



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Desenvolvimento de suportes cromatográficos derivados de compostos heterocíclicos para purificação do G-quadruplex

Sérgio Miguel Roso Rodrigues

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotechnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Carla Cruz
Co-orientadora: Prof^a. Doutora Marta Corvo

Covilhã, outubro de 2015

“You’ve got to find what you love. And that is as true for your work as it is for your lovers. Your work is going to fill a large part of your life, and the only way to be truly satisfied is to do what you believe is great work. And the only way to do great work is to love what you do. If you haven’t found it yet, keep looking. Don’t settle. As with all matters of the heart, you’ll know when you find it. And, like any great relationship, it just gets better and better as the years roll on. So keep looking until you find it. Don’t settle...”

Your time is limited, so don’t waste it living someone else’s life. Don’t be trapped by dogma - which is living with the results of other people’s thinking. Don’t let the noise of others’ opinions drown out your own inner voice. And most important, have the courage to follow your heart and intuition. They somehow already know what you truly want to become. Everything else is secondary.”

Steve Jobs

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus avós, António e Lourdes, que partiram mais cedo do que esperado e que não poderão estar presentes no dia em que irei comprimir mais um objetivo a que me propus. O meu muito obrigado pela educação e carinho dados e também por todos os valores que me ensinaram ao longo da vida.

Ao meu grande amigo Nuno Pereira, o meu especial agradecimento por toda a maturidade que me incutiu, partiste cedo demais, e deixaste um vazio enorme no seio de todos os que te rodeavam. Estive perto de te acompanhar, mas quis o destino que por cá continuasse. Prometo apenas continuar com o sorriso e divertimento que te caracterizava tão bem. Irás para sempre ficar na memória dos que te acompanharam.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, tenho de agradecer às minhas orientadoras, Professora Doutora Carla Cruz e Professora Doutora Marta Corvo, por toda a paciência e compreensão, pelo acompanhamento, disponibilidade, ensinamento e orientação científica prestada ao longo deste último ano. Agradeço também todas as críticas sustentadas e observações, melhorando assim o meu desempenho no desenvolvimento do meu trabalho.

Queria agradecer também à Professora Doutora Fani Sousa a sua simpatia, disponibilidade, aconselhamento e colaboração durante o meu trabalho.

O meu obrigado às Engenheiras Cristina e Joana pela simpatia, motivação e flexibilidade que me permitiram a nível profissional.

Tenho de fazer um enorme agradecimento ao Rafael e à sua maravilhosa família, que me acolheram e me trataram como se de um da família me tratasse. Sem a sua ajuda nos últimos anos teria sido impossível continuar a minha formação académica. O meu muito obrigado a toda a família Barros.

Agradeço também a todos os que durante este ano, de uma forma ou de outra, me ajudaram e acompanharam no laboratório. Sara, Bete, Costa, Cris, João, Filipa, Élia, Sandrina, Quelhas, Josué, Mafalda, Tiago e Fafe: o meu obrigado por tudo, especialmente ao Fafe que foi o camarada que diariamente me acompanhou na luta por este objetivo.

O meu obrigado a toda a malta do grupo “TOP” e aos fantásticos colegas de casa, que sempre me acompanharam na minha formação académica, e me deram força e ânimo para finalizar mais uma etapa. Sem vocês este percurso tinha sido bastante monótono. Obrigado do fundo do coração por todo o vosso apoio e amizade.

Gostaria também de agradecer a todos os meus colegas e amigos que sempre me ajudaram, reconfortaram e encorajaram ao longo da vida, mesmo nas alturas de maiores problemas. Obrigado pelas vossas opiniões, críticas e acima de tudo pela vossa frontalidade e sinceridade. Jorge, Brice, Domingos, Joana Maria, Joana Rita, “Seca”, Marisa, Marlene, Christophe e possivelmente mais alguém que me estou a esquecer (desculpem, não é propositado!), o meu obrigado pela vossa amizade!

Quero agradecer ao meu irmão, à minha cunhada, e ao mais recente herdeiro da família Rodrigues, o meu Simão, pelo vosso aconselhamento e apoio incondicional. O meu muito obrigado aos meus avós, Rodrigues e Felisbela, que me ajudaram sempre que puderam, e por todo o seu amor e carinho.

Por fim, e mais importante, tenho de agradecer do fundo do coração aos meus pais, os meus mais que tudo, as melhores pessoas do mundo: Fernando e Isabel, por uma vida de esforço, dedicação e de muito sacrifício. Fico orgulhoso em saber que por vós fui educado, acarinhado e incondicionalmente apoiado durante a minha vida. Obrigado por me terem dado a possibilidade de mais uma vez concluir um capítulo da minha vida, abrindo-me portas para um futuro mais risonho. Sem vocês, hoje não seria a pessoa que sou e os agradecimentos serão sempre poucos depois de tudo o que fizeram por mim. Amo-vos!

Resumo

As sequências de oligonucleótidos ricas em guanina têm capacidade de formar estruturas de G-quadruplex. Estas estruturas são diversas, transientes, polimórficas e podem ser encontradas em importantes regiões do genoma, tais com os telómeros e oncogenes. Estudos recentes demonstraram que existem ligandos que se ligam seletivamente e estabilizam estas estruturas, sendo estes considerados potenciais agentes anticancerígenos. Tendo em conta estes pressupostos, sintetizaram-se ligandos heterocíclicos derivados de indol para desenvolvimento de suportes cromatográficos através da sua imobilização na Sepharose para purificação de estruturas de G-quadruplex ou plasmídeos que contenham sequências formadoras de estruturas de G-quadruplex.

Primeiramente sintetizaram-se os ligandos derivados de acridina e indol acoplados a diferentes poliaminas. Os ligandos derivados de acridina envolveram quatro tipos de reações, bromometilação da acridina, tosilação das aminas, substituição nucleofílica das aminas parcialmente tosiladas e por fim a destosilação dos ligandos. Os ligandos derivados de indol envolveram a condensação do aldeído de indol com as diferentes poliaminas, dos quais resultaram os ligandos IT3 (31%), IT4 (24%) e o IP5 (24%). Os ligandos sintetizados foram analisados e caracterizados por espectroscopia de RMN.

A síntese dos suportes cromatográficos foi efetuada imobilizando os ligandos IT3, IT4 e IP5. Estes ligandos foram imobilizados na Sepharose, que havia sido previamente ativada via epóxido. Posteriormente os suportes cromatográficos foram analisados e caracterizados por RMN de HR-MAS, onde se constatou a efetiva imobilização dos derivados de indol na Sepharose, com diferentes densidades de imobilização. A fração de imobilização dos ligandos IT3, IT4 e IP5 foi de 0,15, 0,55 e 0,75, respetivamente. Estes resultados demonstraram que a imobilização de derivados de indol com aminas de cadeia mais longa apresentaram maior percentagem de imobilização.

Palavras-chave

Derivados de acridina, derivados de indol, G-quadruplex, RMN HR-MAS, suportes cromatográficos.

Abstract

The sequences of oligonucleotides rich in guanine are capable of forming G-quadruplex structures. These structures are diverse, transient, polymorphic and can be found in important genome regions like telomeres and oncogenes. Recent studies have demonstrated that there are ligands which selectively bind and stabilize these structures, which are considered potential anticancer agents. In view of these assumptions, heterocyclic derivatives of indole have been synthesized for the development of chromatographic supports by immobilization of heterocyclic ligands in Sepharose for purification of G-quadruplex structures or plasmids containing sequences capable of forming G-quadruplex structures.

The acridine and indole derivatives were the first ligands synthesized by coupling different polyamines. The acridine derivative synthesis involved four reactions, the acridine bromomethylation, tosylation of amines, nucleophilic substitution of partially tosylated amines and finally detosylation of the ligands. The indole derivatives ligands involved the aldehyde condensation with different polyamines, which resulted in the ligands IT3 (31%), IT4 (24%) and IP5 (24%). The synthesized ligands were analyzed and characterized by NMR spectroscopy.

The synthesis of the chromatographic supports was performed using the ligands IT3, IT4 and IP5. These ligands were immobilized on Sepharose, which was previously activated via epoxide. Later, the chromatographic supports were analyzed and characterized by HR-MAS NMR, which confirmed the immobilization of the indole derivatives in Sepharose, with different densities in each case. The ligand density obtained for IT3, IT4 and IP5 was 0.15, 0.55 and 0.75, respectively. These results demonstrate, therefore, higher rate of immobilization of ligands that have longer chain amines bounded to them.

Keywords

acridine derivative, chromatographic supports, indole derivative, G-quadruplex, NMR HR-MAS.

Índice

Capítulo 1	23
1 Introdução.....	23
1.1 G-quadruplex e sua estrutura.....	23
1.2 Telômeros e o seu interesse biológico	26
1.3 G-quadruplex e a utilização dos ligandos.....	28
1.3.1 Ligandos derivados de acridina	30
1.3.2 Ligandos derivados de indol.....	31
1.3.3 Ligandos derivados de poliaminas.....	32
1.3.4 Síntese dos ligandos derivados de acridina, indol ligados a poliaminas.....	33
1.3.5 Síntese dos suportes cromatográficos	35
Capítulo 2.....	39
2 Objetivos	39
Capítulo 3.....	41
3 Materiais e Métodos	41
3.1 Materiais.....	41
3.2 Equipamentos.....	41
3.3 Métodos	42
3.3.1 Síntese do 4,5 - di(bromometil) acridina	42
3.3.2 Reação de tosilação da dietilenotriamina	43
3.3.3 Reação de tosilação da trietilenotetramina.....	43
3.3.4 Reação de tosilação da tetraetilenopentamina.....	44
3.3.5 Reação de síntese do composto 1A	44
3.3.6 Reação de síntese do composto 1B	45
3.3.7 Reação de síntese do composto 1C	45
3.3.8 Reação de síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-aminoetil)etano-1,2-diamina)	46
3.3.9 Reação de síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-((2-amino etil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina).....	46
3.3.10 Reação de síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-((2-amino etil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina).....	47
3.3.11 Reação de síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-aminoetil)etano-1,2-diamina) (via alternativa)	47
3.3.12 Reação de síntese do N ¹ -((1H-indol-3-il)metil)-N ² -(2-aminoetil) etano-1,2-diamina (IT3)	48
3.3.13 Reação de síntese do N ¹ -((1H-indol-3-il)metil)-N ² -(2-((2-aminoetil)amino)etil)etano-1,2-diamina (IT4)	49

3.3.14	Reação de síntese do N ¹ -((1H-indol-3-il)metil)-N ² -(2-((2-(2-aminoetil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina (IP5)	49
3.3.15	Síntese dos suportes cromatográficos.....	50
Capítulo 4.....		53
4	Resultados e discussão.....	53
4.1	Síntese química.....	54
4.1.1	Síntese dos derivados de acridina.....	54
4.1.2	Síntese dos derivados de indol	58
4.1.3	Síntese dos suportes cromatográficos	60
Conclusões.....		69
Perspetivas Futuras		71
Bibliografia		73
Anexos.....		79

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura de um quarteto de guanina com um catião. Adaptado de (Burge et al., 2006).	23
Figura 2 - Esquema representativo da estrutura do G-quadruplex e da sobreposição das tétradas de guanina. Adaptado de (Sparapani, 2006).	24
Figura 3 - Exemplos de topologias adotadas pelo G-quadruplex. A topologia A e B são intermoleculares, e as restantes intramoleculares. A) Tetramolecular, B) Bimolecular, C-F) Unimolecular. Diferentes tipologias de cadeia: A) paralela, B,C,E,F) antiparalela, D) híbrida. Adaptado de (König et al., 2010).	25
Figura 4 - Interações electrostáticas entre o catião e os 8 átomos de O6 das duas tétradas de guanina. Adaptado de (König et al., 2010)	26
Figura 5 - Loops existentes nas estruturas de G-quadruplex. Adaptado (Ou et al., 2008)	26
Figura 6 - Estrutura e importância biológica dos telómeros. Esquema representativo do mecanismo de reparação e reativação da telomerase, que é acionado após ocorrer o encurtamento ou dano do telómero. Enquanto a reparação ou reativação em excesso poderia provocar a tumorigénese, os ligandos do G-quadruplex (G4) podem induzir ou estabilizar a estrutura do G-quadruplex nesta região e assim bloquear a ligação da telomerase. Adaptado de (Ou et al., 2008).	27
Figura 7 - Estabilização do G-quadruplex por ligandos através dos diferentes modos de ligação. Adaptado de (Ou et al., 2008).	29
Figura 8 - Ligandos de DNA G-quadruplex. Adaptado de (Arora, Kumar, Agarwal, & Maiti, 2010)	29
Figura 9 - Aplicações da acridina e sua estrutura molecular. Adaptado de (Kaur & Singh, 2011)	30
Figura 10 - Ligandos BRACO-19, AS1410 e RHPS4. Adaptado de (Neidle, 2010).	31
Figura 11 - Estrutura molecular do indol.	31
Figura 12 - Ligandos derivados de indol. Adaptado de (Dash et al., 2012)	32
Figura 13 - Estrutura química da trietilenotetramina.	33
Figura 14 - Esquema sumário da síntese dos derivados de acridina.	34
Figura 15 - Esquema sumário da síntese dos derivados de indol.	34
Figura 16 - Esquema representativo de uma matriz cromatográfica. a) Matriz cromatográfica sem espaçador; b) Matriz cromatográfica com espaçador. Adaptado de (Healthcare, 2007)..	36
Figura 17 - Esquema sumário da síntese dos suportes cromatográficos.....	37
Figura 18 - Síntese do 4,5 - di(bromometil) acridina.	42
Figura 19 - Tosilação do dietilenotriamina (composto A).....	43
Figura 20 - Tosilação da trietilenotetramina (composto B).	43
Figura 21 - Tosilação da tetraetilenopentamina (composto C).	44

Figura 22 - Síntese do composto 1B.	45
Figura 23 - Síntese do composto 1C.	45
Figura 24 - Reação de síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-aminoetil)etano-1,2-diamina).	46
Figura 25 - Reação de síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-((2-aminoetil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina).	46
Figura 26 - Reação de síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-((2-aminoetil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina)	47
Figura 27 - Reação de síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-aminoetil)etano-1,2-diamina) (via alternativa).	47
Figura 28 - Reação de síntese do IT3.	48
Figura 29 - Reação de síntese do IT4.	49
Figura 30 - Reação de síntese do IP5.	49
Figura 31 - Sepharose ativada via epóxido.	50
Figura 32 - Imobilização do suporte com os diferentes ligandos, IT3, IT4 e IP5.	51
Figura 33 - Ligandos sintetizados derivados de acridina (1) e indol (2).	53
Figura 34 - Bromometilação da acridina.	54
Figura 35 - Tosilação das aminas.	56
Figura 36 - Substituição nucleofílica das aminas parcialmente tosiladas.	57
Figura 37 - Destosilação dos compostos. Os passos i) e ii) repetiram-se para todos os átomos de nitrogénio.	57
Figura 38 - Síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-aminoetil)etano-1,2-diamina).	58
Figura 39 - Reação de síntese dos ligandos derivados de indol.	59
Figura 40 - Possíveis produtos obtidos da reação dos derivados de indol.	59
Figura 41 - Numeração dos derivados de indol.	60
Figura 42 - Mecanismo de síntese dos suportes cromatográficos.	61
Figura 43 - Espectros da matriz de Sepharose ativada. a) Espectro de pulso único ¹ H HR-MAS; b) Espectro CPMG ¹ H HR-MAS.	62
Figura 44 - Espectros de CPMG ¹ H HR-MAS dos ligandos imobilizados na matriz de Sepharose ativada. a) ligando IT3; b) ligando IT4; c) ligando IP5. Atribuição dos hidrogénios está feita segundo a Figura 41.	63
Figura 45 - Comparação do espectro do suporte IT4, com o espectro da Sepharose ativada. a) Espectro HSQC-DEPT da imobilização do ligando IT4; b) Espectro HSQC-DEPT da Sepharose ativada.	64
Figura 46 - Espectro 2D NOESY do suporte IT3	65
Figura 47 - Espectro 2D NOESY do suporte IT4	65
Figura 48 - Espectro 2D NOESY do suporte IP5.	66
Figura 49 - Espectro ¹ H HR-MAS do suporte IT3.	66
Figura 50 - Espectro ¹ H HR-MAS do suporte IT4.	67

Figura 51 - Espectro ^1H HR-MAS do suporte IP5..... 67

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Experiências realizadas com diferentes proporções de adição do BMME.	55
Tabela 2 - Rendimentos esperados(Bianchi et al., 1987) e obtidos na tosilação das aminas. .	56
Tabela 3 - Rendimentos esperados(Bartoli et al., 2009) e obtidos dos compostos sintetizados.	58
Tabela 4- Rendimentos obtidos na síntese dos ligandos IT3, IT4 e IP5.....	59
Tabela 5 - Sinais do carbono e próton da posição 8 dos diferentes ligandos.....	60
Tabela 6 - Tabela resumo das integrações dos espectros ¹ H HR-MAS dos três ligandos e as respetivas frações imobilizadas de cada ligando.....	68

Lista de Acrónimos

ccf	Cromatografia de Camada Fina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CPMG	Carr- Purcell-Meiboom-Gill
d	Multiplicidade de sinal, duplete
DMF- <i>d</i> ₇	N,N-dimetilformamida deuterada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Gram
G4	G-quadruplex
h	Hora
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HR-MAS	Alta Resolução de Ângulo Mágico
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy
HSQC-DEPT	Heteronuclear Single Quantum Correlation - Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento, em Hertz
m	Multiplicidade de sinal, multiplete
M	Molar
mg	Miligrama
MHz	Mega Hertz
ms	Milissegundos
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
°C	Graus centígrados
pH	Potencial de Hidrogénio
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Multiplicidade de sinal, singleto
s	Segundos
t	Multiplicidade de sinal, tripleto
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlations Spectroscopy
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
δ	Desvio químico, em Partes por milhão

Capítulo 1

1 Introdução

Nos dias de hoje, existem milhões de pessoas no mundo inteiro, que são diagnosticadas com cancro. Como tal, a investigação numa área de intervenção tão importante como é o cancro, torna-se inquestionavelmente necessária. Com o passar do tempo, o conhecimento que se tem sobre as suas causas, sobre a forma como se desenvolve e progride, é cada vez maior. Portanto, estão, também, a ser estudadas novas formas de o prevenir, detetar e tratar, tendo sempre em atenção a melhoria da qualidade de vida das pessoas com cancro, durante e após o tratamento (Cross & Burmester, 2006).

1.1 G-quadruplex e sua estrutura

Ao longo das últimas décadas, o interesse biológico tem atraído atenção para as sequências de oligonucleótidos ricas em guanina que têm a capacidade de formar estruturas de G-quadruplex (Gellert, Lipsett, & Davies, 1962). A unidade básica do G-quadruplex é o quarteto de guanina, este tem uma disposição planar de quatro bases de guanina estabilizadas por ligações de hidrogénio, ou também denominadas de ligações de *Hoogsteen*. Dois ou mais quartetos de guanina podem associar-se através de interações π - π e formar arranjos empilhados de G-quadruplex, que são estabilizados com iões metálicos (Georgiades, Abd Karim, Suntharalingam, & Vilar, 2010; Monchaud & Teulade-Fichou, 2008).

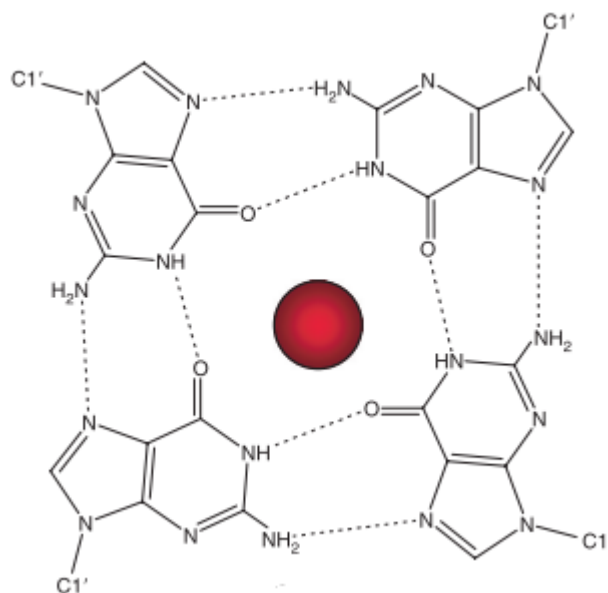


Figura 1 - Estrutura de um quarteto de guanina com um catião. Adaptado de (Burge et al., 2006).

Os G-quadruplexes exibem estruturas de grande diversidade e polimorfismo que são dependentes da composição dos nucleótidos (Fig. 1). Além disso, as estruturas do G-quadruplex podem originar diferentes topologias dependendo da aglomeração molecular de tétradas de guanina (Fig. 2), da orientação e polaridade das cadeias, da presença ou não de ligandos e iões metálicos (como referido anteriormente), da localização e do comprimento dos *loops* e da natureza dos ângulos de torção das cadeias de guaninas (Burge, Parkinson, Hazel, Todd, & Neidle, 2006; Guédin, Gros, Alberti, & Mergny, 2010; Ou et al., 2008). Assim, as estruturas do G-quadruplex podem ter topologias paralelas, antiparalelas ou híbridas (Fig. 3) (Bochman, Paeschke, & Zakian, 2012). Por exemplo, os G-quadruplexes podem ser não só unimoleculares, constituídos apenas por uma única cadeia de oligonucleótidos, mas também bimoleculares ou tetramoleculares, constituídos por duas ou quatro cadeias de oligonucleótidos separadas, respetivamente (Fig. 3).

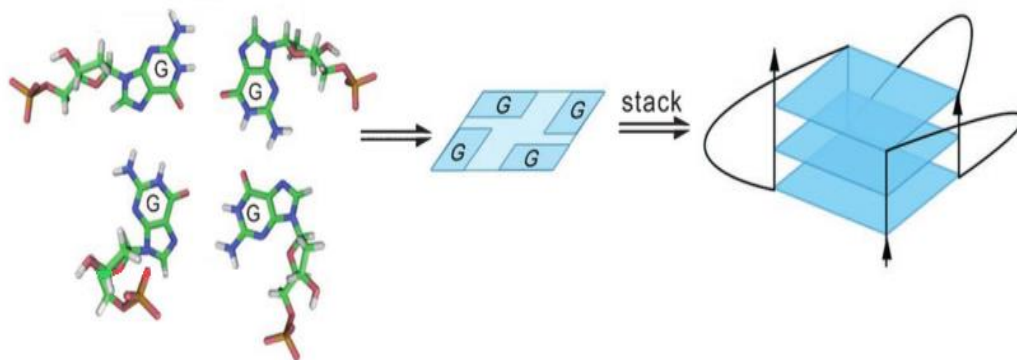


Figura 2 - Esquema representativo da estrutura do G-quadruplex e da sobreposição das tétradas de guanina. Adaptado de (Sparapani, 2006).

Os *loops* são definidos como sequências de nucleótidos que ligam as cadeias no sistema quadruplex. A topologia unimolecular do G-quadruplex tem, até hoje, definido um mínimo de três *loops*. Estes três *loops* são divididos em diferentes tipos: os *loops* em forma de hélice, os *loops* laterais e os *loops* diagonais (Fig. 4). A sua caracterização é bastante simples: os *loops* em forma de hélice requerem cadeias paralelas adjacentes que liguem a parte inferior da tétrada de guanina com a parte superior; os *loops* laterais ligam cadeias antiparalelas adjacentes da mesma tétrada que partilhem as mesmas ligações de hidrogénio e os *loops* diagonais ligam as cadeias antiparalelas da mesma tétrada que não partilhem as mesmas ligações de hidrogénio (Burge et al., 2006; G. Collie & Parkinson, 2011; Ou et al., 2008; Webba Da Silva, 2007).

Os ângulos de torção glicosídica das guaninas são outro parâmetro importante na caracterização do G-quadruplex. Todos os G-quadruplex paralelos possuem as guaninas dos ângulos de torção glicosídica na conformação *anti*, enquanto as tétradas antiparalelas possuem ambas as conformações *anti* e *syn*. Muitos dos G-quadruplexes podem coordenar diversos catiões, como o K^+ e o Na^+ , através dos grupos carbonilo das guaninas. Esta coordenação confere estabilidade

termodinâmica e cinética às estruturas. As tétradas de guanina coordenam cátions deste tamanho por causa dos dois planos de tétradas serem constituídos por oito átomos de O6 do carbonilo (com carga elétrica negativa) que carregam negativamente o centro iônico das tétradas de guanina (Fig. 5) (Hardin, Watson, Corregan, & Bailey, 1992; Ou et al., 2008; Phan, 2010; Sen & Gilbert, 1991; Venczel & Sen, 1993; Wong & Wu, 2003).

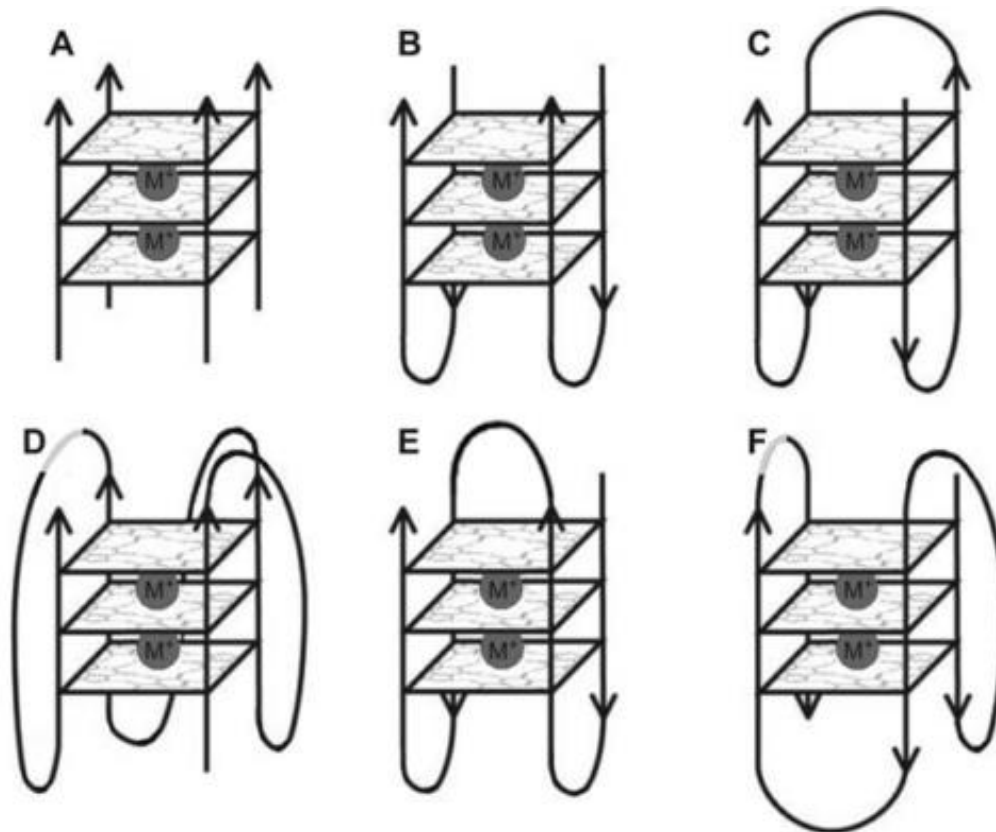


Figura 3 - Exemplos de topologias adotadas pelo G-quadruplex. A topologia A e B são intermoleculares, e as restantes intramoleculares. A) Tetramolecular, B) Bimolecular, C-F) Unimolecular. Diferentes tipologias de cadeia: A) paralela, B,C,E,F) antiparalela, D) híbrida. Adaptado de (König et al., 2010).

Tem sido relatado que os genes podem conter até um total de 376 000 sequências formadoras de G-quadruplex (Huppert & Balasubramanian, 2005). Hoje em dia, as bases de dados são bastante comuns para selecionar e identificar as estruturas de G-quadruplex e com o crescente aumento do número de G-quadruplex reportados em estudos genômicos, a concepção de potenciais fármacos deve ser orientada não só para a diferenciação entre as espécies de DNA em dupla hélice e o DNA quadruplex, mas também que reconheçam as diferentes topologias de G-quadruplex (Qian, 2015).

Todos os fatores referidos anteriormente são elementos críticos que necessitam de ser considerados a fim de melhorar a seletividade e especificidade da ligação dos potenciais fármacos ao G-quadruplex.

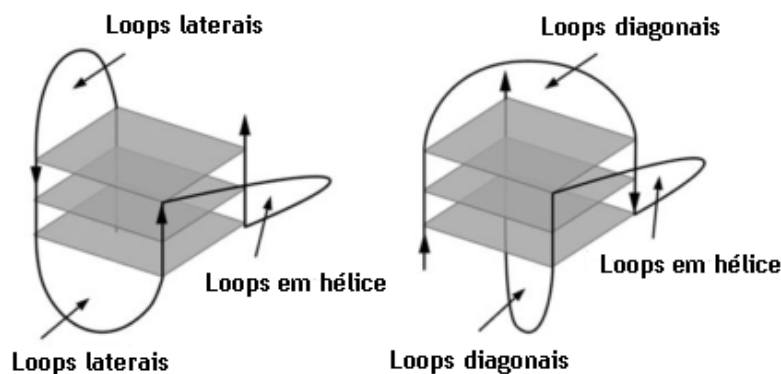


Figura 5 - Loops existentes nas estruturas de G-quadruplex. Adaptado (Ou et al., 2008)

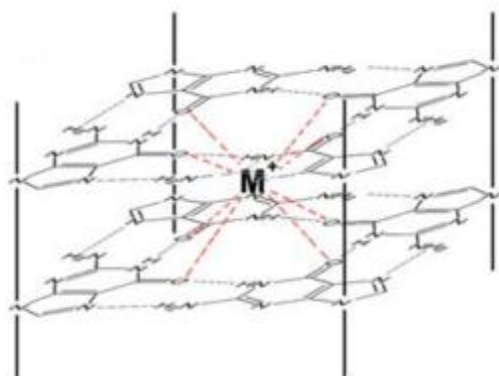


Figura 4 - Interações electroestáticas entre o catião e os 8 átomos de O6 das duas tetradas de guanina. Adaptado de (König et al., 2010)

1.2 Telómeros e o seu interesse biológico

Até à data, foram descritas várias estruturas G-quadruplex. Estudos anteriores mostram que sequências de telómeros humanos com uma única repetição de d(TTAGGGT) podem formar uma cadeia G-quadruplex numa solução contendo o catião K^+ (Parkinson, Lee, & Neidle, 2002). A estrutura é composta por três quartetos de guanina, e os ângulos de torção glicosídicos de todas as guaninas estão em conformação anti. Mais tarde, o tipo de enrolamento e a estrutura cristalina da sequência do telómero humano, com duas repetições, foram também identificados. A análise de raios-X mostrou que a sequência de duas repetições em K^+ forma estruturas de G-quadruplex bimoleculares e que as cadeias paralelas estão ligadas por *loops* em forma de hélice (Parkinson et al., 2002).

Através da análise bioinformática do genoma humano, revelou-se que as estruturas de G-quadruplex estão presentes em abundância no genoma humano e que essas estruturas são ricas em regiões de regulação génica e nas sequências repetitivas, como são os telómeros (Lam, Beraldi, Tannahill, & Balasubramanian, 2013; Ma et al., 2015). Um grande número de estudos conclui, que o G-quadruplex está associado a processos biológicos que são fundamentais para

o seu bom funcionamento, como é exemplo o processo de regulação da transcrição, replicação do DNA e estabilidade do genoma. Os G-quadruplexes são estáveis sob condições próximas das fisiológicas e o maior desafio tem sido estabelecer, para essas estruturas, condições para que se possam formar no DNA genômico (Lam et al., 2013).

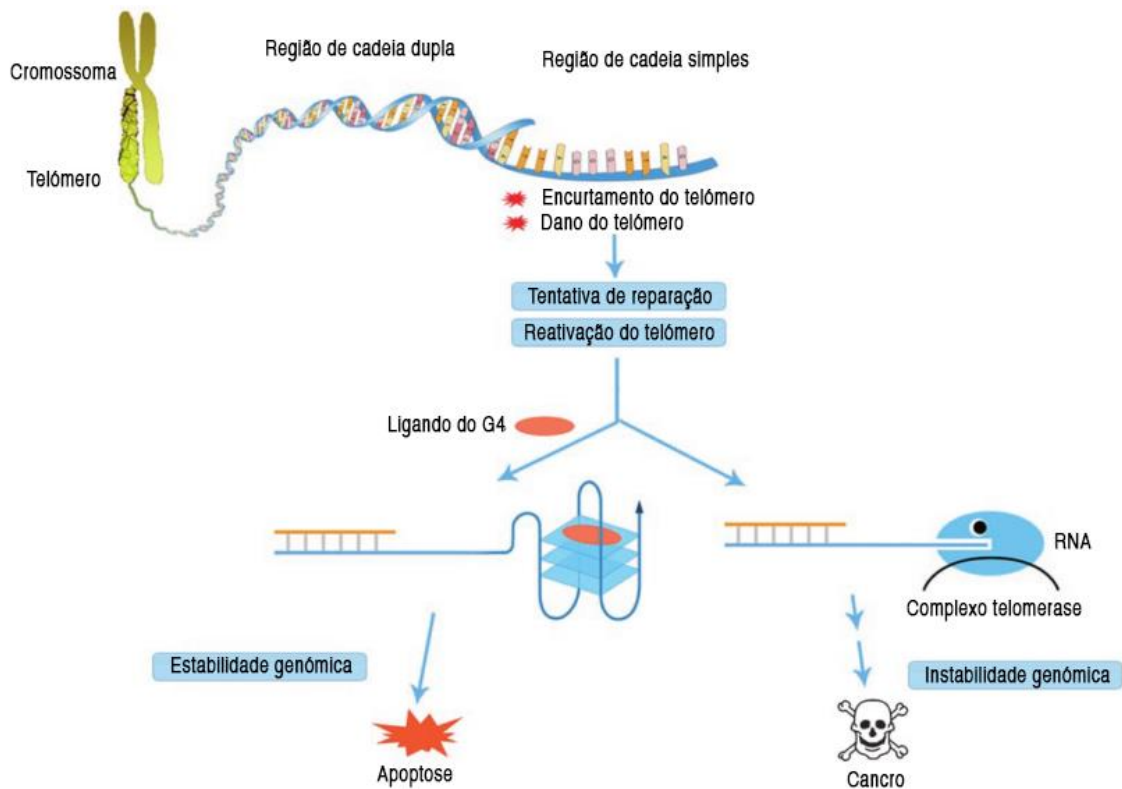


Figura 6 - Estrutura e importância biológica dos telômeros. Esquema representativo do mecanismo de reparação e reativação da telomerase, que é acionado após ocorrer o encurtamento ou dano do telômero. Enquanto a reparação ou reativação em excesso poderia provocar a tumorigênese, os ligandos do G-quadruplex (G4) podem induzir ou estabilizar a estrutura do G-quadruplex nesta região e assim bloquear a ligação da telomerase. Adaptado de (Ou et al., 2008).

Os telômeros são um complexo proteico do DNA, localizado nas extremidades dos cromossomas eucarióticos. São importantes para manter a estabilidade cromossômica e a integridade do genoma. No processo de replicação dos cromossomas eucarióticos empacotados pelo DNA, as extremidades DNA telomérico não podem ser copiadas pela ação da DNA polimerase, devido à falta de uma estrutura helicoidal, da cadeia, na extremidade 3' da sequência de DNA. Como resultado, a extremidade 3' do DNA telomérico é danificada e sofre um encurtamento progressivo, sem que haja qualquer mecanismo de compensação. No entanto, o DNA telomérico nas células tumorais não é reduzido durante a replicação, devido à ação da enzima telomerase que mantém a estabilidade e integridade das células tumorais em proliferação. Daí advém o interesse em estudar os telômeros e a telomerase, por causa das diferenças entre as células somáticas e as células tumorais para manutenção dos telômeros (Wu, Xu, Wang, Xu, & Fu,

2015). O DNA telomérico humano é composto por milhares de repetições em cadeia de sequências ricas em guanina (d(TTAGGG)) e com a extremidade 3' com 100-200 bases (Ou et al., 2008; Wu et al., 2015). A atividade da telomerase é inibida por estas estruturas e esta diminuição está associada à regulação de aproximadamente 85% dos cânceros, tornando a telomerase um potencial alvo terapêutico para o estudo do câncer (Fig. 6) (G. W. Collie et al., 2012; Wu et al., 2015).

1.3 G-quadruplex e a utilização dos ligandos

Tem sido proposto a concepção de um ligando ideal para o G-quadruplex que consiga conter alguns motivos estruturais da biomolécula, com o intuito de minimizar o reconhecimento como antigénio, ser rapidamente metabolizado e excretado do corpo antes de exercer a sua função (König, Evans, & Huppert, 2010).

Os ligandos que induzem a formação de G-quadruplex, e/ou se ligam seletivamente e estabilizam estas estruturas, são de interesse para o desenvolvimento de potenciais agentes anticancerígenos. Das moléculas identificadas até à data que se ligam ao G-quadruplex, muitas são baseadas na funcionalização do núcleo dos sistemas heterocíclicos aromáticos, tais como acridinas, antraquinonas, pirilenos ou porfirinas (Fig. 7). Alguns destes têm mostrado a indução de efeitos biológicos relacionados com o G-quadruplex, embora as suas características físico-químicas sejam diferentes dos fármacos convencionais. Uma abordagem mais comum ao desenvolvimento dos ligandos, tem como ponto de partida sistemas de anéis aromáticos que possam interagir com o terminal do G-quadruplex através de interações π - π . O relato da primeira molécula que se ligou ao G-quadruplex foi um derivado de antraquinona, depois disso as moléculas que têm estrutura semelhantes, tais como fluorenos e acridinas, têm sido descritos com o passar do tempo (Haider, Neidle, & Parkinson, 2011).

A geometria particular da estrutura do G-quadruplex permite o reconhecimento específico por ligandos que tenham a capacidade de se intercalar através de vários modos de ligação. Utilizando moléculas aromáticas que se encaixem na parte superior das tétradas de guanina é comum entre os ligandos do G-quadruplex, pois é um dos fatores que minimiza a interação com o DNA de cadeia dupla e cadeia simples. A especificidade para um determinado G-quadruplex pode ser aumentada por cadeias laterais que se encaixem entre os *loops* e os ângulos de torção glicosídica (Fig. 8a). Agentes intercaladores (Fig. 8b) que se liguem entre as tétradas de guanina dentro do G-quadruplex são mais improváveis de acontecer, não só porque o G-quadruplex é uma estrutura extremamente rígida e estável, mas também por causa da consequente distorção, exigindo assim elevados gastos de energia. Assim, o empilhamento dos ligandos nos planos exteriores (Fig. 8c) das tétradas de guanina parece ser o modo energeticamente mais favorável e provável de acontecer para os compostos que tenham o potencial de se ligar com o G-quadruplex (Ou et al., 2008)

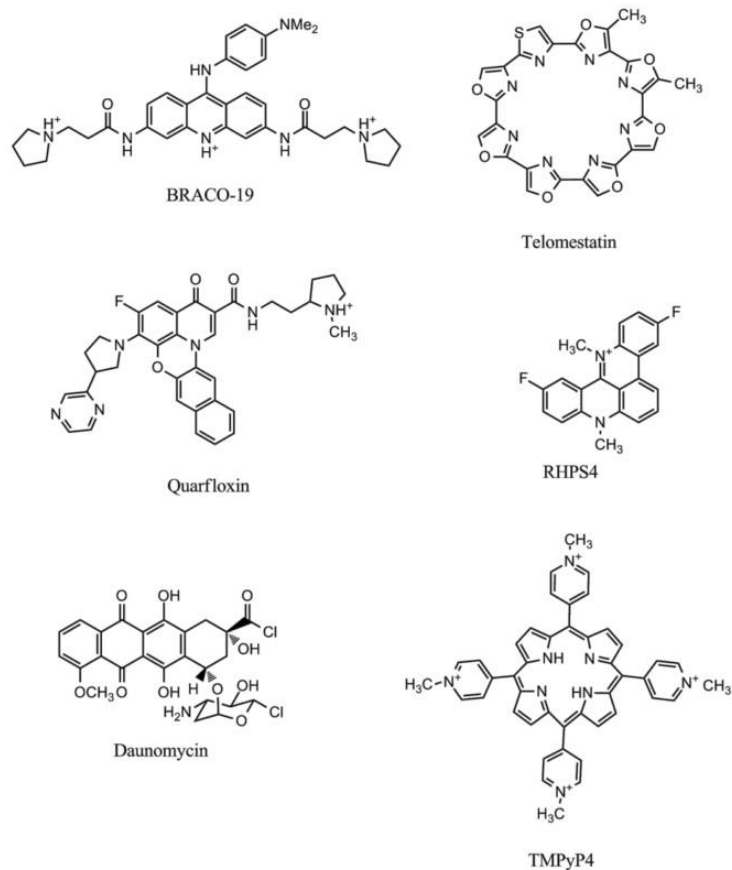


Figura 8 - Ligandos de DNA G-quadruplex. Adaptado de (Arora, Kumar, Agarwal, & Maiti, 2010)

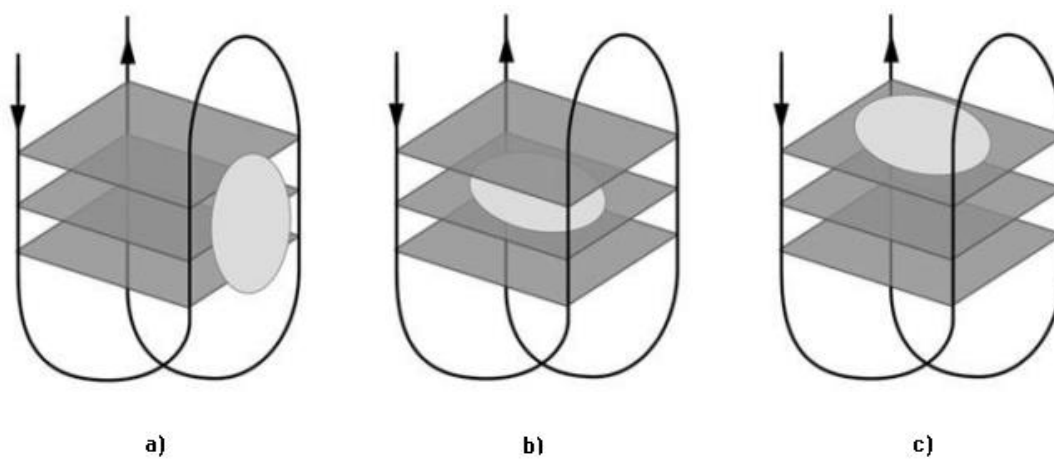


Figura 7 - Estabilização do G-quadruplex por ligandos através dos diferentes modos de ligação. Adaptado de (Ou et al., 2008).

Neste contexto e tendo em conta o objetivo do trabalho, foram estudadas as moléculas derivadas de acridina, de indol e poliaminas.

1.3.1 Ligandos derivados de acridina

A molécula de acridina é um heterociclo fluorescente de estrutura planar, de três anéis aromáticos com um heteroátomo de nitrogênio, que é responsável pela intercalação entre os pares de base do DNA de cadeia dupla, através de interações π - π que, por conseguinte, interferem com os processos metabólicos celulares, como é exemplo o processo de replicação, na qual a telomerase está envolvida (Lerman, 1963).

A acridina e os seus derivados foram principalmente testadas contra infecções bacterianas e malária, e outras infecções por protozoários, tendo um papel preponderante como corante ou sensor para fins biológicos (Fig. 9) (Kaur & Singh, 2011). Mais recentemente, têm sido explorados as suas propriedades como agente anticancerígeno e desde então, um enorme número de ligandos de acridina têm sido testados (Demeunynck, Charmantray, & Martelli, 2001; Schmidt A., Liu M., 2015).

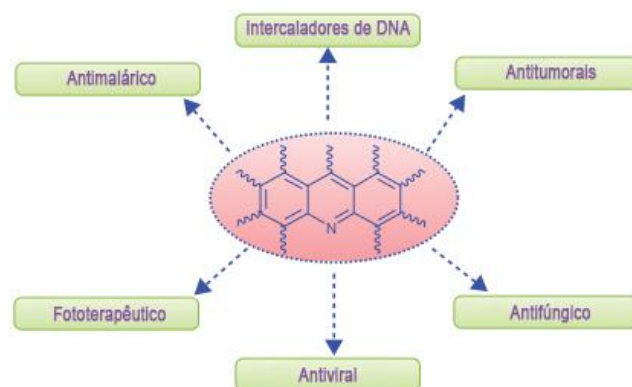


Figura 9 - Aplicações da acridina e sua estrutura molecular. Adaptado de (Kaur & Singh, 2011)

Até hoje, já alguns ligandos foram descritos com algum destaque tendo em conta a sua seletividade/afinidade para com o G-quadruplex e a capacidade que têm de o estabilizar através da inibição da atividade da telomerase.

Os ligandos derivados de acridina BRACO-19, o AS1410 e o RHPS4 são alguns dos exemplos (Fig. 10). O BRACO-19 é uma acridina tri-substituída que tem sido desenvolvida por Needle e o seu grupo de investigação, como sendo um potente e seletivo inibidor da telomerase, que inclusive já entrou na fase de desenvolvimento pré-clínico. O BRACO-19 tem muito baixa citotoxicidade, mas um grande poder de ligação ao G-quadruplex e uma capacidade de inibir a atividade da telomerase como ficou provado com estudos em células de cancro humanas. (Artese, Costa, Ortuso, Parrotta, & Alcaro, 2013; Zhang, Li, Li, Gao, & Jiang, 2014).

O ligando AS1410 foi concebido para possuir uma hidrofobicidade aumentada em comparação com o BRACO-19, como resultado das modificações dos substituintes na posição 9 e como consequência o tempo de semi-vida do composto no plasma aumentou de 1 hora para 2 horas. Quanto ao RHSP4, além de este mostrar uma rápida indução da senescência na replicação em

células cancerígenas, também mostrou ser capaz de penetrar em massas de tumor significativas, de acordo com a sua única carga positiva combinada com o tamanho relativamente pequeno da molécula (Neidle, 2010).

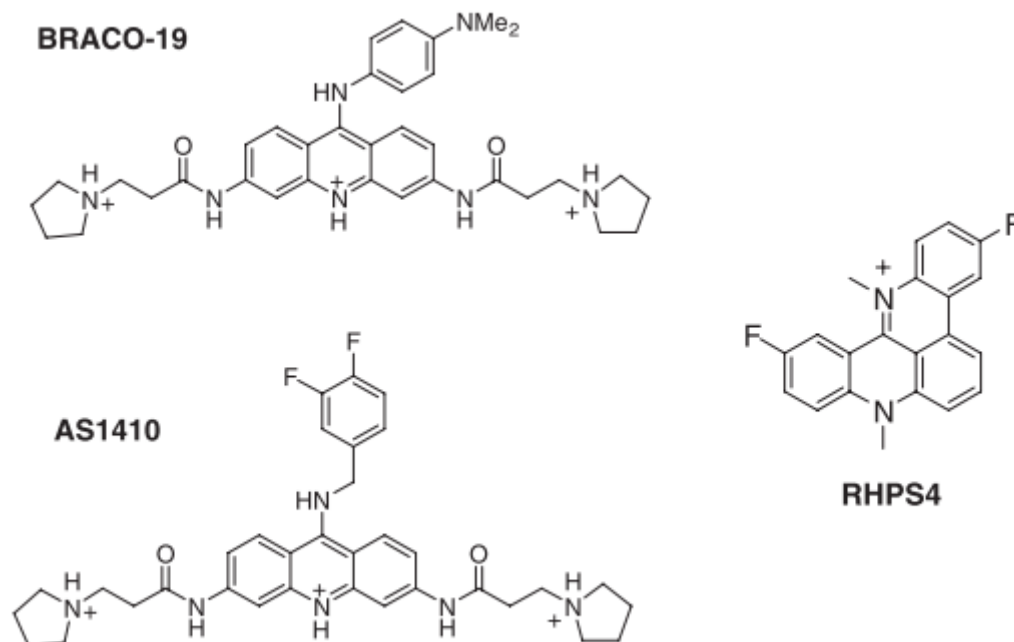


Figura 10 - Ligandos BRACO-19, AS1410 e RHPS4. Adaptado de (Neidle, 2010).

1.3.2 Ligandos derivados de indol

A molécula de indol é constituída por dois anéis, resultantes da fusão de um anel de pirrol com um anel de benzeno (Fig. 11) (Li, Zhu, & Yang, 2012). O núcleo do indol é provavelmente o heterociclo mais comum encontrado em produtos naturais e compostos farmacêuticos. Na realidade, estes têm sido referidos como estruturas privilegiadas devido à sua excelente capacidade de ligação para os mais variados recetores (Barluenga, Rodríguez, & Fañanás, 2009).

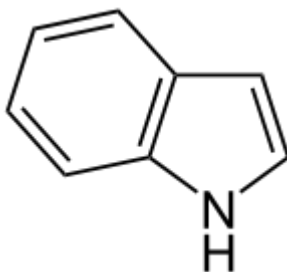


Figura 11 - Estrutura molecular do indol.

Os derivados de indol constituem uma importante classe de agentes terapêuticos na química medicinal, demonstrando propriedades anticancerígenas, antibióticas, antioxidantes, anti-HIV e também o facto de desempenhar um papel vital no sistema imunitário. Tendo em conta todas estas características, o indol tem atraído bastante atenção do ponto de vista de reconhecimento molecular biológico (Biradar, Sasidhar, & Parveen, 2010; Sinha et al., 2008), como tal imaginou-se que a conceção de ligandos para o G-quadruplex poderia levar à formação de novos compostos não tóxicos (Dash, Shirude, & Balasubramanian, 2008). Atualmente ainda não são muitos os compostos derivados de indol estudados e descritos para interagirem com o G-quadruplex e por isso se pensou que talvez fosse uma boa alternativa, visto estes terem grandes potencialidades como agentes anticancerígenos. Existem dois ligandos que já foram testados com excelentes resultados, que são as carboxamidas de bis-indol (Fig. 12). Estes compostos mostraram elevado potencial de estabilização do G-quadruplex e uma significativa seletividade para este em detrimento do DNA de cadeia dupla (Dash et al., 2012).

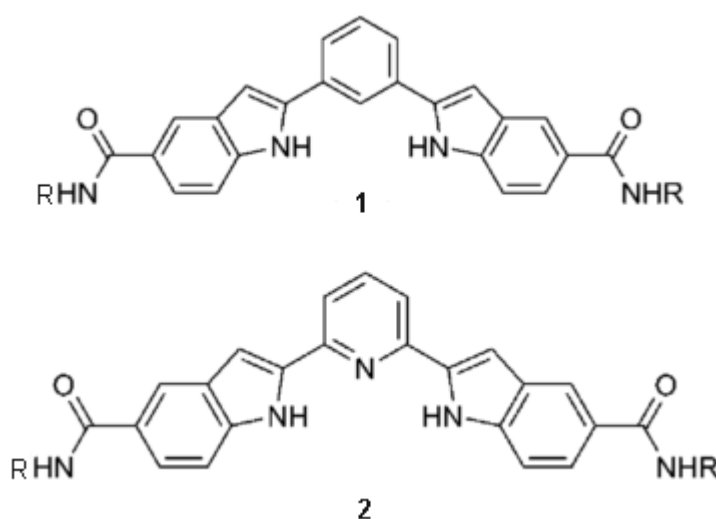


Figura 12 - Ligandos derivados de indol. Adaptado de (Dash et al., 2012)

1.3.3 Ligandos derivados de poliaminas

As poliaminas são moléculas constituídas por cadeias hidrocarbonadas das quais fazem parte átomos de nitrogénio e em geral apresentam baixo peso molecular e considerável solubilidade em água. As poliaminas estão presentes em todos os organismos eucarióticos, onde desempenham um papel fundamental no crescimento e diferenciação celular (Amorim da Costa, Marques, & Batista de Carvalho, 2003). Devido à natureza básica dos grupos amina, estes compostos são suscetíveis de reconhecer iões metálicos e, interagir com os grupos fosfato e com os ácidos nucleicos. Os ligandos de poliaminas quando protonados podem interagir com espécies aniónicas através de interações electrostáticas e ligações de hidrogénio (Aguilar et al., 2002). No entanto, a natureza exata desses mecanismos bioquímicos sobre os quais atuam estas aminas, permanece ainda um pouco desconhecida, como tal, tem sido alvo de intensa investigação nos últimos anos (Amorim da Costa et al., 2003).

Na literatura está descrito que a trietilenotetramina (Fig. 13), uma pequena molécula linear, é um potente inibidor da telomerase. Esta estabiliza ambas as topologias do G-quadruplex, intra e intermoleculares, e mostra uma potente inibição da telomerase e da citotoxicidade aguda (Liu et al., 2008). Tendo estes resultados em conta, um dos objetivos do presente trabalho foi estudar o acoplamento de amins às moléculas de acridina e indol, como a trietilenotetramina, e outras duas que apenas diferem no tamanho da cadeia, contendo mais uma e menos uma unidade adicional de $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, para se avaliarem as suas potencialidades como ligandos do G-quadruplex.

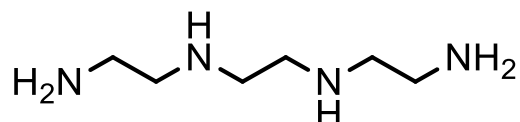


Figura 13 - Estrutura química da trietilenotetramina.

Dado o exposto anteriormente, e considerando a interação descrita na literatura dos fragmentos de acridina, indol e das amins com a estrutura de G-quadruplex, o presente trabalho teve como objetivo a síntese de suportes cromatográficos contendo estes fragmentos. Os suportes cromatográficos contendo ligandos de acridina e indol acoplados a amins, são promissores na purificação das estruturas, já descritas, de DNA G-quadruplex. No próximo subcapítulo descrever-se-á, de forma detalhada, a síntese dos compostos e subsequentemente dos suportes cromatográficos.

1.3.4 Síntese dos ligandos derivados de acridina, indol ligados a poliaminas

Como tem vindo a ser descrito ao longo dos últimos subcapítulos, a síntese de ligandos com afinidade para o G-quadruplex tem demonstrado potencial, nomeadamente como possíveis agentes terapêuticos. Deste modo, os compostos derivados de acridina e indol acoplados com amins foram sintetizados e imobilizados na Sepharose para posterior purificação de estruturas de G-quadruplex ou plasmídeos contendo sequências de oligonucleótidos ricas em guaninas. O ligando de acridina foi sintetizado por adição do 4,5 - di(bromometil) acridina (previamente sintetizado por bromo-metilação) (Fig. 14 A) (Chiron & Galy, 2003), seguida de substituição nucleofílica das poliaminas (Fig. 14 B) previamente tosiladas (Fig. 14 D) (Bartoli et al., 2009; Bianchi, Garcia-espafia, Giusti, & Micheloni, 1987). Após reação, os grupos tosilo foram removidos em meio ácido a temperatura elevada ($T = 90^\circ\text{C}$) (Fig. 14 C) (Aguilar et al., 2002; Hediger & Kaden, 1978). Abaixo, na Figura 14 estão esquematizadas as reações gerais da síntese destes compostos.

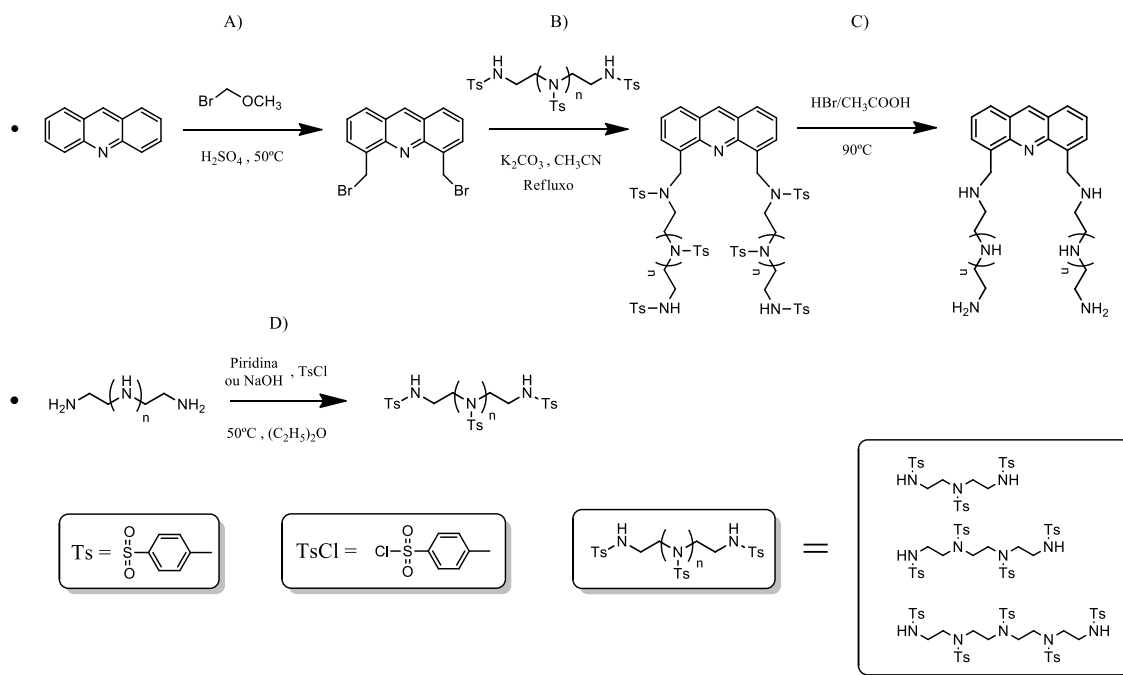


Figura 14 - Esquema sumário da síntese dos derivados de acridina.

A síntese dos derivados de indol foi realizada por adição do indol-3-carboxaldeído às poliaminas, dietilenotriamina, trietilenotetramina e tetraetilenopentamina, formando-se a imina que posteriormente é reduzida com borohidreto de sódio. Esta reação de simples execução encontra-se representada na Figura 15.

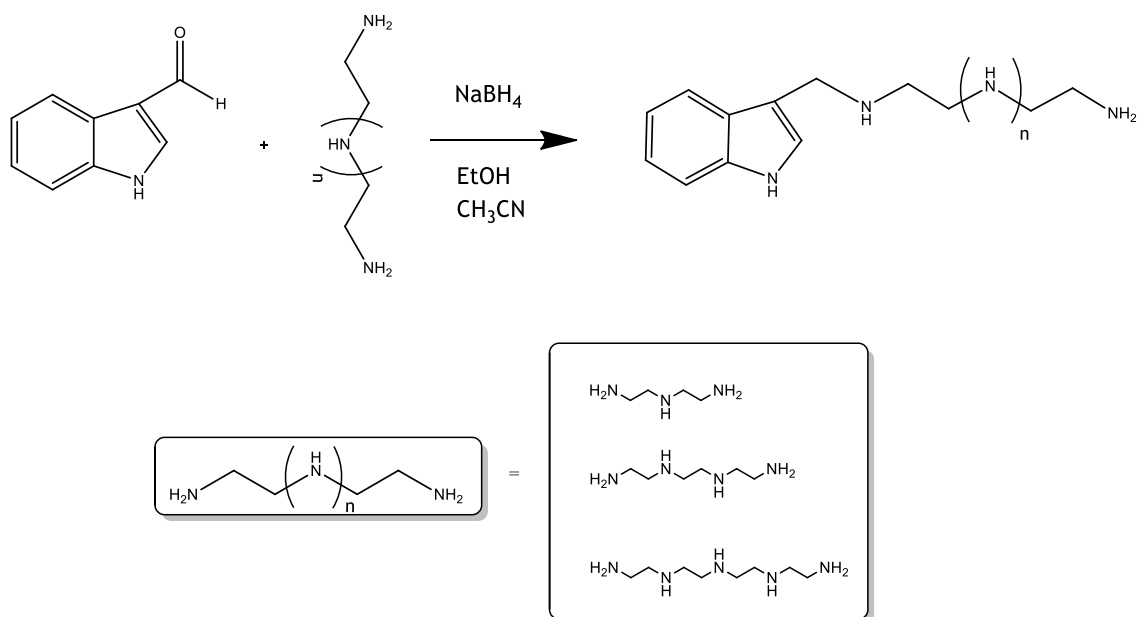


Figura 15 - Esquema sumário da síntese dos derivados de indol.

1.3.5 Síntese dos suportes cromatográficos

Têm surgido estudos que focam o desenvolvimento e aplicação de suportes cromatográficos baseados na sua especificidade biológica (Cuatrecasas & Anfinsen, 1971). Esta área tem evoluído rapidamente e isto levou a que fossem formuladas abordagens e técnicas únicas de purificação de uma grande variedade de macromoléculas. A cromatografia de afinidade tem como fundamento separar biomoléculas, para purificar um dos componentes de um sistema que envolva duas ou mais espécies cujas interações reversíveis demonstrem afinidade com um elevado grau de especificidade biológica, entre uma biomolécula e um ligando imobilizado na matriz cromatográfica. O termo foi, originalmente, usado para descrever os casos mais simples de sistemas de interação, sendo exemplo disso o sistema constituído por enzimas e respetivos inibidores competitivos (Cuatrecasas, Wilchek, & Anfinsen, 1968). No entanto, a potencial aplicação deste tipo de purificação foi evidente e imediatamente alargada para uma variedade de outros sistemas (Cuatrecasas & Anfinsen, 1971).

Avanços nos últimos anos tornaram possível aproximar a purificação funcional de qualquer macromolécula, de forma sistemática e com razoável taxa de sucesso. Aplicações bem-sucedidas catalisaram rapidamente o interesse e aceitação destes métodos de purificação (Pedro Cuatrecasas & Anfinsen, 1971). No entanto, o progresso nesta área tem sido prejudicado pela falta de suportes sólidos para o acoplamento de ligandos, e pela incapacidade de corrigir esse acoplamento com uma distância suficiente do esqueleto da matriz (Cuatrecasas, 1970).

Para que este tipo de aplicação seja bem-sucedida, a matriz requer um número de características favoráveis. O ideal é que a matriz tenha uma rede porosa não muito compacta, que permita uniforme entrada e saída, inalterada, de macromoléculas, ou seja, que a matriz tenha a mínima interação com as proteínas em geral, quer antes, quer após o acoplamento dos ligandos e ainda que esta mantenha as propriedades de fluxo favoráveis durante o seu uso. As partículas da matriz devem ser, preferencialmente, de tamanho uniforme, esféricas e com alguma rigidez. Tendo em conta todas estas características, os derivados de agarose (Sephacrose) são as matrizes mais utilizadas (Cuatrecasas et al., 1968; Pedro Cuatrecasas, 1970; Hahn, Podgomik, Merhar, Schallaun, & Jungbauer, 2001).

É também cada vez mais evidente que para a purificação por cromatografia de afinidade seja eficiente, os grupos de ligandos que interagem com as macromoléculas a serem purificadas devem estar suficientemente afastadas do esqueleto da matriz, para minimizar a interferência estereoquímica com os processos de ligação (Figura 16a). Isto pode ser conseguido mediante a inserção de uma cadeia hidrocarbonada longa, isto é um espaçador, acoplado entre a matriz e o ligando, evitando assim a ocorrência de impedimento estereoquímico (Fig. 16b) (Cuatrecasas, 1970; Hahn et al., 2001; Marcus & Balbinder, 1972).

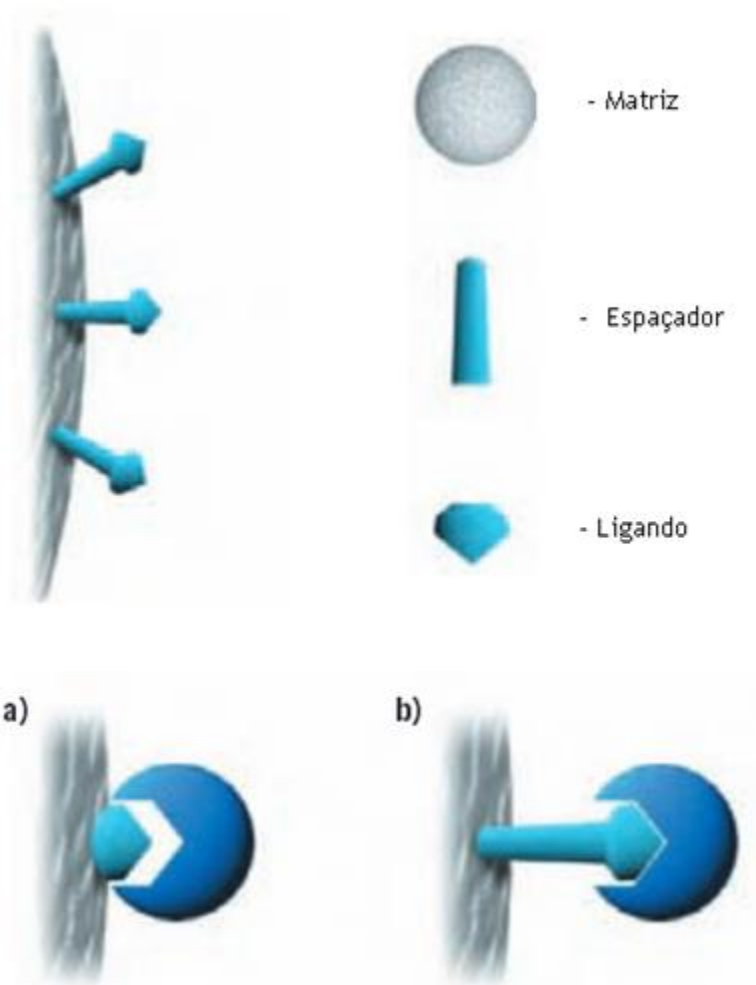


Figura 16 - Esquema representativo de uma matriz cromatográfica. a) Matriz cromatográfica sem espaçador; b) Matriz cromatográfica com espaçador. Adaptado de (Healthcare, 2007).

Atendendo a todas estas razões, decidiu-se explorar o método que visa estabilizar a matriz e simultaneamente efetuar o acoplamento de um grupo espaçador, um procedimento usado geralmente para realizar a ligação entre açúcares e derivados a matrizes de polissacáridos. O método químico envolve a introdução e ativação da Sepharose através da formação de grupos epóxidos, utilizando o reagente 1,4 - butanodiol diglicidil éter seguido da redução com borohidreto de sódio (Oakey & Mulcahy, 2004; Sundberg & Porath, 1974; Uy & Wold, 1977).

Abaixo na Figura 18, pode ser visualizado o esquema que sumariza a reação de imobilização. A posterior caracterização estrutural destes suportes cromatográficos sintetizados foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Alta Resolução de Ângulo Mágico (HR-MAS). Esta técnica permite analisar amostras, tipo suportes cromatográficos e outras, sem as danificar. As amostras sofrem o *swelling* num solvente apropriado, processo que permite tornar a amostra parcialmente solúvel, ou formar uma solução mesmo quando sólidos estão presentes. A técnica consiste na introdução da amostra num rotor especial, que é colocado a elevadas rotações numa sonda apropriada, onde este irá rodar num ângulo mágico de $54,7^\circ$ de inclinação, em relação ao campo magnético. A utilização desta técnica reduz drasticamente o alargamento de sinal

devido às contribuições dos acoplamentos dipolares residuais, e às variações de suscetibilidade magnética, fornecendo assim espectros de alta resolução (Carvalho, Corvo, Enugala, Marques, & Cabrita, 2010; Deshmukh, Simpson, & Hatcher, 2003; Edelman, 2010; Simpson et al., 2001).

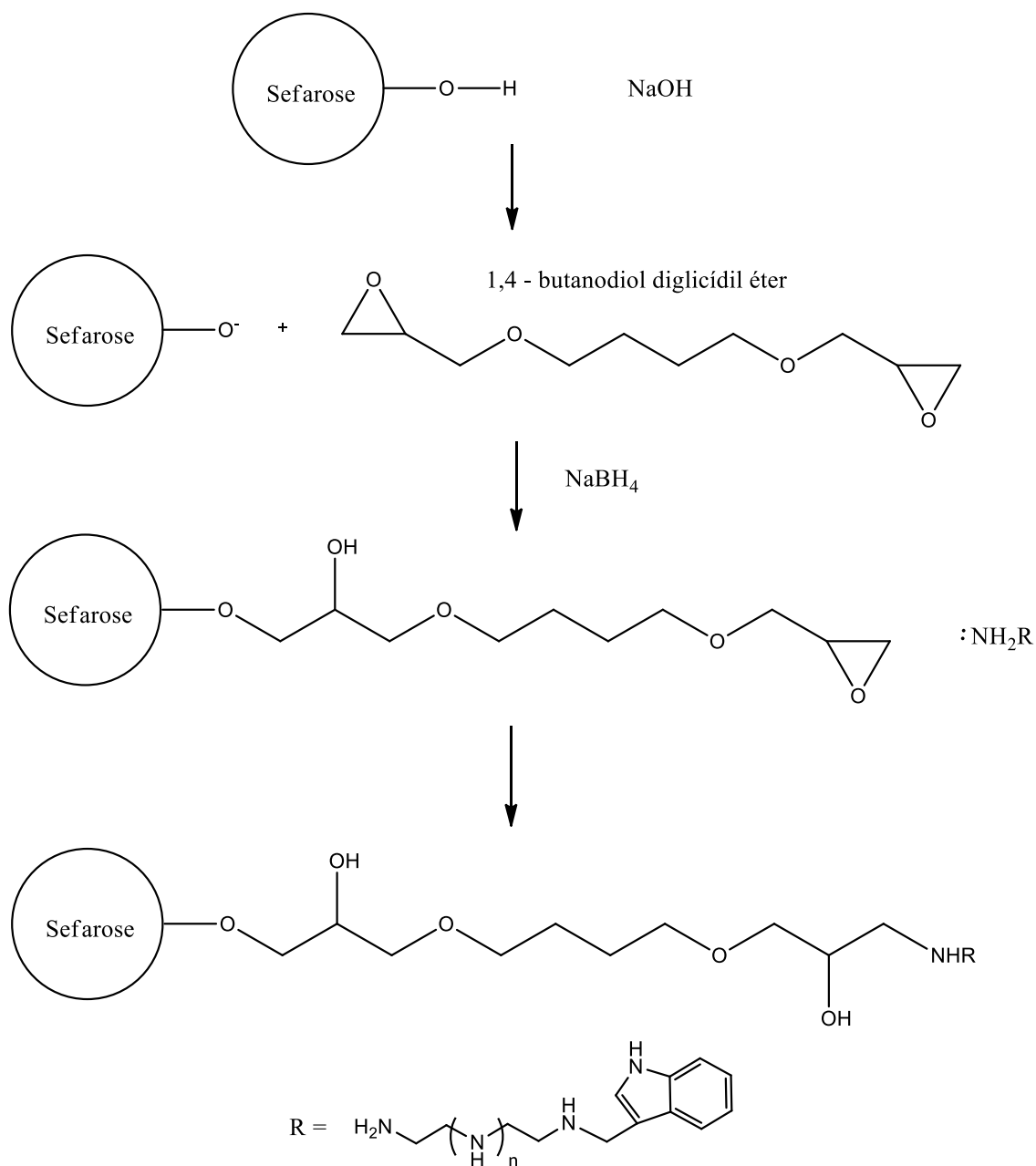


Figura 17 - Esquema sumário da síntese dos suportes cromatográficos.

Após a realização de todas as reações acima referidas, ficou comprovada a síntese de três novos ligandos derivados de acridina, três novos ligandos derivados de indol e a síntese de três suportes cromatográficos com os ligandos derivados de indol respectivamente imobilizados. Esta imobilização dos ligandos foi verificada através da caracterização dos suportes por espectroscopia de RMN de HR-MAS.

Capítulo 2

2 Objetivos

Com a realização deste trabalho de investigação científica pretende-se o desenvolvimento de novos suportes cromatográficos baseados em derivados de heterociclos de acridina e indol com capacidade para ligar-se a estruturas de G-quadruplex.

Os objetivos deste trabalho são:

- Sintetizar heterociclos específicos de sequências do G-quadruplex;
- Caracterizar os heterociclos sintetizados por espectroscopia de RMN;
- Sintetizar os suportes cromatográficos de afinidade através da imobilização dos heterociclos na matriz de Sepharose;
- Caracterizar os suportes cromatográficos por espectroscopia de RMN de HR-MAS.

Capítulo 3

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os reagentes acridina (97%) e o 1,4 - butanodiol diglicidil éter foram adquiridos à *Sigma Aldrich*. O 2-bromometil metil éter (90%), o cloreto de *p*-toluenossulfonilo, o borohidreto de sódio (99%), a dietilenotriamina (98%), a trietilenotetramina (60%), a tetraetilenopentamina (97%) e o indol-3-carboxaldeído foram comercialmente adquiridos à *Acros Organics*. A piridina anidra foi adquirida à *Fisher*. O sulfato de sódio anidro e a areia do mar lavada, de grão fino, foram comprados à *AppliChem Panreac*. O carbonato de potássio, o carbonato de sódio e o ácido acético glacial foram adquiridos à *ChemLab*. O ácido clorídrico (37%), o fenol, o hidróxido de sódio e o ácido sulfúrico 95% à *VWR Chemicals*.

Os solventes usados como clorofórmio, éter dietílico, acetonitrilo, metanol, éter petróleo, diclorometano, a piridina anidra e o isopropanol foram adquiridos à *Fisher*. Os peneiros moleculares 4Å foram utilizados sempre que foi necessária a secagem dos solventes.

As reações realizadas foram seguidas por cromatografia de camada fina (ccf) em placas pré-revestidas de sílica, com uma espessura de 0,2 mm, compradas à *Macherey-Nagel*.

A Sepharose CL-6B foi adquirida à *General Electric, Healthcare Life Sciences*.

Todos os produtos químicos comercialmente adquiridos que foram utilizados nas reações, não sofreram qualquer purificação adicional.

3.2 Equipamentos

As reações de síntese dos ligandos foram realizadas sobre placas de aquecimento e agitação magnética, Lab-Mix 25, da marca *Heidolph*, acoplados a estas placas encontravam-se sensores de temperatura, EKT-Mix 25, também eles da mesma marca. Foi utilizada a câmara de UV CN-15.LC para revelar as placas de cromatografia de camada fina, expondo-as à luz ultravioleta com um comprimento de onda de 254 nm e/ou 365 nm.

As evaporações dos solventes foram efetuadas usando um evaporador rotativo, constituído por um rotavapor, um banho de água, um controlador de vácuo e uma bomba de vácuo da marca *Büchi*. Para a secagem dos compostos obtidos foi utilizada uma estufa a vácuo da *Trade Raypa®*. Os espectros de RMN, para análise e caracterização dos compostos obtidos, foram realizados em um espectrómetro Bruker Avance III 400MHz. Os espectros de ¹H - RMN foram realizados a 400MHz e os de ¹³C - RMN foram realizados a 100MHz, usando como solventes o clorofórmio deuterado (CDCl₃), o metanol deuterado (CD₃OD) e a água deuterada (D₂O), tendo estes como referência o tetrametilsilano (TMS). Os espectros foram processados com o *software* Topspin 3.1 da Bruker. Na caracterização dos suportes cromatográficos todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente utilizando um Bruker Avance III 400MHz, equipado com uma

sonda de 4 mm de ressonância tripla (HNC) HR-MAS. A rotação das amostras no ângulo mágico foi efetuada a 4,0 kHz. Os espectros foram processados com o *software* TopSpin 3.1 da Bruker. Todos os espectros de RMN de ^1H foram referenciados internamente ao sinal residual de ^1H DMF- d_7 , que também serve como o agente de *swell* para o polímero (-0.05 ml). A sequência Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) foi utilizada com um tempo de eco de 1,5 ms para suprimir os sinais largos do polímero, as experiências foram adquiridos em 256 transientes. As experiências de ^1H , ^{13}C HSQC - DEPT (Heteronuclear Single Quantum Correlation-Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer) foram adquiridas em 16 transientes com um tempo de relaxação de 1.5 s e uma largura espectral de 6000 Hz, num total 1K pontos em F2 e 256 pontos em F1. As experiências de ^1H , ^1H TOCSY foram adquiridas utilizando 5.0 s de tempo de relaxação, uma janela espectral de ca. 6000 Hz num total de 2K pontos em F2, 256 pontos em F1. Utilizou-se uma sequência MLEV-17 com um tempo de mistura de 80 ms, em 8 transientes. As experiências de ^1H , ^1H NOESY foram adquiridas com 300 ms de tempo de mistura em 16 transientes com um tempo de relaxamento de 2,0 s e uma largura espectral de ca. 6000 Hz, num total 2K pontos em F2 e 256 pontos em F1.

A preparação de amostra para o HR-MAS requereu aproximadamente 10 mg da amostra de polímero, que foi colocado num rotor de 4 mm de MAS de zircónia (50 μL).

3.3 Métodos

3.3.1 Síntese do 4,5 - di(bromometil) acridina

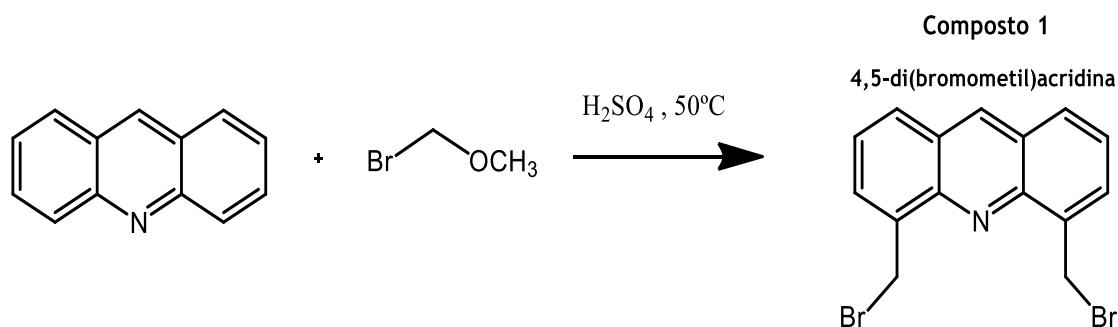


Figura 18 - Síntese do 4,5 - di(bromometil) acridina.

A um balão de três tubuladuras, que foi colocado inicialmente sob atmosfera inerte, com N₂, adicionou-se acridina ($5,6 \times 10^{-3}$ mol, 1 g) e H₂SO₄ (12,5 mL), ligando-se simultaneamente o aquecimento e a agitação da placa. Ao atingir a temperatura de 50 °C, foi adicionado, de uma só vez, o 2-bromometil metil éter (BMME) ($2,25 \times 10^{-2}$ mol, 1,8 mL) com o auxílio de uma seringa. A reação teve a duração de 20h, tendo-se posteriormente adicionado mais 1.8 mL de BMME. Passadas 20h parou-se a reação e o balão foi colocado em gelo durante 2h30m, iniciando-se, seguidamente, o processo de neutralização da mistura reacional com uma solução saturada de NaOH, adicionada gota-a-gota. Depois adicionou-se clorofórmio (50 mL) ao balão, procedeu-se

à filtração e realizou-se uma extração líquido-líquido com água destilada. Por fim, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e finalmente evaporado. O produto amarelo obtido foi por fim colocado a secar na estufa a vácuo a uma temperatura de 50 °C (0,818 g, rendimento = 40%) (Carole et al., 2005).

3.3.2 Reação de tosilação da dietilenotriamina

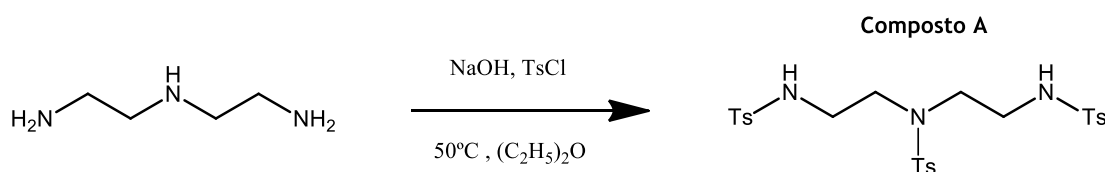


Figura 19 - Tosilação do dietilenotriamina (composto A).

A um balão de duas tubuladuras em agitação e à temperatura ambiente foi adicionado NaOH (2,23 g) e H₂O (15 mL). A essa mistura, foi posteriormente adicionada a dietilenetriamina (0,009 mol, 1 mL). Num copo de vidro à parte, o cloreto de *p*-toluenossulfonilo (TsCl) (0,039 mol, 7,45 g) foi dissolvido em éter dietílico (37 mL). Esta solução foi então adicionada, gota-a-gota, passada 1 hora do início da reação, já com o balão em gelo e sob vigorosa agitação. Após adição desta solução o balão foi deixado à temperatura ambiente durante 3 horas. A reação foi parada e a mistura reacional foi filtrada e lavada com água, etanol e éter dietílico, respectivamente. No final o produto branco obtido foi recristalizado com uma mistura a quente de metanol e clorofórmio. O produto por fim foi seco na estufa a vácuo (1,180 g, rendimento = 23%) (Bianchi et al., 1987).

3.3.3 Reação de tosilação da trietilenotetramina

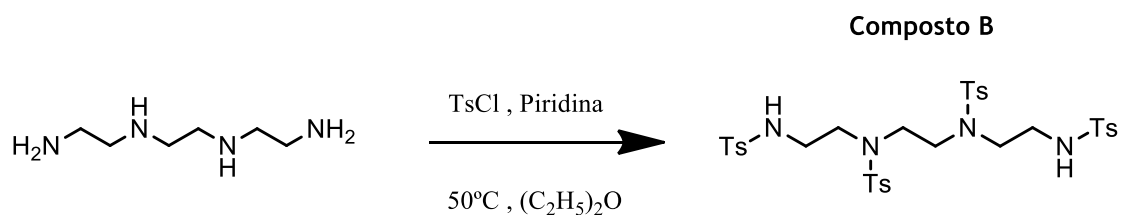


Figura 20 - Tosilação da trietilenotetramina (composto B).

Foi utilizado um balão de duas tubuladuras, onde foi adicionado o cloreto de *p*-toluenossulfonilo (0,027 mol, 5,15 g) dissolvido em éter dietílico (20 mL). Ao balão já sob agitação magnética e aquecimento (50°C) adicionou-se a trietilenotetramina (0,0137mol, 2,04 mL) juntamente com a piridina anidra (10 mL) através da utilização de uma ampola de adição. A reação foi parada após 6h. De seguida foram adicionados 10 mL de HCl (1M) ao balão, para neutralizar a piridina. Posteriormente foi realizada uma filtração e lavagem com água e etanol. Depois foi então

dissolvido o produto do filtro com clorofórmio e procedeu-se à realização de uma extração líquido-líquido, primeiramente com 100 mL de HCl (1M) e depois 3 vezes com água destilada. O produto obtido foi seco com a utilização de sulfato de sódio anidro e por fim foi novamente filtrado, evaporou-se o solvente e colocou-se na estufa a vácuo a secar à temperatura de 50 °C (1,248 g, rendimento = 12%) (Bianchi et al., 1987).

3.3.4 Reação de tosilção da tetraetilenopentamina

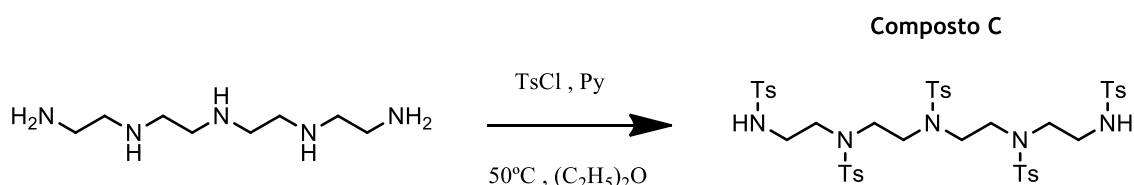


Figura 21 - Tosilação da tetraetilenopentamina (composto C).

O procedimento realizado foi igual ao descrito no ponto 3.3.3. Nesta reação foram apenas alteradas as quantidade usadas de *p*-toluenossulfunilo (0,025 mol, 4,77g) e tetraetilenopentamina (0,0053 mol, 1mL). O rendimento final foi de 26% (1,3 g) (Bianchi et al., 1987).

3.3.5 Reação de síntese do composto 1A

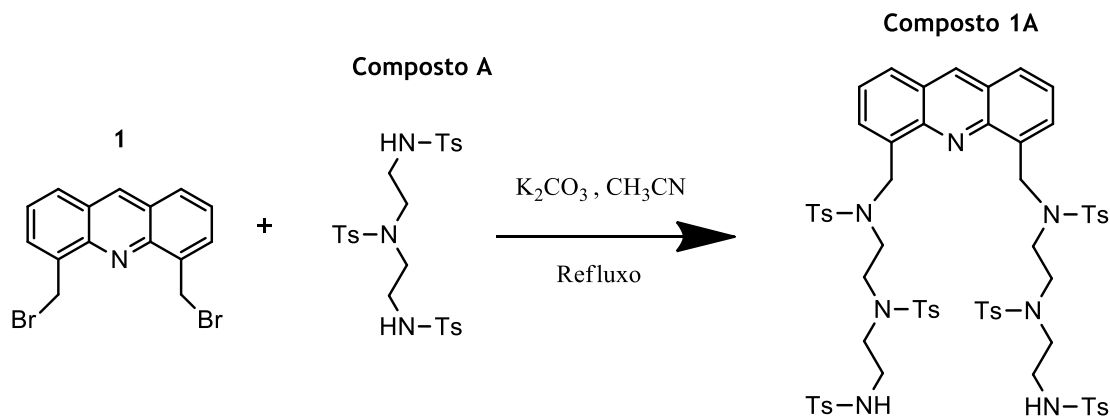


Figura 22 - Síntese do composto 1A.

A um balão de duas tubuladuras foram adicionados 26 mL de acetonitrilo seco para solubilizar o composto A (0,0016 mol, 0,905 g) e de seguida adicionou-se o carbonato de potássio (0,008 mol, 1,1 g), ao mesmo tempo que se ligou a agitação e o aquecimento, até este atingir a temperatura de refluxo. Num copo à parte foi dissolvido o composto 1 (0,0008 mol, 0,3 g) em acetonitrilo seco (7 mL). Após refluxo adicionou-se gota-a-gota, com ajuda de uma ampola de adição, a solução do composto A anteriormente dissolvida. Após 6h de reação, esta foi parada

e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Por fim realizou-se uma filtração, evaporou-se o solvente e o produto foi colocado na estufa a secar (Bartoli et al., 2009).

3.3.6 Reação de síntese do composto 1B

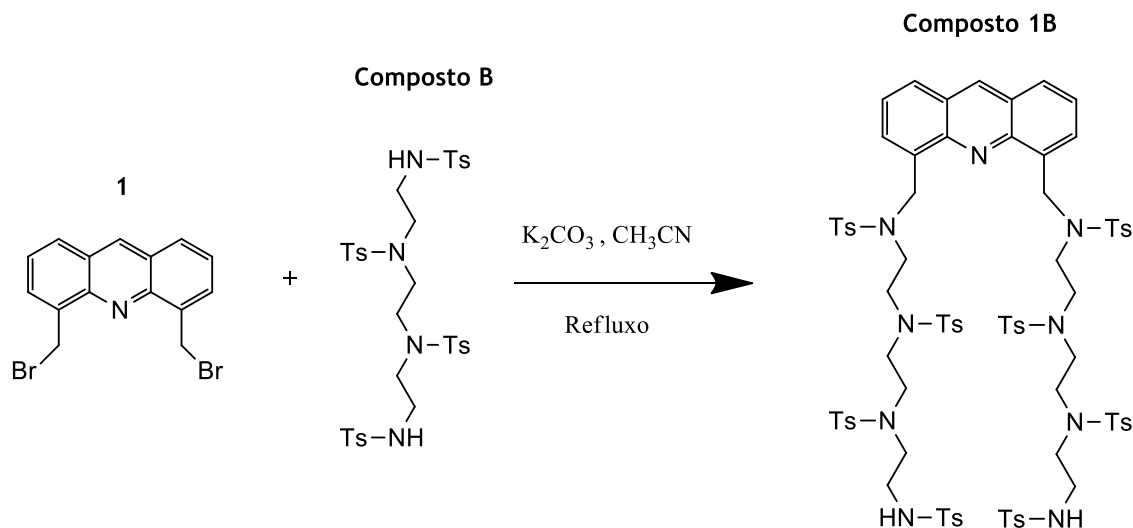


Figura 22 - Síntese do composto 1B.

O procedimento seguido foi igual ao descrito no ponto 3.3.5. Nesta reação foi usado o composto B ($3,26 \times 10^{-4}$ mol, 0,8 g) (Bartoli et al., 2009).

3.3.7 Reação de síntese do composto 1C

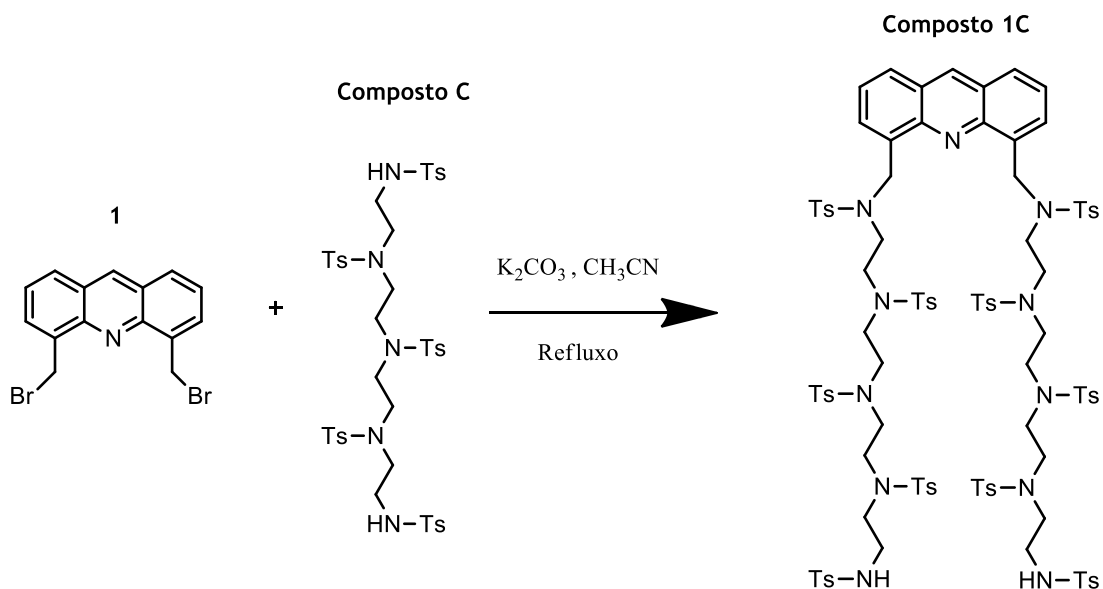


Figura 23 - Síntese do composto 1C.

O procedimento seguido foi igual ao descrito no ponto 3.3.5. Nesta reação foi usado o composto C ($6,2 \times 10^{-4}$ mol, 0,5 g) (Bartoli et al., 2009).

3.3.8 Reação de síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-aminoetil)etano-1,2-diamina)

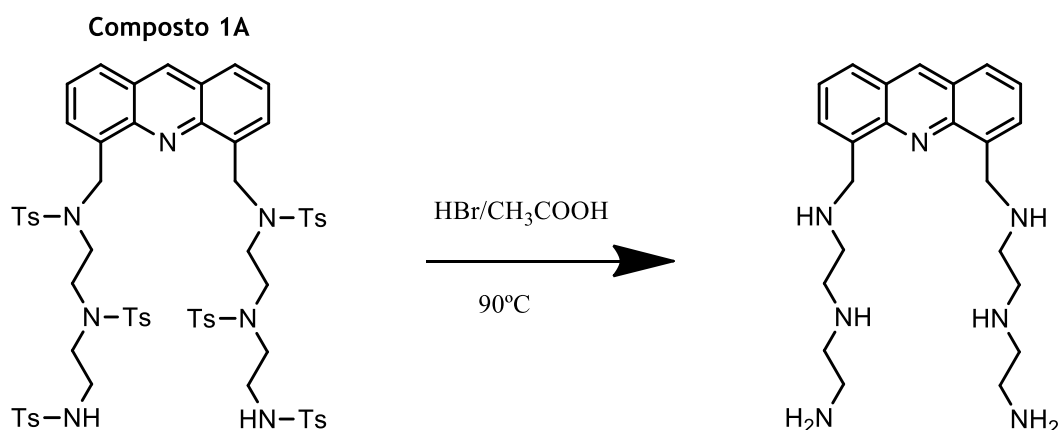


Figura 24 - Reação de síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-aminoetil)etano-1,2-diamina).

Primeiramente foi preparada uma solução de 33% de HBr/CH₃COOH, esta solução foi utilizada para solubilizar o composto 1A (1,12×10⁻⁴ mol, 0,150 g) obtido anteriormente. Após solubilização do composto 1A adicionou-se ao balão de uma tubuladura juntamente com o fenol (0,011 mol, 1,05 g). O balão foi colocado sob agitação magnética à temperatura de 90°C durante 24h. Posteriormente procedeu-se à neutralização da mistura reacional com uma solução saturada de NaOH, filtrou-se e lavou-se várias vezes com clorofórmio. Depois realizou-se a extração líquido-líquido e evaporou-se a fase orgânica. Por fim foi realizada uma recristalização com etanol e água (3:1) (0,227 g, rendimento = 21%) (Hediger & Kaden, 1978).

3.3.9 Reação de síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-((2-((2-aminoetil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina)

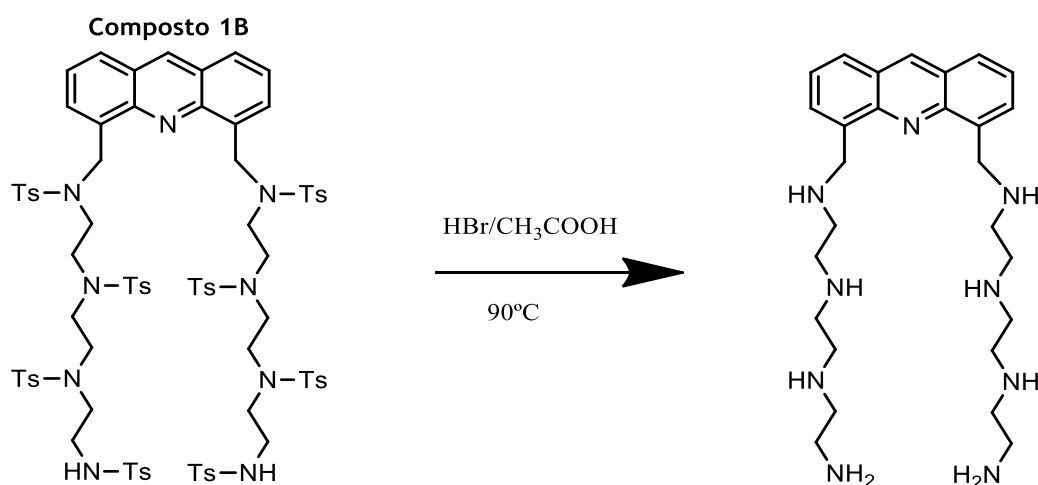


Figura 25 - Reação de síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-((2-((2-aminoetil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina).

O procedimento seguido foi igual ao descrito no ponto 3.3.8. Nesta reação foi usado o composto 1B ($8,68 \times 10^{-5}$ mol, 0,150 g). O rendimento final foi de 14% (0,195 g) (Hediger & Kaden, 1978).

3.3.10 Reação de síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-(2-((2-amino etil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina)

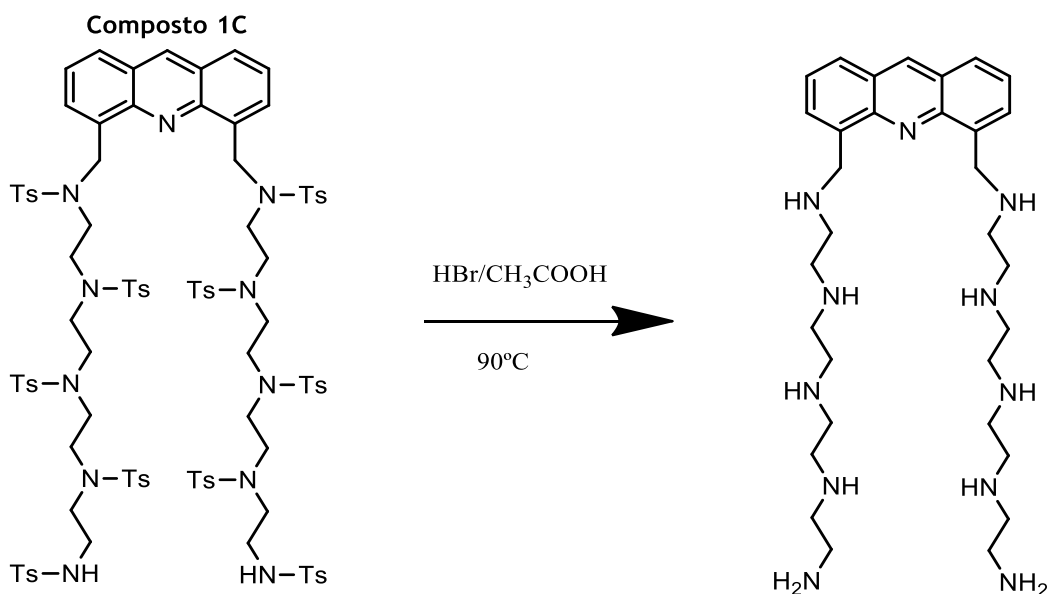


Figura 26 - Reação de síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-(2-((2-amino etil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina)

O procedimento seguido foi igual ao descrito no ponto 3.3.8. Nesta reação foi usado o composto 1C ($7,06 \times 10^{-5}$ mol, 0,150 g). O rendimento final foi de 12% (0,661 g) (Hediger & Kaden, 1978).

3.3.11 Reação de síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-aminoetil)etano-1,2-diamina) (via alternativa)

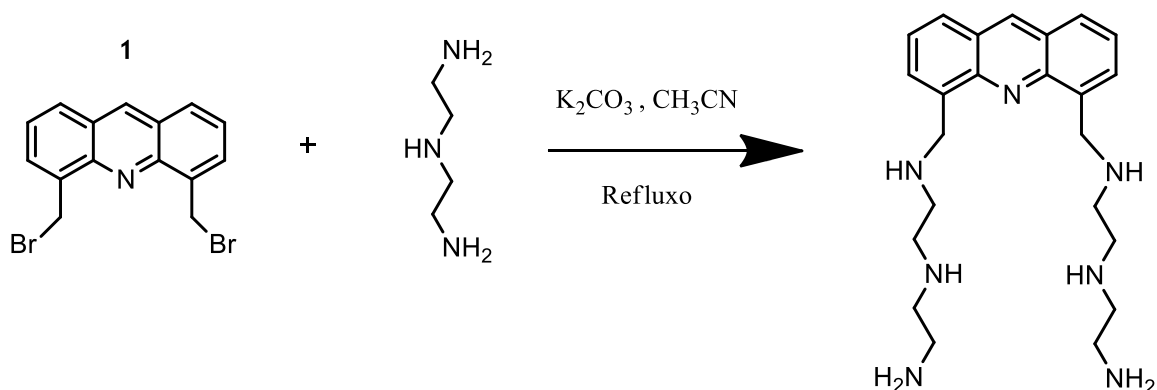


Figura 27 - Reação de síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-aminoetil)etano-1,2-diamina) (via alternativa).

O procedimento seguido foi igual ao descrito no ponto 3.3.5 com a diferença de no passo final o produto ter sido purificado por coluna de cromatografia. Nesta reação foi usado a dietilenotriamina (0,0016 mol, 0,170g) e o composto 1 (1.37×10^{-4} mol, 0,05 g). O rendimento final foi inferior a 5% (Hediger & Kaden, 1978).

3.3.12 Reação de síntese do N¹-((1H-indol-3-il)metil)-N²-(2-aminoetil) etano-1,2-diamina (IT3)

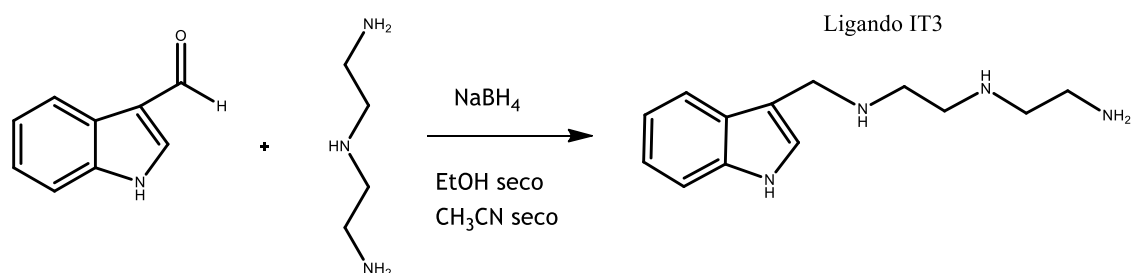


Figura 28 - Reação de síntese do IT3.

A um balão de duas tubuladuras foram adicionados 25 mL de acetonitrilo (CH₃CN) seco e 25 mL de etanol (EtOH) seco e de seguida colocou-se o balão sob atmosfera inerte de N₂. Depois foi adicionado o indol-3-carboxaldeído (0,0034 mol, 0,500 g) e dietilenotriamina (1.03×10^{-2} mol, 1,05 g) respetivamente. A solução resultante foi colocada sob agitação durante 2h e de seguida o solvente foi evaporado. O resíduo obtido após a evaporação foi dissolvido em 15 mL de etanol 99.9%, este foi novamente colocado a reagir, ao qual se adicionou posteriormente, de forma lenta e em pequenas porções, o borohidreto de sódio (NaBH₄), ficando a reagir durante toda a noite. A reação foi então parada, a mistura reacional filtrada e de seguida evaporada. O produto obtido da evaporação foi dissolvido com água e extraído repetidamente com diclorometano (CH₂Cl₂) (3 x 50 mL). A fase orgânica foi evaporada e colocada a secar na estufa. Depois de seco, adicionaram-se 1,5 mL de etanol (99,9%) e 6 mL de dioxano e por fim adição de gotas de HCl 37 %, sob lenta agitação para promover a formação de precipitado. Deixou-se repousar a 4 °C e por fim realizou-se a filtração e armazenamento do produto final (0,245 g, rendimento = 31 %) (Clares et al., 2004).

Caracterização:

¹H NMR (400 MHz, H₂O 90% / D₂O 10%): δ 3,31 - 3,42 (m, 8H, 4xCH₂), 4,49 (s, 2H, CH₂), 7,20 (t, J = 7,54 Hz, 1H, CH), 7,27 (t, J = 7,55 Hz, 1H, CH), 7,52 (d, J = 7,60 Hz, 1H, CH), 7,54 (s, 1H, CH), 7,70 (d, J = 7,85 Hz, 1H, CH), 10,54 (s, 1H, NH) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, H₂O 90% / D₂O 10%): δ 35,02 (CH₂), 41,45 (CH₂), 42,24 (CH₂), 43,07 (CH₂), 44,12 (CH₂), 102,91 (C), 111,68 (CH), 117,31 (CH), 119,64 (CH), 121,98 (CH), 125,47 (C), 127,53 (CH), 135,54 (C) ppm.

Os espectros correspondentes podem ser consultados no anexo 1 e 2.

3.3.13 Reação de síntese do N¹-((1H-indol-3-il)metil)-N²-(2-((2-aminoetil) amino)etil)etano-1,2-diamina (IT4)

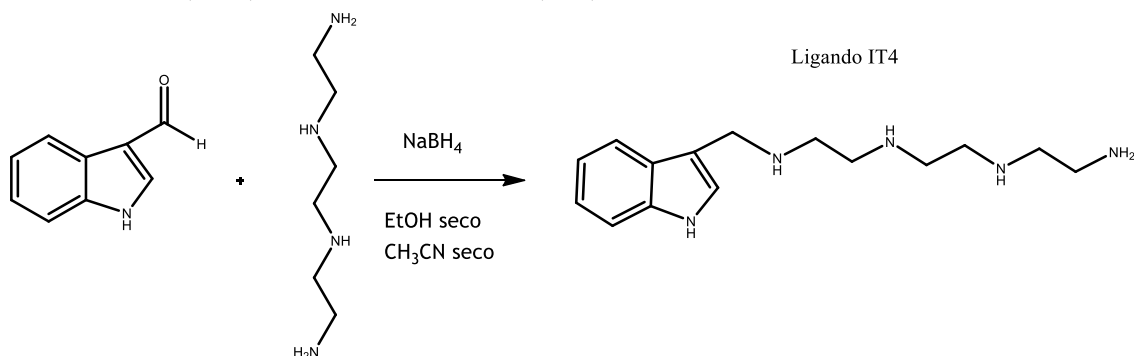


Figura 29 - Reação de síntese do IT4.

O procedimento seguido foi igual ao descrito no ponto 3.3.12. Nesta reação foi usado a trietilenotetramina (0,0068 mol, 0,99 g). O rendimento final foi de 24% (0,232 g) (Clares et al., 2004).

Caracterização:

¹H NMR (400 MHz, H₂O 90% / D₂O 10%): δ 2,89 - 3,50 (m, 12H, 6xCH₂), 4,51 (s, 2H, CH₂), 7,20 (t, J = 7,65 Hz, 1H, CH), 7,27 (t, J = 7,49 Hz, 1H, CH), 7,52 (d, J = 6,01 Hz, 1H, CH), 7,55 (s, 1H, CH), 7,71 (d, J = 7,96 Hz, 1H, CH), 10,56 (s, 1H, NH) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, H₂O 90% / D₂O 10%): δ 34,98 (CH₂), 39,96 (CH₂), 41,37 (CH₂), 42,32 (CH₂), 42,92 (CH₂), 42,96 (CH₂), 43,15 (CH₂), 102,90 (C), 111,68 (CH), 117,35 (CH), 119,65 (CH), 121,98 (CH), 125,48 (C), 127,56 (CH), 135,54 (C) ppm.

Os espectros correspondentes podem ser consultados no anexo 3 e 4.

3.3.14 Reação de síntese do N¹-((1H-indol-3-il)metil)-N²-(2-((2-((2-aminoetil) amino)etil) amino)etil)etano-1,2-diamina (IP5)

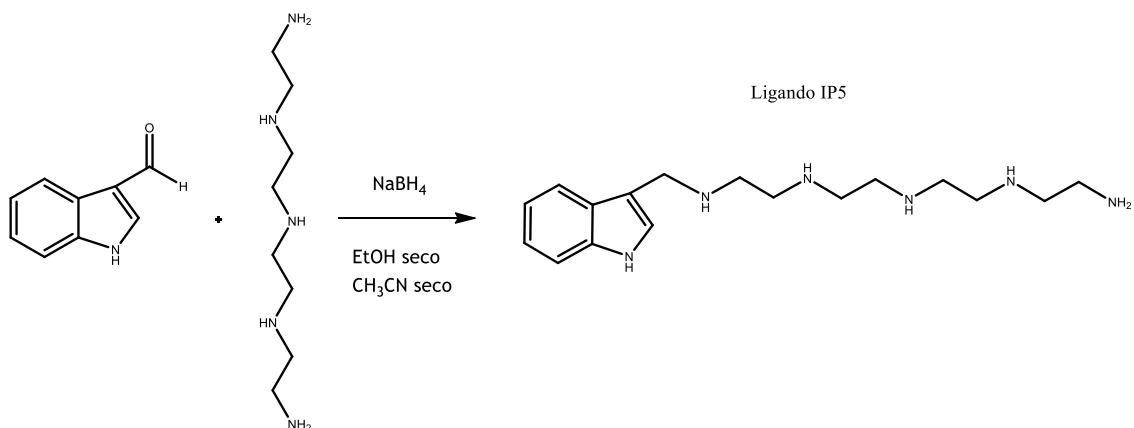


Figura 30 - Reação de síntese do IP5.

O procedimento seguido foi igual ao descrito no ponto 3.3.12. Nesta reação foi usado a tetraetilenopentamina (0,0068 mol, 1,3 g). O rendimento final foi de 24% (0,258 g) (Clares et al., 2004).

Caracterização:

^1H NMR (400 MHz, H_2O 90% / D_2O 10%): δ 3,06 - 3,35 (m, 16H, $8\times\text{CH}_2$), 4,51 (s, 2H, CH_2), 7,20 (t, $J = 7,40$ Hz, 1H, CH), 7,27 (t, $J = 7,03$ Hz, 1H, CH), 7,52 (d, $J = 7,1$, 1H, CH), 7,54 (s, 1H, CH), 7,70 (d, $J = 7,72$ Hz, 1H, CH), 10,57 (s, 1H, NH) ppm.

^{13}C NMR (400 MHz, H_2O 90% / D_2O 10%): δ 42,24 (CH_2), 42,92 (CH_2), 43,75 (CH_2), 43,97 (CH_2), 44,33 (CH_2), 103,58 (C), 112,32 (CH), 117,98 (CH), 120,28 (CH), 122,61 (CH), 126,12 (C), 128.18 (CH), 136,18 (C) ppm.

Os espectros correspondentes podem ser consultados no anexo 5 e 6.

3.3.15 Síntese dos suportes cromatográficos

3.3.15.1 Ativação da Sepharose CL-6B

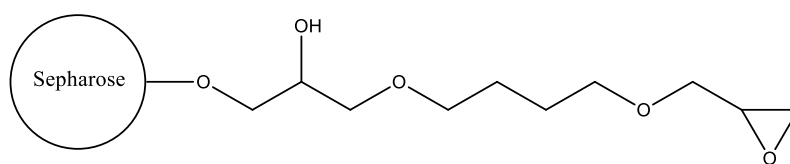


Figura 31 - Sepharose ativada via epóxido.

A Sepharose CL-6B utilizada foi sucessivamente lavada com grandes quantidades água desionizada num funil de vidro sinterizado, de placa porosa, sob vácuo. De seguida a Sepharose CL-6B foi colocada a liofilizar durante 24 horas. Posteriormente, a 500 mg de Sepharose CL-6B foi adicionado uma solução de hidróxido de sódio 1M (5 mL). A mistura obtida foi colocada num erlenmeyer a reagir num agitador orbital a 25 °C e 120 rpm e passadas 4 horas foi adicionado a solução de borohidreto de sódio (10 mg) dissolvido em 1,4 - butanodiol diglicidil éter (1 mL). A reação ficou a reagir durante as 16 horas seguintes. Posteriormente, efetuou-se a lavagem da Sepharose CL-6B, já ativada, com diferentes proporções de acetona e de água desionizada (1:9, 3:7, 5:5, 8:2), e depois só com grandes quantidades de água, no funil de vidro sinterizado, sob vácuo, de forma a remover os grupos epóxidos que ficaram por reagir. Por fim a Sepharose CL-6B ativada foi liofilizada e armazenada a 4 °C (Sundberg and Porath, 1974).

3.3.15.2 Imobilização dos ligandos na Sepharose CL-6B ativada

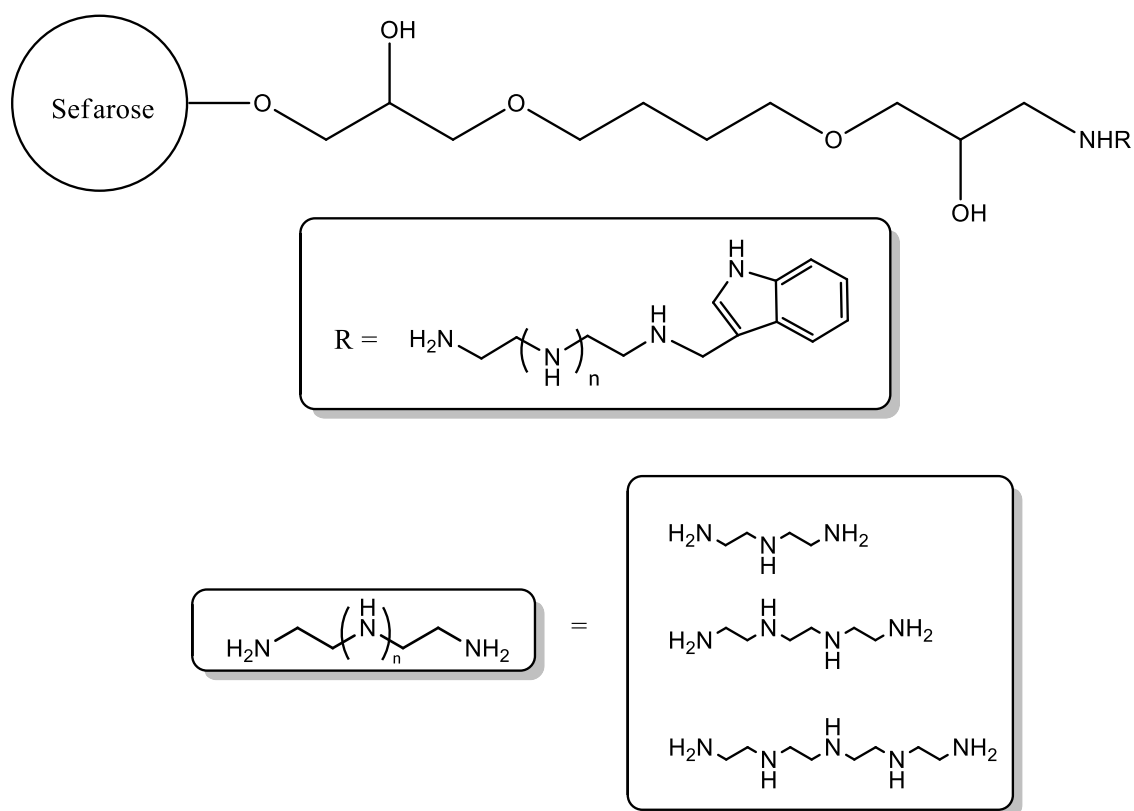


Figura 32 - Imobilização do suporte com os diferentes ligandos, IT3, IT4 e IP5.

Os ligandos IT3 ($3,2 \times 10^{-4}$ mol, 75 mg), IT4 ($1,45 \times 10^{-4}$ mol, 40 mg) e IP5 ($2,82 \times 10^{-4}$ mol, 90 mg) foram dissolvidos em aproximadamente 1 mL da solução de NaHCO₃ 0,5 M. Estas soluções foram de seguida ajustadas para um pH entre 7,5 - 8,5. Posteriormente foi colocado num erlenmeyer a Sepharose CL-6B ativada (0,150 g), com a menor quantidade da solução de NaHCO₃, de modo a que toda a Sepharose CL-6B ativada estivesse submersa durante agitação no orbital a 25 °C e a 110 rpm.

Após 6 horas de agitação, adicionou-se a mistura do ligando inicialmente preparada e procedeu-se ao aumento de temperatura de 25 °C para 55 °C. Após 16 horas de reação efetuou-se a lavagem, extensiva, da Sepharose derivatizada, com água desionizada quente, no funil de vidro sinterizado, sob vácuo. Por fim a amostra foi liofilizada e armazenada a 4 °C.

Capítulo 4

4 Resultados e discussão

Ao longo do trabalho enfatizou-se a importância em sintetizar ligandos para purificação de estruturas de G-quadruplex e/ou separação de isoformas de plasmídeos que contenham sequências formadoras de G-quadruplex. Estes ligandos podem ser sintetizados tendo em conta as propriedades químicas e estruturais do G-quadruplex de modo a potenciar uma interação específica. Na literatura já foram abordados/estudados alguns ligandos derivados de acridina e indol (Dash et al., 2012; Neidle, 2010), acoplados com poliaminas (Liu et al., 2008), com resultados bastante promissores. O BRACO19, um derivado de acridina, é o caso mais flagrante, encontrando-se inclusive em testes pré-clínicos (Sattin et al., 2013). Optou-se, portanto, por realizar a síntese de novos derivados de acridina e indol (Fig. 33). A utilização destes ligandos na síntese de suportes cromatográficos irá permitir a interação com o G-quadruplex, através do empilhamento dos ligandos nos planos exteriores das tétradas de guanina, tendo em conta o potencial que os ligandos têm para se ligar com o G-quadruplex, devido aos seus anéis aromáticos (Ou et al., 2008). A presença de grupos amina, que melhoram consideravelmente a sua solubilidade em água, promove também a interação através de ligações electrostáticas com os grupos fosfato e ácidos nucleicos (Aguilar et al., 2002; Amorim da Costa et al., 2003). Os suportes irão também permitir a separação de isoformas de plasmídeos com sequências formadoras de G-quadruplex, nomeadamente da isoforma superenrolada (sc), que é a isoforma que mostrou ter maior facilidade para a formação de estruturas de G-quadruplex (Sun & Hurley, 2009).

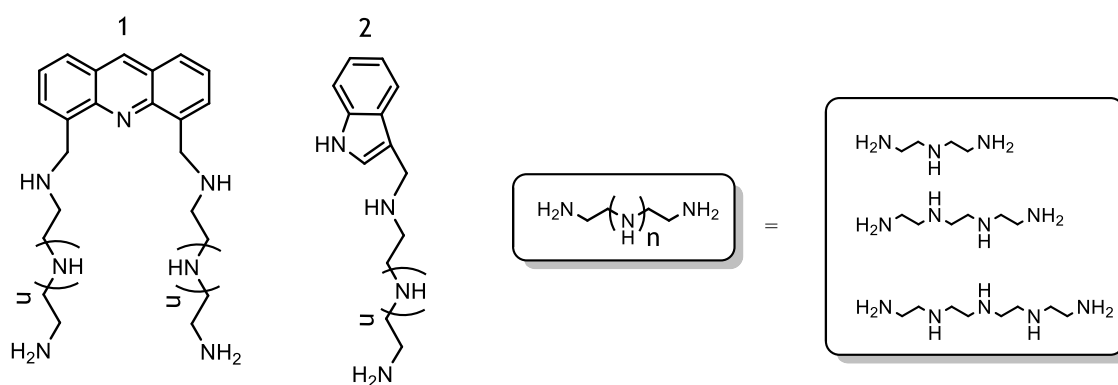


Figura 33 - Ligandos sintetizados derivados de acridina (1) e indol (2).

Neste trabalho, um dos objetivos consiste em preparar suportes cromatográficos a partir da imobilização dos derivados de acridina e indol na Sepharose, para purificação de plasmídeos que contenham sequências formadoras de G-quadruplex. O outro objetivo do trabalho é caracterizar estruturalmente os suportes sintetizados por RMN HR-MAS.

4.1 Síntese química

4.1.1 Síntese dos derivados de acridina

Na síntese de derivados de acridina estão envolvidos 4 tipos de reações, a de bromometilação da acridina, a tosilização das aminas, substituição nucleofílica das aminas parcialmente tosiladas e por fim a reação de destosilação dos ligandos.

No seguimento destas quatro reações poderá ser consultado novamente a Figura 14 que contém esquematizado sumariamente a síntese destes ligandos.

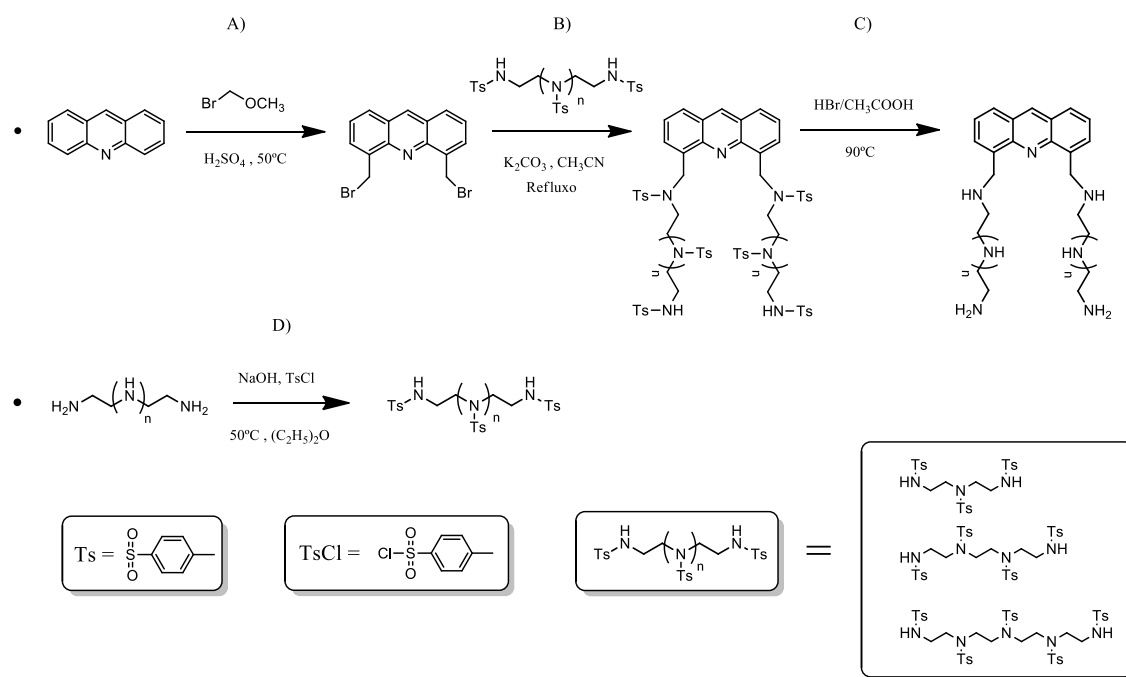


Figura 14 - Esquema sumário da síntese dos derivados de acridina.

• Bromo-metilação da acridina (A)

Para a halogenação da acridina utilizou-se o reagente 2-bromometil metil éter (BMME). Este já foi descrito anteriormente como sendo um eficiente agente utilizado na bromo-metilação de compostos aromáticos (Chiron & Galy, 2003). Na presença de um ácido forte, o BMME reagiu por substituição eletrofílica regioselectiva com a posição 4 da acridina. O composto obtido foi acridina monossubstituída à qual se adicionou, novamente, igual quantidade de BMME para se efetivar a dissustituição da acridina e assim formar o 4,5 - di(bromometil)acridina (Fig. 34) (Chiron & Galy, 2003).

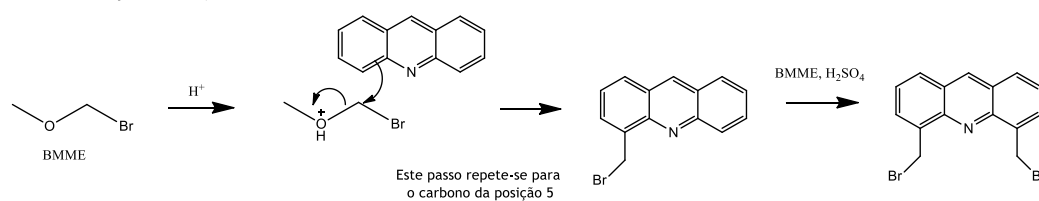


Figura 34 - Bromometilação da acridina.

No entanto alguns problemas foram observados durante o *work up*. Após o término da reação e arrefecimento efetuado em gelo, o composto deveria precipitar (Carole et al., 2005) e isso não aconteceu. Como tal, optou-se por se fazer a basificação da mistura reacional.

Porém, a basificação da mistura resultou em complicações no processo de purificação. Devido à mistura resultante continha vários sais, o processo de filtração tornou-se menos eficiente, tornando-se necessário a realização de várias extrações líquido-líquido para remover as impurezas resultantes.

Além do processo de purificação, o procedimento reacional também foi explorado de modo a otimizar o rendimento final. Na tabela 1, que se encontra abaixo, estão resumidas as várias experiências que foram realizadas, com respectivas modificações feitas e consequentes resultados.

Inicialmente testou-se adição única de 4 equivalentes de BMME de uma só vez, no entanto verificou-se que o produto maioritário obtido foi monobromometil acridina. Numa segunda abordagem, foram adicionados 8 equivalentes de BMME de uma só vez, no entanto mas uma vez mais o resultado final não foi o pretendido, tendo-se obtido uma mistura de 4 - monobromometil acridina e 4,5 - di(bromometil) acridina. Por fim, foi testada outra estratégia que consiste na adição de 4 equivalentes de BMME em dois passos, adição de 4 equivalentes e deixou-se a reagir durante 20h, após essas 20h fez-se adição de os restantes 4 equivalentes, originando o produto final pretendido, 4,5 - di(bromometil)acridina.

O valor de 40% de rendimento obtido situou-se um pouco abaixo dos 64% descritos na literatura (Carole et al., 2005; Chiron & Galy, 2003), como tal será necessário otimizar o processo de purificação.

Tabela 1 - Experiências realizadas com diferentes proporções de adição do BMME.

Experiência	Reagente	Proporção reagente	Rendimento (%)
1		4 eq	17
2	BMME	8 eq	29
3		4 eq + 4 eq (dois passos)	40

Na tabela encontram-se descritos as melhores experiências realizadas de acordo com as diferentes condições de adição do BMME.

- **Tosilação das aminas (D)**

As reações de tosilação consistem na inserção de grupos protetores tosilo, que irão proteger as aminas (Bianchi et al., 1987).

Utilizou-se o reagente cloreto de *p*-toluenossulfonilo para a tosilacção das três aminas, dietilenotriamina, trietilenotetramina e da tetraetilenopentamina. Para o processo de tosilacção das aminas, ocorre uma substituição nucleofílica bimolecular ao grupo tosilo entre o cloro e a amina (nucleófilo), catalisada em meio fortemente básico. Nestas reacções de tosilacção das aminas, as bases utilizadas foram o NaOH para a dietilenotriamina e a piridina para as restantes aminas (Fig. 35).

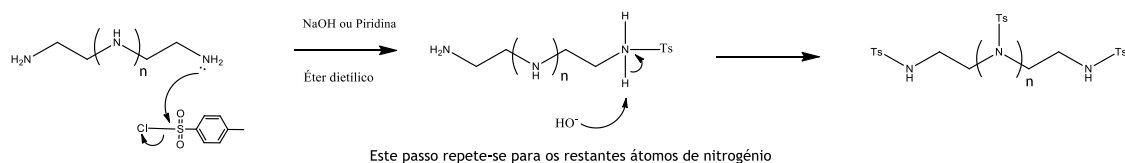


Figura 35 - Tosilacção das aminas.

As reacções correram como planeado, no entanto os rendimentos obtidos foram todos eles bastante inferiores aos descritos, como se pode observar na tabela abaixo (Tabela 2) (Bianchi et al., 1987). No entanto, os produtos apresentavam-se puros, sendo isso uma mais-valia. Estes resultados podem estar também relacionados com a fiabilidade dos reagentes utilizados. Por exemplo, a trietilenotetramina apenas tem 60% de pureza, o que poderá influenciar o produto final. As aminas utilizadas têm sido extensivamente utilizadas no grupo de investigação, pelo que estas poderão ter ganho alguma humidade, não colocando de parte uma secagem prévia das aminas em futuras utilizações.

Tabela 2 - Rendimentos esperados (Bianchi et al., 1987) e obtidos na tosilacção das aminas.

Amina	Rendimento Esperado (%)	Rendimento Obtido (%)
Dietilenotriamina	92	23
Trietilenotetramina	40	12
Tetraetilenopentamina		26

- **Substituição nucleofílica das aminas parcialmente tosiladas (B)**

Para o acoplamento das aminas à acridina, a reacção ocorre por substituição nucleofílica bimolecular do bromo (bom grupo de saída) com o nitrogénio da amina (Fig. 4). A reacção é catalisada por uma base, carbonato de potássio, em acetonitrilo em refluxo.

Estas reacções decorreram conforme o que havia sido planeado.

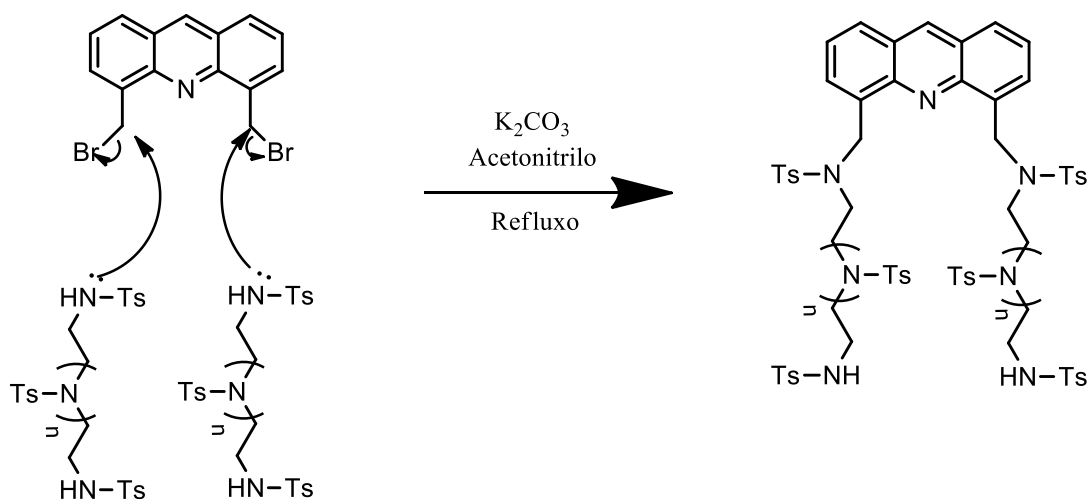


Figura 36 - Substituição nucleofílica das aminas parcialmente tosiladas.

- Destosilação dos compostos

Por fim procedeu-se à remoção dos grupos tosilato. Segundo a literatura o processo de destosilação poderá ser problemático, pois é um processo realizado em condições fortemente ácidas com ácido bromídico (fig. 4). Encontram-se já descritos alguns processos de destosilação que nem sempre resultaram de acordo com o esperado (Banerjea, 1979; Michaelidou & Koutentis, 2010). Do mesmo modo, esta reação não correu como planeada, uma vez que a análise por RMN revela ainda sinais relativos ao grupo tosilato acoplados às aminas. Assim sendo, a continuidade deste trabalho através da utilização destes ligandos ficou comprometida, uma vez que dificultaria a sua ligação ao suporte cromatográfico.

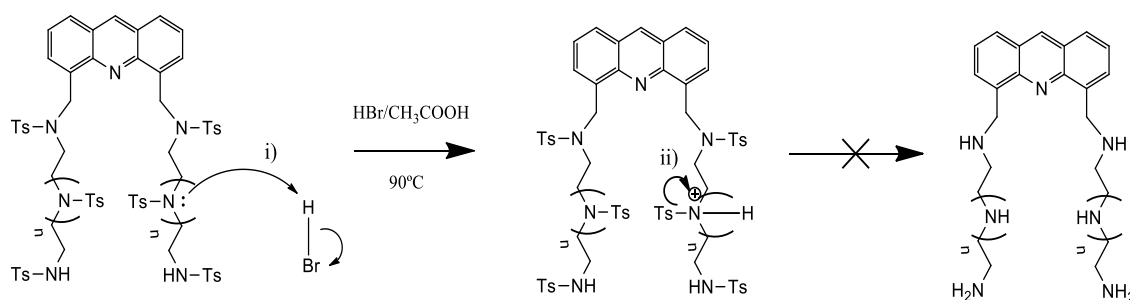


Figura 37 - Destosilação dos compostos. Os passos i) e ii) repetiram-se para todos os átomos de nitrogénio.

Na Tabela 3 podem no entanto ser observados os rendimentos obtidos nestas reações, que mais uma vez foram inferiores ao que se encontra já descrito. Por baixo da tabela encontra-se uma legenda identificando cada composto.

Tabela 3 - Rendimentos esperados(Bartoli et al., 2009) e obtidos dos compostos sintetizados.

Produto	Rendimento Esperado (%)	Rendimento Obtido (%)
1		21
2	31	14
3		12

Legenda da Tabela 3:

- 1- N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-aminoetil)etano-1,2-diamina);
- 2- N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-((2-((2-aminoetil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina);
- 3- N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-((2-((2-amino etil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina).

- **Procedimento Alternativo**

Em alternativa a este processo foi utilizado outro método, à partida bastante mais simples, que se baseou na simples adição das aminas ao 4,5-di(bromometil) acridina (Fig. 38). A reação apresentava rendimentos inferiores a 5%, como tal esta hipótese foi também descartada.

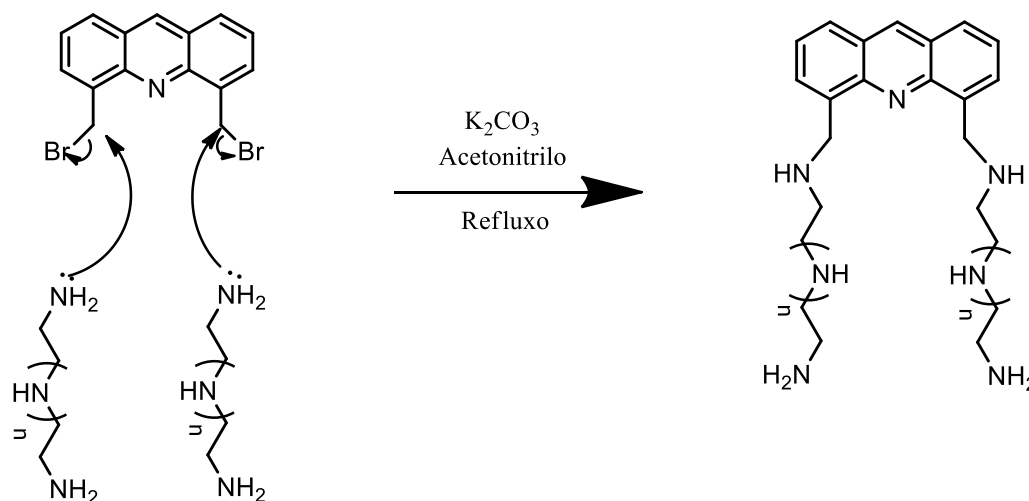


Figura 38 - Síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-aminoetil)etano-1,2-diamina).

4.1.2 Síntese dos derivados de indol

Na síntese de derivados de indol, os ligandos foram obtidos através de uma reação de condensação, do indol-3-carboxaldeído com as três poliaminas, dietilenotriamina, trietilenotetramina e a tetraetilenopentamina, que originaram respetivamente os ligandos IT3,

IT4 e IP5. Nesta reação inicialmente deu-se a formação da imina que posteriormente é reduzida com borohidreto de sódio (Fig. 39) (Clares et al., 2004)

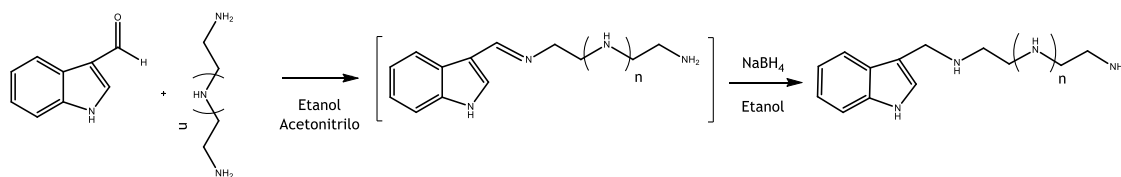


Figura 39 - Reação de síntese dos ligandos derivados de indol.

As reações decorreram conforme o planeado e os rendimentos encontram-se indicados na tabela abaixo.

Tabela 4- Rendimentos obtidos na síntese dos ligandos IT3, IT4 e IP5.

Ligando	Rendimento Obtido (%)
IT3	31
IT4	24
IP5	24

Os baixos rendimentos poderão estar relacionados com o facto de a reação não ter sido completa, mas também com outros fatores. Talvez a utilização de outros solventes venha a favorecer a solubilização do indol-3-carboxaldeído, ou deixar, inicialmente, a reação a reagir durante mais tempo. A utilização de um ácido poderá vir a beneficiar o rendimento, pois inicialmente iria tornar mais eficiente a saída do átomo de oxigénio do aldeído. Outra possibilidade é que tenham sido formados subprodutos que tenham prejudicado o rendimento da reação, como é exemplo disso os produtos que se encontram na Figura 40.

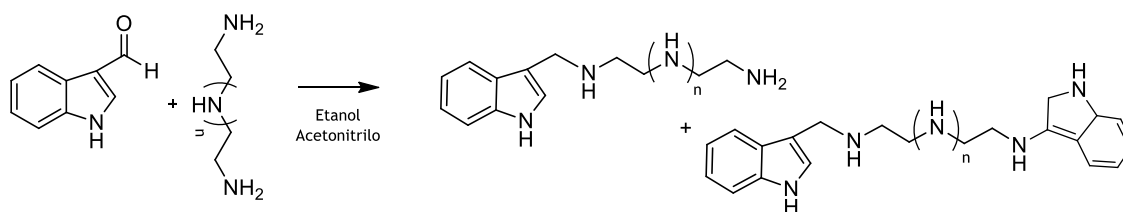


Figura 40 - Possíveis produtos obtidos da reação dos derivados de indol.

De acordo com análise feita por RMN conseguiu-se confirmar os produtos pretendidos através da verificação dos sinais do carbono entre o anel de indol e amina (Fig. 41). No caso do ligando IT3 o sinal do carbono na posição 8, no espectro de ^{13}C , encontrava-se a 42,24 ppm e no espectro de ^1H os respetivos prótons apresentavam um desvio químico de 4,49 ppm. No caso do ligando

IT4 o sinal do carbono na posição 8, no espectro de ^{13}C , encontrava-se a 42,32 ppm e o do ^1H a 4,51 ppm. No caso do ligando IP5 o sinal do carbono na posição 8, no espectro de ^{13}C , encontrava-se a 42,24 ppm e o do ^1H a 4,51 ppm. Esta análise pode ser verificada de forma mais simples através da observação da Tabela 5. Nos anexos 2, 4 e 6, podem ser observados os espectros de HSQC para os diferentes ligandos, sendo que a zona circundada a vermelha representa o sinal da ligação obtida entre o protão e o carbono da posição 8.

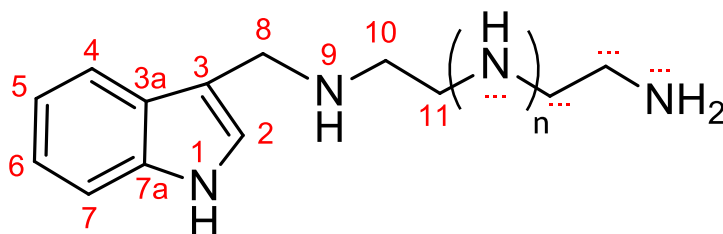


Figura 41 - Numeração dos derivados de indol.

Tabela 5 - Sinais do carbono e protão da posição 8 dos diferentes ligandos.

Ligando	Sinais do espectro de ^1H (ppm)	Sinais do espectro de ^{13}C (ppm)
IT3	4,49	42,24
IT4	4,51	42,32
IP5	4,49	42,24

4.1.3 Síntese dos suportes cromatográficos

Na síntese dos suportes cromatográficos foram utilizados os ligandos derivados de indol IT3, IT4 e IP5 anteriormente sintetizados.

Na preparação destes suportes a matriz escolhida foi a Sepharose, uma vez que é das matrizes mais utilizadas a nível de cromatografia de afinidade. Quanto ao braço espaçador, o 1,4 - butanodiol diglicidil éter, este foi escolhido devido à sua longa cadeia de 12 átomos e por ser recorrentemente utilizado na ativação da Sepharose via epóxido (Healthcare, 2007).

O processo de imobilização dos ligandos na Sepharose foi realizado segundo um método químico que envolve ativação da Sepharose através da formação de grupos epóxidos, utilizando o 1,4 - butanodiol diglicidil éter, que seguidamente é reduzido com borohidreto de sódio, realizando-se seguidamente a imobilização do ligando através do seu grupo amina terminal (Healthcare, 2007; Sundberg & Porath, 1974). O mecanismo da reação pode ser visualizado na Figura 42.

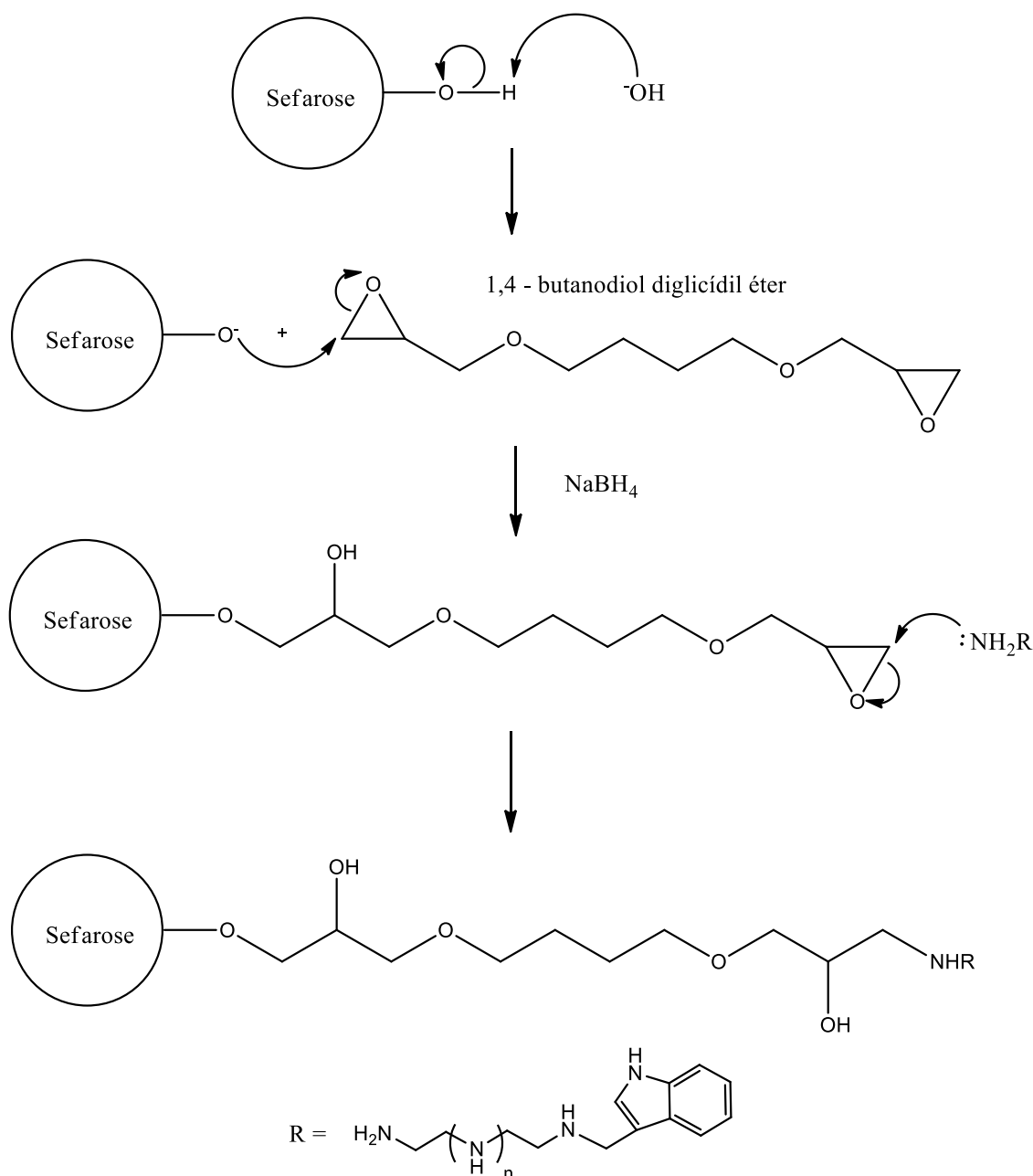


Figura 42 - Mecanismo de síntese dos suportes cromatográficos.

Nesta reação de imobilização do suporte com os diferentes ligandos, houve um problema, pois de acordo com o que está descrito para alguns ligandos, estes são por norma imobilizados com uma solução de pH entre 9 e 11 (Sundberg & Porath, 1974; Uy & Wold, 1977; Wheatley & Schmidt, 1999). Seguindo o que está descrito procedeu-se à solubilização dos ligandos com o auxílio da solução de NaHCO₃ 0,5 M, no entanto aconteceu o que não se previa, ou seja, assim que o pH da solução em causa ultrapassou os 8,5 os compostos começaram a precipitar, estando este facto relacionado com a estrutura e pK dos compostos, o que inviabilizou o passo final de imobilização do ligando no suporte. Este passo da reação provocou a perda de grandes quantidades dos 3 ligandos (IT3, IT4 e IP5). Após alguma otimização deste processo conseguiram-se solubilizar os 3 ligandos entre valores de pH de 7,5 e 8,5, o que possibilitou a

sua imobilização final no suporte cromatográfico. Os suportes sintetizados foram posteriormente caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Alta Resolução de Ângulo Mágico (HR-MAS).

A técnica de RMN de HR-MAS permitiu caracterizar estruturalmente os suportes cromatográficos sintetizados. A da matriz polimérica de Sepharose ativada foi analisada por espectros de RMN de próton 1D de pulso único ^1H HR-MAS e o espectro CPMG ^1H HR-MAS e 2D HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy). Os espectros adquiridos com a matriz de Sepharose ativada (contém o grupo espaçador) e sem os ligandos acoplados serviram como branco para a análise dos espectros já com os ligandos IT3, IT4 e IP5 imobilizados. Os espectros foram obtidos utilizando o solvente deuterado dimetilformamida, $\text{DMF-}d_7$, que serviu também de agente de *swell* para o suporte.

Na análise dos espectros da RMN de ^1H Sepharose ativada, podemos verificar os sinais do solvente $\text{DMF-}d_7$, sendo eles o sinal com o desvio químico de 8,03 ppm e os sinais a 2,94 e 2,77 ppm (Fig. 43).

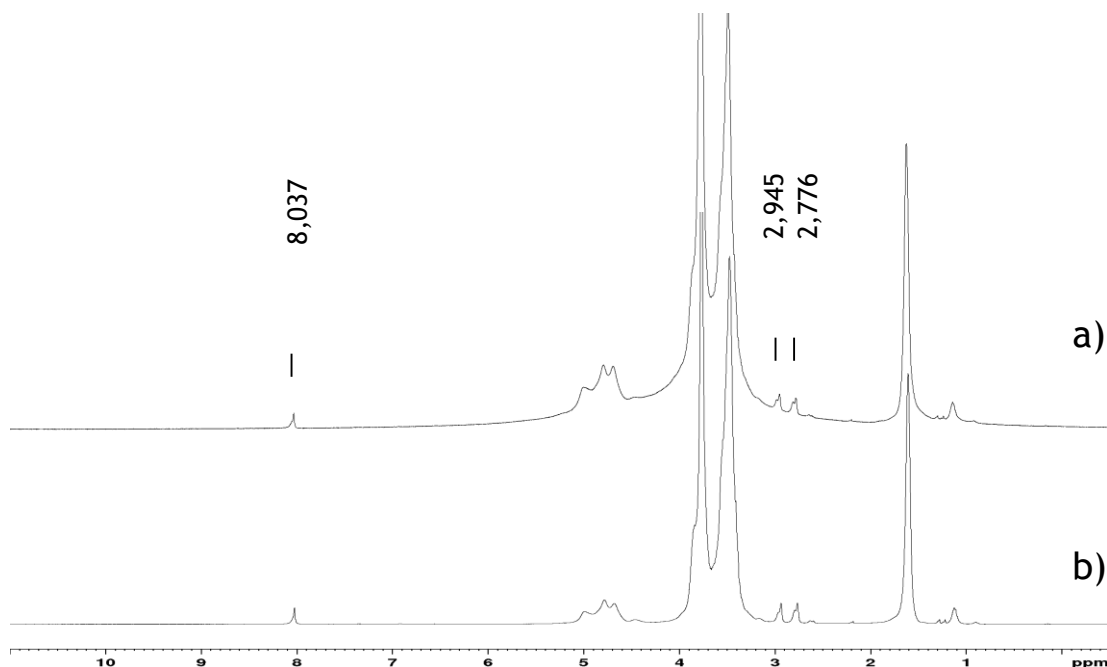


Figura 43 - Espectros da matriz de Sepharose ativada. a) Espectro de pulso único ^1H HR-MAS; b) Espectro CPMG ^1H HR-MAS.

Pela análise dos espectros da figura 43 podemos constatar que a aquisição do espectro de pulso único ^1H HR-MAS apresenta alargamento dos sinais, impossibilitando assim uma melhor análise e caracterização dos sinais obtidos. Posto isto, foi efetuado aquisição de um espectro de CPMG ^1H HR-MAS que tem a vantagem de diminuir esse alargamento, servindo como uma espécie de “filtro” atenuando os sinais da Sepharose. Deste modo obtém-se um espectro com maior resolução.

Na análise da sobreposição de espectros na Figura 44 podemos constatar a presença do anel de indol, pela observação dos sinais característicos a campo baixo, entre 7,1-7,8 ppm e pelos sinais do NH do anel de indol a aproximadamente 10,8 ppm. Nos espectros conseguem observam-se

também os sinais do grupo espaçador a 3,6 ppm e 1,6 ppm. Pode-se observar que os espectros dos três ligandos imobilizados (IT3, IT4 e IP5) são semelhantes, com a exceção de o espectro do IT4 ter uma unidade adicional de $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ e o IP5 ter duas unidades adicionais de $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ em relação ao espectro do IT3. Parte dos sinais devido aos grupos metileno da cadeia de amina podem ser observados ao analisar a zona entre 2,3-2,6 ppm. Visualizando os espectros abaixo, por ordem alfabética, verifica-se o aumento de ressonâncias na zona referida, demonstrando, assim, o aumento da cadeia da amina dos ligandos IT3, IT4 e IP5, respetivamente.

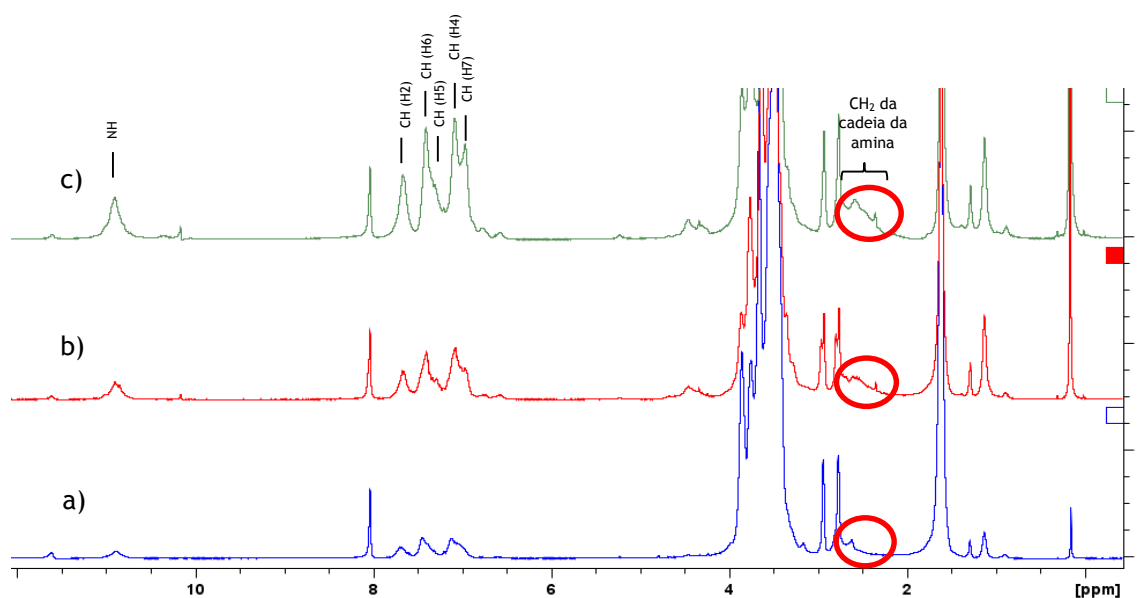


Figura 44 - Espectros de CPMG ^1H HR-MAS dos ligandos imobilizados na matriz de Sepharose ativada. a) ligando IT3; b) ligando IT4; c) ligando IP5. Atribuição dos hidrogénios está feita segundo a Figura 41.

Analisando os espectros bidimensionais 2D HSQC editado (HSQC-DEPT) (Fig. 45), neste caso para o ligando imobilizado IT4, pode-se verificar, onde aparecem os grupos $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ da amina, que para o caso do IT4 serão 3 grupos, estes com desvios químicos a aproximadamente a 3,6 ppm (zona comum com o grupo espaçador) e entre 2,3 e 2,6 ppm. No espectro de HSQC-DEPT esses grupos estão circundados com uma linha a tracejado para melhor observação. O grupo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ identificado, mais à esquerda, na imagem diz respeito ao grupo que se encontra ligado ao anel de indol, e os outros dois grupos identificados, mais à direita, dizem respeito à restante cadeia da amina. Na análise deste espectro são também observados os sinais atribuídos ao anel de indol (circundados a vermelho), sinais estes que se encontram na zona aromática, entre 7,1-7,8 ppm, como referimos anteriormente. Pela comparação do espectro HSQC-DEPT, do suporte imobilizado com o ligando IT4, com o espectro HSQC-DEPT da Sepharose ativada, podemos facilmente observar os sinais do ligando IT4, contrastando com os sinais do espectro a) e b).

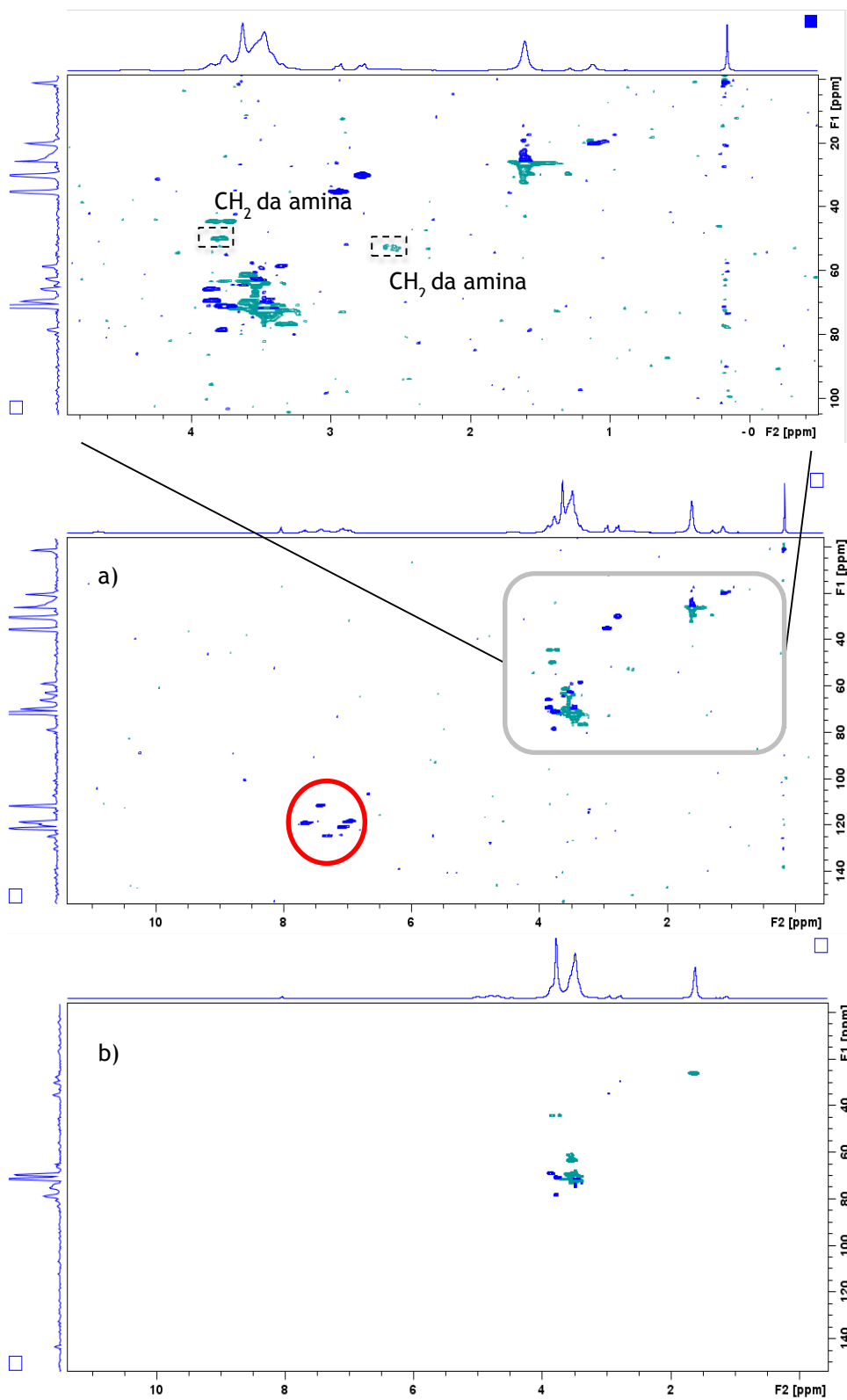


Figura 45 - Comparação do espectro do suporte IT4, com o espectro da Sepharose ativada. a) Espectro HSQC-DEPT da imobilização do ligando IT4; b) Espectro HSQC-DEPT da Sepharose ativada.

A eficácia da imobilização dos ligandos na Sepharose foi comprovada através da análise dos espectros bidimensionais NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) (Fig. 46, 47 e 48). Estes são espectros que permitem estabelecer as correlações entre os núcleos, através da proximidade espacial existente entre eles. Para demonstrar que os ligandos estão efetivamente imobilizados, o ideal seria apresentar a correlação da cadeia de amina com o espaçador, no entanto essa relação é difícil de mostrar uma vez que estas ressonâncias se encontram numa zona do espectro de pouca resolução (3,4 - 3,8 ppm). Como tal, a ligação demonstra-se pela observação da zona circundada a vermelho, zona esta que mostra a correlação existente entre sinais do anel de indol com os sinais do grupo espaçador com o desvio químico a 3,6 ppm e a 1,6 ppm.

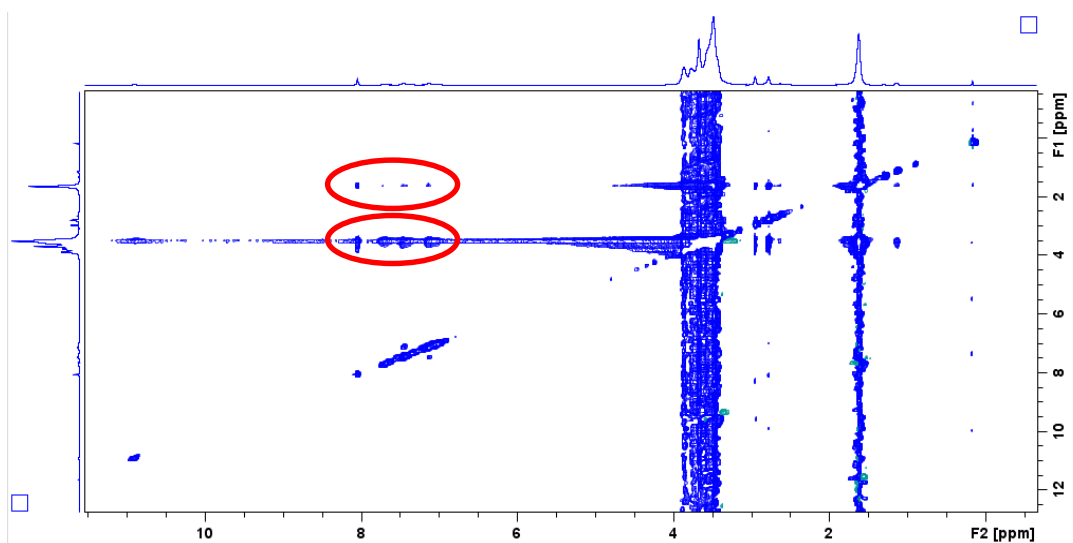


Figura 46 - Espectro 2D NOESY do suporte IT3

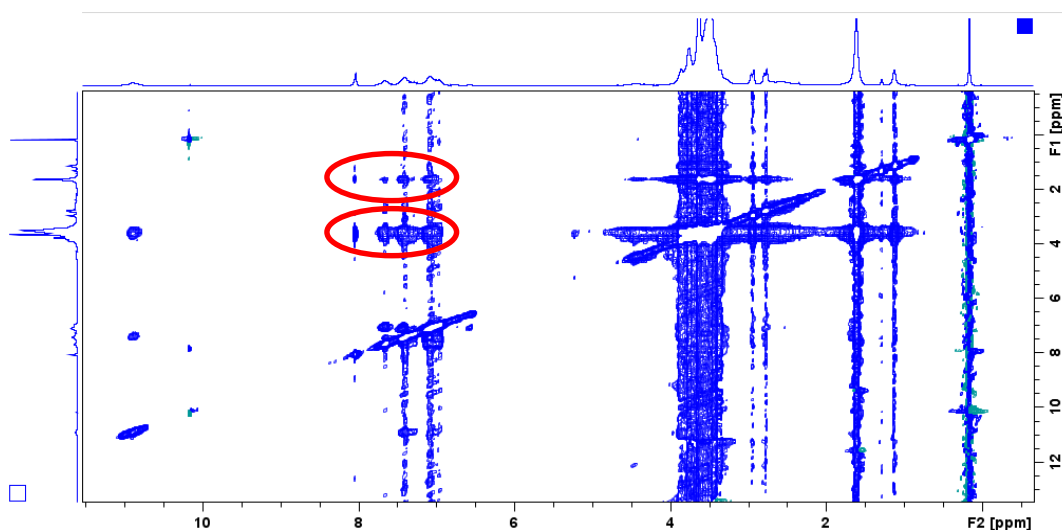


Figura 47 - Espectro 2D NOESY do suporte IT4

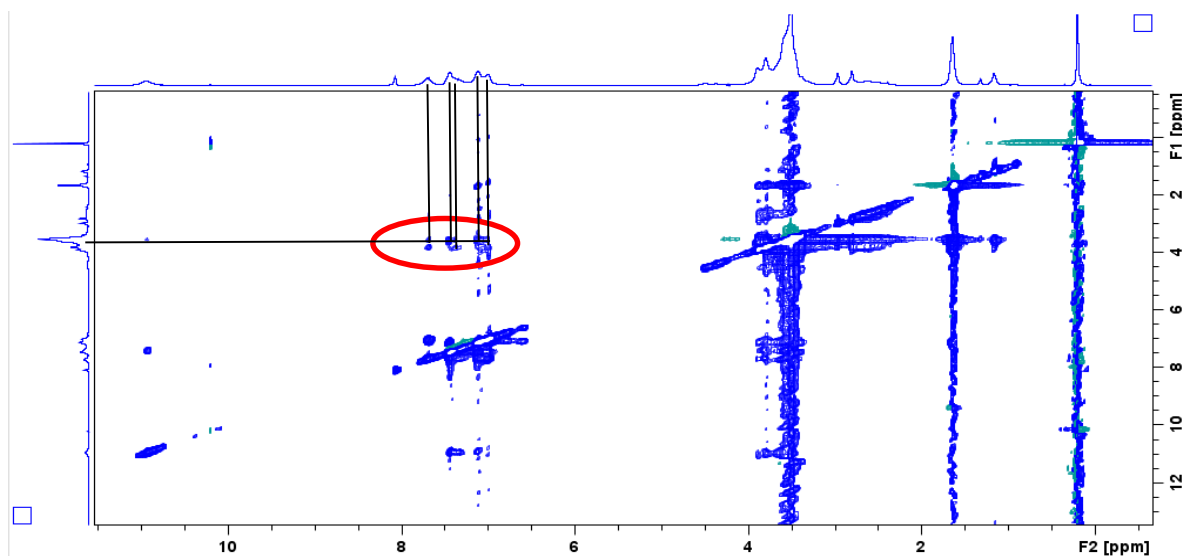


Figura 48 - Espectro 2D NOESY do suporte IP5.

Na Figura 48, pode ser observado com maior detalhe a correlação existente entre o anel de indol e o sinal do grupo espaçador a 3,6 ppm.

Por fim, e após se ter concluído a efetiva ligação dos ligandos ao suporte cromatográfico, torna-se necessário avaliar a fração de ligando que foi imobilizada. Para tal, utiliza-se a integração dos sinais do anel de indol (5H) e a integração do sinal do grupo espaçador a 1,6 ppm, que é o sinal representativo de dois grupos metileno (4H), os únicos que não se encontram adjacentes aos átomos de oxigénio, e por isso o seu desvio químico aparece a campo mais alto. Nas Figuras 49, 50 e 51 podem ser observadas as integrações realizadas sobre essas duas zonas acima referidas.

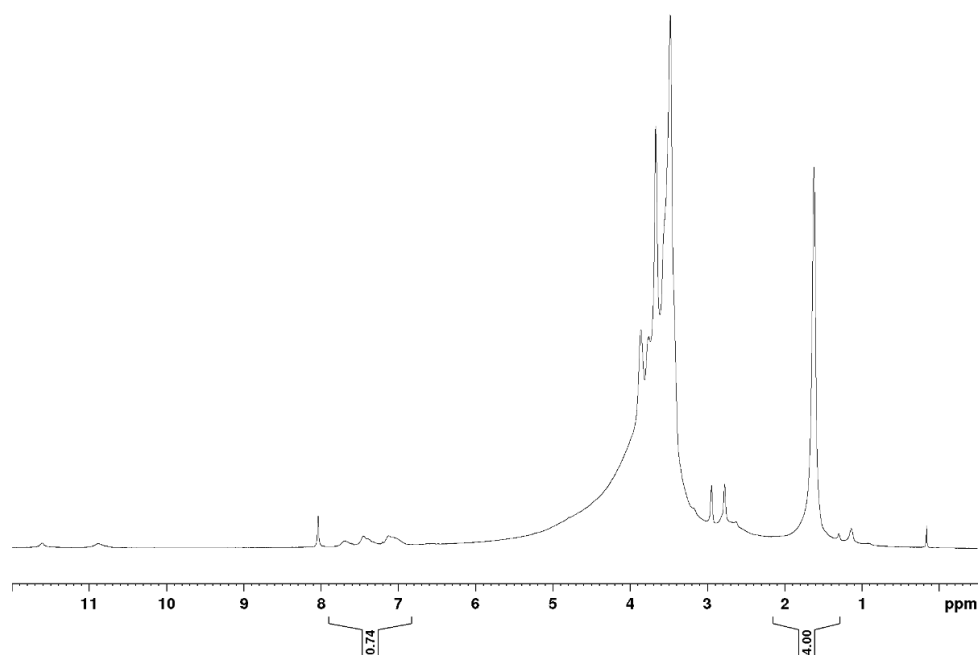


Figura 49 - Espectro ^1H HR-MAS do suporte IT3.

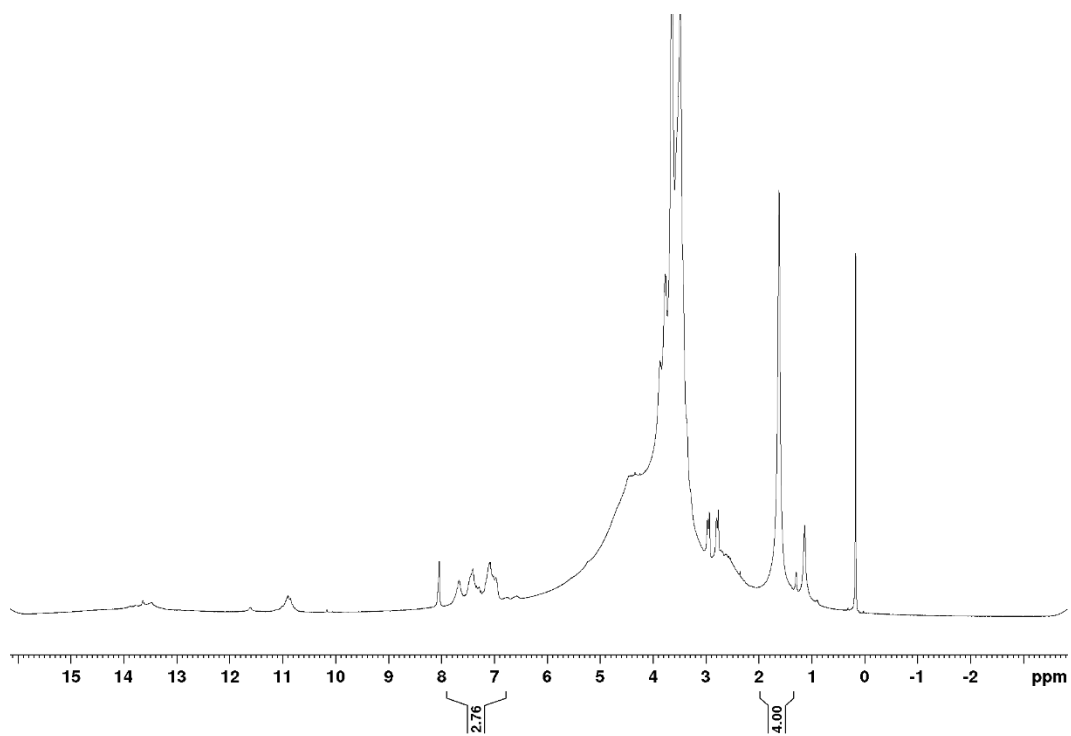


Figura 50 - Espectro ^1H HR-MAS do suporte IT4.

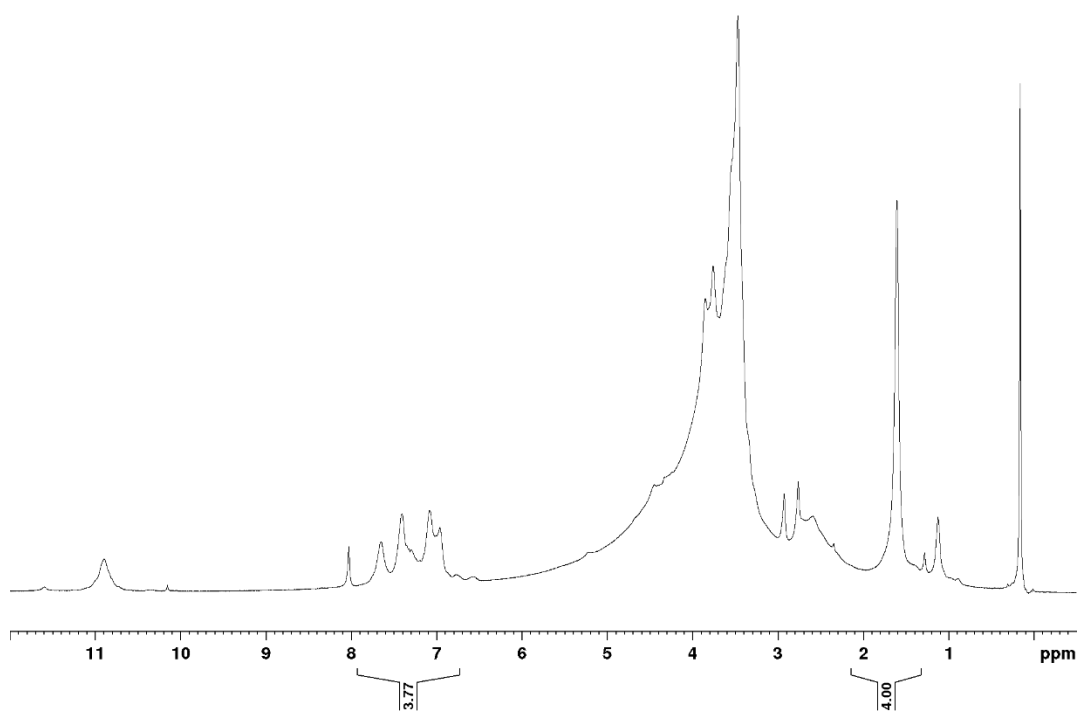


Figura 51 - Espectro ^1H HR-MAS do suporte IP5.

Após análise destes três espectros, foi realizada uma tabela para que os dados das integrações fossem mais facilmente analisados (Tabela 6).

Tabela 6 - Tabela resumo das integrações dos espectros ¹H HR-MAS dos três ligandos e as respectivas frações imobilizadas de cada ligando.

Suporte imobilizado com o ligando:	Integração CH ₂ -CH ₂ (correspondente a 4H)	Integração anel de indol (correspondente a 5H)	Densidade de ligando
IT3	4	0,74	0,15
IT4	4	2,76	0,55
IP5	4	3,77	0,75

Na tabela 1 pode também ser verificada a densidade de ligando imobilizada para cada um dos suportes, obtendo-se então os valores de 0,15, 0,55 e 0,75 para os ligandos IT3, IT4 e IP5, respetivamente. Estes valores foram obtidos pela divisão dos valores de integração do anel de indol por 5 (integração real do anel de indol, caso houvesse um molécula de indol ligada por cada molécula do espaçador imobilizado).

Caso se pretendam analisar os espectros de cada suporte em particular, estes podem ser consultados nos anexos de 7 a 19.

Com estes resultados podemos concluir que a fração de imobilização de ligando no suporte aumenta para cadeias de amins mais longas, podendo este facto estar associado a algum impedimento estereoquímico que ocorra durante a imobilização com amins de cadeias metilénicas menores, provocado pelo anel de indol.

As quantidades de ligando utilizadas na imobilização (IT3 - $3,2 \times 10^{-4}$ mol, 75 mg; IT4 - $1,45 \times 10^{-4}$ mol, 40 mg; $2,82 \times 10^{-4}$ mol, 90 mg) terão com certeza condicionado a quantidade de ligando que ficou imobilizado na Sepharose, no entanto as diferenças na reatividade das diferentes amins são também um fator a ter em conta.

Assumindo que a Sepharose ativada tem exatamente as mesmas características para as três reações de imobilização, e portanto tem a mesma percentagem de espaçador nos três casos, temos que no suporte com o ligando IT3 se utilizou o maior número de moles, mas este ligando tem a densidade mais baixa após a imobilização. O suporte com o ligando IT4, apesar de se ter utilizado um menor número de moles do que o IT3, menos de metade, obteve-se maior densidade de ligando em comparação a este último (um valor 4 vezes maior). Com o IP5 tem quase a mesma quantidade do que o IT3, e tem de facto uma maior densidade de ligando no final (um valor 5 vezes maior de que IT3).

Conclusões

O objetivo do trabalho foi sintetizar suportes cromatográficos através da imobilização de ligandos heterocíclicos derivados de indol na Sepharose para purificar estruturas de G-quadruplex ou plasmídeos contendo sequências ricas em guaninas formadoras de G-quadruplex. As estruturas do G-quadruplex estão presentes em abundância no genoma humano e estas são ricas em regiões de regulação génica e nas sequências repetitivas, como são os telómeros. Estas estruturas estão associadas a processos biológicos fundamentais, como é exemplo disso o processo de regulação da transcrição, replicação do DNA e estabilidade do genoma. Nos telómeros acontece um mecanismo de reparação ou reativação da telomerase que, em excesso, poderá provocar a tumorigénese, processo este que poderá ser bloqueado pela ação de ligandos que estabilizem a estrutura de G-quadruplex. Assim sendo, é notória a relevância síntese de ligandos que tenham a capacidade de se ligar e estabilizar estas estruturas, podendo, assim, funcionar como agentes anticancerígenos.

Para esse efeito foram sintetizados os compostos derivados de acridina e indol acoplados a poliaminas.

Foram sintetizados três ligandos derivados de acridina, os quais não vieram a ser posteriormente utilizados na imobilização, devido a problemas na purificação do produto final, que envolvia a eliminação dos grupos tosilo acoplados às amina.

A síntese de derivados de indol resultou na formação de três novos ligandos, o IT3 (31%), o IT4 (24%) e o IP5 (24%), os quais foram obtidos por condensação do indol-3-carboxaldeído com a dietilenotriamina, trietilenotetramina e tetraetilenopentamina, respetivamente. Estes compostos foram posteriormente analisados e caracterizados por espectroscopia de RMN.

A síntese dos suportes cromatográficos derivados de indol foi realizada por ativação da Sepharose com 1,4 - butanodiol diglicidil éter, formando-se grupos epóxidos e posterior ligação dos derivados de indol pelo grupo amina. Neste processo a maior limitação prendeu-se com o facto de os ligandos precipitarem a pH's superiores a 8,5. Por fim estes suportes foram estruturalmente caracterizados pela técnica de RMN de HR-MAS.

A análise dos suportes cromatográficos por espectroscopia de RMN de HR-MAS, permitiu comprovar a ligação dos derivados de indol na Sepharose. Através desta técnica foi ainda possível avaliar a densidade de ligando imobilizado em cada um dos casos. Obtiveram-se para os ligandos IT3, IT4 e IP5, valores de densidade de 0,15, 0,55 e 0,75, respetivamente. Concluiu-se que a fração de imobilização de ligando no suporte aumenta para cadeias de aminas mais longas, no entanto há que ter em conta a baixa solubilidade dos ligandos no passo de imobilização na Sepharose.

Perspetivas Futuras

Os ligandos sintetizados deverão ser também analisados por espectrometria de massa e por infravermelho (IV) para complementar a caracterização estrutural dos mesmos.

A síntese de novos ligandos derivados de outros compostos aromáticos, como é exemplo a fenazina, poderá ser considerada.

Estudos por dicroísmo circular necessitam ser efetuados para avaliar a capacidade que os ligandos sintetizados têm de interagir e estabilizar as estruturas do G-quadruplex.

Os suportes cromatográficos sintetizados deverão seguir para ensaios preliminares de cromatografia de afinidade para avaliar a capacidade de separação das isoformas de plasmídeos com sequências formadoras de G-quadruplex.

Estudos de viabilidade celular e atividade antiproliferativa dos ligandos sintetizados em linhas celulares cancerígenas.

Bibliografía

- Aguilar, J., Díaz, P., Escartí, F., García-Espaa, E., Gil, L., Soriano, C., & Verdejo, B. (2002). Cation and anion recognition characteristics of open-chain polyamines containing ethylenic and propylenic chains. *Inorganica Chimica Acta*, 339, 307-316.
- Amorim da Costa, a. M., Marques, M. P. M., & Batista de Carvalho, L. a E. (2003). Raman spectra of putrescine, spermidine and spermine polyamines and their N-deuterated and N-ionized derivatives. *Journal of Raman Spectroscopy*, 34(5), 357-366.
- Arora, A., Kumar, N., Agarwal, T., & Maiti, S. (2010). Retraction. Human telomeric G-quadruplex: targeting with small molecules. *The FEBS Journal*, 277(5), 1345.
- Artese, A., Costa, G., Ortuso, F., Parrotta, L., & Alcaro, S. (2013). Identification of new natural DNA G-quadruplex binders selected by a structure-based virtual screening approach. *Molecules*, 18(10), 12051-12070.
- Banerjea, D. (1979). *Coordination Chemistry*. (Elsevier, Ed.).
- Barluenga, J., Rodríguez, F., & Fañanás, F. J. (2009). Recent advances in the synthesis of indole and quinoline derivatives through cascade reactions. *Chemistry, an Asian Journal*, 4(7), 1036-1048.
- Bartoli, S., Bazzicalupi, C., Biagini, S., Borsari, L., Bencini, A., Faggi, E., ... Valtancoli, B. (2009). Cu(ii) complexation with an acridine-containing macrocycle. Assembly of water cluster chains within the cavity of tetranuclear metallomacrocycles. *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003)*, (7), 1223-1230.
- Bianchi, A., Garcia-espafia, E., Giusti, M., & Micheloni, M. (1987). Solution chemistry of macrocycles 5. Synthesis and Ligational Behavior toward Hydrogen and Copper(II) Ions of the LArge Polyazacycloalkane 1,4,7,10,13,16,19,22,25-Nonaazacycloheptacosane ([27]aneN₉). *Inorganic Chemistry*, 254(7), 681-684.
- Biradar, J. S., Sasidhar, B. S., & Parveen, R. (2010). Synthesis, antioxidant and DNA cleavage activities of novel indole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9), 4074-4078.
- Bochman, M. L., Paeschke, K., & Zakian, V. a. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews Genetics*, 13(11), 770-780.
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., & Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: Sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research*, 34(19), 5402-5415.

- Carole, D. G., Michel, D. M., Julien, C., Florence, D., Anna, N., Séverine, J., ... Jean-Pierre, G. (2005). Synthesis and antileishmanial activities of 4,5-di-substituted acridines as compared to their 4-mono-substituted homologues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(19), 5560-5568.
- Carvalho, L. R., Corvo, M. C., Enugala, R., Marques, M. M. B., & Cabrita, E. J. (2010). Application of HR-MAS NMR in the solid-phase synthesis of a glycopeptide using Sieber amide resin. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48, 323-330.
- Chiron, J., & Galy, J.-P. (2003). Reactivity of the Acridine Ring: One-Pot Regioselective Single and Double Bromomethylation of Acridine and Some Derivatives. *Synlett*, (15), 2349-2350.
- Clares, M. P., Aguilar, J., Aucejo, R., Lodeiro, C., Albelda, M. T., Pina, F., Lima J. C., Parola A. J., Pina J., de Melo j. S., Soriano C., Garcia-Espana E. (2004). Synthesis and H⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ Coordination Behavior of a Bis (fluorophoric) Bibrachial Lariat Aza-Crown. *Inorganic Chemistry*, 43(19), 6114-6122.
- Collie, G., & Parkinson, G. (2011). The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines., 40, 5867-5892.
- Collie, G. W., Promontorio, R., Hampel, S. M., Micco, M., Neidle, S., & Parkinson, G. N. (2012). Structural basis for telomeric G-quadruplex targeting by naphthalene diimide ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 134(5), 2723-2731.
- Cross, D., & Burmester, J. K. (2006). Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clinical Medicine & Research*, 4(3), 218-227.
- Cuatrecasas, P. (1970). Protein Purification by Affinity Chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(12), 3059-3065.
- Cuatrecasas, P., & Anfinsen, C. B. (1971). Affinity chromatography. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 59, 157-168.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., & Anfinsen, C. B. (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(2), 636-643.
- Dash, J., Nath Das, R., Hegde, N., Pantoå, G. D., Shirude, P. S., & Balasubramanian, S. (2012). Synthesis of bis-indole carboxamides as G-quadruplex stabilizing and inducing ligands. *Chemistry - A European Journal*, 18(2), 554-564.

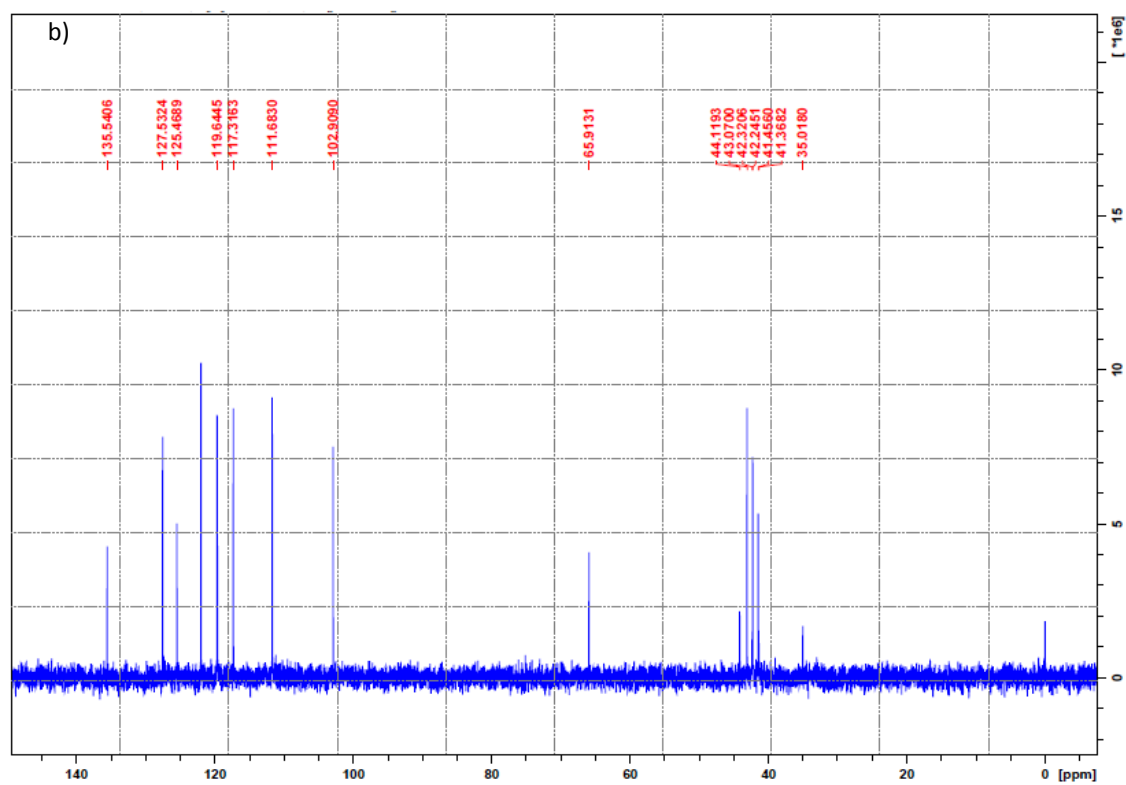
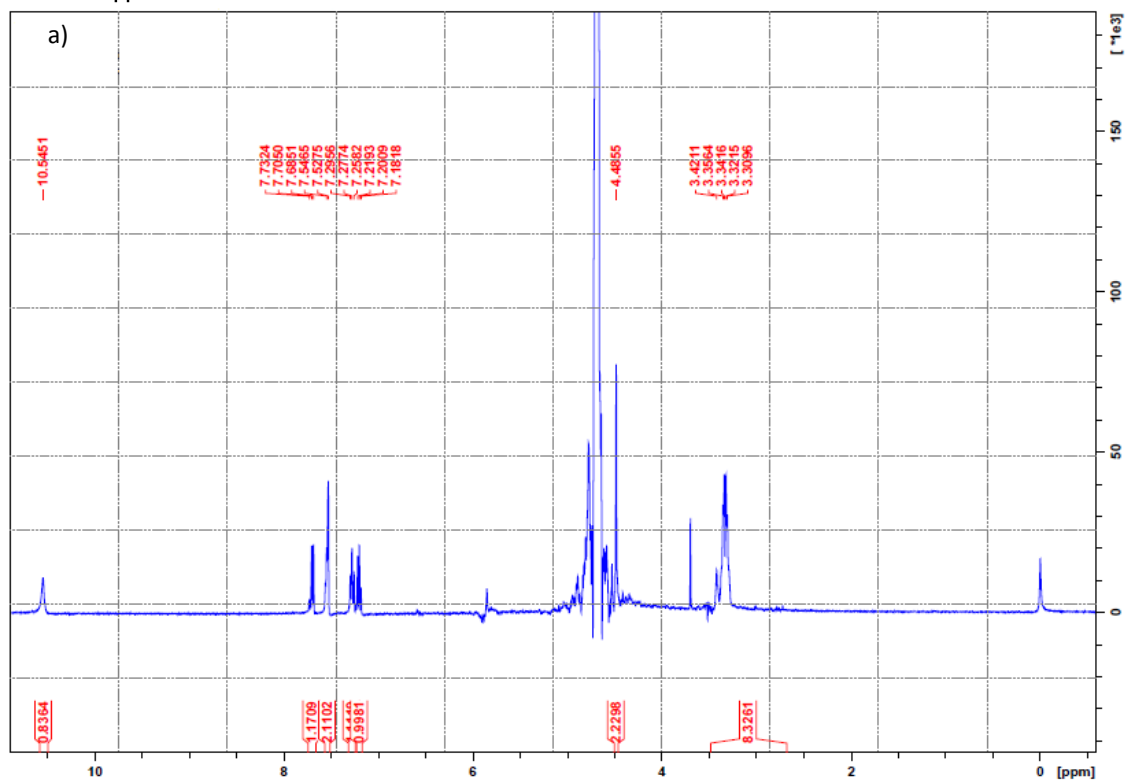
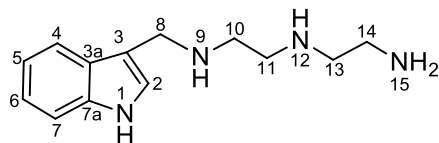
- Dash, J., Shirude, P. S., & Balasubramanian, S. (2008). G-quadruplex recognition by bis-indole carboxamides. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (26), 3055-3057.
- Demeunynck, M., Charmantray, F., & Martelli, a. (2001). Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design*, 7(17), 1703-1724.
- Deshmukh, A. P., Simpson, A. J., & Hatcher, P. G. (2003). Evidence for cross-linking in tomato cutin using HR-MAS NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, 64(6), 1163-1170.
- Edelman, D. C. (2010). Branding in the digital age: You're spending your money in all the wrong places. *Harvard Business Review*, 88(12), 430-443.
- Gellert, M., Lipsett, M., & Davies, D. (1962). Helix formation by guanylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(12), 2013-2018.
- Georgiades, S. N., Abd Karim, N. H., Suntharalingam, K., & Vilar, R. (2010). Interaction of metal complexes with G-quadruplex DNA. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(24), 4020-4034.
- Guédin, A., Gros, J., Alberti, P., & Mergny, J. L. (2010). How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. *Nucleic Acids Research*, 38(21), 7858-7868.
- Hahn, R., Podgomik, a., Merhar, M., Schallaun, E., & Jungbauer, a. (2001). Affinity monoliths generated by in situ polymerization of the ligand. *Analytical Chemistry*, 73(21), 5126-5132.
- Haider, S. M., Neidle, S., & Parkinson, G. N. (2011). A structural analysis of G-quadruplex/ligand interactions. *Biochimie*, 93(8), 1239-1251.
- Hardin, C. C., Watson, T., Corregan, M., & Bailey, C. (1992). Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry*, 31(3), 833-841.
- Healthcare, G. E. (2007). *Affinity chromatography: Principles and Methods*.
- Hediger, M., & Kaden, T. a. (1978). Synthesis and metal complexes of mono-N-substituted tetraazamacrocycles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 45(1), 14.
- Huppert, J. L., & Balasubramanian, S. (2005). Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Research*, 33(9), 2908-2916.
- Kaur, J., & Singh, P. (2011). Acridine derivatives : a patent review (2009-2010), 21(4) 437-454.

- König, S. L. B., Evans, A. C., & Huppert, J. L. (2010). Seven essential questions on G-quadruplexes. *BioMolecular Concepts*, 1(2), 197-213.
- Lam, E. Y. N., Beraldi, D., Tannahill, D., & Balasubramanian, S. (2013). G-quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. *Nature Communications*, 4, 1796.
- Lerman, L. S. (1963). the Structure of the Dna-Acridine Complex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 49(1), 94-102.
- Li, Z., Zhu, A., & Yang, J. (2012). One-Pot Three-Component Mild Synthesis of 2-Aryl-3-(9-alkylcarbazol-3-yl)thiazolin-4-ones. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 49, 1458-1461.
- Liu, J., Guo, L., Yin, F., Zheng, X., Chen, G., & Wang, Y. (2008). Characterization and antitumor activity of triethylene tetramine, a novel telomerase inhibitor. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 62(7), 480-485.
- Ma, D.-L., Zhang, Z., Wang, M., Lu, L., Zhong, H.-J., & Leung, C.-H. (2015). Recent Developments in G-Quadruplex Probes. *Chemistry & Biology*, 22, 1-17.
- Marcus, L., & Balbinder, E. (1972). Use of Affinity Matrices in Determining Steric Requirements for Substrate Binding. *Analytical Biochemistry*, 48, 448-459.
- Michaelidou, S. S., & Koutentis, P. a. (2010). Detosylation of 3-amino-1-tosylindole-2-carbonitriles using DBU and thiophenol. *Tetrahedron*, 66(16), 3016-3023.
- Monchaud, D., & Teulade-Fichou, M.-P. (2008). A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6(4), 627-636.
- Neidle, S. (2010). Human telomeric G-quadruplex: The current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *FEBS Journal*, 277(5), 1118-1125.
- Oakey, L., & Mulcahy, P. (2004). Immobilized cofactor derivatives for kinetic-based enzyme capture strategies: Direct coupling of NAD(P)⁺. *Analytical Biochemistry*, 335(2), 316-325.
- Ou, T., Lu, Y., Tan, J., Huang, Z., Wong, K., & Gu, L. (2008). G-quadruplexes: targets in anticancer drug design. *ChemMedChem*, 3(5), 690-713.
- Parkinson, G. N., Lee, M. P. H., & Neidle, S. (2002). Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature*, 417(6891), 876-880.
- Phan, a. T. (2010). Human telomeric G-quadruplex: Structures of DNA and RNA sequences. *FEBS Journal*, 277(5), 1107-1117.

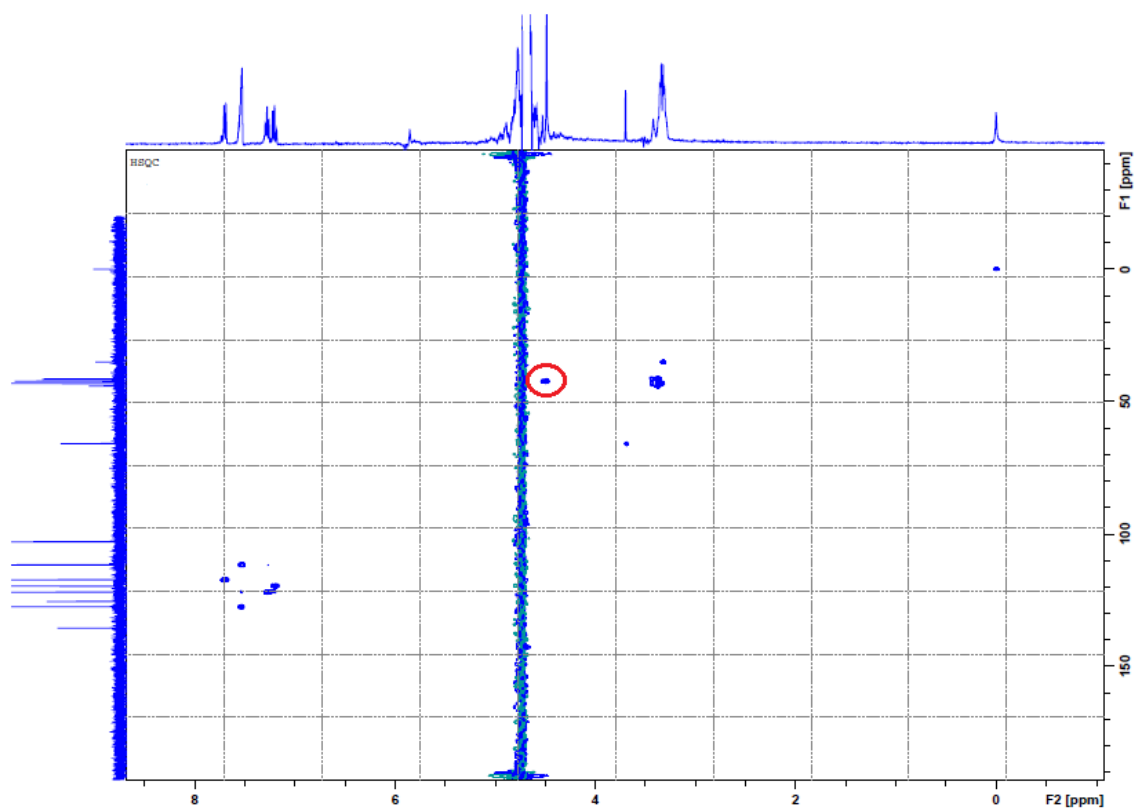
- Qian, L. (2015). G-Quadruplex Ligands Database. Retrieved August 2, 2015, from <http://www.g4ldb.org/ci2/index.php>
- Sattin, G., Artese, A., Nadai, M., Costa, G., Parrotta, L., Alcaro, S., ... Richter, S. N. (2013). Conformation and stability of intramolecular telomeric G-quadruplexes: Sequence effects in the loops. *PLoS ONE*, 8(12), 1-16.
- Schmidt A., Liu M. (2015). Recent Advances in the Chemistry of 1,3-Oxazines. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 115.
- Sen, D., & Gilbert, W. (1991). The structure of telomeric DNA: DNA quadruplex formation. *Current Opinion in Structural Biology*, 1(3), 435-438.
- Simpson, a J., Kingery, W. L., Shaw, D., Spraul, M., Humpfer, E., & Dvortsak, P. (2001). The application of ¹H HR-MAS NMR spectroscopy for the study of structures and associations of organic components at the solid-aqueous interface of a whole soil. *Envir.Sci.Tech.*, 35(16), 3321-3325.
- Sinha, D., Tiwari, A. K., Singh, S., Shukla, G., Mishra, P., Chandra, H., & Mishra, A. K. (2008). Synthesis, characterization and biological activity of Schiff base analogues of indole-3-carboxaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(1), 160-165.
- Sparapani, S. (2006). *Synthesis of G-quadruplex ligands as potential telomerase inhibitors*. Università degli Studi di Camerino.
- Sun, D., & Hurley, L. H. (2009). The importance of negative superhelicity in inducing the formation of G quadruplex. *J Med Chem.*, 52(9), 2863-2874.
- Sundberg, L., & Porath, J. (1974). Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. *Journal of Chromatography*, 90, 87-98.
- Uy, R., & Wold, F. (1977). 1,4-Butanediol diglycidyl ether coupling of carbohydrates to Sepharose: affinity adsorbents for lectins and glycosidases. *Analytical Biochemistry*, 81(1), 98-107.
- Venczel, E. a, & Sen, D. (1993). Parallel and antiparallel G-DNA structures from a complex telomeric sequence. *Biochemistry*, 32(24), 6220-6228.
- Webba Da Silva, M. (2007). Geometric formalism for DNA quadruplex folding. *Chemistry - A European Journal*, 13(35), 9738-9745.

- Wheatley, J. B., & Schmidt, D. E. (1999). Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. *Journal of Chromatography A*, 849(1), 1-12.
- Wong, a., & Wu, G. (2003). Selective binding of monovalent cations to the stacking G-quartet structure formed by guanosine 5'-monophosphate: A solid-state NMR study. *Journal American Chemical Society*, 125(10), 13895-13905.
- Wu, X., Xu, P., Wang, J., Xu, Y., & Fu, T. (2015). Advance in Structural Bioinformatics, 827, 123-141.
- Zhang, B., Li, X., Li, B., Gao, C., & Jiang, Y. (2014). Acridine and its derivatives: a patent review (2009 - 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(6), 647-664.

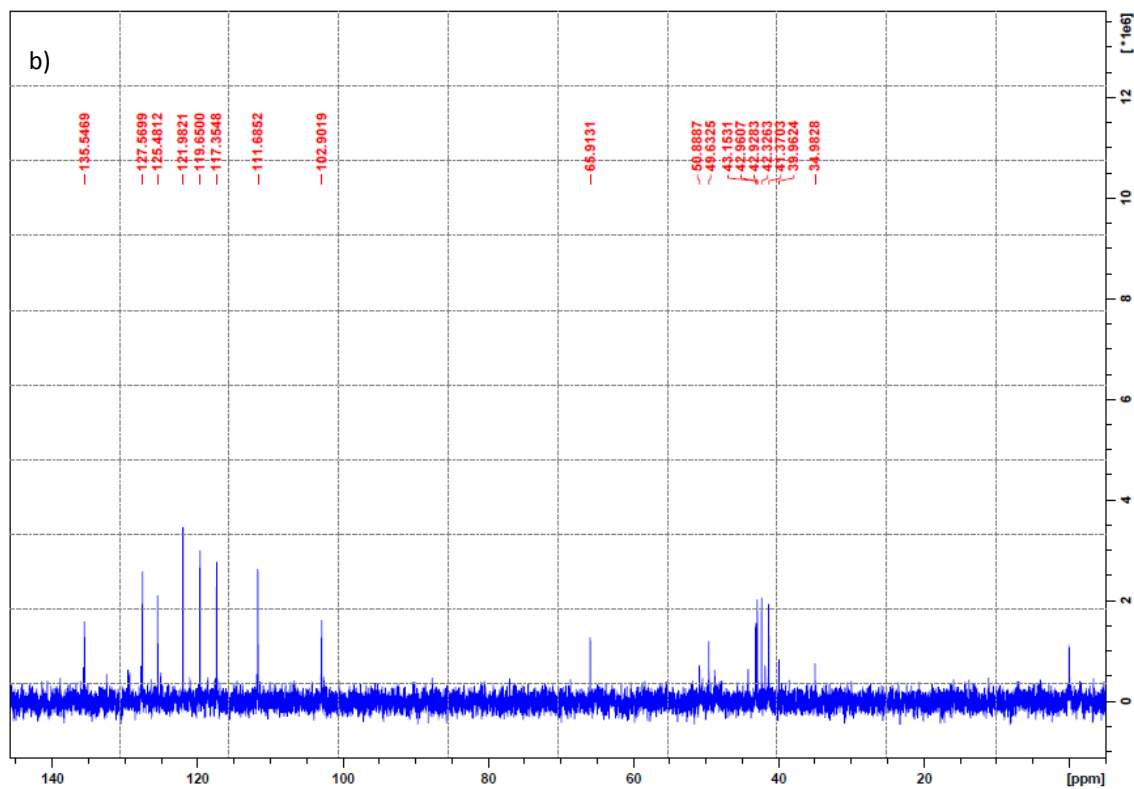
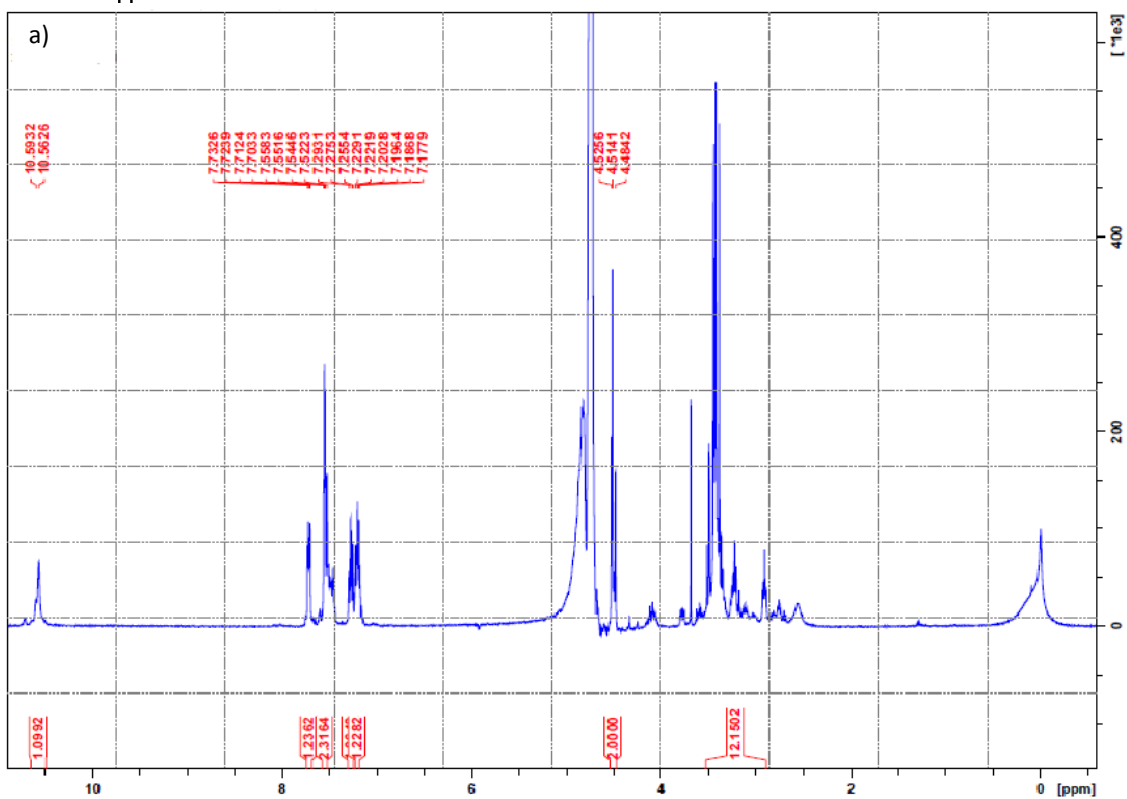
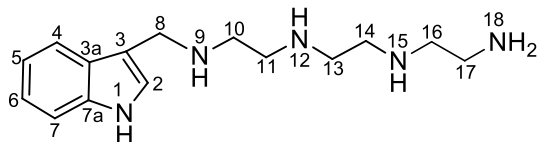
Anexos



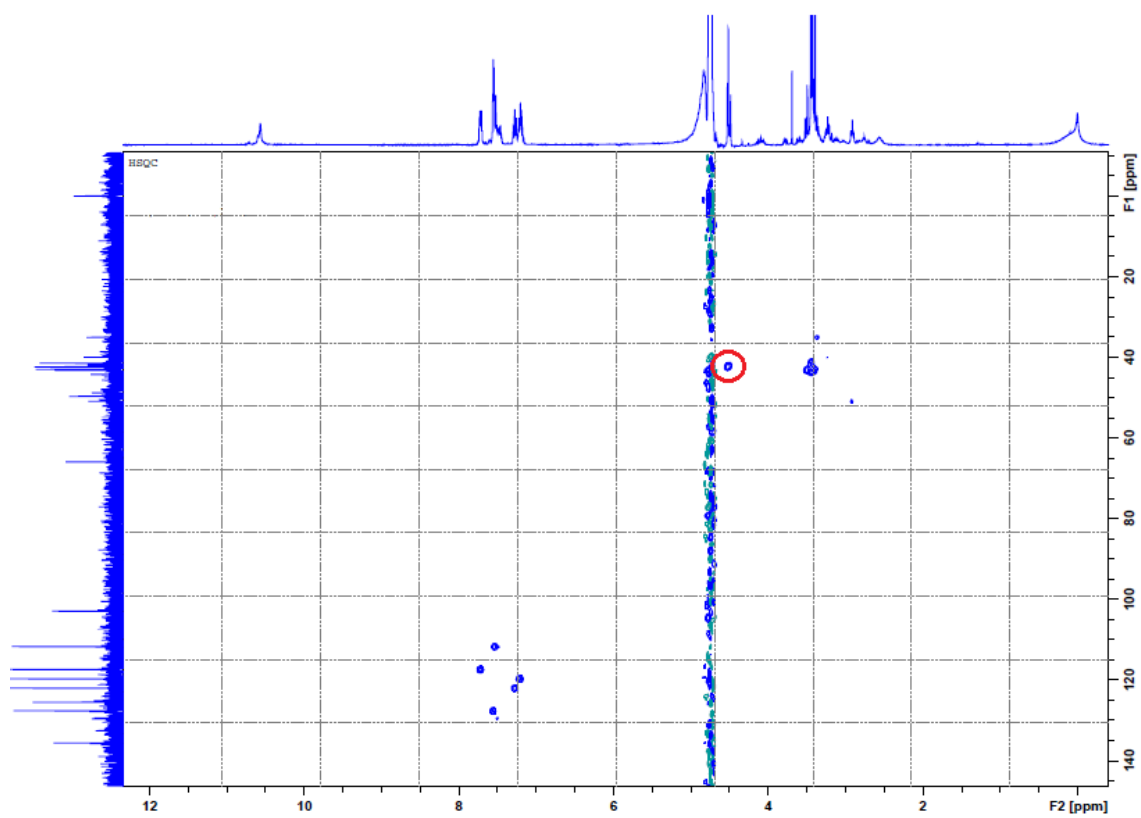
Anexo 1 - Espectros de RMN do ligando IT3 em D₂O, a 25°C. a) Espectro de RMN de ¹H; b) Espectro de RMN de ¹³C.



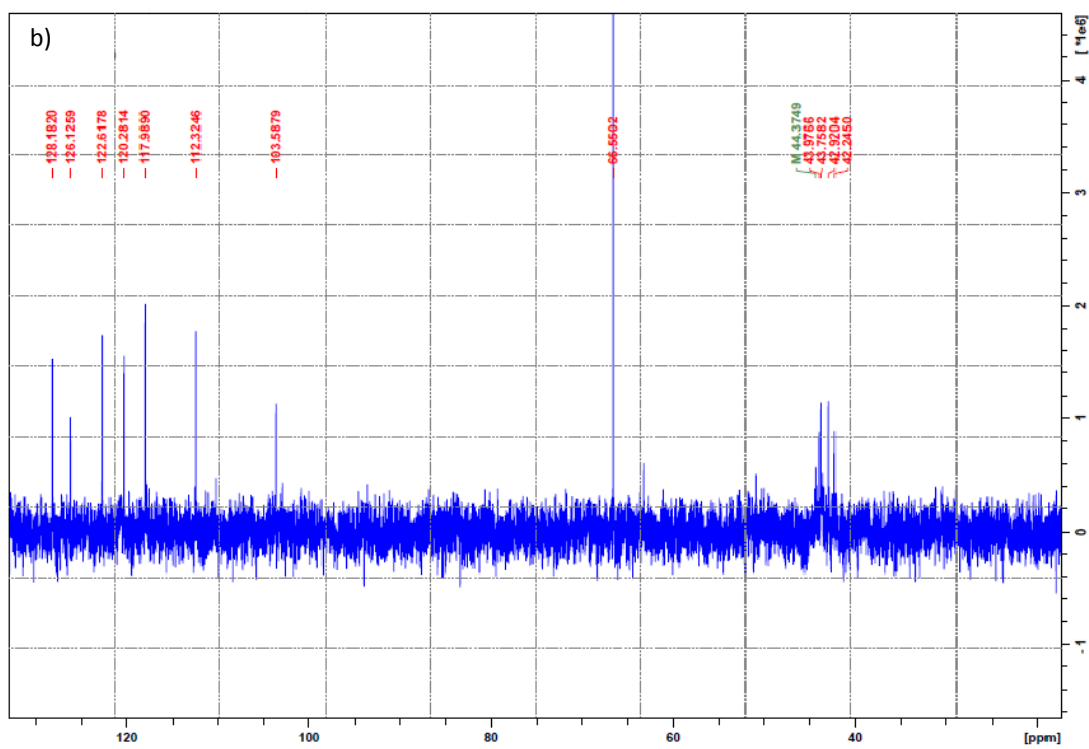
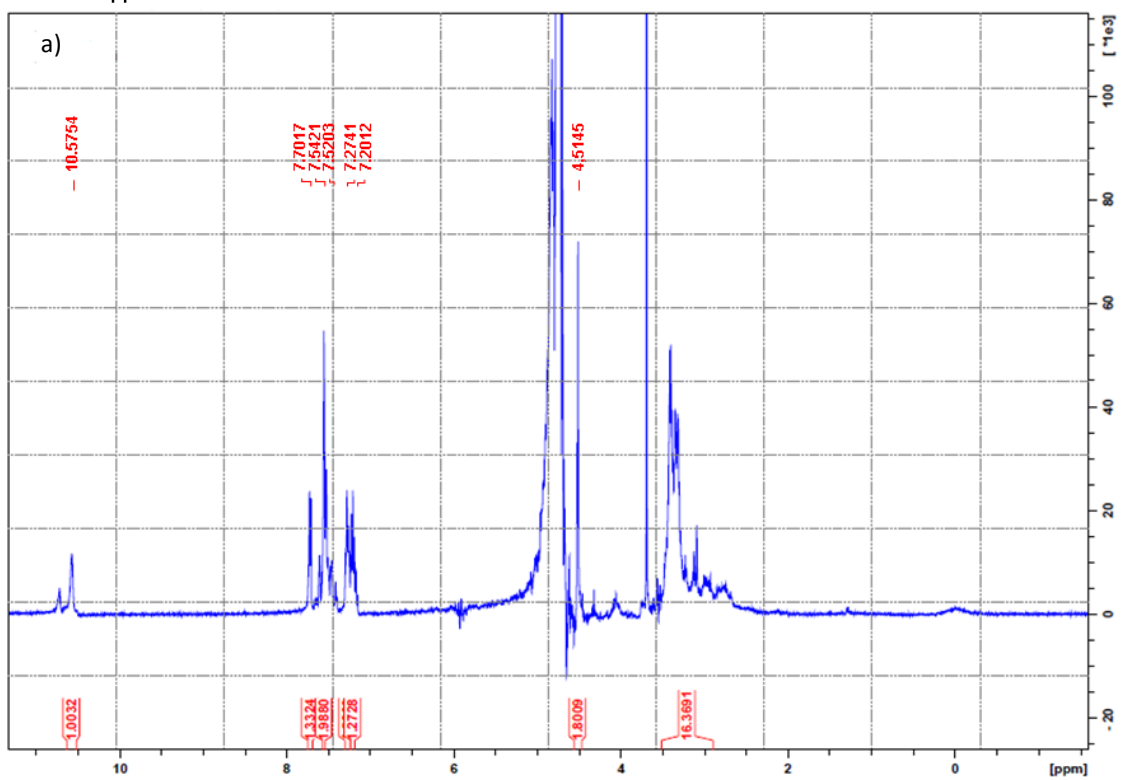
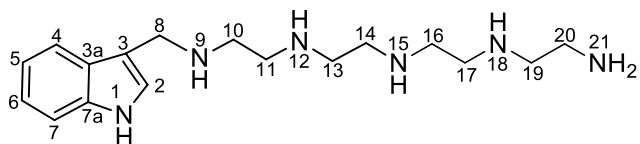
Anexo 2 - Espectro de RMN de HSQC do ligando IT3 em D₂O, a 25°C. A zona circundada a vermelha é referente à ligação entre o próton e carbono da posição 8.



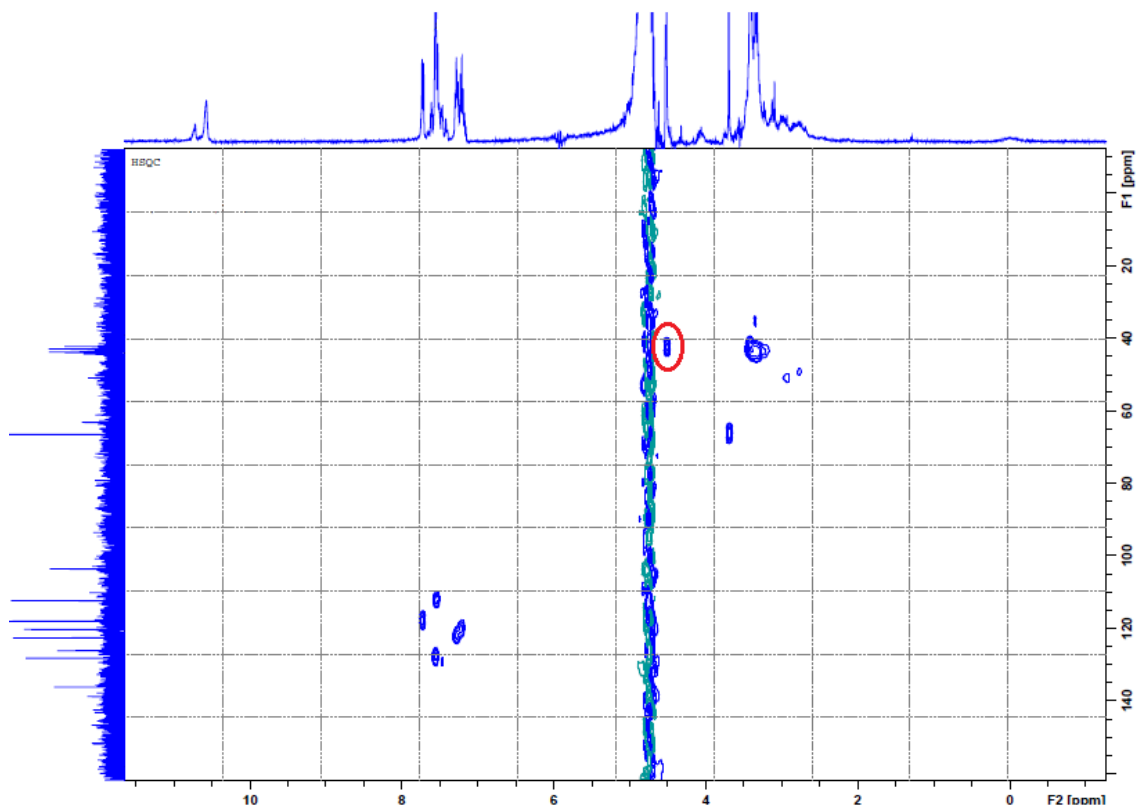
Anexo 3 - Espectros de RMN do ligando IT4 em D₂O, a 25°C. a) Espectro de RMN de ¹H; b) Espectro de RMN de ¹³C.



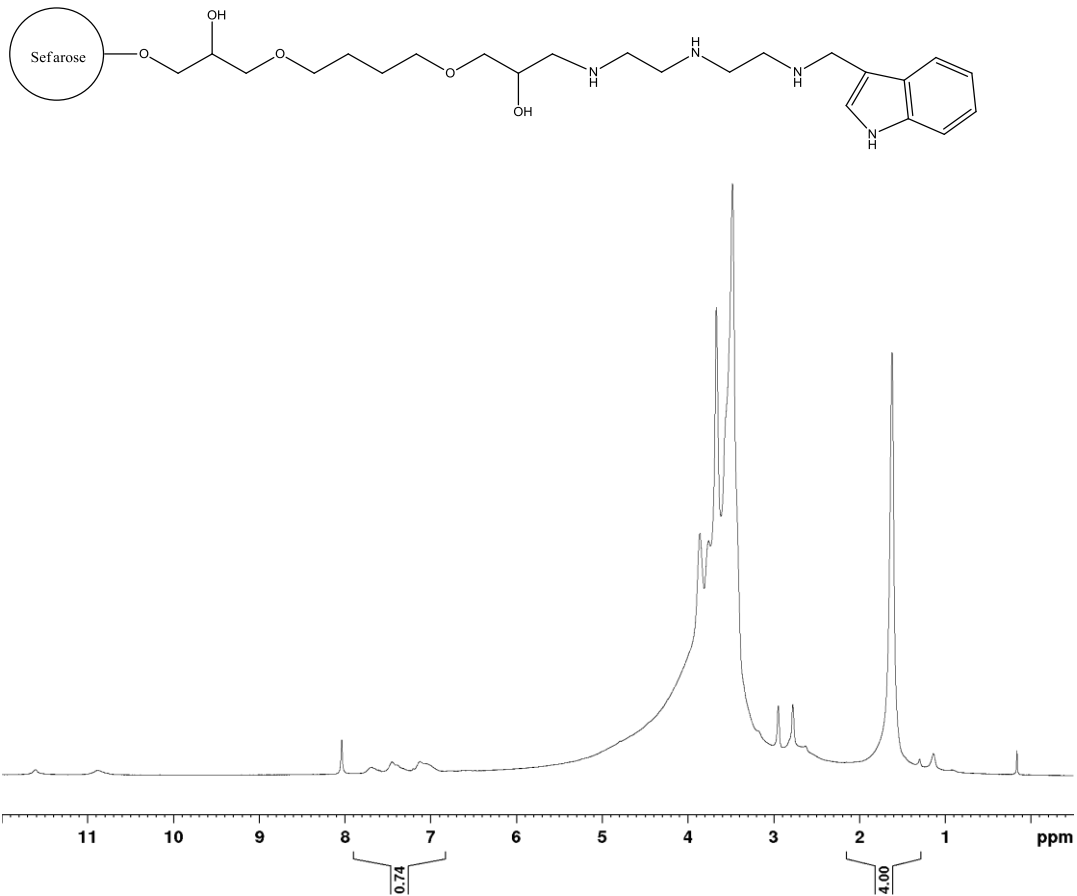
Anexo 4 - Espectro de RMN de HSQC do ligando IT4 em D₂O, a 25°C. A zona circundada a vermelha é referente à ligação entre o próton e carbono da posição 8.



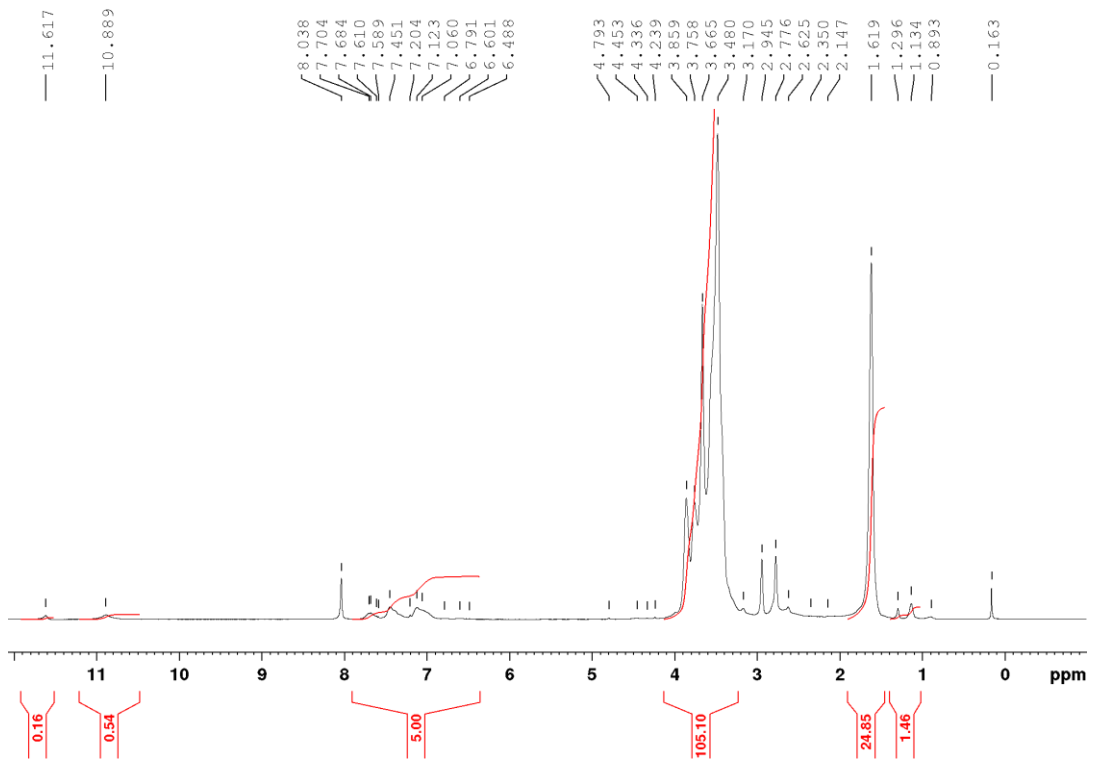
Anexo 5 - Espectros de RMN do ligando IP5 em D₂O, a 25°C. a) Espectro de RMN de ¹H; b) Espectro de RMN de ¹³C.



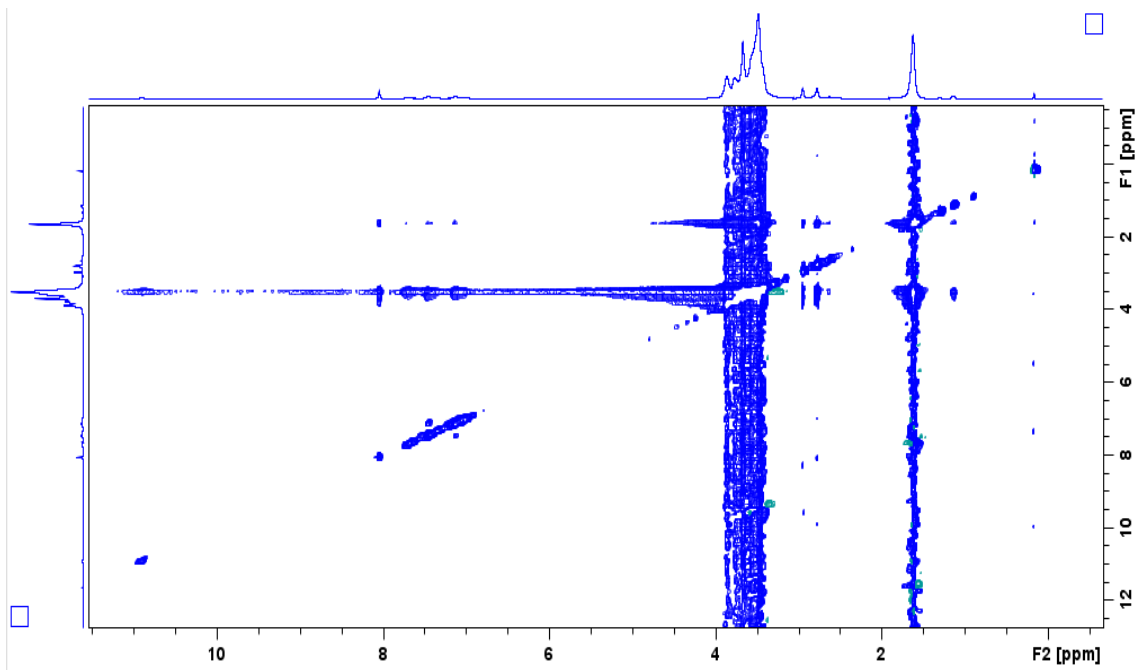
Anexo 6 - Espectro de RMN de HSQC do ligando IP5 em D₂O, a 25°C. A zona circundada a vermelha é referente à ligação entre o próton e carbono da posição 8.



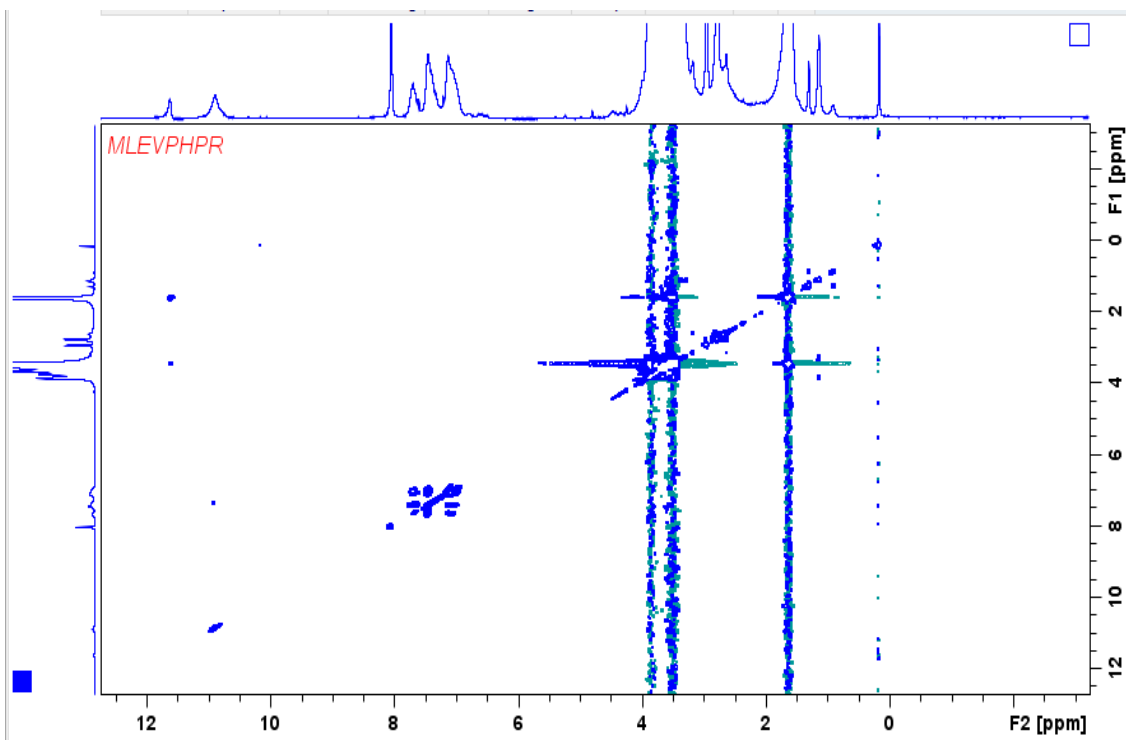
Anexo 7 - Espectro ¹H HR-MAS do suporte IT3.



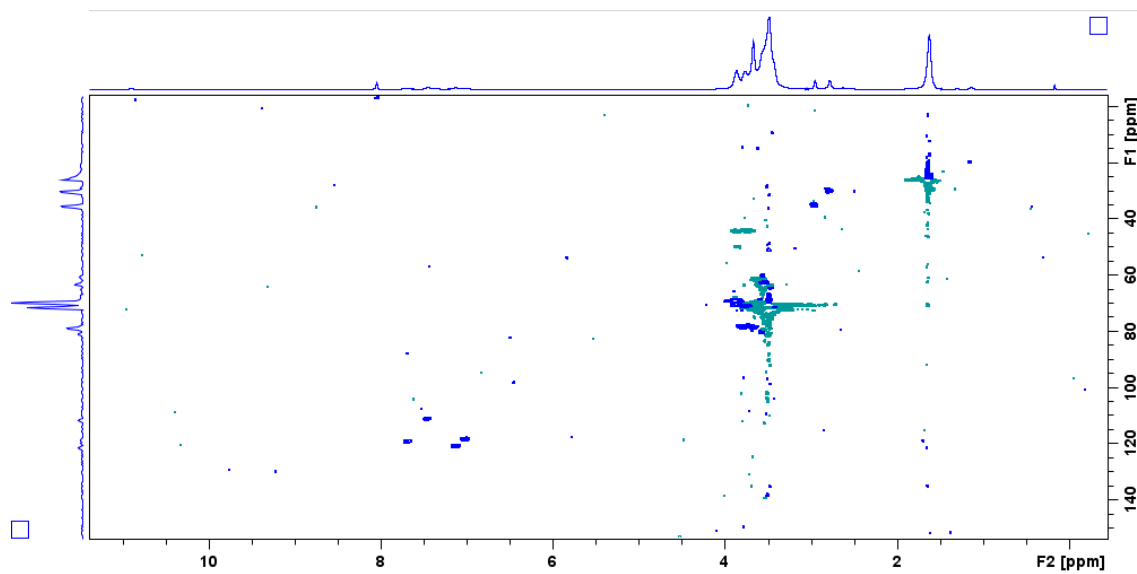
Anexo 8 - Espectro CPMG ¹H HR-MAS do suporte IT3.



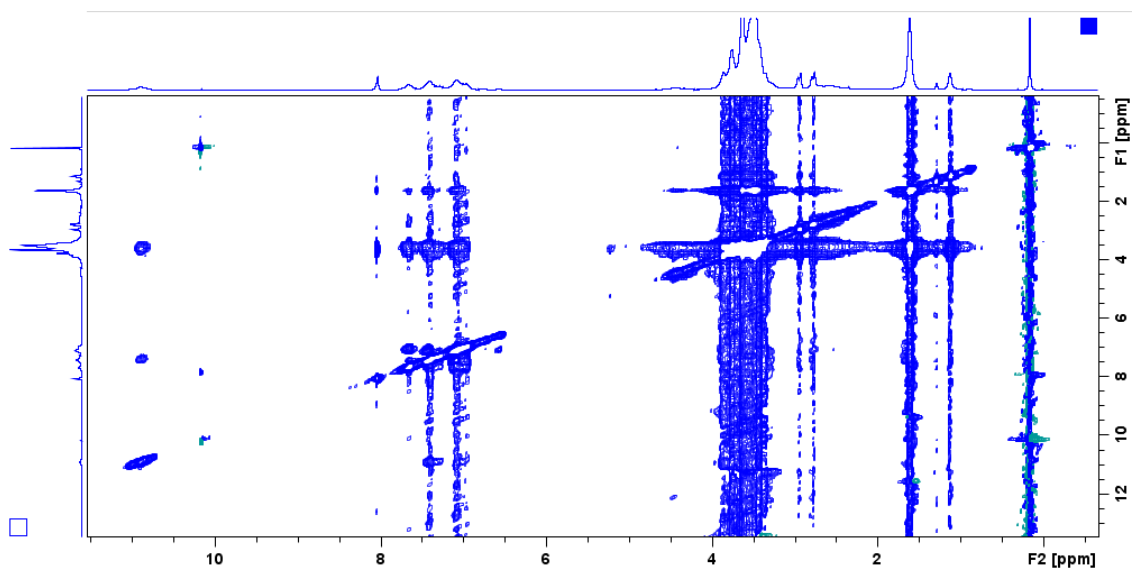
Anexo 9 - Espectro 2D NOESY do suporte IT3.



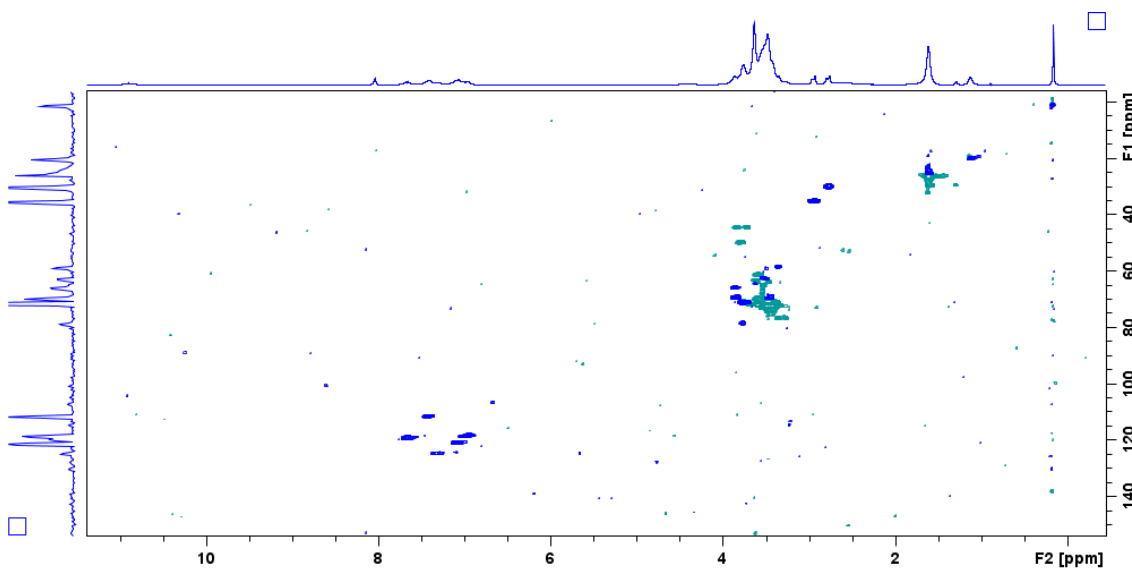
Anexo 10 - Espectro 2D TOCSY do suporte IT3.



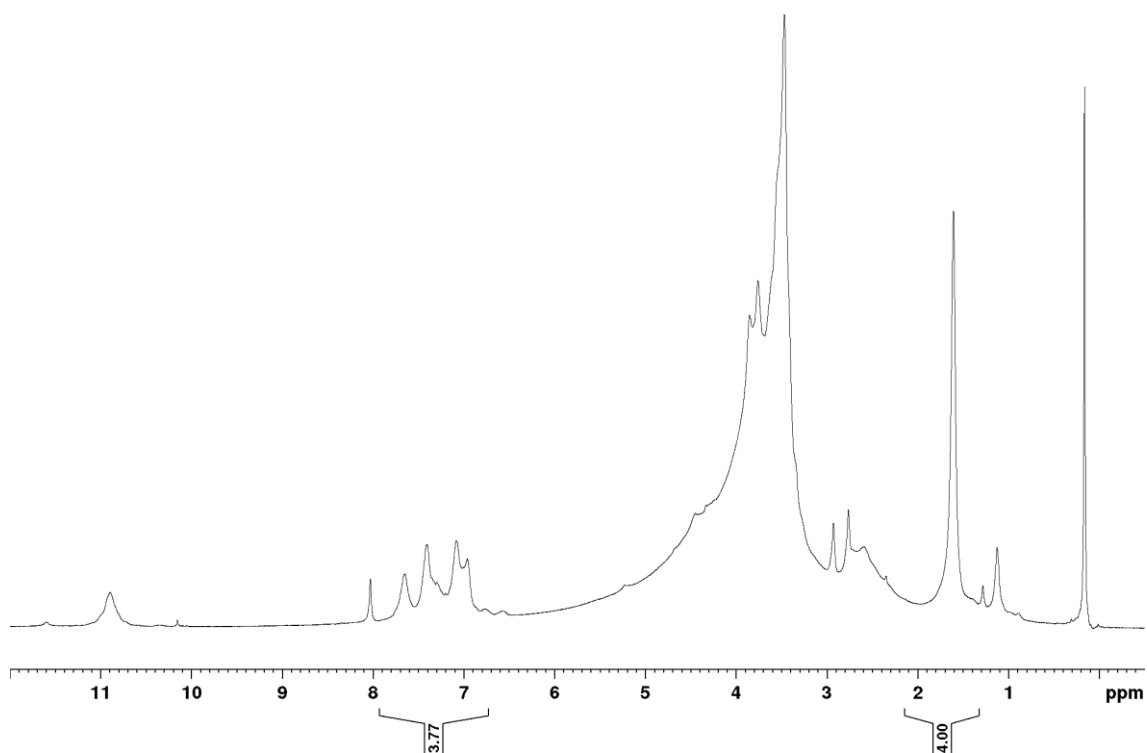
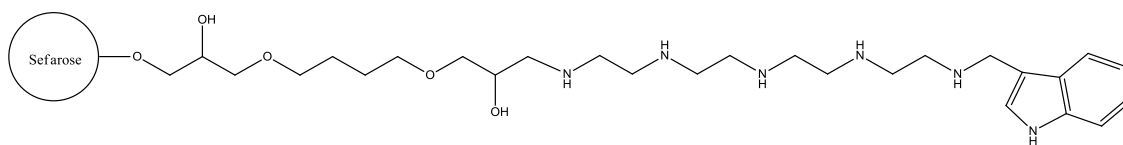
Anexo 11 - Espectro HSQC-DEPT do suporte IT3.



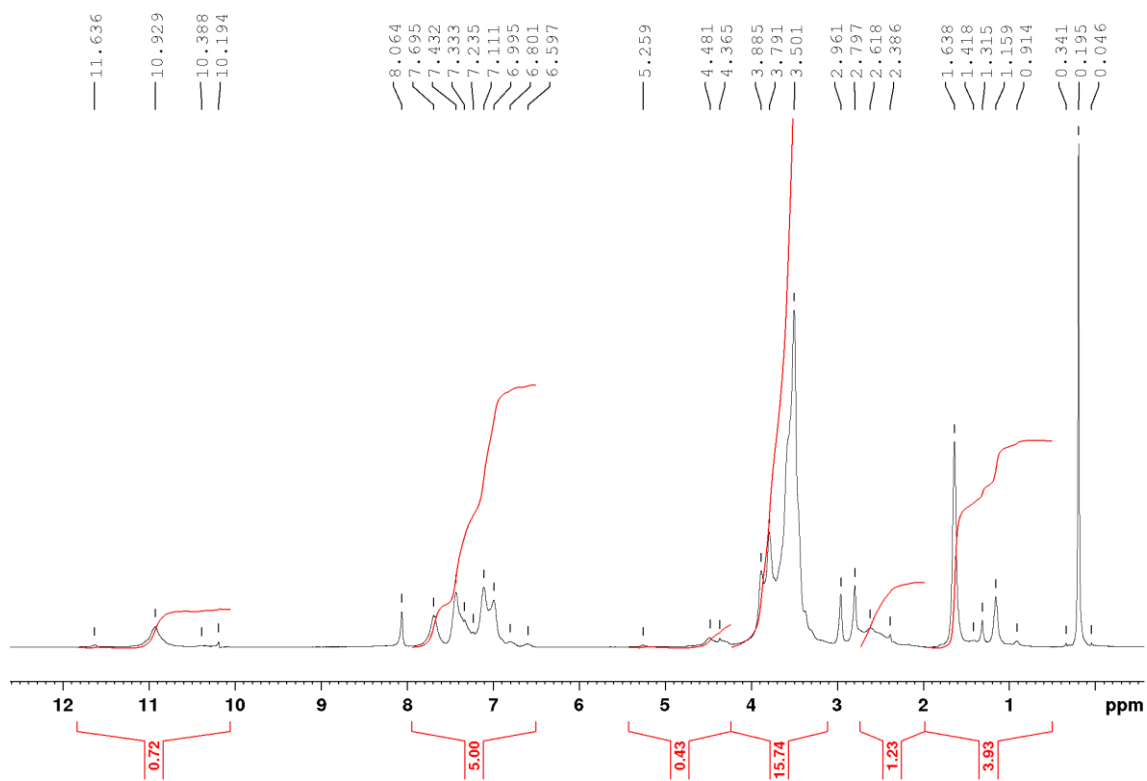
Anexo 14 - Espectro 2D NOESY do suporte IT4.



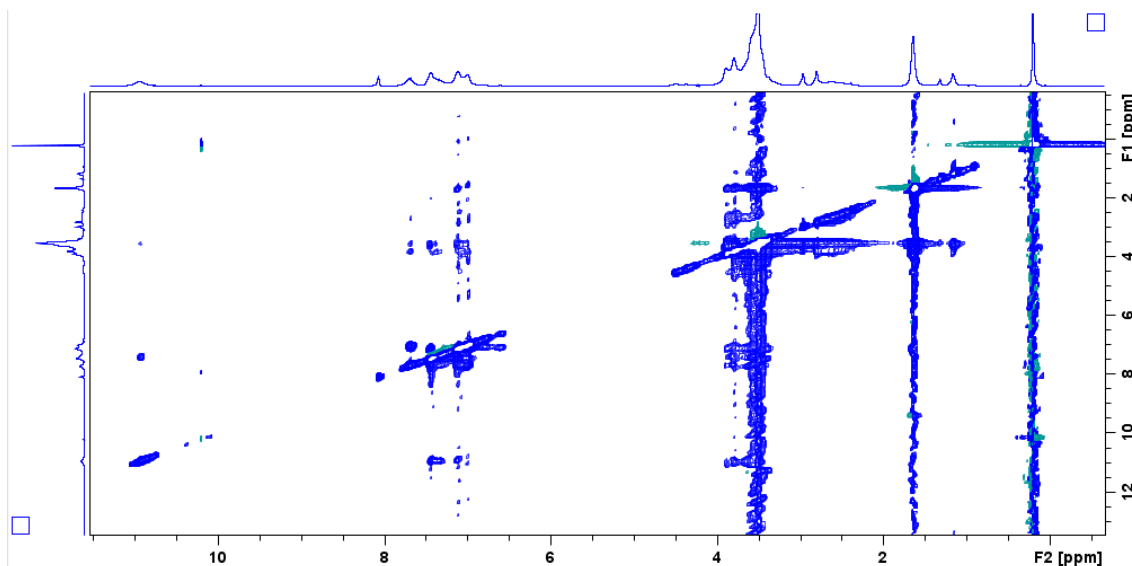
Anexo 15 - Espectro HSQC-DEPT do suporte IT4.



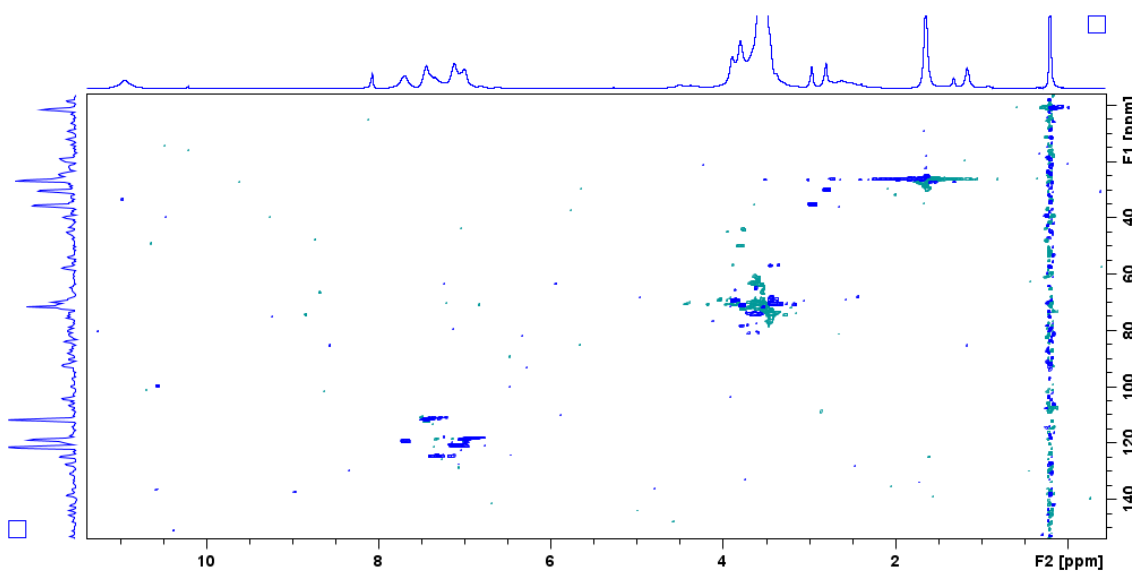
Anexo 16 - Espectro ^1H HR-MAS do suporte IP5.



Anexo 17 - Espectro CPMG ^1H HR-MAS do suporte IP5.



Anexo 18 - Espectro 2D NOESY do suporte IP5.



Anexo 19 - Espectro HSQC-DEPT do suporte IP5.