



Reações de Hetero-Diels-Alder na síntese de pirroles,
di(pirrolil)metanos e di(indolil)metanos e investigação da
respetiva atividade quelante

Nádia Alexandra Azevedo Albano

Dissertação para obter o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professor Doutor Américo Lemos

Professora Doutora Luísa Barreira

2019



Reações de Hetero-Diels-Alder na síntese de pirroles,
di(pirrolil)metanos e di(indolil)metanos e investigação da
respetiva atividade quelante

Nádia Alexandra Azevedo Albano

Dissertação para obter o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professor Doutor Américo Lemos

Professora Doutora Luísa Barreira

2019

Reações de Hetero-Diels-Alder na síntese de pirroles, di(pirrolil)metanos e di(indolil)metanos e investigação da respetiva atividade quelante

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, 29 de setembro de 2019

© 2019 Nádia Alexandra Azevedo Albano

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 à minha querida mãe,

Agradecimentos

Dedico este trabalho à minha mãe, Carla Azevedo, que foi a pessoa que sempre me apoiou de todas as formas possíveis, abdicando de si própria em prole de me permitir realizar este sonho. A pessoa que sempre acreditou nas minhas capacidades e sempre esteve lá para festejar comigo cada vitória como se fosse dela. Sem ela, nada disto teria sido possível e sou-lhe extremamente grata por toda esta experiência de vida que me proporcionou, pois foram estes cinco anos longe de casa, essencialmente, que moldaram a pessoa que sou hoje.

Ao professor Américo Lemos, por quem nutro uma enorme admiração e que tenho em grande consideração e estima, um enorme obrigada por todo o apoio e auxílio que me prestou no decorrer da elaboração desta dissertação, mostrando-se sempre disponível e respondendo prontamente.

À professora Luísa Barreira, que também tenho em grande consideração, agradeço de igual modo toda a ajuda nestes últimos meses, respondendo também prontamente e mostrando-se disponível para responder às questões que iam surgindo.

Aos docentes que marcaram particularmente a minha vida académica, não podia deixar de agradecer por se terem mostrado sempre disponíveis para esclarecer e ajudar os alunos, agradeço também pelos conselhos e por me terem inspirado de algum modo, destacando-se dos restantes.

À minha família que sempre me apoiou ao longo do meu percurso académico e sempre respeitou o meu tempo de estudo, mesmo quando isso implicava ter de abdicar do pouco tempo que tinham para estar comigo, nas poucas oportunidades em que conseguia ir a casa. Custou não só a vocês, mas sobretudo a mim, não poder disfrutar desses períodos de festividade tanto quanto desejaria, mas foi por uma boa causa. Em especial, ao meu avô que a cada dia a demência o afasta mais de nós, e que esteve sempre em mente aquando da elaboração desta dissertação.

Ao meu namorado, melhor amigo e colega não tenho palavras para agradecer todo o apoio e entajuda ao longo destes cinco anos. Foi sem dúvida uma peça fundamental, que tornou todo este percurso não só mais fácil e tolerável, como preenchido de momentos que ficarão na memória. Se teria sido possível sem ti? Claro que sim, mas não seria, de todo, a mesma coisa, tu sabes!

Por último, não podia também deixar de agradecer aos meus amigos por todas as vezes que me ouviram queixar, por procurarem tirar-me de casa para espaiar e me divertir, bem como, por todos os momentos que daí resultaram.

Resumo

O cobre, o ferro e o cálcio são elementos essenciais em diversos processos e funções fisiológicas, dos quais são exemplo o metabolismo energético, crescimento celular e defesa do organismo, entre outras. Quando a homeostase destes fica comprometida, ocorre uma acumulação de metais no nosso organismo que podem atingir níveis tóxicos, isto porque levam à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) através de reações de Fenton e, conseqüentemente, originam stress oxidativo.

O stress oxidativo, por sua vez, é responsável por fenómenos de disfunção celular, apoptose e/ou necrose devido a danos provocados ao nível do ADN, membranas plasmáticas e enzimas. Estudos recentes afirmam que o stress oxidativo constitui uma base etiológica de doenças do foro neurológico como é o caso da doença de Alzheimer e de Parkinson, isto porque o stress oxidativo ao nível dos neurónios leva à sua degeneração.

Dipirrometanos e bis(indolil)metanos portadores das funcionalidades hidroximino e hidrazono no carbono metilénico, demonstraram possuir propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativa e anticancerígenas. No entanto, não existiam referências na literatura, a estudos relativos à investigação ou avaliação da atividade quelante e antioxidante, quer de di(pirrolil)metanos, de bis(indolil)metanos ou de pirroles portadores de grupos funcionais hidroximino ou hidrazono.

Neste contexto, este estudo foi conduzido nesse sentido revelando que dos compostos que preparámos, dois deles, NA8 e NA9 demonstraram ser possuidores de atividade antioxidante considerável.

Relativamente à atividade quelante, os compostos NA7, NA8 e NA9 necessitarão de trabalho de optimização/modelação para que eventualmente possam exibir atividade quelante mais relevante para o Cu^{2+} e Ca^{2+} . Infelizmente para o Fe^{2+} , não obtivemos nenhum composto com atividade significativa.

Palavras-chave: stress oxidativo; atividade quelante; atividade antioxidante; di(pirrolil)metanos; di(indolil)metanos; pirroles.

Abstract

Copper, iron and calcium are essential elements in several physiological processes and functions, such as energy metabolism, cell growth and body defense, among others. When their homeostasis is compromised, there is an accumulation of metals in our body that can reach toxic levels. One of the toxicity mechanisms involves the formation of reactive oxygen species (ROS) through Fenton's reactions which, consequently, generates oxidative stress.

On the other hand, oxidative stress is responsible for cell dysfunction, apoptosis and / or necrosis due to damages caused on DNA, cell membranes and enzymes. Recent studies claim that oxidative stress is one of the etiological causes of neurological ailments such as Alzheimer's and Parkinson's disease, since it leads to neurodegeneration.

Dipyrromethanes and bis (indolyl) methanes bearing hydroxyimino and hydrazono functionalities on methylene carbon have been shown to possess anti-inflammatory, antiproliferative and anticancer properties. However, there were no references in the literature to studies concerning the investigation or evaluation of chelating and antioxidant activity, either di(pyrrolyl)methane, bis(indolyl)methane or pyrrole compounds carrying an hydroxyimino or hydrazono moiety.

In this sense, the preparation and evaluation of the title compounds lead us to the conclusion that among of the synthesised compounds, two of them, NA8 and NA9 possessed considerable antioxidant activity.

Regarding chelating activity, compounds NA7, NA8 and NA9 will need structural optimization/modulation work, in order to eventually achieve relevant chelating activity for Cu^{2+} and Ca^{2+} . Unfortunately for Fe^{2+} , none of the synthesized compounds presented significant activity.

Keywords: oxidative stress; chelating activity; antioxidant activity; di(pyrrolyl) methanes; bis(indolyl)methanes; pyrroles.

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Abreviaturas	xi
1. Introdução	1
1.1 A importância dos metais no nosso organismo.....	1
1.2 Ferro, Cobre e Cálcio enquanto promotores de stress oxidativo.....	1
1.3 Terapia Quelante.....	5
1.4 Objetivos.....	8
2. Materiais e Métodos	9
2.1 Reagentes.....	9
2.2 Síntese dos ligandos	9
2.2.1 Síntese das oximas e hidrazonas precursoras de nitroso- e azoalcenos	10
2.2.2 Síntese dos adutos e bis-heterociclos	12
2.3 Atividade quelante.....	16
2.3.1 Atividade quelante para o Cálcio	16
2.3.2 Atividade quelante para o Ferro	16
2.3.3 Atividade quelante para o Cobre	17
2.4 Atividade antioxidante.....	17
3. Resultados e discussão	19
3.1 Síntese dos ligandos	19
3.1.1 Preâmbulo	19
3.1.2 Preparação das oximas e hidrazonas	21
3.1.3 Reações de hetero Diels-Alder e preparação dos ligandos	22
3.2 Atividade quelante.....	24
3.2.1 Atividade quelante para o Cálcio	24
3.2.2 Atividade quelante para o Ferro	26

3.2.3 Atividade quelante para o Cobre	27
3.3 Atividade antioxidante.....	28
3.3.1 Atividade capturadora de radical ABTS	28
3.3.2 Atividade capturadora de radical DPPH.....	29
4. Conclusão e perspectivas futuras.....	31
Referências Bibliográficas	32
Anexos	37

Índice de Figuras

Figura 1.1 Consequências da formação de ROS por intermédio da participação de cobre na reação de Fenton.	3
Figura 1.2 Formação dos complexos metálicos utilizando ligandos mono, bi e polidentados.	6
Figura 1.3 Estrutura química da deferoxamina (DFO) 1. e da penicilamina 2.	7

Índice de Esquemas

Esquema 3.1 Reações de hetero Diels-Alder de nitroso- e azo-alcenos.	19
Esquema 3.2 Regioseletividade nas reações de hetero Diels-Alder.	20
Esquema 3.3 Geração e interceção in situ de nitroso- e azo-alcenos.	21
Esquema 3.4 Procedimento geral para a síntese das oximas e hidrazonas.	22
Esquema 3.5 Reação de hetero Diels-Alder para preparação do ligando 13 .	22
Esquema 3.6 Síntese dos dipirrometanos 19 a,b .	23
Esquema 3.7 Síntese dos di-indolilmetanos 28 e 29 .	24

Índice de Gráficos

Gráfico 3.1 Atividade quelante (%) dos diferentes ligandos para o Ca^{2+} e respetiva análise estatística (ANOVA).	26
Gráfico 3.2 Atividade quelante (%) dos diferentes ligandos para o Fe^{2+} e respetiva análise estatística (ANOVA).	27
Gráfico 3.3 Atividade quelante (%) dos diferentes ligandos para o Cu^{2+} e respetiva análise estatística (ANOVA).	28
Gráfico 3.4 Atividade antioxidante (%) dos diferentes ligandos para o ensaio com $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e respetiva análise estatística (ANOVA).	29
Gráfico 3.5 Atividade antioxidante (%) dos diferentes ligandos para o ensaio com DPPH^{\bullet} e respetiva análise estatística (ANOVA).	30

Abreviaturas

ABTS - ácido 2,2-diazino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

ADN – ácido desoxirribonucleico

BHT - hidroxitolueno butilado

Bu – butilo

^tBu – *tert*-butilo ou butilo terciário

DCM - diclorometano

DFO – deferoxamina

DMSO - dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazina

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA – ácido etilenoglicol tetra-acético

ER – retículo endoplasmático

Et- etilo

HOMO – orbital molecular ocupada de mais alta energia

IV – infra-vermelho

LUMO - orbital molecular não ocupada de mais baixa energia

NADES – solvente eutético profundo natural

ppm – partes por milhão

PV – violeta de pirocatecol

RNS – espécies reativas de azoto

ROS – espécies reativas de oxigénio

TMS – tetrametil silano

Ts – tosilo (*p*-toluenosulfonilo)

1. Introdução

1.1 A importância dos metais no nosso organismo

Os metais possuem um papel de elevada importância enquanto componentes estruturais e funcionais dos organismos vivos.^(1,2) No entanto, a contaminação de águas e solos com metais pesados tem aumentado nas últimas décadas devido à queima de combustíveis fósseis, desadequada eliminação de resíduos, sobre-utilização de fertilizantes e pesticidas, entre outros.^(3,4,5,6)

Define-se como metais pesados os elementos inorgânicos que possuem uma densidade superior a 5g/cm^3 .⁽³⁾ O cobre (Cu) e o ferro (Fe) são exemplos de metais pesados que constituem micronutrientes essenciais para o organismo humano, sendo cofatores estruturais e catalisadores de várias enzimas envolvidas em processos biológicos, tais como o metabolismo energético, crescimento celular, síntese molecular e defesa do organismo.^(3,7,8,9,10,11)

1.2 Ferro, Cobre e Cálcio enquanto promotores de stress oxidativo

Embora o ferro e o cobre sejam vitais para a vida humana, podem tornar-se tóxicos quando se verifica uma acumulação dos mesmos no nosso organismo, isto é, quando a homeostase fica comprometida. A homeostase de metais pesados no nosso organismo é cuidadosamente regulada através de um sistema de transporte por proteínas que se encarrega da absorção, distribuição, armazenamento e excreção de iões metálicos.⁽³⁾ No entanto, quando essa regulação fica comprometida, estes compostos podem ser acumulados acima do nível limite tornando-se tóxicos dado que, induzem a formação de espécies reativas de azoto e oxigénio (RNS, ROS), por intermédio de reações de Fenton, espécies estas que são responsáveis pelo desenvolvimento de stress oxidativo.^(2,3,7) Em última instância, o stress oxidativo pode provocar disfunção celular, apoptose e/ou necrose uma vez que, a acumulação de radicais livres pode provocar danos ao nível do

ADN, membranas celulares, atividade enzimática, etc., afetando particularmente o sistema respiratório, nervoso, reprodutivo e o trato digestivo.^(3,12,13,14,15) Em suma, tem-se vindo a descobrir que a rutura da homeostase do ferro e do cobre e, conseqüentemente, o stress oxidativo que é gerado, desempenha um papel fulcral na etiologia de desordens neurológicas como é o caso das doenças de Alzheimer e de Parkinson, bem como de outro tipo de doenças como o cancro, doenças do foro cardiovascular, diabetes, inflamação crónica, entre outras.^(2,7)

Em particular, a homeostase do ferro é um processo complexo no qual 65% do ferro se encontra ligado à hemoglobina, 25% ligado a proteínas de armazenamento, entre elas a ferritina e 10% faz parte da constituição da mioglobina, citocromos e outras enzimas. Os mecanismos de homeostase previnem que haja uma elevada taxa de absorção a nível intestinal e regulam a taxa de ferro que é libertado no processo de reciclagem do mesmo. O ferro que não é utilizado pelas proteínas a nível celular é acumulado na ferritina, no entanto, a capacidade que esta possui de se ligar aos iões de ferro é limitada. A sobrecarga de ferro é uma condição comum de pacientes que sofrem de hemocromatose que origina danos generalizados a nível sistémico. Esta condição faz com que a concentração de ferro aumente permitindo que participe em reações orgânicas e inorgânicas com radicais livres de oxigénio, tais como estimular a peroxidação de lípidos de membrana e catalisar a formação de radicais hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) que, posteriormente, irão provocar danos a nível tecidual.⁽²⁾

Por sua vez, o cobre é o metal de transição mais abundante no corpo humano. A dose diária recomendada para o consumo de cobre, num adulto, varia entre 1,5 e 3,9 mg com uma absorção no âmbito dos 12% a 60%, dependendo da ingestão, dieta e de fatores genéticos. Em condições normais, esta absorção ocorre primariamente no intestino delgado e no estômago. Assim que atravessa o lúmen intestinal, é transportado para o fígado de modo a ser distribuído para os tecidos através da circulação periférica ou, então, ser excretado através da bÍlis. Cerca de 10 a 15% do cobre excretado na bÍlis é reabsorvido, sendo que o excesso é excretado através das fezes, urina, saliva e até pela respiração, embora em menor quantidade.⁽⁷⁾

Situações em que é reportado um excesso de cobre no organismo são mais comuns do que por deficiência deste metal, possivelmente devido ao elevado aporte de iões de cobre inorgânico presentes em suplementos minerais e vitamínicos, bem como, no

consumo de água canalizada. O nosso corpo apenas metaboliza o cobre orgânico que está presente na alimentação acoplado às proteínas, enquanto que o cobre inorgânico, não é metabolizado, promovendo stress oxidativo excessivo quase de imediato. Nos sistemas biológicos, os íons de cobre surgem sobretudo no estado reduzido (Cu^+) ou oxidado (Cu^{2+}).^(2,7) A redução do cobre, de Cu^{2+} a Cu^+ , faz com que este seja capaz de decompor o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), originando radicais hidroxilo extremamente reativos. Deste modo, o cobre pode induzir stress oxidativo através de dois mecanismos distintos: pode formar diretamente espécies reativas de oxigénio (ROS) através de reações de Fenton, ou então, reduzir significativamente os níveis de glutathiona, um cofator de enzimas antioxidantes, que conseqüentemente aumentará os níveis de cobre significativamente (**Figura 1.1**).⁽⁷⁾

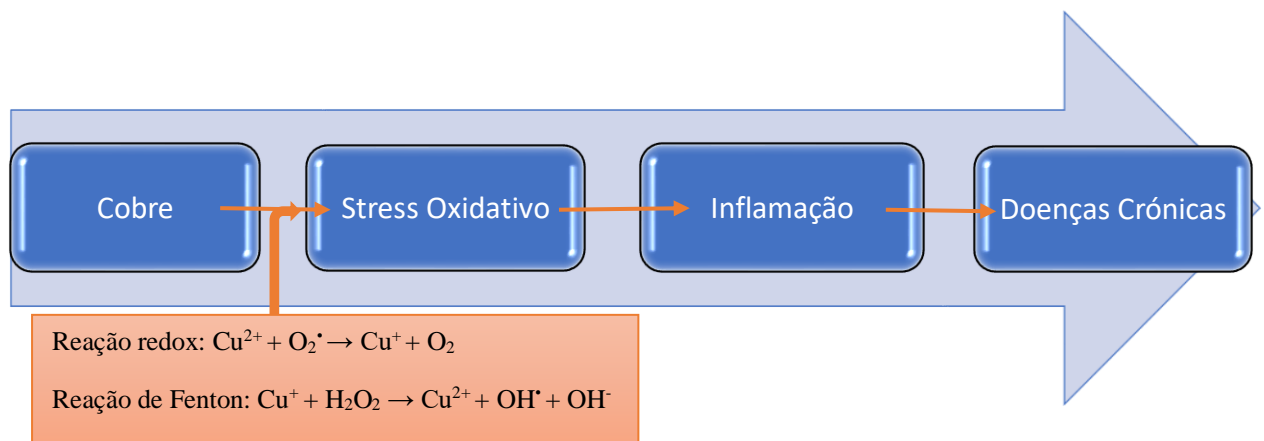


Figura 1.1 Conseqüências da formação de ROS por intermédio da participação de cobre na reação de Fenton.

A glutathiona tem um papel fundamental neste mecanismo uma vez que afeta a resposta oxidativa, na medida em que, atua como quelante do cobre, mantendo-o capturado para que não dê origem a reações redox, além de que atua como substrato de várias enzimas responsáveis pela eliminação dos ROS, quando formados. Deste modo, a diminuição dos níveis de glutathiona promove o aumento do stress oxidativo.⁽⁷⁾

No caso do cálcio, enquanto catião divalente Ca^{2+} , pode ligar-se a várias proteínas, recetores e canais iónicos, podendo ser considerado um mensageiro intracelular omnipresente atuando como regulador em múltiplas funções fisiológicas.⁽¹⁶⁾ A homeostase do cálcio a nível celular desempenha um papel essencial na regulação de várias facetas da fisiologia neuronal das quais se destaca o crescimento e diferenciação,

a aprendizagem e a memória, entre outras.^(17,18)

Existe um vasto conjunto de evidências documentadas que refere haver também uma conexão entre a rotura da homeostase do cálcio e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como é o caso das doenças de Alzheimer^(16,17) e de Parkinson.⁽¹⁹⁾ Este envolvimento do cálcio na patogénese da doença de Alzheimer terá sido inicialmente proposto pelo Dr. Khachaturian em meados dos anos 80^(16,17,20,21) e, desde então, esta teoria tem vindo a ser amplamente estudada de modo a ser clarificada, no entanto, apesar dos progressos feitos, alguns aspetos continuam por definir.^(16,17,18,22,23,24,25,26) A teoria em si envolve vários compartimentos sub-celulares e proteínas, em particular, dois organelos que desempenham um papel importante enquanto tampões de cálcio, nomeadamente, o retículo endoplasmático (ER) e a mitocôndria, bem como, as bombas de transporte Ca^{2+} ATPase e $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$ ATPase, que constituem os principais sistemas de efluxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática.^(16,17,18) Portanto, esta regulação do Ca^{2+} dentro das células é um processo metabolicamente dispendioso, isto porque, requer a ação de bombas dependentes de ATP que, conseqüentemente, resulta num aumento da atividade mitocondrial e concomitantemente, num aumento da produção de ROS.^(19,27a) Deste modo, a perturbação de um equilíbrio tão delicado como este, pode ter conseqüências deletérias para as células e, em particular para os neurónios, levar à necrose e/ou apoptose, e subsequentemente, a um acidente vascular cerebral e neurodegeneração.^(16,17,18)

A homeostase do Ca^{2+} é também importante ao nível do tecido ósseo, podendo despoletar patologias como a osteoporose, caso essa homeostase fique comprometida.^(27b) Isto porque, estudos referem que o stress oxidativo ao nível dos osteoblastos, células responsáveis pela formação de tecido ósseo, modifica as suas funções fisiológicas, inibindo a sua diferenciação e, conseqüentemente, inibindo a formação óssea. Por outro lado, estudos também referem que o stress oxidativo aumenta a diferenciação dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção da matriz óssea, ou seja, pela sua destruição.^(27c, 27d,27e) Na osteoporose, a perda de massa óssea resulta desta mesma conjugação, do aumento da reabsorção óssea e diminuição da formação óssea.^(27c, 27f, 27g) Portanto, a terapêutica nestes casos de osteoporose tanto poderá passar pela terapia quelante de Ca^{2+} , como prevenção do stress oxidativo, quer pela utilização de agentes antioxidantes de modo a neutralizar os ROS formados.

Por último, o stress oxidativo e o comprometimento da homeostase do Ca^{2+} podem

ainda estar relacionados com a aterosclerose. Isto porque, uma das características da placa de aterosclerose passa pela deposição de minerais de cálcio que parece resultar da diferenciação dos osteoblastos vasculares, resultando em células vasculares calcificadas^(27c,27h,27i) Outra patologia na qual se poderia utilizar a terapia quelante de cálcio.

Por sua vez, a produção intracelular de ROS está intimamente relacionada com respostas inflamatórias. A inflamação é uma reação do sistema imunitário a danos e/ou infeções nos tecidos sendo fundamental para a hemóstase dos tecidos. Durante a inflamação, as células do sistema imunitário contribuem também para o stress oxidativo ao produzirem espécies de azoto reativo, como é o caso do peróxido de nitrito (ONOO⁻). Quanto mais tempo persistir essa inflamação, maiores são os riscos de desenvolver uma inflamação crónica que promoverá danos nos tecidos, estando intimamente relacionado com o desenvolvimento de doenças crónicas e neurodegenerativas. Isto porque alguns estudos indicam, que em termos patológicos, a combinação de uma resposta aumentada ao stress oxidativo, um estado inflamatório persistente e a presença de cobre em excesso, estão intimamente relacionados com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, bem como com o desenvolvimento e resistência tumoral.⁽⁷⁾

1.3 Terapia Quelante

Tendo em linha de conta as considerações acima retratadas, surge então o desenvolvimento de terapia utilizando agentes quelantes. A terapia por quelação tem sido explorada para a aplicação em casos de intoxicação aguda e crónica, que pode ser provocada por vários metais, sendo atualmente a terapêutica de eleição.⁽¹⁾

A quelação consiste num processo no qual os iões/moléculas de um ligando se ligam aos átomos/iões centrais de um dado metal formando uma estrutura cíclica ou em anel. Deste modo, o ligando consiste num ião/molécula que possui dois ou mais átomos capazes de doar um par de eletrões para formar uma ligação covalente com o ião/átomo metálico. Consoante a natureza desta ligação, os ligandos podem ser classificados como unidentados, bidentados ou polidentados, com base no número de átomos doadores de eletrões que estabelecem a ligação metal-ligando (**Figura 1.2**). Podem ainda ser considerados ligandos ambidentados se for possível estabelecer ligação através de dois

átomos diferentes, embora nunca ambos em simultâneo.⁽¹⁾

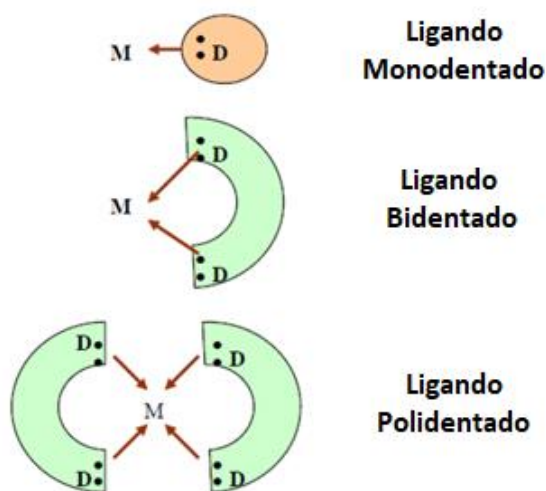
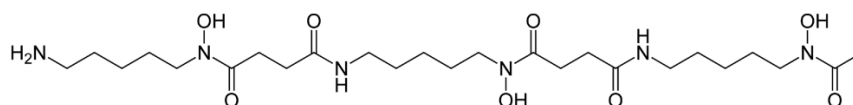


Figura 1.2 Formação dos complexos metálicos utilizando ligandos mono, bi e polidentados.

Embora o conceito de quelação se baseie simplesmente em química de coordenação, o desenvolvimento de um quelante ideal, bem como de uma terapia quelante que remova completamente e de forma específica metais que sejam tóxicos de um local particular do organismo, requer uma abordagem diferenciada no sentido do design do medicamento. Átomos de enxofre (S), azoto (N) e de oxigénio (O) funcionam como ligandos quando pertencem a grupos químicos como -SH, -S-S-, -NH₂, =NH, -OH, -OPO₃H ou >C=O. Muitos doadores atuam como ligandos bidentados que formam as tais estruturas em anel sendo que, quando esta estrutura em anel é formada por cinco membros, confere particular estabilidade ao complexo formado. Estes são geralmente formados pela estrutura YCCY, isto é, Y-CH₂-CH₂-Y, Y-CO-CH₂-Y, entre outras, em que Y pode ser OR, NR₂, O, S, NR, etc.⁽¹⁾ A deferoxamina (DFO) e a penicilamina são exemplos de agentes quelantes com as características mencionadas (**Figura 1.3**) que são atualmente utilizados em termos terapêuticos. A DFO consiste num ligando hexadentado que forma complexos com iões de ferro, sendo estes excretados por via renal, enquanto que a penicilamina atua como quelante de cobre.

1.



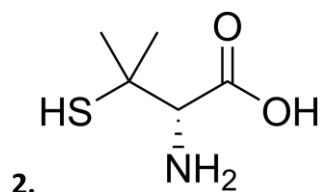


Figura 1.3 Estrutura química da deferoxamina (DFO) **1.** e da penicilamina **2.**

Neste sentido, fomos sintetizar alguns compostos, partindo de hidrazonas e oximas precursoras de nitroso- e azo-alcenos que, *in situ*, foram intercetados por moléculas de pirrole e indole, originando heterociclos ricos em elétrons. Estes, são então compostos cuja estrutura é constituída por anéis aromáticos, átomos de azoto, oxigênio e enxofre que, além da estrutura em anel, lhes confere elevada densidade eletrônica, características estas identificadas anteriormente como adjuvantes da ação quelante. Deste modo, haverá a possibilidades de constituírem eles mesmos bons ligandos, uma vez que, estruturalmente poderão ter afinidade com determinados iões e, sobretudo, capacidade de quelação, tendo em conta que a sua estrutura, a presença de heteroátomos e densidade eletrônica lhes permitirá estabelecer ligações covalentes com iões metálicos.

Em termos gerais, um agente quelante ideal tem que possuir maior afinidade para o metal tóxico do que para metais relevantes para o organismo, ter a capacidade de competir com ligandos endógenos (p.e, a glutatona), capacidade de atravessar membranas celulares de modo a remover o metal tóxico do meio intracelular, a mesma distribuição que o metal em consideração, elevada solubilidade em meio aquoso, baixa toxicidade, bem como, capacidade de formar complexos que não sejam tóxicos para o organismo e, por fim, que promova uma rápida eliminação do metal tóxico.^(1,3)

No entanto, apesar de serem conhecidas as propriedades ideais que devem estar presentes num agente quelante ideal, a previsibilidade da resposta à terapêutica é limitada. Isto porque, um agente quelante que seja qualificado como sendo um quelante ideal *in vitro* pode não o demonstrar ser *in vivo*, tanto por razões de toxicidade, quer por se encontrarem presentes substâncias endógenas que podem atuar como quelantes naturais desses iões metálicos e, portanto, competir com o agente quelante em estudo. Como é o

caso da glutatona que é um quelante endógeno do cobre.⁽¹⁾ A própria estabilidade dos complexos formados pode variar consoante as propriedades, não só do agente quelante, como do metal.^(1,3)

Além destas considerações, o pH é também um fator relevante uma vez que influencia a formação e estabilidade do complexo, sendo que a grande maioria dos agentes quelantes são instáveis a pH baixo. No entanto, a pH alto os metais têm tendência a formar hidróxidos insolúveis, tornando-se menos acessíveis para os agentes quelantes. Este fator tem de ser tido em conta sobretudo quando se trata de patologias que originam estados de acidose ou alcalose. Em suma, a carga iónica do agente quelante determina a sua absorção, distribuição e capacidade de alcançar o ião metálico ao qual se pretende ligar, sendo também a carga iónica do complexo formado que define o modo como este será eliminado do local onde se formou, bem como, a sua excreção do organismo.⁽¹⁾

1.4 Objetivos

Os objetivos principais deste trabalho foram a síntese de pirroles, di(pirrolil)metanos e di(indolil)metanos através de reações de hetero e bis-hetero Diels Alder bem como a avaliação da respetiva atividade quelante para o Ca^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} , dada a sua importância como metais redox e, ainda, a respetiva atividade antioxidante.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos ensaios realizados eram de grau analítico. O hidroxitolueno butilado (BHT), o ácido 2,2-diazino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS), violeta de pirocatecol (PV), e a 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi adquirido à Fluka (Steinheim, Alemanha). Da Merck (Darmstadt, Alemanha) obtivemos a ferrozina e sulfato de cobre pentahidratado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. O metanol foi adquirido à Fischer Scientific (Loughborough, UK). Os restantes reagentes e solventes foram comprados através da VWR International (Leuven, Bélgica).

2.2 Síntese dos ligandos

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 UV_{254} (Macherey-Nagel). A revelação das placas foi efetuada por exposição a radiação U.V. de 254 nm ou exposição 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 realizados 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 ^{13}C . Os desvios químicos (em ppm) indicados para cada composto são relativamente ao padrão tetrametilsilano (TMS), a multiplicidade de sinal s (singuleto), si

(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.

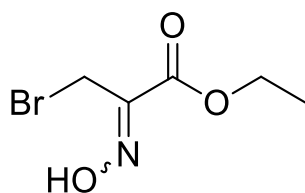
Os espectros de Infra-Vermelho foram registados num espectrofotómetro Bruker FT-IR Tensor 27 utilizando discos de KBr e as bandas mais intensas são expressas em cm^{-1} .

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

O solvente NADES constituído por Cloreto de colina e Glicerol (2/1) foi sintetizado no grupo laboratorial de acordo com procedimentos da literatura.⁽²⁸⁾

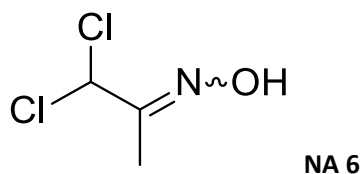
2.1.1 Síntese das oximas e hidrazonas precursoras de nitroso- e azoalcenos

2.1.1.1 – Bromopiruvato de etilo oxima



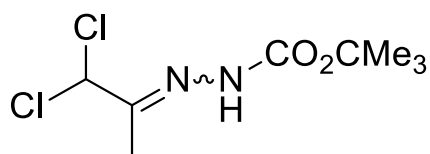
A uma solução de bromopiruvato de etilo 1,4 mL (1,0 mmol) em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ 35 mL (20:10) adicionaram-se 0,69 g (1,0 mmol) (g de cloreto de hidroxilamina e a mistura foi agitada durante 16 h à temperatura ambiente. A mistura foi particionada em 40 mL da mistura $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (20 mL). A fase orgânica recolhida e lavada com 20 mL de H_2O . A fase orgânica foi recolhida e seca com sulfato de sódio anidro. Evaporação à secura deixou um resíduo oleoso que rapidamente solidificou originado 1,30 g (63%) de um óleo translucido que rapidamente solidificou num sólido branco p.f = 75-77 °C lit⁽²⁹⁾76-79; IV v_{max} 3420, 1710, 1540, 1024 cm^{-1} ; ^1H (400 MHz, clorofórmio- d) δ = 1.37 (3 H, t), 4.27 (2 H, s), 4.37 (2 H, q) e 9.62 (1 H, sl).

2.1.1.2 – 1,1-Dicloroacetona oxima



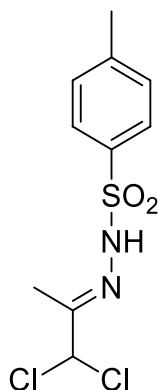
A uma solução de 1,1-dicloroacetona 0,73 mL (8 mmol), em etanol (30 ml), foi adicionado hidrocloreto de hidroxilamina 1,66 g (24 mmol). A mistura foi deixada em agitação durante 48 horas à temperatura ambiente. Evaporou-se o solvente, adicionou-se água (30 mL) e extraiu-se o produto com acetato de etilo (2 x 20 mL). Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ e evaporou-se o solvente. A oxima foi obtida como um óleo que cristaliza no frio. Obtiveram-se cristais incolores 0,64 g (56%). p.f. = 37-39 °C lit⁽³⁰⁾ (38-40); IV ν_{\max} = 3445, 1715, 1399, 740 cm⁻¹, ¹H (400 MHz, clorofórmio-*d*) δ = 2,12 (3H, s), 6,25 (s, 1H, s), 8,28 (1H, sl); ¹³C (101 MHz, clorofórmio-*d*) δ = 8,6; 70,6; 155,7.

2.1.1.3 – 1,1-Dicloroacetona *tert*-butoxicarbonil hidrazona



Num balão de fundo redondo de 100 mL foram introduzidos 30 mL de éter etílico e 10 mL de éter petróleo. A esta mistura foi adicionada 1,1-dicloroacetona (0,7 mL, 7,2 mmol) e carbazato de *t*-butilo (1,1 g, 8,25 mmol). A mistura de reação foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 16 h. O sólido branco entretanto formado foi filtrado sob vácuo e lavado com 15 mL éter etílico/éter petróleo (3:1). Depois de seco obtiveram-se 1,18 g (68%) da hidrazona. p.f. (dec): 128-131 lit⁽³¹⁾ 130,1-132,3; IV ν_{\max} : 3193, 2982, 1710, 1140 cm⁻¹; ¹H (400 MHz clorofórmio-*d*) δ = 1,48 (9H, s), 2,10 (3H, s), 6,38 (1H, s), 7,59 (1H, s); ¹³C (100 MHz, clorofórmio-*d*) δ = 16,2; 28,3; 66,4; 79,4; 143,1 e 154,2.

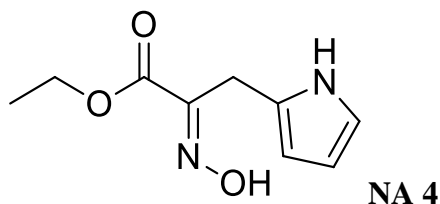
2.1.1.4 – 1,1-Dicloroacetona *p*-toluenosulfonil hidrazona



A 15 mL de ácido propiônico adicionaram-se 1,12 g (6 mmol) de *p*-toluenosulfonil hidrazina e de seguida adicionaram-se 0,55 mL (6 mmol) de 1,1-dicloroacetona e a mistura reacional foi deixada sob agitação durante 6 h à temperatura ambiente. Foram então adicionados 15 mL de éter de petróleo e a mistura deixada no frigorífico durante 16 h. O precipitado branco foi filtrado e lavado 3x com 10 ml de éter de petróleo frio. Após secagem dos cristais obtiveram-se 1,08 g (72%) da hidrazona analiticamente pura, p.f. (dec.) = 135-137,5 °C lit⁽³²⁾ 137-138 °C; IV ν_{\max} : 3210, 1615 e 1345 cm⁻¹, ¹H (400 MHz clorofórmio-*d*) 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 δ (101 MHz, clorofórmio-*d*) 15,2; 23,1; 68,2; 125,4; 128,1; 130,0; 141,3 e 143,6.

2.1.2 Síntese dos adutos e bis-heterociclos

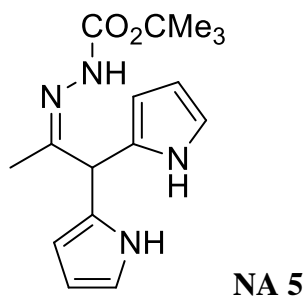
2.1.2.1- 2-Hidroxiimino-3-(pirrol-2-il)propionato de etilo



A uma mistura de 0,358 g (1,17 mmol) da oxima do bromopiruvato de etilo, sintetizada anteriormente e 1,0 mL (15,4 mmol) de pirrole em 35 mL de 1,150 g (8,3 mmol) de K₂CO₃. A mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 16

h. Então os sólidos foram filtrados sob vácuo através de um funil de placa porosa contendo uma pequena camada de celite como coadjuvante de filtração. O solvente foi removido do filtrado e o resíduo sujeito a cromatografia de flash seca usando como eluente uma mistura de DCM/acetato de etilo (5/1), tendo-se obtido 0,121g (64%) de um sólido amarelado. p.f. = 114,5-117 °C lit.⁽²⁹⁾ 118-120 °C; IV ν_{\max} : 3340, 1715, 1546, 1010; ¹H (400 MHz, clorofórmio-*d*) δ = 1,30 (3 H, t), 3,91 (2 H, s), 4,28 (2 H,q), 6,01-6,12 (2 H, m), 6,63 (1 H, m), 8,61 (1 H, sl), 10,32 (1 H, sl). ¹³C δ (100 MHz, clorofórmio-*d*) 15,1; 27,6; 62,3; 108,2; 108,9; 112,4; 132,3; 150,8; 165,1.

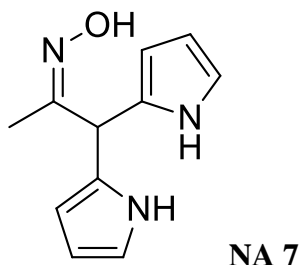
2.1.2.2- 5-(1'-*t*-Butoxicarbonil-hidrazonoetil)dipirrometano



Inicialmente juntou-se 1,383 g (10 mmol) de K₂CO₃ a 12 ml de água destilada. Em seguida, adicionou-se 1,40 mL (20 mmol) de pirrole e, por fim 0,241 g (1 mmol) de dicloroacetona *t*-butoxi-carbonil-hidrazona, deixando a reagir sob agitação. Após 5h de reação, adicionou-se 20 ml de DCM ao produto da reação, de modo a separarmos a fase orgânica da fase inorgânica, sendo a fase orgânica recolhida e repetiu-se este processo novamente. Em seguida, fomos analisar o produto obtido até então por cromatografia, utilizando placa de TLC. Posteriormente, utilizou-se sulfato de sódio anidra para remover eventuais resíduos de água destilada. Após secagem, filtrou-se esse mesmo sólido e, em seguida, colocou-se o filtrado num balão de fundo redondo para evaporar o solvente. No dia seguinte, procurou-se precipitar recorrendo-se então ao hexano que permitiu então a precipitação desejada. O precipitado foi filtrado e sujeito a cromatografia de flash usando como eluente: acetato de etilo/hexano (2:3). Obteve-se um sólido branco 0,249 g (75%), p.f. = lit.⁽³³⁾137-138 °C, IV ν_{\max} = 3330, 2968, 1715, 1369, 1240, 1160 cm⁻¹, ¹H (400 MHz, clorofórmio-*d*) δ = 1,55 (9H, s), 1,82 (3H, s), 5,15 (1H, s), 6,10 (2H, sl), 6,14 (sl, 2H), 6,68 (sl, 2H), 7,50 (sl, 1H), 8,76 (sl, 2H); ¹³C (100 MHz, clorofórmio-*d*): δ = 13,7;

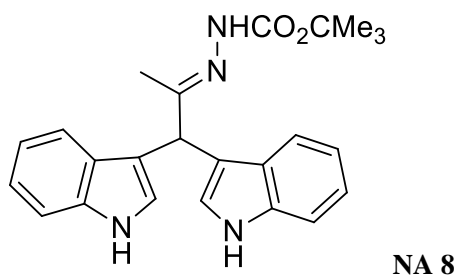
28,5; 46,3; 81,4; 106,7; 108,5; 117,8; 129,3; 152,7 e 156,2.

2.1.2.3 - 5-(1'-Hidroxi-iminoetil)dipirrometano



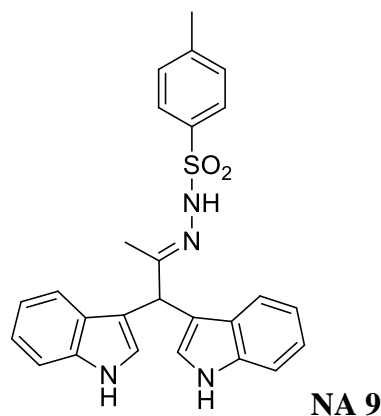
À mistura de 12 mL de água destilada, 2 mL de CH_2Cl_2 , adicionou-se sucessivamente 2,5 mL de pirrole, 2,809 g de K_2CO_3 e, por fim, 0,287 g da 1,1-dicloroacetona oxima, ficando a reagir por 24h. Fomos depois separar a fase orgânica da fase inorgânica utilizando 20 ml de DCM, repetindo este processo novamente, para isolarmos bem a fase orgânica. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrou-se o sólido de seguida. Realizou-se uma cromatografia em TLC (apenas com DCM e com 3:2 DCM/acetato de etilo) antes de colocar a evaporar e, após o processo de evaporação do solvente, procurou-se precipitar o produto recorrendo ao hexano. Dado que se obteve uma espécie de líquido viscoso, fez-se uma mistura de DCM e acetato de etilo, de modo a recolher o produto contido nas paredes do balão de fundo redondo. Em seguida realizou-se novamente uma cromatografia em TLC com 3:2 de DCM/acetato de etilo. Decidiu-se, então, isolar o produto pretendido através de uma coluna de sílica, utilizando 3:2 de DCM/acetato de etilo até à quarta extração, depois utilizou-se apenas acetato de etilo até à sétima e última extração. Ao realizar-se novamente uma cromatografia em TLC com os produtos dessas extrações, concluímos que o produto pretendido se encontrava nos tubos 2 e 3 (segunda e terceira extração) então juntámos o conteúdo de ambos e colocou-se a evaporar. Obteve-se um sólido esbranquiçado 0,184 g (74%), p.f. = 138,5-140, lit⁽³³⁾ 142-144 °C, IV v_{max} = 3330, 1407, 1220, 1095, 948 cm^{-1} , ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}^6$): δ = 1,84 (9H, s), 5,03 (1H, s), 5,95 (2H, sl), 6,04 (2H, sl), 6,67 (2H, sl), 9,39 (2H, s), 10,06 (1H, s), ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}^6$): δ = 13,1; 45,2; 106,8; 108,1; 117,4; 129,8; 156,8.

2.1.2.4- 1-(1-(*tert*-Butoxicarbonilhidrazono)etil)bis(1*H*-indol-3-il)metano



1,1-Dicloroacetona *tert*-butoxicarbonil hidrazona 0,391g (1,6 mmol) e indole 0,766 g (6,5 mmol) foram adicionados a uma suspensão de 1,15 g (8,3 mmol) de K₂CO₃ em 6 mL de solvente eutético profundo natural (NADES) formado por cloreto de colina e glicerol (2:1) e 2 mL H₂O. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h e então diluída com 20 mL de H₂O. O precipitado formado foi lavado com água e cristalizado com éter petróleo. Obtiveram-se 0,341 g (53%) de um sólido branco. p.f. > 190 dec., lit^(34,35) > 180 °C dec.; IV ν_{\max} = 3251, 2979, 1721, 1699, 1524, 1474, 1369, 1330, 1284, 1245, 1158 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.52 (s, 9H), 1.85 (s, 3H), 3.72 (s, 6H), 5.66 (s, 1H), 6.87 (sl, 2H), 7.05 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.19–7.29 (m, 4H), 7.42 (sl, 1H), 7.59 (d, J = 8.0 Hz, 2H) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 13.4, 28.4, 32.8, 43.6, 80.8, 109.1, 114.1, 118.9, 120.3, 121.6, 127.5, 127.7, 137.2, 152.8, 153.7

2.1.2.5 - 1-(1-(*p*-Toluenesulfonilhidrazono)etil)bis(1*H*-indol-3-il)metano



1,1-Dicloroacetona *p*-toluenesulfonil hidrazona 0,30 g (1 mmol) e indole 0,47g

(4 mmol) foram adicionados a uma suspensão de 1,38 g (10 mmol) de K_2CO_3 em 6 mL de solvente eutético profundo natural (NADES) formado por cloreto de colina e glicerol (2:1) e 2 mL H_2O . A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h e então diluída com 20 mL de H_2O . O precipitado formado foi lavado com água e cristalizado com éter petróleo. Obtiveram-se 0,30 g (66%) de um sólido levemente alaranjado. p.f. = 158-160 °C, lit.^(34,35) 159.2–162.3 °C: IV v_{max} = 3408, 3221, 1458, 1336, 1165, 1092, 742, 677, 669 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 1,68 (s, 3H), 2,48 (s, 3H), 5,31 (s, 1H), 6,80 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7,02 (m, 2H), 7,15 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 7,19 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7,38 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 7,44 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7,88 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 9,99 (sl, 1H), 10,91 (sl, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 14,5; 21,1; 43,0; 111,3; 113,2; 118,3; 118,8; 120,9; 123,4; 126,6; 127,6; 129,3; 136,2; 136,3; 142,9; 159,3.

2.3 Atividade quelante

2.3.1 Atividade quelante para o Cálcio

A atividade quelante dos compostos para com o Ca^{2+} é determinada pela alteração de cor provocada pela formação do complexo Ca^{2+} /o-cresolftaleína complexona. A atividade quelante foi medida em placas de 96 poços. Para tal, usaram-se 50 μL de solução de ligando a 1mM, aos quais foram adicionados 30 μL de solução padrão de Ca ($CaSO_4$ 140 mM em água Milli-Q), 20 μL de solução indicadora de o-cresolftaleína complexona (0,5 mM) e 75 μL de solução tampão NH_4^+/NH_3 (150 mM, pH 10). Finalmente, preencheu-se o volume até 300 μL com água Milli-Q. O controlo positivo continha 50 μL de EGTA (1 mM) em substituição da amostra. A absorvância foi lida de imediato, a 575 nm, num leitor de placas (Synergy4, BioTek®).

2.3.2 Atividade quelante para o Ferro

A atividade quelante para com o Fe^{2+} é determinada pela alteração de cor provocada pela formação do complexo Fe^{2+} /ferrozina. Neste método, utilizou-se 200 μL de água destilada, seguidos de 30 μL da solução de ligando a 1 mM, 30 μL da solução de $FeCl_2$ (0,8 mM), também em placas de 96 poços. O controlo negativo, em substituição da

amostra, continha igual volume de água destilada. Para o controlo da cor utilizou-se 30 µL da solução de ligando a 1mM e 242,4 µL de água destilada. Por último, o controlo positivo foi preenchido apenas por EDTA (3,4 mM). No fim, a placa foi incubada durante 30 minutos e, após o tempo de incubação, adicionou-se 12,5 µL de ferrozina (40 mM). Em seguida, incubou-se a placa por mais 10 minutos e leu-se as absorvências a 562 nm, num leitor de placas (Synergy4, BioTek®).

2.3.3 Atividade quelante para o Cobre

Por último, no método de determinação da atividade quelante do Cu^{2+} , a atividade quelante dos compostos é determinada pela alteração de cor provocada pela formação do complexo Cu^{2+} /pirocatecol violeta (PV). Para tal, utilizou-se 200 µL da solução tampão (acetato de sódio, a pH 6), seguido de 30 µL da solução de ligando a 1mM, 100 µL de CuSO_4 (0,3 mM) e 6 µL de PV (4 mM). O controlo negativo, em substituição da amostra, continha igual volume de solução tampão. No controlo da cor utilizou-se 30 µL da solução de ligando a 1mM e 306 µL da solução tampão. O controlo positivo continha 30 µL de EDTA (3,4 mM) em vez de amostra. A absorvância foi lida de imediato, a 632 nm, num leitor de placas (Synergy4, BioTek®).

A atividade quelante (%) foi calculada utilizando a equação:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = \left(1 - \frac{\text{absorvância da amostra corrigida}}{\text{absorvância do controlo negativo}} \right) \times 100$$

Em que a absorvância da amostra corrigida era a absorvância do ensaio com o ligando à qual foi subtraída a absorvância do controlo da cor.

2.4 Atividade antioxidante

A fim de se determinar a atividade antioxidante dos compostos sintetizados realizaram-se ensaios de neutralização dos radicais livres $\text{ABTS}^{+\bullet}$ e $\text{DPPH}\cdot$. Tal como anteriormente, os ligandos foram testados a 1mM.

O radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ é um radical pouco estável pelo que a sua solução tem de ser preparada imediatamente antes do momento da análise. Para tal, preparou-se a solução de

ABTS (7,4 mM) em solução de persulfato de potássio (2,6 mM), deixando a incubar 12 a 16h no frigorífico, num local protegido da luz. Após incubação, a 5 µL da solução de ABTS⁺• adiciona-se etanol até que a absorvância a 734 nm ronde os 0,7. O ensaio de atividade foi também realizado em placas de 96 poços, aos quais foram adicionados, por esta ordem, 10 µL de solução de ligando (1mM) e 190 µL de solução de ABTS⁺• anteriormente preparada. O controlo positivo foi composto por 10 µL de BHT (4,5 mM) em vez de ligando, e o controlo negativo continha 10 µL de DMSO (o solvente usado na preparação das soluções de ligandos) e 190 µL da solução de ABTS⁺•.

Relativamente ao ensaio de DPPH, o primeiro passo também consistiu na preparação da solução de DPPH• a 0,12 mM. O ensaio de atividade foi também realizado em placas de 96 poços, aos quais foram adicionados 22 µL da solução de ligando a 1mM e 200 µL de DPPH. Nos ensaios da cor foram utilizados 22 µL da solução de ligando a 1mM e 200 µL de metanol. Por sua vez, o controlo positivo consiste em 22 µL de solução de BHT (4,5 mM) e 200 µL da solução de DPPH enquanto que, o controlo negativo é constituído por 22 µL são de solvente, DMSO, e e 200 µL da solução de DPPH.

A atividade antioxidante (%) foi calculada utilizando a equação:

$$\text{Ativ. Antiox (\%)} = \left(\frac{\text{absorvância do } C^- - \text{absorvância da amostra}}{\text{absorvância do } C^-} \right) \times 100$$

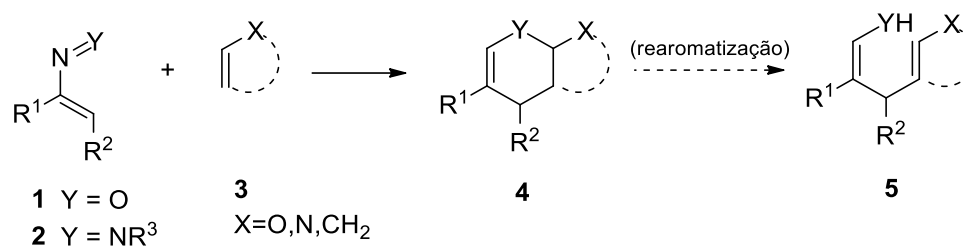
C⁻ - Controlo negativo

3. Resultados e discussão

3.1 Síntese dos ligandos

3.1.1 Preâmbulo

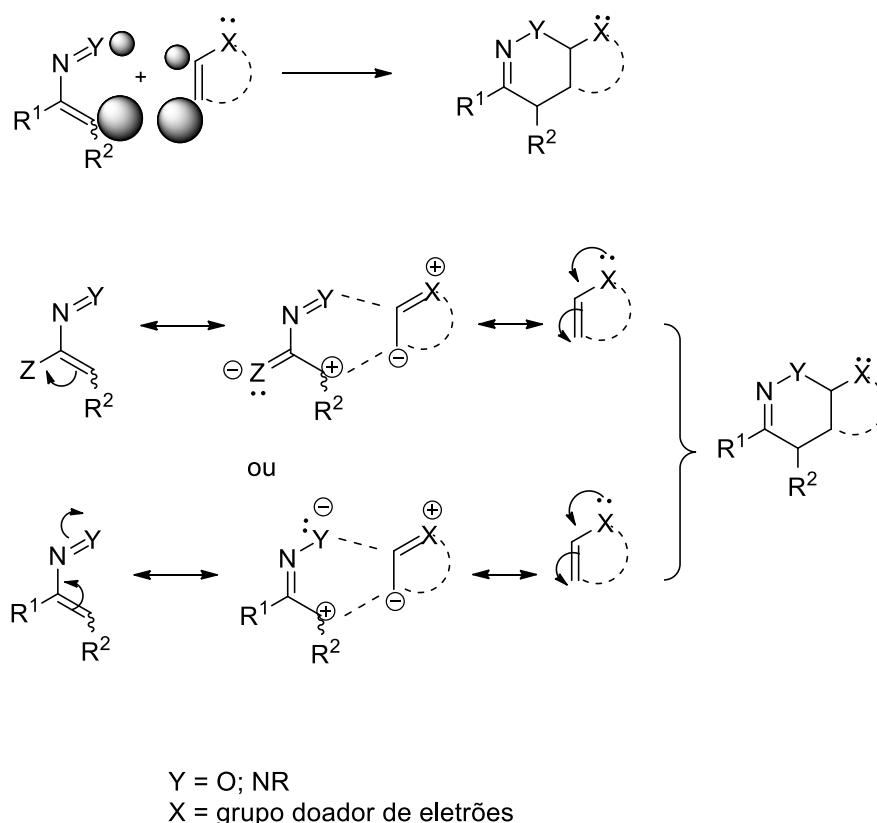
Durante as últimas décadas, as reações de hetero Diels-Alder entre nitrosoalcenos (**1**) e azoalcenos (**2**) conjugados, e dienófilos ou heterodienófilos, ricos em elétrons, possibilitaram a síntese de uma enorme variedade de novos compostos heterocíclicos de elevada importância, devido não só às propriedades no que diz respeito à atividade biológica,⁽³⁶⁾ mas também devido à sua utilidade como intermediários na síntese de outros compostos com interesse farmacológico⁽³⁷⁻⁴⁵⁾ (**Esquema 3.1**).



Esquema 3.1 Reações de hetero Diels-Alder de nitroso- e azo-alcenos.

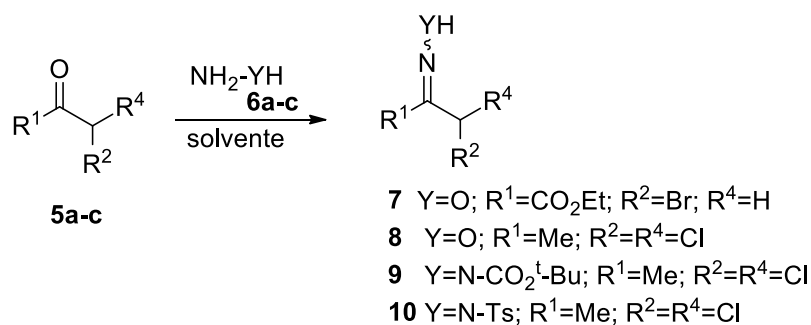
As reações de hetero Diels-Alder são uma espécie de ciclo-adições com procura eletrônica inversa, isto é, nestes casos os (hetero)dienos são deficientes em elétrons e os (hetero)dienófilos, por sua vez, serão possuidores de grande densidade eletrônica. Assim as orbitais moleculares envolvidas serão a LUMO do dieno e a HOMO do dienófilo e consequentemente quanto maior for o poder retirador dos substituintes R¹ e R² (e R³ no caso dos azoalcenos) mais baixa em energia será a respetiva orbital LUMO do dieno. Por outro lado, quanto maior for a capacidade doadora do átomo X do dienófilo mais elevada em termos energéticos será a orbital HOMO e assim menor a diferença energética (ΔE) entre as orbitais, logo maior será a sobreposição das mesmas e, consequentemente, mais rápida, eficiente e regioseletiva será a reação. O régio-isómero que se obtém maioritariamente

ou exclusivamente resulta da sobreposição das orbitais moleculares $HOMO_{\text{dienófilo}}$ - $LUMO_{\text{heterodieno}}$ de modo, ou de tal forma que o átomo terminal do heterodieno ou heterociclo rico em elétrons portador do maior coeficiente da órbita HOMO (em módulo) – ou maior densidade eletrônica – se liga ao átomo terminal do nitroso- ou azoalceno portador do maior coeficiente da orbital LUMO (em módulo) – ou maior deficiência eletrônica^(46,47) (**Esquema 3.2**).



Esquema 3.2 Regioselectividade nas reações de hetero Diels-Alder.

O método mais usual e de longe o mais simples de preparação de nitroso- e azoalcenos é a desidro-halogenação de oximas e hidrazonas α -halogenadas, respectivamente (**Esquema 3.3**). Normalmente, devido à sua elevada reatividade e instabilidade, os nitroso- e azo-alcenos são gerados *in situ* no meio reacional e imediatamente interceptados pelo dienófilo presente ao mesmo tempo no balão de reação. A utilização de uma base inorgânica favorece a lenta geração do heterodieno – e, por consequência, uma baixa concentração – promovendo assim a intercepção pelo dienófilo

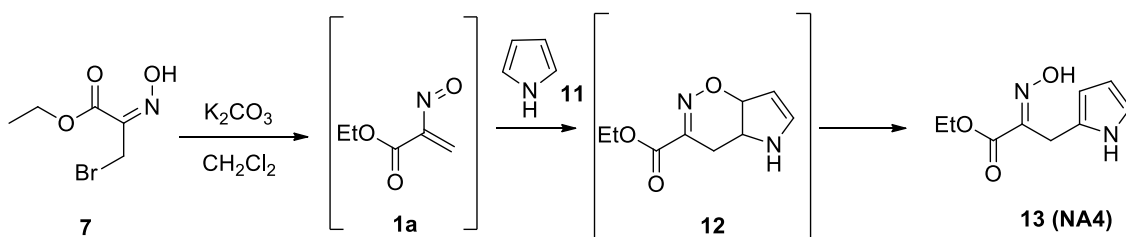


Esquema 3.4 Procedimento geral para a síntese das oximas e hidrazonas.

3.1.3 Reações de hetero Diels-Alder e preparação dos ligandos

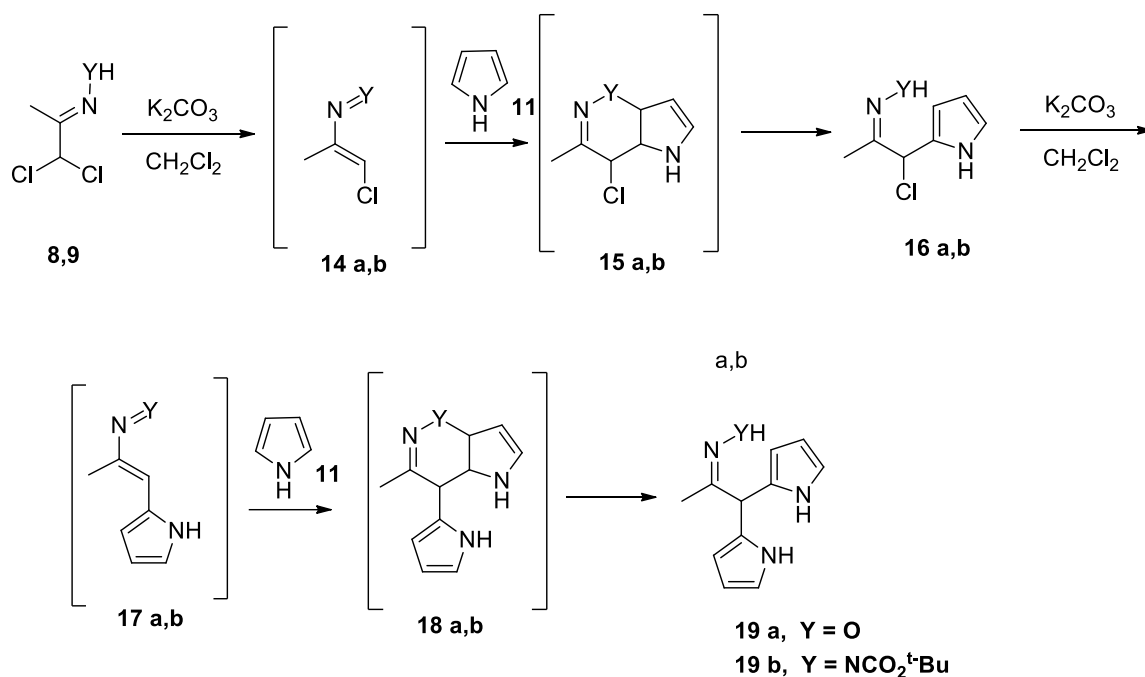
As oximas e hidrazonas preparadas anteriormente foram então utilizadas para a síntese dos heterodienos que foram intercetados por pirrole **11** e indole **21** – heterociclos ricos em elétrons - que funcionaram como dienófilos.

Inicialmente, utilizámos a oxima **7**, derivada do bromopiruvato de etilo, que na presença de carbonato de potássio anidro origina o nitrosoalceno **1a** que, reagindo com o pirrole **11**, produziu o ligando **13**, após rearomatização do cicloaduto **12** inicialmente formado (**Esquema 3.5**), dado que este evolui rapidamente para a oxima de cadeia aberta devido ao ganho energético e consequente estabilidade acrescida, que a rearomatização do anel de pirrole induz na molécula.



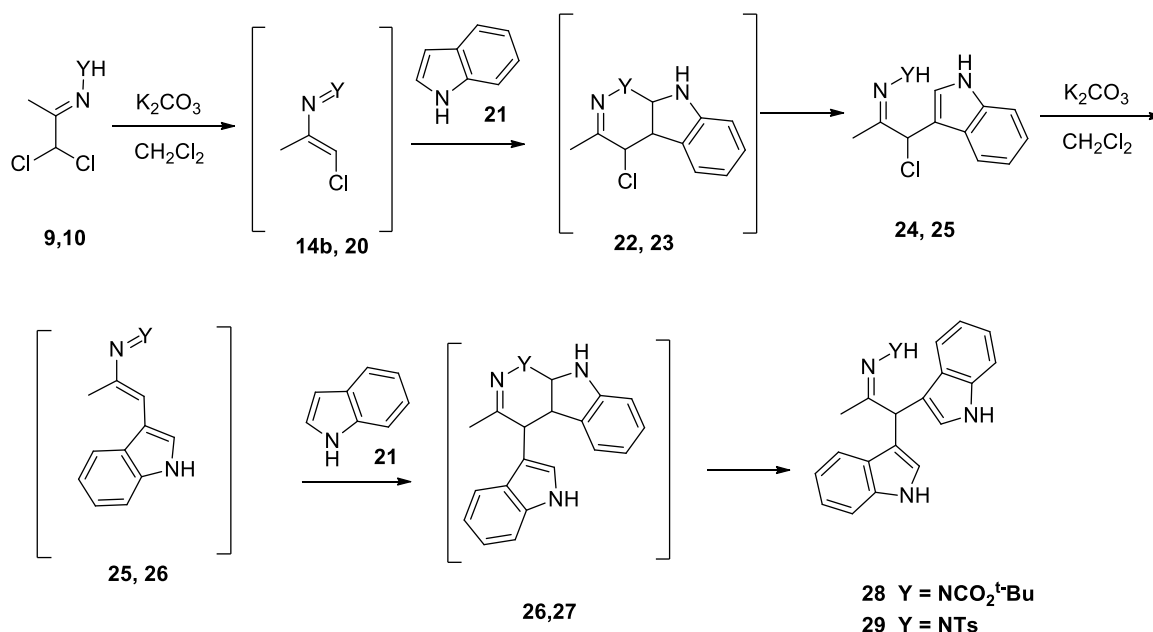
Esquema 3.5 Reação de hetero Diels-Alder para preparação do ligando **13**.

A síntese dos outros compostos teve por base a utilização de precursores α,α' -di-halogenados, nomeadamente a oxima **8** e as hidrazonas **9-10**. A estratégia sintética geral foi similar quer na obtenção dos dipirrometanos **19 a,b**⁽³³⁾ quer dos di-indolilmetanos **28,29**^(34,35) (**Esquema 3.6** e **Esquema 3.7**).



Esquema 3.6 Síntese dos dipirrometanos **19 a,b**.

O processo envolve duas reações de ciclo-adição consecutivas, i.e., numa primeira fase a eliminação de HCl origina o 4-cloro-heterodieno que é intercetado por uma primeira molécula de pirrole ou indole, originando, após rearomatização a hidrazona ou oxima α -halogenada- α' -substituída. Na presença da base, um novo heterodieno-4-substituído por uma molécula de pirrole ou indole é gerado através de nova eliminação de HCl, e este reage com uma outra molécula de pirrole ou indole originando, novamente após abertura do anel de 6 membros, como consequência da rearomatização os bis-adutos finais.



Esquema 3.7 Síntese dos di-indolilmetanos **28** e **29**.

De registrar a diferente regioselectividade encontrada nas reações com o pirrole e com o indole. Enquanto no primeiro o maior coeficiente se encontra no átomo de carbono na posição C2 do anel pirrólico, no caso do indole é o átomo de carbono na posição C3 que efetivamente possui esse caracter.

3.2 Atividade quelante

Após a síntese dos compostos, preparam-se soluções dos ligandos NA6 (**8**), NA4.1 (**13**), NA7.1 (**19a**), NA5 (**19b**), NA8 (**28**) e NA9 (**29**), com uma concentração de 1mM com o objetivo de se determinar as suas atividades quelantes relativamente ao Ca²⁺, Fe²⁺ e Cu²⁺, por métodos espectrofotométricos adaptados a placas de 96 poços.

3.2.1 Atividade quelante para o Cálcio

Como é possível verificar no **Gráfico 3.1**, à primeira vista, os ligandos não obtiveram atividades muito distintas uns dos outros, no entanto, embora os valores se

encontrem todos abaixo de 50%, foi o ensaio de atividade quelante em que todos os compostos analisados demonstraram capacidade quelante em simultâneo.

Os ligandos NA7 (**19a**) e NA9 (**29**) foram os que revelaram melhor atividade quelante comparativamente com os restantes, sendo significativamente mais ativos que o composto NA8 (**29**), embora não apresentem diferenças significativas dos restantes compostos. A diferença significativa entre as atividades do NA7 e NA9 comparativamente com o NA8 poderão ter alguma justificação no facto de o NA8 ser possuidor de um grupo *tert*-butoxicarbonilo, um grupo muito volumoso, que poderá conferir algum atravancamento estérico à molécula, podendo impedir, de alguma forma, que esta adquira uma estrutura tridimensional favorável ao processo de quelação do Ca^{2+} , bem como, o facto de o NA8 eventualmente poder formar um anel de oito átomos, muito menos favorável, quando comparado à possibilidade de formação de um anel de seis átomos que poderá ser formado pela molécula NA7.

Os ligandos NA4.1 (**13**), NA5 (**19b**) e NA6 (**8**), são semelhantes entre si em termos de atividade quelante para o Ca^{2+} embora tenham uma diversidade estrutural muito grande, tornando assim muito difícil o conjeturar de uma plausível racionalização e/ou explicação. Estes três ligandos mencionados apresentam também algumas semelhanças de atividade com os ligandos NA7 (**19a**) e NA9 (**29**), no entanto, estes dois últimos possuem características que lhes poderão conferir uma ligeira vantagem, características estas que, no caso do NA7, será a posição relativa dos átomos de azoto, com a formação de um possível anel de seis átomos, enquanto que no caso do NA9, poderá ser a configuração espacial geral da molécula mais planar deste ligando.

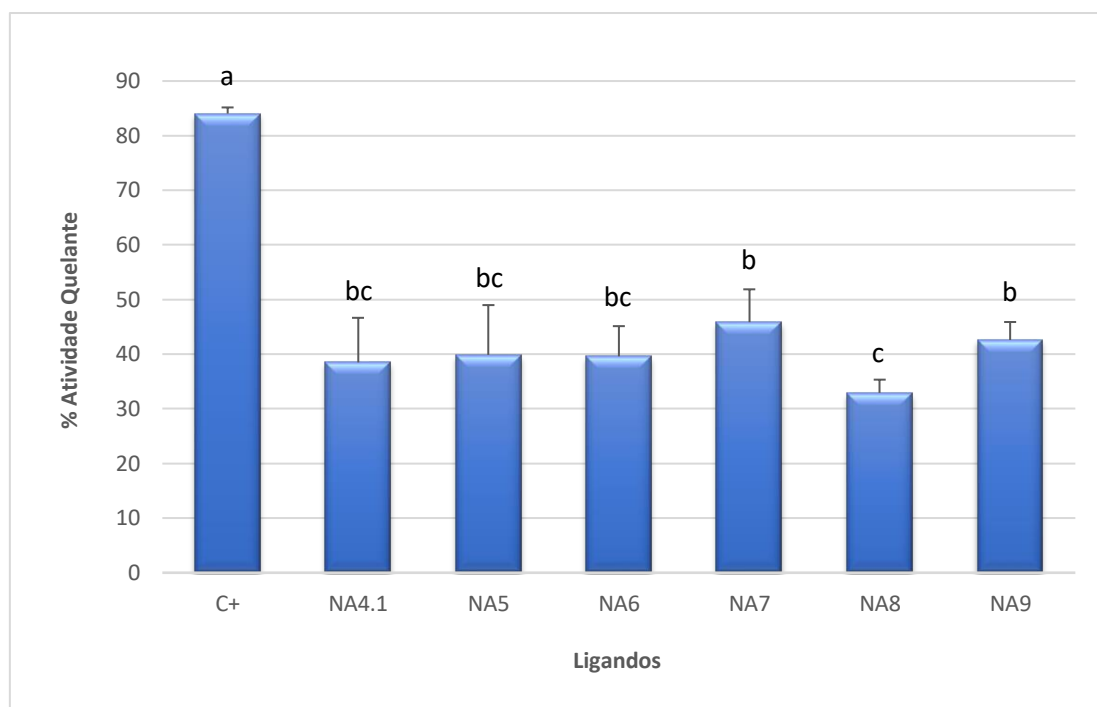


Gráfico 3.1 Atividade quelante (%) dos diferentes ligandos para o Ca^{2+} e respectiva análise estatística (ANOVA).

3.2.2 Atividade quelante para o Ferro

Como é possível verificar no **Gráfico 3.2**, os ligandos sintetizados apresentam uma baixa capacidade para quelar o Fe^{2+} , sendo que os valores se encontram consideravelmente abaixo dos 50% de atividade quelante. Comparativamente ao que vimos anteriormente com o Ca^{2+} , os resultados da atividade quelante dos ligandos para o Fe^{2+} foram muito diferentes; o ligando NA8 (**29**) foi o que demonstrou melhor atividade quelante para o Fe^{2+} , semelhante à do ligando NA4.1 (**13**) e significativamente superior à do NA7 (**19a**).

Posto isto, poderemos concluir que a capacidade quelante dos ligandos neste ensaio não parece estar diretamente relacionada com a estrutura primária do ligando, como foi mencionado acima para o Ca^{2+} , mas sim com uma eventual capacidade que o metal, neste caso o Fe^{2+} , poderá possuir de induzir na disposição espacial ou estereoquímica na molécula do ligando.

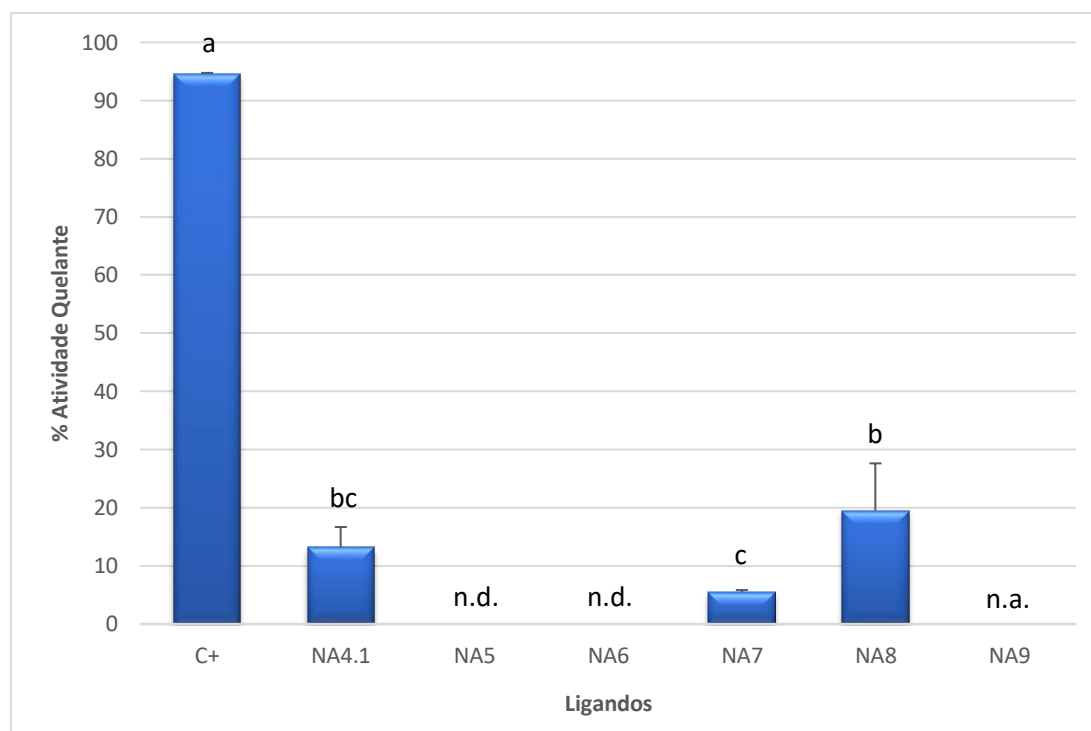


Gráfico 3.2 Atividade quelante (%) dos diferentes ligandos para o Fe^{2+} e respetiva análise estatística (ANOVA). n.d.- não detetável; n.a.- não analisado.

3.2.3 Atividade quelante para o Cobre

Como é possível verificarmos pelo **Gráfico 3.3**, o ligando NA8 (**28**) foi o que revelou melhor atividade quelante para o Cu^{2+} , semelhante à capacidade quelante do controlo positivo. Por sua vez, os ligandos NA4.1(**13**) e NA5 (**19b**), apresentaram valores semelhantes entre si e significativamente mais baixos que o NA8 (**28**), embora o ligando NA 4.1 (**13**) tenha apresentado atividade quelante significativamente superior à do ligando NA6 (**8**).

É de realçar que o valor de capacidade quelante do EDTA, usado neste ensaio como controlo positivo, foi bastante baixo, contrariamente ao que se verifica nos restantes ensaios. O controlo positivo, nestes ensaios, serve como termo de comparação tendo em conta que é composto por um agente quelante de referência para o metal do respetivo ensaio. O EDTA, embora tenha menor capacidade quelante para o Cu que para o Fe, apresenta geralmente atividade à volta dos 80%. Neste ensaio, o controlo positivo apresentou um valor de $34.83 \pm 1.87 \%$ (Tabela 3, em Anexo) pelo que é provável que tenha ocorrido algum erro na execução do método e, conseqüentemente, convém usar

alguma cautela quanto a tirar conclusões definitivas no que diz respeito aos valores referentes a cada ligando.

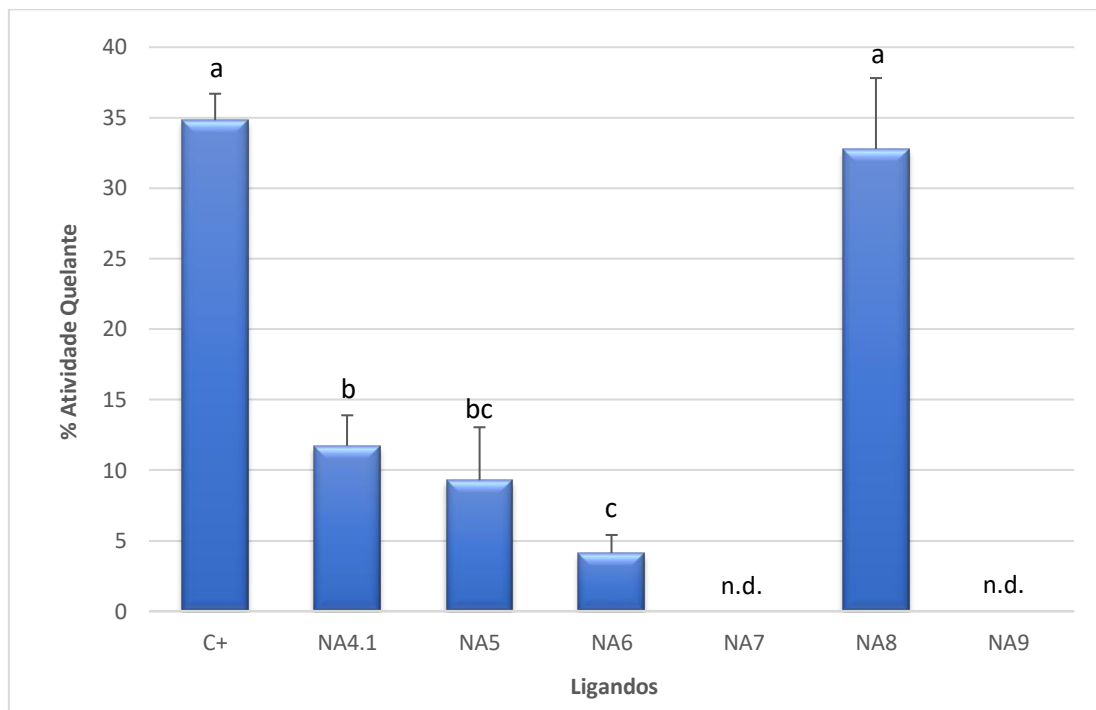


Gráfico 3.3 Atividade quelante (%) dos diferentes ligandos para o Cu^{2+} e respetiva análise estatística (ANOVA). n.d.- não detetável

3.3 Atividade antioxidante

3.3.1 Atividade capturadora de radical ABTS

No que diz respeito ao ensaio de atividade antioxidante com o $\text{ABTS}^{\bullet+}$, cujos resultados se encontram no **Gráfico 3.4**, é possível observar que os ligandos NA8 (**28**) e NA9 (**29**) revelaram possuir uma percentagem de atividade significativamente mais alta que os restantes, em especial, o NA9 com cerca de $82.15 \pm 3.08\%$ (Tabela 4, em Anexo). Estes resultados poderão ser racionalizados pelo facto destas duas moléculas possuírem várias formas de ressonância uma vez que, são compostas por anéis aromáticos, o que lhes conferirão ótimas propriedades para estabilizar radicais livres em situação de stress oxidativo, bem como para se estabilizarem a elas próprias após estabilização desses mesmos radicais.

Em seguida, surgem os ligandos NA4.1 (**13**) e o NA7 (**19a**) com atividades antioxidantes semelhantes entre si, e significativamente superiores às do NA5 (**19b**).

Por fim, era expectável que o NA6 (**8**) não revelasse tão boas propriedades antioxidantes quanto os restantes ligandos, dada a estrutura química da molécula que não lhe conferirá as vantagens referidas anteriormente (formas de ressonância e estabilização interna da molécula).

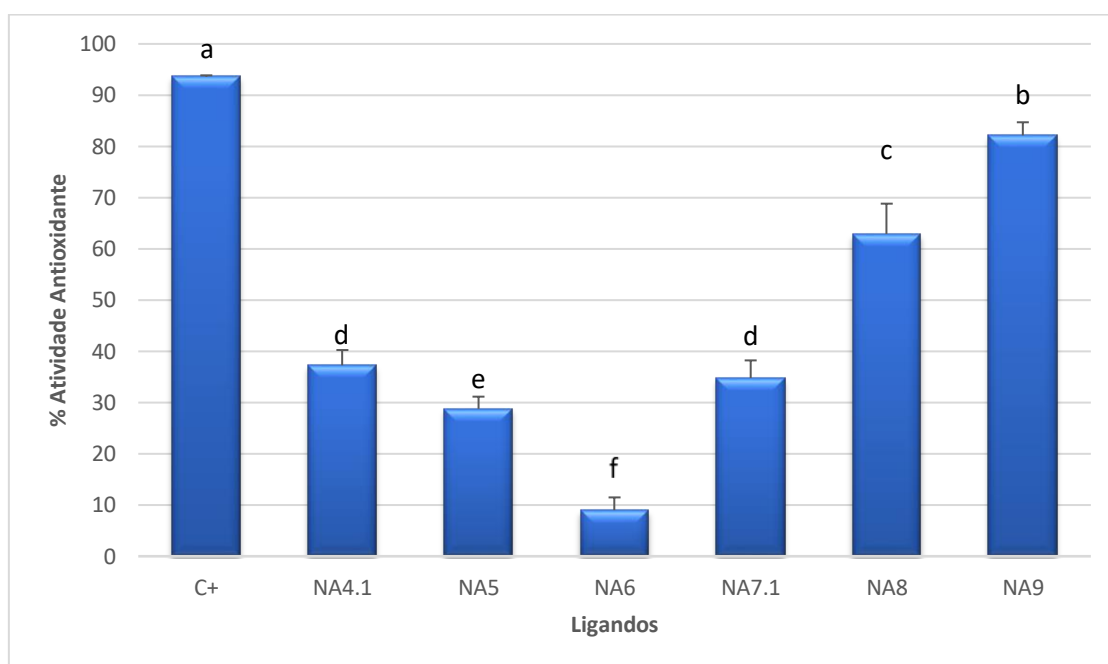


Gráfico 3.4 Atividade antioxidante (%) dos diferentes ligandos para o ensaio com ABTS⁺• e respetiva análise estatística (ANOVA).

3.3.2 Atividade capturadora de radical DPPH

Os resultados do ensaio de atividade antioxidante com o DPPH• encontram-se discriminados no **Gráfico 3.5**, através do qual podemos ver que os ligandos NA8 (**28**) e NA9 (**29**) revelaram também possuir uma percentagem de atividade acima da média relativamente aos restantes ligandos, embora não tão elevada quanto a verificada anteriormente para o radical ABTS⁺•, como podemos verificar pela diferença de valores comparativamente com o controlo positivo. Estes resultados poderão ser explicados, mais uma vez, pelo facto de as duas moléculas possuírem boas propriedades como doadoras

de hidrogénios e para estabilizar radicais livres em situação de stress oxidativo, bem como possuírem várias formas de ressonância possíveis, permitindo-lhes estabilizar a própria molécula após a perda de uma carga.

De acordo com o que foi possível analisar anteriormente, seria de esperar que moléculas possuidoras de mais átomos eletronegativos como é o caso do azoto (N) e oxigénio (O), bem com de estruturas em anel e hetero-aromáticas, como é o caso do NA4.1 (**13**), NA5 (**19b**) e NA7 (**19a**) pudessem revelar melhores resultados no que toca a atividade antioxidante, no entanto não foram esses os resultados encontrados como podemos observar através do **Gráfico 3.5**.

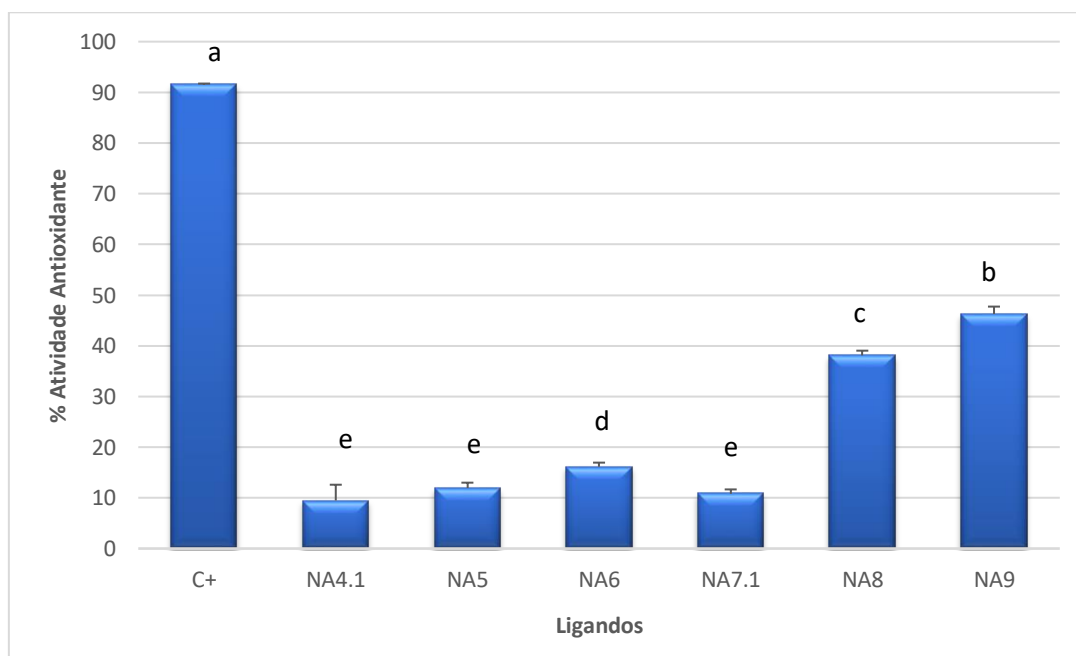


Gráfico 3.5 Atividade antioxidante (%) dos diferentes ligandos para o ensaio com DPPH• e respetiva análise estatística (ANOVA).

4. Conclusão e perspectivas futuras

Perante os resultados obtidos relativamente ao ensaio da atividade quelante para o Ca^{2+} , seria interessante fazer algumas alterações de funcionalidades estruturais nos ligandos que obtiveram melhor atividade quelante como por exemplo, tentar fazer uma combinação dos ligandos NA7 e NA9, isto é, sintetizar o NA9 com a função oxima e testar a atividade quelante do ligando obtido. Perante o resultado dessa experiência, definir-se-ia o passo seguinte.

No que diz respeito ao ensaio da atividade quelante para o Cu^{2+} , seria relevante voltar a repetir o ensaio tendo em conta a inconformidade detetada através do controlo positivo. Perante esse novo ensaio, se sempre se viesse a confirmar valores de atividade quelante semelhantes entre o controlo positivo e o NA8, seria interessante realizar algumas alterações na molécula deste ligando como, por exemplo, substituir o grupo metilo por um grupo arilo ou alcoxi-carbonilo, assim como, induzir variações ao nível do grupo do indole como, por exemplo, através da utilização de indoles com substituintes halogenados e/ou indoles *N*-alquilados ou *N*-acilados e comparar os resultados obtidos entre si. A redução dos grupos hidroxí-imino e/ou hidrazono às respetivas aminas ou *N*-aminas também poderia resultar em compostos com maior capacidade de coordenação.

Por sua vez, relativamente aos ensaios de atividade antioxidante quer com o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ quer com o DPPH^{\bullet} , seria interessante explorar melhor os ligandos NA8 e NA9. No que diz respeito ao NA8, substituir o grupo metilo por um grupo arilo ou outro grupo heteroaromático, de forma a potencialmente podermos ter mais formas de ressonância e assim de dispersar eletrões (ou cargas), poderia ser uma boa aposta de modo a otimizar a atividade antioxidante deste ligando. No caso do NA9, poderíamos também substituir o grupo metilo por um grupo arilo, heteroaromático, carbonilo ou carboxilo sendo que, a otimização deste ligando poderia eventualmente passar também por alquilar o N-1 do indole e/ou substituir os hidrogénios do indole por átomos eletronegativos como por exemplo bromo (Br) ou cloro (Cl).

Referências Bibliográficas

1. Flora SJ, Vidhu P. Chelation in metal intoxication. *Int. J. Env. Res. Public Health* **2010**, 7, 2745–2788. <https://doi:10.3390/ijerph7072745>
2. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011, 283, 65–87. <https://doi:10.1016/j.tox.2011.03.001>
3. Kim J-J, Kim Y-S, Kumar V. Heavy metal toxicity : An update of chelating therapeutic strategies. *J Trace Elem Med Biol* **2019**, 54, 226–31. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>
4. Paweł K, Łukasz S. Effects of heavy metal pollution from mining and smelting on enchytraeid communities under different land management and soil conditions. *Science Total Env.* **2015**, 536, 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.086>
5. Hu Y, Cheng H. Application of stochastic models in identification and apportionment of heavy metal pollution sources in the surface soils of a large-scale region. *Environ. Sci. Tech.* **2013**, 47, 3752–3760. <http://dx.doi.org/10.1021/es304310k>
6. Ayari F, Hamdi H, Jedidi N, Gharbi N, Kossai R. Heavy metal distribution in soil and plant in municipal solid waste compost amended plots. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* **2010**, 7, 465–472. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03326156>
7. Pereira T.C.B., Campos M.M., Bogo M.R. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. *J Appl. Toxicol.* **2016**, 36, 876–885. <http://doi.org/10.1002/jat.3303>.
8. Festa RA, Thiele DJ. Copper : An essential metal in biology. *Curr. Biol* **2011**, 21, R877–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040>
9. Fearl JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J. Nutri.* **2001**, 131, 568S–580S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.2.568S>
10. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuca K, Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch. Toxicol.* **2016**, 90, 1–37. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1579-5>
11. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I : Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr. Topics Med. Chem.* **2001**, 1, 529–539. DOI: 10.2174/1568026013394831
12. Jan AT, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I, Haq Q.M.R. Heavy metals and human health : Mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 29592–29630. <https://doi.org/10.3390/ijms161226183>

13. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. (2012) Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: Luch A. (eds) *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Experientia Supplementum*, vol 101. Springer, Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
14. Huat TJ, Camats-Perna J, Newcombe EA, Valmas N, Kitazawa M, Medeiros R. Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. *J. Mol. Biol.* **2019**, 431, 1843–1868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.018>
15. Flora SJS, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* **2008**, 128, 501–523. http://www.ijmr.org.in/temp/IndianJMedRes1284501-2248509_061445.pdf
16. Magi S, Castaldo P, Macrì ML, Maiolino M, Matteucci A, Bastioli G, Gratteri S, Amoroso S, Lariccia V. Intracellular calcium dysregulation: Implications for Alzheimer's disease. *BioMed. Research Inter.* **2016**, 2016, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6701324>
17. Tong B.C, Wu A.J, Li M, Cheung K. Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. *BBA - Mol. Cell. Res.* **2018**, 1865, 1745–1760. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.07.018>
18. Bezprozvanny I. Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *T Mol. Med.* **2009**, 15, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.001>
19. Dias V, Junn E, Mouradian M.M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Parkinson's Disease* **2013**, 3, 461–491. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
20. Khachaturian ZS. Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiol. Aging* **1987**, 8, 345-346. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(87\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0197-4580(87)90073-X)
21. Khachaturian ZS. Calcium, membranes, aging, and Alzheimer's disease. Introduction and overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, 568, 1-4. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb12485.x>
22. LaFerla FM. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosc.* 2002, 3, 862–872. <https://doi.org/10.1038/nrn960>
23. Marx J. Fresh evidence points to an old suspect : Calcium. *Science* **2007**, 318, 384–385. DOI: 10.1126/science.318.5849.384
24. Bezprozvanny I, Mattson M.P. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosc.* **2008**, 31, 454–463. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.005>
25. Mattson M.P. Calcium and Alzheimer's disease: In a state of flux. *Science Signaling* 2010, 3 (114), 10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.3114pe10>
26. Demuro A, Parker I, Stutzmann G.E. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 12463–12468. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.080895>

27. (a) Dryanovski DI, Guzman JN, Xie Z, Galteri DJ, Volpicelli-Daley LA, Lee VM, Miller RJ, Shumacker PT, Surmeier DJ. Calcium entry and α -synuclein inclusions elevate dendritic mitochondrial oxidant stress in dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* **2013**, 33, 10154–64. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5311-12.2013>. (b) Nam SH, Jung SY, You CM, Ahn EH, Suh CK. H₂O₂ Enhances Ca²⁺ release from osteoblast internal stores. *Yonsei Med. J.* **2002**, 43 (2), 229–235. <https://doi.org/10.3349/ymj.2002.43.2.229> (c) Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Rad. Biol. & Med.* **2001**, 31 (4), 509–519. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00610-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00610-4) (d) Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin. Invest.* **1990**, 85 (3), 632–639. <https://doi.org/10.1172/JCI114485>. (e) Fraser JHE, Helfrich MH, Wallace HM, Ralston SH. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. *Bone* **1996**, 19 (3), 223–226. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(96\)00177-9](https://doi.org/10.1016/8756-3282(96)00177-9). (f) Roholl PJM, Blauw E, Zurcher C, Dormans JAMA, Theuns HM. Evidence for a diminished maturation of preosteoblasts into osteoblasts during aging in rats: an ultrastructural analysis. *J. Bone Miner. Res.* **1994**, 9 (3), 355–366. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090310>. (g) Shih MS, Cook MA, Spence CA, Palnitkar S, McElroy H, Parfitt AM. Relationship between bone formation rate and osteoblast surface on different subdivisions of the endosteal envelope in aging & osteoporosis. *Bone* **1993**, 14, 519–521. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(93\)90189-H](https://doi.org/10.1016/8756-3282(93)90189-H). (h) Carew TE, Schwenke DC, Steinberg D. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: Evidence that antioxidants *in vivo* can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1987**, 84, 7725–7729. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7725>. (i) Keaney Jr JF, Xu A, Cunningham D, Jackson T, Frei B, Vita JA. Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J. Clin. Invest.* **1995**, 95 (6), 2520–2529. <https://doi.org/10.1172/jci117953>.
28. Dai Y, Spronsen JV, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* **2013**, 766, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
29. Gilchrist TL, Roberts, TG. Addition and Cycloaddition Reactions of the Electrophilic Vinyl Nitroso Compounds 3-Nitrosobut-3-en-2-one, 2-Nitrosopropenal, and Ethyl 2-Nitrosopropenoate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, 1283–1292. <https://doi.org/10.1039/P19830001283>
30. Pereira NAM. Reações de ciclo-adição na síntese de novos dipirrometanos e hidroporfirinas. Tese de doutoramento em química orgânica. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, **2014**.
31. Lemos A, Lourenço JP. Cycloaddition reactions of nitrosoalkenes, azoalkenes and nitrile oxides mediated by hydrotalcite. *ARKIVOC* **2010**, 5, 170–182. <http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.0011.515>

32. Sakai K, Hida N, Kondo K. Reactions of α -Polyhalo Ketone Tosylhydrazones with Sulfide Ion and Primary Amines. Cyclisation to 1,2,3-Thiadiazoles and 1,2,3-Triazoles. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, 59, 179–183. <https://doi.org/10.1246/bcsj.59.179>
33. Pereira NAM, Lopes SMM, Lemos A, Pinho e Melo TMVD. On-Water Synthesis of Dipyrrromethanes via Bis-Hetero-Diels-Alder Reaction of Azo- and Nitrosoalkenes with Pyrrole. *Synlett* **2014**, 25, 423–427. DOI: 10.1055/s-0033-1340300
34. Grosso C, Cardoso AL, Rodrigues MJ, Marques C, Barreira L, Lemos A, Pinho e Melo TMVD. Hetero-Diels-Alder Approach to Bis(indolyl)methanes. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, 1122–1131. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.028>
35. Grosso C, Brigas A, de los Santos JM, Palacios F, Lemos A, Pinho e Melo TMVD. Natural deep eutectic solvents in the Hetero-Diels-Alder approach to bis(indolyl)methanes. *Monats. Chem.* **2019**, 150, 1275-1288. <https://doi.org/10.1007/s00706-019-02421-7>
36. Sukhorukov AY, Ioffe SL. Chemistry of Six-Membered Cyclic Oxime Ethers. Application in the Synthesis of Bioactive Compounds. *Chem. Rev.* **2011**, 118, 5004–5041. <https://doi.org/10.1021/cr100292w>
37. Lopes SMM, Cardoso AL, Lemos A, Pinho e Melo TMVD. Recent Advances in the Chemistry of Conjugated Nitrosoalkenes and Azoalkenes. *Chem. Rev.* **2018**, 118, 11324-11352. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00375>
38. Boyko YD, Dorokhov VS, Sukhorukov AY, Ioffe SL. Conjugated Nitrosoalkenes as Michael Acceptors in Carbon–Carbon Bond Forming Reactions: a Review and Perspective. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, 13, 2214–2234. Doi:10.3762/bjoc.13.220
39. Blond G, Gulea M, Mamane V. Recent Contributions to Hetero Diels-Alder Reactions. *Curr. Org. Chem.* **2016**, 20, 2161–2210. Doi: 10.2174/1385272820666160216000401
40. Tanimoto H, Yokoyama K, Mizutani Y, Shitaoka T.; Morimoto, T.; Nishiyama, Y.; Kakiuchi, K. Synthesis of α -Substituted Enoximes with Nucleophiles via Nitrosoallenes. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 559–574. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02364>
41. Belskaya NP, Eliseeva AI, Bakulev VA. Hydrazones as substrates for cycloaddition reactions. *Russ. Chem. Rev.* 2015, 84, 1226-1257. <http://dx.doi.org/10.1070/RCR4463>
42. Santos JMDL, Vicario J, Alonso C, Palacios F. β -Hydroxyimino Phosphorus Derivatives . An Efficient Tool in Organic Synthesis. *Curr. Org. Synth.* **2011**, 15, 1644-1660. Doi: 10.2174/138527211795378146
43. Lemos A. Cycloadditions of conjugated azoalkenes. Targets in Heterocyclic Systems–Chemistry and Properties. Attanasi, O. A., Spinelli, D., Eds.; *Chimica Italiana*: Rome, **2010**; Vol. 14, pp 1–18.

44. Attanasi OA, De Crescentini L, Favi G, Filippone P, Mantellini F, Perrulli FR, Santeusiano S. Cultivating the Passion to Build Heterocycles from 1,2-Diaza-1,3-dienes: the Force of Imagination. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3109–3127. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200900243>
45. Lemos A. Addition and Cycloaddition Reactions of Phosphinyl- and Phosphonyl-2H-Azirines, Nitrosoalkenes and Azoalkenes. *Molecules* **2009**, 14, 4098-4119. <https://doi.org/10.3390/molecules14104098>
46. Grosso C, Liber M, Brigas AF, Pinho TMVD. Regioselectivity in Hetero Diels – Alder Reactions. *J. Chem. Educ.* **2019**, 96, 148-152. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00933>
47. Fleming I. **2002**, *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*. Cheshire, U.K., John Wiley and Sons.

Anexos

Tabela 1. Atividade quelante (%) dos diferentes ligandos para o Ca^{2+} .

Composto	Concentração	% Atividade quelante (Ca^{2+})
NA 4.1	1 mM	38.50 ± 8.17
NA 5		39.88 ± 9.11
NA 6		39.61 ± 5.53
NA 7		45.86 ± 6.01
NA 8		32.92 ± 2.42
NA 9		42.60 ± 3.30
Controlo Positivo		84.04 ± 1.12

Tabela 2. Atividade quelante (%) dos diferentes ligandos para o Fe^{2+} .

Composto	Concentração	% Atividade quelante (Fe^{2+})
NA 4.1	1 mM	13.18 ± 3.51
NA 5		-3.42 ± 2.09
NA 6		-2.11 ± 1.75
NA 7		5.51 ± 0.34
NA 8		19.47 ± 8.16
Controlo positivo		94.60 ± 0.15

Tabela 3. Atividade quelante (%) dos diferentes ligandos para o Cu^{2+} .

Composto	Concentração	% Atividade quelante (Cu^{2+})
NA 4.1	1 mM	11.73 ± 2.16
NA 5		9.29 ± 3.76
NA 6		4.12 ± 1.28
NA 7		-14.49 ± 1.82
NA 8		32.79 ± 5.02
NA 9		-18.98 ± 5.38
Controlo positivo		34.83 ± 1.87

Tabela 4. Atividade antioxidante (%) dos diferentes ligandos para o ensaio com ABTS.

Composto	Concentração	% Atividade Antioxidante (ABTS)
NA 4.1	1 mM	37.28 ± 2.96
NA 5		28.78 ± 2.38
NA 6		9.01 ± 2.48
NA 7		34.79 ± 3.44
NA 8		62.91 ± 5.91
NA 9		82.15 ± 2.55
Controlo positivo		93.63 ± 0.23

Tabela 5. Atividade antioxidante (%) dos diferentes ligandos para o ensaio com DPPH.

Composto	Concentração	% Atividade Antioxidante (DPPH)
NA 4.1	1 mM	9.49 ± 3.10
NA 5		11.95 ± 1.05
NA 6		16.14 ± 0.81
NA 7		10.80 ± 0.87
NA 8		38.11 ± 0.92
NA 9		46.27 ± 1.46
Controlo positivo		91.52 ± 0.21