



Departamento de Química e Farmácia

Síntese e avaliação da atividade quelante de tetrahidropiridazinas, pirazoles e triazoles

Ana Margarida Moniz Faria

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor Américo Lemos e
coorientação da Professora Doutora Luísa Barreira

2019



Departamento de Química e Farmácia

Síntese e avaliação da atividade quelante de tetrahidropiridazinas, pirazoles e triazoles

Ana Margarida Moniz Faria

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor Américo Lemos e
coorientação da Professora Doutora Luísa Barreira

2019

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

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

Universidade do Algarve, 25 de setembro de 2019

© 2019 Ana Margarida Moniz Faria

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar 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 repositórios 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.

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus irmãos que foram sempre o meu pilar.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de dirigir um especial agradecimento ao orientador e coorientadora desta dissertação de mestrado:

Ao professor Américo Lemos pela sua paciência, profissionalismo e constante disponibilidade sempre que solicitei apoio, esclarecimentos e orientação. Um agradecimento muito especial por toda a energia que me transmitiu e por me ter contagiado com o “bichinho” da Química Orgânica.

À professora Luísa Barreira pela imensurável disponibilidade, interesse e compreensão com que me orientou no decurso deste trabalho.

Agradeço também a todos os amigos que me acompanharam durante este percurso académico, em especial à Inês Candeias e à Patrícia Pinto que sempre me ajudaram a enfrentar e ultrapassar os piores obstáculos e nunca me deixaram sozinha nos momentos menos bons.

Ao João, pelo grande apoio que me ofereceu no decorrer da realização desta dissertação.

Um enorme obrigada à minha família, em especial aos meus pais e irmãos, porque sem eles este caminho dificilmente teria sido construído.

Por fim, agradeço a todos que me apoiaram no meu percurso académico, em especial durante a realização deste trabalho, tendo em consideração que não existem agradecimentos que expressem o verdadeiro valor dos seus contributos.

Resumo

A procura de estratégias sintéticas mais ecológicas, “verdes” e amigas do ambiente na síntese de tetrahidropiridazinas, pirazoles e triazoles, assim como o estudo da respetiva atividade quelante para Cu(II) e Fe(II) constituíram os objetivos primordiais deste estudo.

Se na síntese de 1,2,3- triazoles a partir de amino-ésteres e azoalcenos foram encontradas condições que conduziram aos resultados pretendidos, na preparação dos outros dois tipos de compostos – tetrahidropiridazinas e bis(pirazolil)metanos as alternativas investigadas não conduziram a melhores resultados do que os meios convencionais que fazem a utilização de solventes orgânicos halogenados.

Em relação à atividade quelante de Cu(II) e Fe(II), os compostos MM2 e MM9 revelaram que poderão vir a ser promissores como base de trabalho para o desenvolvimento de novos compostos heterocíclicos de azoto e oxigénio com atividade quelante.

Palavras Chaves: Química Verde; Tetrahidripiridazinas; Pirazoles; Triazoles; Cu (II) e Fe(II); Atividade Quelante.

Abstract

The main objectives of this thesis were the development of more ecological, greener and environmental friendly synthetic strategies for tetrahydropyridazine, pyrazoles and triazoles, as well as the study of their respective chelating activity for Cu(II) and Fe(II).

While the synthesis of 1,2,3 – triazoles from amino-esters and azoalkenes was successful and lead to the expected results, for the preparation of the remaining compounds - tetrahydropyridazines and bis(pyrazolyl)methanes, the investigated alternatives did not produced results better than those using conventional methods resorting to halogenated organic solvents.

Concerning the chelating activity, the compounds MM2 and MM9 revealed themselves as promising structural core for the development of new heterocyclic compounds of nitrogen and oxygen with chelating activity.

Key-words: Green Chemistry, tetrahydropyridazines, bis(pyrazolyl)methanes, triazoles, Cu(II), Fe(II), Chelating Activity.

Índice Geral

Agradecimentos	iv
Resumo.....	v
Abstract	vi
Índice Geral	vii
Abreviaturas.....	viii
Índice de Figuras	ix
Índice de Esquemas.....	x
Índice de Tabelas.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Metais no organismo e agentes quelantes	1
1.2. Compostos Heterocíclicos	4
1.3. Química Verde.....	9
2. Resultados e Discussão	11
2.1. Tentativas de Síntese utilizando química verde.....	11
2.1.1. Reações de cicloadição: síntese de tetrahidropiridazinas	12
2.1.2. Reações adição conjugada: Síntese de 1,2,3-triazoles e bis(pirazolil) metanos .	14
2.1.2.1. Preparação de 1,2,3 triazoles	14
2.2. Atividade quelante	16
3. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	19
4. Experimental	20
4.1. Síntese Química.....	20
4.1.1. Considerações gerais.....	20
4.1.2. Preparação das hidrazonas α -halogenada e α,α' -dihalogenadas	21
4.2. Análise da Atividade Quelante	26
4.2.1. Reagentes e produtos químicos	26
4.2.2. Atividade quelante dos metais em estudo.....	27
4.2.3. Tratamento estatístico dos resultados.....	28
5. Bibliografia	29
Anexos.....	34

Abreviaturas

BPMs - Bis(pirazolil)metanos

Bu – Butilo

^tBu – *tert*-butilo ou butilo terciário

CC – Cloreto de colina

DCM - diclorometano

DES – Solvente eutético profundo

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

Et – Etilo

Gli - Glicerol

HOMO – Orbital molecular ocupada de mais alta energia

LUMO – Orbital molecular não ocupada de mais baixa energia

NADES – Solvente eutético profundo natural

PV – Violeta de pirocatecol

TMS – Tetrametil silano

Ts – Tosilo (*p*-toluenosulfonilo)

ROS- Espécies reativas de oxigénio

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Libertação de radicais livres após a reação de oxigénio livre no plasma e a fração livre de Fe(II).....	2
Figura 1.2 - Reação entre os metais de transição e o oxigénio presente nas células, formando ROS	3
Figura 1.3 - Estrutura Química do EDTA	3
Figura 1.4 -Estrutura de piridazinas, pirazoles e 1,2,3- triazoles.....	4
Figura 1.5 -Síntese do núcleo de pirazole.....	5
Figura 1.6 -Regioseletividade nas reações de hetero Diels-Alder de azoalcenos	7
Figura 1.7 -Preparação de 1,2,3-triazoles-1,4-disubstituidos via reação 1,3-dipolar.....	7
Figura 1.8 - Preparação de 1,2,3-triazoles por adição conjugada de amins primárias a azoalcenos.....	8
Figura 2.1 - Atividade quelante em % dos diferentes compostos para o Fe(II). Controlo positivo é EDTA 1 mg/ml. Barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).....	16
Figura 2.2 - Atividade quelante em % dos diferentes compostos para o Cu(II). Controlo positivo é o EDTA 1 mg/ml. Barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes e letras assinaladas com letras iguais são significativamente iguais ($p < 0,05$).....	17

Índice de Esquemas

Esquema 1.1- Método usual de funcionalização de bis(pirazolil)metanos.....	5
Esquema 1.2- Via sintética para a preparação de bis(pirazolil)metanos.....	6
Esquema 1.3- Preparação de piridazinas via reações de hetero Diels-Alder.....	6
Esquema 2.1 - Estratégias de síntese de tetrahidropiridazinas, pirazoles e triazoles....	10
Esquema 2.2 -Reações de ciclo-adição de azoalcenos substituídos em solvente não orgânico.....	11

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 -Resultados da síntese da tetrahidropiridazina 4 (MM2).....	12
Tabela 2.2 -Adição de aminoácidos e amino-éster ao azoalceno.....	13
Tabela 2.3 -Resultados dos vários solventes na síntese dos BPMs MM9 e MM10.....	14

1. Introdução

1.1. Metais no organismo e agentes quelantes

Sabe-se hoje, que é necessária uma homeostasia para um bom funcionamento do organismo humano, de modo a que possa realizar adequadamente as suas funções. Este conhecimento pressupõe um equilíbrio de metais essenciais que promovam uma atividade correta de todos os processos fisiológicos.¹

Com o progressivo aumento da industrialização nos países desenvolvidos, tem vindo a crescer o número de doenças associadas ao aumento da concentração de metais no corpo humano, em consequência do incremento de libertação de metais para o ecossistema que se reflete no agravamento de toxicidade para o organismo.²

A ingestão de alimentos ricos em iões metálicos, também favorecerá o aumento da concentração destes iões no organismo, promovendo um distúrbio metabólico que leva a uma ineficácia dos sistemas bioquímicos, interferindo com a absorção, distribuição e excreção destes iões, comprometendo a toxicidade do organismo.^{2,3}

Sabendo que uma dose excessiva de iões metálicos no organismo pode levar à morte, a Química Medicinal propôs uma terapia farmacológica, na qual um agente quelante é administrado para facilitar a excreção ou redistribuição de um elemento em excesso.

Segundo a comunidade científica, um agente quelante é descrito como uma molécula de ligandos que possuem mais que um par de eletrões não ligantes, que vão servir como doadores de pares de eletrões através de vários átomos para um único ião aceitador, originando estruturas de anéis muito estáveis. Esta interação ligando-metal é mencionada como uma quelação.²

Desta forma, agentes quelantes usados para fins terapêuticos devem respeitar vários critérios, tais como:

- ✓ Possuir alta solubilidade em água, garantindo uma solubilidade adequada em condições fisiológicas;²
- ✓ Apresentar uma grande afinidade e seletividade para o metal diminuindo efeitos colaterais;⁴
- ✓ Resistência a variações de pH fisiológico;²
- ✓ Capacidade de formar complexos menos tóxicos do que o íon metálico livre e promover uma rápida eliminação do metal;²
- ✓ Capacidade de atravessar membranas lipídicas;⁴
- ✓ Poderem ser administrados por via oral ou intravenosa promovendo uma eficácia terapêutica;²
- ✓ Apresentar um elevado grau lipofílico de modo a penetrar mais facilmente a barreira hematoencefálica para a eliminação de íões em excesso no sistema nervoso central.²

Tal como mencionado anteriormente, os agentes quelantes são usados para a eliminação de íões em excesso no organismo humano. Existem várias doenças caracterizadas por um excesso de íões, mas neste trabalho iremos centrar-nos no excesso de íões de Fe(II) e Cu(II).

Uma sobrecarga de Fe(II) no organismo, poderá provocar danos progressivos em vários órgãos vitais, tais como o fígado, coração e no sistema endócrino. Quando existe um excesso de ferro na corrente sanguínea, o transportador destes íões, chamado de transferrina, fica sobrelotado, aumentando a fração livre de íões Fe no plasma. Este excesso de íões Fe(II) livre no plasma reage com o oxigénio presente nos tecidos, libertando espécies reativas de oxigénio (ROS). Estas espécies é que são responsáveis pelos danos provocados nos órgãos vitais⁵ (Figura 1.1).

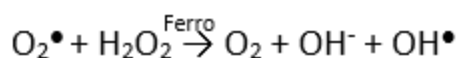


Figura 1.1 -Libertação de radicais livres, após a reação de oxigénio livre no plasma e a fração livre de Fe(II).

A doença de Wilson é caracterizada por um distúrbio no metabolismo do cobre. A ceruloplasmina é o principal transportador de Cobre no organismo humano, facilitando a sua excreção, e nesta patologia clínica, este transportador apresenta baixos níveis séricos. Desta forma, existe uma acumulação de cobre em diferentes órgãos, principalmente no fígado e no sistema nervoso central (SNC). Tal como o ferro, o cobre também reage com o oxigénio presente nas células, devido ao stress oxidativo, originando ROS que provocam malformações no SNC e cirroses hepáticas descritas na doença de Wilson.⁶

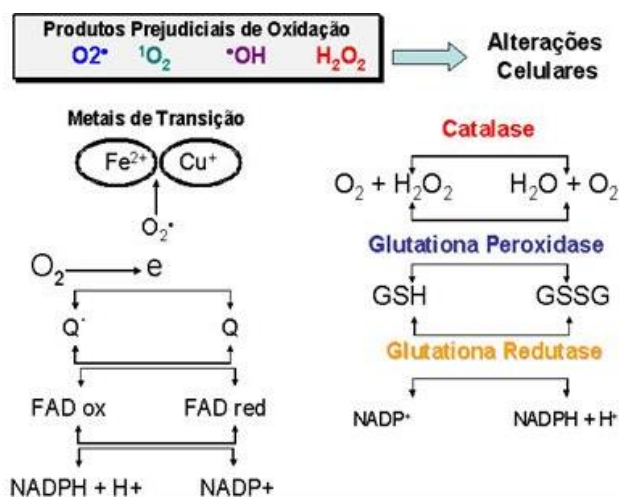


Figura 1.2 - Reação entre os metais de transição e o oxigénio presente nas células, formando ROS

Os agentes quelantes usados como terapêutica para este tipo de patologias, têm como principal objetivo diminuir a fração livre de iões no plasma promovendo a eficácia terapêutica.

O EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético, é utilizado há vários anos na prática clínica como agente quelante. Tal como descrito por Ferrero¹, este composto é capaz de coordenar vários metais e é utilizado em vários tipos de intoxicações provocadas por excesso de metais tais como, Cádmiu, Alumínio, Chumbo, Cálcio, Ferro e Cobre. No caso do Alumínio, a eficácia terapêutica deste agente quelante foi demonstrada na remoção crónica deste metal.

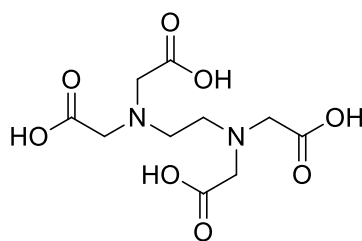


Figura 1.3 - Estrutura Química do EDTA

Por outro lado, o EDTA pode provocar vários efeitos colaterais. Baran² no seu trabalho sobre agentes quelantes, demonstrou que doses elevadas de EDTA são potencialmente nefrotóxicas, existindo comprometimento renal, assim como também a falta de seletividade deste agente quelante pode levar a um incremento na remoção de Cálcio (II) afetando a estrutura óssea. A quelação excessiva de cálcio iônico presente na corrente sanguínea pode causar tetania, espasmos musculares causados pela sua falta, e que em casos extremos até poderá causar a morte do indivíduo.

Face a esta asserção e numa tentativa de contribuir para encontrar melhores opções terapêuticas, tentámos investigar outros compostos que pudessem funcionar como agentes quelantes e eventualmente apresentassem propriedades menos nocivas para o organismo e que possuíssem ao mesmo tempo, uma maior afinidade e seletividade para os metais em causa, isto é, Cu(II) e Fe(II).

1.2. Compostos Heterocíclicos

Os compostos heterocíclicos que contêm átomos de azoto e oxigénio, têm demonstrado a possibilidade de coordenação com diversos metais, podendo assim constituir uma mais-valia na investigação da possibilidade de este tipo de compostos poderem ser utilizados como agentes quelantes.⁷

De entre a enorme variedade de compostos possuindo átomos de azoto, piridazinas (i), pirazoles (ii) e 1,2,3-triazoles (iii) (Figura 1.4), são compostos heterocíclicos que contêm azoto com pares de eletrões disponíveis e terão a

possibilidade de funcionarem como ligandos ou agentes quelantes para vários metais, e em particular, os iões metálicos em causa.

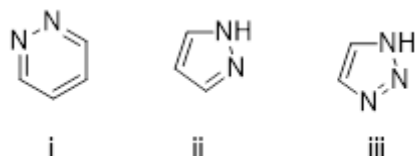


Figura 1.4 -Estrutura de piridazinas, pirazoles e 1,2,3-triazoles.

Na maioria das estratégias sintéticas, a preparação de unidades básicas de 1,2,3-pirazole envolve a reação de compostos 1,3-dicarbonílicos com derivados de hidrazina, tal como demonstrado na Figura 1.5, originando um anel de 5 membros constituído por 2 átomos de azoto.⁸

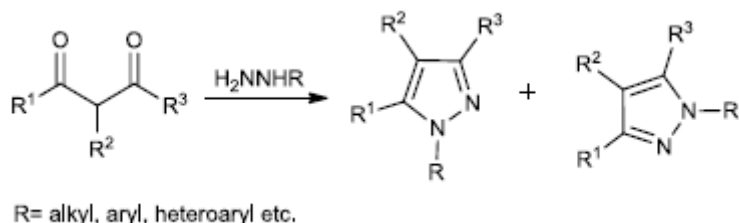
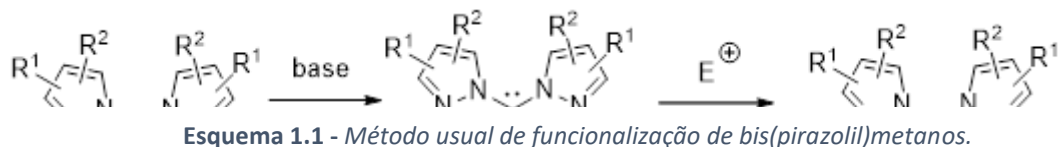


Figura 1.5 - Síntese do núcleo de pirazole

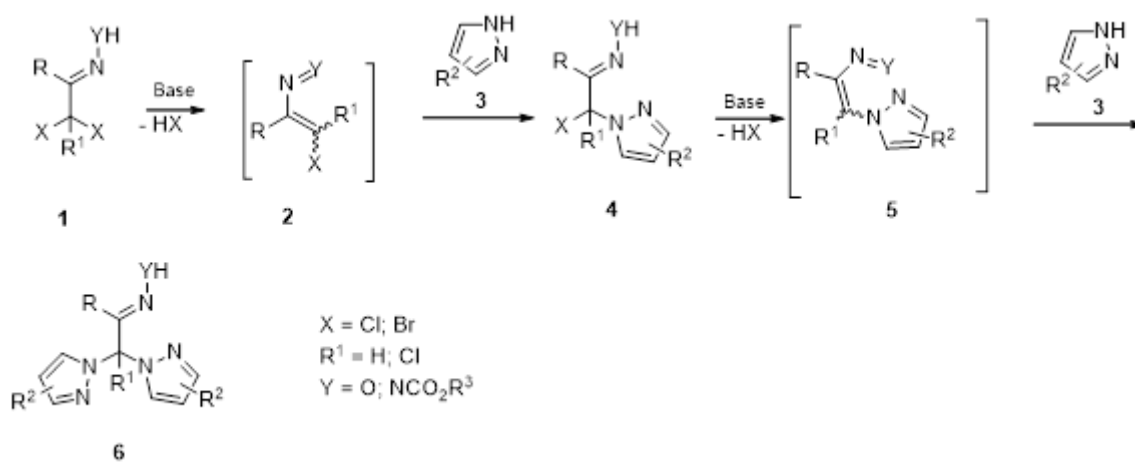
Desde o trabalho pioneiro de Trofimenko,⁹Bis(pirazolil)metanos (BPMs), têm sido exaustivamente utilizados na química de coordenação¹⁰ e complexos destes compostos com diversos metais têm sido intensivamente aplicados em numerosas situações desde a química organometálica e supramolecular¹¹ até compostos com atividade anti-tumoral.¹²

Na sua grande maioria bis(pirazolil)metanos funcionalizados no carbono da ponte metilénica, têm sido preparados através da desprotonação com bases muito fortes e o carbanião resultante intercetado pelo eletrófilo desejado¹³ (Esquema 1.1).



Esquema 1.1 - Método usual de funcionalização de bis(pirazolil)metanos.

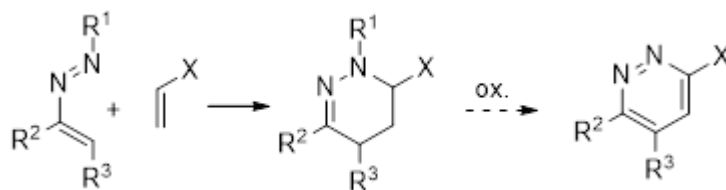
Recentemente¹⁴ foi reportada na literatura uma alternativa sintética conduzindo à obtenção de bis(pirazolil)metanos funcionalizados, baseada numa dupla e consecutiva adição conjugada-1,4, de núcleos de pirazole a nitroso- e azo-alcenos **2** e **5** (Esquema 1.2). Esta rota sintética evitava assim o uso de bases muito fortes – suscetíveis de implementar reações laterais indesejadas – e evitava também um meio de reação completamente anidro, verificando-se, por outro lado, que apresentava condições de reação muito suaves. Deste modo uma vasta gama de bis(pirazolil)metanos portadores, no carbono da ponte metilénica, da função oxima ou hidrazona – que numa etapa posterior poderia ser hidrolisada à função carbonilo e consequentemente abrir caminho a uma grande variedade de manipulações – poderão ser obtidos, dependendo da unidade de pirazole de partida e do respetivo nitroso ou azo-alceno utilizados.



Esquema 1.2- Via sintética para a preparação de bis(pirazolil)metanos.

Piridazinas são compostos heterocíclicos aromáticos de seis membros pertencentes à família das diazinas, nomeadamente 1,2-diazinas. De entre os vários métodos sintéticos para a sua preparação, as reações de hetero Diels-Alder entre azoalcenos eletrofílicos – normalmente gerados a partir das respetivas α -halogeno

hidrazonas - e dienófilos ricos em eletrões, estão entre as metodologias mais utilizadas e de implementação mais expedita¹⁵ (Esquema 1.3).



Esquema 1.3 - Preparação de tetrahidro-piridazinas via reações de hetero Diels-Alder conjugada

Estas reações de hetero Diels-Alder funcionam com procura eletrónica inversa, i.e., o heterodieno sendo eletrofílico ou pobre em densidade eletrónica utilizará ou será controlado pela orbital LUMO, enquanto o dienófilo, rico em densidade eletrónica, utilizará a sua orbital HOMO. Deste modo quanto mais eletrofílico for o heterodieno (portador de grupos substituintes eletro-atratores ou retiradores) e quanto mais nucleofílico ou rico em densidade eletrónica for o dienófilo (portador de grupos doadores) menor será o diferencial energético entre as orbitais HOMO e LUMO e assim mais rápida, eficiente e régio-seletiva será a reação. O régio-isómero maioritário ou exclusivo, resultará da sobreposição das orbitais HOMO-LUMO, de modo que o alinhamento destas permita a interação entre os coeficientes grande-grande (em módulo) e coeficientes pequeno-pequeno¹⁶ (Figura 1.6). As tetrahidropiridazinas assim obtidas poderão depois eventualmente ser oxidadas a piridazinas.

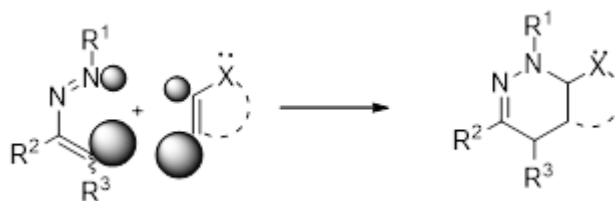


Figura 1.6 - Regioseletividade nas reações de hetero Diels-Alder de azoalcenos.

Um dos métodos mais comuns para a síntese de 1,2,3-triazoles é através da reação de cicloadição 1,3-dipolar envolvendo azidas orgânicas e alcinos.¹⁷ (Figura 1.6). Esta estratégia desenvolvida por Huisgen e colaboradores,^{17a} conheceu um grande impulso através da introdução, no início do corrente século, da catálise da reação com a utilização de sais de Cu(I),^{17b,c} que permitiu aumentar drasticamente a velocidade da

reação, a sua eficiência e rendimento, assim como a regioseletividade na obtenção exclusiva do isómero 1,4-disubstituído (Figura 1.7).

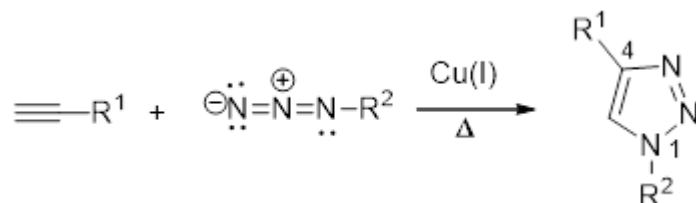


Figura 1.7- Preparação de 1,2,3-triazoles-1,4-disubstituídos via reação 1,3-dipolar.

Estes desenvolvimentos permitiram a ampla utilização desta reação que se tornou um dos melhores exemplos de química “click” ou reações “click”^{17e,f} – reações rápidas, regioespecíficas, sem produção de outros produtos laterais (ou que possam ser removidos sem recurso a cromatografia) e com custos ambientais reduzidos (solvente, temperatura, etc.).

Existem outros métodos de obtenção de triazoles sem recurso ao uso de azidas (potencialmente explosivas) e à catálise por metais.¹⁸ Uma dessas estratégias baseia-se na adição de amins primárias a azoalcenos conjugados, que possuam na posição 1 uma funcionalidade com capacidade de ser um grupo abandonante.^{18a,b} (Figura 1.8)

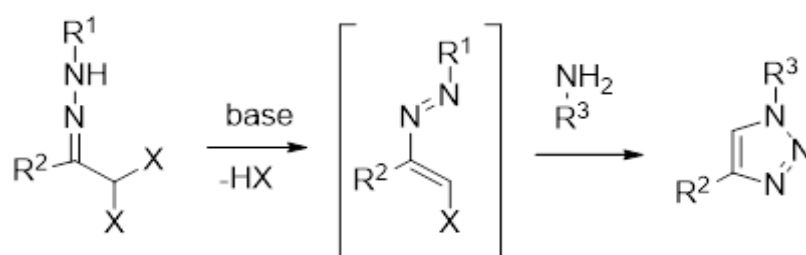


Figura 1.8 - Preparação de 1,2,3-triazoles por adição conjugada de amins primárias a azoalcenos

O mecanismo proposto pelos autores,^{18a} envolve uma adição conjugada ao azoalceno formado *in situ* – por desalogenação da hidrazona inicial. Subsequente eliminação do grupo R1 (tosilo) e concomitante ciclização produz o 1,2,3-triazole-1,4-disubstituído.

1.3. Química Verde

A síntese química, e em particular a síntese orgânica, quer a nível laboratorial quer industrial está a centrar-se cada vez mais na chamada “Química Verde”. Este conceito refere-se a reações que podem ser realizadas à temperatura ambiente ou temperaturas menos elevadas, sem solvente orgânico ou com solventes menos tóxicos e amigos do ambiente e com a menor produção de resíduos, de modo que as reações sejam economicamente rentáveis e com o mínimo de efeitos e impactos nocivos.¹⁹

Neste contexto, solventes eutéticos profundos – DES, ou solventes eutéticos profundos naturais – NADES, quando constituídos por produtos naturais, têm sido considerados como os solventes do século XXI, devido às suas características de muito baixa toxicidade, não-volatilidade e biodegradabilidade, aliadas às suas propriedades de aumento de solubilidade de compostos ou medicamentos pouco solúveis em água, bem como aumento da permeabilidade de membranas e da pele.²⁰⁻²⁴ Também, como a sua síntese envolve somente a mistura física de dois ou mais componentes naturais, a sua produção tem pouco impacto em termos ambientais, constituindo também alternativas economicamente vantajosas, devido ao uso de técnicas simples de produção, relativamente a outros solventes, como por exemplo os líquidos iónicos.

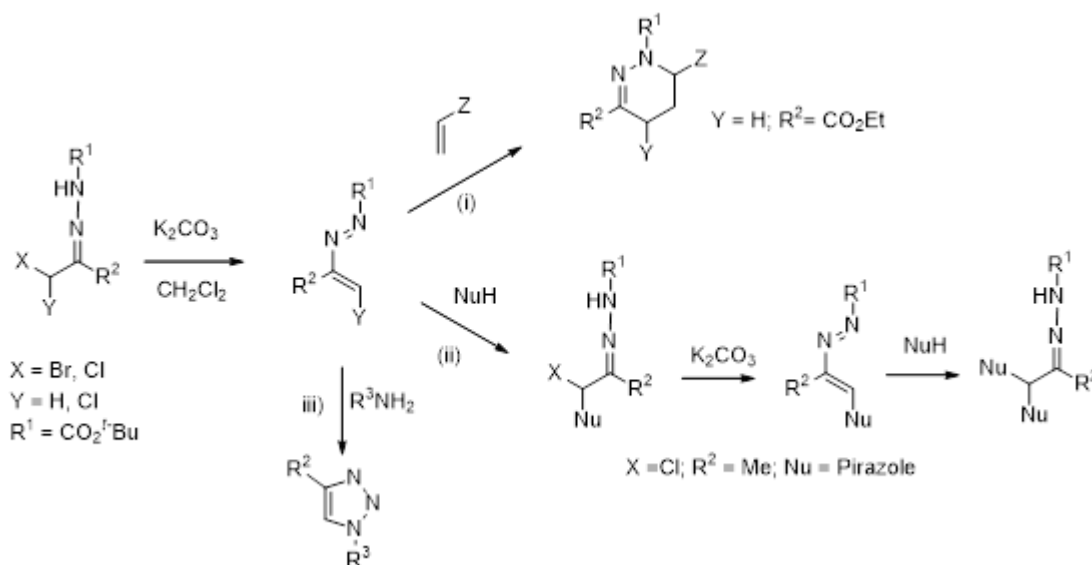
DES podem então ser descritos como uma mistura de dois ou mais componentes que de acordo com o seu rácio molar exibem uma grande diminuição do ponto de fusão, tornando-se líquidos ou quase líquidos à temperatura ambiente. Nestas condições, os componentes interagem entre si através de ligações por pontes de hidrogénio, possibilitando assim o ajuste das suas propriedades físicas, como por exemplo ponto de fusão, polaridade, viscosidade, acidez/basicidade, entre outras, através da criteriosa seleção dos componentes, e respetivo rácio, doador e aceitador das ligações por ponte hidrogénio. Assim os NADES e os DES têm tido enorme sucesso em síntese orgânica como solventes e também como catalisadores orgânicos.²⁵⁻³⁶

As reações de síntese orgânica em água têm nos últimos anos atraído um grande interesse, não só por causa do baixo custo económico, mas sobretudo pelos benefícios ambientais e também porque podem induzir alterações muito benéficas na reatividade.³⁷ Em particular, as reações de Diels-Alder e hetero Diels-Alder podem sofrer significativos aumentos na velocidade e maior seletividade, quando realizadas em água, ou quando esta é usada com um co-solvente, em comparação com solventes orgânicos.³⁸

2. Resultados e Discussão

2.1. Tentativas de Síntese utilizando química verde

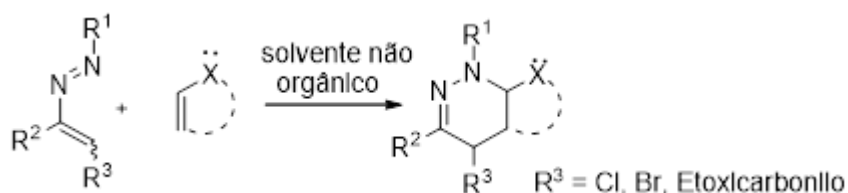
Iniciámos os nossos estudos na tentativa de encontrar soluções de síntese, tendo em mente a obtenção de compostos heterocíclicos de azoto, nomeadamente tetrahidropiridazinas, pirazoles e 1,2,3-triazoles com eventual potencial de coordenação com iões metálicos, que permitissem a utilização de uma química mais amiga do ambiente, através da investigação da possibilidade de eliminar ou reduzir a utilização de solventes orgânicos, especialmente de solventes orgânicos halogenados. Pretendíamos assim, a eventual aplicação às duas estratégias sintéticas diferentes – uma que envolvia reações de hetero-Diels-Alder (i) e a outra através de reações de adição-conjugadas 1,4 (ii) e (iii) (Esquema 2.1).



Esquema 2.1- Estratégias de síntese de tetrahidropiridazinas, pirazoles e triazoles.

2.1.1. Reações de cicloadição: síntese de tetrahidropiridazinas

Nos anos recentes têm sido reportados na literatura trabalhos sobre a utilização, em reações de hetero Diels-Alder entre azoalcenos e alcenos ou heterociclos e heteroaromáticos ricos em eletrões, em H_2O ,³⁸ ou em misturas de solvente orgânico/ H_2O ³⁹ ou a utilização de solventes eutéticos profundos naturais (NADES) ou mistura de NADES/ H_2O .⁴⁰ Constatou-se, no entanto, que em todos estes trabalhos o azoalceno era portador de um substituinte na posição C-4 (R^3 - Esquema 2.2) e virtualmente não existiam na literatura exemplos em que o azoalceno possuísse só átomos de hidrogénio nessa posição ($\text{R}^3 = \text{H}$ - Esquema 2.2)



Esquema 2.2 - Reações de ciclo-adição de azoalcenos substituídos em solvente não orgânico.

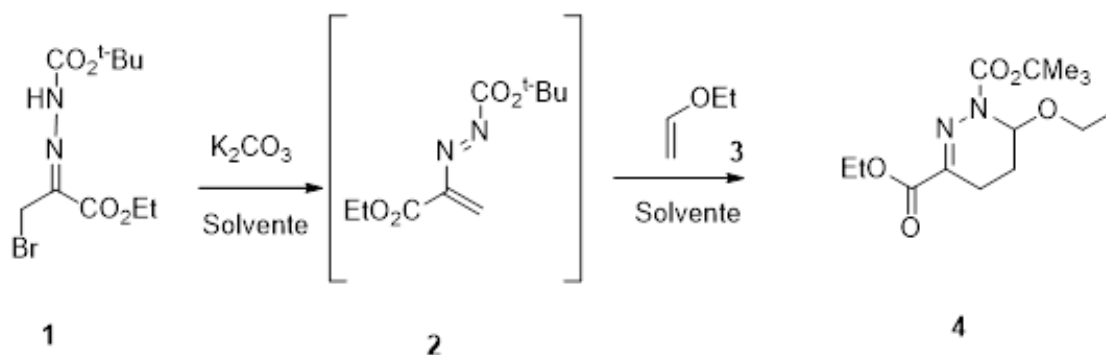
Fomos então, numa fase inicial dos nossos estudos, investigar a possibilidade do azoalceno derivado da *tert*-butoxicarbonilhidrazona do bromopiruvato de etilo, poder ser intercetado pelo éter vinílico etílico, originando a respetiva tetrahidropiridazina, utilizando solventes não convencionais. Os resultados encontrados estão resumidos na Tabela 2.1.

Como se pode verificar pela análise dos dados da tabela, no que respeita às reações de hetero Diels-Alder, todas as tentativas de utilização de um solvente não convencional ou orgânico resultaram em resultados muito negativos. As reações produziram sistematicamente produtos de degradação, não se conseguindo detetar vestígios do cicloaduto desejado. Só quando se utilizaram as condições convencionais

com solvente orgânico, neste caso o diclorometano, foi possível isolar o produto desejado.

Estes resultados parecem indicar que o heterodieno, com dois substituintes fortemente retiradores por ressonância, de densidade eletrônica nas posições N1 e C3, e não possuindo um substituinte na posição C4, que se sabe constituir fator determinante para uma estabilidade acrescida do azoalceno,^{15c,e} estará demasiado exposto a interações/reações com os átomos doadores da água ou do solvente eutético, conduzindo eventualmente a uma eletrofilicidade ainda superior e induzindo a sua rápida degradação, não permitindo assim a sua interceção pelo dienófilo.

Tabela 2.1- Resultados da síntese da tetrahidropiridazina 4 (MM2).



Entrada	Solvente	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	H ₂ O	4	0
2	H ₂ O	16	0
3	H ₂ O/CH ₂ Cl ₂ (10/1)	16	0
4	NADES ¹	4	0
5	NADES ¹	16	0
6	NADES ²	16	0
7	NADES ¹ /H ₂ O (4:1)	16	0
8	CH ₂ Cl ₂	16	87

NADES¹ = Cloreto de colina/Glicerol 2/1; NADES² = Cloreto de colina/Urea 2/1

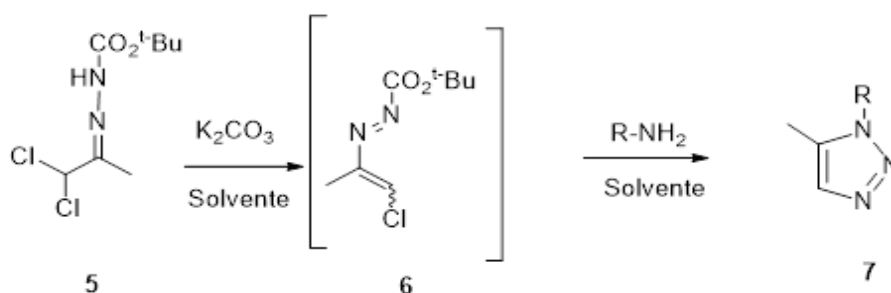
2.1.2. Reações adição conjugada: Síntese de 1,2,3-triazoles e bis(pirazolil) metanos

2.1.2.1. Preparação de 1,2,3 triazoles

Como se fazia referência no capítulo de introdução, uma das estratégias possíveis para a obtenção de 1,2,3-triazoles baseia-se na adição 1,4-conjugada de aminas primárias a azoalcenos, que sejam portadores de um substituinte na posição N1 que possa funcionar também como grupo abandonante ou rejeitado.^{18a,b} Seria de todo o interesse tentar expandir esta abordagem à adição de aminoácidos ou amino-ésteres naturais, obviando a utilização quer de metais quer de solventes orgânicos tradicionais.

Através da utilização do azoalceno **6**, tentámos então encontrar condições de reação, nomeadamente solvente mais amigo do ambiente e aminoácidos que conduzissem à obtenção dos triazoles desejados (Tabela 2.2).

Tabela 1.2- Adição de aminoácidos e amino-éster ao azoalceno **6**.



Entrada	Solvente	RNH ₂	Rendimento (%)
1	H ₂ O	L-Triptofano	0
2	H ₂ O	L-Treonina	0
3	H ₂ O	Glicina	0
4	H ₂ O	L-Triptofano éster etílico	0
5	H ₂ O/CH ₂ Cl ₂ (2/1)	L-Triptofano éster etílico	38
6	NADES ¹	L-Triptofano éster etílico	0
7	NADES ¹ /H ₂ O (4:1)	L-Triptofano éster etílico	vestígio
8	CH ₂ Cl ₂	L-Triptofano éster etílico	0

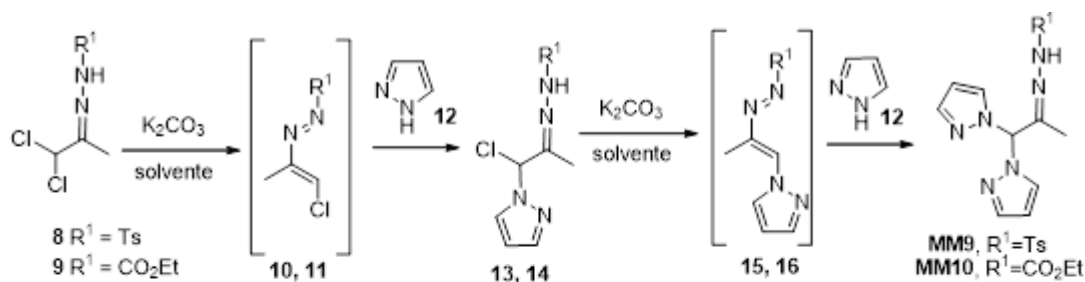
NADES¹ = Cloreto de colina/Glicerol 2/1

Os resultados encontrados não foram muito encorajadores. A utilização do NADES CC/Gli, ou NADES/H₂O (entradas 6 e 7), que tem sido utilizado em outras situações no grupo de trabalho com grande sucesso,⁴⁰ não conseguiu minimamente atingir os objetivos planejados. A utilização de água (entradas 1-3) ou solvente orgânico (entrada 8) também não foi de encontro às expectativas. No entanto quando se utilizou o éster etílico do *L*-triptofano e uma mistura de H₂O/DCM, foi possível isolar, após cromatografia de flash, o desejado triazole (MM8). Estes dados parecem evidenciar da necessidade de encontrar um balanço próprio de solventes polares aprótico/prótico no sentido de potenciar a formação do triazoles.

2.1.2.2. Preparação de bis(pirazolil)metanos

Uma das outras metas que nos tínhamos proposto era tentar encontrar alternativas de síntese mais ecológicas para a obtenção de bis(pirazolil)metanos. Assim de modo semelhante aos casos anteriores, começamos por tentar estudar quais seriam as implicações da utilização de solventes eutéticos NADES, e/ou da mistura ternária NADES/H₂O nos resultados das reações e compará-los com a rota sintética utilizando solvente orgânico convencional (DCM).

Tabela 2.2- Resultados dos vários solventes na síntese dos BPMs MM9 e MM10.



Entrada	R ¹	Solvente	MM9 (%)	MM10 (%)
1	Ts	NADES	0	
2	Ts	NADES/H ₂ O (4/1)	0	
3	Ts	NADES/H ₂ O (1/4)	0	
4	Ts	CH ₂ Cl ₂	62	
5	CO ₂ Et	NADES		0
6	CO ₂ Et	NADES/H ₂ O (4/1)		0
7	CO ₂ Et	NADES/H ₂ O (1/4)		0
8	CO ₂ Et	CH ₂ Cl ₂		73

NADES = Cloreto de colina/Glicerol (2/1)

Os resultados encontrados, sumariados na Tabela 2.3, vieram mais uma vez demonstrar que as alternativas que tentamos implementar foram frustrantes, não indo de encontro às expectativas. A utilização do solvente NADES - Cloreto de colina/Glicerol (entradas 1,5) não conduziram ao produto desejado. Sabendo que a adição de água pode alterar significativamente as propriedades do NADES, como por exemplo viscosidade e sobretudo as ligações por ponte de hidrogénio entre os componentes,^{40,41} tentamos também a mistura ternária Cloreto colina/Glicerol/H₂O (entradas 2,3 e 6,7) em proporções diversas, mas os resultados foram igualmente desanimadores. A utilização do solvente aprótico orgânico halogenado diclorometano, conduziu aos pirazoles desejados com bons rendimentos e sem grandes reações laterais.

2.2. Atividade quelante

Após a síntese dos compostos, estes foram testados relativamente à sua atividade quelante de Cu²⁺ e Fe²⁺ na concentração de 1 mM. Após vários testes referidos no ponto anterior apenas os compostos MM2, MM8, MM9 e MM10 passaram por esta etapa. Os resultados encontrados estão sumariados em anexo.

A atividade quelante para o Fe(II) foi definida através da alteração de cor provocada pela formação do complexo de ferrozina com o Fe(II) livre e a atividade quelante do Cu(II) determinou-se a partir da mudança de cor devido à formação do complexo de Cu(II) com o pirocatecol.

Conforme evidenciado na figura seguinte (Figura 2.1), apenas o composto MM2 demonstrou apresentar algum efeito quelante, mas segundo a literatura, para um composto ser considerado um bom agente quelante, tem de possuir uma percentagem de atividade quelante acima dos 50%. Neste caso, podemos afirmar que este composto não é considerado um bom agente quelante, mas poderá ser um composto promissor, se novas modificações estruturais forem introduzidas, de modo a melhorar o seu efeito quelante.

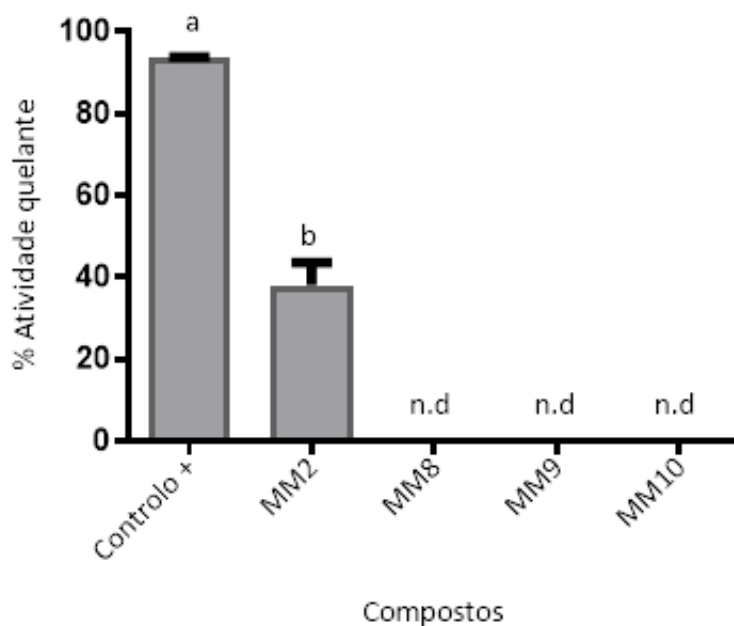


Figura 2.1- Atividade quelante em % dos diferentes compostos para o Fe(II). Controlo positivo é EDTA 1 mg/ml. Barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Depois de analisada a atividade quelante para o Ferro (II), testou-se a atividade quelante dos compostos sintetizados para o Cobre (II).

Tal como demonstrado na Figura 2.2 apenas os compostos MM2 e MM9 apresentaram alguma atividade. Dado que o próprio controlo positivo apresentou uma percentagem de atividade quelante inferior aos 50% seria preferível repetir este ensaio dado a inesperada baixa de atividade do controlo positivo.

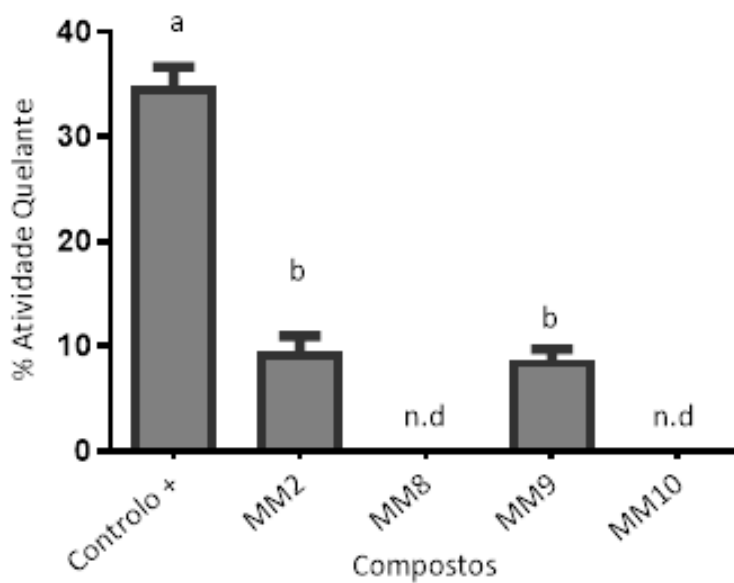


Figura 2.2- Atividade quelante em % dos diferentes compostos para o Cu(II). Controlo positivo é o EDTA 1 mg/ml. Barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes e letras assinaladas com letras iguais são significativamente iguais ($p < 0,05$).

Desta forma, após analisar os resultados obtidos, pode-se concluir que para considerar os compostos MM2 e MM9 como futuros agentes quelantes, estes terão que ser modificados promovendo uma alteração de funcionalidades na sua estrutura, de modo a proporcionar uma coordenação e quelação mais eficaz e seletiva para os metais em causa.

3. Conclusão e Perspetivas Futuras

As tentativas de aplicações de química verde na síntese dos nossos ligandos, nas condições experimentais testadas, não constituíram verdadeiras alternativas à utilização de solventes convencionais orgânicos. Numas situações, provavelmente devido aos solventes levarem à rápida destruição-degradação do intermediário azoalceno por este não possuir um substituinte estabilizador na posição C4 – casos das tetrahidropiridazinas. Nos casos das adições 1,4-conjugadas utilizadas para a síntese dos BPMs, a utilização de NADES ou NADES/H₂O foi prejudicial quando comparada com a utilização de diclorometano, devido eventualmente não à destruição ou degradação do azoalceno, mas talvez devido à indução da inibição da nucleofilicidade ou solvatação do nucleófilo, neste caso o pirazole.

O objetivo primordial no estudo de um composto ao testar a sua atividade quelante é tentar cumprir todos os critérios necessários para utilizar o composto para fins terapêuticos. Assim, neste trabalho foi trabalhada a afinidade dos nossos compostos para os metais em causa de modo a diminuir os efeitos colaterais que poderiam vir a provocar no organismo.

Desta forma, foi possível observar que apenas 2 compostos, MM2 e MM9, é que mostraram ter alguma afinidade para o Cu(II) e Fe(II) e que, futuramente, poderão vir a ser objeto de estudo para futuras alterações de funcionalidades estruturais de modo a conseguir uma maior coordenação e uma maior afinidade para os metais em causa.

4. Experimental

4.1. Síntese Química

4.1.1. Considerações gerais

Os reagentes base de partida foram adquiridos a fornecedores comerciais Aldrich, Fluka ou Acros e os solventes à empresa LaborSpirit e utilizados sem qualquer purificação adicional.

Para o controle das reações por cromatografia em camada fina (TLC) foram utilizadas placas de alumínio revestidas com gel de sílica 60 com 0,20 mm de espessura e indicador de fluorescência UV₂₅₄ (Macherey-Nagel). A revelação das placas foi efetuada por exposição a radiação U.V. de 254 nm ou a uma atmosfera de iodo.

Na purificação dos compostos por cromatografia de flash seca (Dry-Flash) utilizou-se sílica-gel de tipo G contendo 13% de Sulfato de Cálcio (60760 Aldrich) como fase estacionária e o eluente variando de acordo com a descrição experimental.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos nos serviços da Unidade de RMN da Universidade de Coimbra em espectrómetros Bruker Avance operando a 400 MHz para espectros protónicos ¹H e 100 MHz para espectros de carbono ¹³C. Os desvios químicos (em ppm) indicados para cada composto são relativamente ao padrão tetrametilsilano (TMS), a multiplicidade de sinal s (singuleto), sl (singuleto-alargado), d (duplete), dd (duplo-duplete), ddd (duplo-duplo-duplete), t (triplete), q (quarteto) e m (multiplete) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz.

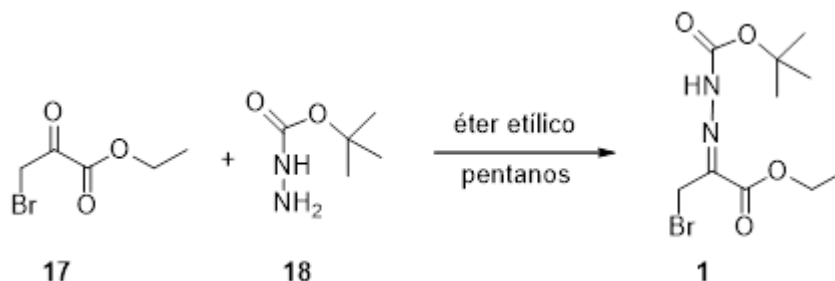
Os espectros de IV foram registados num espectrofotómetro Bruker FT-IR Tensor 27 utilizando discos de KBr e as bandas mais intensas são expressas em cm⁻¹.

Os pontos de fusão foram obtidos num aparelho EZ-Melt automated e não estão corrigidos.

Os solventes NADES CC/Glic e CC/Ureia foram preparados no grupo laboratorial de acordo com procedimentos da literatura.⁴²

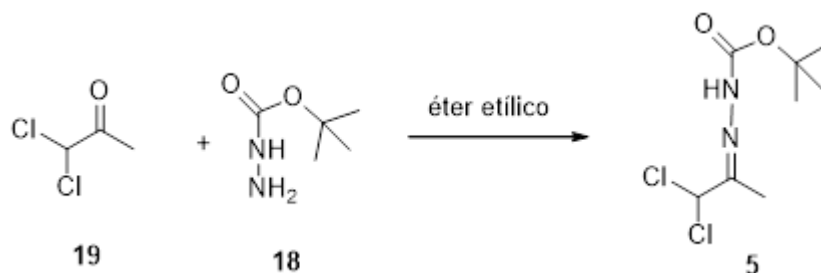
4.1.2. Preparação das hidrazonas α -halogenada e α,α' -dihalogenadas

- **Bromopiruvato de etilo *tert*-Butoxicarbonil hidrazona (1)**



Num balão de fundo redondo de 100 mL contendo 30 mL de éter etílico e 15 mL de éter petróleo (40-60) adicionou-se 0,8 mL de bromopiruvato de etilo (90%) (5,7 mmol) e de seguida 0,6 g de *tert*-butilcarbazonato (4,5 mmol) e a mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente. Um precipitado branco começou gradualmente a formar-se e passados 30 minutos o sólido branco foi filtrado sob vácuo, lavado com 15 mL de éter petróleo (40-60) frio. Depois de seco, obteve-se na forma analiticamente pura, a hidrazona **1** (0,93 g; 66%), p.f. = 106-109 °C (lit⁴³108-110 °C); $IV_{(KBr)}$ 3195, 1739, 1711, 1549 e 1149 cm^{-1} . ^1H (CDCl_3) δ = 1,32 (3H, t); 1,55 (9H, s); 4,22 (2H, s), 4,35 (2H, q) e 8,55(1H, sl).

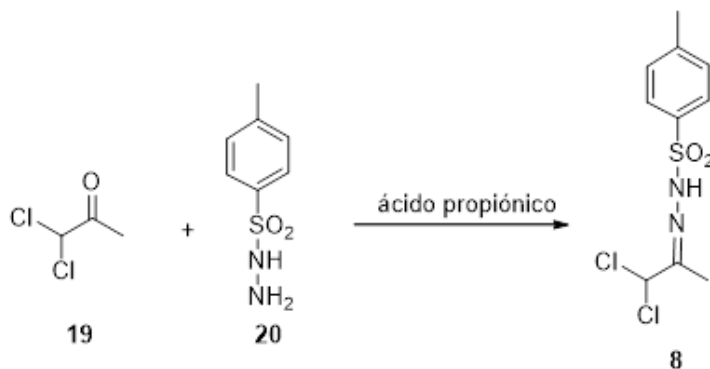
- **1,1-Dicloroacetona *tert*-Butoxicarbonil hidrazona (5)**



A uma solução de 1,1-dicloroacetona (0,8 mL, 8,7 mmol) em éter etílico (35 mL) foi adicionado *tert*-butilcarbazonato (1,15 g; 8,7 mmol) e a mistura reacional foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 16 h. O sólido branco formado foi filtrado sob vácuo, lavado com éter etílico 10 mL e seco, originando a hidrazona **5** pura (1,24 g;

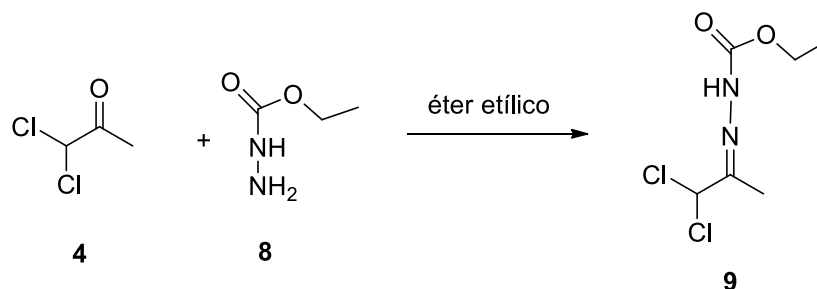
59%), p.f. (decomposição)= 128-130 °C (lit^{15b} 130,1-132,3); IV_(KBr) 3197, 1728, 1707 e 1537 cm⁻¹; ¹H (CDCl₃) δ = 1,55 (9H, s), 2,09 (3H, s), 6,40 (1H, s) e 7,91 (1H, sl). ¹³C (CDCl₃) δ = 16,2; 28,3; 66,4; 79,4; 143,1 e 154,2.

- **1,1-Dicloroacetona *p*-Toluenosulfonil hidrazona (7)**



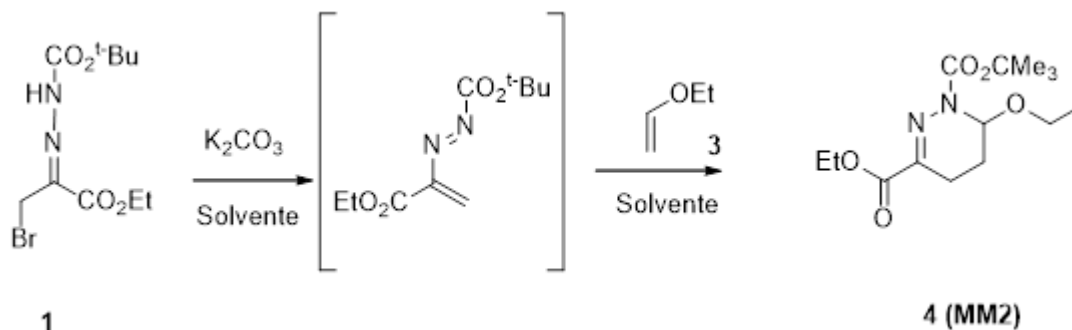
A uma solução de *p*-toluenosulfonil hidrazina (1,12 g, 6 mmol) em ácido propiónico (15 mL) adicionou-se 1,1-dicloroacetona (0,55 mL, 6 mmol) e a mistura reacional foi deixada sob agitação durante 5 h à temperatura ambiente. Foram então adicionados 15 mL de hexano e a mistura deixada no frigorífico durante 16 h. O precipitado branco foi filtrado e lavado 3x com 10 ml de hexano frio. Depois de seco obtiveram-se 1,14 g (72%) da hidrazona **8** analiticamente pura, p.f. (decomp.) = 135-137,5 °C (lit^{18a} 137-138 °C); IV_(KBr) 3210, 1615 e 1345 cm⁻¹, ¹H (CDCl₃) δ = 1,76 (3H, s), 2,26 (3H, s), 6,67 (1H, s), 6,72 (1H, s), 7,28 (2H, m), 7,82 (2H, m); ¹³C (CDCl₃) δ = 15,2; 23,1; 68,2; 125,4; 128,1; 130,0; 141,3 e 143,6.

- **1,1-Dicloroacetona Etoxicarbonyl hidrazona (9)**



A uma solução de 1,1-dicloroacetona (0,8 mL, 8,7 mmol) em éter etílico (35 mL) foi adicionada etoxicarbonyl hidrazina (0,91 g; 8,7 mmol) e a mistura reacional foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 16 h. O sólido branco formado foi filtrado sob vácuo, lavado com éter etílico 10 mL e seco na estufa de vácuo, fornecendo, de modo analiticamente puro, a hidrazona **9** (1,26 g; 64%), p.f. (decomposição) = 109-111 °C, $\text{IV}_{(\text{KBr})}$ 3225, 1698, 1422 e 1058 cm^{-1} , ^1H (CDCl_3) δ = 1,33 (3H, t, $J=7,1$ Hz), 2,07 (3H, s), 4,30 (2H, t, $J=7.1$ Hz), 6,40 (1H, s) e 7,85 (1H, sl).

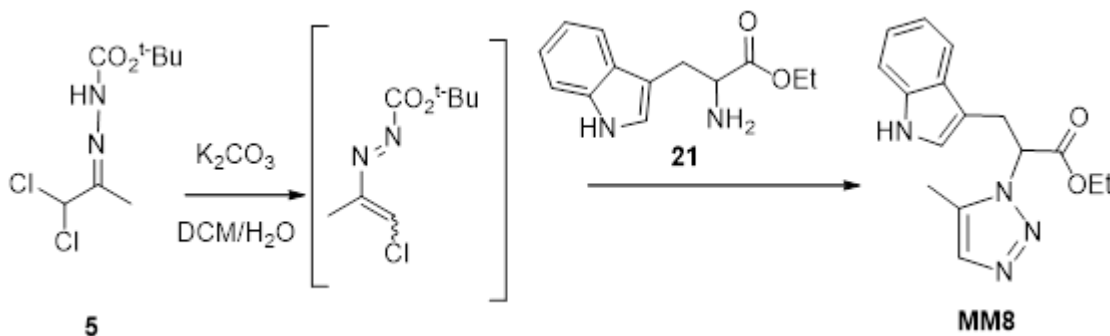
- **Síntese da Tetrahidropiridazina MM2**



A 30 mL de diclorometano foram sucessivamente adicionados a hidrazona **1**, (0,31 g, 1 mmol), éter vinílico etílico **3** (1,0 mL, 10 mmol) e K_2CO_3 (0,8 g, 5,8 mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 16h. Filtração do material insolúvel seguida da remoção do solvente e excesso do dienófilo no evaporador rotativo, conduziu à obtenção de óleo claro que rapidamente cristalizou. O sólido obtido (0,26 g, 87%) consistia na hidrazona **MM2** essencialmente pura, p.f. = 65-67 °C (lit¹ 66-68 °C), $\text{IV}_{(\text{KBr})}$ 2894, 1710, 1622 e 1528 cm^{-1} , ^1H (CDCl_3) δ = (3H, t, $J=7,0$ Hz), 1.37 (3H, t, $J=7,1$ Hz), 1.57 (9H, s), 2.03 – 2.19 (1H, m), 2.48 (1H, ddd, $J=18,8, 13,8$ e 7.0 Hz), 2.66 (1H, ddd,

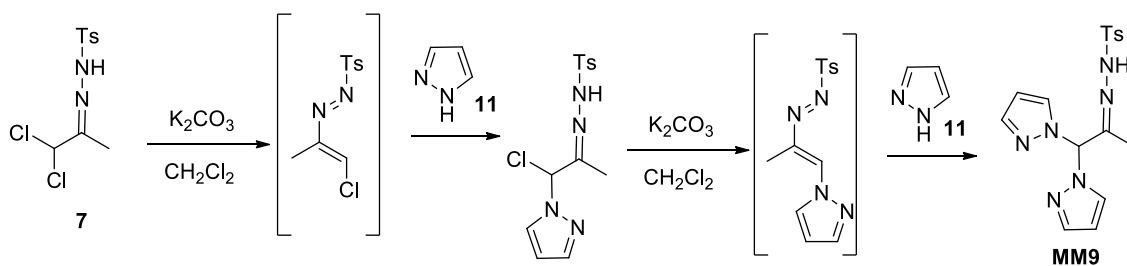
$J=18,6, 6,3$ e 1.4 Hz), 3.61 (2H, q, $J=7,0$ Hz), $4.21 - 4.39$ (2H, m) e 5.64 (1H, sl), ^{13}C (CDCl_3) $\delta= 14,08; 15,11; 17,35; 22,58; 28,07; 28,26; 61,61; 63,60; 82,83; 142,30; 152,26$ e $164,14$.

• Síntese do etil triptofano 1,2,3,- triazole **MM8**



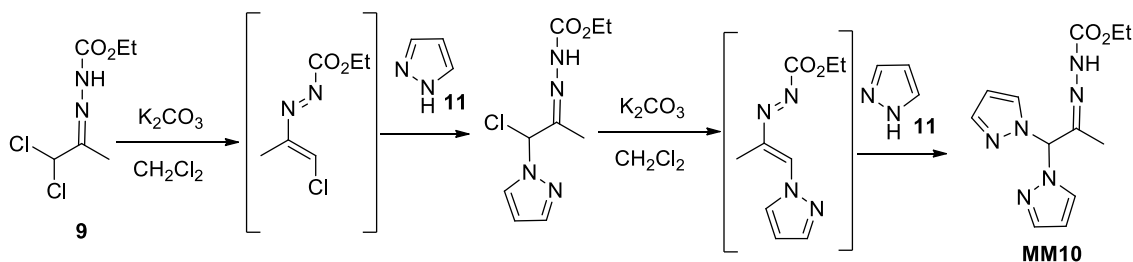
A uma mistura de diclorometano (5 mL) e água (10 mL) adicionou-se a hidrazona **5** (0,241 g, 1,0 mmol), triptofano etil éster **2** (0,58 g, 2,15 mmol) e carbonato de potássio (0,69 g, 5,0 mmol) e deixou-se sob agitação à temperatura ambiente 16 h. A mistura reacional foi extraída 2x com 10 mL de diclorometano. A fase orgânica foi lavada com 15 mL de água e seca com sulfato de sódio anidro. A evaporação do solvente deixou um óleo que foi purificado por cromatografia de flash seca, utilizando como eluente diclorometano/acetato de etilo (3/1 e aumentando a polaridade até 1/1). Recolheram-se os tubos de ensaio contendo o composto com R_f mais baixo, que após rotação sob pressão reduzida originou o triazole **MM8** (0,11 g, 38%), p.f. = $121-123$ °C, $\text{IV}_{(\text{KBr})}$ $3338, 1685$ e 1538 cm^{-1} , ^1H (CDCl_3) $\delta= 1,24$ (3H, t, $J=7,1$ Hz), 2.08 (3H, s), $3.03-3.08$ (1H, m), $3,26-3,30$ (1H, m), $4,15$ (2H, q, $J=7,1$ Hz), $5,70$ (1H, dd, $J=9,2$ e $5,6$ Hz), $6,90 - 7,08$ (3H, m), $7,32-7,51$ (2H, m), $7,91$ (1H, s) e $10,80$ (1H, sl).

• Síntese do Tosyl bis(pirazolil)metano **MM9**



A mistura constituída pela tosil hidrazona **8** (0,53 g, 1,7 mmol), pirazole **12** (0,48 g, 7,0 mmol) e carbonato de potássio anidro (1,38 g, 10 mmol) em DCM (30 mL) foi agitada à temperatura ambiente durante 16 h. Filtração dos materiais insolúveis e evaporação do solvente seguida de cromatografia de flash do resíduo utilizando como eluente um gradiente hexanos/ CH_2Cl_2 (1/3 até 1/8) originou o bis(pirazolil)metano **MM9** (0,45 g, 70%), p.f. =162-164 °C, $IV_{(KBr)}$ 3208, 3060, 1433, 1167 e 759 cm^{-1} , $^1H(CDCl_3)$ δ = 1,98 (3H, s), 2,44 (3H, s), 6,33 (2H, t, $J=2,1Hz$), 7,07 (1H, s), 7,28-7,30 (2H, m), 7,52 (2H, d, $J=2,2Hz$), 7,54 (2H, d, $J=1,8Hz$), 7,59 (2H, d, $J=2,2Hz$) e 9,91 (1H, sl), ^{13}C δ = 14,45; 21,56; 77,94; 104,95; 106,82; 128,04; 129,25; 130,31; 133,66; 135,15; 140,54; 143,80 e 149,19.

• **Síntese do Etoxicarbonilol bis(pirazolil)metano MM10**



A 30 mL de diclorometano, num balão de fundo redondo de 100 mL adicionou-se sucessivamente a etoxicarbonil hidrazona **9** (0,43 g, 2,0 mmol), o pirazole **1** (0,48 g, 7,0 mmol) e carbonato de potássio (1,38 g, 10 mmol) e a mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 16 h. Filtração dos materiais insolúveis e evaporação do solvente seguida de cromatografia de flash do resíduo utilizando como eluente um gradiente hexanos/ CH_2Cl_2 (1/3 até 1/10) originou o bis(pirazolil)metano **MM10** (0,41 g, 74%), p.f. mp 127-130°C. $IV_{\text{vmax}} = 3430, 3211, 2970, 1718, 1180, 1055 \text{ cm}^{-1}$. $^1H(CDCl_3) \delta = 1,24$ (t, $J = 5,9 \text{ Hz}$, 3 H), 1,95 (s, 3 H), 4,14 (q, $J = 5,9 \text{ Hz}$, 2H), 6,30 (dd, $J = 2,6, 1,9 \text{ Hz}$, 2 H), 6,37 (t, $J = 2,2 \text{ Hz}$, 1 H), 7,21 (br s, 1 H), 7,54 (s, 1 H), 7,62 (dd, $J = 2,2, 0,8 \text{ Hz}$, 2 H), 7,62 (d, $J = 2,1 \text{ Hz}$, 1 H). ^{13}C (NMR, $CDCl_3$): $\delta = 14,20; 28,24, 61,20; 78,61; 105,43; 130,22; 135,48; 140,34; 152,76$.

4.2. Análise da Atividade Quelante

4.2.1. Reagentes e produtos químicos

Todos os reagentes descritos foram de grau analítico. Ferrozina, o PV e o acetato de sódio foram encomendados através da Sigma-Aldrich (Alemanha). Outros reagentes, tais como $FeCl_2$ e $CuSO_4$ foram adquiridos à Merck (Alemanha). O EDTA foi adquirido à Fluka (Steinheim Alemanha). Os filtros foram fornecidos pela Milipore.

4.2.2. Atividade quelante dos metais em estudo

Os compostos sintetizados foram testados quanto à sua atividade quelante de Cu^{2+} e Fe^{2+} à concentração de 1 mM e essas atividades foram comparadas com a atividade quelante do EDTA, um quelante já conhecido. A alteração de cor das soluções foi detetada através da leitura da absorvência a 562 nm no caso do Fe(II) e a 632 nm no caso do Cu(II).

A atividade quelante de Fe^{2+} foi determinada medindo-se a formação do complexo Fe^{2+} com Ferrozina em microplacas de 96 poços. Foram colocados 30 μl de amostra com 250 μl de tampão de acetato de sódio (100 mM; pH 4,9) e 30 μl de FeCl_2 (0,1 M em água). Após 30 minutos foram adicionados 12,5 μl de Ferrozina (40 mM). A mudança de cor foi medida num leitor de microplacas a 562 nm. Foi ainda efetuado um controlo negativo no qual a amostra foi substituída pelo tampão.

A atividade quelante de Cu^{2+} foi determinada usando violeta de pirocatecol (PV). As amostras foram misturadas em microplacas de 96 poços com 290 μl de acetato de sódio (50mM e pH 6), 100 μl de CuSO_4 (50 mM) e com 6 μl de PV a 4mM. A mudança de cor da solução foi medida a 632 nm usando um leitor de espectrofotometria de microplacas. Tal como no teste da atividade quelante para o Fe^{2+} foi também preparado um controlo negativo no qual a amostra foi substituída pelo tampão.

O controlo positivo, em ambas as determinações, foi o EDTA (1mg/ml).

No caso do MM2, este composto apresentava cor o que poderia interferir no método espectrofotométrico, assim para não existir esta interferência realizou-se um controlo de cor para este composto, no qual se utilizou a solução do composto mais a solução tampão. A absorvência da amostra corrigida para os compostos que não apresentavam cor foi igual à absorvência do composto, mas para o MM2 que apresentava coloração, a absorvência corrigida foi calculada através da diferença da absorvência do composto com a absorvência do controlo de cor.

Desta forma as percentagens de atividade quelante foram calculadas através da seguinte formula:

$$\%Act = 100 - \left(100 \times \frac{Abs\ corrigida}{Abs\ C -} \right)$$

4.2.3. Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados são apresentados através da média \pm o desvio padrão e as diferenças significativas foram determinadas através do teste one-way ANOVA (aplicando o teste de Tukey para comparações múltiplas) usando o software GraphPad Prism 6.

5. Bibliografia

1. Ferrero, M.E. Rationale for the Successful Management of EDTA Chelation Therapy in Human Burden by Toxic Metals. *BioMed Research International* **2016**. Article ID 8274504, 13 páginas doi: 10.1155/2016/8274504.
2. Baran, E.J. Chelation Therapies : A Chemical and Biochemical Perspective. *Current Medicinal Chemistry* **2010**, 17, 3658-3672. doi: 10.2174/092986710793213760.
3. Crisponi, G.; Nurchi, V.M.; Lachowicz, J.I.; Crespo-Alonso, M.; Zoroddu, M.A.; Peana, M. Kill or cure : Misuse of chelation therapy for human diseases. *Coordination Chemistry Reviews* **2015**, 284, 278-285. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.023.
4. Flora, S.J.S.; Pachauri, V. Chelation in Metal Intoxication. *International Journal of Environmental Research Public Health* **2010**, 7, 2745-2788. doi: 10.3390/ijerph7072745.
5. Crisponi, G.; Remelli, M. Iron chelating agents for the treatment of iron overload. *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, 252, 1225-1240. doi:10.1016/j.ccr.2007.12.014.
6. Crisponi, G.; Nurchi, V.M.; Fanni, D.; Gerosa, C.; Nemolato, S.; Faa, G. Copper-related diseases : From chemistry to molecular pathology. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, 254, 876-889. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.018.
7. 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. *The Royal Society of Chemistry* **2016**, 6, 71628-71637. doi:10.1039/c6ra15051a.
8. Mert, S.; Kasimogullari, R.; Ok, S. A Short Review on Pyrazole Derivatives and their Applications. *PostDoc Journal* **2014**, 2, 64-72. http://www.postdocjournal.com/file_journal/705_17011350.pdf
9. Trofimenko, S. Geminal poly(1-pyrazolyl)alkanes and their coordination chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 70, 5118-5126. doi: 10.1021/ja00720a021.
10. (a) Mukherjee, R. Coordination Chemistry with pyrazole- based chelation ligands: molecular structural aspects. *Coordination Chemistry Rev.* **2000**, 203, 151-218. doi: 10.1016/S0010-8545(99)00144-7. (b) Pettinari, C.; Pettinari, R. Metal derivatives of poly(pyrazolyl) alkanes II. Bis(pyrazolyl) alkanes and related systems. *Coordination Chemistry Rev.* **2005**, 249, 663-691. doi: 10.1016/j.ccr.2004.08.017.
11. (a) Bassanetti, I.; Marchiò, L. Structural Variability in Ag(I) and Cu(I) Coordination Polymers with Thioether-Functionalized Bis(pyrazolyl)methane Ligands. *Inorganic Chemistry* **2011**, 50, 10786-10797. doi: 10.1021/ic201338w. (b) Godau, T.; Bleifuß, S. M.; Müller, A. L.; Roth, T.; Hoffmann, S.; Heinemann, F. W.; Burzlaff. Cu(I) catalysed

- cyclopropanation with enantiopure scorpionate type ligands derived from (+)-camphor or (-)-menthone. *Dalton Trans.* **2011**, 40, 6547-6554. doi: 10.1039/C1DT10032G.
12. (a) Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 1, 815-862. doi: 10.1021/cr400135x. (b) Pellei, M.; Papini, G.; Trasatti, A.; Giorgetti, M.; Tonelli, D.; Minicucci, M.; Marzano, C.; Gandin, V.; Aquilanti, G.; Dolmella, A.; Santini, C. Nitroimidazole and glucosamine conjugated heteroscorpionate ligands and related copper(II) complexes. Syntheses, biological activity and XAS studies. *Dalton Trans.* **2011**, 40, 9877-9888. doi: 10.1039/C1DT10486A. (c) Porchia, M.; Dolmella, A.; Gandin, V.; Marzano, C.; Pellei, M.; Peruzzo, V.; Refosco, F.; Santini, C.; Tisato, F.; Neutral and charged phosphine/scorpionate copper (I) complexes: Effects of ligand assembly on their antiproliferative activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 59, 218-226. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.11.022. (d) Tisato, F.; Marzano, C.; Porchia, M.; Pellei, M.; Santini, C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med. Res. Rev.* **2010**, 30, 708-749. doi: 10.1002/med.20174.
 13. (a) Otero, A.; Fernández-Baeza, J.; Lara-Sánchez, A.; Sánchez-Barba, L. F. Metal complexes with heteroscorpionate ligands based on the bis(pyrazol-1-yl)methene moiety: Catalytic chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257, 1806-1868. doi: 10.1016/j.ccr.2013.01.027. (b) Otero, A.; Fernández-Baeza, J.; Antiñolo, A.; Lara-Sánchez, A.; Martínez-Caballero, E.; Tejeda, J.; Sánchez-Barba, L.; Alonso-Moreno, C.; López-Solera, I. Scandium and Yttrium Complexes Supported by NNCp Heteroscorpionate Ligands: Synthesis, Structure, and Polymerization of ϵ -Caprolactone. *Organometallics* **2008**, 27, 976-983. doi: 10.1021/om701033r. (c) Otero, A.; Fernández-Baeza, J.; Antiñolo, A.; Tejeda, J.; Lara-Sánchez, A. Heteroscorpionate ligands based on bis(pyrazol-1-yl)methane: design and coordination chemistry. *Dalton Trans.* **2004**, 1499-1510. doi: 10.1039/B401425A. (d) Roa, A. E.; Salazar, V.; Mendoza-Espinosa, D.; Paneque, M.; Rodríguez-Diéguez, A.; Rodríguez, A. M.; Tejeda, J.; Castro-Osma, J. A.; Otero, A.; Lara-Sánchez, A. Study of the Coordination Modes of Hybrid NNCp Cyclopentadienyl/Scorpionate Ligands in Ir Compounds. *Inorganic Chemistry* **2019**, 58, 900-908. doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b03030
 14. Grosso, C.; Lemos, A.; Pinho e Melo, T. M.V.D. Conjugate Addition of Pyrazoles to Halogenated Nitroso- and Azoalkenes: a New Entry to Novel Bis(pyrazol-1-yl)methanes. *Synlett* **2014**, 25, 2868-2872. doi: 10.1055/s-0034-1379306.
 15. (a) Zhang, L.; Williams, M. A.; Mendel, D. B.; Escarpe, P. A.; Xiaowu Chen, X. C.; Wang, K.-Y.; Graves, B. J.; Lawton, G.; Kim, C. U. Synthesis and evaluation of 1,4,5,6-tetrahydropyridazine derivatives as influenza neuraminidase inhibitors. *Bioorg. Chem. Med. Lett.* **1999**, 9, 1751-1756. doi: 10.1016/S0960-894X(99)00280-2. (b) Lemos, A.; Lourenço, J. P. Cycloaddition reactions of nitrosoalkenes, azoalkenes and nitrile oxides mediated by hydrotalcite. *ARKIVOC* **2010**, 5, 170-182. doi: 10.3998/ark.5550190.0011.515. (c) Lemos, A. Cycloaddition Reactions of Conjugated Azoalkenes. In *Targets in Heterocyclic Systems: Chemistry and Properties*; Attanasi, O. A., Spinelli, D., Eds.; Soc Chimica Italiana: Rome, **2010**; Vol. 14, pp 1-18. (d) Lopes, S. M. M.; Brigas, A. F.; Palacios, F.; Lemos, A.; Pinho e Melo, T. M. V. D. [4 + 2] Cycloadditions of 3-Tetrazolyl-1,2-diaza-1,3-butadienes: Synthesis of 3-Tetrazolyl-1,4,5,6-tetrahydropyridazines. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2152-2160. doi:

- 10.1002/ejoc.201101826. (e) Lopes, S. M. M.; Cardoso, A. L.; Lemos, A.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Recent Advances in the Chemistry of Conjugated Nitrosoalkenes and Azoalkenes. *Chem. Rev.* **2018**, 118, 11324-11352. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00375. (f) Chen, Z.; Meng, L; Ding, Z.; Hu, J. Construction of Versatile N-Heterocycles from in situ Generated 1,2-Diaza-1,3-dienes. *Curr. Org. Chem.* **2019**, 23, 164-187. doi: doi.org/10.2174/1385272823666190227162840.
16. (a) Grosso, C.; Liber, M.; Brigas, A. F.; Teresa M. V. D. Pinho e Melo, T. V. V. D.; Lemos, A. Regioselectivity in Hetero Diels–Alder Reactions. *J. Chem. Educ.* **2019**, 96, 148–152. doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00933. (b) . (b) Fleming I., **2002**, *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*. Cheshire, U.K., John Wiley and Sons.
17. (a) Huisgen, R.; Szeimies, G.; Moebius, L. 1.3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. *Chem. Ber.* **1967**, 100, 2494-2507. doi: 10.1002/cber.19671000806. (b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064. doi: 10.1021/jo011148j. (c) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 2596. doi: 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4. (d) Meldal, M.; Christian Wenzel Tornøe, C. Z. Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952-3015. doi: 10.1021/cr0783479. (e) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 24, 1128-1137. doi: 10.1016/S1359-6446(03)02933-7 (f) Freitas, L. B. O.; Ruela, F. A.; Pereira, G. R.; Alves, R. B.; Freitas, R. P.; Santos, L.J. A reação “click” na síntese de 1,2,3-Triazóis: Aspectos químicos e aplicações. *Química Nova*, **2011**, 34, 1791-1804. doi:10.1590/S0100-40422011001000012.
18. (a) Kunikazu, S.; Nobuko, H.; Kiyosi, K. Reactions of α -Polyhalo Ketone Tosylhydrazones with Sulfide Ion and Primary Amines. Cyclisation to 1,2,3-Thiadiazoles and 1,2,3-Triazoles *Chem. Soc. Jpn.* **1986**, 59, 179-183. doi: 10.1246/bcsj.59.179 (b) Mantenuto, S.; Lucarini, S.; De Santi, M.; Piersanti, G.; Brandi, G.; Favi, G.; Mantellini, F. One-Pot Synthesis of Biheterocycles Based on Indole and Azole Scaffolds Using Tryptamines and 1,2-Diaza-1,3-dienes as Building Blocks. *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, 19, 3193-3199. doi: 10.1002/ejoc.201600210. (c) Chen, Z.; Cao, G.; Song, J.; Ren, H. Recent Developments in Azide-Free Synthesis of 1,2,3-Triazoles. *Chinese Journal of Chemistry* **2017**, 35, 1797-1807. doi: 10.1002/cjoc.201700459. (d) Arunprasath, D.; Bala, B.D.; Sekar, G. Luxury of N -Tosylhydrazones in Transition-Metal-Free Transformations. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2019**, 361, 1172-1207. doi: 10.1002/adsc.201801031.
19. Clark, J.H.; Tavener, S.J. Alternative solvents: shades of green. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, 11, 149–155. doi: 10.1021/op060160g.
20. Cherukuvada, S.; Nangia, A.; Eutectics as improved pharmaceutical materials: design, properties and characterization. *Chemical Communication* **2014**, 50, 906-923. doi:

10.1039/C3CC47521B.

21. Li, Z.; Lee, P.I.; Investigation on drug solubility enhancement using deep eutectic solvents and their derivatives. *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, 505, 283-288. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.018.
22. Aroso, I.M.; Silva, J.C.; Mano, F.; Ferreira, A.S.D.; Dionísio, M.; Sá-Nogueira, I.; Barreiros, S.; Reis, R.L.; Paiva, A.; Duarte, A.R.C. Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. *Eur J Pharm Biopharm* **2016**, 98, 57-66. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.11.002.
23. Duarte, A.R.C.; Ferreira, A.S.D.; Barreiros, S.; Cabrita, E.; Reis, R.L.; Paiva, A. A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *Eur J Pharm Biopharm* **2017**, 114, 296-304. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.02.003.
24. Herrera, C.; Costa, G.C.; Atilhan, M.; Costa, L.T.; Aparício, S. A theoretical study on aminoacid-based ionic liquids with acid gases and water. *J Mol Liq* **2017**, 225, 347-356. doi: 10.1016/j.molliq.2016.11.086.
25. Paiva, A.; Craveiro, R.; Aroso, I.; Martins, M.; Reis, R.L.; Duarte, A.R.C. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain Chem. Eng.* **2014**, 5, 1063-1071. doi: 10.1021/sc500096j.
26. Smith, E.L.; Abbott, A.P.; Ryder, K.S. Deep Eutectic Solvents (DESS) and Their Applications. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 21, 11060-11082. doi: 10.1021/cr300162p.
27. Liu, P.; Hao, J.-W.; Zhang, Z.-H. Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions. *RSC Adv.* **2015**, 5, 48675-48704. doi: C5RA05746A.
28. Khandelwal, S.; Tailor, Y.K.; Kumar, M. Deep eutectic solvents (DESS) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations. *J. Mol. Liq.* **2016**, 215, 345-386. Doi: 10.1016/j.molliq.2015.12.015.
29. Ghosh, S.K.; Nagarajan, R.; Deep eutectic solvent mediated synthesis of quinazolinones and dihydroquinazolinones: synthesis of natural products and drugs. *RSC Adv.* **2016**, 6, 27378-37387. doi: 10.1039/C6RA00855K.
30. Alonso, D.A.; Baeza, A.; Chinchilla, R.; Guillena, G.; Pastor, I.M.; Ramón, D.J. Deep Eutectic Solvents: The Organic Reaction Medium of the Century. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 4, 1002-1197. doi: 10.1002/ejoc.201501197.
31. Xu, P.; Zheng, G.-W.; Zong, M.-H., Li, N.; Lou, W.-Y. Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresources and Bioprocessing.* **2017**, 4, 34-52. doi: 10.1186/s40643-017-0165-5.
32. Punzi, A.; Coppi, D.I.; Matera, S.; Capozzi, M.A.M.; Operamolla, A.; Ragni, R.; Babudri, F.; Farinola, G.M. *Org. Lett.* **2017**, 19, 18 4754-4757. doi: 10.1021/acs.orglett.7b02114.
33. Fetisov, E.O.; Harwood, D.B.; Kuo, I.F.W.; Warrag, S.E.E.; Kroon, M.C.; Peters, C.J.; Siepmann, J.I. First-Principles Molecular Dynamics Study of a Deep Eutectic Solvent: Choline Chloride/Urea and Its Mixture with Water. *J. Phys. Chem. B* **2018**, 122, 3, 1245-

1254. doi: 10.1021/acs.jpcc.7b10422.
34. Faraone, A.; Wagle, D.V.; Baker, G.A.; Novak, E.C.; Ohl, M.; Reuter, D.; Lunkenheimer, P.; Loidl, A.; Mamontov, E. Glycerol Hydrogen-Bonding Network Dominates Structure and Collective Dynamics in a Deep Eutectic Solvent. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 3, 1261-1267. doi: 10.1021/acs.jpcc.7b11224.
 35. Tomé, L.I.N.; Baião, V.; Silva, W.; Brett, C.M.A.; Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Applied Materials Today* **2018**, *10*, 30-50. doi: 10.1016/j.apmt.2017.11.005
 36. Abbott, A.P.; Harris, R.C.; Ryder, K.S.; D'Agostino, F.L.; Manto, M.D; Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chem* **2011**, *13*, 82-90. doi: 10.1039/C0GC00395F
 37. Simon, M.-O.; Li, C.-J. Green chemistry oriented organic synthesis in water. *Chemical Society Reviews*, **2012**, *41*, 1415-1427. doi: doi.org/10.1039/C1CS15222J
 38. (a) Attanasi, O.A; De Crescentini, L.; Filippone, P.; Fringuelli, F.; Mantellini, F.; Matteucci, M.; Piermatti, O.; Pizzo, F. Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactions of (*E*)-3-Diazenylbut-2-enes in Water. *Helvetica Chimica Acta*, **2001**, *84*, 513-525. doi: doi.org/10.1002/1522-2675(20010228)84:2<513::AID-HLCA513>3.0.CO;2-S. (b) Pereira, N.A.M.; Lopes, S.M.M.; Lemos, A.; Pinho e Melo, T.M.V.D. On-Water Synthesis of Dipyrromethanes via Bis-Hetero-Diels-Alder Reaction of Azo- and Nitrosoalkenes with Pyrrole. *Synlett* **2014**, *25*, 423-427. doi: 10.1055/s-0033-1340300.
 39. Lopes, S. M. M.; Lemos, A.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Reactivity of Dipyrromethanes towards Azoalkenes: Synthesis of Functionalized Dipyrromethanes, Calix[4]pyrroles, and Bilanes. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 7039-7048. doi: 10.1002/ejoc.201402944.
 40. Grosso, C.; Brigas, A.; de los Santos, J.M.; Palacios, F.; Lemos, A.; Pinho e Melo, T.M.V.D. Natural deep eutectic solvents in the Hetero-Diels-Alder approach to bis(indolyl)methanes. *Monats. Chem.* **2019**, *150*, 1275-1288. doi: 10.1007/s00706-019-02421-7.
 41. Zhekenov, T.; Toksanbayev, N.; Kazakbayeva, Z.; Shah, D.; Mjalli, F. S. Formation of type III Deep Eutectic Solvents and effect of water on their intermolecular interactions. *Fluid Phase Equilib.* **2017**, *441*:43. doi: 10.1016/j.fluid.2017.01.022.
 42. Dai, Y.; Spronsen, J.V.; Witkamp, G. J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* **2013**, *766*, 61-68. doi: 10.1016/j.aca.2012.12.019.
 43. Clarke, S. J.; Gilchrist, T. L.; Lemos, A.; Roberts, T. G. Reactions of Azoalkenes derived from Hydrazones of Ethyl Bromopyruvate with Electron Rich Alkenes and Heterocycles. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5615-5624. doi:10.1016/S0040-4020(01)80992-3.
 44. Megías, C.; Cavada, E.P.; Fuentes C.T.; Calle, J.G.; Alaiz, M.; Juan, R.; Pastor, J.; Vioque, J. Chelating, antioxidant and antiproliferative activity of *Vicia sativa* polyphenol extracts. *Eur. Food. Res. Technol.* **2009**, *230*, 353-359. doi: 10.1007/s00217-009-1178-x.

Anexos

Tabela 1- Atividade quelante em percentagem dos diferentes compostos para o Fe²⁺.

Composto	Concentração	% Atividade quelante (Fe ²⁺)
MM2	1 mM	37,952±3,772
MM8		n.d.
MM9		n.d.
MM10		n.d.
Controlo +		93,531±0,231

Tabela 2- Atividade quelante em percentagem dos diferentes compostos para o Cu²⁺.

Composto	Concentração	% Atividade quelante (Cu ²⁺)
MM2	1 mM	9,028±2,048
MM8		n.d.
MM9		8,728±1,000
MM10		n.d.
Controlo +		34,828±2,048