

Síntese e propriedades de sacarinos com aplicação em Química Terapêutica

Bruno Miguel Fernandes de Jesus

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2019



Síntese e propriedades de sacarinos com aplicação em Química Terapêutica

Bruno Miguel Fernandes de Jesus

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

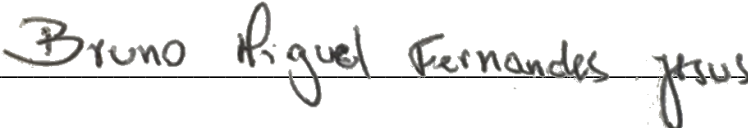
Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2019

Síntese e propriedades de sacarinos com aplicação em Química Terapêutica

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.



Faro, 30 de Setembro de 2019

Copyright © 2019 Bruno Miguel Fernandes de Jesus

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho, através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repósitos científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero deixar o meu maior agradecimento à minha orientadora, a Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano, que prontamente se disponibilizou para guiar esta dissertação e me facultou a possibilidade de realizar o trabalho experimental no seu laboratório e incorporar um dos seus projetos de investigação. Quero agradecer toda a dedicação, palavras de incentivo, conhecimento científico transmitido e atenção dada ao mais ínfimo pormenor para que este trabalho ficasse o melhor possível.

À Professora Doutora Luísa Custódio, que se comprometeu a ajudar no trabalho experimental contribuindo para enriquecimento da minha dissertação.

Ao Bruno Guerreiro, meu parceiro de laboratório, quero agradecer todo o companheirismo, apoio e ensinamentos transmitidos.

À Lília Cabral e à Maria Rodrigues que me orientaram em fases distintas no trabalho experimental, quero agradecer toda a disponibilidade e ensinamentos durante a minha jornada no laboratório.

À Universidade do Algarve e a todos os docentes que lecionam no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, por me terem proporcionado um estudo individualizado e diferenciador, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos serviços farmacêuticos do Centro Hospitalar Universitário do Algarve – Hospital de Faro e à equipa de trabalho da Farmácia Crespo Santos, por me terem facultado uma oportunidade de estágio curricular, toda a simpatia e ensinamentos transmitidos.

À minha família, principalmente aos meus pais, por todo o apoio e esforços realizados dia-a-dia em prol da minha educação.

Um especial agradecimento à Joana, por todas as palavras de incentivo e apoio incondicional.

A todos aqueles que se cruzaram no meu percurso académico e que contribuíram para a concretização deste objetivo.

A todos, muito obrigado!

Resumo

A sacarina, 3-oxo-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido, é usada como edulcorante desde 1887. Vários estudos associam a estabilidade térmica e fotoquímica do sistema benzisotiazolílico e as propriedades deste sistema em química de coordenação com o potencial da sacarina e sacarinos para aplicações em química terapêutica.

A síntese e otimização estrutural de ligandos multidentados baseados em sacarinos é enriquecida pela possibilidade de o sistema benzisotiazolílico poder ligar-se a outros heterociclos, através de grupos funcionais selecionados, recorrendo a estratégias de síntese convergente.

Com a evidência de que a progressão tumoral requer uma maior concentração de cobre (II) do que a presente em tecidos normais, a capacidade quelante seletiva para o cobre (II) de conjugados multidentados baseados em sacarinos, associada à toxicidade negligenciável dos ligandos quando testados em linhagens celulares tumorais, suscitou especial interesse. Ademais ao contrário dos ligandos, os correspondentes complexos de cobre (II) exibiram elevadas citotoxicidades elevadas.

No âmbito do trabalho descrito nesta dissertação, pretendeu-se ampliar a biblioteca de sacarinos com as características acima descritas e aprofundar o conhecimento das propriedades de cada uma das moléculas, com o objetivo de explorar potenciais aplicações farmacológicas.

É reportada a síntese de conjugados tetrazole-sacarinato e tiadiazole-sacarinato, a avaliação espectrofotométrica *in vitro* da capacidade dos ligandos multidentados para coordenação com metais de transição, através da utilização de indicadores de quelação seletiva que produzem complexos coloridos, e das suas propriedades antioxidantes, recorrendo aos métodos de atividade de eliminação radicalar e do poder antioxidante férrico.

Os sacarinos testados evidenciaram elevada eficácia e seletividade como quelantes de cobre (II), em detrimento de ferro (II) e cálcio (II). Os resultados mostram também que as estruturas dos ligandos TSMT e MTSB são favoráveis à atividade de eliminação radicalar para DPPH, ABTS e NO.

O trabalho descrito foi realizado no CCMar, com apoio dos projetos UID/Multi/04326/2019 (Centre of Marine Sciences - CCMAR) e *PTDC/EEI-AUT/5442/2014, INNOVATE*.

Palavras-chave: Sacarinos; Sistema benzisotiazolífico; química de coordenação; quelação seletiva; atividade de eliminação radicalar; poder antioxidante férrico

Abstract

Saccharin, 3-oxo-1,2-benzisothiazole-1,1-dioxide, has been used as sweetener since 1887. Several studies associate the thermal and photochemical stability of the benzisothiazolyl system and the properties of this system in coordination chemistry with the potential of saccharin and saccharinates for therapeutic applications.

The synthesis and structural optimization of saccharinate-based multidentate ligands is enriched by the possibility that the benzisothiazolyl system can bind to other heterocycles through selected functional groups, using convergent synthesis strategies.

The evidence that tumor progression requires a higher copper (II) concentration than that present in normal tissues, the copper (II) selective chelating ability of saccharinate-based multidentate conjugates, associated with negligible ligand toxicity when tested in tumor cell lines, stimulated research. Moreover, unlike ligands, the corresponding copper (II) complexes exhibited high cytotoxicities.

In the scope of the work described in this dissertation it was intended to expand the saccharinate library with the characteristics described above and to deepen the knowledge of the properties of each of the molecules, in order to explore potential pharmacological applications.

We report the synthesis of tetrazole saccharinates and thiadiazole saccharinates, in vitro spectrophotometric evaluation of their ability to coordinate with transition metals, using selective chelation indicators that produce colored complexes, and assessment of their antioxidant properties, using the radical elimination activity methods and ferric antioxidant power.

The saccharinates tested showed high efficacy and selectivity as copper (II) chelators, in detriment of iron (II) and calcium (II). The results also show that the structures of the TSMT and MTSB ligands are favorable for radical scavenging activity, for DPPH, ABTS and NO.

This work described herein was carried out at Center of Marine Sciences – CCMAR and supported by projects UID / Multi / 04326/2019 and PTDC / EEI-AUT / 5442/2014 (INNOVATE).

Keywords: Saccharins; benzisothiazolyl-based conjugates; coordination chemistry; selective chelation; radical scavenging activity; ferric reducing antioxidant power

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice Geral	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas.....	xix
1 – Introdução	1
1.1– Sacarina e sacarinos	1
1.1.1 – Sacarina: propriedades e aplicações	1
1.1.2 – Sacarina: síntese.....	3
1.1.3 – Sacarina: propriedades físico-químicas	4
1.1.4 – Complexos metálicos baseados em sacarina.....	5
1.1.4.1 – Complexos de coordenação monodentada com doação pelo azoto	7
1.1.4.2 – Complexos de coordenação monodentada com doação pelo oxigénio	7
1.1.4.3 – Complexos de coordenação multidentada com doação pelos átomos de oxigénio e azoto	8
1.1.5 – Sacarina e seus derivados: breve resumo das propriedades fotoquímicas.....	9
1.1.5.1 – Sacarina e seus derivados: aplicações em líquidos iónicos.....	11
1.1.6 – Sacarina e seus derivados: outras aplicações	13
1.1.6.1 – A sacarina na inibição da anidrase carbónica.....	13
1.1.6.2 – A sacarina na mimica da atividade da superóxido dismutase	15
1.1.6.3 – A sacarina em co-cristais farmacêuticos	17
1.1.6.4 – Atividade antibacteriana de derivados de sacarina	18
1.1.6.5 – Atividade anti-inflamatória de derivados de sacarina	20
1.1.7 – Sacarinos como antídoto para envenenamento por metais	21

1.1.7.1 – Metais e sua importância na saúde	21
1.1.7.2 – Agentes quelantes em sistemas biológicos.....	23
1.1.7.3 – Sacarinatos como agentes quelantes	26
1.2 – Tetrazoles.....	29
1.2.1 – Informação geral: propriedades, síntese e aplicações	29
1.2.2 – Tetrazoles como ligantes.....	30
1.3– Tiadiazoles.....	32
1.3.1 – Informação geral: propriedades, síntese e aplicações	32
1.3.2 – Tiadiazoles como ligantes.....	34
2 – Síntese de novos sacarinos e avaliação da sua capacidade quelante	35
2.1 – Abordagem sintética geral para a preparação de tetrazole-sacarinos e tiadiazol-sacarinos	37
2.1.1 – Síntese do bloco de construção 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (cloreto de sacarina).....	38
2.1.1.1 – Detalhes experimentais relativos à preparação de 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (cloreto de sacarina)	38
2.1.2 – Preparação dos conjugados tetrazole-sacarinato	39
2.1.2.1 – Síntese dos blocos de construção 1- e 2-metil-5-aminotetrazole	40
2.1.2.2 – Detalhes experimentais relativos à preparação de 1-metil-5-aminotetrazole (1MT)	41
2.1.2.3 – Detalhes experimentais relativos à preparação de 2-metil-5-aminotetrazole (2MT)	41
2.1.2.4 - Síntese dos conjugados tetrazole-sacarinato	42
2.1.2.5 – Detalhes experimentais relativos à preparação do <i>N</i> -(1-metil-1 <i>H</i> -tetrazol-5-il)-2,3-dihidro-1,2-benzisotiazole-3-amina-1,1-dióxido (1MTS).....	43
2.1.2.6 – Detalhes experimentais relativos à preparação do <i>N</i> -(2-metil-2 <i>H</i> -tetrazol-5-il)-1,2-benzisotiazole-3-amina-1,1-dióxido (2MTS)	43
2.1.2.7 – Detalhes experimentais relativos à preparação do 3-((1-metil-1 <i>H</i> -tetrazol-5-il)tio)-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (TSMT).....	44

2.1.2.7.1 – Detalhes experimentais relativos à oxidação do 3-((1-metil-1 <i>H</i> -tetrazol-5-il)tio)-1,2- benzisotiazole-1,1-dióxido	45
2.1.3 – Preparação do conjugado tiadiazole-sacarinato	45
2.1.3.1 – Detalhes experimentais relativos à preparação de o 3-[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)sulfanil]-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (MTSB).....	46
2.2– Avaliação atividade quelante	46
2.2.1 – Detalhes da preparação para medição da atividade quelante para Cu(II) (AQCu)	47
2.2.2 – Detalhes da preparação para medição da atividade quelante para Fe(II) (AQFe)	48
2.2.3 – Detalhes da preparação para medição da atividade quelante para Ca(II)(AQCu).....	48
2.3 – Avaliação da atividade antioxidante.....	49
2.3.1 – Detalhes da preparação do ensaio de Atividade de eliminação radicalar (RSA) no radical DPPH.	51
2.3.2 – Detalhes da preparação do ensaio de RSA no radical ABTS	51
2.3.3 – Detalhes da preparação do ensaio de RSA no óxido nítrico (NO).	51
2.3.4 – Detalhes da preparação do ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP).....	52
3 – Resultados e discussão.....	53
3.1 – Avaliação da atividade quelante para os metais Cu(II) Fe(II) e Ca(II) dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB.....	54
3.2 – Avaliação da atividade de eliminação (RSA) para o radical DPPH, ABTS e NO e do poder antioxidante redutor férrico (FRAP) dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB....	56
4 – Conclusão e perspectivas futuras.....	61
5 – Referências Bibliográficas	63

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Representação da estrutura do 3-oxo-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido, também conhecido por sacarina.	1
Figura 1.2 – Representação da estratégia de síntese da sacarina a partir do tolueno.	3
Figura 1.3 – Representação da estratégia de síntese da sacarina a partir do antranilato de metilo.	4
Figura 1.4 – Representação das estruturas da sacarina, sacarinato de sódio e do sacarinato de cálcio.	5
Figura 1.5 – Representação da estrutura do ião sacarinato	5
Figura 1.6 – Representação das diferentes interações do anião sacarinato com os centros metálicos	6
Figura 1.7 – Representação esquemática da estrutura dos complexos $[M(\text{Sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, onde $M = [\text{V}(\text{II}), \text{Cr}(\text{II}), \text{Mn}(\text{II}), \text{Fe}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II}), \text{Cu}(\text{II}) \text{ ou } \text{Zn}(\text{II})]$	7
Figura 1.8 – Representação esquemática da estrutura dos complexos $[\text{Cu}(\text{Sac})(\text{PPh}_3)_3]$ e $[\text{Cu}(\text{Sac})(\text{PPh}_3)_2]$	8
Figura 1.9 – Representação esquemática da estrutura dos complexos $[\text{M}(\text{Sac})_2(\text{py})_4]$, onde $M = [\text{V}(\text{II}) \text{ ou } \text{Ni}(\text{II})]$	8
Figura 1.10 – Representação esquemática das reações de fotólise nas <i>N</i> -alquilsacarinas ($\lambda = 254 \text{ nm}$) em metanol.	9
Figura 1.11 – Representação esquemática das vias de fotoisomerização de 3,3-disubstituído-2,3-di-hidro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido ($\lambda = 254 \text{ nm}$) em metanol.	10
Figura 1.12 – Representação esquemática da foto isomerização induzida pela radiação UV na sacarina a $\lambda = 290 \text{ nm}$ e das estruturas do anião sacarinato, da iso-sacarina e da correspondente base conjugada.	11
Figura 1.13 – Representação esquemática da formação de 1,3-oxazinas com reutilização do catalisador NISac	12
Figura 1.14 – Representação da reação catalisada pela anidrase carbónica.	13
Figura 1.15 – Representação esquemática da coordenação entre o azoto da sacarina e o catião $\text{Zn}(\text{II})$ presente no centro ativo da anidrase carbónica IX.	14
Figura 1.16 – Representação das estruturas dos complexos de ruténio <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{Sac})_2(\text{dpq})_2]$ (22) e <i>trans</i> - $[\text{Ru}(\text{Sac})_2(\text{dppz})_2]$	15

Figura 1.17 – Representação esquemática da reação de dismutação do anião superóxido, com formação de peróxido de hidrogénio e oxigénio, catalisada pela metaloenzima superóxido dismutase.....	16
Figura 1.18 – Representação esquemática da proposta de estrutura de coordenação entre o cobre e os ligandos sacarina e glutamina.....	17
Figura 1.19 – Representação das estruturas da indometacina e dos co-cristais IND-SAC.....	18
Figura 1.20 – Representação da estrutura dos compostos <i>N</i> -[4-(dicianometilazo)fenil]-2-(sacarina-2-il)-acetamida e do seu precursor derivado da sacarina.....	19
Figura 1.21 – Representação da estrutura das azetodinonas.....	19
Figura 1.22 – Representação da estrutura dos derivados de 3-oxo-2,4,5-trifenilisotiazol-1,1-dióxido e de 3-oxo-1,2,5-tiadiazolidina-1,1 dióxido.....	20
Figura 1.23 – Representação da estrutura do <i>N</i> -(furan-2-il-metil)- <i>N</i> -{4-[(1,1,3-trioxo-2,3-dihidro-1λ ⁶ ,2-benzisotiazol-2-il)metil]benzoil} carbamato (CU-CPD103).....	21
Figura 1.24 – Representação das estruturas dos compostos XH1 (33), clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) e tetratiomolibdato (TTM)	24
Figura 1.25 – Representação das estruturas do Elesclomol como ligando e como complexo resultante da sua coordenação com o metal Cu(II).....	25
Figura 1.26 – Representação esquemática da reação de acoplamento entre 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido e os heterociclos tetrazole ou tiadiazole.	27
Figura 1.27 – Representação da estrutura dos ligandos tetrazole-5-aminosacarinato (TS) e 2-miltetrazole-5-aminosacarinato (2MTS) e dos respetivos complexos de coordenação com o catião divalente Cu(II).....	28
Figura 1.28 – Representação da estrutura do ligando 3-[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)sulfanil]-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (MTSB).	29
Figura 1.29 – Representação das diferentes interações do anel tetrazole com os centros metálicos, na forma neutra (I-IV) e desprotonada (V-X).....	31
Figura 1.30 – Representação da estrutura das formas tautoméricas do conjugado tetrazole-sacarinato, 2-[1-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-il)-etil]-3-oxo-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido.. ..	32
Figura 1.31 – Representação da estrutura de tiadiazoles: 1,2,3-tiadiazole, 1,2,4-tiadiazole, 1,2,5-tiadiazole e 1,3,4-tiadiazole.	32
Figura 1.32 – Representação da estrutura da acetazolamida.....	33

Figura 1.33 – Representação esquemática de alguns dos métodos usados na síntese de tiadiazoles. 34

Figura 2.1 – Representação esquemática da estratégia de síntese dos tetrazole-sacarinatos e tiadiazole-sacarinatos preparados pelo autor. 37

Figura 2.2 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a halogenação da sacarina, com formação do cloreto de sacarina. 38

Figura 2.3 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a síntese de 1-metil-5-aminotetrazole e 2-metil-5-aminotetrazole 40

Figura 2.4 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a síntese de tetrazole-sacarinatos 42

Figura 2.5 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a síntese do tiadiazole-sacarinato.. 46

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Atividade quelante para os metais Cu(II) (AQCu), Fe(II) (AQFe) ou Ca(II) (AQCa) dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB e respetivos controlos positivos nas concentrações de 1 e 10mM. Resultados expressos em valores de percentagem (%) calculados através da equação (i).	55
Tabela 3.2 – Concentração dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB e respetivos controlos positivos capaz de quelatar 50% dos iões Cu(II), Fe(II) ou Ca(II) presentes no meio reacional. Resultados expressos em valores de IC ₅₀ (mM).	56
Tabela 3.3 – Atividade de eliminação radicalar para os radicais DPPH, ABTS ou NO dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB e respetivos controlos positivos nas concentrações de 1 e 10mM. Resultados expressos em valores de percentagem (%) calculados através da equação (ii).	58
Tabela 3.4 – Menor concentração dos ligandos TSMT e MTSB e respetivos controlos positivos capaz de reduzir em 50% a espécie reativa DPPH [•] , ABTS ^{•+} ou NO [•] presente no meio reacional. Resultados expressos em valores de IC ₅₀ (mM).	58
Tabela 3.5 – Poder antioxidante redutor férrico (FRAP) dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB nas concentrações de 1 e 10mM. Resultados expressos em valores de percentagem (%) calculados através da equação (iii).	59

Lista de Abreviaturas

1MT	1-metil-5-aminotetrazole
1MTS	<i>N</i> -(1-metil-1 <i>H</i> -tetrazol-5-il)-2,3-dihidro-1,2- benzisotiazole-3-amina-1,1-dióxido
2MT	2-metil-5-aminotetrazole
2MTS	<i>N</i> -(2-metil-2 <i>H</i> -tetrazol-5-il)-1,2-benzisotiazole-3-amina-1,1-dióxido
5MMT	5-mercapto-1-metiltetrazole anidro
5MTDT	5-metil-1,3,4-tiadiazole-2-tiol anidro
aa	Aminoácido
ABTS	2,2'-azinobis-(ácido -3-etilbenztiazolina-6-sulfónico)
API	Ingrediente farmacêutico ativo
AQCa	Atividade quelante para o metal Cálcio
AQCu	Atividade quelante para o metal Cobre
AQFe	Atividade quelante para o metal Ferro
CA	Anidrase Carbónica
CatG	Catepsina G
Cloreto de sacarina	3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido
CISO₃H	Ácido clorosulfónico
CO₂	Dióxido de carbono
CS₂	Dissulfeto de carbono
CU-CPD103	<i>N</i> -(furan-2-il-metil)- <i>N</i> -{4-[(1,1,3-trioxo-2,3-dihidro-1λ ⁶ ,2-benzisotiazol-2-il)metil]benzoil} carbamato
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil

dppz	Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
dpq	Dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxanila
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etileno glicol tetra-acético
EtOH	Etanol
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA
FRAP	Poder antioxidante férrico
H	Hidrogénio
H⁺	Hidrogenião
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HCO₃⁻	Bicarbonato
HLE	<i>Human leukocyte elastase</i>
HSac	Sacarina
IFN	Interferão
IL	Líquido iónico
IND	Indometacina
IND-SAC	Co-cristais de Indometacina e sacarina
KMnO₄	Permanganato de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
M	Metal
MTSB	3-[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)sulfanil]-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido
N	Azoto
NH₃	Amoníaco

NISac	Adenosina monofosfato proteína quinase
NO	Óxido nítrico
O	Oxigénio
O₂⁻	Radical superóxido
Ophen	1,10-fenantrolina
PACT	Quimioterapia por fotoativação
PCl₅	Pentacloreto de fósforo
PCy₃	Triciclohexilfosfina
PDT	Terapia fotodinâmica
PP₃	Trifenilfosfina
PPh₂Cy	Ciclohexildifenilfosfina
PPhCy₂	Diciclohexilfenilfosfina
PR3	Proteinase 3
py	Piridina
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RSA	Atividade de eliminação radicalar
S	Enxofre
Sac⁻	Anião sacarinato
SO₂	Dióxido de enxofre
SOD	Superóxido dismutase
TPTZ	2,4,6-tripiridil-triazina
TS	Tetrazole-5-aminosacarinato
TSMT	3-((1-metil-1 <i>H</i> -tetrazol-5-il)tio)-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido

TTM	Tetratiomolibdato
ZBG	Grupo de ligação a zinco

1 – Introdução

1.1 – Sacarina e sacarinos

1.1.1 – Sacarina: propriedades e aplicações

Os sacarinos são uma classe de compostos heterocíclicos derivados do 3-oxo-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (**1**) representado na Figura 1.1 e conhecido por sacarina. A sacarina foi descoberta acidentalmente por Constantine Fahlberg, em 1878, no decurso de uma investigação sobre a oxidação da *o*-toluenosulfonamida. As propriedades edulcorantes do composto foram identificadas e os resultados da investigação foram publicados um ano depois, por Fahlberg e Ira Remsen. ⁽¹⁻³⁾

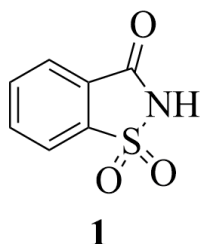


Figura 1.1 – Representação da estrutura do 3-oxo-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido, também conhecido por sacarina. Adaptado de ⁽⁴⁾.

A partir de 1887 a sacarina, o primeiro edulcorante artificial ⁽⁵⁾, passou a ser produzida em escala industrial para utilização como substituto do açúcar. ⁽⁶⁻⁸⁾

A sacarina é um dos edulcorantes artificiais (E954) ⁽⁵⁾ não calóricos mais comercializados. O seu sabor doce é detetado pelos recetores acoplados à proteína G que estão incorporados na membrana celular da célula gustativa. ⁽⁹⁾ É bastante utilizada pela indústria alimentar por apresentar uma melhor relação custo/poder edulcorante comparativamente a produtos com adição de açúcar, sendo geralmente usada na forma de sal de sódio. ⁽¹⁰⁾ A sacarina é tida como muito próxima do edulcorante ideal, pois é barata, estável e não higroscópica. Possui poder calórico nulo e um elevado poder adoçante (superior à sacarose), podendo ser utilizada em associação com outros edulcorantes, como a frutose, o aspartame, ou o ciclamato, entre outros.

A versatilidade da sacarina e a sua estabilidade durante o armazenamento favorecem a sua utilização em produtos alimentares, de higiene, cosméticos e também em medicamentos, como excipiente. ^(7,11-13)

A sacarina é maioritariamente consumida por diabéticos, obesos e por um número crescente de pessoas que pretendem manter a forma física e restringir o valor energético da sua alimentação. Apesar destes produtos não serem necessários para o controlo metabólico em doentes com diabetes *mellitus*, desempenham um papel significativo no convívio social e ao nível psicológico, pois proporcionam a palatabilidade e o prazer do sabor doce, aumentando a variedade de alimentos e também a aceitabilidade do plano alimentar proposto. ⁽¹⁴⁾

Na década de 1970, na sequência de um estudo que revelou que o consumo excessivo de sacarina em ratos conduz ao aumento da incidência de cancro na bexiga, surgiram preocupações em torno da segurança da sacarina, que foi subsequentemente proibida como aditivo alimentar pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA). Nos anos seguintes assistiu-se a uma intensificação das investigações sobre o risco/benefício da sacarina para a saúde ^(6,7,15) e mais tarde, percebeu-se que o efeito observado no sistema urinário desses roedores era específico, não sendo a contraindicação observável em humanos. Foi também aclarado que o efeito citotóxico não se devia à sacarina, mas sim ao catião sódio, presente no sacarinato de sódio que era administrado aos animais. ^(12,16)

Estes estudos levaram a que a proibição de utilização da sacarina fosse levantada pela FDA em 1980 e em 2000 o Programa Nacional de Toxicologia do EUA removeu a sacarina da lista de agentes cancerígenos. ^(12,13)

As propriedades da sacarina e dos seus derivados continuam a ser objeto de intenso estudo, na perspetiva do desenvolvimento de novas aplicações. ⁽⁴⁾ Em síntese orgânica e bioorgânica, os derivados de sacarina são conhecidos como compostos de partida baratos e versáteis para a preparação de outras classes de compostos heterocíclicos, como blocos intermédios em processos de síntese ou como agentes modificadores de reatividade em processos de interconversão de grupos funcionais. ^(4,17-19) As novas aplicações da sacarina e do seu anião (sacarinato) tiram partido da estabilidade térmica e fotoquímica do sistema benzisotiazolífico. ^(13,20) Além de serem

usados em química de coordenação, foram recentemente considerados para a formulação de líquidos iônicos⁽²¹⁻²⁴⁾ e de co-cristais.⁽²⁵⁾

1.1.2 – Sacarina: síntese

As empresas que produzem sacarina (**1**) usam em geral o método de síntese descrito por Remsen e Fahlberg representado na Figura 1.2. Este método é baseado na sulfonação de tolueno (**2**), usando ácido clorosulfônico (ClSO_3H), com formação de uma mistura isomérica de cloreto de *o*-toluenosulfonilo (**3**) e cloreto de *p*-toluenosulfonilo (**4**), que é subsequentemente submetida a tratamento com amoníaco (NH_3), formando uma mistura de *o*-toluenosulfonamida (**5**) e *p*-toluenosulfonamida (**6**). Após separação das sulfonamidas, a *o*-toluenosulfonamida (**5**), precursora de sacarina (**1**), é oxidada a ácido sulfamoilbenzóico (**7**) com a adição de uma solução alcalina de permanganato de potássio (KMnO_4). O ácido sulfamoilbenzóico (**7**) é aquecido em seguida, originando sacarina (**1**), por ciclização.

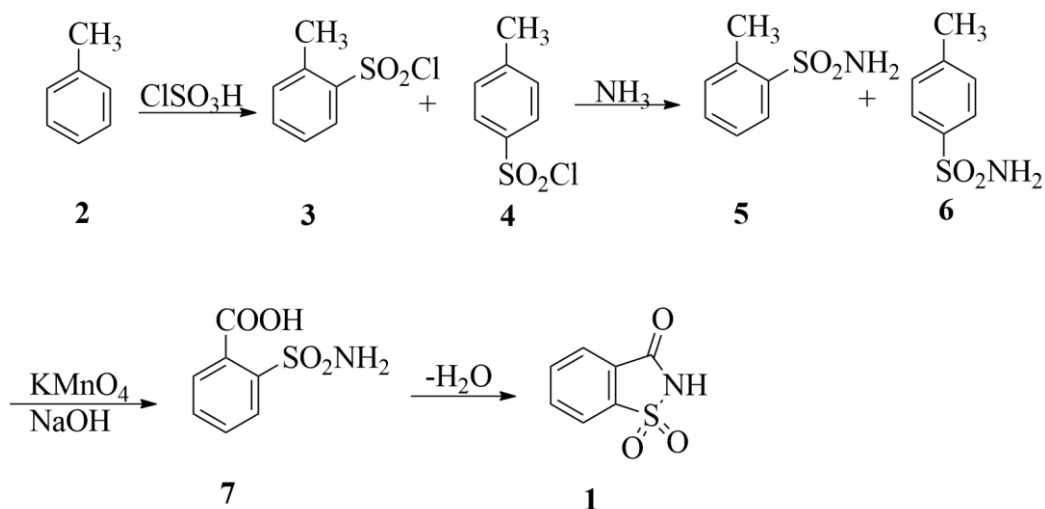


Figura 1.2 – Representação da estratégia de síntese da sacarina (1) a partir do tolueno (2). Adaptado de^(23,26).

Além do método acima referido, foi também desenvolvido um processo de síntese em que a sacarina (**1**) é produzida a partir de antranilato de metilo (**8**), como representado na Figura 1.3.

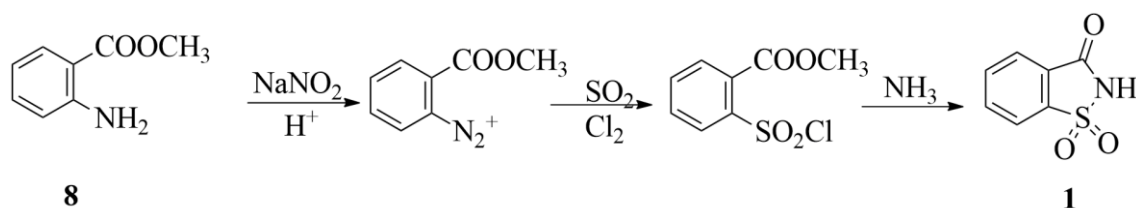


Figura 1.3 – Representação da estratégia de síntese da sacarina (1) a partir do antranilato de metilo (8). Adaptado de ⁽²³⁾.

Ambas as metodologias originam sacarina na forma ácida (**1**), que apresenta solubilidade baixa. Todavia, o tratamento com hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio origina os respetivos sais solúveis. ^(3,12,13,23)

1.1.3 – Sacarina: propriedades físico-químicas

Quimicamente a sacarina incorpora no sistema benzisotiazolílico uma sulfonamida cíclica. ⁽¹⁶⁾ O sistema benzisotiazolílico confere estabilidade térmica e acidez à molécula, que apresenta um intervalo de fusão 228.8 – 229.7°C e estabilidade no intervalo de pH entre 3,3 – 8,0, com um valor de pKa de 1,60. Apresenta também, uma densidade de 0,828 g/ml e uma massa molecular de 183,18 g/mol.

Na estrutura cristalina da sacarina ⁽²⁷⁾ o cristal é constituído por unidades diméricas centrossimétricas formadas por pontes de hidrogénio *N-H...O* entre os átomos de hidrogénio (*H*) ligado ao azoto (*N*) de uma molécula e os átomos de oxigénio (*O*) (grupo carbonilo) da molécula parceira, ambos constituintes do anel de cinco membros. Na forma ácida, a sacarina forma em geral cristais monoclinicos, que apresentam uma clivagem perfeita. ⁽¹³⁾

Apesar de ser bastante estável em soluções aquosas, numa gama de pH ampla, a sacarina revela problemas de solubilidade em água, sendo mais solúvel em etanol, acetona, glicerol e pouco solúvel em clorofórmio. Tal como representado na Figura 1.4, a sacarina é vulgarmente disponibilizada na forma de sacarinato de sódio (**9**) ou de cálcio (**10**), sendo também comercializada na forma ácida (**1**).

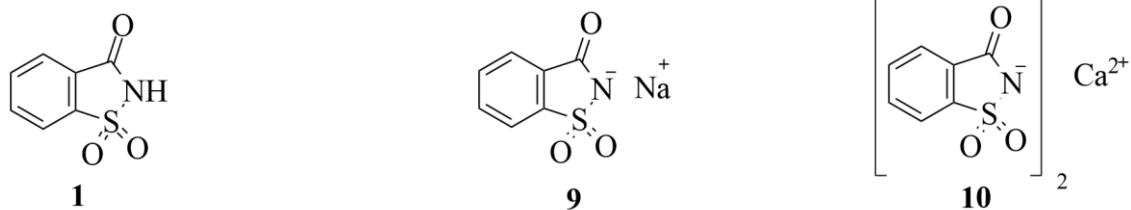


Figura 1.4 – Representação das estruturas da sacarina (1), sacarinato de sódio (9) e do sacarinato de cálcio (10). Adaptado de ⁽¹²⁾.

1.1.4 – Complexos metálicos baseados em sacarina

As suspeitas de atividade carcinogénica da sacarina (HSac) e da sua base conjugada representada na Figura 1.5, o anião sacarinato (**11**) (Sac⁻), suscitaram a intensificação dos estudos sobre as propriedades destas espécies, ganhando especial destaque a investigação sobre a sua interação com catiões metálicos de interesse biológico. Neste contexto, vários estudos ^(13,20) destacaram a química de coordenação da HSac enfatizando a potencialidade do sistema benzotiazolílico atuar como um ligando multidentado e também como grupo de ligação em estruturas polinucleares.

A formação de complexos metálicos envolve que o catião metálico aceite o(s) par(es) de elétrons livres fornecidos pelo(s) dador(es) de elétrons de um ligando. Geralmente, os ligandos, ou agentes quelantes, estabelecem interações com os catiões metálicos através de átomos de enxofre (*S*), *N* ou *O*, como doadores de elétrons. (28)

O anião Sac⁻ (**11**) formado por desprotonação do grupo *-NH*, oferece diferentes locais de coordenação para centros metálicos: um átomo de *N*; um átomo de *O* carbonílico; dois átomos de *O* sulfonílicos; ^(13,20)

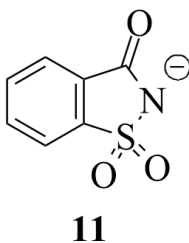


Figura 1.5 – Representação da estrutura do ião sacarinato (11). Adaptado de ⁽⁴⁾.

Usando estes átomos doadores, o Sac⁻ (**11**), pode gerar diversas estruturas, baseadas nas seguintes interações: coordenação monodentada pelos átomos *N* ou *O*; coordenação bidentada pelos átomos *N* e *O*; formação de espécies poliméricas mais complexas com a participação de todos os átomos doadores existentes. O anião Sac⁻ (**11**) pode também participar na formação de complexos de ligandos mistos, estando presente em alguns compostos como ligante do complexo de coordenação e também no papel de contra-íon fora da esfera de coordenação. As interações do Sac⁻ (**11**) com os centros metálicos estão representadas na Figura 1.6. De seguida, serão detalhadas algumas das diferentes formas de interação, bem como as propriedades e características dos correspondentes complexos. ^(13,20)

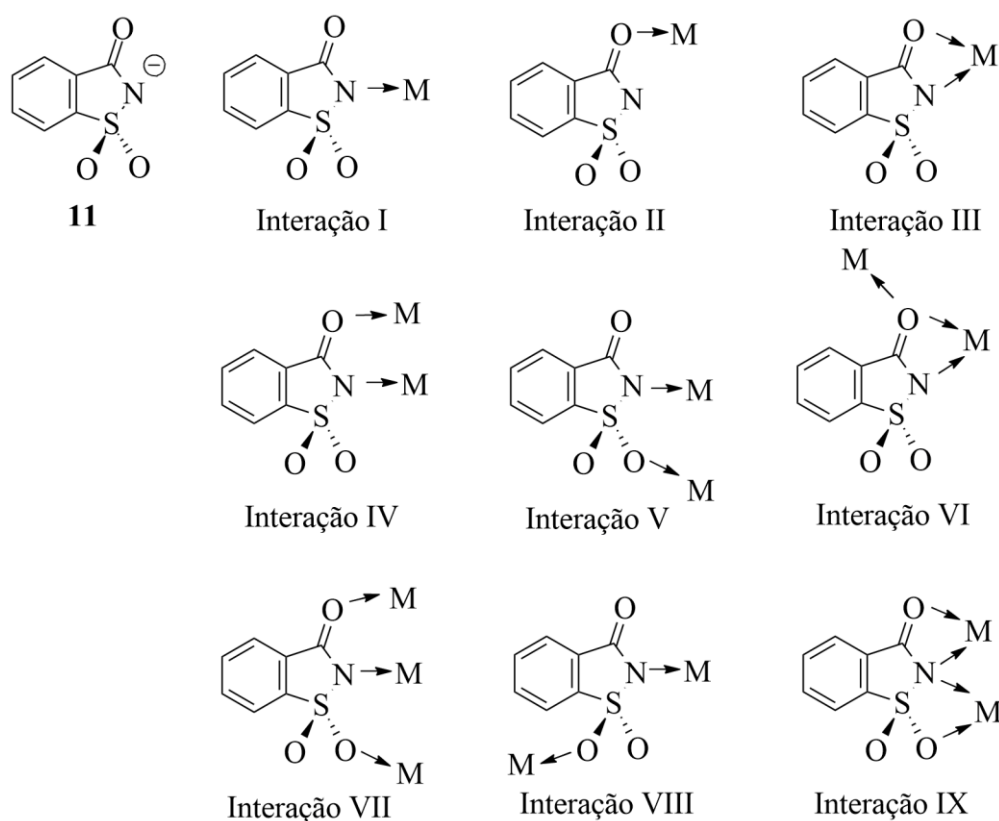


Figura 1.6 – Representação das diferentes interações do anião sacarinato (11**) com os centros metálicos.** Adaptado de ^(13,29).

1.1.4.1 – Complexos de coordenação monodentada com doação pelo azoto

Todos os catiões divalentes da primeira série de metais de transição, de vanádio (II) ao zinco (II), mostram preferência por interação com Sac^- através do átomo de *N* desprotonado (Figura 1.6 – Interação I), originando compostos de coordenação isomorfa com a fórmula $[\text{M}(\text{Sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Estes complexos apresentam uma estrutura octaédrica com duas unidades de Sac^- (**11**) ligadas pelo átomo de *N*, em posição *trans* (Figura 1.7).⁽²⁰⁾

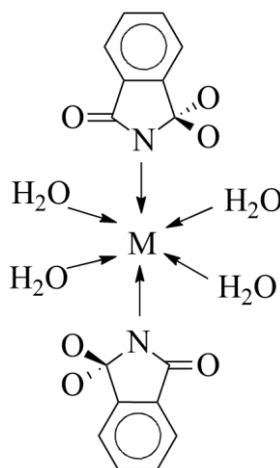


Figura 1.7 – Representação esquemática da estrutura dos complexos $[\text{M}(\text{Sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, onde $\text{M} = [\text{V}(\text{II}), \text{Cr}(\text{II}), \text{Mn}(\text{II}), \text{Fe}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II}), \text{Cu}(\text{II}) \text{ ou } \text{Zn}(\text{II})]$. Adaptado de⁽¹³⁾.

1.1.4.2 – Complexos de coordenação monodentada com doação pelo oxigénio

Como ligando, o anião Sac^- (**11**), disponibiliza dois tipos diferentes de átomos de *O* doadores, o *O* do grupo carbonilo (Figura 1.6 – Interação II) e os *O*'s do grupo sulfonilo, sendo que estes raramente se envolvem em coordenação.

Em contraste, o átomo de *O* do grupo carbonilo participa frequentemente na coordenação de metais, com o Sac^- (**11**) atuando como quelante ou ponte. No entanto, este tipo de coordenação é raro devido a efeitos estereoquímicos, surgindo apenas quando co-ligandos volumosos ou ramificados estão presentes.^(13,20) Esta última premissa é adicionalmente suportada pela estrutura do complexo de cobre (I),

$[\text{Cu}(\text{Sac})(\text{PPh}_3)_3]$, contendo os ligantes volumosos trifenilfosfina (PPh_3), no qual o Sac^-

(11) também coordena através do átomo *O* do grupo carbonilo. Em contrapartida, num complexo semelhante, mas com apenas dois grupos PPh₃, [Cu(Sac)(PPh₃)₂], a coordenação ocorre através de interações M-átomo de *N* (Figura 1.8).⁽²⁰⁾

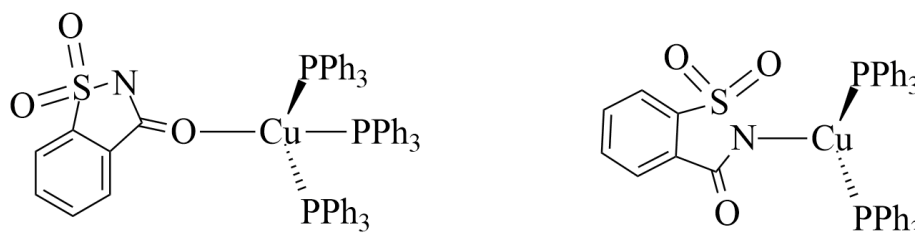


Figura 1.8 – Representação esquemática da estrutura dos complexos [Cu(Sac)(PPh₃)₃] e [Cu(Sac)(PPh₃)₂]. Adaptado de⁽³⁰⁾.

Os complexos de vanádio (II), [V(Sac)₂(py)₄]·2py, e níquel (II), [Ni(Sac)₂(py)₄]·2py, mostraram pela primeira vez este tipo de interações (Figura 1.9). Os ligandos Sac⁻ (11) são forçados a ligarem-se através do *O* carbonílico quando o plano equatorial do octaedro é ocupado por quatro anéis planares de piridina (py).^(13,20)

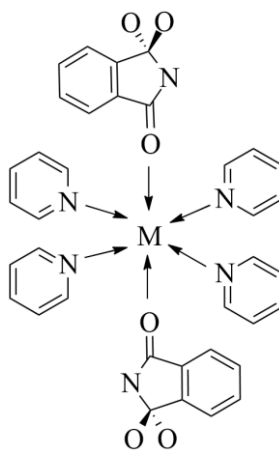


Figura 1.9 – Representação esquemática da estrutura dos complexos [M(Sac)₂(py)₄], onde M = [V (II) ou Ni (II)]. Adaptado de⁽¹³⁾.

1.1.4.3 – Complexos de coordenação multidentada com doação pelos átomos de oxigénio e azoto

É possível a coordenação simultânea de vários átomos doadores do Sac⁻ (11). O anião pode interagir como um ligando bi- ou tridentado em apenas um centro metálico e/ou como um agente de ligação entre dois ou mais iões metálicos (Figura 1.6 – Interações III a IX).^(13,20)

No primeiro caso, o complexo metálico $[\text{Pb}(\text{Sac})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{o phen})]$ é um exemplo da interação III representada na Figura 1.6. Neste contexto, os iões Sac^- (**11**) interagem como ligandos bidentados entre os centros metálicos de $\text{Pb}(\text{II})$ através dos átomos *N* e *O* do grupo carbonilo. ⁽³¹⁾ Por sua vez, o complexo $[\text{Ag}(\text{Sac})]_n$ foi o primeiro complexo reportado que contém cada um dos iões Sac^- (**11**) a interagir como ligandos tridentados, tal como representado na Figura 1.6 – Interação VII. ⁽³²⁾

No segundo caso, duas das espécies mais interessantes são as estruturas $[\text{Cr}_2(\text{Sac})_4] \cdot 2\text{THF}$ ⁽³³⁾ e $[\text{Cr}_2(\text{Sac})_4(\text{py})_2] \cdot 2\text{py}$ ⁽³⁴⁾, em que cada um dos quatro iões Sac^- (**11**) age como ligando bidentado entre os dois catiões de $\text{Cr}(\text{II})$, tal como representado na Figura 1.6 – Interação IV. ^(13,20)

1.1.5 – Sacarina e seus derivados: breve resumo das propriedades fotoquímicas

A estabilidade térmica e fotoquímica do sistema benzisotiazolífico encoraja e suporta muitas das aplicações e potenciais usos da sacarina e seus derivados.

No entanto, estudos bibliográficos revelam que a informação referente à fotoquímica dos benzisotiazoles é restrita à fotólise em solução. ⁽⁴⁾ Os primeiros estudos na fotoquímica de *N*-alquilsacarinas (**12**) indicam que a fotólise ($\lambda = 254 \text{ nm}$) destes compostos em etanol conduz à clivagem da ligação *S-N* seguida da eliminação de dióxido de enxofre (SO_2), resultando na formação de *N*-alquilbenzamina (**13**), como representado na Figura 1.10. ^(35,36)

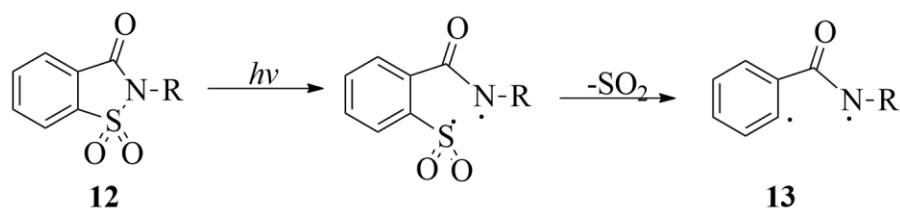


Figura 1.10 – Representação esquemática das reações de fotólise nas *N*-alquilsacarinas (**12**) ($\lambda = 254 \text{ nm}$) em metanol. Adaptado de ⁽⁴⁾.

Estudos posteriores da fotoquímica de 3,3-di-substituído-2,3-di-hidro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (**14**) ($\lambda = 254 \text{ nm}$) em metanol revelaram duas vias de fotoisomerização, ambas com formação do produto final *N*-hidroxissulfonamidas (**15**) (Figura 1.11).

A primeira (Figura 1.11 – A), onde ocorre inicialmente uma homólise das ligações *S-N*, com formação do biradical que parece ser vital para o processo. A segunda (Figura 1.11 – B), que envolve a migração do átomo de *O* do *S* para o *N*, um processo fotoquímico diferente. ^(37,38)

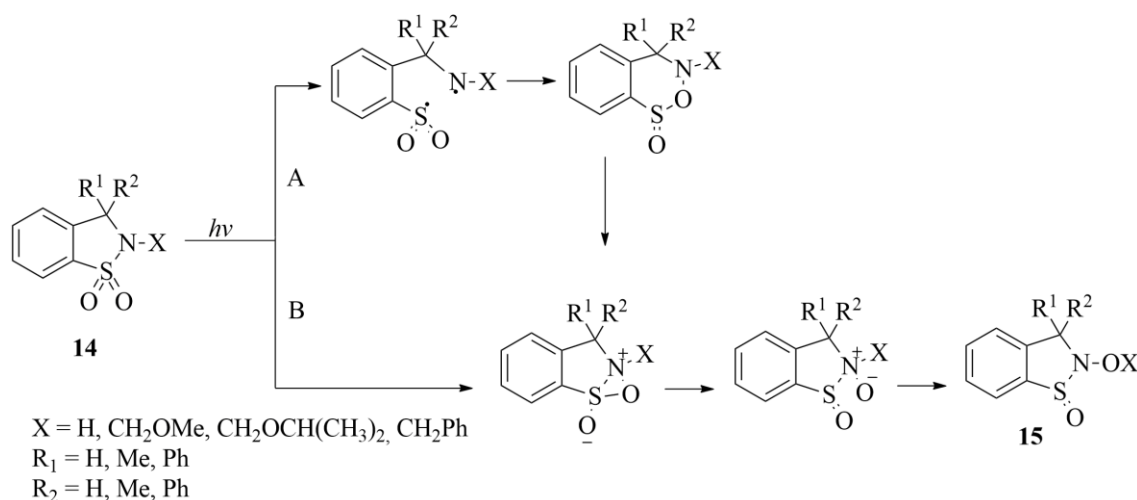


Figura 1.11 – Representação esquemática das vias de fotoisomerização de 3,3-di-substituído-2,3-di-hidro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (14**) ($\lambda = 254 \text{ nm}$) em metanol.** Adaptado de ^(37,38).

Os estudos ^(35–38) acima indicados, reforçam que a fotoquímica da HSac (**1**) e seus derivados em solução é determinada pela estrutura do anel benzisotiazolífico, pela natureza dos substituintes e pelo solvente/meio reacional.

Mais recentemente, foi investigada a fotoquímica da Hsac (**1**) monomérica isolada em argon sólido. Mostrou-se que a Hsac (**1**) sofre uma isomerização quando sujeita a uma banda estreita de radiação UV ($\lambda = 290\text{nm}$), formando um novo composto, iso-sacarina (**16**), tal como representado na Figura 1.12. Este isômero da Hsac (**1**) possui átomos de *H* lábeis e as energias livres e momentos dipolares destas espécies sugerem que tanto a iso-sacarina (**16**) como a sua base conjugada (**17**) podem desempenhar um papel importante nos sistemas onde a Hsac (**1**) ou o Sac⁻ (**11**) participam, principalmente quando a desprotonação é facilitada, pois estas alterações

estruturais implicam alterações importantes nas propriedades desses materiais. Um exemplo é o caso dos líquidos iônicos à base de HSac (**1**), em que a fotoisomerização de Sac⁻ (**11**) com formação de (**17**) poderia resultar numa alteração significativa das propriedades do líquido iônico. ⁽⁴⁾

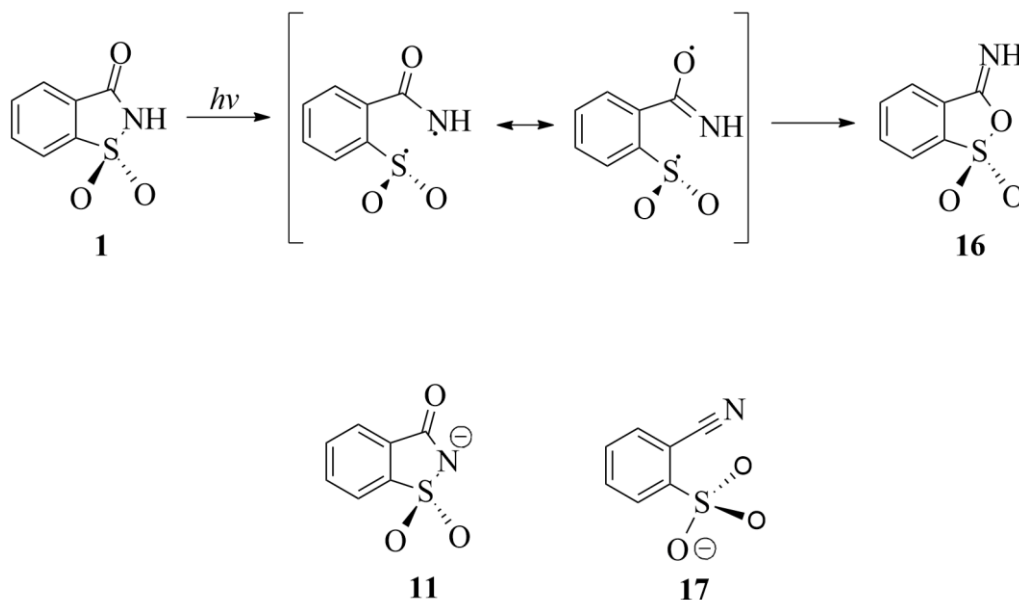


Figura 1.12 – Representação esquemática da foto isomerização induzida pela radiação UV na sacarina (**1**) a $\lambda = 290\text{nm}$ e das estruturas do anião sacarinato (**11**), da iso-sacarina (**16**) e da correspondente base conjugada (**17**). Adaptado de ⁽⁴⁾.

1.1.5.1 – Sacarina e seus derivados: aplicações em líquidos iônicos

A relevância dos líquidos iônicos (IL) cresceu essencialmente na última década, devido às inúmeras aplicações em campos como eletroquímica, síntese, catálise, materiais, separação e biotecnologia. A investigação e desenvolvimento envolvendo líquidos iônicos, a nível académico e industrial, suportou a sua comercialização, subsistindo esforços com o objetivo de otimizar os IL existentes e desenvolver outros, com propriedades melhoradas e que melhor se ajustem à utilização.

Do ponto de vista eletroquímico, o IL deve possuir propriedades como baixo ponto de fusão ($< 25^\circ\text{C}$), alta condutividade iónica, boa estabilidade eletroquímica e viscosidade relativamente baixa. Existe ainda uma preocupação para que os novos IL sejam benignos, tanto ambientalmente como toxicologicamente. Grupos funcionais como NH_2 , SH , OH , COOH , CN ou NHCONH_2 que surgem ligados aos IL clássicos,

representam um fator limitante na pesquisa de novas aplicações pois, conduzem a uma viscosidade alta, comparativamente à obtida com solventes orgânicos e a menor condutividade.

Atualmente, é fundamental desenvolver eletrólitos baseados em IL para utilização em baterias de íons de lítio, células de combustível, painéis solares e outros dispositivos eletroquímicos. Neste contexto, os ILs baseados no íon Sac^- revelaram características promissoras, principalmente para aplicações em dispositivos eletroquímicos e lubrificantes. A extensão da conjugação ao longo do sistema de orbitais π permite a deslocalização de carga, ou uma excitação sobre toda a estrutura, minimizando o enfraquecimento das ligações. ⁽¹⁹⁻²²⁾ A Figura 1.13 apresenta um exemplo da aplicação de Sac^- num processo catalítico. A N-iodosacarina (NISac) (**18**) é usada como catalisador na formação de 1,3-oxazinas (**21**) via cicloadição [2+4] de iminas (**19**) e enonas (**20**). Após o isolamento do produto, o catalisador NISac (**18**) pode ser reutilizado sem perda de eficiência, tal como representado na Figura 1.13. Este protocolo sintético tem como principais características, a temperatura ambiente, os altos rendimentos (85-95%), a simplicidade operacional e a não formação de subprodutos. ⁽²¹⁾

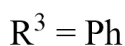
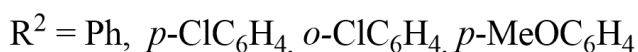
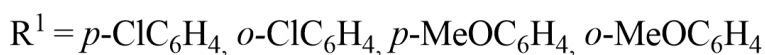
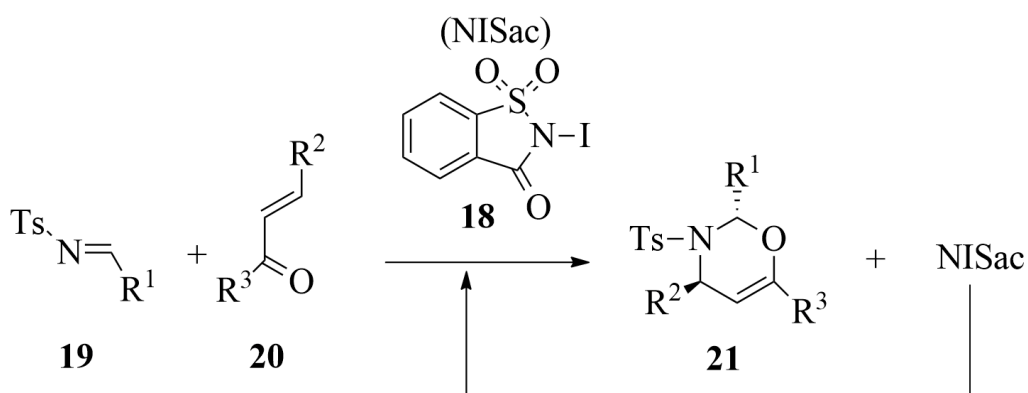


Figura 1.13 – Representação esquemática da formação de 1,3-oxazinas (21**) com reutilização do catalisador NISac (**18**).** Adaptado de ⁽²¹⁾.

1.1.6 – Sacarina e seus derivados: outras aplicações

1.1.6.1 – A sacarina na inibição da anidrase carbónica

As interações metal-HSac podem interferir na atividade de biomoléculas com centros metálicos como é o caso de enzimas. Um dos alvos da HSac é a anidrase carbónica (CA), uma família de metaloenzimas com 12 formas conhecidas em humanos cuja principal função é catalisar a hidratação reversível do dióxido de carbono (CO₂), com formação do anião bicarbonato (HCO₃⁻) e de um hidrogenião (H⁺) (Figura 1.14).⁽³⁹⁾

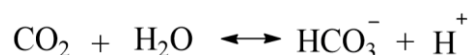


Figura 1.14 – Representação da reação catalisada pela anidrase carbónica. Adaptado de⁽⁴⁰⁾.

Esta família de metaloenzimas tem um papel ativo na regulação de vários processos biológicos, incluindo a regulação do pH, da secreção eletrolítica, do transporte iónico, das vias metabólicas envolvendo gluconeogénese, da ureia, da biossíntese de lípidos e da carcinogénese.⁽⁴¹⁾

Alguns estudos^(13,16) demonstraram que complexos metálicos de HSac e seus derivados, do tipo [M(Sac)₂(H₂O)₄] onde M = [Zn (II) ou Cu (II)], exibem um efeito inibitório *in vitro* sobre várias isoformas da CA. A HSac coordena no seu estado desprotonado (Sac⁻), através do seu átomo de N com o ião de zinco (II) cataliticamente ativo, presente no centro ativo da metaloenzima. Mais recentemente⁽⁴²⁾ foi demonstrado que a HSac em concentrações nanomolares, inibe principalmente a isoforma IX (CA IX), uma isoforma sobre-expressa em vários tipos de células cancerígenas. A CA IX desempenha um papel crucial na regulação do pH diferencial no microambiente tumoral, constituindo também um marcador de tumores agressivos em ambiente hipóxico.⁽⁴⁰⁾

Estudos⁽⁴¹⁻⁴³⁾ demonstraram que a inibição da CA IX por a HSac conduz a uma redução do crescimento e proliferação tumoral, sugerindo que a sacarina e seus derivados podem tornar-se úteis como estratégia de quimioterapia antineoplásica. A

presença de um grupo de ligação a zinco (ZBG) e de uma interação hidrofóbica favorável na CA IX conduzem a uma afinidade nanomolar e a elevada especificidade na ligação do N da HSac ao Zn(II) da metaloenzima, como representado na Figura 1.15.

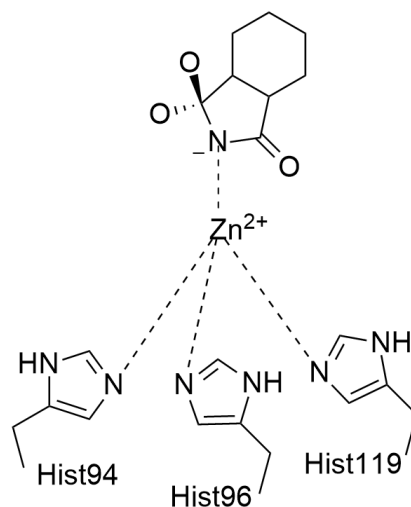


Figura 1.15 – Representação esquemática da coordenação entre o azoto da sacarina e o cátion Zn(II) presente no centro ativo da anidrase carbônica IX. Adaptado de ⁽⁴²⁾.

Num estudo mais recente ⁽⁴⁴⁾, as propriedades da HSac foram utilizadas para modular o perfil de citotoxicidade em complexos de rutênio (II), desenvolvidos para modificar a via de sinalização de morte celular e reduzir a resistência a múltiplos fármacos. Os complexos de Ru(II) estão sob escrutínio como agentes anticancerígenos alternativos aos fármacos convencionais à base de platina. Possuem maior solubilidade em água, menor citotoxicidade celular e são mais eficazmente internalizados pelas células. Possuem também propriedades físico-químicas adequadas para utilização em meios biológicos, capacidade para formar estruturas rígidas e para ativar a alteração nos pares redox Ru^{II/III} (*switch*) sob condições fisiológicas, com redução e substituição de ligantes, e versatilidade para otimização.

Dois novos complexos de Ru(II), *trans*-[Ru(Sac)₂(dpq)₂] (**22**) e *trans*-[Ru(Sac)₂(dppz)₂] (**23**), com uma geometria octaédrica mononuclear distorcida, incorporam os ligandos bidentados neutros dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxanila (dpq) e dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz) como fotossensibilizadores e intercaladores de DNA e os ligandos auxiliares de HSac (doadores pelo átomo N) como inibidores da CA (Figura 1.16).

Sob irradiação com luz UV-A a 365nm ambos os complexos facilitam a dissociação dos ligandos de HSac, existindo um *foto-switching* que permite a interação destes complexos emissivos com o DNA e a proteína albumina de soro bovino (BSA), sob condições fisiológicas, promovendo uma eficiente afinidade de ligação através de perturbação estrutural e intercalação, respetivamente. Nestes complexos, o *foto-switching* induzido com luz UV-A a 365nm resulta em danos no DNA, envolvendo múltiplas espécies reativas de oxigénio (ROS). Com a atividade dupla dos métodos baseados em terapia fotodinâmica (PDT) ⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ e quimioterapia por fotoativação (PACT) ^(45,48) pretende-se alcançar eficácia elevada e um amplo potencial quimioterapêutico. Os ligantes auxiliares de HSac fornecem também uma capacidade de direcionamento interessante e efeito sinérgico em fármacos anticancerígenos baseados em Ru(II) para tumores altamente agressivos em stress hipóxico. ⁽⁴⁴⁾

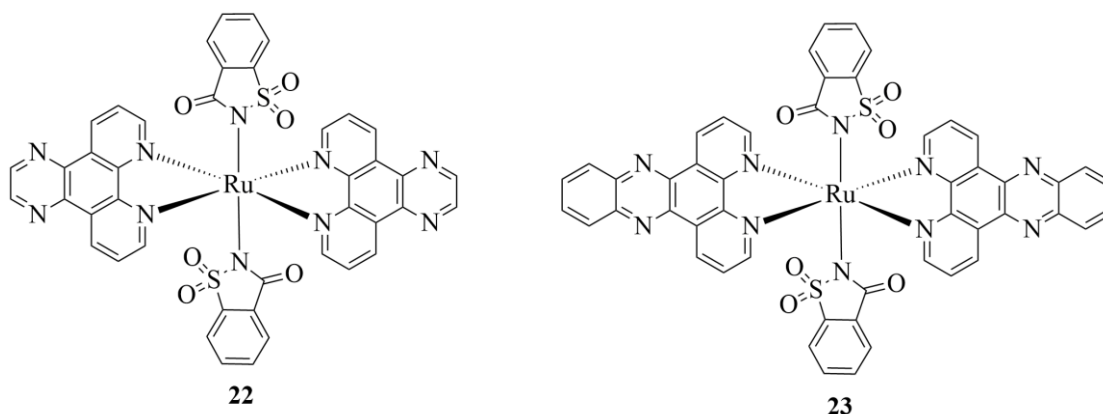


Figura 1.16 – Representação das estruturas dos complexos de ruténio *trans*-[Ru(Sac)₂(dpq)₂] (22) e *trans*-[Ru(Sac)₂(dppz)₂] (23). Adaptado de ⁽⁴⁴⁾.

1.1.6.2 – A sacarina na mimica da atividade da superóxido dismutase

São conhecidos diversos tipos da metaloenzima superóxido dismutase (SOD), entre eles, as estruturas Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Fe-SOD que catalisam a dismutase do anião superóxido (Figura 1.17). ^(49,50)



Figura 1.17 – Representação esquemática da reação de dismutação do anião superóxido, com formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio, catalisada pela metaloenzima superóxido dismutase. Adaptado de ⁽⁵¹⁾.

A SOD tem como principal função o combate ao stress oxidativo causado pelo radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), auxiliando na prevenção de doenças neurológicas, diabetes *mellitus*, lesão tecidual pós-isquemia, artrite reumatoide, cancro, entre outras. ⁽⁵⁰⁾

Estudos ⁽⁴⁹⁾, revelaram que os complexos metálicos divalentes de HSac do tipo $[\text{M}(\text{Sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, onde $\text{M} = [\text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II}) \text{ ou } \text{Cu}(\text{II})]$, apresentam uma atividade mimética da SOD, do inglês “*SOD-like activity*”, tendo o complexo com $\text{Cu}(\text{II})$ despertado especial interesse devido às suas propriedades redox. As posições equatoriais são ocupadas por quatro moléculas de água (H_2O), permitindo que o $2\text{O}_2^{\cdot-}$ tenha acesso direto ao centro metálico durante a reação. O complexo metálico possui uma geometria octaédrica distorcida. Cada ião é ligado a quatro moléculas de H_2O e a dois átomos de N dos ligandos Sac^- em posições *trans*.

Recentemente ⁽³⁹⁾ foram preparados e testados novos complexos metálicos incorporando HSac e aminoácidos (aa) como ligandos, $\text{Na}_2[\text{M}(\text{Sac})_2(\text{aa})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$, onde $\text{M} = [\text{Cu}(\text{II}) \text{ ou } \text{Zn}(\text{II})]$, que revelaram atividade mimética da SOD. Estas estruturas estão a ser escrutinadas relativamente à sua potencial atividade anti-inflamatória, antirreumática e anticancerígena. O metal coordena com os aminoácidos (glicina, serina e glutamina) através dos terminais amino e carboxilato e com o Sac^- através do átomo de N . O complexo Cu-Sac-glutamina foi o que apresentou maior atividade mimética da SOD.

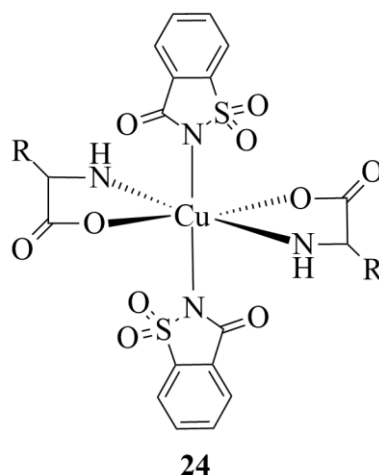


Figura 1.18 – Representação esquemática da proposta de estrutura de coordenação entre o cobre e os ligandos sacarina e glutamina. Adaptado de ⁽³⁹⁾.

1.1.6.3 – A sacarina em co-cristais farmacêuticos

Na última década, tem emergido o interesse em co-cristais farmacêuticos, que se apresentam como um método potencial para aumentar a biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade aquosa, oferecendo melhorias na solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade físico-química, fluidez, compressibilidade e higroscopicidade. Um co-cristal farmacêutico é constituído por um Ingrediente Farmacêutico Ativo (API) e por outros componentes denominados *co-formers*. ⁽²⁵⁾

A HSac afirmou-se como um bom *co-former*, pois atua como dador (*N-H*) e aceitador (*C=O* ou *S=O*) de ligações de *H*. Neste contexto, estudos ^(25,52) indicam que a HSac atua como um ácido fraco quando é co-cristalizada com fármacos que contêm um centro básico adequado. O uso geral da HSac como ácido fraco em produtos de química farmacêutica gera sacarinos de fármacos bastante solúveis, permitindo o seu uso em formulações injetáveis e em gotas. As formas injetáveis desses fármacos são menos propensas a causar irritação e outros efeitos colaterais na pele, visto que as soluções com Sac⁻ apresentam maiores valores de pH (5-6) que os cloridratos e outras formulações de sais comuns (pH 2-3). Acresce que o poder adoçante da HSac contribui para mitigar o sabor amargo de muitos fármacos. ⁽¹³⁾ Um exemplo de um fármaco

formulado como co-cristal é a indometacina (IND) [ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1*H*-indole-3-acético] (**25**), um fármaco com propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas. Os co-cristais de indometacina e HSac (IND-SAC) (**26**), formados através de interações *N-H* ···*O* representadas na Figura 1.19, mostraram melhor eficácia farmacológica, do que a forma não co-cristalizada, quando testados em cães. ^(25,52)

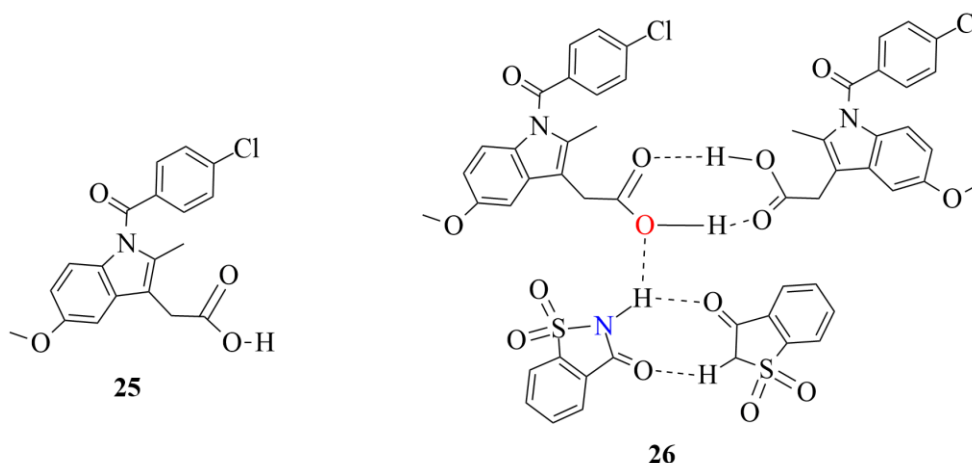


Figura 1.19 – Representação das estruturas da indometacina (**25**) e dos co-cristais IND-SAC (**26**). Adaptado de ⁽²⁵⁾.

1.1.6.4 – Atividade antibacteriana de derivados de sacarina

Estudos ⁽⁵³⁾ revelaram que a introdução do sistema benzisotiazolilico em derivados de piridazina e pirimidina potencia a atividade antibacteriana destes heterociclos. A *N*-[4-(dicianometilazo)fenil]-2-(sacarina-2-il)-acetamida (**27**) pode ser obtida a partir de (**28**) por acoplamento com malonitrilo em solução etanólica de acetato de sódio, a 0-5 °C. O composto (**28**) obtem.se por diazotização do grupo amina do conjugado anilino-sacarina precursor. O composto foi usado como bloco de construção na síntese de uma variedade de derivados de pirimidinas e piridazinas, que apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* contra estirpes das bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*.



Figura 1.20 – Representação da estrutura dos compostos *N*-[4-(dicianometilazo)fenil]-2-(sacarina-2-il)-acetamida (**27**) e do seu precursor derivado da sacarina (**28**). Adaptado de ⁽⁵³⁾.

Vários complexos de HSac-prata (I) di- e polinucleares com quatro ligandos fosfínicos, nomeadamente $[\text{Ag}(\mu\text{-Sac})(\text{PPh}_3)]_2$, $[\text{Ag}(\mu\text{-Sac})(\text{PPh}_2\text{Cy})]_2$, $[\text{Ag}(\mu\text{-Sac})(\text{PPhCy}_2)]_2$ e $[\text{Ag}(\mu\text{-Sac})(\text{PCy}_3)]_n$, cujas estruturas cristalográficas estão determinadas por raio-X, revelaram atividade antimicrobiana contra as espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*. As estruturas di- e polinucleares são obtidas através da química de coordenação do sistema benzisotiazolídico de Sac^- . Todos os grupos fosfino atuam como ligandos monodentados através do átomo de fósforo.⁽⁵⁴⁾

Com a necessidade imperativa de desenvolver novos antibióticos capazes de tratar infecções causadas por bactérias, foram estudados novos derivados de HSac contendo o sistema benzisotiazolídico e a porção 2-azetidinona (anel β -lactâmico). Alguns dos derivados, nomeadamente as azetodinonas (**29**) revelaram atividade antibacteriana.⁽¹⁰⁾

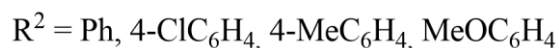
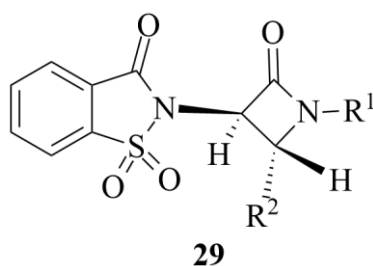


Figura 1.21 – Representação da estrutura das azetodinonas (**29**). Adaptado de ⁽¹⁰⁾.

1.1.6.5 – Atividade anti-inflamatória de derivados de sacarina

A *Human leukocyte elastase* (HLE), a catepsina G (CatG) e a proteinase 3 (PR3) são endopeptidases serínicas que são armazenadas nos grânulos dos neutrófilos e libertadas durante processos inflamatórios. Estas enzimas proteolíticas desempenham um papel relevante na fisiopatologia de doenças inflamatórias importantes como enfisema pulmonar, fibrose cística, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, psoríase, entre outras. A sua ineficiente regulação pelos inibidores fisiológicos pode resultar na degradação dos componentes principais da matriz extracelular.

Assim, os compostos que funcionem como inibidores potentes e seletivos destas enzimas são de elevado potencial terapêutico. São vários os derivados de HSac que mostraram ter uma atividade inibitória sobre estas enzimas, entre eles os derivados de 3-oxo-2,4,5- trifenilisotiazol-1,1-dióxido (**30**) e de 3-oxo-1,2,5-tiadiazolidina-1,1 dióxido (**31**), representados na Figura 1.22. ⁽⁵⁵⁻⁵⁹⁾

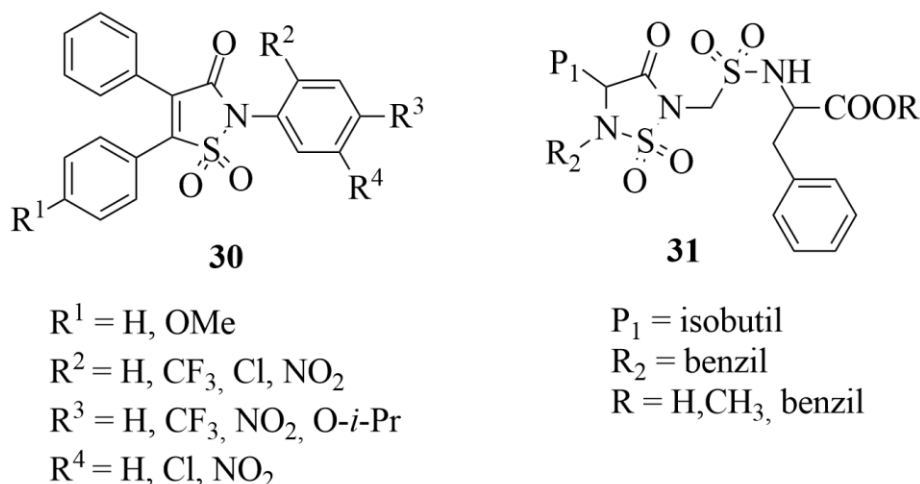


Figura 1.22 – Representação da estrutura dos derivados de 3-oxo-2,4,5-trifenilisotiazol-1,1-dióxido (30) e de 3-oxo-1,2,5-tiadiazolidina-1,1 dióxido (31). Adaptado de ^(58,59).

Recentemente, foi reportado ⁽⁶⁰⁾ que o derivado de sacarina *N*-(furan-2-il-metil)-*N*-{4-[(1,1,3-trioxo-2,3-dihidro-1λ⁶,2-benzisotiazol-2-il)metil]benzoil} carbamato (**32**; CU-CPD103) inibe a via de sinalização JAK/STAT1 mediada pelo interferão sem comprometer a eficácia de outros componentes do sistema imunitário inato. Esta via de sinalização é responsável por induzir a dimerização e regulação da expressão dos genes envolvidos na inflamação. O interferão (IFN) é um elemento central da sinalização

inflamatória, auxiliando na apresentação de antígenos, na imunomodulação e na defesa do hospedeiro contra patógenos. A ativação desta via de sinalização é geralmente benéfica, podendo proteger contra a infecção. No entanto, em patologias autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla a ativação da via de sinalização mediada pelo interferão pode ter efeitos nefastos.

O CU-CPD103 (**32**) é líder potencial no desenvolvimento de um fármaco aplicação terapêutica nas doenças acima descritas. ⁽⁶⁰⁾

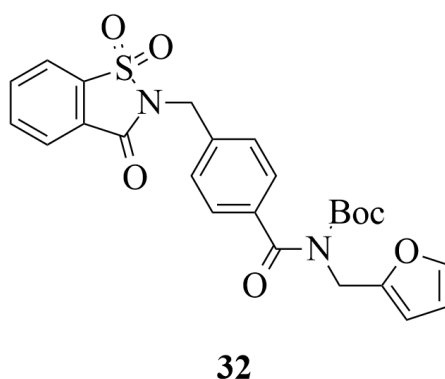


Figura 1.23 – Representação da estrutura do *N*-(furan-2-il-metil)-*N*-{4-[(1,1,3-trioxo-2,3-dihidro-1λ⁶,2-benzisotiazol-2-il)metil]benzoil}carbamato (**32**; CU-CPD103). Adaptado de ⁽⁶⁰⁾.

1.1.7 – Sacarinatos como antídoto para envenenamento por metais

1.1.7.1 – Metais e sua importância na saúde

Os metais são constituintes fundamentais do nosso meio ambiente, apresentando-se maioritariamente na forma de sais. ⁽⁶¹⁻⁶³⁾

Além do papel que desempenham na natureza, os metais são também parte integrante da estrutura e função dos organismos vivos. De entre os metais que afetam funções biológicas, o cobre, o cromo, o cobalto, o ferro, o zinco e o manganês, são os mais conhecidos. No organismo humano a homeostasia dos metais apresenta limites bem definidos e as perturbações nos processos de regulação podem originar manifestações tóxicas graves, associadas a inúmeras doenças. ⁽⁶³⁻⁶⁵⁾ Adicionalmente aos

fenômenos naturais, são as atividades antropogênicas as principais responsáveis pela contaminação ambiental e exposição humana aos metais. A absorção de metais pelo organismo pode ocorrer por várias vias, por exemplos através da dieta, da exposição a ambientes poluídos ou do consumo de fármacos. ⁽⁶¹⁻⁶³⁾

Através do uso controlado de agentes quelantes é possível manter as concentrações de íons metálicos no intervalo de valores fisiológicos tidos como normais. ⁽⁶²⁾ Dada a importância dos diversos metais acima referenciados ao nível biológico e patológico, a área da terapêutica quelante tem sido objeto de investigação, na perspectiva do desenvolvimento de novas abordagens farmacêuticas. Nesta dissertação será dada ênfase ao cobre, pois este metal apresenta relevância no âmbito das propriedades e aplicações de sacarinos em estudo no grupo OrgMedChem, onde foram desenvolvidos alguns sacarinos que funcionam como quelantes multidentados e que apresentam seletividade para o cátion Cu(II).

A nível biológico, o cobre participa nos processos associados ao transporte de elétrons, atuando como cofator enzimático em reações redox. ^(63,64) O cobre presente no organismo encontra-se majoritariamente na forma oxidada, o íon cúprico Cu(II), ou na forma reduzida, o íon cuproso Cu(I).

Alterações no seu metabolismo normal convertem-no num agente tóxico, sendo a sua toxicidade potencial relacionada com a capacidade de gerar ROS que podem reagir com biomoléculas, como lípidos, proteínas ou ácidos nucleicos, induzindo processos apoptóticos. ^(64,66,67) O stress oxidativo provocado pelo cobre pode ser induzido através da reação de Fenton ou pela diminuição da concentração de glutathiona. ^(68,69)

Recentemente surgiram resultados importantes da investigação sobre o papel do cobre na etiologia e crescimento dos tecidos tumorais, onde o nível de stress oxidativo é elevado, tendo sido reportado a distribuição cobre está alterada em tecidos tumorais, pois a proliferação das células cancerígenas requer uma maior abundância de Cu(II) do que as células normais correspondentes. ^(18,70-72) A literatura ^(73,74) realça ainda que o desenvolvimento, a incidência, a regressão e a possibilidade de recidiva de diversos tumores se relacionam com a concentração deste metal.

O cobre desempenha um papel essencial em processos celulares realizados no cérebro. Estudos realizados por diversos autores revelam que no cérebro de doentes de

Alzheimer se observa um decréscimo da concentração total do metal e o desequilíbrio na quantidade de cobre presente no sistema nervoso central foi implicado como fator relevante em vários processos associados à doença, como a agregação amiloide, a hiperfosforilação da proteína tau e a neuro-toxicidade provocada pelas ROS produzidas. Todos estes fatores favorecem a neurodegeneração e o aumento da morte neuronal, características da doença de Alzheimer. ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾

Foi também demonstrado que certas mutações no gene ATP7B provocam alterações na eliminação do cobre com a consequente acumulação deste metal no organismo, principalmente no fígado, cérebro e olhos, desencadeando manifestações clínicas características da doença de Wilson. ^(78,79)

1.1.7.2 – Agentes quelantes em sistemas biológicos

Entende-se por agente quelante um composto orgânico ou inorgânico que se liga a íons metálicos em excesso, ou tóxicos, formando complexos que são facilmente excretados. ⁽⁶²⁾ A terapia quelante é utilizada desde o século XX, tendo assumido especial relevância no tratamento de intoxicações por metais pesados como o arsénio, o chumbo, o mercúrio, entre outros.

Contudo, rapidamente se tornaram evidentes as limitações dos compostos quelantes usados que, embora eficazes, apresentavam efeitos adversos, falta de seletividade e baixo índice de segurança, entre outras desvantagens. Idealmente a molécula utilizada em terapia quelante deve possuir grande afinidade para o metal, capacidade de penetrar nas células, com uma distribuição semelhante à do metal a eliminar, capacidade de formar complexos estáveis e que não sejam tóxicos, elevada solubilidade em água, metabolismo reduzido e rápida eliminação. ^(28,62)

A quelação do cobre, emergiu como uma potencial solução terapêutica para a neurotoxicidade causada pela rotura da homeostasia deste metal. Os compostos XH1 (**33**) e clioquinol (**34**) (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina), representados na Figura 1.24, têm sido objeto de investigação no contexto da doença de Alzheimer. ⁽⁷⁶⁾ Por sua vez, o quelante tetratiomolibdato (**35**; TTM), também representado na Figura 1.24, demonstrou potencial no controlo dos níveis de Cu(II) livre na doença de Wilson, contudo apresenta toxicidade. ⁽⁸⁰⁾

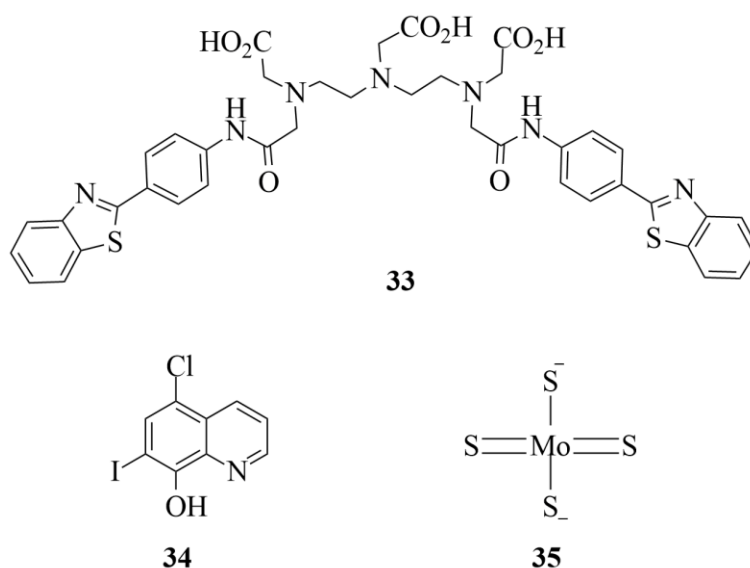


Figura 1.24 – Representação das estruturas dos compostos XH1 (33), clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) (34) e tetratiomolibdato (35; TTM). Adaptado de ^(76,80).

As terapêuticas antineoplásicas convencionais à base de complexos de platina apresentaram limitações principalmente devido ao seu ataque indiscriminado a todas as células do organismo, contribuindo para uma alta severidade e diversidade dos efeitos adversos. ^(81–83) A elevada taxa de divisão das células cancerígenas, com rápido desenvolvimento de resistências, também comprometeu a eficácia dos agentes de alquilação baseados em complexos de platina. ^(84,85)

Como consequência, os estudos têm incidido na comparação das concentrações dos metais zinco, selênio e cobre, no sangue e em tecidos tumorais de pacientes com cancro, com as correspondentes concentrações observadas em indivíduos saudáveis. No decurso da investigação verificou-se que os valores de Cu(II) eram os únicos que aumentavam significativamente em pacientes com cancro, concluindo que as diferenças observadas sustentam o desenvolvimento de ferramentas seletivas para a quimioterapia do cancro. ^(86–88) Além da observação de que a proliferação de células cancerígenas requer uma maior abundância de Cu(II) do que as células normais correspondentes, descobriu-se que as propriedades apoptóticas do Elesclomol (36), um candidato a fármaco antineoplásico, resultam da sua coordenação com o Cu(II) (37) (Figura 1.25).

Estudos do mecanismo de ação do Elesclomol, que complexa com Cu(II) celular, indicam que o composto conduz à formação de ROS, induzindo stress oxidativo e apoptose celular. Tanto o ligando como o seu complexo com o Cu(II) mostraram inibir o crescimento celular, ativando os mecanismos que conduzem à apoptose. ⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾

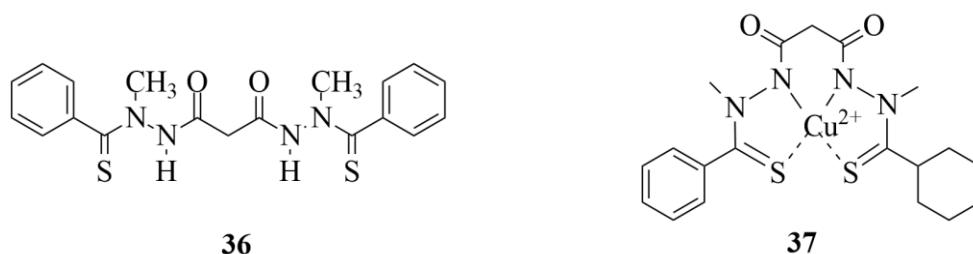


Figura 1.25 – Representação das estruturas do Elesclomol como ligando (36) e como complexo resultante da sua coordenação com o metal Cu (II) (37). Adaptado de ^(89,90).

Considerando a influência do cobre na produção de ROS e o papel destes na carcinogênese, foram investigados outros compostos com capacidade quelante de cobre, entendendo-se que permitiram alcançar dois objetivos: 1) a formação de complexos de cobre citotóxicos que conduzam à apoptose celular; 2) a sequestração do metal, diminuindo a sua disponibilidade no ambiente tumoral e assim comprometendo a progressão do tumor. Assim, os quelantes de cobre livres são vistos como potenciais precursores de agentes citotóxicos seletivos, atuando como pró-fármacos não citotóxicos que podem ser internalizados pelas células cancerígenas, onde complexam os iões de Cu(II) intracelulares (presentes em concentrações elevadas quando comparadas a células normais), gerando complexos que podem levar à morte celular. ⁽¹⁹⁾

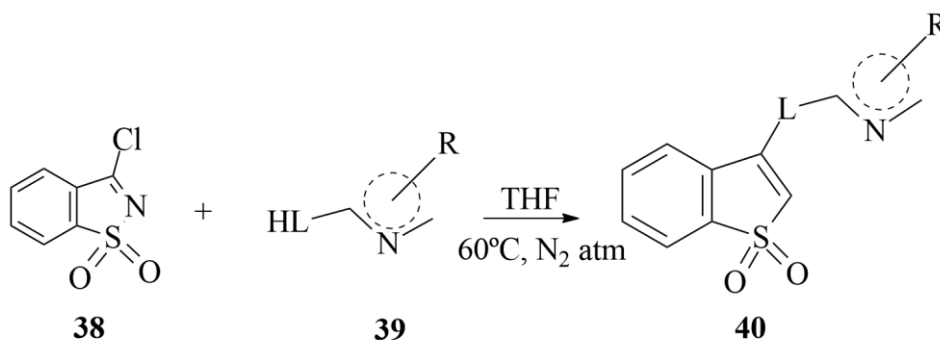
Embora o conceito de quelação seja simplesmente baseado em química de coordenação, a evolução de uma terapia de quelação baseada num quelante ideal que remova completamente um metal tóxico específico do local do corpo desejado envolve uma abordagem integrada de design de fármacos. ⁽⁶²⁾ A sua eficácia, *in vivo*, requer que grande parte do composto administrado seja específico e seletivo para o metal que se pretende eliminar. Esta condição depende do metal, do agente quelante e de características relacionadas com o próprio organismo. É importante ter em conta a toxicidade do composto quelante, assim como do complexo resultante. Pretende-se um equilíbrio entre características hidrofílicas e lipofílicas, pois os compostos hidrofílicos promovem a excreção renal, mas têm dificuldade em aceder ao metal no meio

intracelular. Por outro lado, um elevado carácter lipofílico mobiliza facilmente a fração intracelular, mas contudo conduz a uma maior redistribuição do metal por todo o organismo, incluindo no sistema nervoso central. ⁽⁹²⁾

Em suma, é necessário o desenvolvimento de novas moléculas, com capacidade quelante e propriedades otimizadas. Para aplicação farmacológica, a biocompatibilidade e a seletividade dos compostos são requisitos fundamentais para o desenvolvimento de estratégias que permitam alcançar melhores resultados terapêuticos.

1.1.7.3 – Sacarinos como agentes quelantes

Tendo por base a estrutura e as propriedades da sacarina e sacarinos, nomeadamente no que se refere à utilização em química de coordenação, surgiram vários estudos ^(13,18,19) sobre o desenvolvimento de derivados de HSac (3-oxo-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido) como agentes quelantes otimizados, para aplicações farmacológicas e também em catálise. Todos os compostos se baseiam na química de coordenação de sacarinos revelando a capacidade do sistema benzisotiazolílico para atuar como um ligando multidentado ou como um grupo de ligação em estruturas polinucleares. A otimização estrutural do ligando é facilitada pelo facto de o sistema benzisotiazolílico poder ligar-se a outro heterociclo através de estratégias de síntese convergente. Usando o 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (**38**; cloreto de sacarina), como bloco de construção, e através do acoplamento com os heterociclos tetrazole ou tiadiazole preparou-se uma biblioteca diversificada de conjugados que incorporam o sistema benzisotiazolílico (Figura 1.26). ⁽¹⁸⁾ A ligação entre o sistema heterocíclico benzisotiazole e o heterociclo parceiro é estabelecida através de um grupo funcional específico que funciona como ponte. ⁽¹⁹⁾ Os heterociclos tetrazoles e tiadiazoles são caraterizados mais adiante nos capítulos 1.2 e 1.3, respetivamente.



39 = Anéis de 5 membros insaturados: Tetrazoles/Tiadaizoles

R=H,alquilo,fenilo

L=NH,S

Figura 1.26 – Representação esquemática da reação de acoplamento entre 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (38) e os heterociclos tetrazole ou tiadiazole. Adaptado de ⁽¹⁸⁾.

Os ligandos tetrazole-5-aminosacarinato (**41**; TS) e 2-metiltetrazole-5-aminosacarinato (**42**; 2MTS), foram avaliados relativamente à sua atividade quelante para cátions divalentes. Estes ligandos exibiram uma forte seletividade, e afinidade de ligação, para o cátion Cu(II).

Ao contrário dos ligandos, os respetivos complexos de cobre (II) baseados em TS (**43**) e 2MTS (**44**), cujas estruturas estão representadas na Figura 1.27, exibiram elevada toxicidade *in vitro* contra a linha celular humana de carcinoma hepatocelular HepG2, revelando o potencial de TS (**41**) e 2MTS (**42**) para o desenvolvimento de novas estratégias antineoplásicas baseadas em terapia quelante. ⁽¹⁹⁾

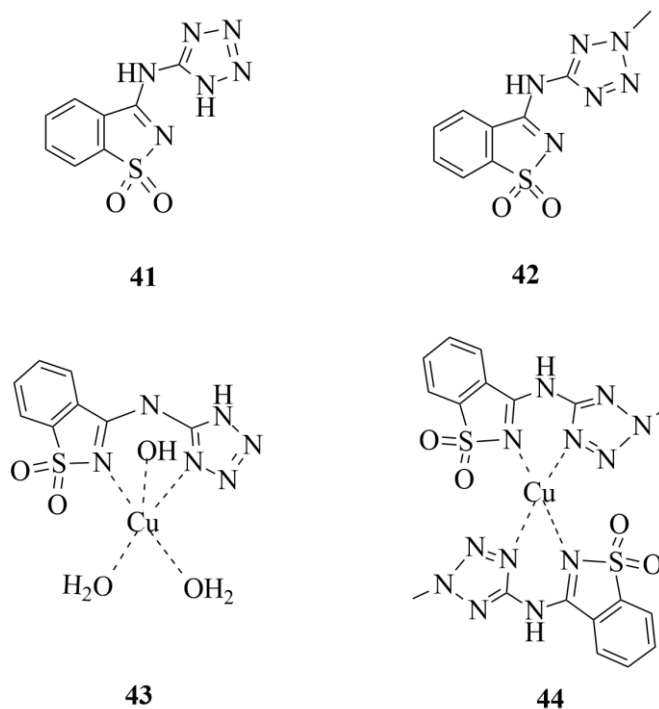


Figura 1.27 – Representação da estrutura dos ligandos tetrazole-5-aminosacarinato (41; TS) e 2-miltetrazole-5-aminosacarinato (42; 2MTS) e dos respectivos complexos de coordenação com o cátion divalente Cu(II), (43) e (44). Adaptados de ⁽¹⁹⁾.

Contudo, os tetrazole-sacarinos são fotolábeis devido à fotoreatividade dos tetrazoles. Considerando as propriedades dos tiadiazoles, (mais fotoestáveis que os tetrazoles), foi proposta a sua incorporação em conjugados à base de sacarina. Foi preparado um tiadiazole-sacarinato, ligando o bloco tiadiazólfico ao sistema heterocíclico benzisotiazole através de um grupo funcional sulfanilo que funciona como ponte, do inglês “sulphanyl-bridged thiadiazolyl-saccharinate”. O ligando resultante, 3-[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)sulfanil]-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (45; MTSB), revelou elevada fotoestabilidade após irradiação com luz na gama espectral do UV. A interação *S*...*N* mostrou desempenhar um papel importante na estrutura da molécula, no cristal. Os complexos de Cu(II) baseados em MTSB exibiram toxicidade, *in vitro*, para 6 linhas celulares cancerígenas sem afetar as células normais. Este sacarinato demonstrou eficácia para as linhagens celulares humanas de linfoma U937, neuroblastoma SH-SY5 e carcinoma hepatocelular HepG2. Portanto, consideramos que o MTSB (45) representa um composto promissor para quimioterapia com base em agentes quelantes. ⁽¹⁸⁾

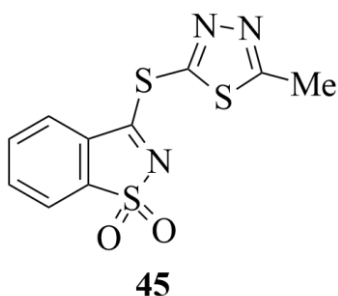


Figura 1.28 – Representação da estrutura do ligando 3-[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)sulfanil]-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (45; MTSB). Adaptado de ⁽¹⁸⁾.

1.2 – Tetrazoles

1.2.1 – Informação geral: propriedades, síntese e aplicações

O amplo interesse nos tetrazoles advém principalmente das suas potenciais aplicações em áreas como medicina, química de coordenação, desenho e desenvolvimento de novos fármacos, agricultura, indústria automóvel, tecnologia de imagens, entre outros.

Os derivados de tetrazoles podem ser classificados em: 1-, 2- e 5-monosubstituídos; 1,5- e 2,5 di-substituídos; sais tetrazolíficos tri-substituídos. São várias as metodologias desenvolvidas para a preparação de compostos com um sistema de anel de tetrazole, principalmente para a preparação de tetrazoles substituídos na posição 5 devido às importantes aplicações em química medicinal. ⁽⁹³⁾

Nos últimos anos, foram obtidos resultados relevantes no desenho de novos candidatos a fármacos contendo o anel tetrazolífico para utilizações como agentes antibacterianos ⁽⁹⁴⁾, antialérgicos ⁽⁹⁵⁾, analgésicos ⁽⁹⁶⁾ e anti-inflamatórios. ⁽⁹⁷⁾

Os derivados de tetrazoles têm sido utilizados como reagentes e catalisadores, em estratégias de síntese orgânica e bioorgânica. ⁽⁹³⁾ Adicionalmente, exibem boas propriedades de coordenação e são capazes de formar complexos estáveis com vários

iões metálicos. Esta propriedade é usada com sucesso em química analítica, para remoção de iões de metais pesados presentes em misturas no estado líquido, e em sistemas químicos formulados para proteção de metais contra a corrosão. A par de todas estas aplicações, os tetrazoles são moléculas muito interessantes do ponto de vista estrutural. O tetrazole não substituído (CN_4H_2) contém o número máximo de átomos de N , entre os sistemas heterocíclicos estáveis não substituídos, razão pela qual os tetrazoles exibem valores extremos de acidez/basicidade, e de constantes de formação, nos complexos que originam. Os átomos de H diretamente ligados ao anel são instáveis e podem dar origem a diferentes tautómeros, sendo que as suas populações relativas dependem do ambiente químico. Os tetrazoles exibem uma fotoquímica muito rica, fortemente influenciada pela natureza dos substituintes no anel tetrazolílico. A fotoreatividade destes heterociclos, em solução e no ambiente rígido de matrizes sólidas, tem sido objeto de intensa investigação. A informação recolhida revela o potencial dos tetrazoles como fotoprecusores de uma alta variedade de novas estruturas químicas.⁽⁹³⁾

1.2.2– Tetrazoles como ligantes

Os tetrazoles possuem uma excelente capacidade de coordenação para os quatro átomos de N do anel tetrazolílico, podendo atuar como um ligando multidentado ou como bloco de construção em ponte em estruturas supramoleculares. As interações do anel tetrazolílico com os centros metálicos estão representadas na Figura 1.29. Assim, o tetrazole neutro (Interações I-IV) pode funcionar como um ligante dinuclear ou trinuclear, enquanto a sua forma desprotonada (Interações V-X) pode ligar dois, três ou quatro iões metálicos.⁽⁹⁸⁾

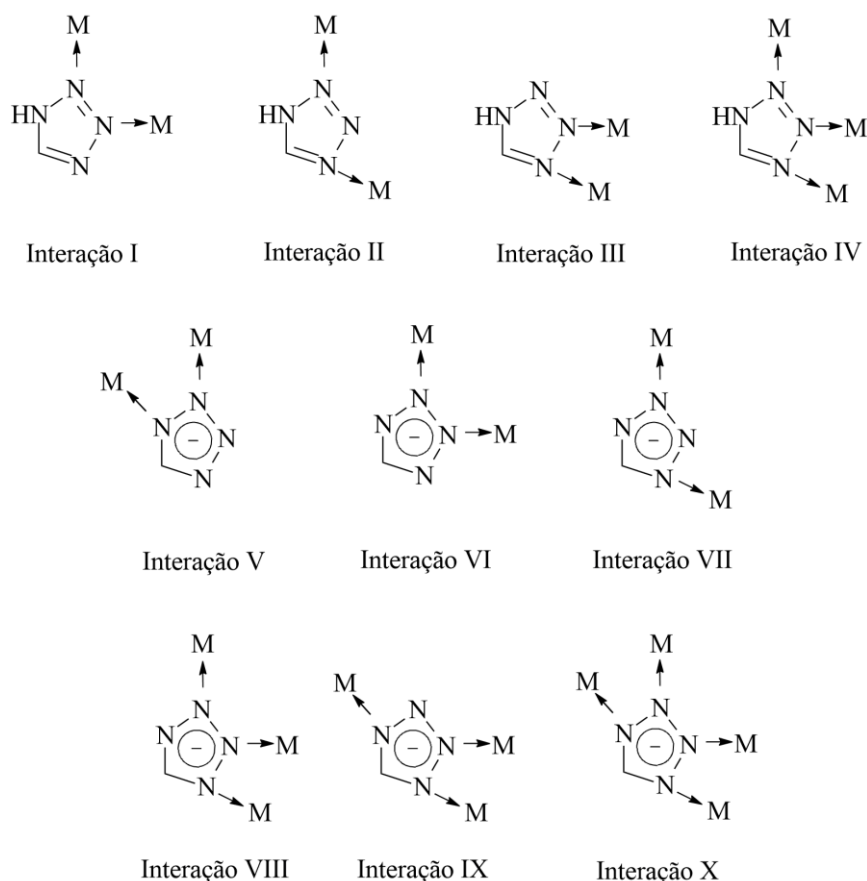


Figura 1.29 – Representação das diferentes interações do anel tetrazole com os centros metálicos, na forma neutra (I-IV) e desprotonada (V-X). Adaptado de ⁽⁹⁹⁾.

Vários derivados de tetrazole coordenados com diferentes centros metálicos, entre eles, níquel, rutênio, paládio ou platina, foram testados em reações de catálise. ⁽¹⁰⁰⁾

Em alguns ligandos, o heterociclo tetrazole coexiste com outros heterociclos, entre eles os derivados de benzisotiazoles (sacarina). O tetrazole-sacarinato, 2-[1-(1*H*-tetrazol-5-il)-etil]-3-oxo-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido, pode existir em duas formas tautoméricas, representadas na Figura 1.30. O 1*H*-tautômero (**46**) mostrou ser estável, devido à presença de uma interação por pontes de *H* ($NH \cdots O=X$, onde $X = S, C$), que está ausente no 2*H*-tautômero (**47**). O conjugado apresenta um centro quiral, sendo os dois enantiômeros espectroscopicamente equivalentes. ⁽¹⁰¹⁾

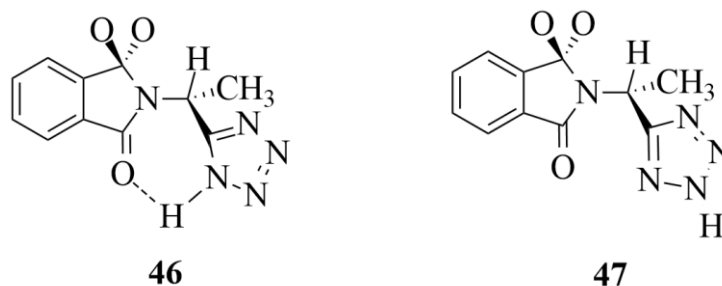


Figura 1.30 – Representação da estrutura das formas tautoméricas do conjugado tetrazole-sacarinato,2-[1-(1*H*-tetrazol-5-il)-etil]-3-oxo-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido. Adaptado de ⁽¹⁰¹⁾.

1.3– Tiadiazoles

1.3.1 – Informação geral: propriedades, síntese e aplicações

Como referido anteriormente, ligandos heterocíclicos com vários átomos doadores que contenham átomos de *N* e de *S* possuem uma capacidade versátil de coordenação com vários íons de metais de transição, participando na síntese e aplicação de compostos de coordenação bioativa e biomimética. Nesse campo, os tiadiazoles assumem uma importância excepcional na construção de complexos metálicos de diferentes tipos, sendo elementos estruturais fundamentais para muitos produtos farmacêuticos e químicos. Os quatro isômeros distintos que o anel tiadiazolífico pode assumir estão representados na Figura 1.31. ⁽¹⁰²⁾

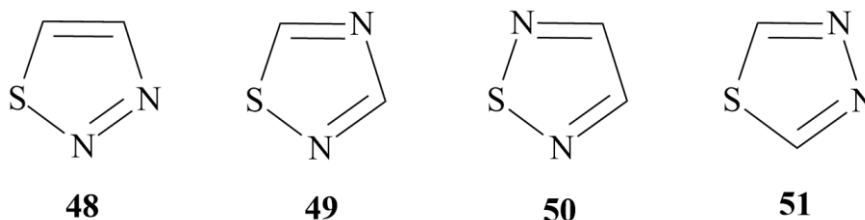
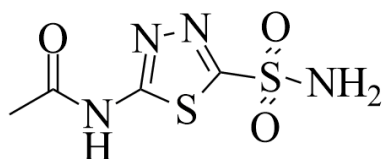


Figura 1.31 – Representação da estrutura de tiadiazoles: 1,2,3-tiadiazole (48), 1,2,4-tiadiazole (49), 1,2,5-tiadiazole (50) e 1,3,4-tiadiazole (51). Adaptado de ⁽¹⁰²⁾.

O 1,3,4-tiadiazole (**51**) é o mais utilizado na química de coordenação, exibindo um amplo espectro de atividades biológicas que incluem ação anticancerígena, antimicrobiana, antituberculosa, anti-inflamatória, antidepressiva e anti-hipertensiva. Um dos exemplos mais conhecidos de fármacos contendo o heterociclo 1,3,4-tiadiazol é a acetazolamida (**52**), de nome comercial Diamox®, cuja estrutura esta representada na Figura 1.32. É um inibidor da CA, usado no tratamento e prevenção de doenças tromboembólicas e glaucoma. Além das aplicações farmacêuticas, o composto também é utilizado em agroquímica, ótica e eletroquímica. ^(102,103)



52

Figura 1.32 – Representação da estrutura da acetazolamida (52). Adaptado de ⁽¹⁰²⁾.

Os 1,3,4-tiadiazoles podem ser obtidos a partir de acil- ou tio-hidrazinas, de 1,3,4-oxadiazoles e de 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazoles. ⁽¹⁰³⁾ A figura 1.31 apresenta três exemplos de estratégias de síntese de compostos: A) a partir de diacil-hidrazina, através de uma síntese assistida por microondas; B) através da interconversão de 1,3,4-oxadiazoles, por reação com tioureia e THF; C) tratando diferentes derivados de 4-amino-5-mercaptop-1,2,4-tiadiazoles com dissulfeto de carbono (CS₂), etanol (EtOH) e hidróxido de potássio (KOH). ⁽¹⁰²⁾

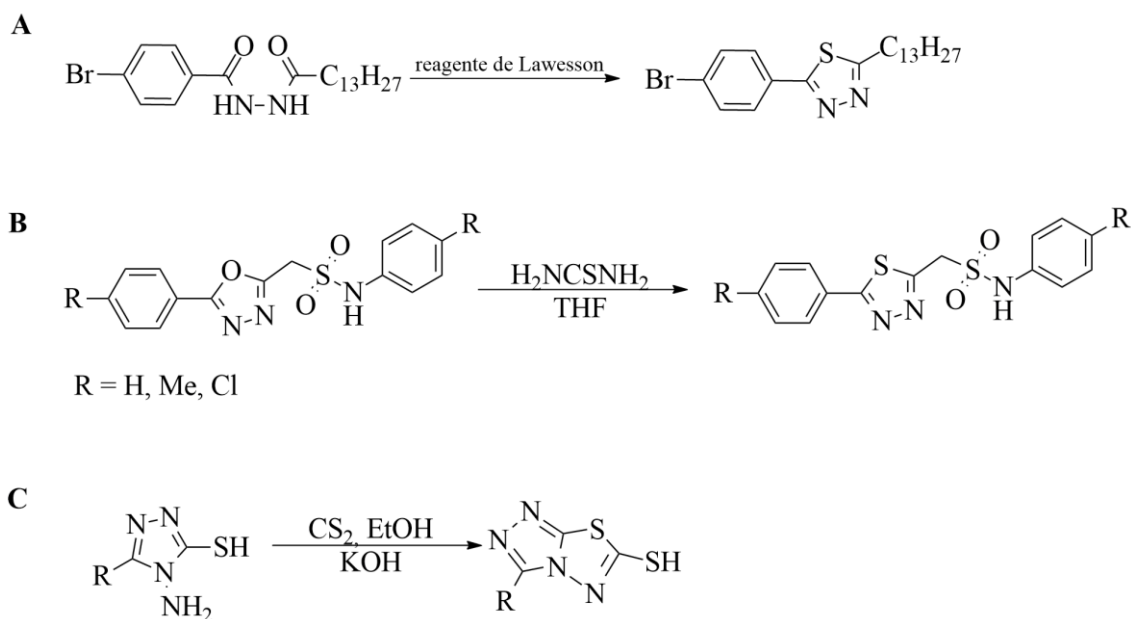


Figura 1.33 – Representação esquemática de alguns dos métodos usados na síntese de tiadiazoles. Adaptado de ^(102,103).

1.3.2– Tiadiazoles como ligantes

A capacidade como ligante dos tiadiazoles é atribuída à presença de átomos de *N* e de *S* doadores no anel de cinco membros, sendo fortemente influenciada pelos substituintes ligados ao heterociclo. A capacidade de coordenação dos átomos de *N* presentes no anel é geralmente superior à expressa pelo átomo de *S*. Os tiadiazoles apresentam boa capacidade de aceitação de elétrons. ⁽¹⁰²⁾

2 – Síntese de novos sacarinos e avaliação da sua capacidade quelante

A HSac e os seus derivados têm sido amplamente estudados ao longo do último século, devido à sua relevância em vários setores de atividade, nomeadamente na indústria alimentar. A estabilidade térmica e fotoquímica do sistema benzisotiazolílico encoraja e suporta as recentes aplicações e potenciais usos da HSac e sacarinos, como é o caso da formulação de líquidos iónicos e de co-cristais. Em síntese orgânica e bioorgânica, os derivados de HSac são conhecidos como compostos de partida baratos e versáteis para a preparação de outras classes de compostos heterocíclicos.

Vários estudos destacaram a química de coordenação da HSac enfatizando a potencialidade do sistema benzisotiazolílico para atuar como um ligando multidentado e também como grupo de ligação em estruturas polinucleares. O anião Sac⁻, formado por desprotonação do grupo $-NH$ benzisotiazolílico oferece diferentes locais de coordenação com centros metálicos, permitindo a formação de complexos baseados em HSac e sacarinos, com aplicações documentadas nas mais diversas áreas e abordadas ao longo dos capítulos 1.1.6 e 1.1.7. Entre eles, foram referidos vários estudos sobre o desenvolvimento de sacarinos como agentes quelantes otimizados para aplicações farmacológicas e também para catálise, onde a otimização estrutural do ligando é facilitada pelo facto de o sistema benzisotiazolílico poder ligar-se a outro heterociclo através de estratégias de síntese convergente.

As propriedades da HSac e sacarinos continuam a ser objeto de estudo, na perspectiva do desenvolvimento de novas aplicações.

Neste contexto, a presente dissertação foi complementada por um projeto laboratorial que consistiu na síntese de novos sacarinos, em que o sistema heterocíclico benzisotiazole está ligado a outro heterociclo, um tetrazole ou um tiadiazole, através de um grupo funcional específico que funciona como ponte. Fez-se a avaliação da capacidade destas moléculas enquanto ligandos multidentados seletivos para a coordenação com os metais de transição e das suas propriedades, nomeadamente para atuar como agentes quelantes seletivos e também do seu potencial antioxidante, com o objetivo de explorar potenciais aplicações farmacológicas.

Este projeto laboratorial insere-se no projeto INNOVATE em que participa o grupo de Reatividade Orgânica e Química Medicinal (OrgMedChem) do CCMAR (<https://www.ccmар.ualg.pt/en/group/organic-reactivity-and-medicinal-chemistry>).

Neste capítulo serão apresentadas e descritas detalhadamente as metodologias de síntese usadas pelo autor. Os sacarinos preparados podem subdividir-se em dois grupos de ligandos multidentados de *N*, os tetrazole-sacarinos e os tiadiazole-sacarinos.

Serão também apresentadas e descritas detalhadamente as metodologias aplicadas na realização dos testes de atividade quelante e de atividade antioxidante aos ligandos sintetizados.

2.1 – Abordagem sintética geral para a preparação de tetrazole-sacarinatos e tiadiazol-sacarinatos

Os novos ligandos foram preparados utilizando uma estratégia sintética convergente em que os dois blocos de construção contendo os heterociclos **(38)** e **(53)**, para os sacarinato-tetrazoles (Figura 2.1 – A), e **(38)** e **(54)**, para os sacarinato-tiadiazoles (Figura 2.1 - B), foram separadamente sintetizados e depois acoplados para formar os conjugados alvo **(55)** e **(56)**, respetivamente. Em ambos os tipos de ligandos utilizou-se 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (**38**; cloreto de sacarina) como um dos blocos de construção.

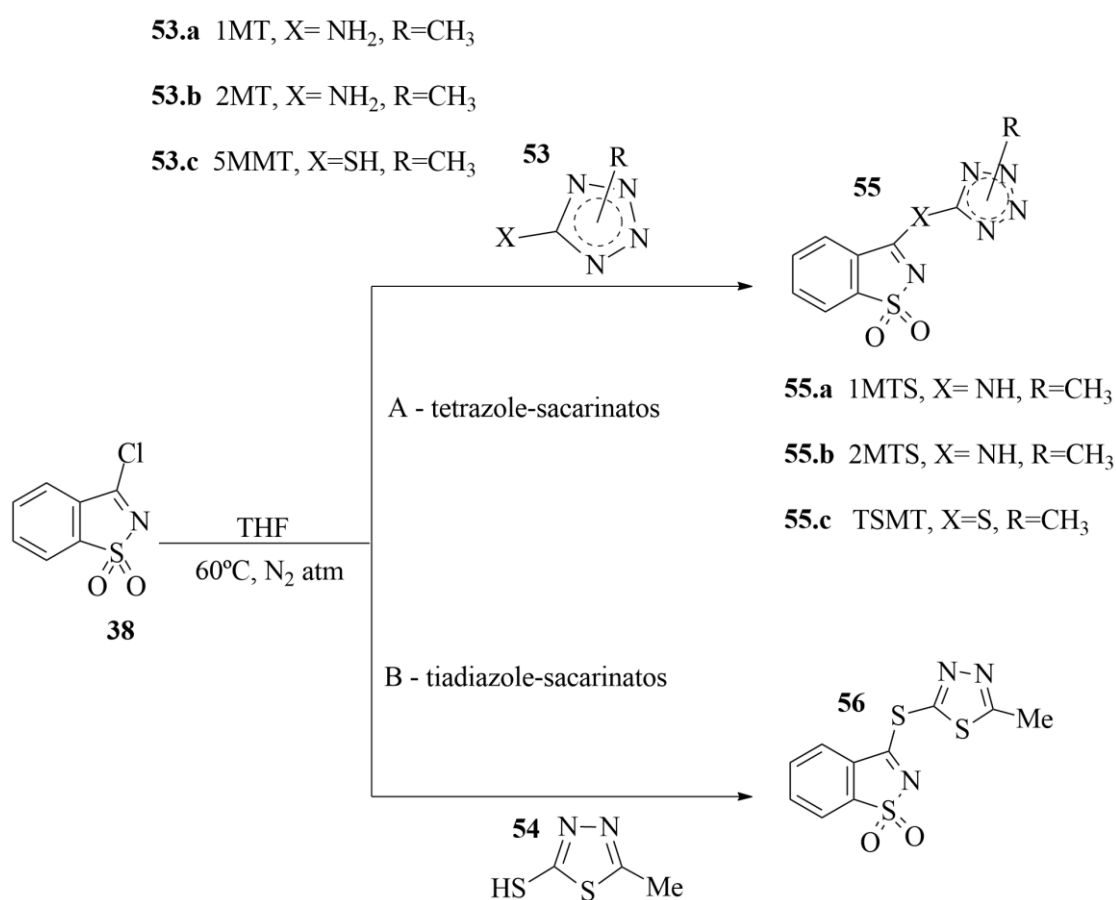


Figura 2.1 – Representação esquemática da estratégia de síntese dos tetrazole-sacarinatos e tiadiazole-sacarinatos preparados pelo autor.

2.1.1 – Síntese do bloco de construção 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (**38**; cloreto de sacarina)

O cloreto de sacarina (**38**) foi sintetizado a partir da HSac (**1**) comercialmente disponível, através da halogenação usando pentacloreto de fósforo (PCl_5) (**57**) a 220°C . A reação envolve a formação de cloreto de sulfonilo (**58**) como composto intermédio que cicliza originando o produto desejado, tal como mostra a Figura 2.2. O processo envolve o ataque do cloreto ao átomo de carbono no grupo ciano. ⁽¹⁰⁴⁾

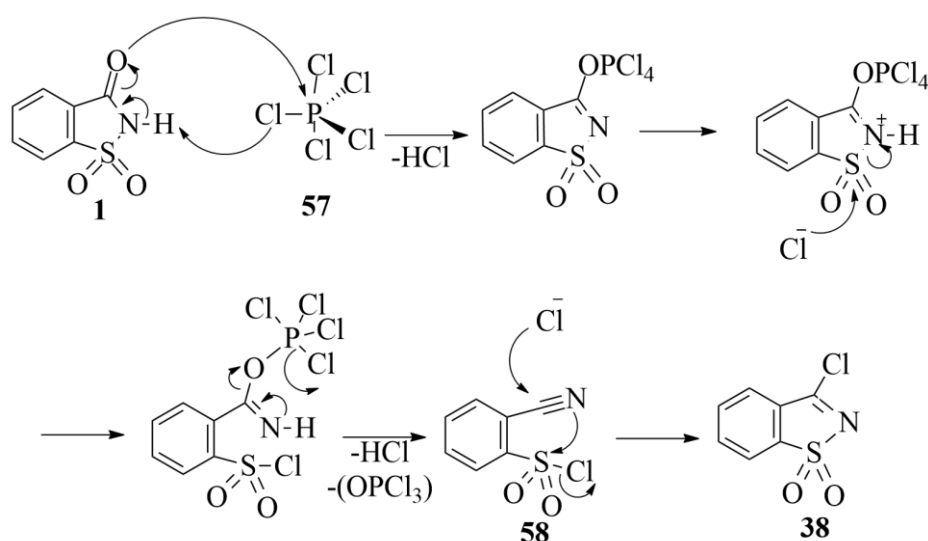
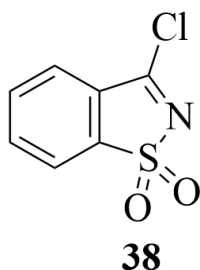


Figura 2.2 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a halogenação da sacarina (**1**), com formação do cloreto de sacarina (**38**). Adaptado de ⁽¹⁰⁴⁾.

2.1.1.1– Detalhes experimentais relativos à preparação de 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (**38**; cloreto de sacarina)



Aqueceu-se uma mistura de sacarina (25,00 g; 136,50 mmol) e pentacloreto de fósforo (30,88; 150,04mmol), (1,1 equivalentes), a 220°C durante 3h30min. Deixou-se arrefecer a mistura até aos 180°C e removeu-se o oxiclreto de fósforo e ácido clorídrico do meio de reação por destilação sob vácuo. Adicionou-se tolueno quando a temperatura da mistura atingiu 100°C, e posteriormente clorofórmio quando a mistura atingiu 70°C (1:9), deixou-se cristalizar o produto à temperatura ambiente. Os cristais formados foram lavados com uma mistura de tolueno e clorofórmio, previamente arrefecida. Obtiveram-se cristais incolores (7,43g; 27,11%). p.f. 142-145°C (literatura⁽¹⁰⁴⁾ 143 – 145°C); ¹H NMR 400 MHz, DMSO):δ 8.17 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 25.1, 7.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 160.61 (s), 139.17 (s), 135.72 (s), 134.89 (s), 127.32 (s), 124.95 (s), 121.26 (s).

2.1.2 – Preparação dos conjugados tetrazole-sacarinato

Os ligandos tetrazole-sacarinato *N*-(1-metil-1*H*-tetrazol-5-il)-2,3-dihidro-1,2-benzisotiazole-3-amina-1,1-dióxido (**55.a**; 1MTS), *N*-(2-metil-2*H*-tetrazol-5-il)-1,2-benzisotiazole-3-amina-1,1-dióxido (**55.b**; 2MTS) e 3-((1-metil-1*H*-tetrazol-5-il)tio)-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (**55.c**; TSMT) foram preparados seguindo a estratégia esquematizada na Figura 2.1 – A. Para além destas sínteses, tentou-se a oxidação do composto TSMT **55.c**. Os detalhes estão descritos no mais adiante em 2.1.2.7.1.

Na síntese de 1MTS (**55.a**), utilizou-se como blocos de construção o cloreto de sacarina (**38**) (descrito em 2.1.1) e 1-metil-5-aminotetrazole (**53.a**; 1MT). Para a preparação de 2MTS (**55.b**) foram usados como blocos de construção cloreto de sacarina (**38**) (descrito em 2.1.1) e 2-metil-5-aminotetrazole (**53.b**; 2MT). Para a preparação de TSMT (**55.c**), partiu-se dos blocos de construção cloreto de sacarina (**38**) (descrito em 2.1.1) e 5-mercaptop-1-metiltetrazole anidro (**53.c**; 5MMT), foi utilizado a partir da fórmula comercialmente disponível. Os blocos 1MT (**53.a**) e o 2MT (**53.b**) foram preparados a partir do 5-aminotetrazole monohidratado (**59**).

2.1.2.1 - Síntese dos blocos de construção 1- e 2-metil-5-aminotetrazole

As reações de alquilação de tetrazoles 5-monosubstituídos decorrem geralmente em meio alcalino, pois nestas condições os tetrazoles 5-monosubstituídos podem reagir como aniões livres. A reação de metilação de 5-aminotetrazole monohidratado (**59**) com o agente de metilação dimetil sulfato (**60**), em meio alcalino, leva à formação dos isômeros 1MT (**53.a**) e 2MT (**53.b**), de acordo com a proposta mecanística na Figura 2.3. A formação destes isômeros é controlada pelas propriedades de um intermediário instável formado no passo limitante da reação. Por sua vez, o *ratio* de 1MT (**53.a**) e 2MT (**53.b**) formados durante a reação é influenciado pela temperatura da reação, pelas propriedades eletrônicas e espaciais dos substituintes na posição 5 do anel tetrazole (principalmente efeitos estéricos) e pela reatividade do eletrófilo. Geralmente, temperaturas reacionais altas favorecem a metilação na posição 1, enquanto substituintes volumosos na posição 5 influenciam a metilação na posição 2. Assim, é esperado que o isômero 1MT (**53.a**) predomine. Os isômeros têm diferentes solubilidades, podendo ser separados durante o procedimento. ^(48,105)

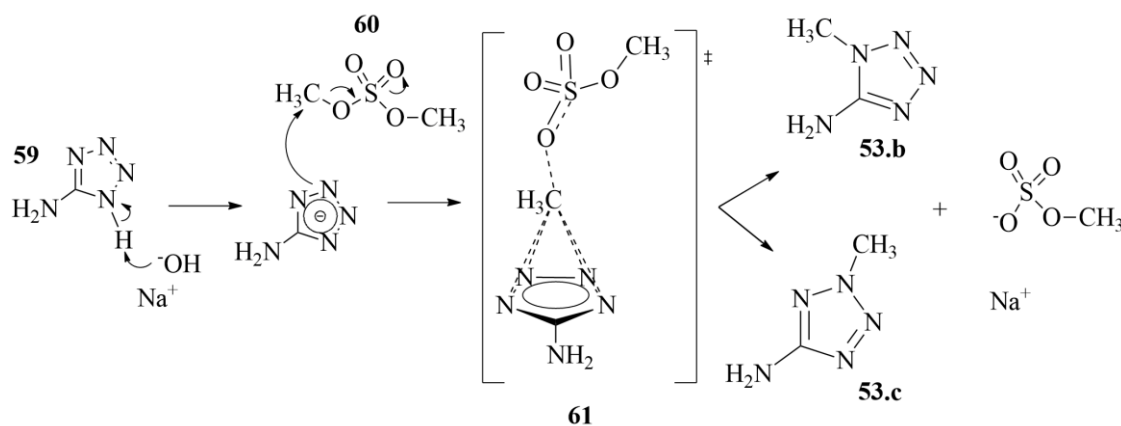
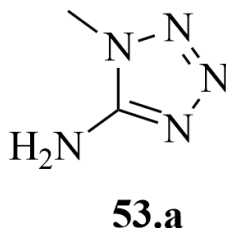


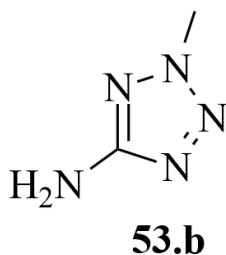
Figura 2.3 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a síntese de 1-metil-5-aminotetrazole (53.a**) e 2-metil-5-aminotetrazole (**53.b**).** Adaptado de ⁽⁴⁸⁾.

2.1.2.2 – Detalhes experimentais relativos à preparação de 1-metil-5-aminotetrazole (**53.a**; 1MT)



Num balão com três tubuladuras, misturou-se 5-aminotetrazole monohidratado (10,3g; 0,099mol) e água (30mL) e adicionou-se à mistura uma solução de hidróxido de sódio 5M (30mL), gota a gota. Em simultâneo, adicionou-se, gota a gota, dimetilsulfato (20mL; 0,21mol), até dissolução total do 5-aminotetrazole monohidratado. Colocou-se um condensador e deixou-se a mistura final sob refluxo durante 1h a 100°C. Depois de arrefecida, colocou-se a mistura reacional no congelador, para permitir a precipitação do 1MT (**53.a**) como agulhas incolores. No dia seguinte, filtrou-se o 1MT **53.a**. (2,75g; 27,8%); p.f. 220 – 221°C (literatura ⁽¹⁰⁵⁾ 220 – 223°C). ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.64 (s, 2H), 3.70 (s, 3H).

2.1.2.3 – Detalhes experimentais relativos à preparação de 2-metil-5-aminotetrazole (**53.b**; 2MT)



Ao filtrado resultante, após remoção de 1MT (**53.a**) adicionou-se éter etílico, álcool etílico e diclorometano procedendo à extração da fase orgânica. Secou-se o extrato orgânico e removeu-se o solvente sob pressão reduzida, obtendo-se um resíduo sólido branco. Após recristalização em diclorometano obteve-se o 2MT (**53.b**) sob a forma de agulhas incolores (1,286; 12,98%). p.f 104 – 105 °C (literatura ⁽¹⁰⁵⁾ 104,5 – 105,5 °C). ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 5.96 (s, 2H), 4.08 (s, 3H).

2.1.2.4 - Síntese dos conjugados tetrazole-sacarinato

A Figura 2.4 apresenta a proposta de mecanismo para a reação de substituição nucleofílica que conduz à síntese dos tetrazole-sacarinatos 1MTS (**55.a**), 2MTS (**55.b**) e TSMT (**55.c**). A reação envolve um mecanismo de adição-eliminação, iniciando-se com a adição do nucleófilo (**53**) correspondente a cada um dos ligandos ao carbono sp² do cloreto de sacarina (**38**). Forma-se o intermediário zwitteriônico (**62**) no passo limitante da reação, culminando com a formação do ligando (**55**) respetivo e por eliminação de ácido clorídrico. ^(106,107)

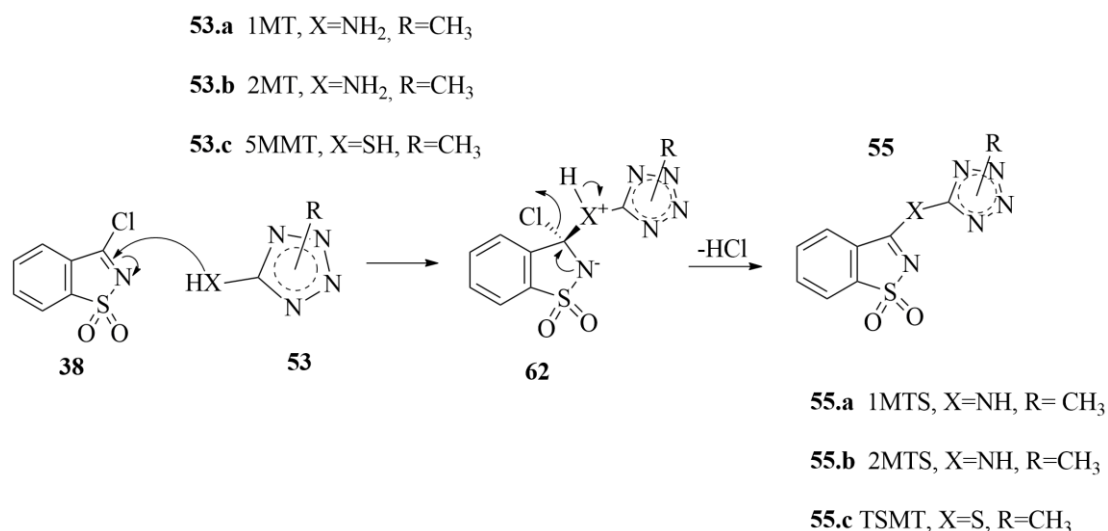
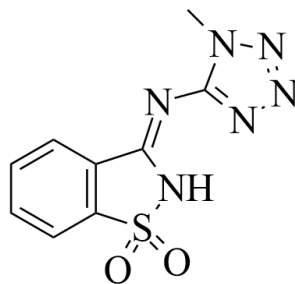


Figura 2.4 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a síntese de tetrazole-sacarinatos (55**). Adaptado de ^(106,107).**

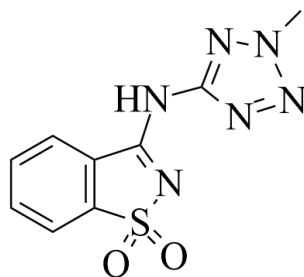
2.1.2.5 – Detalhes experimentais relativos à preparação do *N*-(1-metil-1*H*-tetrazol-5-il)-2,3-dihidro-1,2-benzisotiazole-3-amina-1,1-dióxido (**55.a**; 1MTS)



55.a

Juntou-se 1-metil-5-aminotetrazole (0,8g; 8,08mmol) a 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (1,95g; 9,69mmol), em THF seco (170mL), e manteve-se a mistura em agitação a 60°C, sob atmosfera de azoto, durante 15 horas. Evaporou-se a mistura até à secura, adicionou-se diclorometano e filtrou-se o precipitado branco obtido. Recristalização numa mistura de acetona/etanol (1:1) originou cristais incolores (0,250g). Após análise por ¹H NMR, o produto obtido não correspondeu ao produto proposto, mas sim aos reagentes de partida. Este resultado pode ser justificado pela baixa solubilidade do 1MT.

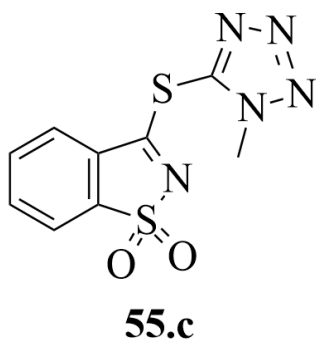
2.1.2.6 – Detalhes experimentais relativos à preparação do *N*-(2-metil-2*H*-tetrazol-5-il)-1,2-benzisotiazole-3-amina-1,1-dióxido (**55.b**; 2MTS)



55.b

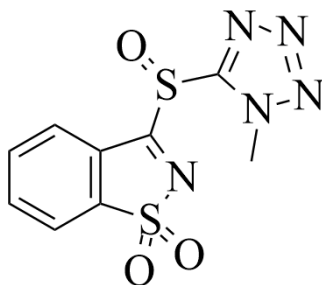
Juntou-se 2-metil-5-aminotetrazole (0,823g; 8,31mmol) e 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (1,65g; 8,26 mmol) em THF seco (100mL) e manteve-se a mistura em agitação a 60°C sob atmosfera de azoto, durante 15 horas. Evaporou-se a mistura até à secura e obteve-se um precipitado branco que se dissolveu em acetona (200mL), deixando cristalizar à temperatura ambiente. Lavou-se os cristais com acetona gelada, obtendo o produto desejado (0,755g; 34,64%). p.f. 267 – 279 °C (literatura ⁽¹⁹⁾ 280 – 282 °C). ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.49 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.91 (s, 2H), 4.43 (s, 3H).

2.1.2.7 – Detalhes experimentais relativos à preparação do 3-((1-metil-1*H*-tetrazol-5-il)tio)-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (**55.c**; TSMT)



Juntou-se 5-mercapto-1-metiltetrazole anidro (0,48g; 4,15mmol) e 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (1,00g; 4,97mmol) em THF seco e manteve-se a mistura em agitação a 60°C sob atmosfera de azoto, durante 15 horas. Recristalização de sólido obtido com uma mistura de clorofórmio/THF (2:1) originou cristais incolores do produto pretendido (0,15g; 38,16%); p.f. 208 – 213 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.15 (s, 1H), 8.04 – 7.91 (m, 3H), 4.04 (s, 3H).

2.1.2.7.1 – Detalhes experimentais relativos à oxidação do 3-((1-metil-1*H*-tetrazol-5-il)tio)-1,2- benzisotiazole-1,1-dióxido



Dissolveu-se TSMT (**55.c**) (0,281g; 1mmol) em acetonitrilo (15mL) e adicionou-se peróxido de hidrogénio 30% (m/m) (0,11mL; 1mmol), mantendo a mistura sob agitação. Adicionou-se sucessivamente à mistura o catalisador SSA (0,1g), preparado previamente de acordo com o protocolo publicado ⁽¹⁰⁸⁾ e seguiu-se a reação por TLC entre 15-360min ⁽¹⁰⁹⁾. Após a conclusão da reação filtrou-se a mistura e removeu-se o solvente em excesso sob pressão reduzida. Lavou-se o resíduo com etanol e acetona previamente arrefecidos. Obteve-se um produto na forma de cristais incolores (0,155g). Ainda não foi possível a análise do produto obtido por ¹H NMR, pois não se conseguiu dissolver.

2.1.3 – Preparação do conjugado tiadiazole-sacarintato

De acordo com o Esquema 2B, sintetizou-se o 3-[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)sulfanil]-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (**56**; MTSB;) a partir dos blocos de construção cloreto de sacarina (**38**) (descrito em 2.1.1) e 5-metil-1,3,4-tiadiazole-2-tiol anidro (**54**; 5MTDT).

À semelhança dos ligandos tetrazole-sacarinato e como representado na Figura 2.5, usa-se uma estratégia de síntese convergente para preparação do ligando MTSB. Os blocos de construção são acoplados através do deslocamento nucleofílico do anião cloreto do carbono sp² do cloreto de sacarina (**38**) devido à funcionalidade do grupo tiol de (**54**). O mecanismo de adição-eliminação proposto envolve a formação de um intermediário zwitteriônico (**57**) no passo limitante da reação culminando com a produção do ligando alvo (**56**) e ácido clorídrico. ^(18,106)

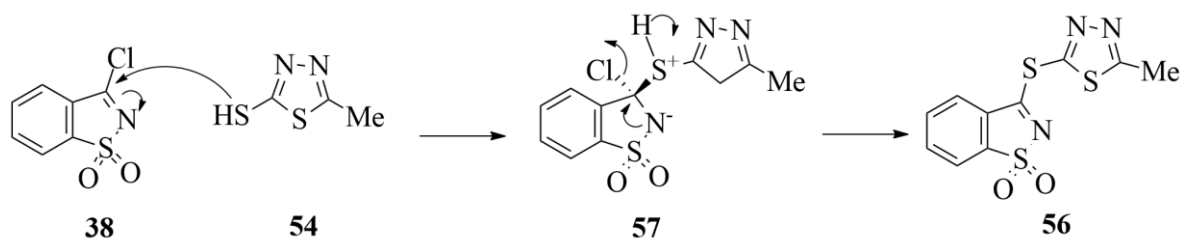
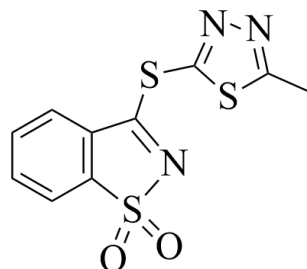


Figura 2.5 – Representação esquemática do mecanismo proposto para a síntese do tiadiazole-sacarinato (**56**). Adaptado de ^(18,106).

2.1.3.1– Detalhes experimentais relativos à preparação de o 3-[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)sulfanil]-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (**56**; MTSB)



56

Adicionou-se 5-metil-1,3,4-tiadiazole-2-tiol anidro (0,65g; 4,92mmol) e 3-cloro-1,2-benzisotiazole-1,1-dióxido (1,19g; 5,90 mmol) a THF seco (50mL) e manteve-se a mistura em agitação a 60°C, sob atmosfera de azoto, durante 24 horas. Evaporou-se o solvente da mistura racional até à secura e recristalizou-se o sólido com uma mistura de acetona/tolueno (2:1). Obteve-se o produto sob a forma de cristais amarelados (0,269g; rendimento de 18,41%); p.f. 194 – 202 °C (literatura ⁽¹⁸⁾ 190 – 192°C); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.83 (dd, *J* = 19.0, 8.2 Hz, 4H), 2.89 (s, 3H).

2.2– Avaliação atividade quelante

Pretende-se avaliar e comparar os ligandos 2MTS, TSMT e MTSB quanto à atividade quelante para os metais Cu(II) (AQCu), Fe(II) (AQFe) e Ca(II) (AQCu),

individualmente, nas concentrações de 1mM e 10mM, através da utilização de indicadores de quelação seletiva que produzem complexos coloridos. As AQCu, AQFe e AQCa dos ligandos são determinadas pela medição espectrofotométrica, a determinado comprimento de onda (λ), das alterações de cor dos complexos Cu(II)/pirocatecol violeta ^(110,111), Fe(II)/ferrozina ⁽¹¹²⁾ e Ca(II)/*o*-cresolftaleína complexona ⁽¹¹³⁾, respetivamente, seguindo os métodos descritos na literatura. ^(114–116)

A mudança de cor ocorre quando o indicador passa da sua forma ligada ao ião metálico para a forma não ligada. Isto acontece devido ao quelante metálico, que é introduzido no meio e remove o ião metálico ligado ao indicador. É de notar que a dissociação do metal ao indicador provocado pelo quelante metálico resulta numa diminuição considerável da absorção a determinado comprimento de onda.

Expressou-se os resultados da atividade quelante para os ligantes em estudo em valores de IC₅₀ (mM) e em valores de percentagem (%) nas concentrações de 1 e 10mM, calculados através da equação (i) ⁽¹⁹⁾, que correspondem à diferença entre 1 (quando todas as moléculas do indicador estão livres em solução) e a absorvância normalizada das moléculas do indicador coordenadas com o metal. Para o cálculo dos valores de IC₅₀ (mM), os ligandos foram testados a várias concentrações. Para tal, recorreu-se a diluições das soluções de 1mM e/ou 10mM previamente preparadas, conforme a necessidade.

$$\text{Atividade Quelante (\%)} = \left(1 - \frac{\text{absorvância da amostra ao } \lambda \text{ (nm)}}{\text{absorvância do controlo negativo ao } \lambda \text{ (nm)}} \right) \times 100$$

(i)

2.2.1– Detalhes da preparação para medição da atividade quelante para Cu(II) (AQCu)

A cada uma das soluções dos ligandos em DMSO (30 μ L nas concentrações de 1mM ou 10mM) misturou-se em microplacas de 96 poços 200 μ L do tampão acetato de sódio a 50mM (pH6), 100 μ L de CuSO₄•5H₂O (50 μ L/mL em água destilada) e 6 μ L de pirocatecol violeta (4mM em água destilada). Mediu-se a mudança de absorvância da

solução de pirocatecol violeta a 632nm usando o medidor de microplacas EZ Read 400 da marca Biochrom®. Como controlo positivo utilizou-se o EDTA na concentração de 1mM em água destilada.

2.2.2– Detalhes da preparação para medição da atividade quelante para Fe(II) (AQFe)

A cada uma das soluções dos ligandos em DMSO (30µL nas concentrações de 1mM ou 10mM) misturou-se em microplacas de 96 poços 200µL de água destilada e 30µL uma solução de FeCl₂ (0,1mg/mL em água destilada). Após 30 minutos, adicionou-se 12,5µL de uma solução de ferrozina (40mM em água destilada). Após 10 minutos mediu-se a mudança de absorvância da solução de ferrozina a 562nm usando o medidor de microplacas EZ Read 400 da marca Biochrom®. Como controlo positivo utilizou-se o EDTA na concentração de 1mM em água destilada.

2.2.3– Detalhes da preparação para medição da atividade quelante para Ca(II)(AQCa)

É importante referir que apesar de o DMSO interferir com o método, preparou-se previamente para cada um dos ligandos soluções de 5 e 50mM em DMSO para depois diluir em água Milli Q para concentrações de 1 e 10mM. Isto deve-se ao facto de o DMSO ser um bom solvente para os ligandos testados ao contrário da água Milli Q quando utilizada como único solvente. No entanto para o controlo negativo utilizou-se apenas água Milli Q.

A cada uma das soluções dos ligandos (em DMSO + água Milli Q) (50µL nas concentrações de 1mM ou 10mM) misturou-se em microplacas de 96 poços 125µL de água Milli Q, 75µL da solução tampão A, 30µL da solução padrão de Cálcio (20mg/L em água Milli Q) e 20µL da solução de *o*-cresolftaleína complexona. Mediu-se a mudança de absorvância da solução de *o*-cresolftaleína complexona a 575nm usando o

medidor de microplacas EZ Read 400 da marca Biochrom®. Como controlo positivo utilizou-se o EGTA na concentração de 1mM em água Milli Q.

Solução tampão A: Num balão de 100mL adicionou-se 750mg de cloreto de amónio e 5mL de amoníaco e fez-se o volume com água Milli Q.

Solução padrão de Cálcio (20mg/L): Num balão de 100mL dissolveu-se 5mg de carbonato de cálcio, adicionou-se 1mL de ácido clorídrico 1M e fez-se o volume com água Milli Q.

Solução indicadora de *o*-cresolftaleína complexona: Num balão de 100mL dissolveu-se 30mg de *o*-cresolftaleína complexona, adicionou-se 28mL da solução tampão A e fez-se o volume com água Milli Q.

2.3 – Avaliação da atividade antioxidante

Pretende-se avaliar e comparar o potencial antioxidante dos ligandos 2MTS, TSMT, MTSB, a concentrações de 1 e 10mM, usando três métodos descritos na literatura ⁽¹¹⁴⁾ baseados em processos radicalares, nomeadamente a Atividade de eliminação radicalar do inglês “*radical scavenging activity*” (RSA) para os radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) ⁽¹¹⁷⁾, (2,2'-azinobis-(ácido-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) ABTS ⁽¹¹⁸⁾ e óxido nítrico (NO) ⁽¹¹⁹⁾ e através de um método descrito na literatura ⁽¹¹⁴⁾ relacionado com metais, respetivamente o poder antioxidante redutor férrico do inglês “*ferric reducing antioxidant power*” (FRAP) ⁽¹¹⁵⁾. A RSA para os radicais DPPH, ABTS e NO e o FRAP são determinados pela medição espectrofotométrica, a determinado comprimento de onda (λ).

Nos testes de RSA prende-se avaliar a capacidade dos ligandos para reduzir as espécies reativas DPPH[•], ABTS^{•+} e NO[•]. Estas espécies, ao serem reduzidas devido ao antioxidante (doador de *H*) ou por transferência de eletrões, seguida de transferência de prótons, são eliminadas do meio reacional, resultando na sua mudança de cor. Como

consequência, existe uma diminuição da absorvância a determinado λ . O tipo de transferência depende do antioxidante, do radical e do meio reacional. ^(120,121)

Para os ensaios de RSA expressou-se os resultados para os ligandos em estudo em valores de IC₅₀ (mM) e em valores de percentagem (%) nas concentrações de 1 e 10mM calculados através da equação (ii), que correspondem à diferença entre 1 (quando todas as espécies reativas são eliminadas da solução) e a absorvância normalizada das espécies reativas em solução. Para o cálculo dos valores de IC₅₀ (mM), os ligandos foram testados a várias concentrações. Para tal, recorreu-se a diluições das soluções de 1mM e/ou 10mM previamente preparadas, conforme a necessidade.

$$\text{RSA}(\%) = \left(1 - \frac{\text{absorvância da amostra ao } \lambda \text{ (nm)}}{\text{absorvância do controlo negativo ao } \lambda \text{ (nm)}} \right) \times 100$$

(ii)

No caso do FRAP é avaliada a capacidade dos ligandos para reduzir a espécie Fe(III) para Fe(II) através da doação de eletrões ao complexo [Fe(III)(TPTZ)₂]³⁺/ [Fe(II)(TPTZ)₂]²⁺ ⁽¹²²⁾ (TPTZ = 2,4,6-tripiridil-triazina) existente no meio reacional, resultando na sua mudança de cor. ^(120,121)

Ao contrário do RSA, no FRAP o aumento da atividade antioxidante resulta no aumento da absorvância a determinado λ . ⁽¹¹⁵⁾ Em consequência, utiliza-se como referência na equação (iii) a absorvância do controlo positivo (ácido gálico, 1mM em água destilada). Para os ensaios do FRAP, expressou-se os resultados para os ligandos em estudo em valores de percentagem (%) nas concentrações de 1 e 10mM calculados, através da equação (iii), que correspondem à absorvância normalizada dos complexos de Fe(II):

$$\text{FRAP}(\%) = \left(\frac{\text{absorvância da amostra ao } \lambda \text{ (nm)}}{\text{absorvância do control positivo ao } \lambda \text{ (nm)}} \right) \times 100$$

(iii)

2.3.1– Detalhes da preparação do ensaio de Atividade de eliminação radicalar (RSA) no radical DPPH.

A cada uma das soluções dos ligandos em DMSO (22 μ L nas concentrações de 1mM ou 10mM) misturou-se em microplacas de 96 poços 200 μ L da solução de DPPH (120 μ M em metanol) e incubou-se no escuro durante 30 minutos. Mediu-se a absorvância a 517nm usando o medidor de microplacas EZ Read 400 da marca Biochrom®. Como controlo positivo utilizou-se uma solução de ácido gálico (1mM em água destilada).

2.3.2– Detalhes da preparação do ensaio de RSA no radical ABTS

A cada uma das soluções dos ligandos em DMSO (10 μ L nas concentrações de 1mM ou 10mM) misturou-se em microplacas de 96 poços 190 μ L da solução stock de ABTS^{•+} (7,4mM). Incubou-se durante 6 minutos e mediu-se a absorvância a 734nm usando o medidor de microplacas EZ Read 400 da marca Biochrom®. Como controlo positivo utilizou-se uma solução de ácido gálico (1mM em água destilada).

Solução stock de ABTS^{•+} (7,4mM): Misturou-se 5mL de água destilada, 0,0035g de persulfato de potássio e 0,0203g de ABTS por 16h no escuro à temperatura ambiente. De seguida dissolveu-se a solução de ABTS^{•+} com etanol de maneira a obter uma absorvância de pelo menos 0,7 a 734nm usando o medidor de microplacas EZ Read 400 da marca Biochrom®.

2.3.3– Detalhes da preparação do ensaio de RSA no óxido nítrico (NO).

A cada uma das soluções dos ligandos em DMSO (50 μ L nas concentração de 1mM ou 10mM) misturou-se em microplacas de 96 poços 50 μ L de nitroprussiato de sódio (10mM em PBS). Incubou-se 90 minutos à luz e adicionou-se o reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de naftiletlenodiamina em 2,5% de ácido

metafosfórico). Mediu-se a absorvância a 546nm usando o medidor de microplacas EZ Read 400 da marca Biochrom® Como controlo positivo utilizou-se uma solução de rutina (10mM em metanol).

2.3.4– Detalhes da preparação do ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP).

A cada uma das soluções dos ligandos em DMSO (50µL nas concentrações de 1mM ou 10mM) misturou-se em microplacas de 96 poços 50µL de água destilada e 50µL ferrocianeto de potássio 1%. Incubou-se a 50°C durante 20 minutos. De seguida, adicionou-se 50µL de ácido tricloroacético 0,1% (m/v) e 10µL uma solução de FeCl₃ 0,1% (m/v). Incubou-se durante 10 minutos e mediu-se a absorvância a 700nm usando o medidor de microplacas EZ Read 400 da marca Biochrom® Como controlo positivo utilizou-se uma solução de ácido gálico (1 e 10mM em água destilada).

3 – Resultados e discussão

No presente capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para os ligandos 2MTS, TSMT e MTSB na avaliação da atividade quelante e do potencial antioxidante anteriormente descritos em 2.2 e 2.3, respetivamente.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e os ensaios conduzidos pelo menos em sextuplicado, ($n = 6$). As diferenças significativas foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) ou pelo teste das amplitudes múltiplas de Duncan ($P < 0,05$). Quanto aos valores de IC50, foram calculados em cada um dos testes (AQCu, AQFe, AQCa, RSA e FRAP) por ajuste sigmoidal dos dados recorrendo ao programa GraphPad Prism v. 6.0, apenas para os ligandos que exibiram atividade igual ou superior a 50%, entre as concentrações 1 e 10mM.

3.1 – Avaliação da atividade quelante para os metais Cu(II), Fe(II) e Ca(II) dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB.

Avaliou-se os ligandos 2MTS, TSMT e MTSB quanto às suas atividades quelantes para os metais Cu(II) (AQCu), Fe(II) (AQFe) e Ca(II) (AQCu), nas concentrações de 1mM e 10mM. No seguimento, comparou-se as AQCu e AQFe de cada um dos ligandos com a atividade quelante exibida pelo quelante metálico EDTA⁽¹¹⁴⁾ para os respectivos metais na concentração de 1mM. Por sua vez, a AQCu de cada um dos ligandos foi comparada com a atividade quelante exibida pelo quelante metálico EGTA⁽¹¹⁶⁾ na concentração de 1mM.

Como indica a Tabela 1, ambos os ligandos TSMT e MTSB mostram AQCu, de 80% e 87%, respectivamente, na concentração de 1mM e de 92%, para ambos os ligandos, na concentração de 10mM. Estes valores são elevados, mesmo quando comparados com o valor obtido para o quelante EDTA (75%), à concentração de 1mM. Como já observado em estudos anteriores⁽¹⁹⁾, o ligando 2MTS mostra uma AQCu baixa (15%) na concentração de 1mM, quando comparada com o valor obtido para o quelante EDTA (75%), à mesma concentração. Contudo, na concentração de 10mM, o ligando 2MTS mostra uma AQCu de 82%, semelhante aos valores obtidos na literatura⁽¹⁹⁾ (86%). Notavelmente, os ligandos 2MTS, TSMT e MTSB evidenciaram uma AQFe nula ou abaixo dos 10%, até mesmo para concentrações de 10mM. Nas mesmas condições, para o quelante EDTA (1mM), foi observada uma AQFe de 94%. No que diz respeito ao ensaio de AQCu, os ligandos 2MTS, TSMT e MTSB também mostraram atividade nula ou abaixo dos 10%. O mesmo não acontece para o quelante EGTA que nas mesmas condições demonstrou ter uma AQCu de 85%.

Tabela 3.1 – Atividade quelante para os metais Cu(II) (AQCu), Fe(II) (AQFe) ou Ca(II) (AQCa) dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB e respectivos controlos positivos nas concentrações de 1 e 10mM. Resultados expressos em valores de percentagem (%) calculados através da equação (i).

Composto	Cu(II)		Fe(II)		Ca(II)	
	1mM	10mM	1mM	10mM	1mM	10mM
2MTS	15,7 ± 0,8 ^e	82,6 ± 1,3 ^c	–	–	–	–
TSMT	80,0 ± 1,4 ^c	92,5 ± 0,7 ^a	–	–	–	–
MTSB	87,1 ± 0,7 ^b	92,5 ± 0,8 ^a	–	–	–	–
EDTA	75,3 ± 1,3 ^d	n/a	94,4 ± 0,3	n/a	n/a	n/a
EGTA	n/a	n/a	n/a	n/a	85,1 ± 0,7	n/a

Os valores representam a média ± erro padrão da média, $n = 6$. Na mesma coluna os valores seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes de acordo com o teste das amplitudes múltiplas de Duncan ($P < 0,05$); n/a: não aplicável; “–”: atividade nula.

De acordo com a Tabela 2, os ligandos 2MTS, TSMT e MTSB demonstraram capacidade para quelatar 50% dos iões Cu(II) presentes no meio reacional com valores de IC_{50} de 3,83 mM, 0,44 mM e 0,50mM, respetivamente. Embora estes valores sejam superiores ao valor de IC_{50} exibido pelo quelante EDTA (0,29 mM), os novos ligandos apresentam maior seletividade. O EDTA mostrou também capacidade para quelatar iões Fe(II) presentes no meio reacional com um valor de IC_{50} de 0,24mM. Por sua vez, o EGTA mostrou uma capacidade para quelatar 50% dos iões Ca(II) presentes no meio reacional com valores de IC_{50} de 0,48mM.

Tabela 3.2 – Concentração dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB e respectivos controlos positivos capaz de quelatar 50% dos iões Cu(II), Fe(II) ou Ca(II) presentes no meio reacional. Resultados expressos em valores de IC₅₀ (mM).

Composto	IC ₅₀ (mM)		
	Cu(II)	Fe(II)	Ca(II)
2MTS	3,83 ± 0,38 ^b	n/a	n/a
TSMT	0,44 ± 0,03 ^a	n/a	n/a
MTSB	0,50 ± 0,01 ^a	n/a	n/a
EDTA	0,29 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,01	n/a
EGTA	n/a	n/a	0,48 ± 0,04

Os valores representam a média ± erro padrão da média, $n = 6$. Na mesma coluna os valores seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes de acordo com o teste das amplitudes múltiplas de Duncan ($P < 0,05$); n/a: não aplicável.

Os resultados indicam que tanto os tetrazole-sacarinos (2MTS e TSMT) como os tiadiazole-sacarinos (MTSB) exibem elevada eficácia e seletividade para quelatar o Cu(II), suportando resultados anteriores^(18,19). Além disso, tendo em conta as estruturas moleculares dos ligandos, os resultados obtidos sugerem que, a uma concentração de 1mM, a ponte de *S* utilizada na construção ligandos TSMT e MTSB entre os heterociclos é preferível à ponte de *N* utilizada na construção do ligando 2MTS, pois observa-se uma maior capacidade para quelatar o catião Cu(II).

3.2 – Avaliação da atividade de eliminação (RSA) para o radical DPPH, ABTS e NO e do poder antioxidante redutor férrico (FRAP) dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB.

Os radicais livres, incluindo os ROS e as espécies reativas de azoto (RNS), são produzidos através de reações metabólicas na cadeia respiratória mitocondrial.⁽¹²³⁾

O delicado equilíbrio entre os efeitos positivos e prejudiciais dos radicais livres é crucial para os organismos vivos e quando a produção de ROS e/ou RNS supera as defesas antioxidantes do organismo, pode ocorrer stress oxidativo, que é a causa subjacente de várias doenças degenerativas. Assim, o uso de antioxidantes pode ajudar na prevenção

e/ou redução da gravidade de diferentes doenças relacionadas com o stress oxidativo, como por exemplo o cancro, diabetes *mellitus*, distúrbios cardiovasculares e doenças neurológicas. ⁽¹¹⁴⁾

Tendo por base os resultados acima descritos e os obtidos noutros estudos ^(18,19), que suportam o potencial dos sacarinos para atuarem como agentes quelantes altamente eficazes e seletivos para o Cu(II) e considerando a influência deste metal na produção de ROS ^(64,66-69), o potencial antioxidante dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB também foi avaliado. Para tal, recorreu-se a três métodos à base de radicais (RSA para os radicais DPPH, ABTS e NO) e a um método relacionado com metais, o FRAP.

No seguimento, comparou-se as RSA para os radicais DPPH, ABTS e NO de cada um dos ligandos com a RSA exibida pelo ácido gálico ^(114,120) para os radicais DPPH e ABTS e a RSA exibida pela rutina ⁽¹²⁴⁾ para o radical NO.

Esta metodologia foi utilizada porque, não existindo um método universal, a literatura ^(120,121) recomenda que, para uma avaliação mais fiável da capacidade antioxidante de um composto, se recorra a diferentes ensaios antioxidantes complementares, uma vez que o stress oxidativo no nosso organismo é produzido pela ação de diversas espécies reativas que apresentam mecanismos de reação e atividade diferentes.

Como representado na Tabela 3, os ligandos TSMT e MTSB exibiram valores de RSA para o radical DPPH de 43% e 29%, respetivamente, na concentração de 1mM e de 62% e 61%, respetivamente, na concentração de 10mM. Para o ensaio de RSA para o radical ABTS, os ligandos TSMT e MTSB exibiram valores de 27% e 25%, respetivamente, na concentração de 1mM e de 34% e 26%, respetivamente, na concentração de 10mM. Estes valores são inferiores ao valor de RSA do ácido gálico para os radicais DPPH e ABTS (de 78% e 94%, respetivamente), na concentração de 1mM. No ensaio de RSA para o radical NO, o ligando TSMT na concentração de 10mM foi o único demonstrar atividade superior a 10%. O ligando 2MTS não evidenciou atividade acima de 10% para os ensaios de RSA dos radicais DPPH, ABTS e NO, em nenhuma das concentrações testadas.

Tabela 3.3 – Atividade de eliminação radicalar para os radicais DPPH, ABTS ou NO dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB e respectivos controlos positivos nas concentrações de 1 e 10mM. Resultados expressos em valores de percentagem (%) calculados através da equação (ii).

Composto	DPPH		ABTS		NO	
	1mM	10mM	1mM	10mM	1mM	10mM
2MTS	–	–	–	–	–	–
TSMT	43,2±3,4 ^c	62,5 ± 4,2 ^b	27,5 ± 2,9 ^{cd}	34,6±3,9 ^{bc}	–	18,9±3,3 ^b
MTSB	29,9±4,2 ^d	61,9 ± 5,5 ^b	25,6 ± 5,4 ^d	26,0±5,9 ^d	–	–
Ácido Gálico	78,9±1,4 ^a	n/a	94,5 ± 0,2 ^a	n/a	n/a	n/a
Rutina	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	69,5 ± 4,9 ^a

Os valores representam a média ± erro padrão da média, $n = 6$. Na mesma coluna os valores seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes de acordo com o teste das amplitudes múltiplas de Duncan ($P < 0,05$); n/a: não aplicável; “–”: atividade nula ou abaixo dos 10%

A Tabela 4 indica que os ligandos TSMT e MTSB apresentaram capacidade para reduzir em 50% a espécie reativa DPPH[•] presente no meio reacional, com valores de IC₅₀ de 1,95mM e 3,96mM, respetivamente. O ácido gálico mostrou uma capacidade superior para reduzir em 50% a espécie reativa DPPH[•] presente no meio reacional, com valores de IC₅₀ de 0,13mM, mostrando também capacidade para reduzir em 50% a espécie reativa ABTS^{•+} presente no meio reacional com valores de IC₅₀ de 0,17mM. Por sua vez, a rutina mostrou capacidade para reduzir em 50% da espécie reativa NO[•] presente no meio reacional com um valor de IC₅₀ de 2,94.

Tabela 3.4 – Menor concentração dos ligandos TSMT e MTSB e respectivos controlos positivos capaz de reduzir em 50% a espécie reativa DPPH[•], ABTS^{•+} ou NO[•] presente no meio reacional. Resultados expressos em valores de IC₅₀ (mM).

Composto	IC ₅₀ (mM)		
	DPPH	ABTS	NO
TSMT	1,95 ± 0,29 ^c	n/a	n/a
MTSB	3,96 ± 0,32 ^d	n/a	n/a
Ácido Gálico	0,13 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,02	n/a
Rutina	n/a	n/a	2,94 ± 0,28

Os valores representam a média ± erro padrão da média, $n = 6$. Na mesma coluna os valores seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes de acordo com o teste das amplitudes múltiplas de Duncan ($P < 0,05$); n/a: não aplicável;

De acordo com a tabela 5, os ligandos 2MTS, TSMT e MTSB apresentam valores de FRAP de mais de 13%, 13% e 21%, respectivamente, para uma concentração de 10mM. Evidenciando que todos eles possuem capacidade para reduzir a espécie Fe(III) no meio reacional para Fe(II). Ao contrário do RSA, no FRAP o aumento da atividade antioxidante resulta no aumento da absorvância a determinado λ . Em consequência, utiliza-se como referência na equação (iii) a absorvância do controlo positivo (ácido gálico, 1mM em água destilada). Por este motivo não existe valores IC50 nem de atividade de FRAP para o controlo positivo.

Tabela 3.5 – Poder antioxidante redutor férrico (FRAP) dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB nas concentrações de 1 e 10mM. Resultados expressos em valores de percentagem (%) calculados através da equação (iii).

Composto	FRAP	
	1mM	10mM
2MTS	–	13,2±1,9 ^b
TSMT	12,2±0,5 ^b	13,4±0,8 ^b
MTSB	–	21,4±4,4 ^a

Os valores representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. Na mesma coluna os valores seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes de acordo com o teste das amplitudes múltiplas de Duncan ($P<0,05$); n/a: não aplicável; “–”: atividade nula ou abaixo dos 10%.

De acordo com a literatura^(120,121) a capacidade do composto antioxidante para eliminar os radicais livres do meio reacional tem em conta dois fatores, a taxa de eliminação radicalar e o número de radicais que cada composto antioxidante pode eliminar, sendo ambos os fatores determinados pelas estruturas químicas do composto antioxidante em causa e dos radicais livres. Neste contexto, os resultados sugerem que as estruturas químicas dos ligandos TSMT e MTSB são favoráveis à RSA. O ligando 2MTS ao não exibir a mesma capacidade sugere que a utilização da ponte de *S* na construção dos sacarinos é preferencial.

Quanto ao FRAP, a literatura^(125,126) indica que não é possível avaliar a capacidade de redução da espécie Fe(III) em antioxidantes que contenham na sua estrutura o grupo $-SH$, como é o caso do ligando MTSB, o que possivelmente explica a fraca capacidade deste ligando neste teste. Adicionalmente, os ligandos 2MTS e TSMT também mostraram capacidade para reduzir a espécie Fe(III).

Como já referido, apesar de numerosos estudos, não há um método universal confiável para a avaliação da capacidade antioxidante, mesmo *in vitro*. Os efeitos antioxidantes *in vivo* são muito menos compreendidos. Nos dias de hoje ainda é difícil provar com certeza se os antioxidantes são efetivamente eficazes para a prevenção e/ou tratamento de doenças. ⁽¹²¹⁾ Tudo isto dificulta a interpretação dos resultados e a avaliação das propriedades antioxidantes, não só dos sacarinos testados neste projeto laboratorial, mas também de outros compostos.

4 – Conclusão e perspectivas futuras

O trabalho descrito nesta dissertação está principalmente relacionado com a síntese de novos sacarinos, em que o sistema heterocíclico benzisotiazole está ligado a outro heterociclo, um tetrazole ou um tiadiazole, através de um grupo funcional específico que funciona como ponte. Os ligandos foram preparados utilizando uma estratégia sintética convergente em que os dois blocos de construção contendo os heterociclos respectivos para cada grupo de ligandos multidentados de *N* foram separadamente sintetizados e depois acoplados para formar os conjugados alvo. Os novos sacarinos preparados podem subdividir-se em dois grupos de ligandos multidentados de *N*, os tetrazole-sacarinos e os tiadiazole-sacarinos, com objetivo final de avaliar e comparar a capacidade destas moléculas enquanto ligandos multidentados seletivos para a coordenação com cátions de metais de transição, o potencial para atuarem como agentes quelantes seletivos e também do seu potencial antioxidante.

Na parte final do trabalho os ligandos 2MTS, TSMT e MTSB foram avaliados quanto à sua atividade quelante para os cátions divalentes dos metais cobre, ferro e cálcio. Todos demonstraram elevada eficácia e seletividade para quelatar o cobre (II) em detrimento do ferro (II) e cálcio (II). Tendo em conta as estruturas moleculares dos ligandos, os resultados também sugerem que, nas concentrações testadas, a utilização da ponte de *S* na construção dos ligandos é preferível à ponte de *N*.

Considerando a influência do cátion cobre (II) na produção de ROS, o potencial antioxidante dos ligandos 2MTS, TSMT e MTSB também foi avaliado *in vitro*. Os resultados evidenciam pela primeira vez que as estruturas químicas dos ligandos TSMT e MTSB são favoráveis à atividade de eliminação radicalar para os radicais DPPH, ABTS e NO. Quanto ao poder antioxidante férrico os ligandos 2MTS, TSMT e MTSB mostraram capacidade para reduzir a espécie ferro (III).

A estratégia sintética convergente utilizada na construção dos sacarinos, permite uma fácil introdução de diversidade química, através de diferentes substituintes no anel tetrazólico e tiadiazólico, e alterações no grupo funcional que funciona como ponte, como é exemplo a tentativa de oxidação do composto TSMT **55.c**.

Como perspectivas futuras, as sínteses abordadas na presente dissertação deverão ser repetidas de maneira a otimizar rendimentos e resultados. Novas alterações químicas e estruturais deverão ser realizadas de maneira a aumentar a biblioteca de moléculas com as características acima descritas. No futuro, deverá ser avaliada a capacidade dos conjugados sintetizados se ligarem a catiões divalentes e formar os complexos correspondentes. A toxicidade dos ligandos e respetivos complexos será avaliada *in vitro* contra linhagens celulares cancerígenas humanas e as linhagens celulares normais correspondentes, recolhendo assim informação acerca da segurança dos compostos.

A otimização estrutural é assim o primeiro passo num longo caminho para o desenvolvimento de novas moléculas, com capacidade quelante e propriedades otimizadas para aplicação farmacológica, onde os sacarinos já revelaram potencial e oferecem perspectivas para novas abordagens na quimioterapia do cancro, especialmente para tumores, sendo que a proliferação de células neoplásicas requer uma maior concentração de iões cobre (II) do que as células normais correspondentes.

5 – Referências Bibliográficas

1. Mattes, R. D. Low calorie sweeteners: Science and controversy: Conference proceedings. *Physiol. Behav.* **164**, 429–431 (2016).
2. Warner, D. J. Ira Remsen, saccharin, and the linear model. *Ambix.* **55**, 50–61 (2008).
3. Arnold, D. L., Krewski, D., Munro, I. C. Saccharin: A toxicological and historical perspective. *Toxicology* **27**, 179–256 (1983).
4. Duarte, L., Reva, I., Cristiano, M. L. S., Fausto, R. Photoisomerization of saccharin. *J. Org. Chem.* **78**, 3271–3275 (2013).
5. Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., Ferreira, I. C. F. R. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **13**, 377–399 (2014).
6. Tandel, K. Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2**, 236–243 (2011).
7. Kroger, M., Meister, K., Kava, R. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **5**, 35–47 (2006).
8. George, V., Arora, S., Sharma, V., Wadhwa, B. K., Singh, A. K. Stability, physico-chemical, microbial and sensory properties of sweetener/sweetener blends in lassi during storage. *Food Bioprocess Technol.* **5**, 323–330 (2012).
9. Ager, D. J. Pantaleone, D. P., Henderson, S. A., Katritzky, A. L., Prakash, I., Walters, D. E. Commercial, synthetic nonnutritive sweeteners. *Angew. Chemie Int. Ed.* **37**, 1802–1817 (1998).
10. Mortazavi, Z. F. A., Islami, M. R. & Khaleghi, M. Highly stereoselective synthesis of saccharin-substituted β -lactams via in situ generation of a heterosubstituted ketene and a zwitterionic intermediate as potential antibacterial agents. *Org. Lett.* **17**, 3034–3037 (2015).
11. Mortensen, A. Sweeteners permitted in the european union: Safety aspects. *Scand. J. Food Nutr.* **50**, 104–116 (2006).
12. IARC working group em *Volume 73. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - saccharin and its salts.* 517-624 (IARC press, 1999).
13. Baran, E. J., Yilmaz, V. T. Metal complexes of saccharin. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 1980–1999 (2006).
14. Teixeira, S., Gonçalves, J; Vieira, E. Edulcorantes: uso e aplicação na alimentação, com especial incidência na dos diabéticos. *Rev. Aliment. Humana* **17**, 47–54 (2011).

15. Mokhtaruddin, N. S. M., Yusof, E. N. M., Ravvof, T., Tiekink, E. Veerakumarasivan, A., Tahir, M. Unusual saccharin-N,O (carbonyl) coordination in mixed-ligand copper(II) complexes: Synthesis, X-ray crystallography and biological activity. *J. Mol. Struct.* **1139**, 1–9 (2017).
16. Köhler, K., Hillebrecht, A., Schulze, J., Innocenti, A., Heine, A., Supuran, C. Klebe, G. Saccharin inhibits carbonic anhydrases: Possible explanation for its unpleasant metallic aftertaste. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 7697–7699 (2007).
17. Kyo Han Ahn, Baek, H. H., Seok Jong Lee., Cho, C. W. Synthesis of chiral benzosultams: 3-Functionalized 1,2-benzisothiazoline 1,1-dioxides. *J. Org. Chem.* **65**, 7690–7696 (2000).
18. Cabral, L. I. L. Brás, E. M., Henriques, M. S. C., Marques, C., Frija, L. M. T., Barreira, L., Paixão, J. A., Fausto, R., Cristiano, M. L. S. Synthesis, Structure, and Cytotoxicity of a New Sulphonyl-Bridged Thiadiazolyl-Saccharinate Conjugate: The Relevance of S···N Interaction. *Chem. Eur. J.* **24**, 3251–3262 (2018).
19. Ismael, A., Henriques, M. S. C., Marques, C., Rodrigues, M., Barreira, L., Paixão, J. A., Fausto, R., Cristiano, M. L. S. Exploring saccharinate-tetrazoles as selective Cu(II) ligands: Structure, magnetic properties and cytotoxicity of copper(II) complexes based on 5-(3-aminosaccharyl)-tetrazoles. *RSC Adv.* **6**, 71628-71637 (2016).
20. Baran, E. J. The saccharinate anion: A versatile and fascinating ligand in coordination chemistry. *Quim. Nova* **28**, 326–328 (2005).
21. Carter, E. B., Culver, S. L., Fox, P. A., Goode, R. D., Ntai, I., Tickell, M. D., Traylor, R. K., Hoffman, N. W., Davis, J. H. Sweet success: Ionic liquids derived from non-nutritive sweeteners. *ChemInform* **35**, 630–631 (2004).
22. Zhang, Q., Liu, S., Li, Z., Li, J., Chen, Z., Wang, R., Lu, L., Deng, Y. Novel cyclic sulfonium-based ionic liquids: Synthesis, characterization, and physicochemical properties. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 765–778 (2009).
23. Rai, A., Yadav, L. D. S. N-Iodosaccharin (NISac): a new reusable catalyst for formal [2+4] cycloaddition of imines and enones. *Tetrahedron Lett.* **51**, 4045–4049 (2010).
24. Shkrob, I. A., Marin, T. W., Chemerisov, S. D., Hatcher, J., Wishart, J. F. Toward radiation-resistant ionic liquids. radiation stability of sulfonyl imide anions. *J. Phys. Chem. B* **116**, 9043–9055 (2012).
25. Qiao, N., Schindwein, W., Malek, N., Davies, A., Trappitt, G. Pharmaceutical cocrystals: An overview. *Int. J. Pharm.* **419**, 1–11 (2011).
26. Zubair, M. U., Hassan, M. M. A em *Analytical profiles of drugs substances-saccharin*. 193–194 (Academic Press, 1984).
27. Bart, J. C. J. The crystal and molecular structure of saccharin (o-sulphobenzoic imide). *J. Chem. Soc. (B)*. **378**, 376–381 (1968).
28. Srivastava, S., Goyal, P em *Novel biomaterials - Decontamination of toxic*

- metals from wastewater* 11- 20 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010).
29. Yeilel, O. Z., Günay, G., Büyükgüngör, O. Novel silver(I)-saccharinate complexes exhibiting $\text{Ag} \cdots \pi$ and $\text{C-H} \cdots \text{Ag}$ close interactions with a new coordination mode of saccharinate. *Polyhedron* **30**, 364–371 (2011).
 30. Falvello, L. R., Gomez, J., Pascual, I., Tomás, M., Urriolabeitia, E. P., Schultz, A. J. Saccharinate as a versatile polyfunctional ligand. Four distinct coordination modes, misdirected valence, and a dominant aggregate structure from a single reaction system. *Inorg. Chem.* **40**, 4455–4463 (2001).
 31. Baran, E. J., Wagner, C. C., Rossi, M. & Caruso, F. Crystal structure and IR spectrum of diaqua(o-phenanthroline) bis(saccharinato)lead(II). *Zeitschrift fur Anorg. und Allg. Chemie* **626**, 701–705 (2000).
 32. Weber, R. *et al.* Crystal structure of 1, 2-benzisothiazol-3 (2H)-one- 1,1-dioxide, (saccharin) silver salt , $\text{Ag}(\text{C}_7\text{H}_4\text{NO}_3 \text{S})$. *Zeitschrift fur Krist.* **274**, 273–274 (1993).
 33. Cotton, F. A., Falvello, L. R., Schwotzer, W., Murillo, C. A., Valle-Bourrouet, G. Two chromium(II) complexes with amidato-like ligands: a compound with the longest Cr-Cr bond and a mononuclear compound with D_{2d} symmetry. *Inorganica Chim. Acta* **190**, 89–95 (1991).
 34. Alfaro, N. M., Cotton, F. A., Daniels, L. M., Murillo, C. A. Mononuclear-Dinuclear equilibrium for the pyridine adducts of chromium (II). *Inorganic Chemistry.* **31**, 2718–2723 (1992).
 35. Ono, I., Sato, S., Fukuda, K., Inayoshi, T. The mechanisms of photochemical reactions of o-sulfobenzoic imides. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **70**, 2051–2055 (1997).
 36. Letters, C. Photochemical reactions of N-alkyl nad N-allyl-o-sulfobenzimidides. *Chemical Society of Japan.* **1**, 9-12(1979).
 37. Döpp, D. *et al.* Photoisomerization of sultams derived from saccharin; Part 4: Generation of cyclic sulfine hydroxamic acids. *Synthesis.* **8**, 1228–1235 (2001).
 38. Döpp, D. The surprising photochemistry of sultams related to saccharin. *Int. J. Photoenergy* **3**, 41–48 (2001).
 39. Santi, E. Vieira, I., Mombrú, A., Castiglioni, J., Baran, E. J, Torre, M. H. Synthesis and characterization of heteroleptic copper and zinc complexes with saccharinate and aminoacids. Evaluation of SOD-like activity of the copper complexes. *Biol. Trace Elem. Res.* **143**, 1843–1855 (2011).
 40. Mcdonald, P. C., Winum, J., Supuran, C. T.; Dedhar, S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget.* **3**, 84–97 (2012).
 41. Ivanova, J., Carta, F., Vullo, D., Leitans, J., Kazaks, A., Tars, K., Zalubovskis, R., Supuran, C. N-Substituted and ring opened saccharin derivatives selectively inhibit transmembrane, tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. *Bioorganic Med. Chem.* **25**, 3583–3589 (2017).

42. Mahon, B. P., Hendon, A. M., Driscoll, J. M., Rankin, G. M., Poulsen, S. A., Supuran, C. T., McKenna, R. Saccharin: a lead compound for structure-based drug design of carbonic anhydrase IX inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **23**, 849–854 (2015).
43. Swain, B., Angeli, A., Angapelly, S., Thacker, P. S., Supuran, C. T., Arifuddin, M. Synthesis of a new series of 3-functionalised-1-phenyl-1,2,3-triazole sulfamoylbenzamides as carbonic anhydrase I, II, IV and IX inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **34**, 1199–1209 (2019).
44. Kumar, P., Dasari, S., Patra, A. K. Ruthenium(II) complexes of saccharin with dipyridoquinoxaline and dipyrindophenazine: Structures, biological interactions and photoinduced DNA damage activity. *Eur. J. Med. Chem.* **136**, 52–62 (2017).
45. Mari, C., Pierroz, V., Ferrari, S., Gasser, G. Combination of Ru(II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy. *Chem. Sci.* **6**, 2660–2686 (2015).
46. Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **1**, 279–293 (2004).
47. Celli, J. P., Spring, B. Q., Rizvi, I., Evans, C. L., Samkoe, K. S., Verma, S., Pogue, B. W., Hasan, T. *Chem Rev.* **110**, 2795–2838 (2010).
48. Farrer, N. J., Salassa, L., Sadler, P. J. Photoactivated chemotherapy (PACT): the potential of excited-state d-block metals in medicine. *Dalton Transactions.* **48**, 10690–10701 (2009).
49. Apella, M. C., Totaro, R., Baran, E. J. Determination of superoxide dismutase-like activity in some divalent metal saccharinates. *Biol. Trace Elem. Res.* **37**, 293–299 (1993).
50. Delgado, F. Nicova, E. Agotegaray, M., Pardo, V. G., Dorn, V., Burrow, R. Dennehy, M. Ni-thiosaccharinate complexes: Synthesis, characterization and DFT studies. Biological properties as superoxide dismutase mimetics and as anti-carcinogenic agents. *Inorganica Chim. Acta.* **494**, 1–22 (2019).
51. Broering, E. P., Truong, P. T., Gale, E. M., Harrop, T. C. Synthetic analogues of nickel superoxide dismutase: A new role for nickel in biology. *Biochemistry* **52**, 4–18 (2013).
52. Bhatt, P. M., Ravindra, N. V., Banerjee, R., Desiraju, G. R. Saccharin as a salt former. Enhanced solubilities of saccharinates of active pharmaceutical ingredients. *Chem. Commun.* **8**, 1073–1075 (2005).
53. Aly, A. A., Nassar, S. A. N-[4-(Dicyanomethylazo)phenyl]-2-saccharin-2-ylacetamide in the synthesis of pyridazine and pyrimidine derivatives. *Heteroat. Chem.* **15**, 2–8 (2004).
54. Yilmaz, V. T., Gocmen, E. Icel, C., Cengiz, M., Susluer, S. Y., Buyukgungor, O. Synthesis, crystal structures, in vitro DNA binding, antibacterial and cytotoxic activities of new di- and polynuclear silver(I) saccharinate complexes with tertiary monophosphanes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **131**, 31–42 (2014).

55. Groutas, W. C. Houser-Archield, N., Chong, L.S., Venkataraman, R., Epp, J. B., Huang, H., McClenahan, J. J. Efficient inhibition of human leukocyte elastase and cathepsin G by saccharin derivatives. *J. Med. Chem.* **36**, 3178–3181 (1993).
56. Groutas, W. C., Chong, L. S., Venkataraman, R., Kuang, R., Epp, J. B., Houser-Archield, N., Huang, H., Hoidal, R. Amino acid-derived phthalimide and saccharin derivatives as inhibitors of human leukocyte elastase, cathepsin G, and proteinase 3. *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 335–340 (1996).
57. Groutas, W. C. Chong, L. S., Venkataraman, R., Epp, J. B., Kuang, R., Houser-Archield, N., Hoidal, J. R. The Gabriel-Colman rearrangement in biological systems: design, synthesis and biological evaluation of phthalimide and saccharin derivatives as potential mechanism-based inhibitors of human leukocyte elastase, cathepsin G and proteinase 3. *Bioorganic Med. Chem.* **3**, 187–193 (1995).
58. Gütschow, M., Pietsch, M., Themann, A., Fahrig, J., Schulze, B. 2,4,5-Triphenylisothiazol-3(2H)-one 1,1-dioxides as inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **20**, 341–347 (2005).
59. Lai, Z. Gan, X., Wei, L., Alliston, K. R., Yu, H., Li, Y. H., Groutas, W. Potent inhibition of human leukocyte elastase by 1,2,5-thiadiazolidin-3-one 1,1 dioxide-based sulfonamide derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **429**, 191–197 (2004).
60. Csakai, A., Smith, C., Davis, E., Martinko, A., Coulup, S., Yin, H. Saccharin derivatives as inhibitors of interferon-mediated inflammation. *J. Med. Chem.* **57**, 5348–5355 (2014).
61. Ercal, N., Gurer, H., Aykin-Burns, N. Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* **1**, 529-539 (2001).
62. Flora, S. J. S., Pachauri, V. Chelation in metal intoxication. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **7**, 2745–2788 (2010).
63. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. *Molecular, clinical and environmental toxicology* **47**, 133-164 (2013).
64. Jomova, K., Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **283**, 65–87 (2011).
65. Menon, A. V., Chang, J. O., Kim, J. Mechanisms of divalent metal toxicity in affective disorders. *Toxicology* **339**, 58–72 (2016).
66. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
67. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1–40 (2006).
68. Speisky, H., Gómez, M., Burgos-Bravo, F., López-Alarcón, C., Jullian, C., Oleazar, C., Aliaga, M. E. Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: Redox-consequences associated with their interaction with reduced

- glutathione. *Bioorganic Med. Chem.* **17**, 1803–1810 (2009).
69. Liochev, S. I., Fridovich, I. The Haber-Weiss cycle-70 years later: an alternative view. *Redox Rep.* **7**, 55–57 (2002).
70. Brewer, G. J. Anticopper therapy against cancer and diseases of inflammation and fibrosis. *Drug Discov. Today* **10**, 1103–1109 (2005).
71. Brabec, V., Nováková, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resist. Updat.* **9**, 111–122 (2006).
72. Paterson, B. M., Donnelly, P. S. Copper complexes of bis(thiosemicarbazones): From chemotherapeutics to diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 3005–3018 (2011).
73. Giacomelli, C. Trincavelli, M. L., Satriano, C., Hansson, O., Mendola, D., Rizzarelli, E., Martini, C. Copper (II) ions modulate angiogenin activity in human endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **60**, 185–196 (2015).
74. Nasulewicz, A., Mazur, A. & Opolski, A. Role of copper in tumour angiogenesis - Clinical implications. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **18**, 1-8 (2004).
75. Gamez, P., Caballero, A. B. Copper in Alzheimer's disease: Implications in amyloid aggregation and neurotoxicity. *AIP Adv.* **5**, 1–12 (2015).
76. Budimir, A. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharm.* **61**, 1–14 (2011).
77. Maynard, C. J., Bush, A. I., Masters, C. L., Cappai, R., Li, Q. Metals and amyloid- β in Alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Path.* **86**, 147-159.
78. Ferenci, P., Cztonkowska, A., Merle, U., Ferenc, S., Gromadzka, G., Yurdaydin, C., Vogel, W., Bruha, R., Schmidt, H., Stremmel, W. Late-onset wilson's disease. *Gastroenterology* **132**, 1294–1298 (2007).
79. Schrag, A., Schott, J. M. Kayser–fleischer rings in wilson's disease. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1650–1650 (2012).
80. Kodama, H., Fujisawa, C., Bhadhprasit, W. Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. *Curr. Drug Metab.* **13**, 237–250 (2012).
81. Ruggiero, A., Trombatore, G., Triarico, S., Arena, R., Ferrara, P., Scalzone, M., Pierri, F., Riccardi, R. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anti-cancer Drugs.* **24**, 1007–1019 (2013).
82. Apps, M. G., Choi, E. H. Y., Wheate, N. J. The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocr. Relat. Cancer* . **22**, 1-43(2015).
83. Wang, D., Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 307–320 (2005).
84. Brabec, V., Kasparkova, J. Modifications of DNA by platinum complexes: Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist. Updat.* **8**, 131–146 (2005).

85. Johnstone, T. C., Park, G. Y., Lippard, S. Understanding and improving platinum anticancer drugs - phenanthriplatin. *Anticancer Research*. **34**, 471-476 (2014).
86. Gupte, A., Mumper, R. J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* **35**, 32-46 (2009).
87. Denoyer, D., Clatworthy, S. A. S., Masaldan, S., Meggyesy, P. M., Cater, M. A. Heterogeneous copper concentrations in cancerous human prostate tissues. *The Prostate* **75**, 1510-1517 (2015).
88. Denoyer, D., Masaldan, S., La Fontaine, S., Cater, M. A. Targeting copper in cancer therapy: 'copper that cancer'. *Metallomics* **7**, 1459-1476 (2015).
89. Hasinoff, B. B., Yadav, A. A., Patel, D., Wu, X. The cytotoxicity of the anticancer drug elesclomol is due to oxidative stress indirectly mediated through its complex with Cu(II). *J. Inorg. Biochem.* **137**, 22-30 (2014).
90. Yadav, A. A., Patel, D., Wu, X., Hasinoff, B. B. Molecular mechanisms of the biological activity of the anticancer drug elesclomol and its complexes with Cu(II), Ni(II) and Pt(II). *J. Inorg. Biochem.* **126**, 1-6 (2013).
91. Nagai, M. Vo, N. H., Ogawa, L. S., Chimmanamada, D., Inoue, T., Chu, J., Beaudette-Zlatanova, B. C., Blackman, R. K., Barsoun, J., Koya, K., Wanda, Y. The oncology drug elesclomol selectively transports copper to the mitochondria to induce oxidative stress in cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 2142-2150 (2012).
92. Andersen, O., Aaseth, J. Molecular mechanisms of in vivo metal chelation: Implications for clinical treatment of metal intoxications. *Environ. Health Perspect.* **110**, 887-890 (2002).
93. Frija, L. M. T., Fausto, R., Loureiro, R. M. S., Cristiano, M. L. S. Synthesis and structure of novel benzisothiazole-tetrazolyl derivatives for potential application as nitrogen ligands. *J. Mol. Catal. A Chem.* **305**, 142-146 (2009).
94. Frija, L. M. T., Cristiano, M. L. S., Gómez-Zavaglia, A., Reva, I., Fausto, R. Genesis of rare molecules using light-induced reactions of matrix-isolated tetrazoles. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **18**, 71-90 (2014).
95. Toney, J. H. Fitzgerald, P., Grover-Sharma, N., Olson, S., May, W., Sundelof, J., Vanderwall, D., Cleary, K., Grant, S., Wu, J., Kozarich, J., Pompliano, D., Hammond, G. Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent inhibitors of *Bacteroides fragilis* metallo- β -lactamase. *Chem. Biol.* **5**, 185-196 (1998).
96. Honma, Y., Hanamoto, K., Hashiyama, T., Sekine, Y., Takeda, M., Ono, Y., Tsuzurahara, K. Antiallergic agents. N-(1H-Tetrazol-5-yl)-2-pyridinecarboxamides. *J. Med. Chem.* **27**, 125-128 (1984).
97. Rajasekaran, A., Thampi, P. P. Synthesis and analgesic evaluation of some 5-[β -(10-phenothiazinyl) ethyl]-1-(acyl)-1,2,3,4-tetrazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **39**, 273-279 (2004).
98. Bekhit, A. A., El-Sayed, O. A., Aboulmagd, E., Park, J. Y. Tetrazolo[1,5-

- a]quinoline as a potential promising new scaffold for the synthesis of novel anti-inflammatory and antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **39**, 249–255 (2004).
99. Gaponik, P. N., Voitekhovich, S. V., Ivashkevich, O. A. Metal derivatives of tetrazoles. *Russ. Chem. Rev.* **75**, 507–539 (2006).
100. Aromí, G., Barrios, L. A., Roubeau, O., Gamez, P. Triazoles and tetrazoles: Prime ligands to generate remarkable coordination materials. *Coord. Chem. Rev.* **255**, 485–546 (2011).
101. Ismael, A., Borba, A., Duarte, L., Giuliano, B. M., Gómez-Zavaglia, A., Cristiano, M. L. S. Structure and photochemistry of a novel tetrazole-saccharyl conjugate isolated in solid argon. *J. Mol. Struct.* **1025**, 105–116 (2012).
102. Frija, L. M. T., Pombeiro, A. J. L., Kopylovich, M. N. Coordination chemistry of thiazoles, isothiazoles and thiadiazoles. *Coord. Chem. Rev.* **308**, 32–55 (2016).
103. Hu, Y., Li, C., Wang, X., Yang, Y., Zhu, H. 1,3,4-Thiadiazole: synthesis, reactions, and medicinal, agricultural, and materials chemistry. *Chem. Rev.* **114**, 5572–5610 (2014).
104. Brigas, A. F., Fonseca, C. S. C., Johnstone, R. A. W. Preparation of 3-chloro-1,2-benzisothiazole 1,1-dioxide (pseudo-saccharyl chloride). *J. Chem. Research.* **996**, 299-300 (2002).
105. Henry, R. A., Finnegan, W. G. Mono-alkylation of Sodium 5-Aminotetrazole in Aqueous Medium. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 923–926 (1954).
106. Ismael, A., Gago, D. J. P., Cabral, L. I. L., Fausto, R., Cristiano, M. L. S. Investigations into the mechanism of solvolysis of 3-aryloxybenzisothiazoles. *Croat. Chem. Acta.* **87**, 363–373 (2014).
107. Brigas, A. F., Goncalves, P. M., Johnstone, R. A. W. Electronic effects on C-O-C ether bonds in 3-aryloxy derivatives of benzisothiazole 1,1-dioxides: Rapid ethanolysis of 3-(4-nitrophenoxy)-1,2-benzisothiazole 1,1-dioxide to give 3-ethoxy-1,2-benzisothiazole 1,1-dioxide. *Acta Crystallogr.* **54**, 251–253 (1998).
108. Manna, J., Roy, B., Sharma, P. Efficient hydrogen generation from sodium borohydride hydrolysis using silica sulfuric acid catalyst. *J. Power Sources* **275**, 727–733 (2015).
109. Shaabani, A., Rezayan, A. H. Silica sulfuric acid promoted selective oxidation of sulfides to sulfoxides or sulfones in the presence of aqueous H₂O₂. *Catal. Commun.* **8**, 1112–1116 (2007).
110. Su, J., Sun, Y. Q., Huo, F. J., Yang, Y. T., Yin, C. X. Naked-eye determination of oxalate anion in aqueous solution with copper ion and pyrocatechol violet. *Analyst* **135**, 2918–2923 (2010).
111. Egusa Saiga, A., Nishimura, T. Antioxidative properties of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by a protease treatment in an Fe (II)-induced aqueous lipid peroxidation system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 2201–2204 (2013).

112. Stookey, L. L. Ferrozine - A new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*. **42**, 779–781 (1970).
113. Stavropoulos, W. S., Thiels, B. J., Mack, R. F. Determination of calcium. US3938954A (1973).
114. Rodrigues, M. J. Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A. P., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Varela, J., Barreira, L., Custódio, L. Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Ind. Crops Prod.* **77**, 315–322 (2015).
115. Megías, C., Pastor-Cavada, E., Torres-Fuentes, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Juan, R., Pastor, J., Vioque, J. Chelating, antioxidant and antiproliferative activity of *Vicia sativa* polyphenol extracts. *Eur. Food Res. Technol.* **230**, 353–359 (2009).
116. Hidaka, S., Nishimura, H., Nakajima, K., Liu, S. Y. Effects of a rhubarb (*Rheirhizoma*) solution and its fractions on the formation of calcium phosphate precipitates. *Journal of Periodontal Research* **31**, 408–413 (1996).
117. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., Vojnov, A. A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic. Res.* **40**, 223–231 (2006).
118. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. **26**, 1231–1237 (1999).
119. Baliga, M. S., Jagetia, G. C., Rao, S. K., Babu S, K. Evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain spices in vitro: A preliminary study. *Nahrung - Food* **47**, 261–264 (2003).
120. Badarinath, A. V., Rao, K. M., Chetty, C. M., Ramkanth, S., Rajan, T. V. S., Gnanaprakash, K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Int. J. PharmTech Res.* **2**, 1276–1285 (2010).
121. Niki, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 503–515 (2010).
122. Huang, D., Boxin, O. U., Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841–1856 (2005).
123. Vera-Ramirez, L. Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, M. C., Ramirez-Tortosa, C., Granados-Principal, S., Lorente, J. A., Quiles, J. L. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **80**, 347–368 (2011).
124. Oliveira, G. L. S. Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Ciencias Farm. Basica e Apl.* **36**, 461–466 (2015).
125. Cao, G., Prior, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing

- total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* **44**, 1309–1315 (1998).
126. Prior, R. L., Cao, G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *J. AOAC Int.* **83**, 950–956 (2000).
