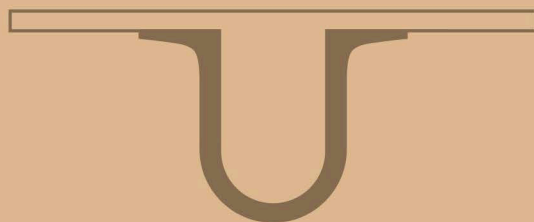




UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Juliana Gonçalves Araújo

COMPLEXOS DE COBRE DERIVADOS DO IMIDAZOLE:
SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Dissertação de Mestrado em Química Medicinal,
orientada pela Professora Doutora Dina Maria Bairrada Murtinho
e pela Professora Doutora Ana Salomé Pires,
apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

COMPLEXOS DE COBRE DERIVADOS DO IMIDAZOLE:
SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Juliana Gonçalves Araújo

Dissertação de Mestrado na área científica de Química Medicinal orientada pela Professora Doutora Dina Murtinho e pela Professora Doutora Ana Salomé Pires e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser..., mas, graças a Deus, não somos mais o que éramos”

Martin Luther King

Agradecimentos

Com a chegada ao fim de mais uma etapa, gostaria de expressar os meus agradecimentos a todos que, ao longo deste tempo, me acompanharam e contribuíram para a realização deste trabalho.

O trabalho apresentado, nesta dissertação, foi realizado no grupo de Química Orgânica, no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra em parceria com o Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Gostaria de começar por agradecer à Professora Doutora Dina Murtinho, na qualidade de orientadora, por me ter aceite para a realização deste trabalho, pela transmissão de conhecimentos e aperfeiçoamento dos meus métodos de trabalho laboratorial, e pela disponibilidade total ao longo de todo o ano. Agradeço a simpatia e calma que transmitia, porque foram importantes nesta fase, não esquecendo da ajuda prestada na escrita desta dissertação.

À Professora Doutora Maria Elisa Serra, agradeço todo o apoio prestado, pelas dúvidas esclarecidas e simpatia ao longo deste ano.

À Professora Doutora Ana Salomé Pires, no papel de orientadora, agradeço a oportunidade de realizar uma parte do meu trabalho no Instituto de Biofísica, a orientação científica e integração no grupo, a transmissão dos seus conhecimentos e críticas que aperfeiçoaram o meu trabalho, a simpatia e amizade, assim como a paciência em determinados momentos. Agradeço também pela realização da análise estatística, assim como o apoio prestado na escrita deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes agradeço a colaboração no trabalho laboratorial e a boa disposição, e à Professora Doutora Maria Filomena Botelho agradeço a revisão rigorosa deste documento. A ambas também agradeço a oportunidade dada para a realização da segunda parte do meu trabalho no grupo.

Agradeço à Doutora Ana Cristina Gonçalves, a ajuda prestada na técnica de citometria de fluxo, e ao Mestre Paulo Teixeira pela colaboração no trabalho laboratorial, nomeadamente nos estudos de morfologia, realizados no Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra.

À Mestre Sílvia Gramacho, agradeço a simpatia e a disponibilidade ao longo do trabalho e ao Mestre Pedro Cruz pelos estudos de ressonância magnética nuclear.

Agradeço a todas as pessoas do Grupo de Química Orgânica da Universidade de Coimbra, a forma como me integraram no grupo, os ensinamentos, o apoio prestado ao longo de todo o trabalho desenvolvido e o bom ambiente de trabalho. Um especial agradecimento aos meus colegas e amigos, Patrícia Santos, Cláudia Alves e João Simões por estarem sempre presentes, nesta fase tão importante e também à Dona Lurdes, pela sua simpatia e boa disposição.

A todos os colegas do Instituto de Biofísica, especialmente à Mestre Rita Neves, Mestre Ricardo Teixo, Beatriz Serambeque, Rosana Martins, Beatriz Lopes e Catarina Ferreira, quero-lhes agradecer a integração no grupo, aos conhecimentos transmitidos nos testes *in vitro*, ao apoio, à descontração e boa disposição, fundamentais num ambiente de trabalho.

A toda a minha família e amigos, agradeço por estarem sempre presentes, pelo apoio e força demonstrados, contribuindo para a continuação desta caminhada.

Por fim, o obrigada especial vai para os meus pais e irmã Alexandra, as pessoas mais importantes da minha vida. Agradeço o facto de estarem sempre presentes, o apoio incondicional tanto nos bons como nos maus momentos, as preocupações e todos os sacrifícios. Agradeço o amor, a força, o orgulho do meu percurso, a motivação para nunca desistir e a oportunidade dada para ter chegado até aqui.

Índice

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas.....	xi
Índice de Esquemas.....	xiii
Abreviaturas	xv
Resumo.....	xix
Abstract	xxi
Introdução.....	1
1.1 Cancro	3
1.1.1 Cancro colorretal.....	4
1.1.2 Cancro da mama	7
1.2 Tratamento do cancro.....	8
1.2.1 Quimioterapia no cancro colorretal.....	9
1.2.2 Quimioterapia do cancro da mama	13
1.2.3 Tipos de morte celular	16
1.3 Complexos Metálicos	18
1.3.1 Complexos de Platina	18
1.3.2 Complexos metálicos alternativos à platina	20
1.3.3 Complexos de cobre.....	23
1.4 Imidazóis	25
1.4.1 Imidazóis como inibidores da topoisomerase.....	26
1.4.2 Imidazóis como inibidores da polimerização dos microtúbulos	28
1.4.3 Imidazóis como inibidores do citocromo P450	29
1.4.4 Imidazóis como inibidores do TGF- β	29
1.4.5 Imidazóis que atuam diretamente no DNA.....	30
Síntese de Complexos de Cu(II) derivados do Imidazole	33
2.1 Síntese de derivados do 4-nitroimidazole.....	36
2.1.1 Síntese de 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole	37
2.1.2 Síntese de ligandos derivados do 4-nitroimidazole	37
2.2 Síntese de derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole	38
2.3 Síntese de derivados de benzoimidazole	40
2.3.1 Síntese do 1-(2-bromoetil)-1 <i>H</i> -benzoimidazole.....	40

2.3.2 Síntese do 2-(1 <i>H</i> -benzoimidazole-1-il)etil)ciclo-hexilamina.....	41
2.3.4 Tentativa de síntese de (1 <i>H</i> -benzoimidazol-1-il)metanamina	43
2.4 Síntese dos complexos de Cu(II) derivados de imidazóis	44
2.4.1 Síntese dos complexos Cu (II) derivados do 4-nitroimidazole e do benzoimidazole	44
2.4.2 Síntese de complexos de Cu(II) derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole	45
Estudos <i>in vitro</i>	47
3.1 Determinação da proliferação celular.....	49
3.2 Avaliação da viabilidade celular	53
3.3 Avaliação do ciclo celular	57
3.4 Stresse oxidativo	59
3.5 Estudo de hemocompatibilidade	62
Conclusão	67
Experimental	73
5.1 Técnicas de identificação e caracterização	75
5.2 Purificação e Secagem dos Solventes e Reagentes.....	76
5.3 Métodos sintéticos.....	77
5.3.1 Síntese de 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole (2.2)	77
5.3.2 Síntese dos ligandos derivados do 4-nitroimidazole.....	78
5.3.3 Síntese dos ligandos derivados do 1-(3-aminopropil) imidazole	80
5.3.4 Síntese do 1-(2-bromoetil)-1 <i>H</i> -benzoimidazole (2.12).....	82
5.3.5 Síntese do 2-(1 <i>H</i> -benzoimidazole-1-il)etil)ciclohexilamina (2.13)	82
5.3.6 Síntese de 2-(clorometil)-1 <i>H</i> -benzimidazole (2.15)	83
5.3.7 Síntese de Complexos de Cu(II)	84
5.4 Estudos <i>in vitro</i>	86
5.4.1 Culturas celulares	86
5.4.2 Avaliação da citotoxicidade.....	88
5.4.3 Análise estatística.....	95
Referências	97

Índice de Figuras

Figura 1.1 Genes e vias de sinalização envolvidos na formação e desenvolvimento do cancro colorretal.....	6
Figura 1.2 Anabolismo e catabolismo do 5-FU	11
Figura 1.3 Vias metabólicas do irinotecano	12
Figura 1.4 Estrutura de quatro antraciclina, doxorubicina, daunarrubicina, epirubicina e idarrubicina	15
Figura 1.5 Processos que conduzem à morte celular	17
Figura 1.6 Estrutura química do imidazole	25
Figura 1.7 Estruturas das formas de ressonância do imidazole.....	26
Figura 3.1 Curvas de dose-resposta da atividade metabólica nas linhas celulares tumorais.....	50
Figura 3.2 Curvas de dose resposta da atividade metabólica do 2.13 e 2.20.....	53
Figura 3.3 Viabilidade das linhas celulares tumorais	54
Figura 3.4 Análise morfológica das linhas celulares tumorais HCC1806 e LS1034.....	56
Figura 3.5 Viabilidade das linhas celulares de tecido normal	57
Figura 3.6 Ciclo celular das linhas tumorais.....	58
Figura 3.7 Avaliação da produção de peróxidos intracelulares	60
Figura 3.8 Avaliação da produção intracelular do radical superóxido.....	60
Figura 3.9 Avaliação da produção intracelular de GSH.....	61
Figura 3.10 Quantificação da libertação de hemoglobina	62
Figura 5.1 Câmara de Neubauer ou hemocitómetro.....	88
Figura 5.2 Estruturas químicas do MTT e dos cristais de formazan resultantes das células metabolicamente ativas.....	89

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 Rendimento dos complexos de Cu(II) derivados do 4-nitroimidazole e benzoimidazole	45
Tabela 3.1 Valores de IC ₅₀ dos complexos de Cu(II) testados nas quatro linhas celulares	51
Tabela 3.2 Valores de IC ₅₀ do complexo de Cu(II) derivado do benzoimidazole 2.20 e dos fármacos usados na quimioterapia convencional	52
Tabela 5.1 Valores de IC ₅₀ do composto 2.20 , para cada respetiva linha celular	91

Índice de Esquemas

Esquema 2.1 Representação da síntese do imidazole realizado por Heinrich Debus.....	36
Esquema 2.2 Representação da síntese do 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole a partir do 4-nitroimidazole.....	37
Esquema 2.3 Esquema da síntese e rendimentos dos ligandos derivados do 4-nitroimidazole a partir do 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole.....	38
Esquema 2.4 Esquema da síntese dos ligandos derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole.....	39
Esquema 2.5 Síntese de 1-(2-bromoetil)-1 <i>H</i> -benzoimidazole a partir do benzoimidazole.....	40
Esquema 2.6 Síntese de 2-(1 <i>H</i> -benzoimidazole-1-il)etil)ciclo-hexilamina a partir de 1-(2-bromoetil)-1 <i>H</i> -benzoimidazole.....	41
Esquema 2.7 Representação da síntese de 2-(clorometil)-1 <i>H</i> -benzoimidazole a partir de <i>o</i> -fenilenodiamina.....	42
Esquema 2.8 Representação da síntese de 2-(clorometil)-1 <i>H</i> -benzoimidazole a partir de <i>orto</i> -fenilenodiamina usando cloroacetato de metilo.....	43
Esquema 2.9 Representação da síntese de (1 <i>H</i> -benzoimidazol-1-il)metanamina a partir de <i>o</i> -fenilenodiamina.....	43
Esquema 2.10 Esquema da síntese dos complexos de Cu(II) derivados do 4-nitroimidazole e do benzoimidazole.....	44
Esquema 2.11 Síntese dos complexos de Cu(II) derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole.....	46

Abreviaturas

15-PGDH	<i>15-prostaglandin dehydrogenase</i>
5-FU	<i>5-Fluorouracil</i>
ALK5	<i>Like kinase 5 activin</i>
AnV	<i>Anexina V</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BRCA1	<i>Breast cancer gene 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer gene 2</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
DACH	<i>1,2-diaminocyclohexane</i>
DBU	<i>1,8-Diazacyclo[5.4.0]undec-7-ene</i>
DCF	<i>2',7'-dichlorofluorescein</i>
DCH ₂ -DA	<i>2',7'-dichlorohydrofluorescein</i>
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DHFU	<i>5,6-dihydro-5-fluorouracil</i>
DMF	<i>Dimethylformamide</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DPD	<i>Di-hydropyrimidine deshydrogenase</i>
Dttp	<i>Deoxythymidine triphosphate</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FdUMP	<i>Fluorodeoxyuridine monophosphate</i>
FdUTP	<i>Fluorodeoxyridine triphosphate</i>

FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FUTP	<i>Fluorouridine triphosphate</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IGFBP	<i>Insuline growth factor binding protein</i>
IP	Iodeto de Propídeo
IV	Infra-vermelho
K-Ras	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NOS	<i>Nitrogen oxide species</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PI3KCA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alfa</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrossarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RIP3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear protónica
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
TNM	<i>Tumor node metastasis</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i>
TMS	Tetrametilsilano
TP53	<i>Cellular tumor antigen p53</i>
TS	Thymidylate synthase
UGTIAI	<i>Hepatic uridine diphosphate glucuronosyltransferase IA1</i>
VEGF	<i>Vascular endotelial growth factor</i>

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

d – Duplete

m – Multiplete

s – Singuleto

t - Tripleto

Resumo

Os cancros colorretal e da mama são muito frequentes e uma das principais causas de mortalidade. Atualmente, para além dos fármacos usados nos tratamentos de quimioterapia destes cancros, como o 5-FU, o irinotecano, etc, são também usados três complexos metálicos, a cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina. No entanto, estas opções quimioterapêuticas apresentam efeitos adversos e as células tumorais têm tendência a desenvolver resistência aos fármacos. Sendo assim, existe a necessidade de desenvolver novos agentes mais eficientes para quimioterapia.

Num trabalho anterior, realizado na Unidade de Biofísica da Universidade de Coimbra, em parceria com o grupo de Orgânica do Departamento de Química, foram desenvolvidos complexos de ^{99m}Tc , modificados com ligandos derivados do 4-nitroimidazole com o objetivo de serem usados na deteção de hipoxia tumoral. Os resultados revelaram que os complexos conseguiam atravessar a membrana celular e acumular nas células tumorais, postulou-se a hipótese de que a substituição do tecnécio por cobre poderia conferir atividade citotóxica aos complexos. Estudos anteriores revelaram que os complexos de Cu(II) apresentavam atividade antitumoral, sendo capazes de provocar morte celular, e que alguns imidazóis e derivados apresentam atividade farmacológica, incluindo atividade antitumoral.

Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo a síntese de novos complexos de Cu(II) derivados do imidazole e posterior avaliação da sua atividade antitumoral, com recurso a testes *in vitro*, nas linhas celulares de cancro colorretal, LS1034 e WiDr, e da mama, MCF-7 e HCC1806.

Numa primeira fase, sintetizaram-se complexos de Cu(II) derivados do imidazole, partindo do 4-nitroimidazole, do 1-(3-aminopropil)imidazole e do benzoimidazole. Os ligandos derivados do 4-nitroimidazole e do benzoimidazole foram preparados numa sequência sintética de dois passos, a partir dos seus precursores (1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole e o 1-(2-bromoetil)-1H-benzoimidazole, respetivamente) sendo posteriormente reagidos com aminas. Os ligandos derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole foram preparados por reação deste imidazole com diferentes salicilaldeídos: bromados, clorados e mono ou dissustituídos. Os ligandos foram complexados com acetato de cobre mono-hidratado, originando os complexos de Cu(II) correspondentes.

Na segunda parte do trabalho foi avaliada a atividade antitumoral dos complexos de Cu(II) sintetizados, nas quatro linhas celulares tumorais. Foi determinada a atividade metabólica das células, após tratamento com os complexos, e calculados os valores de IC₅₀ (do inglês *half maximal inhibitory concentration*) a partir das curvas dose-resposta. Os complexos de Cu(II) derivados do 4-nitroimidazole e do benzoimidazole, modificados com um grupo ciclo-hexilamina, apresentaram uma maior atividade antiproliferativa, especialmente o último complexo, com valores de IC₅₀ entre 1,2 e 6,57 µM, nas quatro linhas celulares. De salientar que estes valores de IC₅₀, nalguns casos, são mais baixos que os obtidos para fármacos já usados na prática clínica. Em termos de relação estrutura-atividade e com base nos resultados de estudos de proliferação celular, conclui-se que a presença de um grupo ciclo-hexilamina na estrutura dos compostos poderá ser responsável pela maior atividade antitumoral dos complexos.

Utilizando o complexo que apresentou melhores valores de IC₅₀, realizaram-se estudos de viabilidade e ciclo celular. Para todas as linhas celulares, verificou-se que a viabilidade das células diminuía na presença do complexo e era acompanhada por morte celular, necrose. Avaliou-se ainda o stresse oxidativo, pela medição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da produção intracelular da defesa antioxidante GSH, nas linhas celulares HCC1806 e LS1034. Aparentemente o complexo induz alterações nos níveis de ROS e GSH, que denotam a possível existência de stresse oxidativo, sendo necessário estudos mais detalhados.

Adicionalmente, fizeram-se estudos de seletividade em duas linhas celulares de tecido normal, HFF1 e CCD841 CoN. Os resultados revelaram que o composto mais citotóxico possui alguma seletividade para as células tumorais, uma vez que a diminuição da viabilidade das células normais não foi tão acentuada. Foi ainda realizado um estudo de hemocompatibilidade, por quantificação da hemoglobina libertada. O estudo revelou que o composto não apresenta atividade hemolítica, uma vez que a libertação de hemoglobina foi quase nula, o que demonstra a manutenção da integridade da membrana dos eritrócitos.

Com base nos resultados, o complexo de Cu(II) do benzoimidazole modificado com ciclo-hexilamina pode vir a ser promissor no tratamento do cancro, especialmente em casos de quimiorresistência.

Abstract

Colorectal and breast cancer are very common and one of the main causes of mortality. Currently, in addition to the drugs used in chemotherapy treatments, such as 5-FU, irinotecan, etc., three metal complexes, cisplatin, carboplatin and oxaliplatin are also used. However, these chemotherapeutic options have adverse effects and tumor cells have tendency to develop drug resistance. Thus, there is a need to develop new more effective chemotherapy agents.

In previous work carried out at the Biophysics Unit of the University of Coimbra, in collaboration with the Organic group from the Department of Chemistry, ^{99m}Tc complexes modified with 4-nitroimidazole derived ligands were developed, with the purpose of being used in the detection of tumoral hypoxia. The results revealed that the complexes were able to cross the cell membrane and accumulate in tumor cells. It was hypothesized that the replacement of technetium by copper could confer cytotoxic activity to the complexes. Previous studies have revealed that Cu(II) complexes have antitumor activity, being able to cause cell death, and that some imidazoles and derivatives have pharmacological activity, including antitumor activity.

In this context, this dissertation aimed at the synthesis of new Cu(II) complexes derived from imidazole and their subsequent evaluation of their antitumor activity, using in vitro tests in colorectal, LS1034 and WiDr, and breast, MCF-7 and HCC1806, cancer cell lines.

Firstly, Cu(II) complexes derived from imidazole were synthesized, starting from 4-nitroimidazole, 1-(3-aminopropyl)imidazole and benzoimidazole. The 4-nitroimidazole and benzoimidazole derived ligands were prepared in a two-step synthetic sequence from their precursors (1-(2-bromoethyl)-4-nitroimidazole and 1-(2-bromoethyl)-1H-benzoimidazole, respectively) being subsequently reacted with amines. Ligands derived from 1-(3-aminopropyl)imidazole were prepared by reacting it with different salicylaldehydes: brominated, chlorinated and mono or disubstituted. The ligands were complexed with copper acetate monohydrate, yielding the corresponding Cu(II) complexes.

In the second part of the work the antitumor activity of the synthesized Cu(II) complexes was evaluated in the four tumor cell lines. The metabolic activity of the cells was determined, after treatment with the complexes, and the IC_{50} values (mean inhibitory concentration) were calculated from the dose-response curves. The Cu(II) complexes derived from 4-nitroimidazole and

benzoimidazole, modified with a cyclohexylamine group, had higher antiproliferative activity, especially the latter complex, with IC_{50} values between 1.2 and 6.57 μ M, in the four cell lines. It should be noted that these IC_{50} values, in some cases, are lower than those obtained for drugs already used in clinical practice. In terms of structure-activity relationship and based on the results of cell proliferation studies, it may be concluded that the presence of the cyclohexylamine group may be responsible for the greater antitumor activity of these complexes.

Viability and cell cycle studies were carried out, using the complex that presented the best IC_{50} values. For all cell lines, cell viability was found to decrease in the presence of the complex, resulting in cell death by necrosis. Oxidative stress was also evaluated by measuring the production of reactive oxygen species (ROS) and the intracellular production of the GSH antioxidant defense in HCC1806 and LS1034 cell lines. Apparently, the complex induces changes in the ROS and GSH levels, which indicate the possible existence of oxidative stress. More detailed studies will be necessary.

Additionally, selectivity studies on two normal tissue cell lines, HFF1 and CCD841 CoN, were carried out. The results revealed that the most cytotoxic compound has some selectivity for tumor cells, since the decrease in viability of normal cells was not as significant. A hemocompatibility study was also done by quantification of the released hemoglobin. The study showed that the compound does not exhibit hemolytic activity, since the release of hemoglobin was almost nil, which demonstrates the maintenance of erythrocyte membrane integrity.

Based on the results, the Cu(II) complex of benzoimidazole modified with cyclo-hexylamine may be promising in cancer treatment, especially in cases of chemoresistance.

CAPÍTULO I

Introdução

1. Introdução

1.1 Cancro

No processo normal de crescimento celular, as células crescem e por mitose dividem-se, formando novas células. Durante esta etapa existem mecanismos de controlo e regulação do crescimento celular de forma a que a divisão celular decorra corretamente. Contudo, anomalias neste processo levam a uma proliferação anormal e multiplicação das células surgindo assim, o cancro. Por vezes, as células cancerígenas podem libertar-se do tumor primário, entrando na corrente sanguínea ou no sistema linfático e invadem outros tecidos e órgãos, mais ou menos distantes, levando ao surgimento de metástases – processo de metastização.¹

Atualmente, o cancro é umas das principais causas de mortalidade e morbilidade a nível mundial e a tendência é para o aumento do número de casos, com previsão de cerca de 21,4 milhões de novos casos de cancro e aproximadamente 13,3 milhões de mortes até 2030.²

Vários são os fatores de risco que aumentam a probabilidade de uma pessoa vir a desenvolver cancro, sendo os mais comuns o envelhecimento, a má alimentação, o tabagismo, o sedentarismo, a obesidade, a exposição solar, a exposição a determinadas substâncias cancerígenas e o consumo excessivo de álcool.^{3,4}

Mundialmente, os tipos de cancro com maior incidência são o cancro do pulmão, da mama, colorretal e da próstata. Em termos de mortalidade em países desenvolvidos, o cancro do pulmão e o cancro da mama são os mais mortais para o género masculino e feminino, respetivamente. Também os cancros da próstata e colorretal apresentam uma elevada taxa de mortalidade no género masculino nestes países. Nos países menos desenvolvidos, o cancro do pulmão, do fígado e do estômago são os mais mortíferos para o género masculino e o cancro do útero para o género feminino.³

Relativamente a Portugal, os últimos dados disponibilizados demonstram que o número de novos casos está a aumentar, estimando-se que em 2035 estará acima dos 60000. Esse aumento deve-se sobretudo ao envelhecimento da população, resultante do aumento da taxa de sucesso no tratamento do cancro e de outras patologias, podendo levar ao aparecimento de novos cancros.

Associados também a este aumento estão as alterações dos estilos de vida, assim como, os fatores de risco já mencionados anteriormente. À semelhança do que acontece nos países desenvolvidos, em Portugal o cancro da mama é o que apresenta maior incidência no género feminino, seguindo-se do cancro colorretal e depois o cancro do colo do útero. No género masculino, o cancro da próstata é o que apresenta o maior número de casos, seguido do cancro colorretal e depois o cancro do pulmão. Em termos de mortalidade, no caso das mulheres, o cancro da mama é o mais mortífero, em segundo o cancro colorretal e por último o cancro do colo do útero. Relativamente ao género masculino, o cancro do pulmão é o mais mortal, seguindo-se o cancro da próstata e depois o cancro colorretal.⁴

1.1.1 Cancro colorretal

Como já mencionado, o cancro colorretal é um dos tipos de cancro com maior incidência e com uma taxa de mortalidade elevada tanto em Portugal como a nível mundial. Em 2012, no mundo, foram diagnosticados aproximadamente 1,4 milhões de novos casos de cancro colorretal e estima-se que em 2035 o número de casos aumentará para 2,4 milhões.⁵

Aproximadamente 90% dos novos cancros colorretais são diagnosticados em pessoas com idade superior a 50 anos, com uma idade média de diagnóstico de 69 anos. Os doentes podem apresentar sintomas como a presença de sangue nas fezes, a alteração do seu calibre, a perda de peso inexplicável, sinais de obstrução ou perfuração intestinal, dor abdominal e anemia.^{5,6}

O cólon é dividido em quatro secções: o ascendente, o transversal, o descendente e o sigmoide, sendo que é neste último segmento que é mais frequente surgir o cancro colorretal. A maioria dos cancros colorretais desenvolve-se a partir de pólipos adenomatosos ou adenomas que progridem para cancros invasivos.⁷

O cancro pode confinar-se à parede do cólon, que é o que acontece nos dois primeiros estádios da doença ou então metastizar. Segundo a classificação TNM (do inglês *tumor node metastasis*), no estágio I, o tumor não chega a atingir a parede exterior do cólon. Já no estágio II, o tumor desenvolve-se no interior da parede do cólon ou do reto, podendo invadir tecidos circundantes, mas sem conseguir chegar aos gânglios linfáticos. Estes dois estádios são tratáveis, contudo se não o forem, o cancro evolui para o estágio III, em que o tumor se espalha para os gânglios linfáticos vizinhos e, mais tarde, evolui para o estágio IV caracterizado pela metastização à distância.^{8,9}

Esta patologia desenvolve-se como resultado de alterações genéticas e epigenéticas mas também devido a fatores ambientais. Pode ocorrer como familiar, hereditário ou esporádico. Menos de 10% dos casos são referentes ao cancro colorretal hereditário, cerca de 25% estão relacionados com a forma familiar e aproximadamente 70% de todos os cancros dizem respeito à forma esporádica.¹⁰

A instabilidade genómica, a inativação de genes supressores tumorais, a ativação de vias oncogénicas e a sobreexpressão de fatores de crescimento são algumas causas que despoletam o processo de carcinogénese do cancro colorretal.⁹

A instabilidade genómica envolve três mecanismos moleculares: a instabilidade cromossomal, defeitos na reparação do DNA (do inglês *Desoxyribonucleic acid*) e metilação aberrante do DNA. A instabilidade cromossomal é o tipo de instabilidade genómica mais comum no cancro colorretal, sendo que os genes mais afetados são o *APC* (do inglês *adenomatous polyposis coli gene*), o *TP53* (do inglês *cellular tumor antigen p53*) e o *KRAS* (do inglês *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), sendo o *APC* o gene mais frequentemente mutado no cancro colorretal. A perda da função de reparação de erros no DNA está associada à instabilidade de microssatélites, onde ocorre uma mudança do número de unidades de nucleótidos repetidos de DNA em microssatélites, causando inativação de genes que têm a capacidade de reparar erros. Relativamente à metilação aberrante do DNA, no cancro colorretal ocorre uma grande depleção da metilação das citocinas mas uma aquisição de uma metilação aberrante de determinados promotores associados às ilhas CpG, que induz a expressão de genes silenciadores.^{9,10}

Uma das mudanças genéticas causadas pelo cancro colorretal é a ativação da via de sinalização Wnt, que ocorre quando a oncoproteína β -catenina se liga a estruturas nucleares (membros da família do fator potenciador de linfócitos), promovendo um fator de transcrição que regula os genes envolvidos na ativação celular. Um componente do complexo formado pela oncoproteína β -catenina, o APC, tem um papel importante na degradação da β -catenina. Um outro supressor tumoral é o *TP53* que regula o ciclo celular e os *checkpoints* de morte celular, podendo ser ativado por diversas alterações celulares. A sua inativação frequentemente diz respeito à transição dos adenomas para cancros invasivos.⁹

O cancro colorretal também pode surgir a partir da ativação de vias oncogénicas, com interferência de oncogenes como *RAS* (do inglês *rat sarcoma viral oncogene homolog*), do *BRAF* (do inglês *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) e do *PI3KCA* (do inglês *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alfa*). Mutações nos genes *RAS* e *BRAF* ativam a via de sinalização MAPK (do inglês *mitogen-activated protein kinase*). Enquanto que a proteína *RAS*, principalmente *KRAS*, ativa a atividade GTPase que sinaliza diretamente a *RAF* (do inglês *rapidly accelerated fibrosarcoma*), mutações em *BRAF* sinalizam a atividade cinase treonina-serina da

BRAF, que mais tarde conduz à cascata de sinalização do MAPK. Mutações nos genes que expressam na PI3KCA incluem uma perda da proteína PTEN (do inglês *phosphatase and tensin homolog*), que é um inibidor da via de sinalização PI3K (do inglês *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*).⁹

Por último, os fatores de crescimento também têm um papel importante no aparecimento do cancro colorretal. Um aumento da atividade da enzima COX-2 (do inglês *cyclooxygenase-2*) leva à síntese de prostaglandina E2, que é um agente fortemente associado ao cancro colorretal. Também a proteína EGF (do inglês *epidermal growth factor*) e o seu recetor EGFR (do inglês *epidermal growth factor receptor*), são encontrados em vários subgrupos deste tipo de cancro, em que o recetor medeia a sinalização através da ativação das cascatas de sinalização MAPK e PI3K. O VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*) é um fator de crescimento que também está associado ao cancro colorretal, sendo responsável pela angiogénese.⁹

Na figura 1.1, estão representados os mecanismos envolvidos na formação e no desenvolvimento do cancro ao nível do intestino.

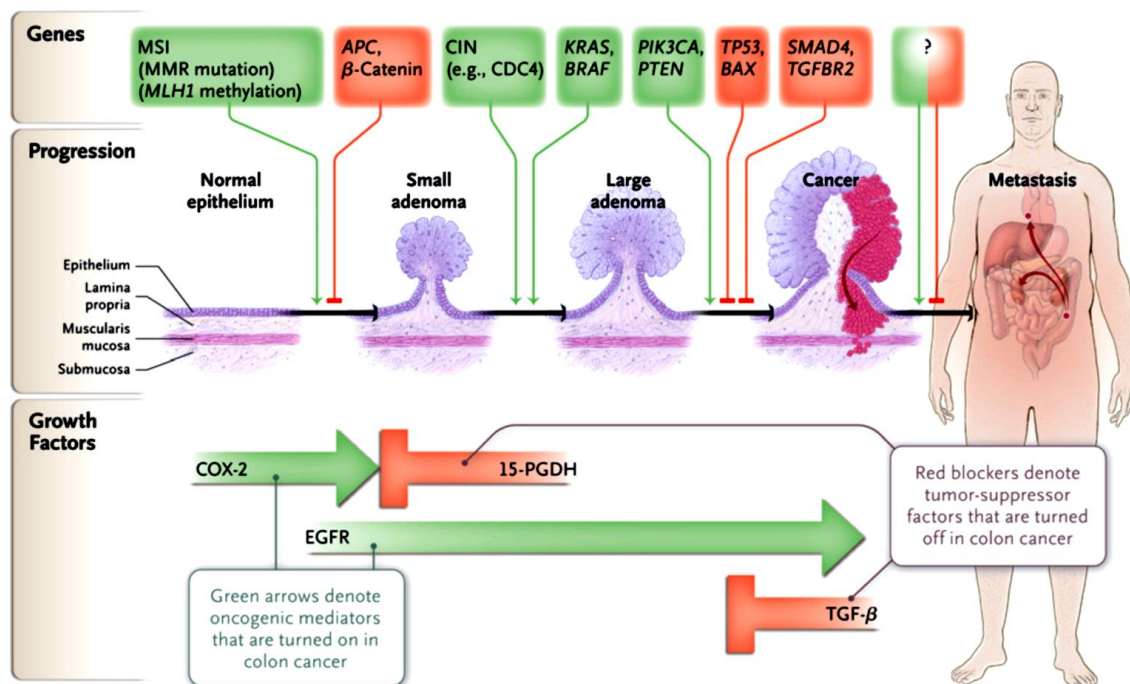


Figura 1.1 Genes e vias de sinalização envolvidos na formação e desenvolvimento do cancro colorretal. Como genes supressores tumorais destacam-se o APC e TP53 e como oncogenes o KRAS e BRAF. As vias oncogénicas ativam a via de sinalização MAPK, que por sua vez induz o aumento da expressão da proteína PI3K, conduzindo a um aumento da proliferação e diferenciação celular descontroladas. Relativamente aos fatores de crescimento, a COX-2 e o EGFR (do inglês *epidermal growth factor receptor*) promovem o desenvolvimento do tumor, sendo que a COX-2 produz prostaglandina E2, que está fortemente relacionada com o cancro colorretal, que depois é degradada pela 15-PGDH.⁹

1.1.2 Cancro da mama

A nível mundial, o cancro da mama é um dos tipos de cancro mais comuns, estimando-se que em 2015 aproximadamente 570000 doentes morreram. Cerca de 1,5 milhões de mulheres, representando 25% de todas as mulheres com cancro, são diagnosticadas por ano em todo o mundo. Só em Portugal, anualmente são detetados cerca de 6000 novos casos de cancro da mama, e cerca de 1500 mulheres morrem devido a esta patologia. Contudo, esta doença não afeta só as mulheres. Os cancros da mama em homens representam 1% de todos os cancros da mama.^{4,11}

Vários são os fatores que aumentam a probabilidade de se ter cancro da mama, entre eles a idade, a história familiar, as alterações genéticas, o consumo de bebidas alcoólicas, o sedentarismo, níveis altos de determinadas hormonas, a primeira menstruação numa idade prematura, a gravidez já numa idade avançada, entre outros.¹²

Os tumores na mama normalmente aparecem a partir de uma hiperproliferação ductal ou dos lóbulos, glândulas produtoras de leite, que pode desencadear o surgimento de tumores benignos que poderão evoluir para tumores malignos, após uma permanente estimulação de fatores carcinogénicos.¹¹

Pela necessidade de escolher o tratamento mais adequado para combater o cancro da mama, este é classificado em cinco estádios de acordo com a classificação TNM. O estágio 0 corresponde a cancros da mama não invasivos, como o carcinoma lobular *in situ* (CLIS) ou o carcinoma ductal *in situ* (CDIS), no estágio I ocorre a invasão para o tecido mamário, nos estádios II e III as células cancerígenas já invadiram os gânglios linfáticos, geralmente os axilares, e o estágio IV correspondente ao cancro da mama avançado ou metastático, onde o tumor já se espalhou para outras partes do corpo.¹³

Existem duas hipóteses para a iniciação e a progressão do cancro da mama: a teoria das células estaminais cancerígenas e a teoria estocástica. No caso da teoria das células estaminais, é sugerido que os vários subtipos de cancro são derivados das mesmas células estaminais ou das células progenitoras. Mutações epigenéticas e genéticas nas células estaminais e progenitoras fazem com que ocorram diferentes fenótipos. Na teoria estocástica, cada subtipo tumoral surge a partir de um só tipo de células, por exemplo, de células estaminais, de células progenitoras ou de células diferenciadas.¹¹

Mutações e amplificações anormais de oncogenes e genes supressores tumorais têm um papel importante na fase inicial e na progressão do cancro da mama. Alguns dos genes envolvidos são o *BRCA1/2* (do inglês *breast cancer gene 1 and 2*), o *HER2* (do inglês *human epidermal growth factor receptor 2*), o *EGFR*, o *c-Myc*, *RAS* entre outros.¹¹

Dois genes supressores tumorais frequentes no cancro da mama são o *BRCA1* e o *BRCA2*, que estão localizados no cromossoma 17q21 e no 13q12, respetivamente. Uma deficiência no *BRCA1* leva a uma desregulação dos *checkpoints* do ciclo celular, a duplicações anormais dos centrómeros, a instabilidade genética e, por vezes, a apoptose. No que respeita ao *BRCA2*, está muitas vezes associado a cancros ductais invasivos já avançados, mas com fenótipo luminal. As mutações no *BRCA1* e no *BRCA2* são ambas autossómicas dominantes, sendo herdadas mesmo que o segundo alelo seja normal e representam cerca de 20 a 25% dos cancros da mama hereditários e entre 5 a 10% de todos os cancros.¹¹

O *HER2* também tem um papel importante no processo de carcinogénese do cancro da mama encontrando-se localizado no braço longo do cromossoma 17 (17q12). A sobreexpressão da proteína HER2, família tirosina cinase, corresponde a 20% dos cancros da mama primários, aumentando com a ativação da via de sinalização PTEN/Akt/mTORC1.¹¹

Na via de sinalização do EGFR estão envolvidos o PI3K, o Ras-Raf-MAPK e o JNK que desencadeiam a proliferação celular, a invasão celular, a angiogénese e a resistência à apoptose. A sobreexpressão de EGFR representa mais de 30% dos cancros da mama inflamatórios, estando também associada a casos de cancro da mama triplo-negativo.¹¹

O gene *c-Myc* codifica a proteína Myc que é responsável pelo recrutamento de histonas acetiltransferases ou DNA metiltransferases. A sobreexpressão de *c-Myc* é observada em cancros invasivos num estágio avançado, enquanto que não é detetado a sua amplificação em tecidos benignos.¹¹

Por último, existem três genes da família Ras: o *H-ras*, o *K-ras* (do inglês *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e o *N-ras* que quando sobreexpressos, estão relacionados com mutações pontuais. Não representam uma grande percentagem de casos de cancro (<5%) e a sua transdução é observada tanto em tecidos mamários benignos como malignos. Também o facto de serem detetados no estágio inicial e avançado da doença, faz com que não seja bom para diagnóstico.¹¹

1.2 Tratamento do cancro

O tratamento do cancro inclui abordagens terapêuticas como cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal e terapia dirigida. Tanto o cancro colorretal como o cancro da mama podem ser tratados por quimioterapia, envolvendo o uso de fármacos que destroem seletivamente as células tumorais ou então limitam a sua proliferação. No entanto, o uso deste tratamento está frequentemente associado a efeitos secundários graves, nomeadamente, a supressão da medula

óssea, o aparecimento de lesões no trato gastrointestinal, a perda de cabelo, as náuseas e o desenvolvimento de resistência ao tratamento.¹⁴

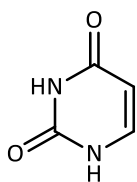
Dependendo do estágio da doença, a quimioterapia pode ser adjuvante, neoadjuvante ou paliativa. Enquanto a quimioterapia adjuvante é aplicada após a cirurgia ao doente, com o intuito de eliminar possíveis células tumorais que não tenham sido removidas, a quimioterapia neoadjuvante é realizada antes da cirurgia. Neste caso, o objetivo é diminuir o tamanho do tumor de modo a facilitar o método cirúrgico.¹⁵

1.2.1 Quimioterapia no cancro colorretal

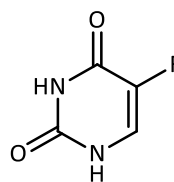
No tratamento do cancro colorretal, para os estádios II e III pode recorrer-se à quimioterapia adjuvante, sendo que no estágio II só deve ser aplicada quando haja um elevado risco de reincidência após a cirurgia.⁷ Os fármacos frequentemente utilizados para o tratamento são as fluoropirimidinas, mais concretamente o 5-FU (do inglês *5-fluorouracil*), o irinotecano e a oxaliplatina. Também pode ser usada a combinação destes agentes terapêuticos. As associações medicamentosas mais frequentes são denominadas pelos acrónimos FOLFOX, que associa o 5-FU, a leucovorina e a oxaliplatina; FOLFIRI que associa o 5-FU, a leucovorina e o irinotecano; FOLFOXIRI que associa o 5-FU, a leucovorina, a oxaliplatina e o irinotecano ; ou XELOX ou CapeOX que associam a capecitabina (pró-fármaco do 5-FU) e a oxaliplatina.¹⁶ Como tratamento de primeira linha, a opção passa pela combinação FOLFOX, seguindo-se a FOLFIRI. Para estádios mais avançados (estádio IV), para além da quimioterapia ainda são utilizados inibidores de recetores de fatores de crescimento (anti-EGFR), como por exemplo o cetuximab, e/ou os inibidores de angiogénese como o bevacizumab.¹⁷

1.2.1.1 5-Fluorouracilo

O 5-FU (**1.2**) é frequentemente utilizado no tratamento do cancro, incluindo cancro colorretal e da mama, além de alguns do trato digestivo. Trata-se de um análogo do uracilo (**1.1**), em que o hidrogénio ligado ao carbono 5 é substituído por um flúor.¹⁸



1.1



1.2

Tem sido demonstrado que cerca de 80% a 85% do 5-FU é catabolizado em metabolitos inativos pela enzima di-hidropirimidina desidrogenase (DPD, do inglês *di-hydropyrimidine dehydrogenase*), e só 1 a 3% induz efeitos citotóxicos nas células, através da inibição da síntese de DNA e do processamento e função do RNA (do inglês *ribonucleic acid*).¹⁹ Como já anteriormente mencionado, o 5-FU é catabolizado pela DPD, uma enzima presente no fígado, na mucosa intestinal e em vários outros tecidos, e convertida a DHFU (do inglês *5,6-dihydro-5-fluorouracil*) (Figura 1.2).^{18,19}

O 5-FU entra rapidamente nas células através do mesmo mecanismo de transporte do uracilo, por difusão facilitada, onde depois é convertido em vários metabolitos ativo, como o FTUP, o FdUTP e o FdUMP. O FUTP (do inglês *fluorouridine triphosphate*), incorpora-se no RNA em vez do UTP (do inglês *uridine triphosphate*) e promove alterações no processamento e na função do RNA, o FdUTP (do inglês *fluorodeoxyridine triphosphate*), substitui o dTTP (do inglês *deoxythymidine triphosphate*) no DNA, e o FdUMP (do inglês *fluorodeoxyuridine monophosphate*) inibe a atividade da enzima TS (do inglês *thymidylate synthase*).¹⁹

O FdUTP e o FdUMP causam lesões no DNA, de modo que ambos os processos provocam morte celular.¹⁹

O 5-FU em combinação com outros agentes quimioterapêuticos melhora a resposta e a sobrevivência nos doentes de cancro da mama e do pescoço, mas tem maior impacto no tratamento do cancro colorretal. No cancro colorretal avançado, as taxas de resposta à quimioterapia com o 5-FU como tratamento de primeira linha variam entre 10-15%, sendo este valor aumentado para 40-50% quando combinado com o irinotecano e a oxaliplatina.¹⁸

Quanto ao mecanismo de ação, durante a replicação do DNA, a topoisomerase I forma uma quebra transitória numa das cadeias de DNA e liga-se covalentemente ao 3-fosforilo final da cadeia aberta do DNA. O irinotecano, sendo um inibidor potente da topoisomerase, liga-se ao complexo formado entre esta enzima e o DNA e impede que a cadeia aberta se volte a ligar, resultando numa quebra irreversível, desencadeando a cascata apoptótica e por fim, morte celular.²²

A topoisomerase I apresenta níveis elevados nalguns tipos de cancro em relação aos níveis normais presentes na mucosa. Por exemplo, nas células de cancro colorretal esses valores estão 14 a 16 vezes mais altos do que nos tecidos normais.²¹

O SN-38, mais tarde, é convertido pela UGT1A1 (do inglês *hepatic uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1*) em SN-38G, por glicoronidação, o qual é eliminado do organismo por excreção biliar (Figura 1.3).²²

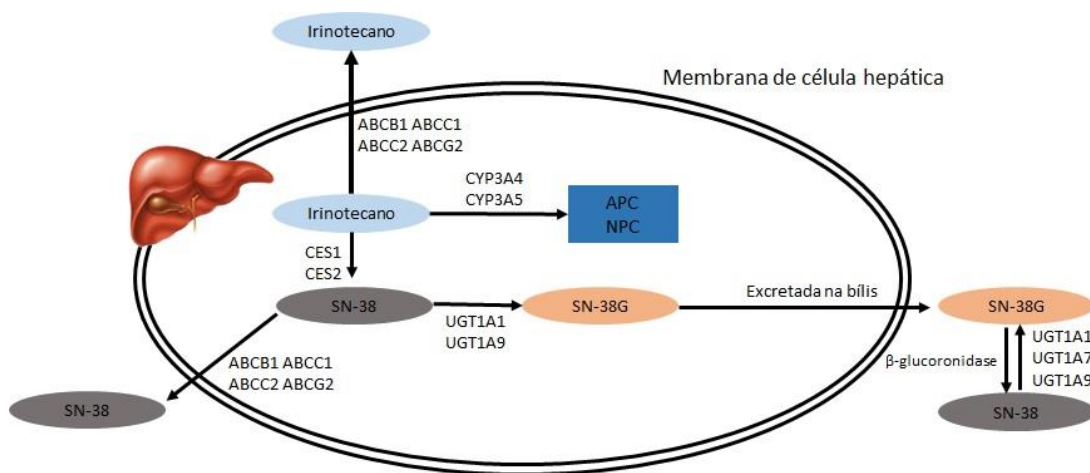


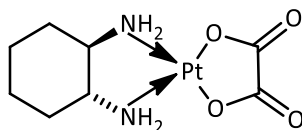
Figura 1.3 Vias metabólicas do irinotecano. O irinotecano é convertido em SN-38 pelas carboxilesterases endógenas. Uma parte sofre glicoronidação por parte da UGT1A1, formando SN-38G que é eliminado por via biliar.

O irinotecano é usado em combinação com o 5-FU para o tratamento do cancro colorretal, sendo a sua administração por via oral ou então por infusão.²²

1.2.1.3 Oxaliplatina

A oxaliplatina (1.5) é um dos complexos de platina utilizados na clínica, caracterizado por apresentar uma unidade 1,2-diaminociclo-hexano (DACH, do inglês *1,2-diaminocyclohexane*). Mais

de 50% da dose administrada é excretada pelos rins na urina, enquanto que uma pequena fração é eliminada pelas fezes.²³



1.5

Este fármaco induz lesões citotóxicas através da formação de aductos platina-DNA intra e inter-cadeias, formando ligações cruzadas entre as espécies de platina e a sequência de bases específicas, normalmente duas bases de guanina adjacentes ou duas bases adenina-guanina adjacentes. Estes aductos induzem uma inibição da replicação e da transcrição do DNA, demonstrando uma citotoxicidade maior que a da cisplatina e a da carboplatina.²³

A oxaliplatina pode formar três tipos de ligações cruzadas que contribuem para a citotoxicidade: ligações intra-cadeias, as mais frequentes, que induzem lesões no DNA com interação nas duas guaninas; ligações inter-cadeias e ligações entre DNA-proteínas, que apesar de provocarem a desnaturação das proteínas, muitos estudos revelam não induzirem a morte celular.²⁴

No tratamento do cancro colorretal, a oxaliplatina é frequentemente combinada com outros fármacos antineoplásicos como o 5-FU e a leucovorina (ácido fólico), como tratamento de primeira linha para doentes no estágio IV.^{23,25}

A oxaliplatina apresenta um efeito *in vivo* mais acentuado do que a cisplatina, além de ter um perfil de toxicidade reduzido. Contudo, apesar da eficácia da oxaliplatina, as células tumorais desenvolvem resistência, sendo que a combinação com outros fármacos pode prevenir a resistência por parte das células ou mesmo a reversão do processo.²⁴

1.2.2 Quimioterapia do cancro da mama

No tratamento neoadjuvante e adjuvante do cancro da mama, em muitos casos a quimioterapia é mais eficaz quando tem por base a combinação de dois ou mais fármacos. Os fármacos utilizados no tratamento desta patologia incluem antraciclinas, nomeadamente a doxorubicina e a epirubicina, os taxanos como o paclitaxel (taxol) e o docetaxel, o 5-FU, a ciclofosfamida e a carboplatina. O tratamento dos cancros da mama que expressam HER-2 é feito com recurso a fármacos que tenham como alvo esta proteína, como por exemplo o trastuzumab

e o pertuzumab. O trastuzumab é um anticorpo monoclonal usado tanto de modo isolado como em combinação. A administração é por via intravenosa sendo aplicado tanto nos estádios mais precoces como nos mais tardios da doença. Também administrado pela mesma via, o pertuzumab é combinado com o trastuzumab e aplicado como terapia neoadjuvante em estádios mais precoces, ou em estádios mais avançados.²⁶

1.2.2.1 Antraciclinas

As antraciclinas fazem parte de uma classe de fármacos antineoplásicos, constituídos por um núcleo antraquinona planar ligado a um açúcar contendo um grupo amina.¹⁴ Foram introduzidos como agentes quimioterapêuticos há cerca de 50 anos e têm sido aplicadas no tratamento de alguns tipos de cancro, incluindo a leucemia, o linfoma, o cancro da mama, o cancro do pulmão, o mieloma múltiplo e o sarcoma.^{27,28}

As quatro antraciclinas mais comuns são a doxorubicina (DOX) e a daunorrubicina (DNR), que são produtos naturais extraídos da *Spreptomyces peucetiusor*, e a epirrubicina (EPI) e a idarrubicina (IDA), que são análogos semissintéticos (Figura 1.4).¹⁴

A doxorubicina e a daunorrubicina foram as primeiras antraciclinas a serem usadas na clínica. A epirrubicina é um estereoisómero da doxorubicina, tendo como vantagem o facto de apresentar um aumento do volume de distribuição e um tempo de semi-vida ($T_{1/2}$) mais longo que o precursor, $T_{1/2}$ (doxorubicina)=1-3h e $T_{1/2}$ (epirrubicina)=31-35h. A idarrubicina, derivada da daunorrubicina, é mais lipofílica e apresenta uma maior captação celular.²⁹

Quanto ao mecanismo de ação desta classe de fármacos, as antraciclinas intercalam entre os pares de bases de DNA e RNA, inibindo a replicação de DNA e a transcrição de RNA, levando a uma diminuição da replicação e do crescimento rápido das células tumorais. Também têm um papel importante na inibição da enzima topoisomerase II, crucial na replicação, e da sobrevivência das células, evitando o desenrolamento do DNA.³⁰

Outros mecanismos envolvidos incluem a interferência na separação das cadeias de DNA, na atividade da enzima helicase e na formação de radicais livres.²⁹

Apesar de serem agentes quimioterapêuticos eficazes no tratamento do cancro, tem sido reportado que as antraciclinas desenvolvem toxicidade cardíaca, originada pela inibição da topoisomerase-II β nos cardiomiócitos, pela formação de radicais livres de oxigénio e pela acumulação de produtos metabólicos.^{28,29}

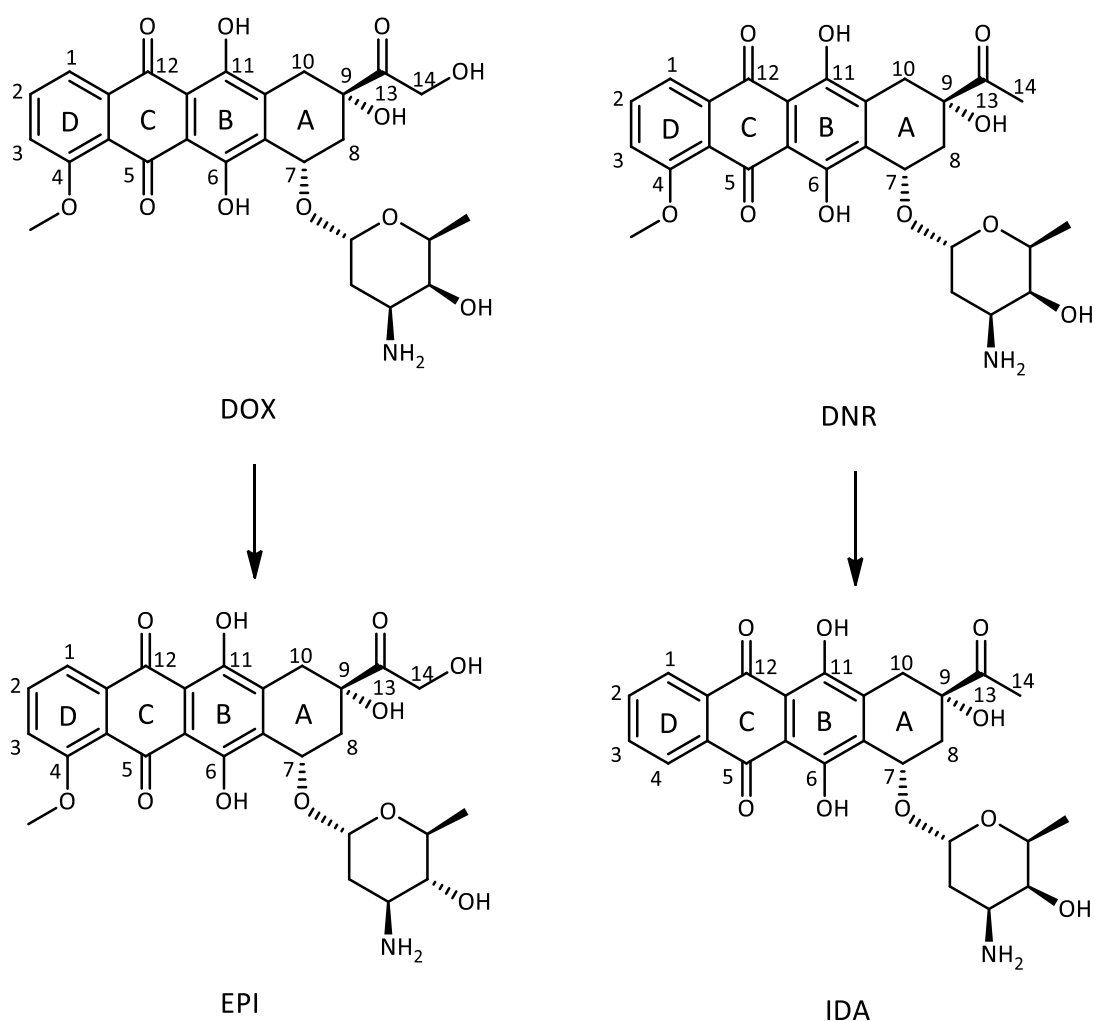


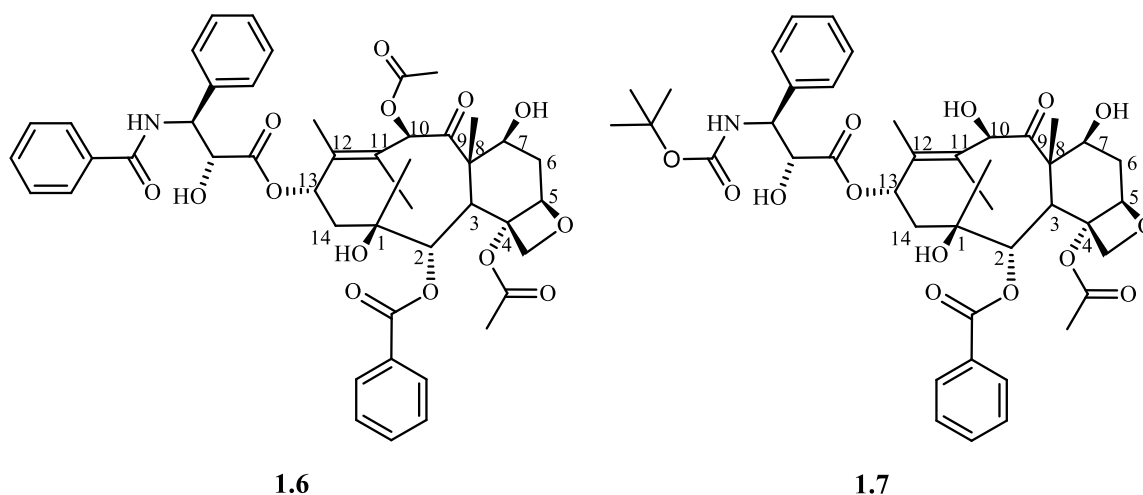
Figura 1.4 Estruturas de quatro antraciclina, doxorubicina (DOX), daunorubicina (DNR), epirubicina (EPI) e idarubicina (IDA). Apresentam uma estrutura aglicona tetracíclica de quatro cadeias de ciclo-hexano, com uma unidade de daunosamina no carbono C7 do anel A, grupos hidroquinona-quinona adjacentes nos anéis B e C, um substituinte metoxi- no carbono C4 do anel D, um grupo carbonilo no C13, e uma cadeia lateral pequena no C9. A doxorubicina e daunorubicina diferem nas suas cadeias, sendo que a doxorubicina contém um grupo álcool primário enquanto a daunorubicina possui um grupo metilo. A epirubicina, derivada da doxorubicina, tem um grupo hidroxilo equatorial na unidade daunosamina. A idarubicina é semelhante à daunorubicina, excepto na ausência do grupo 4-metoxilo no anel D.²⁹

1.2.2.2 Taxanos

Na década de 90, os taxanos, como o paclitaxel (**1.6**) e o docetaxel (**1.7**), foram introduzidos em combinação com antraciclina e agentes alquilantes, de forma a melhorarem a sobrevivência de doentes com cancro da mama metastático. Além disso, têm sido usado em estádios precoces e atualmente são combinados com antraciclina e com trastuzumab.³¹

Enquanto que o paclitaxel foi isolado diretamente da planta *Taxus brevifolia*, o docetaxel é um produto semissintético obtido pela esterificação do 10-deacetilbacatin III que, por sua vez, é isolado diretamente da planta *Taxus baccata*.³²

Esta classe de fármacos apresentam um anel taxano com um anel lateral oxetano com quatro membros nas posições C4 e C5 e uma cadeia lateral éster em C13. Eles diferem nos grupos ligados ao carbono C10 e C13. O docetaxel apresenta um grupo *tert*-butoxilo na posição C13 que é substituído por um grupo fenilo para o paclitaxel. Já na posição C10, o docetaxel apresenta um grupo hidroxilo e o paclitaxel um grupo acetilo.³²



É através da cadeia lateral presente no carbono C13, que o taxano se liga aos microtúbulos, ocorrendo a formação de feixes de tubulina estáveis, resultando numa inibição da proliferação celular por interrupção do ciclo celular na metafase/anafase e pela formação de uma metafase incompleta dos cromossomas devido à estabilização dos microtúbulos.^{32,33}

1.2.3 Tipos de morte celular

Agentes quimioterapêuticos, entre os quais os apresentados anteriormente, podem induzir a diminuição da proliferação celular ou então a morte das células tumorais. Existem três tipos de morte celular, os quais são classificados consoante os aspetos biológicos e bioquímicos. Estes processos são: a apoptose, a necrose e a autofagia (Figura 1.5).³⁴

A apoptose é um tipo de morte programada, caracterizada por uma redução no volume das células, fragmentação da cromatina e o aparecimento de protuberâncias na membrana plasmática que se desprendem e formam corpos apoptóticos. Estes corpos são, mais tarde, reconhecidos e

fagocitados por macrófagos, sem que ocorra um processo inflamatório. Este tipo de morte pode ser desencadeado por duas vias: a intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca, também designada via mitocondrial, é ativada em resposta ao stresse celular, incluindo lesões no DNA (induzidos por agentes genotóxicos ou defeitos na reparação), stresse no retículo endoplasmático (induzido pela acumulação de proteínas disfuncionais), ausência de fatores de crescimento, que causam alterações na membrana interna da mitocôndria, havendo a formação de poros que levam à libertação de proteínas pró-apoptóticas no citoplasma. O citocromo c libertado ativa a caspase-9, conduzindo à ativação da cascata das caspases que culmina em morte celular. Por outro lado, a via extrínseca é ativada quando há interação entre os recetores localizados na membrana celular e ligandos específicos, desencadeando a ativação das caspases, nomeadamente a caspase-8, que induz a morte celular por apoptose.^{34,35}

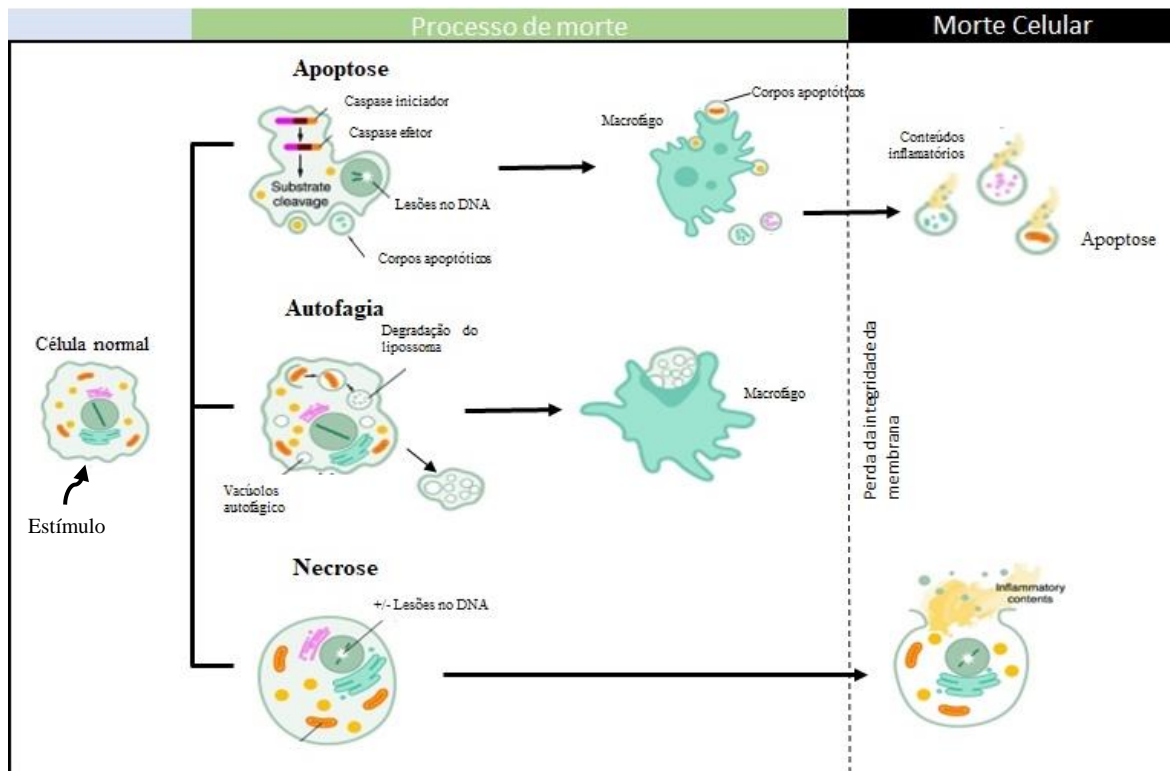


Figura 1.5 Processos que conduzem à morte celular. Uma falha na morte como resposta a um estímulo particular pode resultar no aparecimento de cancro. A apoptose é um processo de morte celular que ativa caspases iniciadoras e, conseqüente caspases efectoras. As células apoptóticas demonstram uma condensação nuclear, lesões no DNA, formação de corpos apoptóticos, mantendo a membrana plasmática intacta e expõe moléculas alvo à superfície para fagocitose. No caso de não haver fagocitose, os corpos apoptóticos podem sofrer lise ou então necrose apoptótica. A autofagia ocorre vacuolização, degradação de componentes citoplasmáticas e condensação da cromatina, sendo que podem ser fagocitadas. Por fim, na necrose ocorre o rompimento da membrana com libertação de componentes celulares o que induz resposta inflamatória.

Por outro lado, a necrose resulta da ativação de vias de sinalização que estão dependentes da atividade da proteína RIP3 (do inglês *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*). Neste caso ocorre uma rápida perda da integridade da membrana plasmática, fazendo com que o conteúdo celular se espalhe desencadeando inflamação.³⁵

Por fim, a autofagia é um processo no qual os constituintes do citoplasma e os organelos são incorporados em vesículas, conhecidas como autofagossomas, para serem degradados. Apesar de ser um mecanismo de sobrevivência, por vezes componentes da via de sinalização autofágica promovem a morte celular.

1.3 Complexos Metálicos

Com a descoberta da cisplatina por Rosenberg em 1965, criou-se um grande interesse em torno da utilização de complexos metálicos para a terapia do cancro, tendo sido desenvolvidos e avaliados em ensaios *in vitro* e *in vivo* inúmeros compostos deste tipo, alguns dos quais alcançaram diferentes fases de estudos clínicos, levando ao aparecimento de novos fármacos. O vasto número de elementos metálicos com diferentes geometrias de coordenação e estados de oxidação, diferentes características cinéticas e termodinâmicas e diferentes propriedades intrínsecas do ião metálico e do ligando possibilitaram aos investigadores explorarem esta classe de fármacos, o que determinou o desenvolvimento de novos fármacos com diversas atividades farmacológicas, nomeadamente antitumoral.^{36,37}

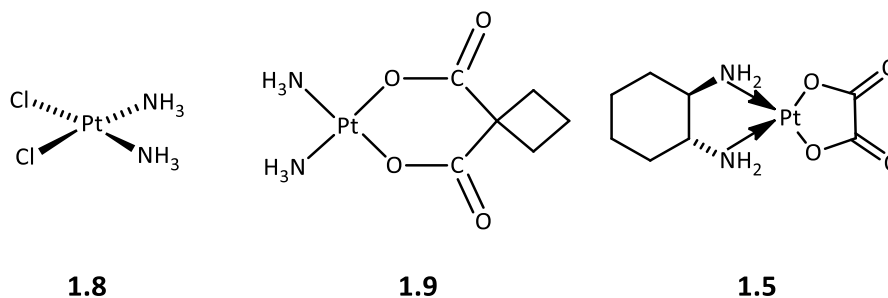
O facto de o centro metálico das moléculas ser carregado positivamente, permite a ligação a biomoléculas carregadas negativamente, como o caso de proteínas e ácidos nucleicos, estes últimos constituintes do DNA.³⁸

Metais de transição como a platina, o ruténio, o ouro, o titânio e o cobre são alguns dos metais mais estudados e a partir dos quais foram desenvolvidos complexos com aplicabilidade farmacológica.³⁷

1.3.1 Complexos de Platina

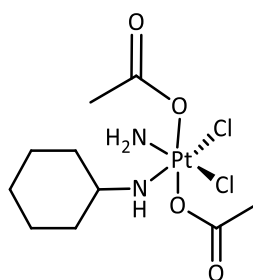
Dentro da classe dos complexos metálicos usados na clínica, os complexos de platina são os fármacos utilizados no tratamento do cancro. Atualmente só três é que estão a ser usados, a cisplatina (**1.8**), a carboplatina (**1.9**) e a oxaliplatina (**1.5**).

Como já referido, o primeiro complexo a surgir foi a cisplatina na década de 60, sendo aprovado em 1978 pela FDA para o tratamento do cancro. A cisplatina reage com os nitrogénios dadores das bases de DNA, inibindo a sua transcrição e levando à apoptose. Com a ligação ao DNA, ocorre a formação de ligações covalentes cruzadas, causando uma distorção na estrutura helicoidal, inibindo a replicação e a transcrição.^{38,39}

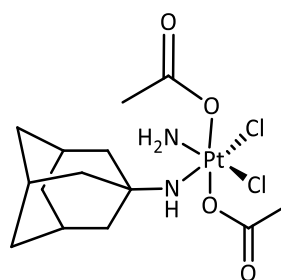


Apesar do sucesso da cisplatina no tratamento do cancro, esta apresenta diversos efeitos adversos quando usada em quimioterapia, o que inclui náuseas, vômitos, ototoxicidade com perda de audição e toxicidade renal. Este facto desencadeou o desenvolvimento de novos complexos de platina, nos quais foram sintetizados milhares e só cerca de 30 passaram para estudos clínicos. Destes são atualmente usados na clínica a carboplatina, que foi introduzida no final de 1980, com menos efeitos adversos que a cisplatina, e a oxaliplatina usada no cancro colorretal e tumores resistentes à cisplatina, que foi aprovada em 2002.³⁹

Os complexos de Pt(IV) apresentam uma geometria octaédrica e são considerados pró-fármacos. São inertes no sangue, sendo ativados quando sujeitos a agentes redutores, exercendo depois a sua atividade citotóxica. Estes complexos apresentam vantagens em relação aos de Pt(II) (dos quais fazem parte a cisplatina, oxaliplatina e carboplatina) relativamente à biodisponibilidade oral, à resistência e à toxicidade. Dois exemplos deste tipo de complexos são a satraplatina (também designada por JM216) (**1.10**) e a LA-12 (**1.11**). A satraplatina está sendo investigada para a administração em estádios avançados do cancro da próstata, do pulmão e do ovário. Tratando-se de um pró-fármaco, é ativado por redução na presença de agentes intracelulares redutores, como a glutatona e o ácido ascórbico, entre outros, demonstrando baixa nefrotoxicidade, neurotoxicidade e ototoxicidade. A LA-12 é um análogo da satraplatina, que apresenta um grupo hidrofóbico (adamantilamina) o que promove a entrada nas células cancerígenas. Estudos *in vitro* demonstraram ser mais eficiente do que cisplatina no que respeita a células do carcinoma do ovário resistente A2780cisR, causando um aumento dos níveis de P53 e alterações no ciclo celular.³⁷



1.10



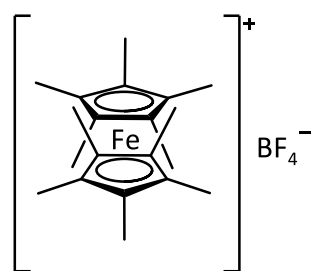
1.11

Apesar da cisplatina e de outros fármacos baseados na platina terem sucesso na clínica, estes apresentam vários efeitos adversos, nomeadamente nefrotoxicidade, mielossupressão, neurotoxicidade, ototoxicidade, entre outros. Para contornar esta questão, houve a necessidade de procurar novos centros metálicos de modo a contrariar as desvantagens apresentadas pelos complexos de platina.⁴⁰

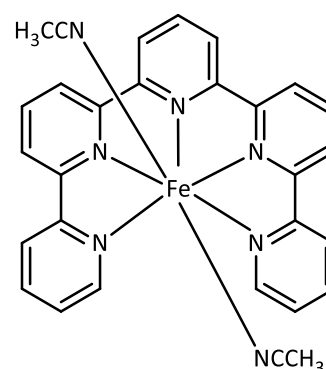
1.3.2 Complexos metálicos alternativos à platina

Para além do uso da platina na síntese de novos complexos com atividade terapêutica, também foram testados outros metais de transição tais como o ferro, o cobalto, o ouro, o titânio, o gálio e o ruténio. Normalmente, estes complexos apresentam vantagens em relação aos de platina, uma vez que exibem uma variedade de estruturas e estereoquímicas, locais de coordenação adicionais quando em complexos octaédricos, diferentes afinidades com os ligandos e mudanças do estado de oxidação.⁴¹

O ferro tem um papel importante em muitos sistemas biológicos, nomeadamente na síntese de DNA e no crescimento e na proliferação celular. Ao longo dos tempos, têm sido estudados complexos de ferro com diferentes ligandos, de modo a terem aplicabilidade terapêutica. O sucesso do complexo de Fe(II) do glicopeptídeo bleomicina, que causa quebras na cadeia dupla do DNA, usado no tratamento do cancro, promoveu a investigação de novos complexos deste metal. Muitos outros surgiram, entre os quais se destacam os complexos quelantes de Fe(II/III), complexos contendo um grupo ferrocenilo e complexos Fe(II/III) de polipiridilo. Dois exemplos ilustrativos desses novos complexos sintetizados são o DEMFc⁺ (**1.12**), o qual apresenta um grupo ferrocenilo e o **1.13**, onde estão presentes vários ligandos piridilo.⁴²

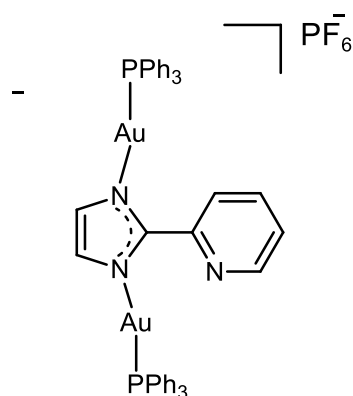


1.12

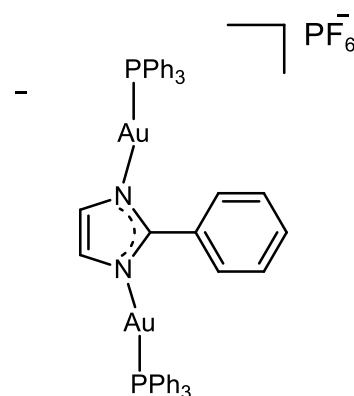


1.13

Complexos de ouro com fosfinas e ligandos de carbeno, ditiocarbamatos e porfirinatos têm sido também desenvolvidos e avaliados *in vitro* e *in vivo*. Estes compostos partilham propriedades, nomeadamente o facto de inibirem a tioredoxina redutase (TrxR), o DNA e a ligação proteica, provocando a disfunção mitocondrial e a indução de apoptose. Complexos de Au(I)/Au(II) de derivados do imidazole foram avaliados em linhas celulares de cancro do ovário e de cancro da mama, verificando-se que os compostos **1.14** e **1.15** apresentaram citotoxicidade mais elevada do que a cisplatina. Muitos dos complexos testados apresentavam citotoxicidade mais elevada para células tumorais que eram resistentes à cisplatina, indicando assim que o mecanismo de ação seria diferente para os complexos de ouro.³⁷



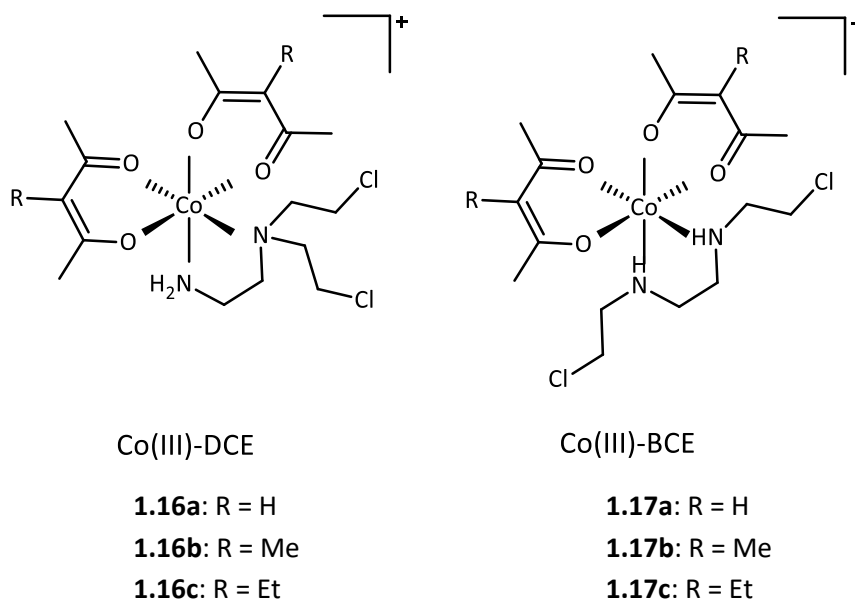
1.14



1.15

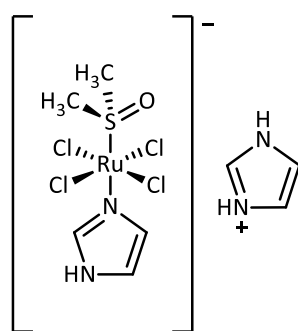
No caso do cobalto, este metal tem a capacidade de apresentar três estados de oxidação (+1, +2 e +3), adotando uma geometria octaédrica. Recentemente, vários complexos de Co(II) e Co(III) com bases de *Schiff* demonstraram possuir atividade anticancerígena. O complexo de Co(II) contendo um derivado de morfolina, 4-(4-aminofenil), apresentou baixa atividade contra células de

carcinoma hepatocelular (HepG2), exibindo valores de IC_{50} (concentração média inibitória) na ordem dos milimolares.⁴³ Pelo contrário, o complexo de Co(II) contendo 2,6-bis(2,6-dietilfeniliminometil)piridina exibiu melhores valores de citotoxicidade contra adenocarcinoma colorretal (HCT-15) e contra cancro do colo do útero (HeLa), com valores de IC_{50} entre 45 e 100 μ M.⁴⁴

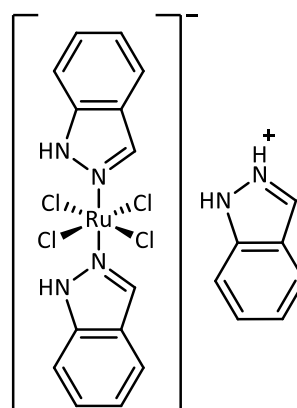


Ligandos bidentados do tipo *N,N'*-bis(2-cloroetil)etilenodiamina (BCE) e *N,N'*-bis(2-cloroetil)etilenodiamina (DCE), foram utilizados para preparar uma série de complexos de Co(III)-acetilacetato estáveis (**1.16a-c** e **1.17a-c**) com seletividade para células em hipoxia. Estudos de citotoxicidade mostraram que o **1.16b** era o complexo mais eficaz, apresentando elevada citotoxicidade contra células de cancro da mama (EMT6).⁴⁵

Muitos complexos de ruténio apresentam atividade antitumoral, particularmente contra cancros em fase metastática, sendo uma alternativa aos de platina, pois a sua toxicidade é mais baixa, apresentam diferentes mecanismos de ação e também um vasto espetro de atividade. Dois exemplos ilustrativos são o NAMI-A (**1.18**) e o KP1019 (**1.19**). O NAMI-A mostra atividade seletiva contra metástases, nomeadamente para metástases de cancro do pulmão, mas não é eficiente na redução de tumores primários. A ligação ao DNA é fraca, o que sugere que a atividade antimetastática não está relacionada com lesões no DNA. O KP1019 é seletivo para tumores primários, sendo altamente ativo em linhas celulares de cancro colorretal. Tem a capacidade de interagir com o DNA e inibir a sua síntese, provavelmente através de diferentes mecanismos de ação.⁴¹



1.18



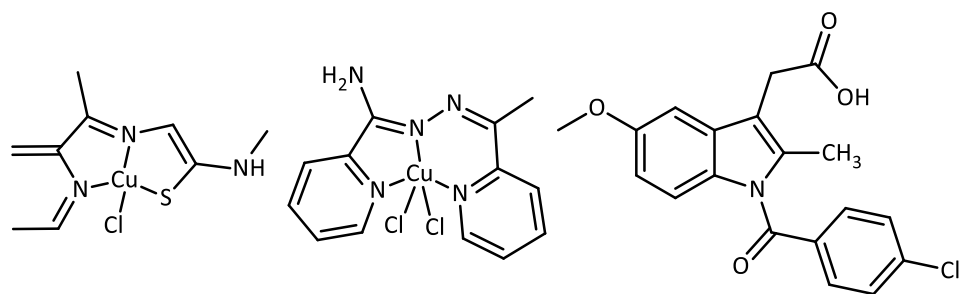
1.19

1.3.3 Complexos de cobre

O cobre tem um papel importante na biologia, uma vez que tem capacidade de se reduzir de Cu(I) ou oxidar a Cu(II), com cada estado de oxidação a ter afinidades preferenciais para diferentes grupos coordenantes. O Cu(I) tem afinidade para grupos tióis e tioésteres enquanto que o Cu(II) coordena preferencialmente com grupos que tenham na sua constituição oxigênio e nitrogênio.⁴⁶

Os íons de Cu(I) têm uma configuração d^{10} e são capazes de formar complexos com ligandos que tenham características dadoras fracas como aqueles que contenham tioésteres, enxofre, fósforo e nitrogênios aromáticos. Estes complexos podem ter uma geometria linear, trigonal ou então tetraédrica. Já os íons de Cu(II) têm uma configuração d^9 , com uma coordenação de 4-6 ligandos, favorecendo geometrias como a quadrangular plana, bipiramidal trigonal e a octaédrica, permitindo assim a obtenção de uma grande variedade de complexos com denticidades e tamanho diferentes.^{46,47}

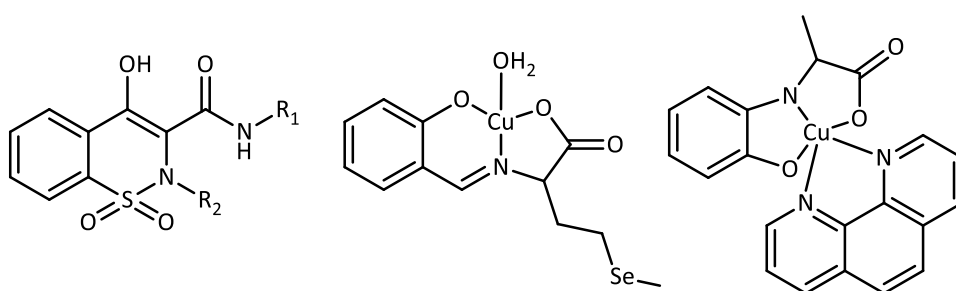
Têm sido desenvolvidos vários complexos de Cu com diferentes finalidades, nomeadamente para exercerem alguma atividade anticancerígena (**1.21** e **1.22**), antiviral, anti-inflamatória (**1.23** e **1.24**), antimicrobiana (**1.25**) e até mesmo para aplicações cosméticas. Contudo, apesar de todo o trabalho desenvolvido na investigação, existe um grande obstáculo que é a passagem dos estudos *in vitro* para os ensaios *in vivo*.⁴⁶



1.20

1.21

1.22



1.23

1.24

1.25

Ao longo dos anos, tem sido demonstrado que o cobre tem a capacidade de matar bactérias, leveduras e vírus, supondo-se que os íons de Cu são libertados levando a uma interrupção da membrana celular da bactéria o que provoca a morte celular. A entrada de íons Cu na bactéria leva à produção de ROS (do inglês *reactive oxygen species*) e à degradação de DNA plasmídico.⁴⁶

Complexos de cobre sintetizados como agentes anticancerígenos têm demonstrado que induzem a morte das células tumorais através de vários mecanismos, incluindo a inibição do proteassoma, a produção de ROS, lesões no DNA, entre outros.⁴⁷

O cobre tem sido usado como um substituto da platina, uma vez que é melhor tolerado pelo organismo, devido à existência de vias biológicas naturais que permitem regular os níveis de Cu e à excreção deste metal quando necessário.⁴⁶

A importância da homeostasia do cobre no organismo

Os sais de cobre são necessários ao organismo, sendo a sua concentração fisiológica regulada por mecanismos que envolvem a ceruloplasmina e a albumina no fígado, a fim de regular os níveis no sangue, e também proteínas transportadoras de cobre (CTR1 e Cu ATP7A/B) a nível celular. O cobre atua como cofator de enzimas envolvidas no metabolismo, nomeadamente a

citocromo C oxidase, a superóxido dismutase que atua na destruição de ROS, a tirosinase envolvida na síntese de melanina, a dopamina- β -hidroxilase que atua na síntese de dopamina, etc. Contudo, um excesso dos níveis de cobre pode ser tóxico para células saudáveis levando à produção de ROS e de NOS (do inglês *nitrogen oxide species*), daí a homeostasia do cobre ser altamente regulada.⁴⁷⁻

49

Doenças associadas ao cobre incluem mutações ligadas ao cromossoma X em ATP7A, o qual codifica as ATPases transportadoras de Cu, que levam à produção de enzimas disfuncionais truncadas, resultando numa má distribuição do cobre e tornando-se assim uma condição fatal conhecida como Síndrome *Menkes*. A perda funcional da ATP7A faz com que o cobre seja acumulado no organismo, principalmente em tecidos como o intestino delgado, com deficiência de cobre sistémica o que provoca neurodegeneração e surgimento de anomalias. Pelo contrário, a doença de *Wilson*, causada por mutações em ATP7B, resulta num aumento de produção de cobre e na sua acumulação, levando a danos de tecidos como o fígado, o cérebro, os rins e a córnea.⁴⁶

1.4 Imidazóis

Imidazóis são compostos heterocíclicos constituídos por um anel planar de 5 membros, solúveis tanto em água como noutros solventes polares. São moléculas anfotéricas, comportando-se como ácidos e bases. Apresentam uma polaridade elevada, com um momento dipolar de 3,61 D e podem ser encontrados em duas formas tautoméricas, devido ao facto do átomo de hidrogénio poder estar localizado em qualquer um dos átomos de nitrogénio.^{50,51}

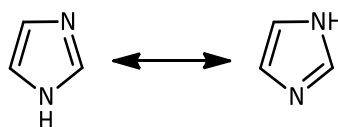


Figura 1.6 Estrutura química do imidazole.

O imidazole é considerado um composto aromático, uma vez que apresenta um sistema de 6 eletrões π , constituído pelo par de eletrões do átomo de nitrogénio do NH e pelas duas ligações duplas do anel.⁵⁰

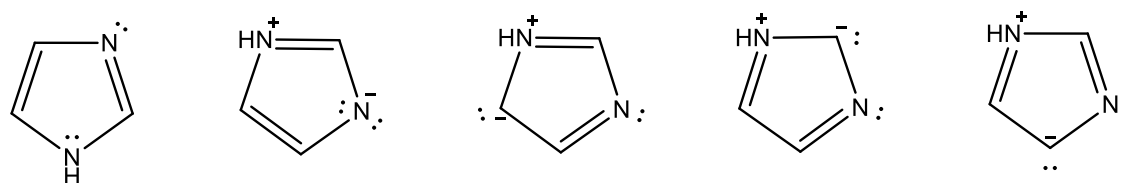


Figura 1.7 Estruturas das formas de ressonância do imidazole.

A primeira vez que foi sintetizada foi em 1858 por Heinrich Debus, contudo na década de 1840 já tinham sido descobertos alguns derivados do imidazole. Debus utilizou glicoxal e formaldeído em amônia para preparar o imidazole. Embora este método de síntese apresente rendimentos baixos, ainda continua a ser usado para formar imidazóis C-substituídos.⁵¹

O anel do imidazole é encontrado na estrutura de diversas moléculas biológicas, nomeadamente em componentes do ser humano que têm grande relevância biológica, como o aminoácido histidina, a vitamina B12, a proteína histamina, a biotina, e faz parte da estrutura base do DNA e das purinas.⁵⁰

Estudos têm demonstrado que os derivados de imidazóis apresentam várias atividades farmacológicas, nomeadamente antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e analgésica, antiviral, anticancerígena, antidepressiva, entre outras. Compostos desta família têm sido sintetizados e avaliados e, nalguns casos, têm demonstrado melhores efeitos farmacológicos e menor toxicidade em relação a alguns fármacos comerciais.⁵²

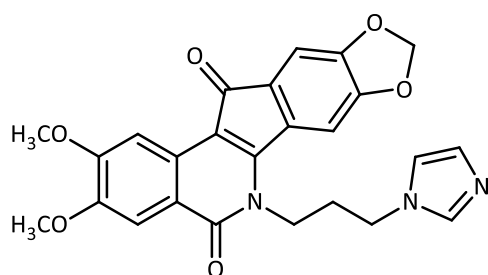
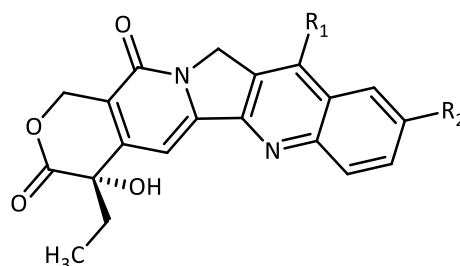
No que diz respeito à atividade antitumoral, os imidazóis podem interferir com a síntese do DNA por interações como ligações de hidrogénio, ligações coordenadas, e levar a uma interrupção no crescimento e divisão celular. Os imidazóis têm a capacidade de se ligar facilmente a proteínas comparativamente a outros anéis heterocíclicos.⁵³

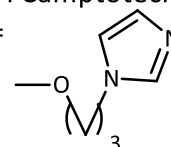
Ao longo dos anos, tem havido um empenho contínuo no desenvolvimento de novos agentes antitumorais baseados em novos imidazóis, tendo como alvo enzimas ou recetores como as topoisomerasas, os microtúbulos, a enzima citocromo P450, o TGF- β (do inglês *transforming growth factor- β*), o DNA, entre outros.^{53,54}

1.4.1 Imidazóis como inibidores da topoisomerase

Como já mencionado anteriormente, a topoisomerase tem um papel importante no crescimento celular, na apoptose, na transcrição e em outros processos celulares reguladores. Os agentes que têm como alvo esta enzima, podem não só estabilizar o complexo formado entre a topoisomerase e a molécula de DNA, mas também controlar a replicação e a transcrição do DNA

nas células tumorais. Os inibidores da topoisomerase já usados na clínica, o topotecano e o irinotecano, apresentam baixa solubilidade, curta duração de ação e alta toxicidade associada à resistência pelo seu uso prolongado. O facto do anel do imidazol ser capaz de estabelecer ligações de hidrogénio devido à presença de dois átomos de azoto, melhora a sua solubilidade na água, fazendo com que esta estrutura seja introduzida noutros compostos bioativos. Dois compostos baseados em imidazóis desenvolvidos como inibidores da topoisomerase, são o indimitecano (**1.26**) e a camptotecina (**1.27a**) e um seu derivado (**1.27b**).⁵³


1.26

1.27a: R1= H, R2 = H Camptotecina

1.27b: R1 = Et, R2 =


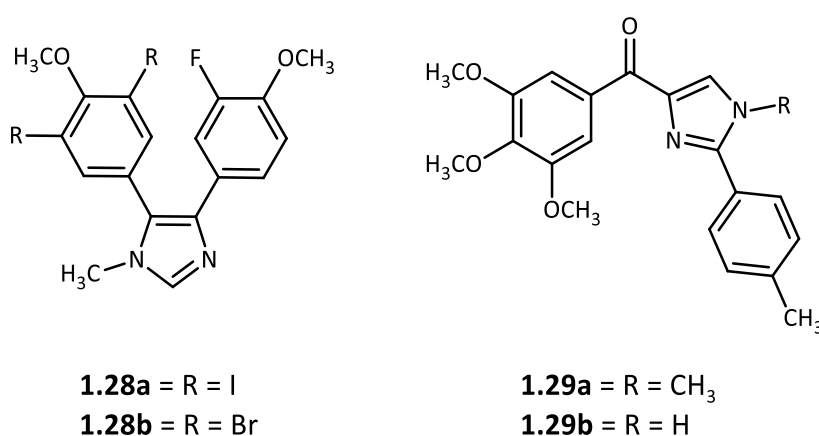
O indimitecano que contém o imidazole é um potencial candidato antitumoral, com melhor solubilidade na água para o tratamento de tumores sólidos refratários. Comparando com os inibidores convencionais da topoisomerase I, o indimitecano sem a unidade lactona lábil torna-se mais estável. Além disso, pode induzir quebras de DNA mais tardias, quebra em posições específicas da topoisomerase I, ligação com diferentes locais do alvo e causar o bloqueio do ciclo celular nas fases S e G2-M.⁵³

A partir da camptotecina (**1.27a**, CPT), e com a introdução de grupos etilo e imidazole nas posições 7 e 10, obteve-se o composto **1.27b**, que revelou valores de IC₅₀ mais baixos de 0,16 μM para as células do cancro da mama da linha MCF-7 e de 0,06 μM para as células do cancro do cólon HCT-8, cujo valor é comparável ao do topotecano (0,15 e 0,07 μM), mas inferior para a camptotecina (0,02 e <0,01 μM) para as mesmas linhas celulares.⁵⁵

1.4.2 Imidazóis como inibidores da polimerização dos microtúbulos

Os microtúbulos estão envolvidos na formação e no desaparecimento do fuso mitótico, que é responsável pela separação dos cromossomas duplicados durante a divisão celular. Uma interrupção na formação dos microtúbulos resulta na paragem do ciclo celular e consequente morte das células, mecanismo de ação dos taxanos, dos alcaloides vinca e das combretastatinas que têm como alvo a tubulina.⁵⁴

No entanto, também moléculas baseadas em imidazóis estão a ser estudadas, como é o caso de análogos do *N*-metilimidazole **1.28a** e **1.28b**, em que ambos apresentaram boa atividade inibitória para a polimerização da tubulina em células do endotélio do cordão umbilical humano. O composto **1.28b**, dibromado, exibe uma inibição seletiva para as células do cancro do colo do útero KB-3-1 e da próstata PC-3, indicando uma potencial atividade antiangiogénica em tumores sólidos.^{56,57}

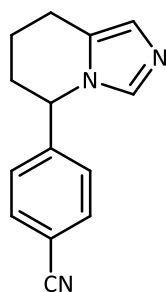


Um outro composto desenvolvido foi o **1.29a**, o qual apresenta um grupo carbonilo ligado ao imidazole, e que demonstrou ter atividade antitumoral por inibição da polimerização da tubulina em linhas celulares do cancro da próstata e melanoma. Mostrou ser eficaz na inibição do crescimento das linhas celulares resistentes MDA-MB-435 e MDA-MB-435/LCC6MDRI com valores de IC₅₀ de 67 e 83 nM respetivamente, e possui melhor índice de resistência a fármacos (R=0,9) quando comparado com o paclitaxel (IC₅₀=465 e 16 nM, R=29). O composto **1.29b** revelou ser um potencial candidato antitumoral nas linhas A375, LNCaP e PPC-1 com valores de IC₅₀ entre 9 e 12 nM, que podem ser justificadas com o facto do composto formar ligações de hidrogénio e ligar-se a sítios específicos da tubulina como ASP251, LEU252 e THR179.⁵⁸

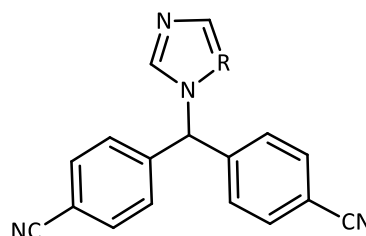
1.4.3 Imidazóis como inibidores do citocromo P450

O citocromo P450 (CYP) é uma classe de hemoproteínas envolvidas em processos metabólicos e com a capacidade de ativar agentes carcinogênicos que estão implicados como fatores de risco do cancro. O fadrozole (**1.30**) e o letrozole (**1.31a**) têm sido recomendados pela FDA como fármacos de primeira linha para o tratamento do cancro da mama.⁵³

A substituição do anel de triazole no letrozole (**1.31a**) por uma unidade de imidazole, origina o composto **1.31b**, que revelou possuir uma melhor atividade inibitória do CYP19 ($IC_{50}=4$ nM), em comparação com o letrozole ($IC_{50}=8$ nM). Também demonstrou uma eficácia antitumoral (40% inibição) para a linha celular epitelial humana de glândula supra-renal H295R, valor este superior ao do letrozole para a concentração de 10 nM (10% inibição).⁵⁹



1.30

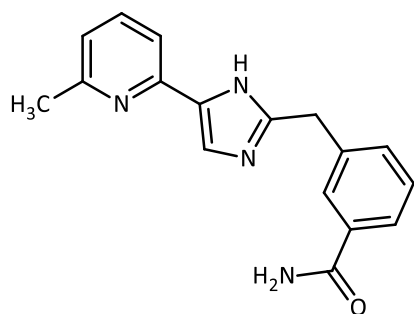


1.31a: R = N Letrozole

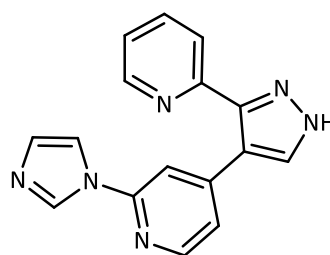
1.32b: R = CH

1.4.4 Imidazóis como inibidores do TGF- β

O TGF- β) é uma proteína envolvida na modelação da proliferação e da diferenciação celulares através do recetor ALK5 (do inglês *like kinase 5 activin*), sendo a sua inibição uma das estratégias utilizadas para diminuir os níveis de TGF- β observados pelo cancro. Verificou-se que fragmentos de piridina e imidazóis apresentam eficácia na inibição de ALK5, como demonstram os compostos **1.32** e **1.33**.⁶⁰ O composto **1.32** é um excelente inibidor do ALK5 ($IC_{50}=0,034$ μ M) com seletividade para outras kinases. Estudos de *docking* do composto **1.32** mostraram que este se liga ao local ativo do ALK5 e que o anel de imidazole poderia formar ligações de hidrogénio com ASP351 facilitando a ligação ao local ativo.⁶¹ O composto **1.33** é um potente e seletivo inibidor do TGF- β , inibindo 50% da atividade de ALK5 para uma concentração de 100 nM.⁵³



1.32

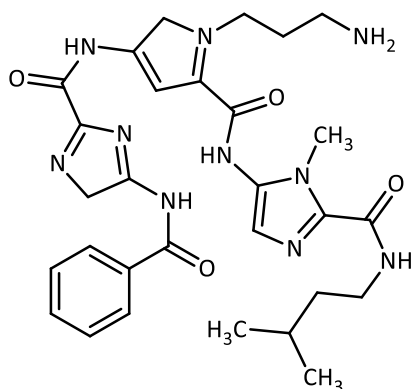


1.33

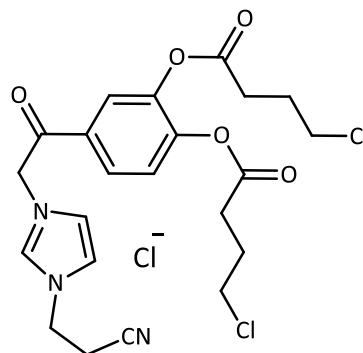
1.4.5 Imidazóis que atuam diretamente no DNA

Agentes que se ligam seletivamente à sequência de DNA são potencialmente úteis para direcionar e modular a expressão de genes associados ao crescimento de células tumorais. Compostos com heteroátomos como azoto, enxofre e oxigênio podem aumentar a interação de complexos através das ligações de hidrogênio formadas com o DNA e depois perturbar a cadeia dupla de DNA.⁵³

Muito recentemente, foi descoberto que as poliamidas derivadas do aminoimidazole, de baixo peso molecular, como a diaminoimidazole (**1.34**), eram capazes de se ligar especificamente com afinidade elevada à sequência de DNA ($K_{eq}=1,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) do que o seu equivalente monoamino/monocatiônico ($K_{eq}=4,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).⁶² A combinação de uma unidade alquilante com derivados do imidazole originou o composto **1.35**, que diminuiu significativamente o crescimento de células HeLa. No entanto, a substituição desse anel de imidazole por pirimidina, piridazina, piridina ou benzimidazole reduziu a sua atividade antitumoral.⁵³

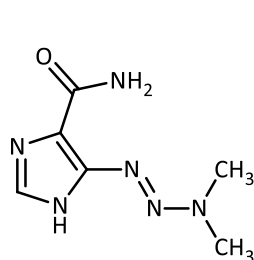
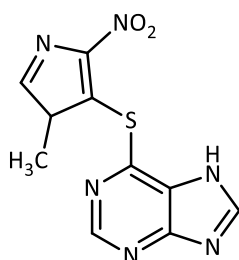
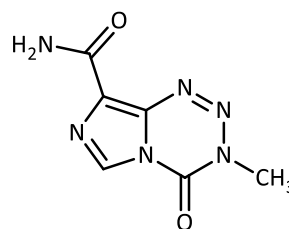
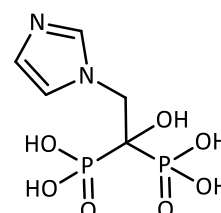
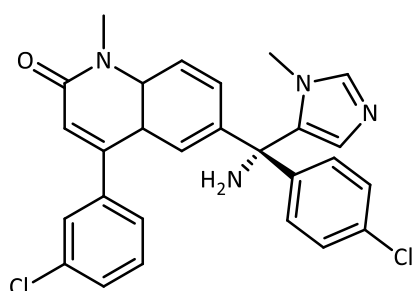
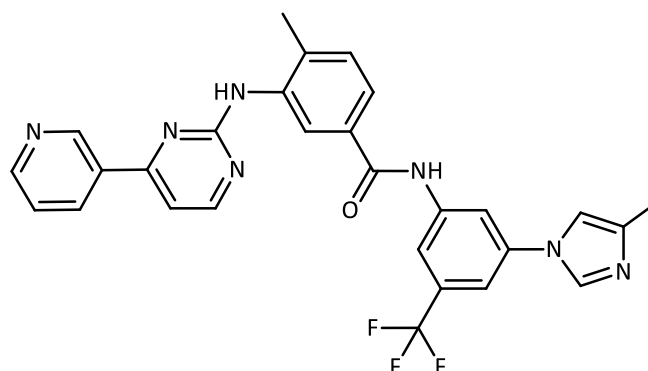


1.34



1.35

Derivados do imidazole podem também ser encontrados como constituintes de fármacos já usados na clínica, no tratamento do cancro, mais concretamente na dacarbazina (**1.36**) (inibidor de purinas), na azatioprina (**1.37**) (pós droga da mercaptopurina, que é um inibidor da síntese do DNA), na temozolomida (**1.38**) (agente alquilante), no ácido zoledrónico (**1.39**), no tipifarnib (**1.40**) e no nilotinib (**1.41**). Contudo estes fármacos não são usados nem no tratamento do cancro da mama nem do colorretal.¹⁴

**1.36****1.37****1.38****1.39****1.40****1.41**

Com base na grande diversidade de propriedades apresentadas pelos imidazóis e dos seus derivados, estes compostos tornaram-se muito atrativos para os investigadores, que se têm dedicado a sintetizar novos agentes quimioterapêuticos fazendo modificações nas estruturas dos imidazóis, de modo a encontrarem novos agentes terapêuticos.

Como foi referenciado ao longo do texto, existe uma constante procura e desenvolvimento de fármacos com potencial antitumoral. Estes compostos são diferentes entre si, mas a maioria partilha das mesmas desvantagens como a passagem de estudos *in vitro* para estudos *in vivo*, os efeitos secundários no uso do fármaco, ou a resistência por parte das células tumorais. Posto isto, e chegando à conclusão de ainda não se ter conseguido sintetizar fármacos que contrariem essas desvantagens, é necessário que o desenvolvimento científico continue.

Os complexos metálicos de Cu têm vindo a revelar resultados promissores no tratamento do cancro e os compostos derivados dos imidazóis com diferentes alvos, tem sido reportado na literatura, no combate da doença. Contudo a combinação destes dois compostos poderia revelar-se algo promissor e onde se deveria investir. Assim sendo, e numa tentativa de colmatar essa falha ainda na investigação, o desenvolvimento deste trabalho terá como base a síntese de complexos de Cu(II) derivados do imidazole e posterior avaliação da sua atividade antitumoral em linhas celulares tumorais.

CAPÍTULO II

Síntese de Complexos de Cu(II) derivados do
Imidazole

2. Síntese de Complexos de Cu(II) derivados do Imidazole

Este trabalho teve como objetivo a síntese de novos complexos de Cu(II) contendo ligandos derivados do imidazole, para posteriormente serem sujeitos a estudos *in vitro*, nomeadamente a avaliação da atividade antitumoral em várias linhas celulares.

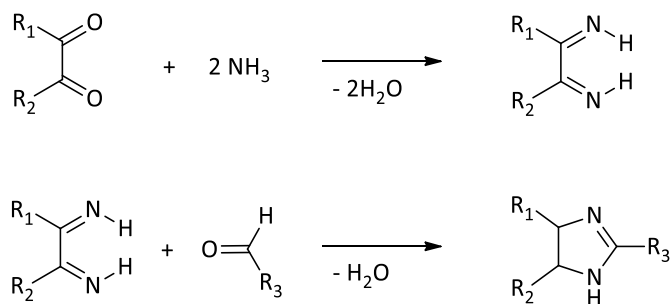
Um trabalho de doutoramento anteriormente realizado no Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra em parceria com o grupo de Orgânica do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, onde foram sintetizados complexos ^{99m}Tc modificados com ligandos derivados do 4-nitroimidazole para serem utilizados na deteção de hipoxia tumoral, foi o ponto de partida para este projeto. Os resultados obtidos mostraram que estes complexos conseguiam acumular seletivamente nas células tumorais e, assim, permitiam a visualização desses tecidos onde os níveis de oxigénio eram reduzidos.⁶³

Em consequência, e uma vez que os complexos conseguiam penetrar nas células tumorais, pensou-se em substituir o tecnécio por cobre com a finalidade de este induzir citotoxicidade às células tumorais. Trabalhos anteriores realizados pelos dois grupos de investigação, já haviam demonstrado que os complexos de cobre modificados com ligandos do tipo salen apresentaram elevada atividade citotóxica em relação a vários tipos de linhas celulares tumorais.⁶⁴ Tal como foi descrito no primeiro capítulo, os complexos de Cu(II) apresentam atividade biológica, sendo capazes de induzir a morte celular. Também no caso dos imidazóis foram desenvolvidos alguns compostos com este núcleo como agentes antitumorais, que atuavam em enzimas ou em recetores. Decidiu-se então, combinar estes dois compostos, de forma a obter novos complexos de Cu(II) com uma possível atividade antitumoral.

Neste capítulo encontra-se descrita a primeira parte do trabalho laboratorial que deu origem a esta dissertação, que consistiu na obtenção dos novos complexos de Cu(II) contendo ligandos derivados do imidazole. Neste estudo foram usados três imidazóis diferentes, como

reagentes, o 4-nitroimidazole, o 1-(3-aminopropil)imidazole e o benzoimidazole, que foram modificados de modo a obter ligandos com diferentes características.

Como já mencionado no primeiro capítulo, o imidazole foi sintetizado pela primeira vez em 1858 por Heinrich Debus, usando glicoxal e formaldeído em amônia como reagentes, de modo a obter o imidazole.



Esquema 2.1 Representação da síntese do imidazole realizado por Heinrich Debus.

Esta reação ocorre em dois passos, sendo que no primeiro ocorre uma reação de condensação entre os grupos carbonilo do glicoxal e a amônia, formando uma diimina e libertando duas moléculas de água. No passo seguinte, a diimina reage com o formaldeído, obtendo-se o imidazole, com libertação de mais uma molécula de água.

Uma vez que existem vários derivados do imidazole comercialmente acessíveis, neste trabalho utilizaram-se três desses derivados como reagentes de partida que foram objeto de várias modificações de estruturas que serão descritos nos subcapítulos 2.1, 2.2 e 2.3.

2.1 Síntese de derivados do 4-nitroimidazole

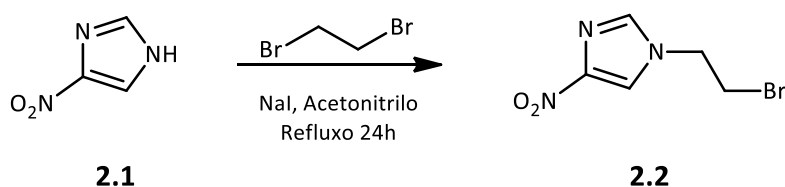
A síntese deste conjunto de ligandos foi efetuada utilizando-se uma sequência sintética de dois passos, em que a primeira etapa passou por sintetizar um precursor, o 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole, que posteriormente foi reagido com as três aminas distintas: a ciclo-hexilamina, a morfolina e a piperidina.

Este conjunto de três ligandos já tinham sido anteriormente sintetizados pelo grupo de investigação de Química Orgânica e utilizados no trabalho de Doutorado acima mencionado.⁶³

2.1.1 Síntese de 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole

O 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole (**2.2**) foi obtido por tratamento do 4-nitroimidazole (**2.1**) com excesso de 1,2-dibromoetano, em refluxo de acetonitrilo, na presença de carbonato de potássio e de vestígios de iodeto de sódio, que funcionou como catalisador, durante 24h (Esquema 2.2). Após a evaporação do solvente, o produto foi sujeito a uma extração em diclorometano/água e purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente acetato de etilo/hexano numa relação de 3:1. Obteve-se um sólido amarelo pálido com um rendimento de 55% cuja pureza foi confirmada por RMN ^1H e RMN ^{13}C .

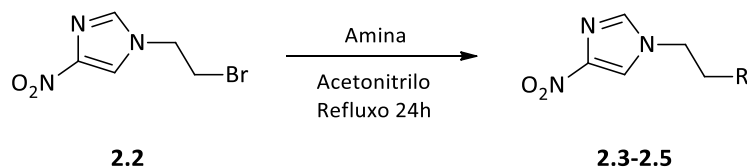
É de salientar que nesta reação ocorre a formação de um produto secundário, o 4-nitro-1-vinil-1*H*-imidazole, resultante da eliminação de HBr a partir do produto **2.2**, o que justifica, em parte, o baixo rendimento obtido.



Esquema 2.2 Representação da síntese do 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole a partir do 4-nitroimidazole.

2.1.2 Síntese de ligandos derivados do 4-nitroimidazole

Após a obtenção do composto precursor, procedeu-se à reação deste com ciclo-hexilamina, morfolina e piperidina (Esquema 2.3). A utilização destas três aminas teve por objetivo obter ligandos que coordenassem de forma bidentada com o cobre, mas que apresentassem características estruturais diferentes (uma amina secundária, menos impedida e duas aminas terciárias mais impedidas e com diferentes polaridades). O procedimento utilizado foi o mesmo para os três ligandos, tendo-se feito reagir 1 equivalente molar de 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole (**2.2**) com 1,2 equivalente molar de cada uma das aminas e 1 equivalente molar de carbonato de sódio, em refluxo de acetonitrilo, durante 24h. Terminado o tempo de reação, os sais de carbonato foram filtrados e os produtos sujeitos a cromatografia em coluna de gel de sílica.



Ligandos	2.3	2.4	2.5
R			
Rendimento	39 %	70 %	76 %

Esquema 2.3 Esquema da síntese e rendimentos dos ligandos derivados do 4-nitroimidazole a partir do 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole

A *N*-(2-(4-nitro-1H-imidazole-1-il)etil)ciclo-hexilamina (**2.3**), a *N*-(2-(4-nitro-1H-imidazole-1-il)etil)morfolina (**2.4**) e a *N*-(2-(4-nitro-1H-imidazole-1-il)etil)piperidina (**2.5**) foram purificadas por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluentes acetato de diclorometano/metanol 90:10, diclorometano/metanol 98:2 e acetato de etilo/metanol/dietilamina 100:10:3 respetivamente, tendo sido confirmada a pureza dos compostos por RMN ¹H e RMN ¹³C. À exceção do **2.3**, o qual se apresentava sob a forma de um óleo viscoso amarelo, os outros dois produtos eram sólidos amarelos. Os compostos **2.3-2.5** foram obtidos com rendimentos moderados (39 e 76%) (Esquema 2.3).

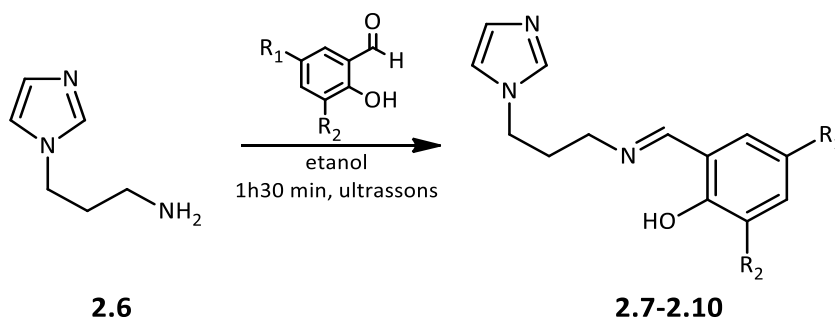
2.2 Síntese de derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole

Partindo do 1-(3-aminopropil)imidazole foram sintetizados quatro ligandos diferentes. Este conjunto de ligandos apresenta características estruturais bastante diferentes do conjunto anterior: são ligandos tridentados; não apresentam um grupo -NO₂ que se sabe que permite, através de várias reações de redução⁶⁵, a entrada em células em hipoxia; são ligandos do tipo salen que já mostraram coordenar de forma muito eficiente com metais e exibir atividade citotóxica; apresentam átomos de halogéneo no anel aromático, o que se sabe poder aumentar a atividade citotóxica de alguns compostos. O objetivo, é, por conseguinte, aliar a presença do núcleo do imidazole com a presença de salens, de modo a estudar o seu efeito na atividade citotóxica dos complexos de cobre.

O composto de partida apresenta um grupo amina, o qual foi modificado por reação com o grupo carbonilo dos diferentes salicilaldeídos, formando uma ligação N=C, característica de compostos do tipo salen. Nestes ligandos variou-se o tipo e o número de átomos de halogéneos de modo a observar-se a influência destes na atividade antitumoral.

A partir do 1-(3-aminopropil)imidazole, procedeu-se à síntese dos compostos **2.7-2.10**, fazendo-o reagir com os seguintes salicilaldeídos: 5-cloro-2-hidroxibenzaldeído, 5-bromo-2-hidroxibenzaldeído, 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído e 3,5-dibromo-2-hidroxibenzaldeído. O procedimento foi idêntico para os quatro compostos, tendo-se feito reagir 1 equivalente molar de 1-(3-aminopropil)imidazole com 1 equivalente molar do salicilaldeído, na presença de sílica ativada como catalisador, durante 1h30 em banho de ultrassons (Esquema 2.4)⁶⁶. A síntese de iminas por ultrassons apresenta várias vantagens, nomeadamente a diminuição do tempo de reação e do consumo de energia (evitando a necessidade de aquecimento).

Os ligandos foram purificados por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente diclorometano/metanol na razão 90:10, tendo sido obtidos na forma de óleos amarelos com rendimentos que variaram entre 32% e 70%. Os espetros de RMN ¹H e RMN ¹³C confirmaram a presença dos compostos.



Ligando	R ₁	R ₂	Rendimento
2.7	Cl	H	32%
2.8	Br	H	46%
2.9	Br	Br	70%
2.10	Cl	Cl	68%

Esquema 2.4 Esquema da síntese dos ligandos derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole

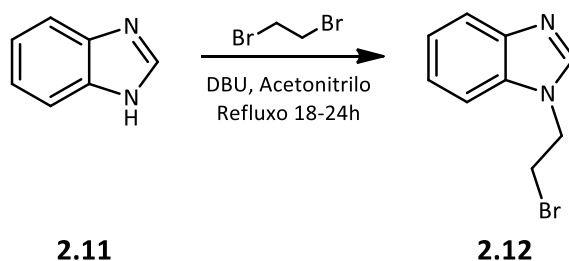
2.3 Síntese de derivados de benzoimidazole

O benzoimidazole (**2.11**) é um composto aromático bicíclico, resultante da fusão do benzeno com o imidazole. O benzoimidazole pode ser sintetizado por reação do *orto*-fenilenodiamina com ácido fórmico. O núcleo benzoimidazole apresenta atividade biológica, encontrando-se presente em compostos com atividade antimicrobiana, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, etc. Estas características tornam este núcleo um precursor interessante para o desenvolvimento de novos compostos com potencial atividade farmacológica.

Assim, partindo do benzoimidazole e de modo semelhante ao procedimento descrito para os compostos **2.3-2.5**, o ligando **2.13** foi obtido numa sequência sintética de dois passos, tendo inicialmente sido preparado o precursor 1-(2-bromoetil)-1*H*-benzoimidazole (**2.12**), que seguidamente foi reagido com a ciclo-hexilamina.

2.3.1 Síntese do 1-(2-bromoetil)-1*H*-benzoimidazole

Inicialmente, preparou-se este ligando seguindo o mesmo procedimento usado para preparar o composto **2.2**. Um equivalente molar de benzoimidazole foi reagido com 4 equivalentes molares de 1,2-dibromoetano, na presença de 1 equivalente molar de carbonato de potássio, em refluxo de acetonitrilo e utilizando vestígios de NaI como catalisador. Contudo, após purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente acetato de etilo/hexano 7:1, verificou-se que o rendimento obtido era muito baixo. De modo a tentar melhorar este rendimento, foram ensaiadas outras condições da reação. Assim, em vez de carbonato de potássio e iodeto de sódio, foi usado DBU (do inglês *1,8-Diazacyclo[5.4.0]undec-7-ene*) como catalisador (Esquema 2.5).

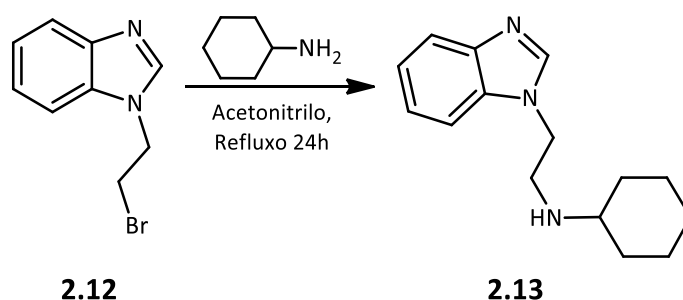


Esquema 2.5 Síntese de 1-(2-bromoetil)-1*H*-benzoimidazole a partir do benzoimidazole

O composto **2.12** foi isolado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente diclorometano/metanol 95:5, sendo obtido um sólido de cor amarelo pálido. A presença do composto puro foi confirmada por espectroscopia de RMN e este foi obtido com um rendimento de 21 %.

2.3.2 Síntese do 2-(1*H*-benzoimidazole-1-il)etil)ciclo-hexilamina

Obtido o precursor anteriormente descrito, procedeu-se à síntese do composto **2.13**, utilizando um procedimento análogo ao seguido para a formação dos compostos **2.3-2.5**. Utilizou-se carbonato de potássio para neutralizar o ácido bromídico formado ao decurso da reação e NaI como catalisador (Esquema 2.6). Foi obtido um óleo amarelo, após cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente diclorometano/metanol 90:10.



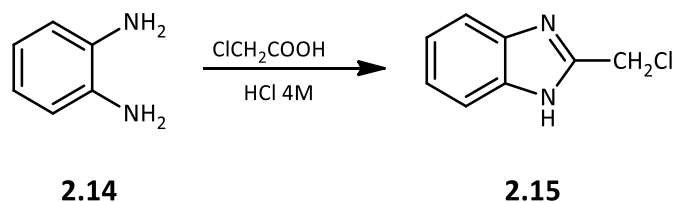
Esquema 2.6 Síntese de 2-(1*H*-benzoimidazole-1-il)etil)ciclo-hexilamina a partir de 1-(2-bromoetil)-1*H*-benzoimidazole

2.3.3 Síntese do 2-(clorometil)-1*H*-benzoimidazole

Com o objetivo de obter outros compostos derivados do benzoimidazole com substituintes na posição 2 do anel, procedeu-se à síntese do 2-(clorometil)-1*H*-benzoimidazole.

Como primeira tentativa, começou-se por fazer reagir 1 equivalente molar de *orto*-fenilenediamina (**2.14**) com 1 equivalente molar de ácido monocloroacético em refluxo de HCl 4M, durante 3 horas (Esquema 2.7). Após arrefecimento da reação, e sob um banho de gelo, adicionou-se amónia para basificar a solução. Formou-se um precipitado amarelo pálido que foi recristalizado

em metanol a quente. No entanto, após análise de RMN ^1H , verificou-se que o composto não estava puro, apresentando ainda quantidades apreciáveis de reagente.



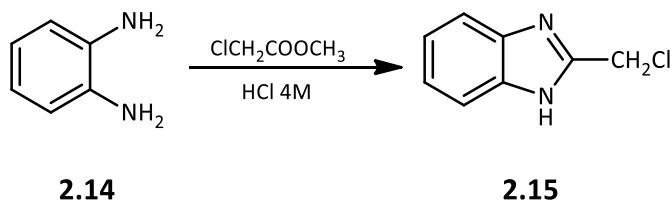
Esquema 2.7 Representação da síntese de 2-(clorometil)-1*H*-benzimidazole a partir de *o*-fenilenodiamina

Numa tentativa de melhorar o rendimento da reação, aumentou-se o tempo de reação e a concentração de HCl, que passou a ser 5M (de acordo com outros procedimentos descritos na literatura^{67,68}), tendo a reação sido controlada por TLC (do inglês *thin-layer chromatography*). Após isolamento verificou-se que o composto final obtido continuava a exibir um rendimento baixo e a estar contaminado com uma quantidade apreciável de reagente.

Uma vez que os procedimentos seguidos, que se encontravam na literatura, apresentavam rendimentos relativamente elevados, pensou-se que os baixos rendimentos obtidos neste trabalho poderiam ser devidos ao facto da *orto*-fenilenodiamina não estar pura. Procedeu-se então à recristalização da *orto*-fenilenodiamina, de modo a aumentar o seu grau de pureza. Voltou-se novamente a repetir a reação, desta vez usando a *orto*-fenilenodiamina recristalizada, mas o rendimento da reação permaneceu bastante baixo.

Numa última tentativa, e recorrendo a um outro procedimento, similar ao da literatura⁶⁹, fez-se reagir 1 equivalente molar de *orto*-fenilenodiamina com 1,3 equivalentes molares de cloroacetato de metilo, em HCl 4M. Deixou-se a mistura reacional sob agitação, à temperatura ambiente, durante 4 horas e em refluxo durante outras 4 horas (Esquema 2.8). Posteriormente, foi adicionado água gelada e amónia à mistura reacional, de modo a neutralizar a solução.

Após filtração e lavagem com água, foi obtido um sólido amarelo com um rendimento de 76%. Embora a reatividade relativa dos ácidos e ésteres seja semelhante, o melhor rendimento obtido com este procedimento pode dever-se ao facto de quando se utiliza o éster como reagente é libertado metanol, para um meio aquoso, enquanto que quando o reagente é o ácido liberta-se H₂O, e como a concentração desta no do meio já é elevada, esta reação pode ser mais desfavorável.



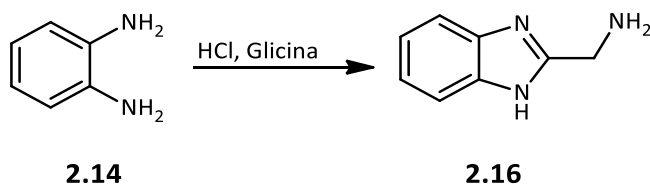
Esquema 2.8 Representação da síntese de 2-(clorometil)-1*H*-benzoimidazole a partir de *orto*-fenilenodiamina usando cloroacetato de metilo

É de salientar que este composto foi obtido já no final do trabalho experimental, pelo que não foi efetuada a sua reação com a ciclo-hexilamina, por falta de tempo.

2.3.4 Tentativa de síntese de (1*H*-benzoimidazol-1-il)metanamina

Foi ainda tentada a síntese do composto **2.16**, com o objetivo de sintetizar salens derivados do benzoimidazole, análogos aos compostos **2.7-2.10**.

Para tal, fez-se reagir novamente a *orto*-fenilenodiamina (**2.14**) com a glicina, em refluxo de ácido clorídrico durante 1h30 (Esquema 2.9). Após arrefecimento e a adição de amónia, ocorreu a formação de cristais que filtrados e recristalizados em etanol. A análise do produto por RMN ¹H, revelou a presença de uma pequena quantidade do composto pretendido, assim como de outros compostos que apareciam como manchas intensas no TLC. A análise de RMN ¹H mostrou a presença de uma grande quantidade de reagente, **2.14**, pelo que não foi efetuada a purificação do produto por cromatografia.



Esquema 2.9 Representação da síntese de (1*H*-benzoimidazol-1-il)metanamina a partir de *o*-fenilenodiamina

Atendendo às dificuldades encontradas na síntese de **2.15**, seria talvez útil proceder à síntese deste composto (**2.16**) utilizando o éster de glicina em vez da glicina. No entanto, por falta de tempo, tal não foi tentado.

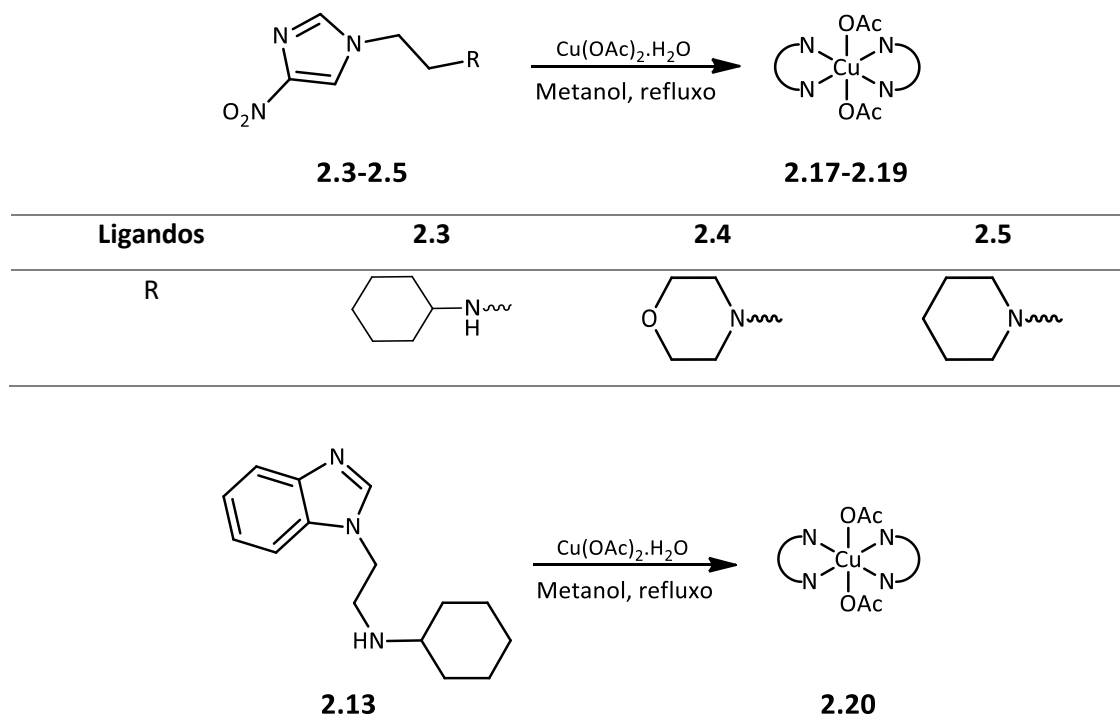
2.4 Síntese dos complexos de Cu(II) derivados de imidazóis

2.4.1 Síntese dos complexos Cu (II) derivados do 4-nitroimidazole e do benzoimidazole

Na síntese dos complexos de Cu(II), fez-se reagir 2 equivalente do ligando anteriormente sintetizados com 1 equivalentes de $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em refluxo de metanol, durante 6h (Esquema 2.10). Os complexos metálicos precipitaram diretamente em metanol, por arrefecimento da solução, e foram filtrados.

Os complexos metálicos de cobre exibem diversos tipos de geometria, dependendo da carga do metal, do tipo e da quantidade de ligando utilizado. As geometrias mais comuns de Cu(II) são a octaédrica, a piramidal quadrada e em menor extensão a planar quadrada e a trigonal bipiramidal.

No caso dos complexos **2.17-2.19**, os ligandos utilizados na sua preparação são bidentados do tipo *N,N*, com estequiometria metal:ligando 1:2, pelo que se espera a formação de um complexo contendo dois ligandos e dois contra-íões acetato. A coordenação efetuar-se-á provavelmente, pelo N da posição 1 do anel do imidazole e pelo N das aminas.



Esquema 2.10 Esquema da síntese dos complexos de Cu(II) derivados do 4-nitroimidazole e do benzoimidazole

A pureza dos complexos foi verificada por TLC e estes foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho (IV).

Os complexos obtidos apresentavam tons de azul claro/ verde água com rendimentos entre 46% e 67% (Tabela 2.1).

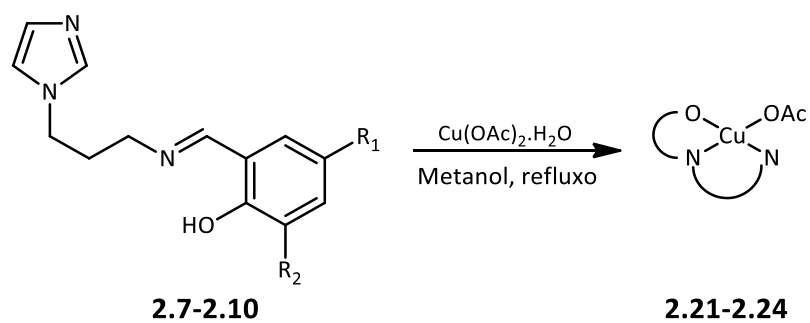
Tabela 2.1 Rendimento dos complexos de Cu(II) derivados do 4-nitroimidazole e benzoimidazole

Complexos de Cu(II)	Rendimento
2.17	46%
2.18	67%
2.19	55%
2.20	45 %

2.4.2 Síntese de complexos de Cu(II) derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole

Para a síntese dos complexos de Cu(II) **2.21-2.24**, a reação foi efetuada utilizando 1 equivalente do ligando e 1 equivalente de Cu(OAc)₂.H₂O, em refluxo de metanol durante 6h (Esquema 2.11). Por arrefecimento da mistura de reação, observou-se a cristalização dos complexos a partir do metanol, que foram posteriormente filtrados, obtendo-se compostos com cor verde. Os complexos **2.21-2.24** foram obtidos com rendimentos entre 78% e 92% e a sua pureza verificada por TLC, e foram ainda caracterizados por espectroscopia de infravermelho (Esquema 2.11).

Neste tipo de complexos a estequiometria metal:ligando é de 1:1, o ligando é tridentado pelo que se espera que se estabeleçam três ligações entre o metal e o ligando, através do N da posição 1 do imidazole, do N da imina e do O do anel aromático, ficando com um ião acetato como contra-ião.



Complexos de Cu(II)	R ₁	R ₂	Rendimento
2.21	Cl	H	85%
2.22	Br	H	92%
2.23	Br	Br	78%
2.24	Cl	Cl	90 %

Esquema 2.11 Síntese dos complexos de Cu(II) derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole

Os complexos sintetizados foram utilizados em estudos de atividade citotóxica em linhas celulares tumorais, que serão descritos no capítulo 3.

CAPÍTULO III

Estudios *in vitro*

3. Estudos *in vitro*

Os complexos de Cu(II) derivados do imidazole prosseguiram para estudos *in vitro*, nomeadamente estudos de citotoxicidade, a partir dos quais se determinaram os efeitos dos complexos de Cu (II) na proliferação em duas linhas celulares de cancro da mama, a MCF-7 e a HCC1806, e em duas de cancro colorretal, a LS1034 e a WiDr. Com o complexo que apresentou um maior efeito na inibição da proliferação celular, prosseguiu-se para estudos de avaliação da viabilidade celular e morte celular induzida, do ciclo celular, da produção intracelular de espécies reativas de oxigénio e da presença de GSH, uma defesa antioxidante, nas linhas celulares tumorais HCC1806 e LS1034.^{70,71} Paralelamente, a seletividade dos compostos foi avaliada em duas linhas celulares não tumorais, a HFF1 e a CCD841 CoN. Também foi realizado um estudo de hemocompatibilidade, onde suspensões de eritrócitos de sangue humano, foram expostas ao composto mais promissor (**2.20**). Este ensaio permitiu através da quantificação da hemoglobina, avaliar se o complexo de Cu(II) induzia lesões na membrana dos eritrócitos e, eventualmente, perceber se haveria a possibilidade da administração do mesmo por via intravenosa.

3.1 Determinação da proliferação celular

O ensaio de MTT (do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) foi o método usado para avaliar a proliferação celular a partir do estudo da atividade metabólica, por colorimetria. Esta técnica permite quantificar as células metabolicamente ativas através dos cristais de formazano formados, obtendo-se valores percentuais que são proporcionais à proliferação celular, por comparação com as condições controlo das linhas celulares.

Inicialmente, incubaram-se, durante 48 h, as culturas celulares do cancro da mama e colorretal que foram sujeitas a concentrações crescentes para os complexos contendo ligandos derivados do 4-nitroimidazole **2.17-2.19**, complexos contendo ligandos derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole **2.21** e **2.22** e para o complexo derivado do benzoimidazole, **2.20**. Essas concentrações variaram entre 1 e 200 μ M. No entanto, para alguns casos, esse intervalo de

concentrações foi posteriormente reduzido para 0,5-20 μM , como aconteceu para o complexo **2.17**, na linha celular HCC1806, e para o complexo **2.20**, para todas as linhas celulares, dada a elevada inibição da proliferação celular. Como controlos, foram usadas células tratadas com igual volume de solvente (DMSO (do inglês *dimethyl sulfoxide*) para os complexos **2.17-2.19** e **2.20** e DMF (do inglês *dimethylformamide*) para os complexos **2.21** e **2.22**) e que não foram sujeitas aos complexos metálicos. Os valores de proliferação celular obtidos nestas condições corresponderam a 100% da proliferação celular. É importante referir que não se encontrou um solvente apropriado que permitisse dissolver os complexos **2.23** e **2.24**, facto que limitou a prossecução dos estudos *in vitro* com estes dois complexos.

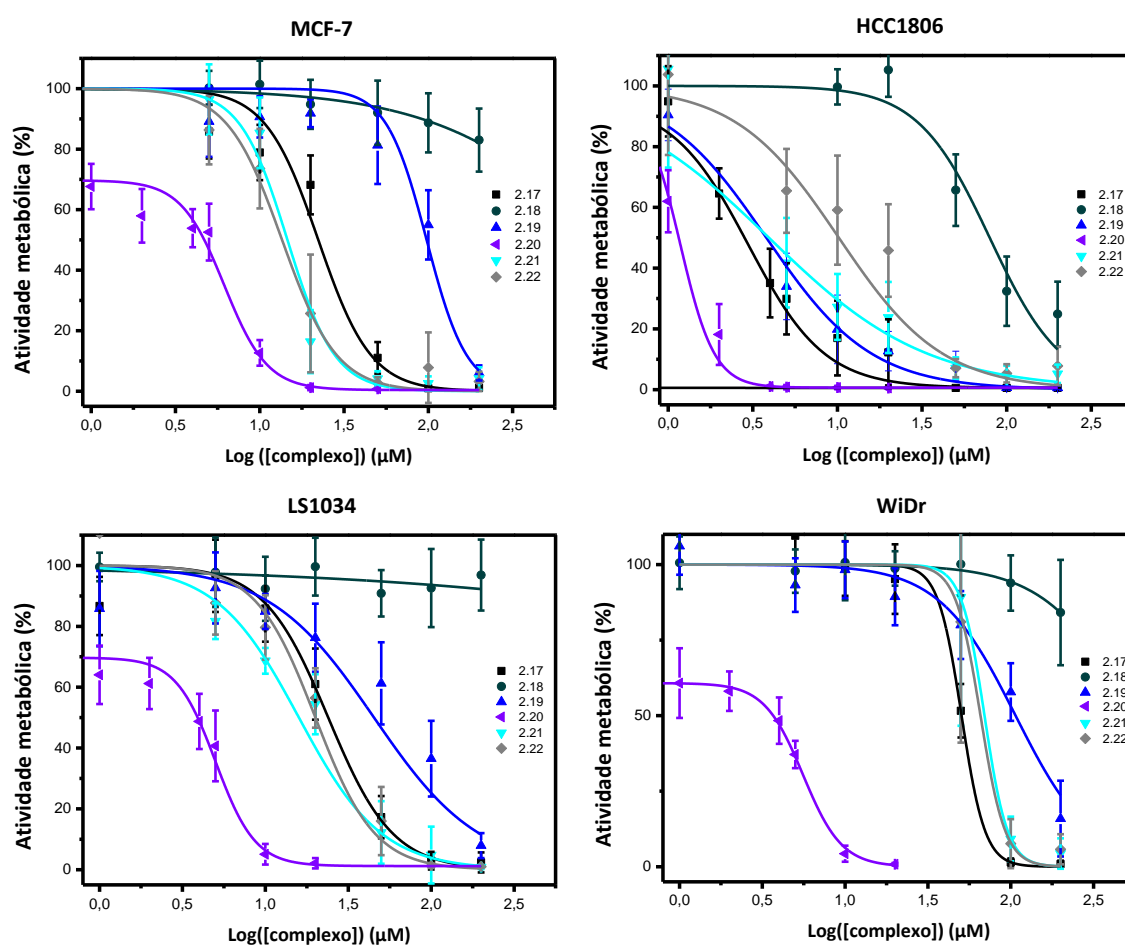


Figura 3.1 Curvas de dose-resposta correspondentes à atividade metabólica (em percentagem) das linhas celulares tumorais MCF-7, HCC1806, LS1034 e WiDr após incubação de 48h com os complexos derivados do 4-nitroimidazole **2.17-2.19**, complexos derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole **2.21** e **2.22** e o complexo derivado do benzimidazole **2.20**. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizadas em triplicado ($n \geq 9$).

Com os valores percentuais obtidos foram traçadas as curvas dose-resposta que foram ajustadas a uma função considerando o melhor ajuste relativamente aos resultados experimentais. Através destas curvas, foi possível calcular a concentração do composto necessária para inibir 50% da proliferação celular, ou seja, os valores de IC₅₀ e que estão apresentados na Tabela 3.1.

Analisando a Figura 3.1, verifica-se que a inibição da proliferação celular é dependente do complexo de Cu(II) testado. Dos complexos testados, o complexo **2.20** é que apresenta uma maior inibição da proliferação celular em todas as linhas celulares, sendo visível pelas curvas dose-resposta que apresenta.

Também se conclui que os efeitos induzidos pelos complexos de Cu(II) dependem da linha celular, havendo uma diminuição notória da atividade metabólica, principalmente após incubação com os complexos **2.21** e **2.22**, nas linhas celulares HCC1806 e WiDr, apesar de que nesta última, concentrações mais baixas de complexo induziram um aumento da proliferação celular.

Tabela 3.1 Valores de IC₅₀ dos complexos de Cu(II) testados nas quatro linhas celulares, após 48h de incubação e os seus respetivos valores de r^2 . Os valores de IC₅₀ dos complexos **2.18** e **2.19** não foram calculados uma vez que eram superiores às concentrações testadas nestes estudos.

Linha Celular	2.17		2.18		2.19		2.21		2.22		2.20	
	IC ₅₀ (μM)	r^2	IC ₅₀ (μM)	r^2	IC ₅₀ (μM)	r^2	IC ₅₀ (μM)	r^2	IC ₅₀ (μM)	r^2	IC ₅₀ (μM)	r^2
MCF-7	22,2	0,94	----	----	97,7	0,97	14,59	0,98	13,55	0,98	6,57	0,99
HCC1806	2,9	0,98	79,3	0,91	4,2	0,97	3,9	0,89	10,2	0,89	1,2	0,92
LS1034	23,9	0,98	----	----	45,2	0,97	15,9	0,97	20,1	0,98	5,1	0,99
WiDr	50,5	0,99	----	----	----	----	69,5	0,70	65,7	0,72	5,5	0,99

Com base nos resultados da Figura 3.1 e da Tabela 3.1, observa-se que, de um modo geral, os complexos de Cu(II) derivados do 4-nitroimidazole (**2.17**) e do benzoimidazole (**2.20**) contendo na sua estrutura a ciclo-hexilamina, apresentam melhores resultados comparativamente aos restantes compostos. Nas linhas celulares de cancro da mama, o composto **2.17** revelou ser o segundo complexo mais citotóxico apresentando um IC₅₀ mais baixo (2,9 μM) para a linha HCC1806 do que para a linha MCF-7 (22,2 μM). Já nas linhas celulares de cancro colorretal, o valor de IC₅₀ é mais baixo para a linha LS1034 do que para a linha celular WiDr. No caso do complexo **2.20**, este composto é o complexo com maior atividade anti-proliferativa, com valores de IC₅₀ mais baixos, quando comparados com os dos outros compostos, apresentando um IC₅₀ de 6,57 μM e 1,2 μM

para MCF-7 e HCC1806, respetivamente. As linhas celulares LS1034 e WiDr apresentam valores de IC₅₀ de 5,1 µM e 5,5 µM, respetivamente.

Os complexos de Cu(II) derivados do 1-(3-aminopropil) imidazole **2.21** (clorado) e **2.22** (bromado), os quais foram dissolvidos em DMF, apresentaram em certas linhas celulares valores de IC₅₀ mais baixos que os outros compostos, no entanto ao longo das experiências revelaram ser instáveis e que se degradavam rapidamente.

Para os compostos **2.18**, nas linhas celulares MCF-7, LS1034 e WiDr, e **2.19**, na linha celular WiDr, não foi possível determinar os valores de IC₅₀ por estes serem muito superiores às concentrações testadas.

Tabela 3. 2 Valores de IC₅₀ do complexo de Cu(II) derivado do benzoimidazole **2.20** e dos fármacos usados na quimioterapia convencional, após 48 horas de incubação nas linhas celulares WiDr e MCF-7.^{72,73}

a: incubação com epirrubicina; b: incubação com carboplatina; c: incubação com Docetaxel; d: incubação com 5-FU; e: incubação com irinotecano; f: incubação com oxaliplatina

Linha Celular	2.20		Quimioterapia convencional
	IC ₅₀ (µM)	r ²	IC ₅₀ (µM)
MCF-7	6,57	0.99	0,320 ^a
			>500 ^b
			11,90 ^c
HCC1806	1,2	0.92	0,240 ^a
			271,14 ^b
			8,35 ^c
LS1034	5,1	0,99	238 ^d
			47,5 ^e
			5,9 ^f
WiDr	5,5	0,99	442,4 ^d
			38,7 ^e
			21 ^f

Comparando os valores de IC₅₀ do complexo **2.20**, apresentados na Tabela 3.2, com os fármacos usados na clínica é possível observar que este composto apresenta valores de IC₅₀ mais baixos nas quatro linhas celulares estudadas, exceto no caso da epirrubicina, no tratamento para células MCF-7 e HCC1806, em que a ordem de grandeza é dos nanomolar.

Para se perceber se o efeito antiproliferativo do complexo **2.20** era devido à presença do metal ou era inerente ao próprio ligando, o ligando derivado do benzoimidazole, **2.13**, foi testado nas mesmas concentrações do complexo correspondente, **2.20**.

Na Figura 3.2, é possível observar que o efeito inibitório do composto **2.13** nas quatro linhas celulares tumorais é pouco revelante, de modo que a proliferação varia entre 80% e 100%, valores de proliferação muito elevados quando comparados com o efeito induzido pelo complexo **2.20**, já

discutido anteriormente. Por esta razão, não foi possível determinar valores de IC₅₀ para o composto **2.13**.

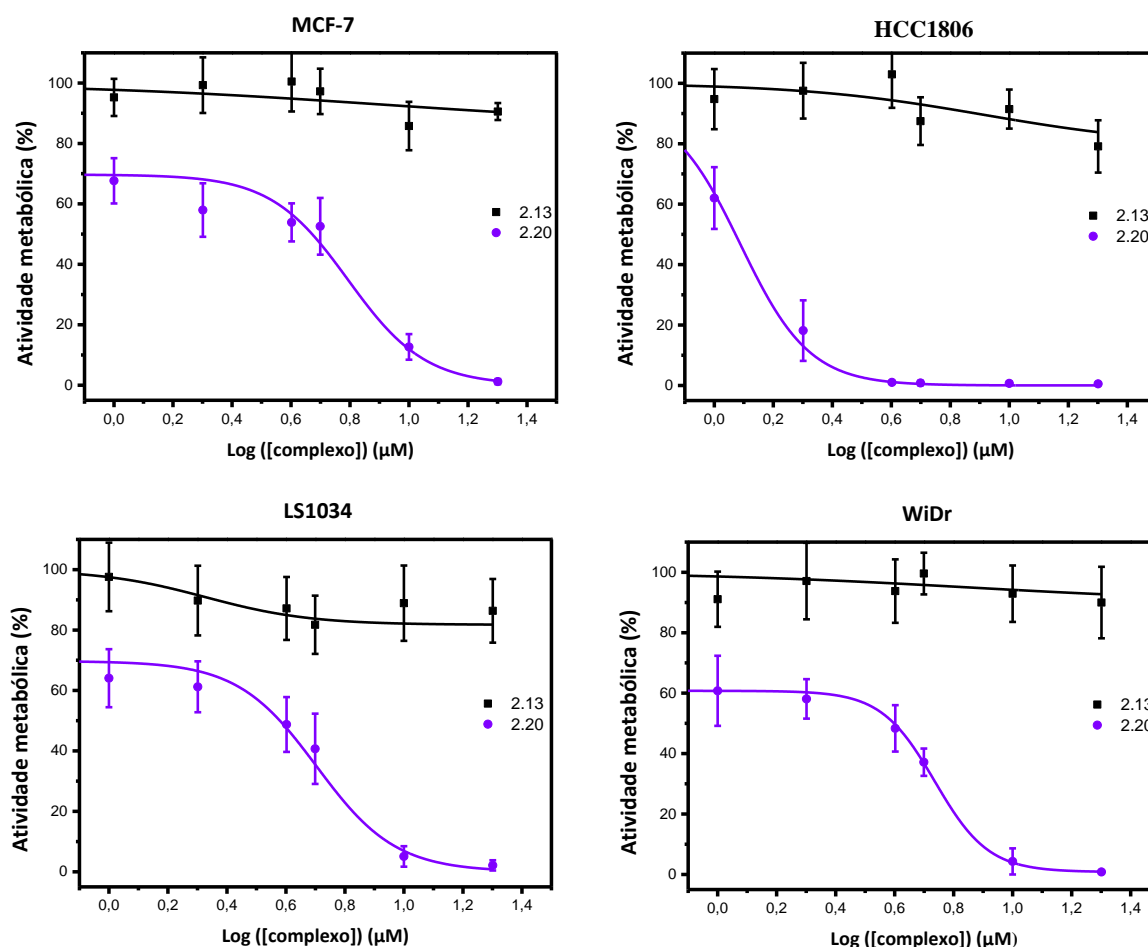


Figura 3.2 Curvas de dose-resposta correspondentes à atividade metabólica (em percentagem) das linhas celulares tumorais MCF-7, HCC1806, LS1034 e WiDr após 48h de incubação com o ligando derivado do benzimidazole, **2.13**, e o respetivo complexo de Cu(II), **2.20**. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizadas em triplicado ($n \geq 9$).

3.2 Avaliação da viabilidade celular

Com base nos resultados obtidos anteriormente e discutidos na secção 3.1, o complexo **2.20** foi o escolhido para prosseguir para estudos de viabilidade e ciclo celular e produção de ROS, nas quatro linhas celulares tumorais.

A avaliação da viabilidade e tipos de morte celular induzida foi efetuada através de citometria de fluxo, recorrendo-se a uma dupla marcação com AnV e IP, permitindo a distinção de quatro populações de células: células viáveis (V), células em apoptose inicial (AI), células em apoptose tardia/necrose (AT/N) e por fim, células em necrose (N). Foram avaliadas três condições:

um controlo, no qual não ocorreu a adição do complexo **2.20**, e duas concentrações de **2.20**, uma correspondente ao IC₅₀ e outra a 20 µM, nas quatro linhas celulares e que foram incubadas durante 48h.

Na Figura 3.3 estão apresentados os resultados da viabilidade celular, revelando que o número de células viáveis diminui com o aumento da concentração do complexo **2.20**, em todas as linhas celulares.

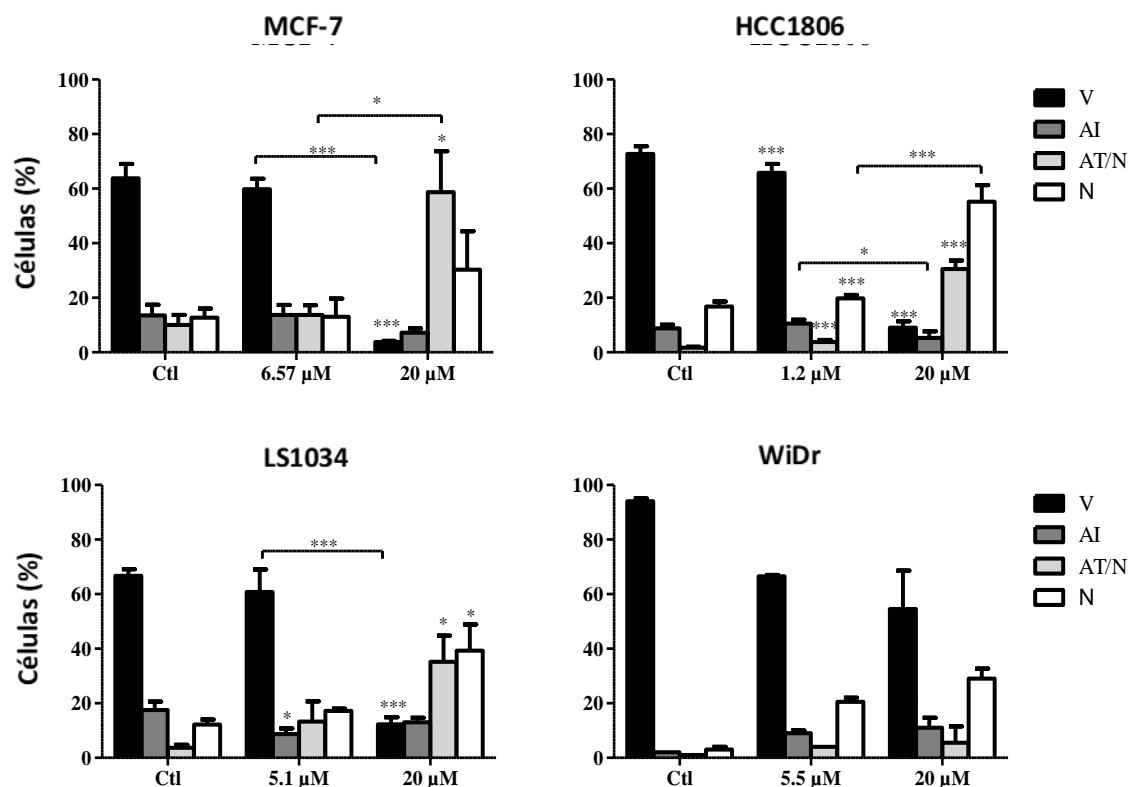


Figura 3.3 Viabilidade celular apresentada em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). As células foram incubadas durante 48h, sob três condições: um controlo, concentrações de IC₅₀ e 20 µM do complexo **2.20**. Os resultados estão apresentados sob a forma de média ± erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizados em duplicado (n≥6). As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por: * para p<0,05; *** para p<0,001.

Na linha celular MCF-7, a população de células viáveis do controlo é de 63±5,24% e, quando sujeitas a uma concentração 6,57 µM (IC₅₀) de **2.20**, a população reduz-se para 59±3,79%. Comparando o controlo com as células incubadas com concentração 20 µM do complexo, verifica-se uma diminuição de 60% das células viáveis, apresentando diferenças estatisticamente significativas (p<0,001). Também existem diferenças estatisticamente significativas entre as populações de células tratadas com 6,57 µM e 20 µM (p<0,001). A percentagem de células em apoptose inicial mantém-se quando tratadas com 6,57 µM de **2.20** e reduz-se em 6% quando

sujeitas a uma concentração 20 μM , não havendo diferenças estatisticamente significativas. Na população de células em apoptose tardia/necrose, há significado estatístico entre as células de controlo e as células tratadas com 20 μM do composto **2.20** ($p=0,022$) e entre as populações tratadas com 6,57 μM e 20 μM ($p=0,031$). No caso da população de células em necrose, há uma tendência para o aumento desta população quando as células são tratadas com uma concentração 20 μM do complexo.

Na linha celular tumoral HCC1806, a população de células viáveis do controlo é de $73\pm 2,91$, mas quando incubadas com 1,2 μM (IC_{50}) de **2.20** diminui 8% ($p<0,001$) e cerca de 64% quando sujeitas a 20 μM ($p<0,001$). Existe um significado estatístico entre as populações de células em apoptose inicial após o tratamento com 1,2 μM e 20 μM de **2.20**, ocorrendo uma diminuição da população em 5% ($p=0,020$). Na população de células em apoptose tardia/necrose, há um aumento significativo destas, em relação ao controlo, quando as células são incubadas com 1,2 μM e 20 μM de complexo ($p<0,001$, para ambos os casos). Por fim, na população de células em necrose, existem um aumento significativas entre as células controlo e as tratadas com 20 μM ($p<0,001$) e entre as células tratadas com o IC_{50} e com 20 μM ($p<0,001$). Com o aumento da concentração do composto **2.20**, observa-se um aumento da população de células em necrose, passando de um valor de 20% (controlo) para 55% quando sujeitas à concentração de 20 μM ($p<0,001$).

A população de células viáveis de LS1034 é de $67\pm 2,47\%$ no controlo, havendo uma diminuição de 54% quando as células são incubadas com uma concentração de complexo de 20 μM ($p<0,001$). Entre as células tratadas com 5,1 μM e 20 μM , ocorre uma diminuição de 48% igualmente com significado estatístico ($p<0,001$). Paralelamente, observa-se uma diminuição de células em apoptose inicial quando incubadas com 5,1 μM de **2.20** em relação ao controlo ($p=0,042$), acompanhada pelo aumento do número de células em apoptose tardia/necrose. Um aumento relativamente ao controlo é também observado após tratamento com 20 μM ($p=0,021$), assim como um aumento da população de células em necrose ($p=0,013$). Para a linha celular WiDr, não foi possível apurar diferenças estatísticas, uma vez que se trata de resultados preliminares ($n=2$). No entanto, observa-se uma redução de 28% e 40% da população de células viáveis com o aumento da concentração do complexo **2.20**, contrapondo com um aumento do número de células em necrose que ocorre quando as células são incubadas durante 48h, para as duas concentrações testadas. Para as restantes populações não são notórias alterações.

Para as linhas celulares do cancro da mama HCC1806 e de cancro colorretal LS1034, foram realizados estudos de morfologia, de modo a complementar os resultados obtidos por citometria de fluxo, para avaliação da viabilidade e do tipo de morte celular induzidos quando as células eram expostas ao composto **2.20**. As células foram tratadas seguindo o mesmo procedimento utilizado

para a citometria de fluxo. A Figura 3.4 apresenta imagens representativas do estudo preliminar de morfologia, para as três condições às quais as células das linhas celulares tumorais foram sujeitas. Nas imagens de controlo, as células mantêm a membrana íntegra. Quando sujeitas às concentrações dos valores de IC_{50} , as células demonstram alterações nas suas membranas, causadas pelo processo de morte celular, bem visível na linha HCC1806, onde se identifica necrose, pelo extravasamento do citoplasma. No caso da concentração de 20 μM , ambas as linhas celulares tumorais apresentam uma clara desintegração da membrana celular e posterior extravasamento do citoplasma, igualmente sinais de morte celular por necrose. Apesar de preliminares, os resultados da análise morfológica corroboram os da análise da viabilidade celular obtidos por citometria de fluxo.

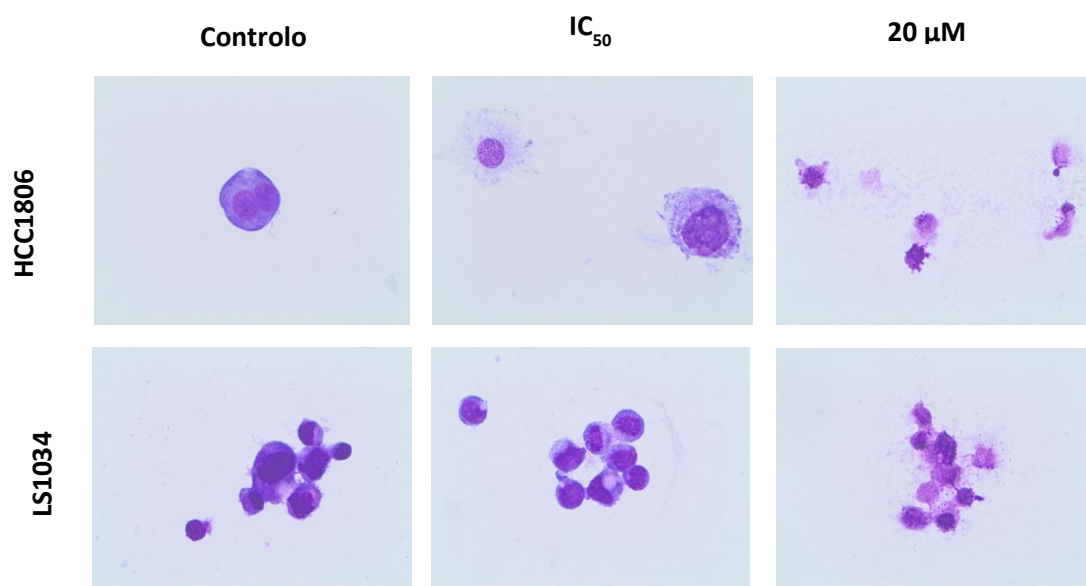


Figura 3.4 Análise morfológica das células HCC1806 e LS1034, as quais foram incubadas durante 48h, nas seguintes condições: ausência do composto 2.20 (controlo), concentrações 3 μM e 20 μM de **2.20**, numa ampliação de 400X.

Face aos resultados apresentados anteriormente, e de forma a perceber se o complexo **2.20** era seletivo para as linhas celulares tumorais, realizaram-se estudos preliminares em duas linhas celulares de tecido normal, HFF1 (fibroblastos) e CCD841 CoN (colonócitos), que se encontram apresentados na Figura 3.5. As condições testadas incluíram uma condição controlo (sem administração de composto), e duas condições de tratamento (3 e 20 μM).

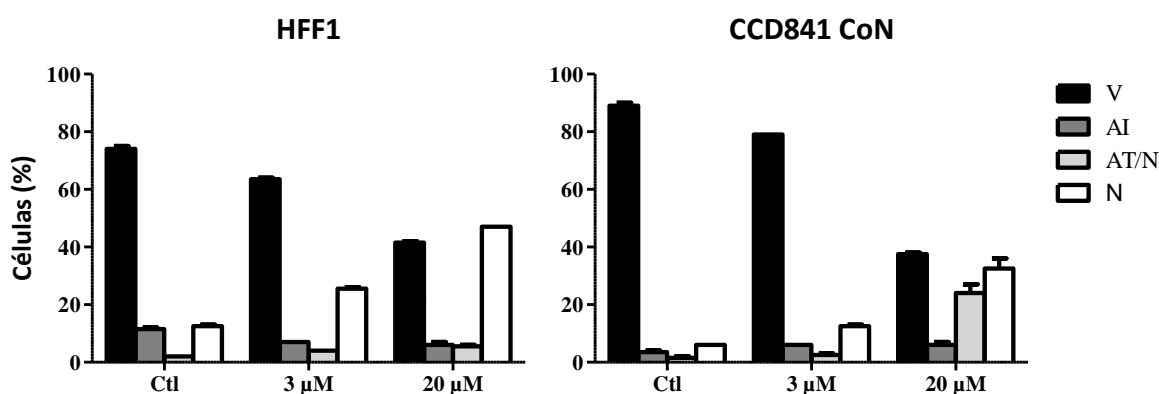


Figura 3.5 Viabilidade celular apresentada em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). As células foram incubadas durante 48h, sendo avaliadas três condições: controlo (Ctl), concentrações 3 μ M e 20 μ M do complexo 2.20. Os resultados preliminares apresentam-se como a média \pm erro-padrão de um ensaio realizado em duplicado.

Na linha celular HFF1, com o aumento da concentração do composto **2.20** observa-se uma diminuição da população de células viáveis, acompanhada por um aumento notório da percentagem de células em necrose, sendo este o tipo de morte predominante. Esta diminuição foi mais acentuada nas células CCD841 CoN, onde observou-se um aumento das células em apoptose tardia/necrose e necrose. Nas células normais, a média de inibição da viabilidade, foi de aproximadamente 10-15% muito semelhante às das células tumorais, para a concentração IC_{50} . A diferença mais notória, ocorre na concentração de 20 μ M, onde a percentagem de viabilidade nas células normais era aproximadamente de 40-45 %, contrapondo com os 10-20% das linhas celulares tumorais. Assim, é importante salientar que apesar do composto também induzir a morte celular nas células normais, para uma concentração aproximada a percentagem de células em morte não é tão pronunciada, mesmo para a concentração de 20 μ M, observando-se que o composto é mais seletivo para estas quatro linhas celulares tumorais.

3.3 Avaliação do ciclo celular

O objetivo deste estudo foi tentar compreender até que ponto o composto **2.20** induz alterações ao nível do ciclo celular. Utilizou-se novamente a citometria de fluxo, com recurso à marcação com IP/RNase, e obtiveram-se os resultados apresentados na Figura 3.6.

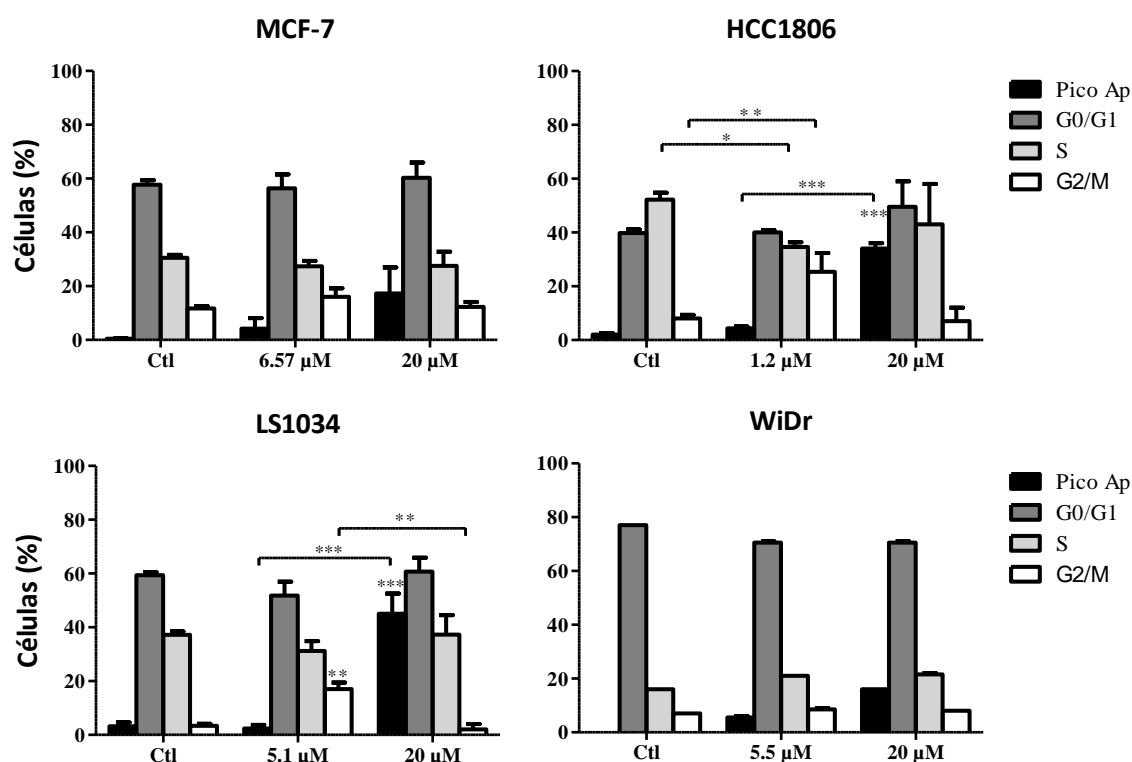


Figura 3.6 Ciclo celular apresentado em percentagem (%) de células em cada uma das fases do ciclo celular G0/G1, S e G2/M. Além disso ainda está presente o pico apoptótico, que indica a indução de morte celular por apoptose. As células foram incubadas durante 48h, sendo realizadas três condições: controle, concentrações IC₅₀ e 20 μM do complexo **2.20**. Os resultados apresentam-se sob a forma de média ± erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizadas em duplicado (n≥6) para as linhas celulares HCC1806 e LS1034. Os resultados das outras duas linhas são estudos preliminares (n=2). As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por: * para p<0,05; ** para p<0,01; *** para p<0,001.

Na linha celular tumoral MCF-7, não se observam alterações nas populações de células nas fases G0/G1, S e G2/M. Contudo, apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significativas, é de notar o aumento do pico apoptótico quando as células são tratadas com o composto **2.20**, comparativamente ao controle. Uma vez, que não foi realizado um número de ensaios suficiente, estes valores referem-se a resultados preliminares para a linha MCF-7 e WiDr, sendo necessário a realização de mais alguns ensaios para obter resultados mais conclusivos.

Na linha celular de cancro da mama HCC1806, observa-se um aumento do pico apoptótico com o aumento da concentração de **2.20**, com diferenças estatisticamente significativas entre a condição 20 μM e as restantes condições (p<0,001, para ambos os casos). Esse aumento é acompanhado por uma diminuição de 18 % na população de células bloqueadas na fase S. Diferenças estatisticamente significativas também estão presentes na população de células em fase

G2/M, onde ocorre um aumento de células tratadas para a concentração de IC₅₀ em relação ao controlo (p=0,001).

Os resultados obtidos para a linha celular LS1034 mostram o aumento estatisticamente significativo do pico apoptótico nas células tratadas com 20 µM de **2.20**, em comparação com as restantes condições (p<0,001, para ambos os casos). Na fase G2/M, ocorre um aumento significativo do número de células nesta fase, para uma concentração 5,1 µM de **2.20** em relação ao controlo e à concentração 20 µM (p=0,001, para ambos os casos). As restantes populações de células não apresentam alterações estatisticamente significativas.

Os resultados preliminares (n=2) obtidos para a linha celular WiDr mostram não haver alterações induzidas no ciclo celular, de modo que o número de células em fase G0/G1, fase S e fase G2/M não varia nas três condições testadas. No entanto, é de salientar que se observa o aumento do pico apoptótico com o aumento da concentração do composto **2.20**.

3.4 Stresse oxidativo

O passo seguinte na avaliação da citotoxicidade do complexo de Cu(II) **2.20** foi a avaliação da presença de ROS, nomeadamente, a produção intracelular de peróxidos e de radical superóxido. Paralelamente, também se avaliou a produção intracelular da defesa antioxidante GSH, que é produzida de modo a ser capaz de prevenir lesões no DNA. Neste estudo recorreu-se à técnica de fluorimetria. As duas linhas celulares HCC1806 e LS1034 foram novamente sujeitas às três condições estudadas anteriormente: um controlo, tratamento com a concentração correspondente ao valor de concentração IC₅₀, calculado para cada linha celular e a 20 µM do complexo **2.20**. Neste estudo, as células foram avaliadas após 2h e 24h de incubação, de modo a racionalizar a evolução da produção destas espécies ao longo do tempo.

Na Figura 3.7 estão representados os resultados relativos à produção de peróxidos intracelulares para as duas linhas celulares.

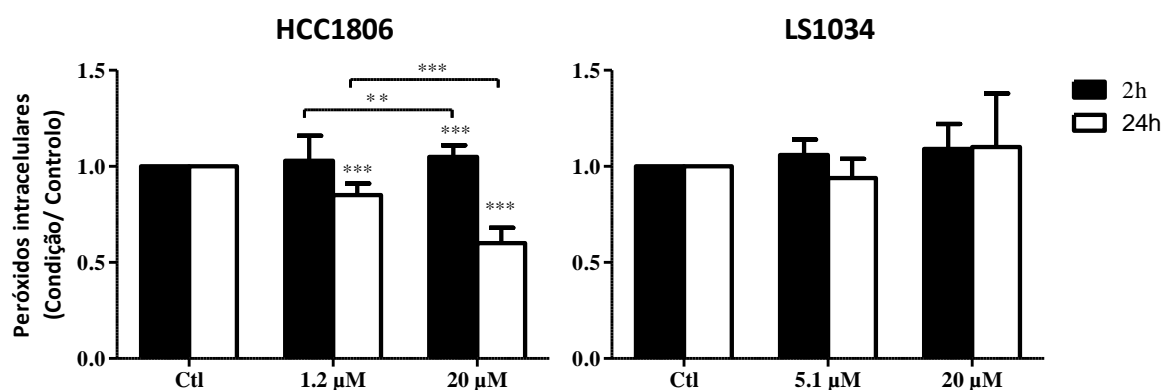


Figura 3.7 Avaliação da produção de peróxidos intracelulares nas linhas celulares HCC1806 e LS1034, após a exposição durante 2 e 24h. Os resultados estão apresentados com normalização ao controle, exprimindo a média \pm desvio-padrão de, pelo menos, duas experiências efetuadas independentemente e em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; *** para $p < 0,001$.

Numa primeira análise dos resultados para a linha HCC1806, conclui-se que após 2h de incubação com uma concentração 20 μM do composto **2.20**, há um aumento da produção de peróxidos, com significado estatístico em relação ao controle ($p < 0,001$) e à concentração 1,2 μM ($p = 0,001$). Contudo, após 24h observa-se uma diminuição na produção destas espécies com diferenças estatisticamente significativas entre todas as condições testadas ($p < 0,001$).

Na linha celular LS1034, apesar de observar-se um aparente aumento dos níveis de peróxidos com o aumento da concentração do complexo **2.20**, para os dois tempos de incubação, segundo uma análise estatística, não apresenta diferenças significativas entre as condições.

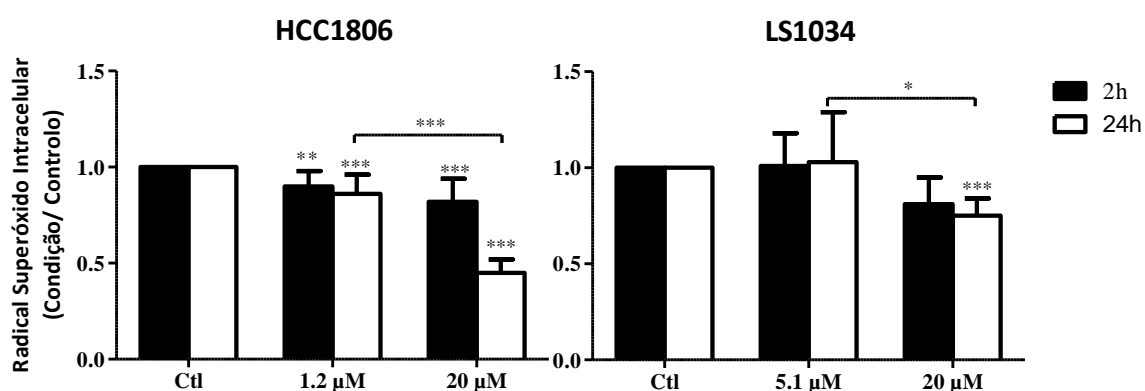


Figura 3.8 Avaliação da produção intracelular de radical superóxido nas linhas celulares HCC1806 e LS1034, após a exposição durante 2 e 24h. Os resultados estão apresentados com normalização ao controle, exprimindo a média e o desvio-padrão de, pelo menos, duas experiências efetuadas independentemente e em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; *** para $p < 0,001$.

Como apresentado na Figura 3.8, observou-se que os níveis intracelulares do radical superóxido diminuíram na linha celular HCC1806, com o aumento do tempo de incubação e da concentração de composto. Na avaliação às 2h, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa de peróxidos para as concentrações 1,2 μM ($p=0,016$) e 20 μM ($p<0,001$), em relação ao controlo. Também às 24h, as três condições apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,001$).

Na linha celular tumoral LS1034, observou-se uma diminuição na produção intracelular de radical superóxido quando as células são tratadas com uma concentração 20 μM de complexo, durante 24h, com diferenças em relação ao controlo ($p<0,001$) e ao IC_{50} ($p=0,050$).

Por fim, fez-se a avaliação da produção de defesa antioxidante como resposta às lesões provocadas pelas ROS, tendo sido quantificada a espécie GSH (Figura 3.9).

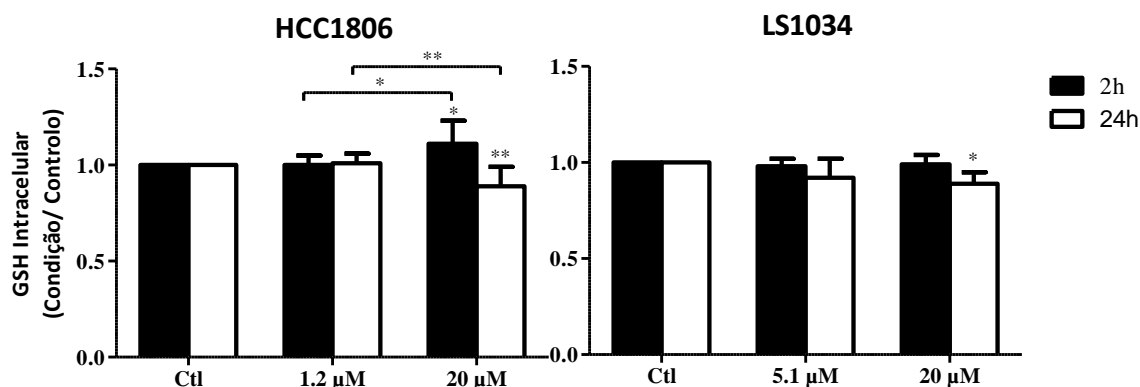


Figura 3.9 Avaliação da produção intracelular de GSH nas linhas celulares HCC1806 e LS1034, após a exposição ao composto **2.20** durante 2 e 24h. Os resultados estão apresentados com normalização ao controlo, exprimindo a média e o desvio-padrão de, pelo menos, duas experiências efetuadas independentemente e em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por: * para $p<0,05$; ** para $p<0,01$.

Após a incubação durante 2h das células HCC1806, ocorreu um aumento significativo de GSH na condição 20 μM em relação ao controlo ($p=0,029$) e à condição de 1,2 μM ($p=0,031$). Às 24h, verifica-se que há uma diminuição de radical peróxido intracelular na concentração 20 μM relativamente ao controlo ($p=0,006$) e a 1,2 μM ($p=0,002$).

A linha celular LS1034 não apresenta diferenças estatisticamente significativas após 2h de incubação com o composto **2.20**. O valor significativo presente no gráfico, refere-se a uma diminuição dos níveis de GSH das células expostas a 20 μM do composto **2.20** durante 24h, em relação ao controlo ($p=0,003$).

3.5 Estudo de hemocompatibilidade

Este estudo permitiu avaliar o efeito do composto **2.20** nas membranas dos eritrócitos, de modo a verificar se a integridade da membrana era comprometida, levando à libertação da hemoglobina no meio.^{74,75} A Figura 3.10 mostra os valores da hemoglobina, expressos em percentagens, após as suspensões de eritrócitos de sangue humano, serem expostas a quatro concentrações crescentes do composto **2.20**. Como controlo positivo usou-se Triton X-100, um surfactante que promove a lise das células de forma a extrair proteínas ou outros organelos celulares.⁷⁶

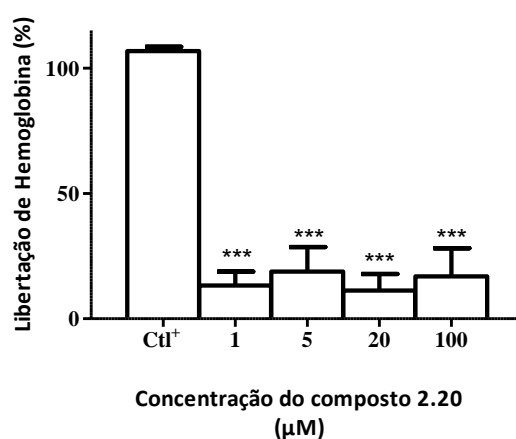


Figura 3.10 Quantificação da libertação de hemoglobina, expressa em percentagem em relação ao controlo positivo, após a incubação dos eritrócitos com concentrações crescentes (1, 5, 20 e 100 µM) do complexo **2.20**. Os resultados estão apresentados com normalização ao controlo, exprimindo a média e o desvio-padrão de três experiências efetuadas independentemente e em triplicado (n=9). As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por: *** para $p < 0,001$.

Os resultados obtidos revelam que, quando comparado ao controlo positivo, o composto **2.20**, não apresenta uma atividade hemolítica elevada, com o aumento da concentração, existindo diferenças estatisticamente significativas entre o controlo positivo e as quatro concentrações testadas ($p < 0,001$). Este facto verifica-se também na concentração mais elevada, a qual correspondeu neste estudo a uma concentração 4 vezes superior à concentração de composto usada nos ensaios de citotoxicidade. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o efeito induzido pelas quatro condições de tratamento testadas, variando a percentagem de libertação de hemoglobina entre 13 a 18%, contrapondo à libertação máxima ocorrida com a utilização do Triton X-100, onde se observaram claramente danos na membrana.

Discussão dos resultados dos estudos *in vitro*

Dos oito complexos de Cu(II) sintetizados e descritos no capítulo 2, apenas 6 avançaram para estudos de citotoxicidade, uma vez que para os complexos de Cu(II) contendo um derivado do 1-(3-aminopropil)imidazole diclorado **2.23** e dibromado **2.24**, não foi possível usar um solvente apropriado para dissolver os mesmos. Do mesmo conjunto de complexos, os complexos **2.21** (monoclorado) e **2.22** (monobromado), não eram solúveis no solvente convencionalmente usado em estudos *in vitro*, o DMSO, sendo-o em DMF. No entanto, o solvente DMF apresenta uma maior inibição na proliferação celular comparativamente ao DMSO, comprometendo a exequibilidade dos estudos propostos.

Nos estudos de citotoxicidade começou-se por determinar a atividade metabólica das células tumorais após exposição aos compostos, concluindo-se através dos valores de IC₅₀ calculados a partir das curvas dose-resposta, que o complexo de Cu(II) **2.20** é aquele que tem um maior efeito inibitório na proliferação, em todas as quatro linhas celulares. Para as linhas celulares MCF-7, LS1034 e WiDr, as células tumorais quando expostas ao complexo **2.20** revelaram ter respostas semelhantes, com IC₅₀ entre 5,1 e 6,57 µM, sugerindo que o efeito do composto é independente do tipo de cancro. No entanto, para a linha celular do cancro da mama, HCC1806, o complexo **2.20** apresenta o efeito antiproliferativo mais notório (IC₅₀=1,2 µM).

O segundo composto com um efeito inibitório mais revelante, é o complexo **2.17**, com uma estrutura semelhante ao **2.20**, diferenciando-se pelo facto do **2.17** apresentar na sua estrutura um grupo 4-nitroimidazole que é substituído pelo benzoimidazole no caso do **2.20**. Nas estruturas destes dois compostos, ainda está presente um grupo ciclo-hexilamina. O facto destes complexos apresentarem maior efeito antiproliferativo sugere que a presença desta amina é importante para a atividade antitumoral que estes complexos apresentam. As mesmas conclusões foram retiradas num estudo realizado com um complexo de platina (II), análogo à cisplatina, conhecido por JM118. Em termos de estrutura difere unicamente num dos grupos -NH₃, que é substituído por um grupo ciclo-hexilamina. Os resultados demonstraram que JM118 liga-se ao DNA de forma semelhante à descrita para a cisplatina, contudo, era mais ativo contra células tumorais humanas sensíveis e resistentes à cisplatina. A ciclo-hexilamina é uma amina primária, e menos impedida que a morfolina e piperidina, podendo facilitar a ligação ao centro metálico, provavelmente tornando o complexo mais estável que os restantes, e aumentando a sua eficácia.^{77,78} Comparando o conjunto de complexos derivados do 4-nitroimidazole, como já referido, o que contém a ciclo-hexilamina **2.17** é o mais citotóxico, sendo que os outros dois, o que contém a morfolina **2.18** e a piperidina **2.19**, apresentam valores de proliferação celular muito elevados pelo que não foi possível calcular

os seus valores de IC₅₀. Nestes casos, os valores de IC₅₀ seriam muito superiores às concentrações testadas durante o trabalho laboratorial.

Com os complexos de Cu(II) derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole pretendia-se estudar a influência do número e tipo de átomos de halogéneos na atividade antitumoral. No entanto, só a atividade dos complexos de Cu(II) **2.21** (monoclorado) e **2.22** (monobromado) foi avaliada, não sendo possível tirar conclusões sobre lipofilicidade e permeabilização na membrana celular. Só foi unicamente a diferença entre a presença de cloro e bromo na estrutura destes complexos. Nas linhas celulares MCF-7 e WiDr, o complexo monoclorado **2.21** apresentou valores de IC₅₀ ligeiramente superiores aos dos complexo **2.22**, enquanto que nas restantes linhas tumorais ocorreu o contrário. Ao longo do trabalho laboratorial, observou-se que os complexos **2.21** e **2.22** se degradavam em solução. A justificação para essa instabilidade química pode passar pelo facto do solvente DMF tornar a ligação entre o metal e o ligando mais lábil, e o ligando poder ser substituído pelo solvente. Assim sendo, estes complexos não apresentam interesse terapêutico devido à sua rápida degradação.

É na linha celular HCC1806, que todos os complexos apresentam o melhor efeito inibitório da proliferação celular, sugerindo assim que a presença de um anel imidazole na estrutura dos complexos possa fornecer alguma seletividade para células com características deste tipo de cancro da mama.

A comparação entre as curvas dose-resposta do complexo **2.20** e do ligando correspondente **2.13**, demonstrou que o ligando só por si não apresenta um efeito inibitório significativo da proliferação celular. Isso acontece quando este é complexado com o Cu(II), sugerindo que a presença deste centro metálico é extremamente importante na inibição da proliferação celular.^{79,80}

Comparando os valores de IC₅₀ obtidos para o complexo mais promissor na inibição da proliferação celular – complexo **2.20** – com os valores anteriormente obtidos com outros fármacos usados atualmente na quimioterapia convencional no cancro colorretal e da mama, verifica-se que praticamente todos os valores são mais baixos, à exceção da epirrubicina para as células HCC1806 (240 nM) e MCF-7 (320 nm), que são na ordem dos nanomolares. O facto do composto **2.20** apresentar valores de IC₅₀ muito melhores do que os fármacos comercializados, torna-o um potencial fármaco para o tratamento destes tipos de cancro.

O composto **2.20** foi sujeito a outros estudos, nomeadamente a estudos de viabilidade e ciclo celular, com o intuito de perceber se a diminuição da atividade metabólica seria acompanhada pela diminuição da viabilidade celular e por alterações no ciclo celular.

Nas quatro linhas celulares, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração do complexo **2.20**. De uma forma geral, na maioria das linhas celulares, o tipo de morte celular induzido por elevadas concentrações do complexo **2.20** é a necrose ou apoptose tardia/necrose. A necrose é um tipo de morte celular que está normalmente associado a um forte estímulo que pode ter sido desencadeado pela produção de espécies reativas, assim como danos no DNA, o que foi bastante evidente nas concentrações mais elevadas. Pode-se assim concluir que, para concentrações elevadas, ocorrem alterações celulares fortes que induzem a um processo de necrose.

Em termos de ciclo celular, nas linhas celulares MCF-7 e WiDr não se observam alterações notórias nas condições testadas relativamente ao controlo. No entanto, com o aumento da concentração ocorre um aumento do pico apoptótico, o que está de acordo com o observado na análise da viabilidade celular com a presença de apoptose ou apoptose tardia. Seria necessário, realizar mais ensaios, uma vez que estes são resultados preliminares. Nas linhas HCC1806 e LS1034, para a concentração IC₅₀ do composto **2.20**, observa-se um bloqueio na fase G2/M. Esse bloqueio normalmente está associado a danos no DNA, o que permite concluir que estas concentrações induzem danos no material genético.⁸¹ Para a condição de 20 µM em ambas as linhas, o aumento do pico apoptótico em relação ao do controlo é bem vivível, ocorrendo um pequeno aumento na população de células que ficou bloqueada na fase G0/G1. Esta fase corresponde à fase anterior da replicação do material genético, onde as células aumentam de tamanho, produzem RNA e sintetizam proteínas, preparando a célula para a fase seguinte, a fase S. Assim sendo, para concentrações mais elevadas, o que acontece é que o estímulo é tão intenso que o bloqueio acontece antes que as células consigam sintetizar o DNA, provocando a sua morte, como corroborado pela população em necrose nos resultados de viabilidade celular e também na morfologia.

De modo a averiguar se o mecanismo de ação do composto **2.20** envolveria a indução de stresse oxidativo, foi avaliada a presença de ROS e da defesa antioxidante GSH, quando as duas linhas celulares foram expostas ao complexo em estudo, após 2h e 24h.

Um aumento da produção de peróxidos foi observado nas duas linhas celulares com o aumento da concentração, quando incubadas durante 2h. Na incubação de 24 h, enquanto que as células HCC1806 diminuíram os níveis de produção de peróxidos, as LS1034, aparentemente, mantiveram os níveis elevados em relação ao controlo. A diminuição ocorrida após 24h na linha celular HCC1806, pode ser justificada pelo facto desta espécie reativa se converter noutras ao longo do tempo, o que poderá ter dificultado a sua quantificação.

Quanto aos níveis de radical superóxido, estes tendem a diminuir na presença do complexo **2.20**, para a linha celular HCC1806 nos dois tempos de incubação, enquanto que para a linha LS1034 isso só acontece quando as células são sujeitas à concentração mais elevada (20 μ M). Os danos provocados pela citotoxicidade do composto **2.20** na concentração mais elevada e no IC₅₀ correspondente à linha HCC1806 poderão ser tão elevados, que a quantificação do radical superóxido seja dificultada ou até mesmo que ocorra a conversão rápida desse radical noutras espécies.

Quando expostas a agentes que induzem lesões no DNA, as células através de mecanismos de defesa produzem defesas antioxidantes, sendo uma delas a GSH, responsável pela destoxificação de ROS, incluindo o radical superóxido e peróxidos, de modo a prevenir essas lesões.⁸² Sendo assim, seria de esperar que o aumento de espécies reativas fosse acompanhado com um aumento de GSH, o que se acontece na linha HCC1806 para uma incubação de 2h. Para o mesmo tempo de incubação, na linha celular LS1034, os níveis desta defesa antioxidante mantiveram-se. Após 24h de incubação com o composto **2.20**, ocorreu uma descida acentuada dos níveis de GSH para ambas as linhas celulares, com o aumento da concentração do complexo. Os baixos níveis de GSH das condições testadas, relativamente ao controlo, resultam em processos de morte celular rápida, o que vem a corroborar o facto de nessas condições a percentagem de viabilidade ser muito baixa.⁸³

Quando testado o complexo **2.20** em células saudáveis HFF1 e CDD841 CoN, os resultados preliminares mostraram uma diminuição do número de células com o aumento da concentração do composto, acompanhado com um aumento do número de células em necrose. Contudo, a inibição da proliferação celular não é tão acentuada como nas linhas celulares tumorais, sugerindo que o complexo **2.20** sintetizado poderia apresentar vantagens em relação a fármacos usados na clínica e que afetam também as células saudáveis.

Por fim, recorrendo ao estudo de hemocompatibilidade foi possível concluir que o composto **2.20** não provocou uma libertação elevada de hemoglobina em solução, em comparação com o detergente usado, Triton X-100, mesmo com o aumento da concentração do complexo. Este baixo valor de hemoglobina libertada, permite concluir que as membranas dos eritrócitos não terão sofrido alterações estruturais, permitindo assim o armazenamento da hemoglobina no interior do eritrócito. Assim sendo, verifica-se que o complexo **2.20** não apresenta toxicidade sanguínea, não levando a um processo de hemólise, tornando a administração intravenosa uma via possível e segura para o composto.

CAPÍTULO IV

Conclusão

4. Conclusão

O objetivo do trabalho foi sintetizar novos complexos de Cu(II) derivados do imidazole e avaliar a sua atividade antitumoral em linhas celulares de cancro colorretal e da mama, de forma a poderem tornar-se alternativas eficazes e vantajosas relativamente aos fármacos usados atualmente na clínica. Como os complexos de Cu e os imidazóis têm revelado atividade farmacológica de interesse em química medicinal, pensou-se em aliar estes dois tipos de compostos, conduzindo à síntese de vários complexos de Cu(II) derivados do imidazole.

Numa primeira fase do trabalho laboratorial, foram sintetizados três conjuntos de ligandos: três ligandos derivados do 4-nitroimidazole **2.3-2.5**, obtidos por reação do 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole com ciclo-hexilamina, morfolina e piperidina, respetivamente; quatro ligandos derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole **2.7-2.10**, preparados por reação deste com salicilaldeídos clorados e bromados; e um ligando derivado do benzoimidazole **2.13** obtido por reação do 1-(2-bromoetil)-1*H*-benzoimidazole com ciclo-hexilamina. Além disso, ainda foram realizadas tentativas de síntese de outros derivados do imidazole, nomeadamente de derivados do 2-(clorometil)-1*H*-benzoimidazole e da 1*H*-benzoimidazole-1-il)metanamina, mas que, por falta de tempo, não foi possível concluir as sequências sintéticas projetadas.

Os ligandos anteriormente descritos foram complexados com Cu(OAc)₂.H₂O, dando origem aos complexos de Cu(II) derivados do 4-nitroimidazole **2.17-2.19**, do benzoimidazole **2.20** e do 1-(3-aminopropil)imidazole **2.21-2.24**.

Posteriormente, os complexos de Cu(II) sintetizados foram sujeitos a estudos *in vitro*, nomeadamente de determinação da proliferação celular nas linhas do cancro colorretal LS1034 e WiDr e de cancro da mama MCF-7 e HCC1806. O complexo de Cu(II) derivado do benzoimidazole, **2.20**, revelou ser o mais promissor, tendo em conta que apresentou uma maior inibição da proliferação celular nas quatro linhas celulares, com IC₅₀ entre 1,2 e 5,67 µM. Estabelecendo uma comparação destes valores com os dos fármacos convencionais usados no tratamento dos cancros da mama e colorretal, conclui-se que, para alguns casos, os valores obtidos para o complexo **2.20** são mais baixos. O facto deste complexo apresentar na sua estrutura um grupo ciclo-hexilamina, tratando-se de uma amina secundária, poderá permitir que a ligação ao centro metálico ocorra

facilmente, uma vez que se trata de uma amina menos impedida. Sendo assim, o complexo tornar-se-ia mais estável que os restantes, aumentando a sua eficácia na atividade antitumoral.

A atividade citotóxica do ligando derivado do benzoimidazole, **2.13**, foi também estudada para as mesmas linhas tumorais, tendo-se observado que este apresentava uma atividade citotóxica muito baixa. Sendo que o complexo correspondente a este ligando (**2.20**) era aquele que induziu uma maior inibição proliferativa, conclui-se que o centro metálico é responsável pela atividade antitumoral e não o ligando.

O complexo **2.20** foi ainda submetido a estudos de viabilidade e ciclo celular nas quatro linhas celulares tumorais, para avaliação da produção de ROS e da defesa antioxidante GSH para as linhas LS1034 e HCC1806, assim como, a estudos de hemocompatibilidade. De uma forma geral, os resultados de viabilidade celular demonstraram que a citotoxicidade do complexo **2.20** culminava em morte celular por necrose para todas as linhas celulares tumorais. Paralelamente, o composto **2.20** induziu o bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 para MCF-7 e na fase G2/M para HCC1806 e LS1034 para concentrações mais baixas e na fase G0/G1 para concentrações mais elevadas.

Relativamente à avaliação do stresse oxidativo, na linha celular HCC1806, após 2h de incubação com o composto **2.20**, ocorreu um aumento de peróxidos e de GSH e uma diminuição do radical superóxido. Após 24h, os níveis destas espécies diminuíram. Na LS1034, ocorreu um aumento de peróxidos e superóxido para a concentração IC₅₀ e uma diminuição do superóxido para 20 µM. Os níveis de GSH mantiveram-se após 2h, mas diminuíram após 24h. Estas alterações nos níveis de ROS e da defesa antioxidante GSH, induzidas pelo complexo **2.20**, revelam que, aparentemente existe stresse oxidativa. Contudo, são necessários estudos mais detalhados.

Além destas quatro linhas celulares, foram testadas duas linhas celulares do tecido normal, HFF1 e CCD841 CoN, de forma a averiguar até que ponto o complexo é seletivo para tecido tumoral. O complexo **2.20** não induziu uma morte celular tão acentuada como a que tinha sido observada nas linhas celulares tumorais, concluindo-se ser mais seletivo para as linhas celulares tumorais.

Por fim, foi efetuado o estudo de hemocompatibilidade, onde foram usadas soluções de eritrócitos de sangue humano, ficando demonstrado que o composto **2.20** não induzia lesões na membrana dos eritrócitos, mantendo a integridade desta. Este estudo realizou-se através da medição da libertação de hemoglobina, depois dos eritrócitos terem sido expostos ao complexo em estudo.

Os resultados acima descritos, mostraram que o composto **2.20** pode revelar-se um potencial fármaco para o tratamento de cancro colorretal e da mama, nomeadamente para tumores resistentes à quimioterapia convencional.

As perspetivas futuras deste trabalho passam por dar continuidade aos estudos preliminares de viabilidade e ciclo celular das linhas celulares tumorais e dos estudos de seletividade nas linhas celulares de tecido normal (HFF1 e CDD841 CoN), para tornar os resultados mais robustos. Também determinar o mecanismo de ação envolvido na morte celular e a possível presença de lesões no DNA provocadas pela ação dos complexos recorrendo ao ensaio cometa, são alguns dos objetivos. A enzima SOD, conhecida por superóxido dismutase, catalisa a dismutação do superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio. Sendo uma das defesas antioxidantes enzimáticas mais importantes, a avaliação da sua atividade seria outro dos passos seguintes assim como a iniciação de estudos *in vivo*.

CAPÍTULO V

Experimental

5. Experimental

Neste capítulo estão descritos os procedimentos experimentais seguidos para a obtenção dos compostos descritos no capítulo II, bem como as técnicas de identificação, caracterização e aparelhos utilizadas neste trabalho (espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C , infravermelho e ponto de fusão) e processos de purificação e secagem dos solventes.

A caracterização das linhas celulares utilizadas, os materiais e métodos usados nos estudos *in vitro*, a técnica de citometria de fluxo, o ensaio de hemocompatibilidade e os aparelhos usados estão também aqui apresentados.

5.1 Técnicas de identificação e caracterização

Espetros de ressonância magnética nuclear

Os espetros de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C) foram realizados à temperatura ambiente, recorrendo a um espectrómetro *Brucker Avance III 400MHz*, utilizando o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os solventes usados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido (DMSO-d_6).

Espetros de infravermelho

Os espetros de infravermelho foram obtidos, num espectrofotómetro *Agilent Technologies Cary 630 FTIR*, recorrendo a pastilhas de KBr.

Ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados num medidor de pontos de fusão FALC (método capilar aberto).

Cromatografia

Placas de sílica 60 F264 com suporte de alumínio, fornecidas pela Merck, foram utilizadas para cromatografia de camada fina (TLC), de modo a controlar a evolução das reações. Nas cromatografias em coluna foi utilizada gel de sílica (0.040-0.063 mm) fornecido pela Merck ou Fluka.

Citometria de fluxo

As sondas fluorescentes foram detetadas tendo sido utilizado um citómetro FACS Calibur.

Ensaio de hemocompatibilidade

Nesta técnica, para a quantificação da hemoglobina libertada foi utilizado um espectrofotómetro ELISA (Biotek®, *Synergy HT*).

5.2 Purificação e Secagem dos Solventes e Reagentes

Os reagentes foram adquiridos comercialmente apresentando alto grau de pureza, não tendo sido necessário recorrer a qualquer purificação adicional.

Quanto aos solventes, estes foram destilados e secos de acordo com os procedimentos descritos de seguida.

Acetato de Etilo

O solvente foi refluxado durante 2h30, na presença de K_2CO_3 .

Acetonitrilo

O solvente foi seco por refluxo durante 3h, na presença de pentóxido de fósforo, seguido de destilação.

Diclorometano

Foi refluxado na presença de $CaCl_2$ durante 2h, tendo sido de seguida destilado.

Dimetilformamida

Durante 24h, o solvente foi tratado com óxido de cálcio que anteriormente fora ativado a 500°C. Após decantação, foi adicionado NaOH, e agitado durante 1h. Finalmente, o DMF foi decantado e destilado.

Metanol

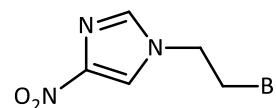
Este solvente foi refluxado com magnésio e uma quantidade catalítica de iodo durante 2h, e depois destilado a partir do respectivo alcóxido, de acordo com o método de Lund e Bjerrum.

Éter etílico, Hexano

Foram obtidos após refluxo com sódio e na presença de benzofenona (usada como indicador) e posterior destilação.

5.3 Métodos sintéticos

5.3.1 Síntese de 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole (2.2)



Num balão de fundo redondo, colocou-se 50 mmol (5,65 g) de 4-nitroimidazole, 200 mmol de 1,2-dibromoetano (17,4 mL), na presença de 50 mmol de carbonato de potássio (6,90 g) e de vestígios de iodeto de sódio (NaI), em refluxo de acetonitrilo (50 mL) durante cerca de 24h. Filtrou-se a solução para remover o excesso de carbonato de potássio e evaporou-se o solvente.

Fez-se uma extração do produto com diclorometano e água, e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e evaporou-se o solvente. Realizou-se uma cromatografia por coluna em gel de sílica usando como eluente acetato de etilo e hexano numa relação de 3:1. O produto foi recristalizado em diclorometano/éter etílico, tendo sido obtido um sólido amarelo pálido.

Rendimento: 55%

Ponto de fusão: 110°C

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3,67 (t, 2H, $J=6,0$ Hz); 4,47 (t, 2H, $J=6,0$ Hz); 7,53 (s, 1H); 7,87 (s, 1H).

RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 29,62; 49,62, 119,08; 136,19; 148,43.

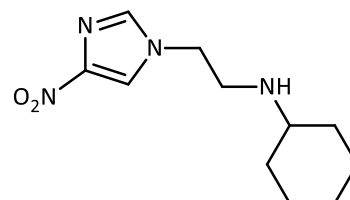
IV (cm^{-1}): 1544, 1527, 1517, 1487, 1466, 1407, 1380, 1334, 1287, 1264, 1234, 1159, 1139, 989, 982, 887, 875, 821, 756, 656.

5.3.2 Síntese dos ligandos derivados do 4-nitroimidazole

Este grupo de compostos foram sintetizados utilizando o mesmo procedimento, tendo sido diferente o modo de isolamento.

Num balão de fundo redondo, fez-se reagir 5 mmol (1,09 g) de 1-(2-bromoetil)-4-nitroimidazole com 6 mmol da amina, 5 mmol (0,7 g) de carbonato de potássio, na presença de uma quantidade catalítica de iodeto de sódio, e colocou-se em refluxo de acetonitrilo (20 mL) durante 18-24h. Terminado o tempo de reação, os sais de carbonato foram filtrados e o solvente foi evaporado.

***N*-(2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)ciclohexilamina (2.3)**



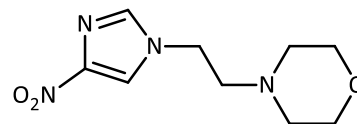
O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ na razão 90:10. O produto obtido foi um óleo viscoso amarelado.

Rendimento: 39%

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0,97-1,07 (m, 1H); 1,13-1,29 (m, 4H); 1,54-1,65 (m, 1H); 1,70-1,76 (m, 2H); 1,81-1,89 (m, 2H); 2,37-2,44 (m, 1H); 3,04 (t, 2H, $J=5,6$ Hz); 4,08 (t, 2H, $J=5,6$ Hz); 7,53 (d, 1H, $J=1,6$ Hz); 7,89 (s, 1H, $J=1,6$ Hz).

RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 25,5; 26,0; 30,3; 45,4; 45,5; 59,5; 121,7; 138,7; 149,1 (hidrobrometo de *N*-(2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)ciclohexilamina).

IV (cm^{-1}): 2927, 2852, 1544, 1519, 1490, 1448, 1403, 1378, 1334, 1288, 1130, 983, 823.

***N*-(2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)morfolina (2.4)**

O produto foi isolado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ na razão 98:2.

Obteve-se um sólido com cor amarelo pálido.

Rendimento: 70%

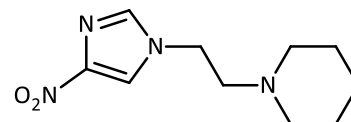
Ponto de fusão: 105°C

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 2,51 (t, 4H, $J=4,8$ Hz); 2,74 (t, 2H, $J=5,6$ Hz); 3,71 (t, 4H, $J=4,8$ Hz); 4,08 (t, 2H, $J=5,6$ Hz); 7,52 (s, 1H); 7,89 (s, 1H).

RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 44,6; 52,9; 57,7; 66,4; 120,5; 137,1; 146,9 (hidrobrometo de *N*-(2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil) morfolina).

IV (cm^{-1}): 3141, 3104, 1540, 1523, 1486, 1332, 1284, 1116.

HRMS (ESI): calculado para $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$: 226,1066; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$: 227,1142

***N*-(2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)piperidina (2.5)**

O isolamento do produto foi feito através de uma cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente acetato de etilo/ MeOH /dietilamina 110:10:3, tendo-se obtido um sólido amarelo.

Rendimento: 76%

Ponto de fusão: 107°C

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1,42-1,48 (m, 2H); 1,55-1,61 (m, 4H); 2,41-2,44 (m, 4H); 2,66 (t, 2H, $J=6,0$ Hz); 4,06 (t, 2H, $J=6,0$ Hz); 7,52 (d, 1H, $J=1,4$ Hz); 7,90 (d, 1H, $J=1,4$ Hz).

RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 24,1; 26,0; 30,3; 45,9; 54,6; 58,6; 119,9; 136,3.

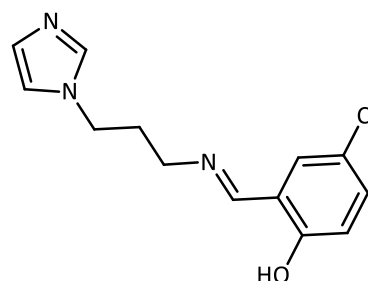
IV (cm^{-1}): 2931, 1540, 1535, 1521, 1484, 1328, 1286, 823.

HRMS (ESI): calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$: 224.1273; encontrado para $[\text{M}+\text{H}]^+$: 225.1346.

5.3.3 Síntese dos ligandos derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole

A síntese deste conjunto de compostos foi realizada utilizando as mesmas condições. Para isso, num balão de fundo redondo foi adicionado 5 mmol (0,6 mL) de 1-(3-aminopropil)imidazole, 5 mmol do salicilaldeído (5-clorosalicilaldeído, 5-bromosalicilaldeído, 3,5-dibromosalicilaldeído ou 3,5-diclorosalicilaldeído) e 0,9 g de sílica ativada em 15 mL de etanol. Colocou-se a reação num banho de ultrassons durante 1h30, tendo sido a reação controlada por TLC. Filtrou-se a sílica e lavou-se com CH₂Cl₂. Evaporou-se o solvente. De seguida, procedeu-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente CH₂Cl₂/MeOH na razão 90:10. Foram obtidos óleos amarelos.

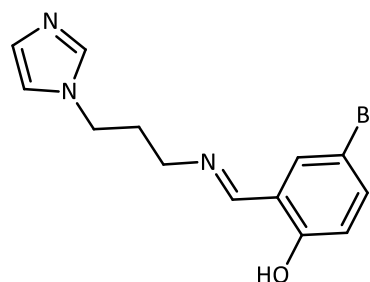
2-(((3-1H-imidazole-1-il)propil)imino)metil)-4-clorofenol (2.7)



Rendimento: 32%

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2,17-2,24 (m, 2H); 3,56-3,59 (m, 2H); 4,08 (t, 2H, J=7,0 Hz); 6,92-6,98 (m, 2H); 7,06-7,14 (m, 1H); 7,23-7,25 (m, 1H); 7,27-7,29 (m, 2H); 8,26 (s, 1H); 13,10 (s, 1H).

2-(((3-1H-imidazole-1-il)propil)imino)metil)-4-bromofenol (2.8)



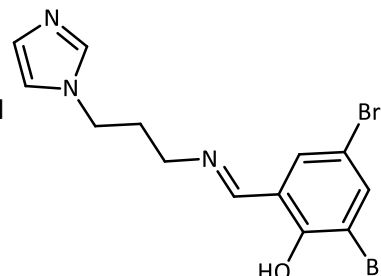
Rendimento: 46%

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2,17-2,24 (m, 2H); 2,55-3,59 (m, 2H); 4,08 (t, 2H, J=6,8 Hz); 6,86-6,89 (m, 1H); 6,91-6,94 (m, 1H); 7,07-7,11 (m, 1H), 7,35-7,37 (m, 1H); 7,39-7,42 (m, 1H); 7,45-7,49 (m, 1H); 8,25 (s, 1H); 13,1 (s, 1H).

RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 31,6; 44,3; 55,9; 110,3; 118,7; 119,0; 119,9; 129,8; 133,5; 135,2; 137,1; 160,0; 164,9.

IV (cm⁻¹): 3367, 3112, 2937, 2852, 1635, 1608, 1573, 1508, 1479, 1438, 1375, 1276, 1230, 1201, 1180, 1108, 1079, 819, 740, 663, 626.

**2-(((3-(1H-imidazole-1-il)propil)imino)metil)-4,6-dibromofenol
(2.9)**



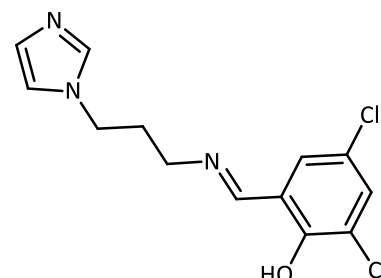
Rendimento: 70%

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2,18-2,29 (m, 2H); 3,58-3,61 (m, 2H); 4,09 (t, 2H, *J*=6,6 Hz); 6,93 (s, 1H); 7,09 (s, 1H); 7,34 (d, 1H, *J*=2,4 Hz); 7,48 (s, 1H); 7,71 (d, 1H, *J*=2,4 Hz); 8,21 (s, 1H); 14,29 (s, 1H).

RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 31,5; 44,2; 55,2; 109,9; 112,2; 118,7; 119,8; 130,0; 132,8; 137,9; 141,9; 157,6; 164,4.

IV (cm⁻¹): 3116, 3077, 2935, 2877, 1666, 1567, 1509, 1455, 1265, 1230, 1164, 1106, 1081, 862, 819, 736, 663, 624, 563.

**2-(((3-(1H-imidazole-1-il)propil)imino)metil)-4,6-clorofenol
(2.10)**

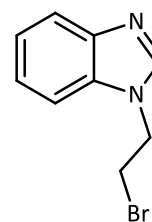


Rendimento: 68%

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2,18-2,25 (m, 2H); 3,58-3,61 (m, 2H); 4,09 (t, 2H, *J*=6,8 Hz); 6,93 (s, 1H); 7,09 (s, 1H); 7,16 (d, 1H, *J*=2,4 Hz); 7,43 (d, 1H, *J*=2,4 Hz); 7,48 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 14,12 (s, 1H).

RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 31,5; 44,2; 55,5; 118,7; 119,4; 122,8; 123,1; 129,1; 130,0; 132,4; 137,1; 156,2; 164,5.

IV (cm⁻¹): 3399, 3114, 2938, 1637, 1508, 1384, 1280, 1214, 1182, 1149, 1108, 1081, 1031, 946, 917, 865, 854, 823, 742, 688, 663, 624, 565.

5.3.4 Síntese do 1-(2-bromoetil)-1*H*-benzimidazole (2.12)

Num balão de fundo redondo, fez-se reagir 5 mmol (0,59 g) de benzimidazole com 20 mmol de 1,2-dibromoetano (1,74 mL), na presença de 16 mmol (2,44 mL) de DBU, em 20 mL de acetonitrilo e deixou-se em refluxo durante 18-24h. Para isolar o produto, realizou-se uma cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente CH₂Cl₂/MeOH 95:5. Obteve-se um sólido de cor amarelo pálido.

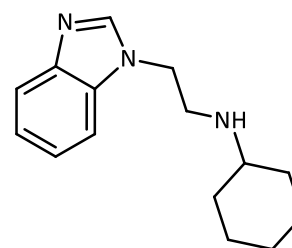
Rendimento: 21%

Ponto de fusão: 93°C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 3,93 (t, 2H, *J*=6,0 Hz); 4,70 (t, 2H, *J*=6,0 Hz); 7,21-7,30 (m, 2H); 7,66-7,69 (m, 2H); 8,29 (s, 1H).

RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 32,1; 45,6; 110,4; 119,4; 121,6; 122,4; 133,5; 143,4; 144,3.

IV (cm⁻¹): 3095, 3054, 2979, 2958, 2917, 2856, 1733, 1612, 1587, 1490, 1461, 1417, 1380, 1359, 1332, 1278, 1241, 1199, 1157, 1128, 1008, 892, 767, 744, 634, 428.

5.3.5 Síntese do 2-(1*H*-benzimidazole-1-il)etil)ciclohexilamina (2.13)

Para a síntese deste ligando, fez-se reagir 1,1 mmol (0,250 g) de 1-(2-bromoetil)-benzimidazole com 1,25 mmol (0,175 mL) de ciclo-hexilamina em 15 mL de acetonitrilo, na presença de 1,25 mmol (0,175 g) de carbonato de potássio e uns vestígios de iodeto de sódio. Colocou-se a reação sob agitação e em refluxo, durante 24h.

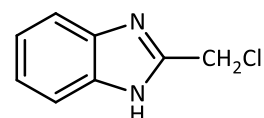
Terminado o tempo de refluxo, filtrou-se para remover os sais de carbonato e evaporou-se o solvente. O ligando foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como eluente CH₂Cl₂/MeOH 90:10. Obteve-se um óleo amarelo.

Rendimento: 35%

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1,02-1,14 (m, 3H); 1,16-1,28 (m, 2H); 1,57-1,61 (m, 1H); 1,69-1,74 (m, 2H); 1,85-1,88 (m, 2H); 2,45-2,52 (m, 1H); 3,15 (t, 2H, $J=6,0$ Hz); 4,36 (t, 2H, $J=6,0$ Hz); 7,22-7,32 (m, 2H); 7,45 (d, 1H, $J=8,0$ Hz); 7,71 (d, 1H, $J=8,0$ Hz); 8,04 (s, 1H).

IV (cm⁻¹): 3390, 3089, 3060, 2927, 2852, 1704, 1648, 1614, 1496, 1459, 1450, 1384, 1367, 1288, 1261, 1203, 1128, 1008, 892, 767, 744, 634, 428.

5.3.6 Síntese de 2-(clorometil)-1H-benzimidazole (2.15)



Num balão de fundo redondo, fez-se reagir 10 mmol (1,08 g) de *o*-diaminobenzeno com 13 mmol (1,2 mL) de cloroacetato de metilo em 9 mL de HCl 4M e deixou-se em agitação à temperatura ambiente durante 4 horas. Após esse tempo, deixou-se mais 4 horas em refluxo. De forma a isolar o produto final, adicionou-se à solução resultante 25 mL de água gelada, seguindo-se a adição de amónia até atingir um pH de 9. Posteriormente, o sólido foi filtrado e lavado com água, obtendo-se um sólido amarelo.

Rendimento: 76%

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 4,92 (s, 2H); 7,20-7,22 (m, 2H); 7,55-7,57 (m, 2H).

IV (cm⁻¹): 3087, 3056, 3008, 2940, 2850, 2744, 2688, 2634, 1675, 1621, 1589, 1488, 1454, 1442, 1315, 1278, 1253, 1226, 1031, 1020, 933, 840, 767, 744, 736, 700, 640, 437.

5.3.7 Síntese de Complexos de Cu(II)

5.3.7.1 Procedimento geral para a síntese dos complexos de Cu(II) derivados do 4-nitroimidazole e do benzimidazole:

Num balão de fundo redondo foi adicionado 1 mmol de ligando, 0.5 mmol de acetato de cobre e 20 mL de metanol seco. Colocou-se em refluxo e agitação magnética durante 6h, tendo sido controlada a reação por TLC.

Após arrefecimento da reação, ocorreu formação de um sólido que depois foi filtrado. Evaporou-se o metanol e adicionou-se éter etílico para precipitar o resto do complexo, que foi filtrado novamente. Os complexos apresentavam tons azuis.

Complexo de Cu(II)/ *N*-(2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)ciclo-hexilamina (2.17)

Rendimento: 46%

Ponto de fusão: 92°C (degrada)

IV (cm⁻¹): 3421, 3122, 2933, 2857, 1629, 1548, 1492, 1403, 1384, 1338, 1290, 1135, 1045, 823, 755, 682, 669, 474.

Complexo de Cu(II)/ *N*-(2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)morfolina (2.18)

Rendimento: 69%

Ponto de fusão: 238°C

IV (cm⁻¹): 3133, 2857, 2807, 1542, 1513, 1490, 1450, 1402, 1330, 1286, 1263, 1137, 1114, 1070, 1010, 981, 867, 823, 655.

Complexo de Cu(II)/ *N*-(2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil)piperidina (2.19)

Rendimento: 55%

Ponto de fusão: 74°C (degrada)

IV (cm⁻¹): 3475, 3374, 2935, 1604, 1546, 1513, 1488, 1446, 1421, 1986, 1351, 1332, 1292, 1126, 989, 823, 692.

Complexo de Cu(II)/ 2-(1*H*-benzoimidazole-1-il)etil)ciclohexilamina (2.20)

Rendimento: 45%

Ponto de fusão: 112°C (degrada)

IV (cm⁻¹): 3421, 3106, 2929, 2854, 1573, 1515, 1465, 1446, 1384, 1336, 1297, 1197, 746.

5.3.7.2 Procedimento geral para a síntese dos complexos de Cu(II) derivados do 1-(3-aminopropil)imidazole:

Para a síntese deste conjunto de complexos, seguiu-se o mesmo procedimento usado para os complexos anteriores, no entanto a reação foi efetuado usando 1 mmol de ligando e 1 mmol de acetato de cobre.

Estes complexos de Cu(II) foram cristalizados por arrefecimento da mistura da reação, tendo sido obtidos sólidos com coloração verde.

Complexo de Cu(II)/ 2-(((3-1*H*-imidazole-1-il)propil)imino)metil)-4-clorofenol (2.21)

Rendimento: 85%

Ponto de fusão: 196,4°C

IV (cm⁻¹): 3421, 3133, 1623, 1529, 1465, 1423, 1392, 1324, 1176, 1106, 1093, 825, 721, 707, 659.

Complexo de Cu(II)/ 2-(((3-1*H*-imidazole-1-il)propil)imino)metil)-4-bromofenol (2.22)

Rendimento: 92%

Ponto de fusão: 195°C

IV (cm⁻¹): 3421, 3135, 1621, 1527, 1465, 1390, 1324, 1176, 1108, 1093, 825, 669, 653.

Complexo de Cu(II)/ 2-(((3-(1H-imidazole-1-il)propil)imino)metil)-4,6-dibromofenol (2.23)

Rendimento: 78%

Ponto de fusão: 220°C

IV (cm⁻¹): 3135, 2925, 1621, 1452, 1413, 1386, 1328, 1214, 1157, 1108, 754, 709, 680, 653.

Complexo de Cu(II)/ 2-(((3-(1H-imidazole-1-il)propil)imino)metil)-4,6-clorofenol (2.24)

Rendimento: 90%

Ponto de fusão: 233°C

IV (cm⁻¹): 3421, 3145, 3056, 2981, 2925, 2869, 1621, 1602, 1589, 1531, 1465, 1455, 1442, 1417, 1386, 1330, 1220, 1172, 1108, 1093, 767, 754, 746.

5.4 Estudos in vitro

Após a síntese dos complexos de Cu(II), prosseguiu-se para estudos *in vitro* com o intuito de avaliar a atividade antitumoral dos mesmos.

Foram usadas linhas celulares que têm como característica o crescimento em monocamada aderente, as quais foram mantidas num ambiente apropriado. Do cancro da mama utilizou-se as linhas celulares humanas MCF-7 (ATCC Cat#HTB-22) e HCC1806 (ATCC Cat#CRL-2335) e do cancro do colorretal LS1034 (ATCC Cat# CRL-2158), linha celular do cego, e WiDr (ATCC Cat#CCL-218), linha do cólon esquerdo. Para além destas linhas celulares, foram utilizadas as linhas celulares CCD841-CoN (ATCC Cat#CRL-1790) e HFF1 (ATCC Cat#SCRC-1041), que correspondem a células saudáveis humanas do cólon e células penianas mais concretamente do prepúcio, respetivamente. Estas linhas celulares permitiram avaliar a seletividade dos compostos.

5.4.1 Culturas celulares

A propagação e o manuseamento das linhas celulares decorreram sob condições rigorosas, num ambiente estéril e asséptico. As linhas celulares foram adquiridas pela *American Type Culture*

Collection (ATCC), e foram propagadas em cultura aderente e mantidas a 37°C numa incubadora *Binder*, em atmosfera humificada com 95% de ar e 5% de CO₂.

As linhas celulares do cancro da mama têm origem na glândula mamária de diferentes doentes. A MCF-7 expressa IGFBP (do inglês *insuline growth factor binding protein*) e é positiva para recetores de estrogénio e progesterona. É uma linha celular pouco agressiva e invasiva, apresentando um baixo potencial metastático.⁸⁴ Por outro lado, a linha celular HCC1806 é de um tipo de cancro da mama triplo negativo, não apresentando recetores para estrógeno (ER), progesterona (PR) e HER-2 e não expressa a proteína P53.⁸⁵

Relativamente ao cancro colorretal, as células LS1034 têm origem no cego de um doente com cancro colorretal no estágio C. Apresentam mutações nos genes supressores que codificam a P53 e a APC, tratando-se também de uma linha celular descrita como resistente à quimioterapia. A linha celular tumoral WiDr é proveniente da região reto-sigmóide do cólon, também apresentando uma mutação no gene que codifica na proteína P53, diferente da respetiva mutação das células LS1034, e na APC.⁷¹

As linhas celulares CCD841-CoN, HFF1, MCF-7 e WiDr foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648), e as linhas celulares HCC1806 e LS1034 foram cultivadas em *Roswell Park Memorial Institute*, RPMI 1640 (Sigma, R4130).

Os meios foram preparados e suplementados com 1% de antibiótico (Sigma, A5955; 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco, 11360) para RPMI e 0,25 mM para DMEM, e 15% de soro bovino fetal (Sigma, F7524) para HFF1, 10% para CCD841 e 5% para as restantes linhas celulares. Tal como já mencionado, as culturas celulares usadas crescem numa monocamada que adere ao suporte sólido. De maneira a conseguir-se realizar estudos com elas, é necessário que as células se destaquem dos suportes através de métodos enzimáticos. Para isso, começou-se por lavar as culturas de células com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) e posteriormente adicionou-se 2 mL de uma solução de TrypLE Express™ (Gibco, 12605-028), deixando-se incubar a 37°C até que as células se destacassem do frasco.

Findo o tempo de incubação, adicionou-se 4mL de meio de cultura, de modo a inativar a solução enzimática e ressuspendeu-se a suspensão celular. Para proceder-se à contagem das células num microscópio ótico invertido (Motic, AE31), diluiu-se 20 µL de azul tripano e 20 µL da suspensão celular e transferiu-se para uma câmara de *Neubauer* (Figura 5.1).

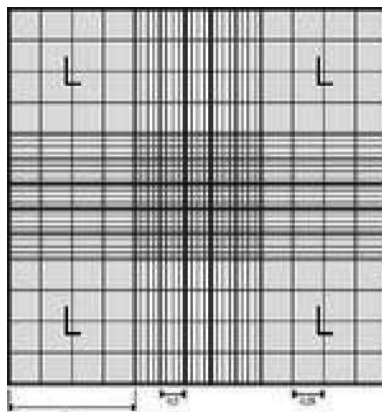


Figura 5.1 Câmara de Neubauer ou hemocítmetro

O objetivo do método de exclusão do azul tripano é contabilizar as células vivas em suspensão uma vez que consegue diferenciar das células mortas. Por fim, à suspensão celular foi adicionado meio de cultura de maneira a obter-se a concentração pretendida, conforme o estudo posterior.

5.4.2 Avaliação da citotoxicidade

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico dos complexos de Cu(II) nas linhas celulares tumorais. Começou-se por determinar a proliferação celular após exposição aos compostos sintetizados, de modo a encontrar qual apresentava o maior efeito inibitório da proliferação celular, e com esse prosseguir para estudos posteriores como a avaliação da viabilidade e ciclo celular, ROS e estudos de morfologia.

Foram utilizados dois solventes: o dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, D4540) e a dimetilformamida (DMF), dependendo da solubilidade dos compostos. Todas as soluções utilizadas foram previamente autoclavadas ou esterilizadas através de um processo de filtração, recorrendo a filtros (GE Healthcare, Whatman, Resist™ 30/0,2 PTFE-S). Os complexos metálicos foram testados em concentrações que variaram entre 0,5 e 200 μM .

5.4.2.1 Avaliação da proliferação celular

Foram preparadas suspensões celulares com 50 mil células/mL em meio de cultura para as linhas MCF-7 e WiDr, uma suspensão com 60 mil células/mL para HCC1806 e outra com 70 mil

células/mL para a linha celular LS1034. Estas suspensões celulares foram distribuídas por placas de 48 poços, tendo cada poço ficado com um volume final de 500 μ L. Após 24h, tempo necessário para as células voltarem a aderir ao suporte sólido, foram testadas as concentrações dos complexos metálicos entre 0,5 e 200 μ M. Além disso ainda foram feitos dois controlos: um em que não foi adicionado qualquer composto e outro correspondente ao solvente onde os complexos foram solubilizados e que representava 1% do volume de meio de cultura de cada poço. Depois as células foram incubadas durante 48h.

Seguidamente, realizou-se o ensaio colorimétrico MTT, com o qual foi possível avaliar a atividade metabólica das células sujeitas aos compostos e obter curvas dose-resposta.

O MTT consiste num sal de tetrazólio de cor amarela que permite avaliar a viabilidade e função mitocondrial das células. Estes sais revelam a atividade das enzimas desidrogenases, presentes em células metabolicamente ativas, e conseguem protonar o anel de tetrazólio do MTT, formando cristais de formazano com uma coloração roxa. Depois de solubilizados e quantificados por espectrofotometria, é possível avaliar a atividade mitocondrial e consequentemente, a atividade metabólica (Figura 5.2).⁸⁶

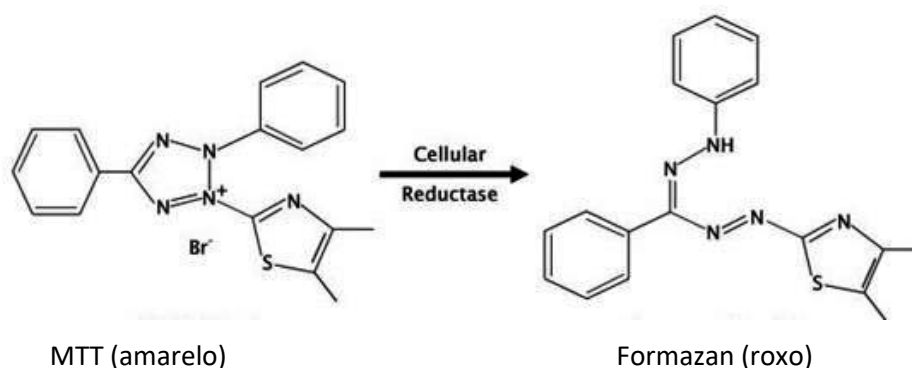


Figura 5.2 Estruturas químicas do MTT e dos cristais de formazan resultantes das células metabolicamente ativas

Posto isto, e terminado o tempo de incubação de 48h, o meio de cultura das placas foi descartado e as células lavadas com PBS. Adicionou-se 150 μ L de uma solução de MTT (0,5 mg/mL: Sigma, M2128) em PBS e incubou-se durante pelo menos 2h a 37°C. Para dissolver os cristais de formazano formados, recorreu-se a uma solução 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol, tendo sido adicionado em cada poço 150 μ L e colocadas as placas sob agitação.

Após a solubilização dos cristais, foram transferidos 200 μ L de cada poço para uma placa de 96 poços (Sarstedt, Alemanha), e feita a leitura das absorvâncias num espectrofotómetro, usando os comprimentos de onda de 570 e 620 nm.

As curvas dose-resposta e os valores de IC₅₀ foram calculados recorrendo ao programa Origin Pro 8.5, tendo anteriormente calculado a percentagem da atividade metabólica sujeitas ao complexo de Cu(II) em relação às células sujeitas ao solvente, tendo sido utilizada a **equação 1.1**.

$$\% \text{ Atividade metabólica} = \frac{(\text{Células tratadas com solução})_{(Abs\ 570\ nm - Abs\ 620\ nm)}}{(\text{Células tratadas com solvente})_{(Abs\ 570\ nm - Abs\ 620\ nm)}} \times 100$$

Equação 1.1. Determinação da atividade metabólica das células tumorais

5.4.2.2 Avaliação da viabilidade celular

O efeito ao nível da morte celular do complexo que induziu maior inibição de proliferação foi avaliado recorrendo à citometria de fluxo. A partir da citometria de fluxo as partículas que se encontram em suspensão no líquido em fluxo podem ser contadas, examinadas e classificadas, permitindo que se faça uma análise de vários parâmetros.

Neste trabalho foi utilizado um citómetro FACSCalibur, tendo em cada ensaio sido usadas 1x10⁶ células para todas as marcações. O número de eventos, que correspondia ao número de células, foi calculado pelo programa CellQuest™, e a quantificação e análise dos resultados foi feita recorrendo a um *software* específico (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software).

Para a análise da viabilidade celular foram utilizadas duas sondas fluorescentes, a anexina V (AnV) acoplada a FITC (do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e o iodeto de propídio (IP). A anexina V trata-se de uma proteína anticoagulante, que tem a capacidade de ligação a fosfolípidos aniónicos, tais como a fosfatidilserina que se encontra no folheto interno da bicamada fosfolipídica. Já o iodeto de propídio permite corar e intercala-se no DNA e RNA celulares.⁸⁷ Os tipos de morte celular podem ser distinguidos porque durante a apoptose, a fosfatidilserina desloca-se para o folheto externo da bicamada, permitindo a sua deteção quando as células são incubadas com AnV-FITC. Pelo facto da membrana se manter íntegra, o IP não atravessa a mesma, não conseguindo intercalar com o DNA. Isto acontece quando a membrana apresenta danos como consequência de uma apoptose tardia ou necrose.^{88,89}

Na análise deste estudo podemos agrupar os resultados em quatro grupos distintos: o primeiro correspondente às células viáveis (negativa para ambas as marcações), o segundo em que as células estão em apoptose inicial (marcação positiva para AnV-FITC e negativa para IP), o terceiro onde as células se encontram em apoptose tardia/necrose (marcações positivas para as duas

sondas) e por último, em que as células estão em necrose (marcação negativa para AnV-FITC mas positiva para IP).

As células foram sujeitas a três condições: a um controlo no qual não foi adicionado qualquer composto, a um valor de IC₅₀ (calculado para cada linha celular [Tabela 5.1]) e à concentração de 20 µM (concentração máxima testada para este composto) e incubadas durante 48 horas.

Tabela 5.1 Valores de IC₅₀ do composto **2.20**, para cada respetiva linha celular

Linha celular	IC ₅₀ (µM)
MCF-7	6,57
HCC1806	1,2
LS1034	5,1
WiDr	2,6

As células foram centrifugadas a 1300 xG durante 5 minutos, tendo o sobredanante sido descartado. Foi realizada uma lavagem no qual foi adicionado PBS ao *pellet* obtido e sujeito novamente a centrifugação. Ao sedimento foi adicionado 100 µl de tampão de ligação frio (0,01M de Hepes [Sigma, H7535], 0,14 M de NaCl [Sigma, S7653] e 0,25 mM de CaCl₂ [Sigma, C4901]), 2,5 µL de AnV-FITC (Immunostep, ANXVF) e 1 µL de IP (kit Immunostep). Utilizando um vórtex, a solução celular foi homogeneizada e foi incubada no escuro durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, adicionou-se mais 400 µL de tampão de ligação frio e a solução foi homogeneizada novamente. Os comprimentos de onda de excitação foram de 525 nm para AnV-FITC e de 488 nm para o IP. Os resultados apresentados estão na forma de percentagem de células identificadas em cada subpopulação, demonstrando marcação positiva ou negativa para as sondas AnV-FITC/IP.

5.4.2.3 Avaliação do ciclo celular

Neste estudo foi novamente utilizada a técnica de citometria de fluxo para avaliar o ciclo celular. Durante o ciclo celular, as células passam por quatro etapas: a fase G1 (gap-1), a fase S onde

ocorre a replicação do DNA, a fase G2 (gap-2) e por último a fase M (mitose), no qual há uma divisão do material genético pelas duas células-filhas.⁹⁰

Nesta avaliação foram usadas duas sondas, uma solução de iodeto de propídeo (IP) e RNase (esta última responsável por catalisar a degradação do RNA), permitindo agrupar as células em três populações: células que se encontram na fase S (no qual o DNA está a ser replicado), células que estão da fase G0 e G1 onde ainda não ocorreu a replicação do material genético e a fase G2 e M onde as células apresentam o dobro do conteúdo genético relativamente ao início do processo. A obtenção de histogramas de fluorescência permite a análise do ciclo celular nesta técnica.⁹¹

De um modo semelhante ao procedimento da viabilidade celular, as células foram centrifugadas a 1300 xG durante, 15 minutos e descartado o sobrenadante. Foi adicionado 200 µL de etanol a 70% frio a cada tubo em agitação no vórtex e as células foram incubadas durante 30 minutos no escuro a 4°C. Seguidamente, as células foram lavadas com 2 mL de PBS, centrifugadas nas mesmas condições e descartado o sobrenadante. Adicionou-se 200 µL de uma solução de IP/RNase (Immunostep, PI/RNase) e incubou-se durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. O comprimento de onda de excitação de 488 nm foi o usado para possibilitar a deteção.

5.4.2.4 Avaliação das espécies reativas de oxigénio

De modo a avaliar o ambiente após a exposição das linhas celulares ao composto **2.20**, foi avaliado a produção intracelular de ROS, nomeadamente o radical superóxido e de peróxidos e a defesa antioxidante GSH. Os níveis intracelulares destas espécies foram avaliados por fluorimetria. Para a deteção da presença do radical superóxido, utilizou-se a sonda DHE (do inglês *dihydroethidium*), que atravessa a membrana celular e se oxida pelo radical superóxido, originando um composto vermelho que se intercala no DNA. Desta forma, é possível determinar a presença do radical superóxido a nível intracelular.^{92,93}

A presença de peróxidos foi avaliada usando a sonda DCFH₂-DA (do inglês *2',7'-dichlorohydrofluorescein diacetate*) que é capaz de atravessar a membrana e já no meio intracelular, os seus dois grupos acetatos são clivados por esterases intracelulares e formam DCFH (do inglês *2',7'-dichlorohydrofluorescein*), que é oxidado pelo H₂O₂ resultando no composto DCF (do inglês *2',7'-dichlorofluorescein*).⁹⁴

De modo a detetar a presença de peróxido e do radical superóxido, as células foram sujeitas a três condições: a um controlo no qual não foi adicionado qualquer composto, a um valor de IC₅₀

(calculado para cada linha celular [Tabela 5.1]) e à concentração de 20 μM (concentração máxima testada para este composto). As células foram incubadas durante 2 e 24h.

Após o tempo de incubação, foram usadas 1×10^6 células por ensaio e por condição, as quais foram sujeitas a uma lavagem com PBS, centrifugadas e removido o sobrenadante. Após a adição de 6 mL de PBS, as células foram distribuídas pelos tubos, tendo sido realizado um duplicado para cada condição. Seguidamente, a cada tubo foram adicionados 5 μL de DHE (1mM [Sigma, D7008]) durante 15 minutos ou 1 μL de DCFH₂-DA (5 μM [Molecular Probes, D-399]) durante 45 minutos, a 37°C, no escuro. Seguidamente, a suspensão celular foi lavada com PBS e centrifugada a 1300G durante 5 minutos, e finalmente o pellet foi ressuspensionado em 400 μL de PBS. A suspensão foi transferida para placas de 96 poços, sendo o volume de cada tubo dividido em dois replicados de 200 μL . A leitura foi feita num espectrofotómetro ELISA (Biotek®, *Synergy HT*), com o comprimento de onda de excitação de 620 nm para o DHE e 488 nm para o DCF.

De forma a prevenir lesões no DNA, as células apresentam mecanismos de defesa antioxidante, incluindo antioxidantes não enzimáticos nomeadamente a GSH, que neutralizam as ROS. A GSH reage com o oxigénio singlete, o radical superóxido e o radical hidroxilo, entre outras.^{95,96} Usando o alaranjado de mercúrio, um composto fluorescente, que se liga especificamente aos grupos sulfidril, do GSH, originando um produto que emite fluorescência vermelha com um comprimento de onda de excitação de 488 nm, sendo possível avaliar a sua produção também por fluorimetria. O procedimento foi semelhante ao das espécies oxidantes anteriores, tendo as células sido incubadas com 1 μL de alaranjado de mercúrio (10 mM [Sigma, M7750]) durante 15 minutos, no escuro a 37°C. A suspensão celular foi lavada por centrifugação com PBS a 1300 xG, durante 5 minutos, e o sedimento foi ressuspensionado em 400 μL de PBS. Finalmente, a suspensão foi transferida para uma placa de 96 poços, tendo feito dois replicados de 200 μL . O comprimento de onda de excitação foi de 620 nm.

5.4.2.5 Morfologia

Com o intuito de complementar os resultados da avaliação da viabilidade celular, efetuaram-se estudos de morfologia para as linhas celulares tumorais HCC1806 e LS1034.

Começou-se por preparar uma suspensão celular com 100 mil células/mL que foi distribuída por placas de 12 poços, ficando cada poço com um volume final de 1 mL. Após 24h, administrou-se o complexo de Cu(II) que revelou ter uma maior inibição na proliferação celular, o composto **2.20**. As células foram sujeitas a três condições: o controlo, o IC₅₀ (Tabela 5.1) e à concentração máxima de composto testada, seguido de incubação durante 48h.

O meio das placas foi recolhido, as células lavadas com PBS e adicionado TrypLe, deixando incubar a 37°C, até que as células se destacassem. A solução enzimática foi inibida com o meio de cultura inicialmente recolhido, e a suspensão celular foi sujeita a centrifugação de 1300 xG durante 5 min. Descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente, mas desta vez com PBS para lavar as células. Descartou-se o sobrenadante, tendo sido obtido um *pellet* de células ao qual foram adicionados 40 µL de FBS, homogeneizado e colocado numa lâmina. Com a ajuda de uma lamela, fez-se um esfregaço das células sobre a lâmina e deixou-se secar.

Os esfregaços foram fixados em metanol durante 5 min. Depois foram corados com *May-Grünwald* 1:4 em metanol durante 3 min seguido de *Giemsa* 1:9 em H₂O durante 8 min. De seguida foram lavados em água corrente durante 3 min, secos ao ar, diafanizados com xilol (VWR, Radnor, EUA) e preservados com meio de montagem sintético Entellan New (Merck, Darmstadt, Alemanha). As lâminas foram observadas ao microscópio ótico Olympus U-D30 (Olympus, Tokyo, Japão) e fotografadas com uma câmara Olympus SC30 (Olympus, Tokyo, Japão).

5.4.2.6 Estudo de hemocompatibilidade

Neste ensaio pretendeu-se avaliar a hemocompatibilidade, isto é, avaliar se o composto se provoca alguma lesão na membrana dos eritrócitos, por medição da libertação de hemoglobina e até mesmo perceber se o composto poderá vir a ser administrado por via intravenosa. Começou-se por recolher 1 mL de sangue e transferiu-se para uma solução de NaCl 0,85% com CaCl₂ 10 mM (1:30) anteriormente preparada. Após 3 centrifugações e lavagens (1500 rpm/3 min), foi obtido um *pellet* de eritrócitos. De acordo com o volume pretendido, foi ressuscitado a 2% na solução preparada inicialmente, e a solução foi distribuída por placas de 96 poços. Adicionaram-se volumes do composto **2.20**, de forma a testar a gama de concentrações 1, 5, 20 e 100 µM. Além destes, ainda foram feitos controlos negativos, no qual não foi adicionado nenhum composto, controlos positivos, onde foi usado Triton-X 100, um detergente que promove a lise das células, e testados ainda o efeito do solvente no qual o composto estava dissolvido.

A placa de 96 poços foi depois incubada durante 1 hora, sob agitação, e depois sujeita a centrifugação (4000 rpm/5min). Finalmente, o sobrenadante foi recolhido e feita a quantificação da libertação da hemoglobina através da medição da absorvância a 540 nm, utilizando a **equação 1.2**.

$$\% \text{ Libertação de hemoglobina} = \frac{\text{Abs (amostra)}}{\text{Abs (controlo positivo)} - \text{Abs (controlo negativo)}} \times 100\%$$

Equação 1.2. Fórmula para o cálculo da libertação de hemoglobina

5.4.3 Análise estatística

A análise estatística dos valores experimentais da avaliação da viabilidade, do ciclo celular, produção de ROS e defesa antioxidante foi realizada usando o *software* IBM® SPSS® Statistics, versão 24.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA).

A comparação da viabilidade e ciclo celular, a produção de ROS e defesa antioxidante entre as três condições com o complexo de Cu(II) **2.20** para cada concentração foi realizada segundo o teste Analysis of Variance (ANOVA) de um fator (distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou pelo teste Kruskal-Wallis (caso contrário). As comparações múltiplas foram feitas usando o teste *Tukey* (em caso de homogeneidade de variâncias) ou o teste *Games-Howel* (caso contrário). No caso da amostra ser constituída por menos de 10 valores, procedeu-se à análise não paramétrica. Considerou-se o nível de significância de 0,05.

CAPÍTULO VI

Referências

Referências

- (1) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674.
- (2) Mi, Y.; Zhao, J.; Feng, S. S. *J. Control. Release* **2013**, *169* (3), 185–192.
- (3) Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-tieulent, J.; Jemal, A. *CA a cancer J. Clin.* **2015**, *65* (2), 87–108.
- (4) Direção-Geral da Saúde. *Programa Nacional para as Doenças Oncológicas*; Lisboa, 2013.
- (5) Day, L. W.; Velayos, F. *Gut Liver* **2015**, *9* (2), 143–151.
- (6) Astin, M.; Griffin, T.; Neal, R. D.; Rose, P.; Hamilton, W. *BritishJournalofGeneralPractice* **2011**, No. May, 231–243.
- (7) Aran, V.; Victorino, A. P.; Thuler, L. C.; Ferreira, C. G. *Clin. Colorectal Cancer* **2016**, *15* (3), 195–203.
- (8) Markowitz, S. D.; Dawson, D. M.; Willis, J.; Willson, J. K. V. *Cancer Cell* **2002**, *1* (3), 233–236.
- (9) Markowitz, S.; Bertagnolli, M. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361* (25), 2449–2460.
- (10) Hauptman, N.; Glavač, D. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2017**, *2017*, 1–11.
- (11) Sun, Y. S.; Zhao, Z.; Yang, Z. N.; Xu, F.; Lu, H. J.; Zhu, Z. Y.; Shi, W.; Jiang, J.; Yao, P. P.; Zhu, H. *P. Int. J. Biol. Sci.* **2017**, *13* (11), 1387–1397.
- (12) McPherson, K.; Steel, C. M.; Dixon, J. M. *Bmj* **2000**, *321* (7261), 624.
- (13) M.Weiss. Your Guide to the Breast Cancer Pathology Report, *Breastcancer.org*, 2013.
- (14) Nussbaumer, S.; Bonnabry, P.; Veuthey, J. L.; Fleury-Souverain, S. *Talanta* **2011**, *85* (5), 2265–2289.
- (15) Boyle, P.; Langman, J. S. *Clin. Rev.* **2000**, *321*, 805–808.
- (16) Gustavsson, B.; Carlsson, G.; MacHover, D.; Petrelli, N.; Roth, A.; Schmoll, H. J.; Tveit, K. M.; Gibson, F. *Clin. Colorectal Cancer* **2015**, *14* (1), 1–10.
- (17) Marques, A. M.; Turner, A.; Mello, R. A. De; Marques, A. M.; Hospitalar, C. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20* (30), 10425–10431.
- (18) Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 330–338.
- (19) Miura, K.; Kinouchi, M.; Ishida, K.; Fujibuchi, W.; Naitoh, T.; Ogawa, H.; Ando, T.; Yazaki, N.; Watanabe, K.; Shibata, C.; Sasaki, I. *Cancers (Basel)*. **2010**, *2*, 1717–1730.

- (20) Mathijssen, R. H. J.; Verweij, J.; Loos, W. J.; Bruijn, P. De; Nooter, K.; Sparreboom, A. *Br. J. Cancer* **2002**, *38*, 144–150.
- (21) Armand, J. P.; Ducreux, M.; Mahjoubi, M.; Abigeres, D.; Bugat, R.; Chabot, G.; Herait, P.; Forni, M. De; Rougier, P. *Eur. J. Cancer* **1995**, 1283–1287.
- (22) Fuchs, C.; Mitchell, E. P.; Hoff, P. M. *Elsevier* **2006**, *32* (7), 491–503.
- (23) Comella, P.; Sandomenico, C. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2009**, *5*, 229–238.
- (24) Alcindor, T.; Beauger, N. *Curr. Oncol.* **2011**, *18* (1), 18–25.
- (25) Alian, O. M.; Azmi, A. S.; Mohammad, R. M. *Clin. Transl. Med.* **2012**, *1* (26), 1–7.
- (26) Breast Cancer. American Cancer Society, 2014.
- (27) Leong, S. L.; Chaiyakunapruk, N.; Wen, S.; Lee, H. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (39), 1–13.
- (28) Volkova, M.; Russell, R. *Curr. Cardiol. Rev.* **2011**, *7*, 214–220.
- (29) MCGowan, J. V.; Chung, R.; Maulik, A.; Piotrowska, I.; Walker, J. M.; Yellon, D. M. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2017**, *31*, 63–75.
- (30) Rizvi, S. F. A.; Tariq, S.; Mehdi, M. *Int. J. Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *4* (4), 81–85.
- (31) MCGrogan, B. T.; Gilmartin, B.; Carney, D. N.; Mccann, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1785*, 96–132.
- (32) Weger, V. A. De; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. *Anticancer. Drugs* **2014**, *25*, 488–494.
- (33) Abal, M.; Andreu, J. M.; Barasoain, I. *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 193–203.
- (34) Green, D. R.; Llambi, F. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2015**, *7*, 1–25.
- (35) Fink, S. L.; Cookson, B. T. *Infect. Immun.* **2005**, *73* (4), 1907–1916.
- (36) Bruijninx, P. C.; Sadler, P. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (2), 197–206.
- (37) Muhammad, N.; Guo, Z. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19* (1), 144–153.
- (38) Zhang, C. X.; Lippard, S. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (4), 481–489.
- (39) Hanif, M.; Hartinger, C. G. *Future Medicinal Chemistry*. 2018, p 3.
- (40) Murtinho, D.; Da Rocha, Z. N.; Pires, A. S.; Jiménez, R. P.; Abrantes, A. M.; Laranjo, M.; Mamede, A. C.; Casalta-Lopes, J. E.; Botelho, M. F.; Pais, A. A. C. C.; Nunes, S. C. C.; Burrows, H. D.; Costa, T.; Serra, M. E. S. *Appl. Organomet. Chem.* **2015**, *29* (7), 425–432.
- (41) Riccardi, C.; Musumeci, D.; Irace, C.; Paduano, L.; Montesarchio, D. *European J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (7), 1100–1119.
- (42) Chen, J.; Luo, Z.; Zhao, Z.; Xie, L.; Zheng, W.; Chen, T. *Biomaterials* **2015**, *71*, 168–177.
- (43) Dhahagani, K.; Kumar, S. M.; Chakkaravarthi, G.; Anitha, K.; Rajesh, J.; Ramu, A.; Rajagopal, G. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *117*, 87–94.
- (44) Mart, P.; Garza-ort, A.; Mijangos, E.; Barr, L.; Contreras, R.; Reedijk, J.; Barr, L.; Francisco, S. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Elsevier B.V. 2014, p 28.

- (45) Munteanu, C. R.; Suntharalingam, K. *Dalt. Trans.* **2015**, *44* (31), 13796–13808.
- (46) Wehbe, M.; Leung, A. W. Y.; Abrams, M. J.; Orvig, C.; Bally, M. B. *Dalton Trans.* Royal Society of Chemistry 2017, p 9.
- (47) Tabti, R.; Tounsi, N.; Gaidon, C.; Bentouhami, E.; Desaubry, L. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. **2017**, *7* (5), 875–879.
- (48) Chakraborty, A.; Kumar, P.; Ghosh, K.; Roy, P. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *647* (1–3), 1–12.
- (49) Gou, Y.; Li, J.; Fan, B.; Xu, B.; Zhou, M.; Yang, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *134*, 207–217.
- (50) Verma, A.; Joshi, S.; Singh, D. *J. Chem.* **2013**, *2013*, 1–12.
- (51) Gupta, P.; Gupta, J. K. *Chem. Sci. J.* **2015**, *6* (2), 1–12.
- (52) Gupta, V.; Kant, V. *Sci. Int.* **2013**, *1* (7), 253–260.
- (53) Zhang, L.; Peng, X.; Damu, G. L. V; Geng, R.; Zhou, C. *Med. Res. Rev.* **2013**, *34* (2), 340–437.
- (54) Ali, I.; Lone, M. N.; Aboul-Enein, H. Y. *Medchemcomm* **2017**, *8*, 1742–1773.
- (55) Li, Q.; Deng, X.; Zu, Y.; Lv, H.; Su, L.; Yao, L.; Zhang, Y.; Li, L. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (7), 3200–3206.
- (56) Biersack, B.; Muthukumar, Y.; Schobert, R.; Sasse, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (21), 6270–6273.
- (57) Beale, T. M.; Myers, R. M.; Shearman, J. W.; Charnock-jones, D. S.; Brenton, J. D.; Gergely, V.; Ley, S. V. *Medchemcomm* **2010**, *1*, 202–208.
- (58) Chen, J.; Wang, Z.; Li, C.; Lu, Y.; Vaddady, P. K.; Meibohm, B.; Dalton, J. T.; Miller, D. D.; Li, W. J. *Med. Chem.* **2010**, *53* (20), 7414–7427.
- (59) Pautus, S.; Aboraia, A. S.; Bassett, C. E.; Brancale, A.; Coogan, M. P.; Simons, C. J. *Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24* (21), 487–498.
- (60) Dewang, P. M.; Kim, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (14), 4228–4232.
- (61) Kim, D.; Lee, Y.; Woo, Y.; Dewang, P. M.; Yhong, Y.; Woon, Y.; Park, H.; Yoo, J.; Soon, H.; Kim, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (12), 4459–4467.
- (62) Satam, V.; Babu, B.; Chavda, S.; Savagian, M.; Sjöholm, R.; Tzou, S.; Liu, Y.; Kiakos, K.; Lin, S.; Wilson, W. D.; Hartley, J. A.; Lee, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (2), 693–701.
- (63) Abrantes, A. M. Hipoxia Tumoral - Metabonómica e Imagem Estudo Experimental, Universidade de Coimbra, 2013.
- (64) Batista, J. Síntese de complexos metálicos de salens e salans para estudos de citotoxicidade, Universidade de Coimbra, 2015.
- (65) Abrantes, A. M.; Serra, M. E. S.; Murtinho, D.; Gonsalves, A. M. R.; Botelho, M. F. *Oncol. Rev.* **2009**, *3*, 30–44.
- (66) Serra, M. E. S.; Murtinho, D.; Goth, A.; Gonsalves, A. M. R.; Abreu, P. E.; Pais, A. A. C. C.

- Chirality* **2010**, *22*, 425–431.
- (67) Bai, Y.-B.; Zhang, A.-L.; Tang, J.-J.; Gao, J.-M. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (11), 2789–2795.
- (68) Petkar, K.; Parekh, P.; Mehta, P.; Kumari, A.; Baro, A. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *5* (2), 115–119.
- (69) Sheng, C.; Che, X.; Wang, W.; Wang, S.; Cao, Y.; Yao, J.; Miao, Z.; Zhang, W. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1706–1712.
- (70) Kim, C.; Gao, R.; Brandt, R.; Hartman, J.; Hatschek, T.; Crosetto, N.; Foukakis, T.; Navin, N. E. *Cell Press* **2018**, *173* (4), 879–893.
- (71) Casalta-lobes, J.; Abrantes, A. M.; Laranjo, M.; Rio, J.; Cristina, A.; Oliveiros, B.; Sarmiento-ribeiro, A. B.; Botelho, M. F. *J. Cancer Ther.* **2011**, *2*, 408–417.
- (72) Pires, A. S.; Marques, C. R.; Encarnação, J. C.; Abrantes, A. M. *Front. Physiol.* **2018**, *9* (July), 1–14.
- (73) Botas, F. A. S. Células tumorais da mama e propriedades de células estaminais, Instituto Politécnico de Coimbra, 2011.
- (74) Naahidi, S.; Jafari, M.; Logan, M.; Edalat, F.; Khademhosseini, A.; Dixon, B.; Chen, P. *Bioact. Compat. Polym.* **2014**, *29* (3), 254–269.
- (75) Liu, H.-Y.; Du, L.; Zhao, Y.-T.; Tian, W.-Q. *Journal of Nanomaterials*. 2015, p 9.
- (76) Koley, D.; Bard, A. J. *Proc. Natl. Acad. United States Am.* **2010**, *107* (39), 16783–16787.
- (77) Kostrhunova, H.; Vrana, O.; Suchankova, T.; Gibson, D.; Kasparkova, J.; Brabec, V. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1833–1842.
- (78) Sun, Y.; Gou, S.; Yin, R.; Jiang, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5146–5153.
- (79) Marzano, C.; Pellei, M.; Tisato, F.; Santini, C. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2009**, *9* (2), 185–211.
- (80) Santini, C.; Pellei, M.; Gandi, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (1), 815–862.
- (81) Stark, G. R.; Taylor, W. R. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *280*, 51–82.
- (82) Forman, H. J.; Zhang, H.; Rinna, A. *Mol. Aspects Med.* **2008**, *30*, 1–12.
- (83) Hall, A. *Eur. J. Clin. Invest.* **1999**, *29* (3), 238–245.
- (84) Comşa, Ş.; Cîmpean, A. M.; Raica, M. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 3147–3154.
- (85) Volk-draper, L. D.; Rajput, S.; Hall, K. L.; Wilber, A.; Ran, S. *Neoplasia* **2012**, *14* (10), 926–942.
- (86) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Benink, H. A.; Worzella, T. J. In *Assay Guidance Manual*; 2016; pp 1–31.
- (87) Gerais, P.; Células, D. C. De. *Relatório Interno*; 2009.
- (88) Bruno, S.; Bino, G. Del; Gorczyca, W.; Hotz, M. A.; Lassota, P.; Traganos, F. *J. Quant. Cell Sci.*

- 1992**, 13 (8), 795–808.
- (89) Zhang, X.; Huo, L.; Jin, H.; Han, Y.; Wang, J.; Zhang, Y.; Lai, X.; Le, Z.; Zhang, J.; Hua, Z. *Oncotarget* **2017**, 8 (26), 42602–42612.
- (90) Schafer, K. A. *Vet. Pathol.* **1998**, 35, 461–478.
- (91) Group, I.; Alamos, L. J. *Cell Biol.* **1973**, 53 (3), 766–771.
- (92) Zhao, H.; KAlivendi, S.; Zhang, H.; Joseph, J.; Nithipatikom, K.; Vasquez-Vivar, J.; Kalynaraman, B. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, 34 (11), 1359–1368.
- (93) Halliwell, B.; Whiteman, M. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, 142 (2), 231–255.
- (94) Rhee, S. G.; Chang, T.; Jeong, W.; Kang, D. *Mol. Cells* **2010**, 29 (6), 539–549.
- (95) Manda, G.; Nechifor, M. T.; Neagu, T. *Curr. Chem. Biol.* **2009**, 3, 22–46.
- (96) Barrera, G.; Peroxidation, L. *Int. Sch. Res. Netw.* **2012**, 2012.