presença de  $K_2CO_3$  durante 2h30.

### **Acetona**

Foi utilizada diretamente de um recipiente fechado.

### **Clorofórmio e diclorometano**

Foram refluxados na presença de  $CaCl_2$ .

### **DMF**

Foi tratada durante 24h com óxido de cálcio previamente ativado a 500 °C. Depois de decantar, adicionou-se NaOH e agitou-se durante 1h. Posteriormente, o solvente foi decantado, destilado e guardado sobre peneiros moleculares com tamanho 4 Å.

### Etanol e metanol

Foram secos pelo método de Lund e Bjerrum, sendo refluxados e posteriormente destilados a partir do correspondente alcóxido de magnésio.

### Éter etílico, hexano e THF

Foram secos por refluxo, na presença de sódio e benzofenona que funcionam como indicador (cor azul significa ausência de água no solvente), sendo posteriormente destilados e guardados sobre peneiros moleculares com tamanho 4 Å.

## 6.3. Procedimentos experimentais

### 6.3.1. Síntese da Diamina Derivada do Ácido (+)-Canfórico

#### (1*R*, 3*S*)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano



2.2

Num balão de duas tubuladuras, com uma tapada e outra com uma coluna de condensação, adicionou-se 50 mmol de ácido canfórico a 100 mL de clorofórmio e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado. A reação foi colocada a uma temperatura entre 60 e 65 °C com agitação magnética. Adicionou-se pouco a pouco 150 mmol de azida de sódio e após a adição deixou-se ocorrer a reação durante 18h. Ao fim deste tempo, a solução foi transferida para um erlenmeyer e adicionou-se hidróxido de sódio até atingir pH 14. À medida que se adicionou hidróxido de sódio, adicionou-se gelo, no sentido de impedir o aumento brusco de temperatura, resultante da neutralização, que provocasse evaporação de clorofórmio. Após ter atingido o pH 14, procedeu-se a extrações com porções de clorofórmio. A fase orgânica foi, posteriormente, lavada com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada.

Obteve-se um óleo amarelado.

Rendimento:97 %

Caraterização:<sup>83</sup>

$[\alpha]_D^{25} = +30$  (*c*1, etanol)

Uma amostra analítica foi obtida por tratamento da diamina com HCl. O produto resultante foi recristalizado em metanol/éter. A caracterização está de acordo com o anterior descrito.

Ponto de fusão 240°C

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.11 (s, 3H); 1.20 (s, 3H); 1.38 (s, 3H); 1.76-2.01 (m, 2H); 2.13-2.34 (m, 2H); 3.55 (t, 1H, J8..8 Hz)

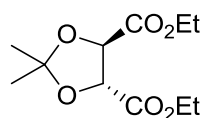
RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 17.9, 21.3, 22.8, 25.7, 34.5, 46.1, 59.2, 64.3.

IV(cm<sup>-1</sup>): 3427, 3404, 3322, 3049, 3028, 2988, 2970, 2933, 2933, 2903, 2885, 2886, 2842, 2812, 1600, 1522.

### 6.3.2. Síntese da Diamina Derivada do Ácido *L*-Tartárico

As várias etapas de síntese são descritas a seguir

#### ***(R,R)*-2,3-*O*-Isopropilideno-tartarato de etilo**



3.3

Adicionou-se 0.23 mmol (40 mg) de ácido *p*-toluenossulfônico e 0.8 mol (133 mL) de trietilortoformato a 0.4 mol (68.4 mL) de tartarato de etilo em 200 mL de acetona. Aqueceu-se a solução à temperatura de refluxo até ao desaparecimento do reagente (24h). Decorrido o tempo, evaporou-se a acetona, dissolveu-se o sólido obtido em clorofórmio e procedeu-se a extrações com hidrogenocarbonato de sódio. Adicionou-se à fase orgânica Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente a pressão reduzida.

Obteve-se um óleo acastanhado.

Rendimento: 93.5%

#### Caraterização:<sup>89</sup>

[α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -41.9 (c5.25, CHCl<sub>3</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.33 (t, 6H, J 7.1); 1.50 (s, 6H); 4.29 (q, 4H, J 7.1); 4.78 (s, 2H).

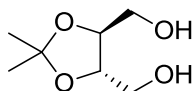
RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 13.9, 26.2, 61.7, 77.0, 113.6, 169.5

IV(cm<sup>-1</sup>): 2988, 2942, 1757, 1358, 1375, 1260, 1210, 1165, 1111, 1026



m/z: 247 [(M+H)<sup>+</sup>, 0.5], 231 (100,0), 173 (44.4), 161 (7.6), 155 (7.3), 145 (7.1), 133 (8.0), 115 (19.1), 104(7.2) , 87 (21.3), 85 (16.9), 83 (25.2), 59 (48.5), 43 (91.0).

### **(S, S)-2,3-O-isopropilideno-1,4-di-hidroxitano**



3.4

Preparou-se uma solução de 0.13 mol (33.2 g) de 2,3-O-isopropilideno-tartarato de etilo em 250 mL de THF. Colocou-se a solução num banho de gelo e adicionou-se lentamente 0.28 mol de hidreto de alumínio e lítio (10.8g) e controlou-se a temperatura, sem ter deixado ultrapassar os 25 °C. Deixou-se a solução atingir a temperatura ambiente, lentamente, sob agitação em atmosfera inerte durante a noite. Foi adicionado acetato de etilo para destruir os hidretos em excesso. Em seguida foram adicionados aproximadamente: 11 mL de H<sub>2</sub>O, 11 mL de NaOH 15 % e novamente 33 mL de H<sub>2</sub>O. Deixou-se agitar durante 1h-2h, filtrou-se e secou-se posteriormente com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e, por fim, evaporou-se o solvente.

Obteve-se um líquido amarelo pálido.

Rendimento: 49 %

Caraterização:<sup>89</sup>

$[\alpha]_D^{22} = +3.9$  (c5, CHCl<sub>3</sub>) [+4.1 (c5,CHCl<sub>3</sub>).

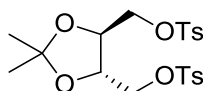
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.42 (s, 6H); 3.70-3.74 (m, 6H); 4.95 (s, 2H).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 26.8, 62.1, 78.4, 109.2.

IV(cm<sup>-1</sup>): 3047, 2990, 2936, 2884, 1651, 1570, 1454, 1412, 1377, 1252, 1219.

m/z: 147 [(M+H)<sup>+</sup>, 29.2], 131 (25.6), 87 (7.5), 69 (18.1), 59 (100.0).

### **(S, S)-2,3-O-isopropilideno-1,4-ditosiloxibutano**



3.5

Num erlenmeyer, dissolveu-se 31.3 mmol (5.08 g) de diol em 60 mL de piridina seca e arrefeceu-se a 0°C num banho de gelo. A esta temperatura adicionou-se lentamente 81.7 mmol

(15.57 g) de cloreto de tosilo recristalizado mantendo a temperatura até à sua dissolução. Após estar dissolvido, a mistura foi colocada no congelador durante uma noite. Verteu-se para aproximadamente 60 mL de água de forma a precipitar um sólido. Filtrou-se e recristalizou-se em etanol.

Obteve-se um sólido branco cristalino.

Rendimento: 50%

Caraterização:<sup>89</sup>

$[\alpha]_D^{22} = -12.0$  (c8.8, CHCl<sub>3</sub>) [-12.4 (c8.8, CHCl<sub>3</sub>).

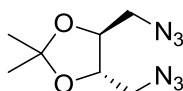
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.30(s, 2H); 2.46 (s, 6H); 4.09 (m, 6H); 7.37 (d, 4H), J8.0); 7.78 (d, 4H, J8.0).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 21.6, 26.7, 66.4, 75.0, 110.8, 127.9, 129.9, 132.4, 145.2.

IV(cm<sup>-1</sup>): 2980, 2930, 1597, 1597, 1380, 1360, 1190, 1175, 1098.

m/z: 471 [(M+H)<sup>+</sup>, 0.2], 457 (7.5), 456 (13.6), 455 (57.2), 285 (7.4), 227 (36.1), 155 (77.9), 126 (8.1), 113 (18.2), 91 (100.0), 69 (24.5).

**(S, S)-2,3-O-isopropilideno-1,4-diazidobutano**



**3.6**

Dissolveu-se 14 mmol (4.41 g) de composto ditosilado em 80 mL de DMF seca. Adicionou-se 56.3 mmol (3.66 g) de azida de sódio e aqueceu-se a 90°C, durante aproximadamente 18h, em atmosfera inerte. Decorrido o tempo, arrefeceu-se e evaporou-se o DMF. Foi adicionado éter etílico ao sólido e lavou-se 3 vezes com água. As fases orgânicas foram secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtradas e evaporadas. O óleo obtido foi sujeito a uma filtração por uma coluna de sílica, usando hexano/éter isopropílico/clorofórmio (4:1:1) como eluente.

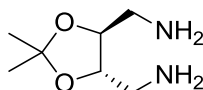
Obteve-se um óleo castanho claro.

Rendimento: 52%

Caraterização:<sup>89</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.47 (s, 6H), 3.34 (t, 2H, J6.2Hz) 3.50-3.57 (m, 2H), 4.05 (t, 2H, J10.0)

### (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diaminobutano



3.7

Num reator de hidrogenação dissolveu-se 7.04 mmol (1.49 g) de diazida em 40 mL de etanol seco e adicionou-se 450 mg de Pd/C a 5%. Colocou-se o reator num hidrogenador do tipo Parr, à temperatura ambiente e sob uma pressão de hidrogénio de 1 atm durante uma noite. Filtrou-se a mistura sob celite e evaporou-se o etanol.

Obteve-se um óleo amarelo claro.

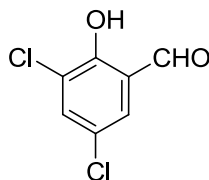
Rendimento: 87%

Caraterização:<sup>89</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.41 (s, 6H), 1.51 (s, 4H) 2.81-2.96 (m, 4H), 3.79 (t, 2H, J2.6).

### 6.3.3. Síntese de Salicilaldeídos

#### 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído



2.4

Num balão dissolveu-se 16.9 mmol de diclorofenol (2.750 g) em 16.9 mmol de hexametenotetramina (2.369 g) e 15 mL de TFA, em atmosfera inerte, com agitação contínua e a uma temperatura de 130 °C durante cerca de 24h (reação controlada por TLC). Posteriormente, adicionou-se 10 mL de HCl 4M e agitou-se durante 10 minutos. Extraiu-se a mistura da reação duas vezes com 75 mL de diclorometano e juntaram-se as fases orgânicas para serem extraídas com duas porções de 100 mL de HCl 4M, 100 mL de H<sub>2</sub>O e, por fim, com uma solução saturada de NaCl. As fase orgânicas combinadas foram secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrou-se e evaporou-se. Por TLC comparativo verificou-se a formação do composto com êxito.

Obteve-se um sólido amarelo.

Rendimento: 79.5%

#### Caraterização:

Ponto de fusão: 94-95 °C

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 7.49 (d, 1H, *J*2.4Hz); 7.61 (d, 1H, *J*2Hz); 9.55 (s, 1H); 11.37 (s, 1H).

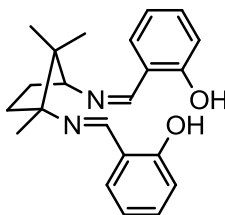
IV(cm<sup>-1</sup>): 3448, 1606, 1444, 1410, 1385, 1323, 1209, 1173, 868, 758

### 6.3.4. Síntese de Salens

Procedimento geral para a síntese de salens:

Colocar num erlenmeyer 2.5 mmol de diamina e 5 mmol de salicilaldeído com 10 mL de etanol. Colocar 30 minutos em ultrassons. Controlar a reação por TLC usando misturas de AcOEt/Hexano. Filtrar o produto de reação. Colocar a secar na bomba de vazio.

#### **(1*R*, 3*S*)- *N,N*'-bis[salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano**



2.6

Obtém-se um sólido amarelo.

Rendimento: 60%.

#### Caraterização:

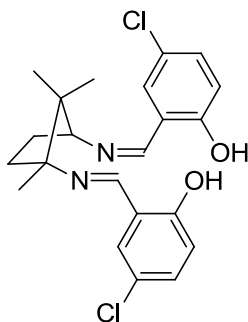
Ponto fusão: 156 -157 °C

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.96 (s, 3H); 0.98 (s, 3H); 1.32 (s, 3H); 1.82-1.88 (m, 1H); 1.98-2.08 (m, 1H); 2.14-2.24 (m, 1H); 2.29-2.36 (m, 1H); 3.60 (t, 1H, *J*8.62 Hz); 6.89 (t, 2H, *J*7.40 Hz); 6.96 (d, 2H, *J*8.20); 7.28-7.34 (m, 4H); 8.35 (s, 2H).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 18.9, 20.7, 24.5, 28.1, 33.9, 48.3, 70.7, 76.31, 117.0, 117.1, 118.4, 118.6, 118.7, 119.0, 131.2, 131.4, 132.1, 132.3, 161.2, 161.3, 161.4, 163.8

IV(cm<sup>-1</sup>): 1629, 1496, 1413, 1282, 1167, 1120, 1030, 988, 757.

**(1R, 3S)-N,N<sup>2</sup>-bis[5-cloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano**



2.7

Obtém-se um sólido amarelo.

Rendimento: 68%.

Caraterização:

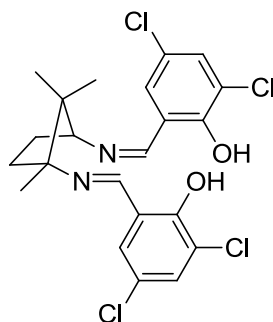
Ponto de fusão: 176.0 – 177.0 °C

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.31 (s, 3H); 1.83 (s, 3H); 1.89 (s, 3H); 1.83-1.97 (m, 1H); 1.98-2.07 (m, 1H); 2.16-2.23 (m, 1H); 2.25-2.34 (m, 1H); 3.60 (t, 1H, J8.60 Hz); 6.89-6.92 (d, 2H, J4.20 Hz); 7.24-7.26 (d, 4H, J4.40 Hz); 8.27-8.28 (d, 2H, J2.4 Hz); 13.47 (s, 1H); 14.00 (s, 1H)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 18.9, 21.0, 24.3, 28.2, 34.1, 48.5, 71.0, 118.6, 118.7, 119.5, 123.0, 123.2, 130.4, 130.6, 132.0, 132.1, 159.8, 160.1, 160.4, 162.8.

IV(cm<sup>-1</sup>): 3440, 2983, 2968, 1633, 1483, 1379, 1281, 1186, 1124, 1061, 827, 789

**(1R, 3S)-N,N<sup>2</sup>-bis[3,5-dicloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano**



2.8

Obtém-se um sólido amarelo.

Rendimento: 47%.

Caraterização:

Ponto fusão: 101-102°C

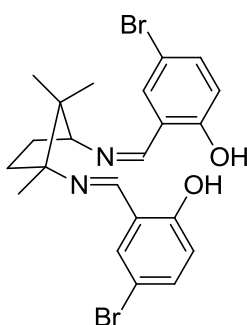
RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.97 (s, 3H); 1.00 (s, 3H); 1.34 (s, 3H); 1.86-1.92 (m, 1H); 1.93-2.08 (m, 1H); 2.20-2.27 (m, 1H); 2.30-2.37 (m, 1H); 3.66 (t, 1H, J8.4 Hz); 7.18 (dd, 2H, J6.2 Hz); 7.42 (d, 2H, J1.2 Hz); 8.25 (s, 2H); 14.4 (s, 1H); 14.90 (s, 1H).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 18.9, 20.7, 24.4, 27.9, 33.8, 48.6, 70.9, 75.5, 119.2, 119.3, 122.1, 122.6, 123.0, 123.3, 129.0, 129.2, 132.4, 157.0, 157.9, 160.3, 162.6

IV(cm<sup>-1</sup>): 3446, 2954, 2912, 1624, 1439, 1410, 1409, 1213, 1165, 1146, 872, 754, 706

HRMS (ESI): calculado para C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 487.05136; encontrado para [M+H]<sup>+</sup>: 487.05082

### **(1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[5-bromo-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano**



2.9

Obtém-se um sólido amarelo.

Rendimento: 86%

#### Caraterização:

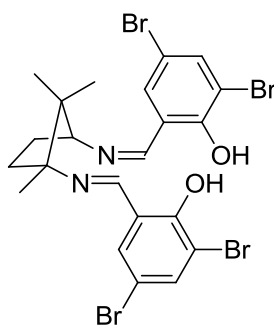
RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.92 (s, 3H); 0.96 (s, 3H); 1.31 (s, 3H); 1.82-1.88 (m, 1H); 1.97-2.06 (m, 1H); 2.14-2.24 (m, 1H); 2.29-2.36 (m, 1H); 3.6 (t, 1H, J8.4 Hz); 6.86; (d, 2H, J8.8 Hz); 7.39 (t, 4H, J7.2 Hz); 8.26 (d, 2H, J5.2 Hz); 13.49 (s, 1H); 14.03 (s, 1H).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 18.91, 20.95, 24.24, 28.17, 34.09, 48.52, 71.04, 76.41, 109.85, 110.03, 119.08, 120.10, 120.33, 133.40, 133.59, 134.84, 134.96, 160.28, 160.31, 160.56, 162.67

IV(cm<sup>-1</sup>): 3448, 2966, 2877, 1630, 1570, 1481, 1377, 1281, 1076, 964, 825, 787

HRMS (ESI): calculado para C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 507.02827; encontrado para [M+H]<sup>+</sup>: 507.02773

**(1R, 3S)-N,N'-bis[3,5-dibromo-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano**



2.10

Obtém-se um sólido amarelo.

Rendimento: 67%.

Caraterização:

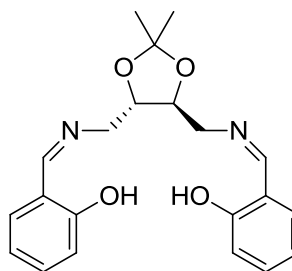
Ponto fusão: 239-240°C

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.97 (s, 3H); 1.00(s, 3H); 1.35 (s, 3H); 1.86-2.08 (m, 1H); 2.18-2.38 (m, 3H); 3.66 (t, 1H, J4.2Hz); 7.37 (dd, 2H, J6.8Hz); 7.71 (d, 2H, J1 Hz); 8.22 (d, 2H, J0.4 Hz); 14.70 (s, 1H); 15.15 (s, 1H)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 18.9, 20.7, 24.3, 27.9, 33.8, 48.6, 70.8, 75.3, 108.8, 109.3, 112.6, 113.1, 119.6, 119.7, 132.8, 133.0, 137.8, 137.9, 158.6, 159.6, 160.2, 162.5

IV(cm<sup>-1</sup>): 3448, 2983, 2883, 1631, 1496, 1433,1385, 1213, 1153, 1095, 1051, 845, 766

**(2S, 3S)-N,N'-bis[salicilideno]-2,3-O-isopropilideno-1,4-diaminobutano**



3.8

Obtém-se um sólido amarelo.

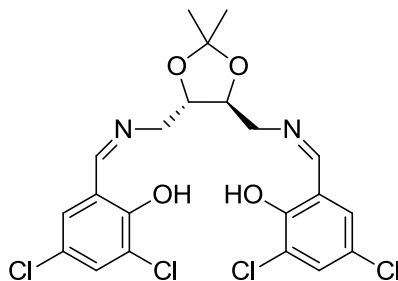
Rendimento: 9%

Caraterização:

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.38 (s, 1H); 3.87 (t, 4H, J14.4Hz); 4.22 (d, 2H, J10.8Hz); 6.88 (t, 2H, J7.4Hz); 6.96 (t, 2H, J4.2 Hz); 7.25 (d, 2H, J4.4Hz); 7.31 (t, 2H, J7.6Hz); 8.38 (s, 2H); 13.08 (s, 2H)

IV( $\text{cm}^{-1}$ ): 3448, 2966, 1630, 1448, 1385, 1290, 1169, 1115, 1070, 866, 741, 688

**(2*S*, 3*S*)-*N,N'*-bis[3,5-dicloro-salicilideno]-2,3-*O*-isopropilideno -1,4-diaminobutano**



**3.9**

Obtém-se um sólido amarelo.

Rendimento: 83%

Caraterização:

Ponto de fusão: 170-172 °C

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.37 (s, 6H); 3.89 (s, 4H); 4.21 (s, 2H); 7.16-7.40 (m, 4H); 8.31 (s, 2H); 13.90 (s, 2H)

IV( $\text{cm}^{-1}$ ): 3448, 2962, 2924, 1610, 1527, 1458, 1385, 1321, 1178, 825, 710, 656

### 6.3.5. Síntese de Salans

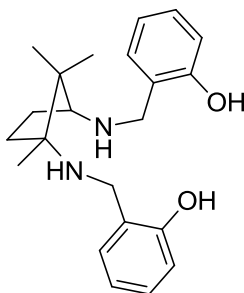
Procedimento geral para a síntese de salans:

Dissolveu-se num balão de 50 mL 2 mmol de salen, em 10 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol, com agitação à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Decorrido o tempo adicionou-se, lentamente, 20 mmol de boro-hidreto de sódio (757 mg) à solução num banho de gelo. Controlou-se a reação por TLC. Adicionou-se cloreto de amónia saturado à solução. Adicionou-se água e diclorometano e extraiu-se 3 vezes com diclorometano.

Às fases orgânicas foi adicionado Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrou-se e evaporou-se.



**(1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[1-(2-hidroxifenil)metil]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano**



2.11

Obteve-se um óleo beje que ao ser adicionado éter etílico, evaporado e secado em bomba de vácuo, obteve-se um sólido branco.

Rendimento: 71%

Caraterização:

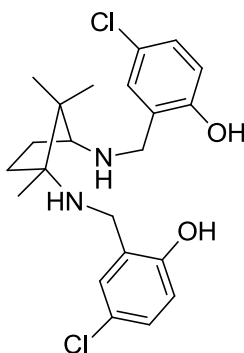
Ponto de fusão: 83.0-84.0 °C

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.94 (s, 3H); 1.02 (s, 3H); 1.18 (s, 3H); 1.42-1.52 (m, 1H); 1.71-1.78 (m, 1H); 1.88-1.96 (m, 1H); 2.15-2.25 (m, 1H); 2.99 (t, 1H, *J*7.6); 3.86-4.11 (m, 4H); 6.76-6.84 (m, 4H); 6.99 (d, 2H, *J*7.2); 7.15 (q, 2H, *J*7.6).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 16.9, 21.5, 21.7, 27.3, 34.3, 46.6, 46.7, 51.7, 64.0, 64.9, 116.5, 116.6, 119.1, 122.7, 123.3, 128.1, 128.3, 128.9, 128.9, 158.3

HRMS (ESI): calculado para C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 355.23854; encontrado para [M+H]<sup>+</sup>: 355.23800

**(1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[1-(5-cloro-2-hidroxifenil)metil]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano**



2.12

Obteve-se um sólido beje, após recristalização em diclorometano.

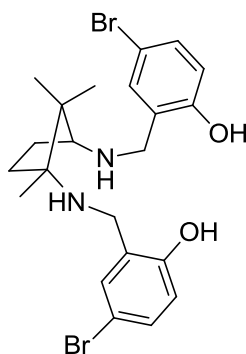
Rendimento: 98%

Caraterização:

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.94 (s, 3H); 1.01 (s, 3H); 1.17 (s, 3H); 1.44-1.50 (m, 2H); 1.72-1.78 (m, 2H); 1.86-1.94 (m, 1H); 2.96 (t, 1H, *J*8.8Hz); 3.82-4.09 (m, 4H); 6.73-6.77 (m, 2H); 6.97 (d, 2H, *J* 1.2Hz); 7.10-7.14 (m, 2H)

IV(cm<sup>-1</sup>): 3437, 2962, 2924, 1587, 1475, 1385, 1269, 1190, 1128, 1045, 820, 638

**(1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[1-(5-bromo-2-hidroxifenil)metil]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano**



2.13

Necessidade de recristalização em diclorometano.

Obteve-se um sólido beje, após recristalização em diclorometano.

Rendimento: 64%

Caraterização:

Ponto de fusão: 174-175 °C

RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 0.94 (s, 3H); 1.00 (s, 3H); 1.17 (s, 3H); 1.42-1.51 (m, 1H); 1.71-1.78 (m, 1H); 1.87-1.95 (m, 1H); 2.14-2.24 (m, 1H); 2.95 (t, 1H, *J*8.8); 3.82-4.11 (m, 4H); 6.71 (q, 2H, *J*4); 7.23 (d, 2H, *J*2)

IV(cm<sup>-1</sup>):3446, 2981, 2875, 1620, 1537, 1450, 1385, 1325, 845, 754, 737

HRMS (ESI): calculado para C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 511.05956; encontrado para [M+H]<sup>+</sup>: 511.05903

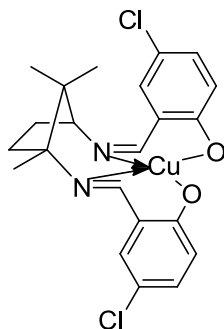
### 6.3.6. Síntese de Complexos de Cu(II)

Procedimento geral para a síntese de complexos de Cu(II):

A 0.5 mmol de ligando salen ou salan foram adicionados 0.6 mmol de Cu(OAc)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (99.8 mg) e colocados num balão com 20 mL de metanol em refluxo durante 2-3h (reação controlada por TLC) com coluna de condensação e com agitação magnética. Evaporou-se o solvente e lavou-se com diclorometano, e filtrou-se sob celite, de modo a separar o metal não dissolvido do complexo. Evaporou-se o diclorometano e secou-se o precipitado numa bomba de vázio.

A purificação de **2.16** e **3.11** constituem exceções, dado que o sólido obtido precipitou em metanol. Neste caso, filtrou-se o sólido obtido.

#### **[(1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[5-cloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Cu(II)**



2.14

Obteve-se um sólido castanho.

Rendimento: 95%

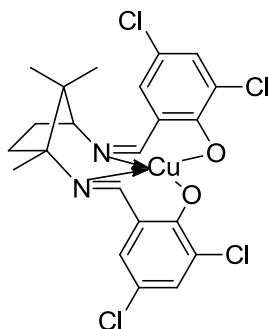
#### Caraterização:

Ponto de fusão: > 300 °C

IV(cm<sup>-1</sup>): 1637, 3076, 2983, 2900, 1452, 1385, 1288, 1180, 1093, 1043, 887, 850, 733, 704

HRMS (ESI): calculado para C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>CuN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:480.04325; encontrado para [M+H]<sup>+</sup>: 480.04271

**[(1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[3,5-dicloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Cu(II)**



2.15

Obteve-se um sólido castanho.

Rendimento: 58%

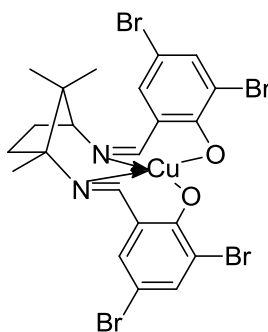
Caraterização:

Ponto de fusão: > 300 °C

IV( $\text{cm}^{-1}$ ): 1666, 1427, 1385, 1279, 1209, 1173, 742, 735, 703

HRMS (ESI): calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{Cl}_4\text{CuN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 547.96531; encontrado para  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 547.96477

**[(1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[3,5-dibromo-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Cu(II)**



2.16

Obteve-se um sólido castanho.

Rendimento: 87%

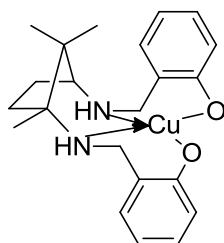
Caraterização:

Ponto de fusão: > 300 °C

IV( $\text{cm}^{-1}$ ): 2968, 1631, 1456, 1385, 1182, 868, 742

HRMS (ESI): calculado para  $C_{22}H_{20}Br_4CuN_2O_2$   $[M+H]^+$ : 723.76324; encontrado para  $[M+H]^+$ : 723.76271

***[(1R, 3S)-N,N'-bis[1-(2-hidroxifenil)metil]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Cu(II)***



2.17

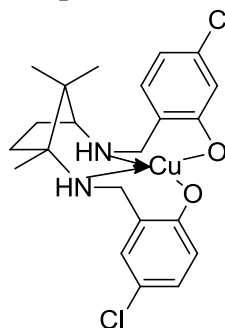
Obteve-se um sólido verde escuro.

Rendimento: 84 %

Caraterização:

Ponto de fusão: > 300 °C

***[(1R, 3S)-N,N'-bis[1-(5-cloro-2-hidroxifenil)metil]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Cu(II)***



2.18

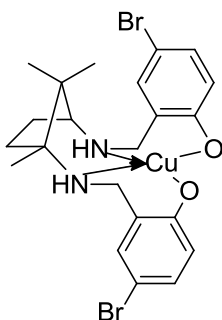
Obteve-se um sólido verde escuro

Rendimento: 90%

Caraterização:

Ponto de fusão: > 300 °C

**[(1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[1-(5-bromo-2-hidroxifenil)metil]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Cu(II)**



2.19

Obteve-se um sólido verde escuro

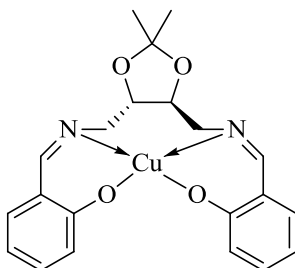
Rendimento: 53%

Caraterização:

Ponto de fusão: > 300 °C

IV( $\text{cm}^{-1}$ ): 2964, 1614, 1583, 1483, 1381, 1273, 1257, 1101, 997, 881, 823, 768

**[(2*S*, 3*S*)-*N,N'*-bis[salicilideno]-2,3-*O*-isopropilideno -1,4-diaminobutano]Cu(II)**



3.10

Obteve-se um sólido castanho

Rendimento: 91%

Caraterização:

Ponto de fusão: > 300 °C

IV( $\text{cm}^{-1}$ ): 1610, 1577, 1477, 1385, 1273, 1257, 1101, 817, 625, 545, 457

## 6.4. Estudos *in vitro*

Os estudos *in vitro* são a primeira abordagem nos ensaios pré-clínicos na avaliação do efeito terapêutico de uma nova molécula ativa e fornecem as informações necessárias para a continuidade do processo experimental. Os estudos *in vitro* foram realizados em células que crescem em monocamada aderente e em ambiente controlado.

De maneira a avaliar os efeitos dos complexos de Cu(II) sintetizados neste trabalho, utilizaram-se duas linhas celulares humanas de cancro do cólon, uma do cólon esquerdo, a WiDr, e uma do cego, denominada LS1034 e duas linhas celulares humanas do cancro da mama, MCF-7 e HCC1806.

### 6.4.1. Culturas Celulares

No cultivo e na propagação de células dispersas das diferentes linhas celulares, foram sempre estabelecidas as condições rigorosas de assepsia e esterilidade necessárias. Nos estudos *in vitro* realizados, todas as linhas celulares foram adquiridas e certificadas pela *American Type Culture Collection* (ATCC).

A linha celular LS1034 foi isolada do cego de um doente com cancro do cólon, que se encontrava no estadio III. É uma linha celular quimiorresistente e cujas células possuem mutações em diferentes genes, nomeadamente o que codifica a proteína P53 e o gene que codifica a proteína APC.<sup>96</sup> A linha celular WiDr também expressa a P53 mutada, mas com uma mutação diferente da P53 presente na linha LS1034. Para além disto, à semelhança da linha LS1034, a WiDr possui mutação no gene *APC*.<sup>90</sup> As linhas celulares MCF-7 e HCC1806 foram isoladas da glândula mamária de doentes diferentes, sendo a HCC1806 isolada a partir de uma doente com cancro da mama no estadio II (TNM). A linha celular MCF-7 caracteriza-se por ser HER-2 positiva e por expressar vários IGFBP (*insulin growth factor binding protein*).<sup>97</sup> A linha celular HCC1806, ao contrário da MCF-7, é HER-2 negativa e não expressa P53 mutada.<sup>98</sup>

As linhas celulares utilizadas foram propagadas em cultura aderente e de acordo com as instruções do seu fornecedor, mantidas a 37<sup>0</sup>C em atmosfera humificada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora *Binder*.

LS1034 e HCC1806 foram propagadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute Medium*, RPMI-1640 (Sigma, R4130), e as linhas celulares MCF-7 e WiDr foram propagadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648). Ambos os meios foram suplementados com 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*, Sigma, F7524), 1% de antibiótico (Sigma, A5955), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco, 11360) para o RPMI e 0,25 mM para o DMEM.

As linhas celulares crescem formando uma monocamada aderente ao suporte sólido. Estas células necessitam, para a realização de estudos *in vitro*, de ser transferidas para outros suportes sólidos, tendo-se para tal recorrido a métodos enzimáticos, de modo a preparar suspensões celulares. Assim, inicialmente procedeu-se à lavagem das culturas celulares com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*, constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, P0662) [pH 7,4]), e incubaram-se a 37°C com 2 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma, T4049) ou TrypLE Express™ (Gibco, 12605-028) durante o tempo necessário para que as células se soltassem do frasco, tendo sido este tempo otimizado para cada linha celular. De seguida, adicionaram-se pelo menos 4 mL de meio de cultura a fim de inativar a solução enzimática, homogeneizou-se a suspensão celular e procedeu-se à determinação da concentração de células.

Para tal diluiu-se um volume conhecido de suspensão celular em igual volume de azul tripano e procedeu-se à contagem num microscópio invertido (Motic, AE31) com ampliação de 10 vezes, utilizando um hemocitómetro. O método do azul tripano permite fazer uma contagem de células numa suspensão celular. Esta técnica é simples e não dispendiosa, fornecendo informação fiável do número total de células da suspensão celular.<sup>99,100</sup>

Por último, adicionou-se meio de cultura à suspensão celular de forma a obter a concentração celular pretendida, de acordo com o estudo a realizar.

## 6.4.2. Estudos de Citotoxicidade

Neste trabalho, os estudos *in vitro* realizados tiveram como propósito a avaliação do efeito citotóxico causado pelos complexos de Cu(II) nas linhas celulares utilizadas.

Desta forma, a primeira abordagem consistiu na determinação da proliferação celular na tentativa de entender qual o composto que teve um efeito mais evidente na inibição da proliferação celular nas linhas celulares tumorais. Neste âmbito, a gama de concentrações para todos os complexos de Cu(II) usada na incubação das culturas celulares foi entre 0.5 e 5 µM. As soluções de complexos de Cu(II) foram preparadas com concentração adequada de modo a que a sua adição apenas alterasse no máximo em 1% o volume do meio de cultura dos compartimentos celulares. Foram utilizados dois controlos: um em que não houve administração de qualquer composto e outro em que foi administrado o solvente dos complexos metálicos no volume correspondente a 1% do volume do meio de cultura do compartimento celular. O solvente utilizado foi o dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, D4540). O DMSO utilizado como solvente foi previamente esterilizado com recurso a filtração, utilizando filtros de acetato celulose de 0,22 µm (Syringe Filter; Frilabo, 1520012).



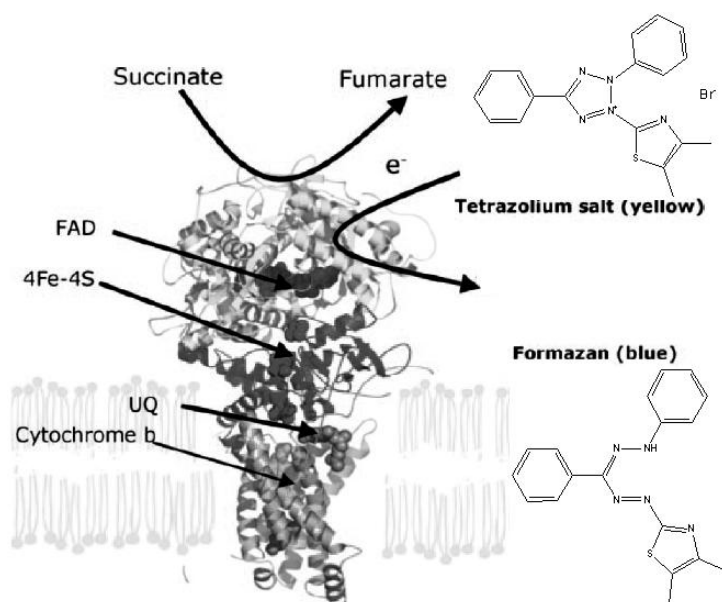
Posteriormente, o complexo metálico que induziu maior inibição da proliferação celular foi sujeito a estudos de viabilidade celular e análise do ciclo celular nas quatro linhas celulares tumorais, de forma a avaliar se o seu efeito citostático se traduzia também num efeito citotóxico e analisar a sua seletividade. Assim, as quatro linhas celulares tumorais foram incubadas com a concentração correspondente ao seu IC<sub>50</sub> previamente obtido, e com uma concentração superior ao IC<sub>50</sub> (5 μM).

#### 6.4.2.1. Determinação da Proliferação Celular

Como já foi referido, a determinação da proliferação celular foi estudada por colorimetria, através do ensaio MTT. O tempo de incubação foi de 48h para cada uma das concentrações e, após esta, foi avaliada a atividade metabólica, por colorimetria, de forma a construir uma curva dose-resposta.

O MTT (Figura 6.1) é um sal de tetrazólio solúvel em água de cor amarela e é muito utilizado na avaliação de viabilidade e função mitocondrial em culturas celulares. Os sais de tetrazólio usados na biologia celular e bioquímica são derivados aromáticos de 1,2,3,4-tetrazólio com substituintes nas posições 2, 3 e 5.<sup>101</sup>

Basicamente, os sais de tetrazólio detetam a atividade da enzima desidrogenase.<sup>102</sup> As enzimas desidrogenases têm a capacidade de protonar o anel tetrazólico do MTT e formar cristais de *formazan* de cor azul-escura (Figura 6.1). Estes cristais podem ser solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos. Posto isto, a quantidade de cristais obtidos é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, pois apresentam metabolismo mitocondrial, sendo esta uma medida da atividade metabólica.<sup>101</sup>



**Figura 6.1.** Redução de MTT pela succinato desidrogenase. Representação do complexo II em que o anel tetrazólio do MTT é reduzido e clivado com formação de *formazan*.<sup>adaptado de 101</sup>

Nestes estudos, foi necessária uma suspensão celular com 50 mil células/mL em meio de cultura para as linhas WiDr, MCF-7 e HCC1806 e uma suspensão com 70 mil células/mL para a linha celular LS1034. Esta suspensão foi distribuída por placas de 48 poços, de forma a obter um volume final de 500 µL por poço. Após 24h, as células foram incubadas com diferentes concentrações de complexo metálico (0.5 a 5 µM).

Passadas as 48h de incubação das células sob efeito do complexo metálico, descartou-se o meio de cultura e procedeu-se a uma lavagem com PBS. Adicionaram-se 200 µL por poço de uma solução de MTT (0,5 mg/mL; Sigma, M2128) em PBS, pH 7,4. Depois da incubação no escuro durante pelo menos 2h, a 37°C, procedeu-se à dissolução dos cristais de formazano, com agitação das placas, depois da adição de 200 µL por poço de uma solução 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol. Depois da solubilização dos cristais, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços (Sarstedt, Alemanha), e esta foi usada na medição da absorvância num espectrofotómetro, usando o comprimento de onda de 570 nm e um comprimento de onda de referência de 620 nm.<sup>102</sup>

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da atividade metabólica das células tratadas com solução de complexo metálico em relação às células tratadas com solvente, normalizadas para 100%, utilizando a equação 1.

$$\% \text{ atividade metabólica} = \frac{(\text{Células tratadas com solução})(\text{Abs } 570 \text{ nm} - \text{Abs } 620\text{nm})}{(\text{Células tratadas com DMSO})(\text{Abs } 570 \text{ nm} - \text{Abs } 620\text{nm})} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

**Equação 1.** Determinação da percentagem da atividade metabólica das células tratadas em relação às células controlo.

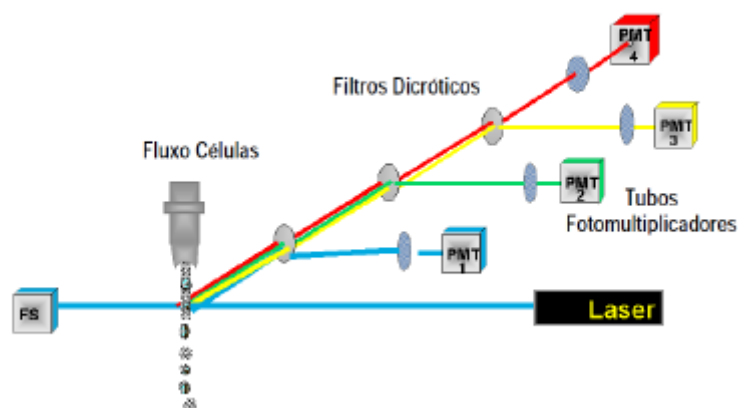
O programa Origin Pro 8.5 foi utilizado no processamento dos dados obtidos, tendo sido possível o estabelecimento de curvas de dose-resposta e a determinação dos respetivos valores de IC<sub>50</sub>.

#### 6.4.2.2. Avaliação da Viabilidade Celular

A citometria de fluxo foi a técnica utilizada no estudo do efeito do complexo metálico que apresentou maior inibição da proliferação celular, nos processos de morte celular.

Esta é uma técnica que permite contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas num líquido em fluxo, possibilitando a análise de vários parâmetros, em simultâneo. O citómetro de fluxo (Figura 6.2) é o instrumento utilizado nesta técnica e possibilita a análise das características físicas e/ou químicas de uma simples célula. É constituído por uma fonte de luz (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, monocromadores, fotodíodos ou

fotomultiplicadores para a deteção sensível dos sinais de interesse e uma unidade de processamento dos dados recolhidos.<sup>103</sup>



**Figura 6.2.** Esquema da constituição interna de um citómetro de fluxo.<sup>Adaptado de 103</sup>

Um feixe de luz de comprimento de onda bem definido é direcionado para um meio líquido em fluxo. Os detetores são apontados em linha ou perpendicularmente ao feixe de luz no qual o fluxo atravessa e são designados de FSC (*forward scatter*) e SSC (*side scatter*), respetivamente. Quando o meio líquido atravessa a radiação emitida, cada partícula suspensa dispersa a luz de uma determinada forma, e cada uma contém corantes químicos fluorescentes que são excitados emitindo radiação de menor frequência que a da radiação emitida pela fonte. A partir da análise de flutuações de brilho de cada detetor (uma para cada pico de emissão fluorescente) é possível obter informações sobre a estrutura física e química de cada partícula.<sup>103</sup>

O instrumento utilizado na citometria de fluxo foi o citómetro FACSCalibur. Foram necessárias cerca de  $1 \times 10^6$  células, por ensaio, em todas as marcações. O número de eventos obtidos através do programa CellQuest™, correspondente ao número de células, foi de  $1 \times 10^4$  para o estudo da viabilidade e tipos de morte celular e  $2,5 \times 10^4$  para o estudo do ciclo celular. A análise e quantificação da informação foi realizada, usando um *software* específico que processa em computador dedicado (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software).

As sondas fluorescentes utilizadas na citometria de fluxo para a análise da viabilidade celular, foram anexina V (AnV) acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídeo (IP). A AnV é uma proteína anticoagulante que se liga com elevada afinidade a fosfolípidos aniónicos, tais como a fosfatidilserina. O IP é um corante com a capacidade de se intercalar no DNA e RNA celulares.<sup>103</sup>

A necrose e a apoptose distinguem-se com base nas diferenças morfológicas, bioquímicas e alterações moleculares que ocorrem nas células durante cada processo.<sup>104</sup> Em células viáveis, a fosfatidilserina encontra-se no folheto interno da bicamada lipídica. Durante a apoptose, a

fosfatidilserina move-se para o folheto externo, podendo ser identificada através da incubação das células com AnV-FITC. Este evento ocorre quando a membrana celular ainda está intata, sendo característico de apoptose.<sup>105,106</sup> Por outro lado, o IP não consegue atravessar a bicamada lipídica, sendo apenas possível intercalar o DNA (ou o RNA) quando a integridade da membrana celular se encontra comprometida ao ponto de possibilitar a passagem do IP, o que se verifica quando as células se encontram em apoptose tardia ou necrose.<sup>107</sup>

Assim, através deste modelo da dupla marcação é possível agrupar e classificar a população celular em quatro grupos distintos: grupo I, em que temos as células viáveis (negativa para ambas as marcações); grupo II, composto por células em apoptose inicial (apresentam marcação positiva para AnV-FITC, mas negativa para a marcação com IP); grupo III, do qual fazem parte as células em apoptose tardia/necrose (apresentam-se positivas para ambas as marcações); e, por último, o grupo IV, que engloba todas as células em necrose (apresentam marcação negativa para AnV-FITC e positiva para IP).

Na dupla marcação das células, estas foram centrifugadas (1300G, durante 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensão em PBS e lavado por centrifugação nas mesmas condições já referidas. Depois, o sedimento foi ressuspensão em 100 µL de tampão de ligação frio (constituído por 0,01 M de HEPES [Sigma, H7523], 0,14 M de NaCl [Sigma, S7653] e 0,25 mM de CaCl<sub>2</sub> [Sigma, C4901]), 2,5 µL de AnV-FITC (Immunostep, ANXVF) e 1 µL de IP (kit Immunostep) e incubado durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Por fim, adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação frio. A deteção foi realizada com os comprimentos de onda de excitação de 525 nm para AnV-FITC e 488 nm para o IP. Os resultados foram apresentados em percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações e baseiam-se no resultado da marcação para AnV-FITC/IP, isto é, se foram positivas ou negativas.

#### **6.4.2.3. Avaliação do Ciclo celular**

A avaliação do ciclo celular foi realizada, recorrendo à técnica de citometria de fluxo. O ciclo celular diz respeito à sequência de eventos através dos quais existe duplicação do material genético de uma célula e consequente divisão da mesma em duas células-filhas. O ciclo celular é constituído por 4 fases que sumarizam a sequência de eventos: a fase G1 (gap-1) que precede a fase S, na qual existe replicação do conteúdo genético; posteriormente, segue-se a fase G2 (gap-2) que precede a fase M (mitose) que consiste na distribuição equitativa dos cromossomas duplicados pelas células-filhas.<sup>108,109</sup>

De forma a avaliar o ciclo celular, utilizou-se um procedimento que necessita do uso de uma solução de iodeto de propídeo (IP) e RNase. A função da enzima consiste em catalisar a degradação do RNA, o que possibilita especificidade do IP para o DNA. As análises do ciclo celular por

citometria de fluxo são representadas em histogramas de intensidade de fluorescência. De acordo com as 4 fases do ciclo celular, referidas acima, é possível agrupar as células em três tipos de populações, de acordo com o conteúdo genético de cada uma: o grupo de células que está em fase S, em que o DNA se encontra em replicação; as fases G0 e G1 correspondente ao conteúdo genético antes da replicação; e as fases G2 e M que contém o dobro do conteúdo genético das fases G0 e G1.<sup>110</sup>

Quanto ao procedimento para análise do ciclo celular, as células foram centrifugadas (1300 G, durante 5 minutos) e, depois, descartou-se o sobrenadante. De seguida, adicionaram-se 200 µL de etanol a 70% aos diferentes tubos em agitação no vórtex e incubaram-se durante 30 minutos no escuro, a 4°C. Lavaram-se as células com 2 mL de PBS, tendo sido, de seguida, centrifugadas (1300 G, durante 5 minutos) e o sobrenadante foi decantado. Depois, adicionaram-se 200 µL de solução IP/RNase (Immunostep, PI/Rnase) e incubaram-se durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. A deteção foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm.

### 6.4.3. Análise Estatística

Os valores experimentais obtidos da proliferação celular segundo o método de MTT, foram ajustados a um modelo sigmoidal de dose-resposta utilizando o software OriginLab v. 8.5:

$$\text{Proliferação celular (\%)} = \frac{100}{1 + 10^{\frac{x - x_0}{\text{IC}_{50}}}} \quad (\text{eq.2})$$

onde  $x_0$  corresponde ao valor que inibe a proliferação a 50% (IC50). A análise estatística foi realizada utilizando o *software* IBM® SPSS® Statistics, versão 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA). A análise descritiva das variáveis quantitativas em estudo foi realizada através do cálculo de estimadores de tendência central, de dispersão e de localização.

Na análise inferencial, a normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi avaliada segundo o teste de Shapiro-Wilk.

A comparação de viabilidade celular e ciclo celular entre as condições de incubação com o complexo de Cu(II) **2.15** para cada concentração e entre as linhas celulares (para cada condição) foi efetuada segundo o teste *Analysis of Variance* (ANOVA) de um fator (no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou segundo o teste Kruskal-Wallis (caso contrário).



# Bibliografia

- [1] L. Liotta, P.S. Steeg, e W.G. Stetler-Stevenson, *Cell*, **64**(2), 1991, 327-336.
- [2] C.J. Sherr, *SCIENCE*, **274**, 1996, 1672-1677.
- [3] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *Cell*, **144**, 2011, 646-674.
- [4] L.A. Torre; F. Bray; R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal., *CA: Cancer Journal of Clinicians*, **62**, 2012, 10-29.
- [5] R.L. Siegel, J. Ma; Z. Zou, A. Jemal, *Cancer Journal of Clinicians*, **64**, 2014, 9-29.
- [6] N. Miranda, C. Portugal, *Programa Nacional para as doenças oncológicas. Direção Geral de Saúde*, 2014.
- [7] A.J.M. Watson, P.D. Collins, *Digestive Diseases*, **29**, 2011, 22-228.
- [8] M. Astin, T. Griffin, R.D. Neal, P. Rose, W. Hamilton, *The British journal of general practice: The journal of the Royal College of General Practitioners*, **61**(586), 2011, 231-43.
- [9] S.D. Markowitz, M.M. Bertagnolli, *The New England Journal of Medicine*, **361**(25), 2009, 2449-2460.
- [10] E.R. Fearon, B. Vogelstein, *Cell*, **61**, 1990, 759-767.
- [11] M. Weiss. Your Guide to the Breast Cancer Pathology Report, *Breastcancer.org*, 2013.
- [12] B.M. Wolpin, R.J. Mayer, *Gastroenterology*, **134**(5), 2008, 1296-1310.
- [13] M. Watson, *Oxford University Press*, 2008.
- [14] The Cancer Genome Atlas Network, *Nature*, 2012. 61-70.
- [15] D.J. Slamon, W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin, S.G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, M.F., *Science*, **244**, 1989, 707-712.
- [16] M.J. Piccart-Gebarth et al, *The New England Journal of Medicine*, **353**(16), 2005, 1659-1672
- [17] A.R. Venkitaraman, *Cell*, **108**, 2002, 171-182.
- [18] <http://www.cancer.gov/types/breast/adjvant-fact-sheet>, acessado em Março 2015
- [19] I. Grivicich, A. Regner, A. Brondani da Rocha, *Revista Brasileira de Cancerologia*, **53**(3), 2007, 335-343.
- [20] B.G. De Saint and A. Fischer, *Curr. Opin. Immunol*, **13**, 2001, 549-554.
- [21] B. M. Wolpin, R.J. Mayer, *Gastroenterology*, **134**(5), 2008, 1296-1310.
- [22] A.M. Marques, A. Turner, R.A. Mello, *World Journal of Gastroenterology*, **20**(30), 2014, 10425-10431.
- [23] L.J.M. Oostendorp, P.F. Stalmeier, P.C. Pasker-de Jong, W.T. Van der Graaf, P.B. Ottevanger, *Anti-Cancer Drugs*, **21**(8), 2010, 749-758.
- [24] *Breast Cancer*. American Cancer Society, 2014.
- [25] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston, *Nature Reviews: Cancer*, **3**, 2003, 330-338.

- [26] R.H.J. Mathijssen, R.J. van Alphen, J. Verweij, W.J. Loos, K. Nooter, G. Stooter, A. Sparreboom, *Clinical Cancer Research*, **7**, 2011, 2182-2194.
- [27] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, *Pharmacological Reviews*, **56**, 2004, 185-229.
- [28] B.T. McGrogan, B. Gilmartin, D.N. Carney, A. McCann, *Biochimica et Biophysica Acta* **1785**, 2008, 96-132.
- [29] J. Gligorov, J.P. Lotz, *Oncologist*, **9**, 2004, 3-8.
- [30] B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature* **222**, 1969, 385-386.
- [31] J. Reedijk, *Chem. Commun.*, 1996. 801-806.
- [32] D.B. Zamble, S.J. Lippard, *Elsevier Science*, October, 1995, 435-439.
- [33] S. Faivre, D. Chan, R. Salinas, B. Woynarowska, J.M. Woynarowski, *Biochemical Pharmacology*, **66**, 2003. 225-237.
- [34] A.J. Di Pasqua, J. Goodisman, J.C. Dabrowiak, *Inorganica Chimica Acta*, **389**, 2012, 29-35.
- [35] Z.H. Siddik, *Oncogene*, **22**, 2003, 7265-7279.
- [36] A.M. Florea, D. Büsselberg, *Cancer*, **3**, 2011, 1351-1371.
- [37] B. Stordal, N. Pavlakis, R. Davey, *Cancer Treatment Reviews*, **33**, 2007, 347- 357.
- [38] X. Qiao, Z.-Y. Ma, C.-Z. Xie, F. Xue, Y.-W. Zhang, J.-Y. Xu, Z.-Y. Qiang, J.-S. Lou, G.-J. Chen, S.-P. Yan, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**, 2011, 728-737.
- [39] P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler, *Current Opinion in Chemical Biology*, **12**, 2008, 197-206.
- [40] M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, *Dalton Transactions*, 2008. 183-194.
- [41] J.M. Rademaker-Lakhai, C. Terret, S.B. Howell, C.M. Baud, R.F. de Boer, D. Pluim, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, J.-P. Droz, *Clinical Cancer Research*, **10**, 2004, 3386-3395.
- [42] K.R. Barnes, A. Kutikov, S.J. Lippard, *Chemistry & Biology*, **11**, 2004, 557-564.
- [43] W. Liu, R. Gust, *Chemical Society Revisions*, **42**(2) 2013, 755-771.
- [44] I. Ott, R. Gust, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **340**, 2007, 117 - 126.
- [45] A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel, *Metal ions in Life Sciences*, Springer, **13**, 2013.
- [46] C. Duncan, A. R. White, *Metallomics*, **4**, 2012, 127-138.
- [47] C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **9**, 2009, 185-211.
- [48] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, *Chemical Reviews*, **114**, 2014 815-862.
- [49] S.S. Bhat, A.A. Kumbhar, H. Heptullah, A.A. Khan, V.V. Gobre, S.P. Gejji, V.G. Puranik, *Inorganic Chemistry*, **50**, 2011, 545-558.
- [50] A. Kumar, J. Prakash Chinta, A.K. Ajay, M.K. Bhat, C.P. Rao, *Dalton Transactions*, **40**, 2011, 10865-10872.



- [51] A. Chakraborty, P. Kumar, K. Ghosh, P. Roy, *European Journal of Pharmacology*, **647**, 2010, 1–12.
- [52] A.-Y. Shen, S.-N. Wu, C.-T., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **51**, 1999, 543-548.
- [53] V. Milacic, P. Jiao, B. Zhang, B. Yan, *International Journal of Oncology*, **35**(6), 2009, 1481-91.
- [54] V. Gandin, M. Pellei, F. Tisato, M. Porchia, C. Santini, C. Marzano, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **16**(1), 2012, 142-151.
- [55] B.H. Geierstanger, T.F. Kagawa, S.-L. Chenll, G.J. Quigleyll, P.S. Ho, *The Journal of Biological Chemistry*, **266**(30), 1991, 2015-2019.
- [56] S.K. Bharti, G. Nath , R. Tilak , S.K. Singh, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 2010, 651–660.
- [57] N. Kocak, M. Sahin, I.H. Gubbuk, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers*, **22**, 2012, 852–859.
- [58] P. Bhowmik, M.G.B. Drew, S. Chattopadhyay, *Inorganica Chimica Acta*, **366**, 2011 62–67.
- [59] A.A. El-Sherif, T.M.A. Eldebss, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **79**, 2011 1803– 1814.
- [60] L. Canali, D.C. Sherrington, *Chemical Society Reviews*, **28**, 1999, 85–93.
- [61] M.E.S. Serra, D. Murtinho, A. Goth, A.M. d’A. R. Gonsalves, P.E. Abreu, A.C.C. Pais, *Chirality*, **22**, 2010, 425–431.
- [62] K. Matsumoto, B. Saito, T. Katsuki, *Royal Society of Chemistry. Chem. Commun.*, 2007, 3619–3627.
- [63] P. Adão, S. Barroso, F. Avecilla, M.C. Oliveira, J.C. Pessoa, *Journal of Organometallic Chemistry*, **760**, 2014, 212-223.
- [64] M.E.S. Serra, D. Murtinho, A. Goth, A.M.d’A.R. Gonsalves, P.E. Abreu, A.C.C. Pais, *Chirality*, **22**, 2010, 425–431.
- [65] J.E.Reed, A.A. Arnal, S. Neidle, R. Vilar, *Journal of American Chemical Society*, **128**, 2006, 5992-5993.
- [66] S. Routier, J.-L. Bernier, M.J. Waring, P. Colson, C. Houssier, C. Bailly., *Journal of Organic Chemistry*, **61**, 1996, 2326-2331.
- [67] K.I. Ansari, J.D. Grant, G.A. Woldemariam, S. Kasiri, S.S. Mandal, *Organic Biomolecular Chemistry*, **7**, 2009, 926–932.
- [68] K.I. Ansari, S. Kasiri, J.D. Grant, S.S. Mandal, *Journal of Biomolecular Screening*, **16**(11), 2011, 26-35.
- [69] K. I. Ansari, J. D. Grant, S. Kasiri, A. Woldemariam, B. Shrestha, S.S. Mandal, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **103**, 2009, 818–826.
- [70] A. Hille et al. *Journal of Biologic Inorganic Chemistry*, **14**, 2009, 711–725
- [71] D. Murtinho, Z N. da Rocha, A.S. Pires, R.P. Jiménez, A.M. Abrantes, M. Laranjo, A.C. Mamede, J.E. Casalta-Lopes, M.F. Botelho, A.A.C.C. Pais, S.C.C. Nunes, H.D. Burrows, T. Costa, M.E.S. Serra, *Applied Organometallic Chemistry*, 2015.
- [72] A. Meshkini, R. Yazdanparast, *Experimental and Molecular Pathology*, **89**, 2010 334–342

- [73] F.J. Fard, Z.M. Khoshkhoo, H. Mirtabatabaei, M.R. Housaindokht, R. Jalal, H.E. Hosseini, M.R. Bozorgmehr, A.A. Esmacili, M.J. Khoshkholgh, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **97**, 2012, 74–82.
- [74] G. Zhang, C. Ta, S.-Y. Cheng, J.A. Golen, A.L. Rheingold, *Inorganic Chemistry Communications*, **48**, 2014, 127–130.
- [75] A. Arola-Arnal, J. Benet-Buchholz, S. Neidle, R. Vilar, *Inorganic Chemistry*, **47**, 2008, 1910-11919.
- [76] T.A. Immel, M. Grützke, E. Batroff, U. Groth, T. Huhn, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **106**, 2012, 68–75.
- [77] H. Glasner, E.Y. Tshuva, *Inorganic Chemistry*, **53**, 2014, 3170–3176.
- [78] H. Glasner, E.Y. Tshuva, *Journal of the American Chemical Society*, **133**, 2011, 16812–16814.
- [79] R.P. Jiménez, Trabalho apresentado a Provas de Mestrado e Química na Universidade de Coimbra, 2013.
- [80] M.Z. Hernandez, S.M.T. Cavalcanti, D.R.M. Moreira, W.F.A. Junior, A.C.L. Leite, *Current Drug Targets*, **11**, 2010.
- [81] P. Metrangolo, H. Neukirch, T. Pilati, G. Resnati, *Accounts of Chemical Research*, **38**(5), 2005, 386-395
- [82] Y.-X. Lu, J.-W. Zou, J.-C. Fan, W.-N. Zhao, Y.-J. Jiang, Q.-S. Yu, *Journal of Computational Chemistry*, **30**(5), 2008, 725-732.
- [83] D.M.B Murtinho, Dissertação apresentada para a Provas de Doutorado em Química na Universidade de Coimbra, 2006
- [84] J.C. Duff, E.J. Bills. *Journal of Chemical Society*, 1932, 1987-1988
- [85] J.C. Duff, E.J. Bills, *Journal of Chemical Society*, 1934, 1305-1308
- [86] L.F. Lindoy, G.V. Meehan, N. Svenstrup, *SYNTHESIS*, **7**, 1998, 1029-1032
- [87] M.B. Smith, J. March, *John Wiley & Sons*, 6ed, 2007,
- [88] G.B. Kauffman, R.D. Myers, *Journal of Chemical Education*, **52**, 1975, 777-781
- [89] M.E.S. Serra, Dissertação apresentada para a Provas de Doutorado em Química na Universidade de Coimbra, 1998
- [90] J. Casalta-Lopes. *Journal of Cancer Therapy*, **2**(3), 2011, 408-417.
- [91] P.L. Olive, J.P. Banáth, *Nature Protocols*, **1**(1), 2006, 23-9
- [92] G.P. Pfeifer, *Plenum Press*, 1996
- [93] A. Newbold, B.P. Martin, C. Cullinane, Michael Bots. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2014, 1196-1202
- [94] C.M. Cowan et al. *The Journal of Neuroscience*, **21**(18), 2001, 7099–7109
- [95] R. Fox, M. Aubert. *Methods in Molecular Biology*, **414**, 2008,47-56
- [96] M. Ilyas, I.P. Tomlinson, A. Rowan, M. Pignatelli, W.F. Bodmer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**(19), 1997.
- [97] S.E. Pratt, M.N. Pollak, *CANCER RESEARCH*, **53**, 1993, 5193-5198.

- [98] A.F. Gazdar, V. Kuravri, A. Virmani, L. Gollahon, M. Sakaguchi, M. Westerfield, D. Kodagoda, V. Statsny, H.T. Cunningham, I.I. Wistuba, G. Tomlinson, V. Tonk, R. Ashfaq, A.M. Leitch, J.D. Minna, J.W. Shay, *International Journal of Cancer*, **78**, 1998, 766-774.
- [99] K.D. Sarma, D. Ray, A. Antony, *Cytotechnology*, **32**(2), 2000, 93-95.
- [100] H. Vierheilig, P. Shweiger, M. Brundrett, *Physiologia Platarum*, 2005.
- [101] N.S. Sánchez, M. Königsberg, *BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY EDUCATION*, **34**(3), 2006, 209–212.
- [102] S.P Langdon, *Humana Pre. Ed. New Jersey*.
- [103] A.A. Tavares, J.M. Tavares, *Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante*, 2009.
- [104] T. Lopes, *Citometria de Fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos*, 2002.
- [105] E. Bedner, X. Li, W. Gorczyca, M.R. Melamed, Z. Darzynkiewicz, *Cytometry*, **35**(3), 1999, 181-195.
- [106] L. Peng, H. Jiang, C. Bradley, *Journal of West China University of Medical Sciences*, **32** (4), 2001, 602-620.
- [107] Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota, F. Traganos, *Cytometry*, **13**(8), 1992, 795-808.
- [108] K.A. Schafer, *Veterinary Pathology*, **35**(6), 1998, 461-478.
- [109] K. Vermeulen, D.R. Van Bockstaele, Z.N. Berneman, *Cell Proliferation*, **36**(3), 2003, 131-149.
- [110] H.A. Crissman, J.A. Steinkamp, *The journal of cell biology*, **59**(3), 1973, 766-771.



