



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Síntese de ácidos e ésteres fosfónicos e avaliação
das suas propriedades antioxidante e
antimicrobiana**

Luís Manuel Rodrigues Muralhas

Orientação:

Prof. Doutor António Paulo Teixeira

Prof^ª. Doutora Maria do Rosário Martins

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2016



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Síntese de ácidos e ésteres fosfónicos e avaliação
das suas propriedades antioxidante e
antimicrobiana**

Luís Manuel Rodrigues Muralhas

Orientação:

Prof. Doutor António Paulo Teixeira

Prof^a. Doutora Maria do Rosário Martins

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2016

Agradecimentos

Agradeço à Prof^a. Doutora Rosário Martins pela disponibilidade e ajuda ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Doutor António Teixeira pela orientação, pela ajuda e pela disponibilidade fornecida ao longo deste trabalho.

À minha família por todo o apoio que me deram ao longo do curso.

Aos meus colegas e amigos, Andreia Santos, Diana Ferreira, Marina Costa e Lucília Mouquinho, por toda a amizade fornecida durante os anos de estudo.

Aos meus colegas de casa pelo companheirismo e apoio dado ao longo deste período.

À Mestre Andreia Piçarra pela disponibilidade, auxílio e amizade ao longo da realização deste trabalho.

À Técnica de Laboratório Anabela Cabeça por toda disponibilidade e ajuda prestada nesta etapa.

Às minhas colegas Maria Rouxinol e Marisa Guerreiro por todo o companheirismo, amizade, disponibilidade e compreensão.

Abreviaturas

AA- Ácido ascórbico

AAE- Equivalentes ácido ascórbico

Abs- Absorvância

ATCC -*American Type Cell Cultures*

BHT - Butil-hidroxitolueno

BHTE- Equivalentes de BHT

BP- Bisfosfonatos

CMB-Concentração mínima bactericida

CMI- Concentração mínima inibitória

COX-Ciclo-oxigenase

DMSO- Dimetilsulfóxido

DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

GABA-BP- alendronato de sódio

LFG – Laboratório Flaviano Gusmão

N-Bp- Bisfosfonatos contendo azoto

P[OSi(me)₃]₃]- Tris(trimetilsilil)fosfito

QE- Equivalentes de Quercetina

THF- Tetra-hidrofurano

T.E- Cloridrato de tetraciclina

Unidades

g-Grama

µg-Micrograma

mL-Mililitro

mg- Miligrama

Min- Minuto

Resumo

Síntese de ácidos e ésteres fosfônicos e avaliação das suas propriedades antioxidante e antimicrobiana

Neste trabalho, procedeu-se à síntese de ácidos e ésteres fosfônicos, bem como à avaliação de algumas das suas propriedades biológicas.

Foi possível sintetizar os ácidos fosfônicos LMA1, LMA2, LMA3 e LM12, os ésteres fosfônicos LMC2 e LMC7 e um composto com estes dois grupos funcionais (LM25).

Foram avaliadas as propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana dos compostos sintetizados, bem como de outros derivados fosfônicos que foram cedidos por membros do grupo de trabalho (AL1, F257, F294 e GABA-BP).

Os compostos em estudo apresentaram diferenças no potencial antioxidante, tendo sido o composto F257 o que apresentou maior capacidade antioxidante pelos métodos do radical DPPH e do β -caroteno/ácido linoleico.

Os derivados ácidos fosfônicos apresentaram elevado potencial anti-inflamatório, com valores de capacidade de inibição da desnaturação da albumina superiores a 90%, na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$.

Os derivados fosfônicos em estudo apresentaram também atividade antibacteriana, com capacidade de inibição do crescimento bacteriano de diferentes estirpes Gram-positivas e Gram-negativas.

Palavras chave: Ácidos fosfônicos, Ésteres fosfônicos, atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória, atividade antimicrobiana.

Abstract

Synthesis of phosphonic acid and esters and evaluation of their antioxidant and antimicrobial properties.

In this work, it was carried out the synthesis of phosphonic acids and esters as well as the evaluation of some of their biological properties.

It was possible to synthesize the phosphonic acids LMA1, LMA2, LMA3 and LM12, phosphonic esters and LMC2 LMC7 and a compound having these two functional groups (LM25).

Antioxidant properties, anti-inflammatory and antibacterial activity were evaluated for the synthesized compounds, as well as for other assigned phosphonic derivatives (AL1, F257, F294 and GABA-BP).

The compounds under study showed differences in antioxidant potential, and F257 compound showed higher antioxidant activity in the of DPPH and β -carotene/linoleic acid methods.

Phosphonic acid derivatives showed a high anti-inflammatory potential on the inhibition of albumin denaturation at the concentration of 125 μ g /mL, with inhibition values higher than 90%.

Phosphonic derivatives used in this study also showed antimicrobial potential, revealing ability to inhibit bacterial growth of diverse Gram-positive and Gram-negative strains.

Keywords: phosphonic acids, phosphonic esters, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, antimicrobial activity

Índice

1. Problemática.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. Introdução.....	5
3.1 Bisfosfonatos.....	5
3.2 Ação dos bisfosfonatos	6
3.3 Farmacocinética dos bisfosfonatos	8
3.4 Atividade antioxidante	12
3.3 Atividade anti-inflamatória.....	13
3.4 Atividade antibacteriana.....	14
4. Materiais e métodos.....	19
4.1 Síntese de ácidos e esteres fosfônicos	19
4.1.1 Síntese do ácido [(4-dimetilamino)fenil]hidroximetilfosfónico (LMA1)	19
4.1.2 Síntese do ácido (4-cianofenil)hidroximetilfosfónico (LMA2).....	20
4.1.3 Síntese do ácido [1,4-fenilenobis(hidroximetileno)]difosfónico (LMA3)	21
4.1.4 Síntese do ácido (4-formilfenil)(hidroxi)metil)difosfónico (LMA12)	22
4.1.5 Síntese do ácido (dimetoxifosforil)hidroxi(1-metil-1 <i>H</i> -indazol-3-il)fosfónico (LM25).....	23
4.2 Avaliação da atividade antioxidante	27
4.2.1 Método do radical DPPH.....	27
4.2.2 Método do β -caroteno/ácido linoléico.....	28
4.2.3 Método do poder redutor	30
4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	31
4.4.1 Método da inibição da desnaturação da albumina.....	31

4.4	Avaliação da atividade antibacteriana	31
4.4.1	Microrganismos em estudo.....	32
4.4.2	Preparação das suspensões microbianas	32
4.4.2.1	Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	33
4.4.2.2	Concentração Mínima Bactericida (CMB)	34
5.	Resultados e discussão.....	37
5.1	Síntese dos compostos fosfônicos.....	37
5.2	Avaliação da atividade antioxidante.....	41
5.2.1	Método do radical livre DPPH.....	41
5.2.2	Método do β -caroteno/ácido linoleico	46
5.2.3	Método do poder redutor	51
5.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	58
5.4	Avaliação da atividade antibacteriana.....	67
5.4.1	Concentração mínima inibitória	67
5.4.2	Concentração mínima bactericida	70
6.	Considerações finais.....	73
7.	Referências bibliográficas.....	75
8.	Anexos.....	85

Índice de figuras

Figura 1- Estrutura química do Bisfosfonato e pirofosfato (adaptado de (Zhang & Uludağ, 2007)).....	5
Figura 2- Via do mevalonato e locais de ação dos bisfosfonatos azotados (adaptado de (Stresing & Clézardin, 2007))	7
Figura 3- Representação da ligação entre os bisfosfonatos e o osso (adaptado de (Giger & Leroux, 2013)).....	9
Figura 4- Incorporação dos bisfosfonatos na matriz óssea e reabsorção dos bisfosfonatos por parte dos osteoclastos e a sua consequente apoptose (adaptado de (Ohba et al., 2014)	11
Figura 5- Vias de excreção do Bisfosfonatos (adaptado de Miller, 2011)	12
Figura 6- Mecanismos de ação de dois tipos de cicloxigenases, COX-1 e COX-2 (adaptado de (Ndoye Foe <i>et al.</i> , 2016)).....	14
Figura 7- Mecanismos de ação dos agentes antibacterianos (adaptado de (Barzic & Ioan, 2015)	16
Figura 8-Reação síntese do ácido [(4-dimetilamino)fenil]hidroximetilfosfónico (LMA1)	19
Figura 9-Estrutura do composto LMA1.....	20
Figura 10- Reação síntese do ácido (4-cianofenil)hidroximetilfosfónico (LMA2)	20
Figura 11- Estrutura do composto LMA2.....	21
Figura 12-Reação síntese do ácido [1,4-fenilenobis(hidroximetileno)]difosfónico (LMA3)	21
Figura 13-Estrutura do composto LMA3.....	22
Figura 14-Reação síntese do ácido (4-formilfenil)hidroxi)metil) difosfónico (LMA12)	22
Figura 15- Estrutura do composto LMA12.....	23
Figura 16-Reação síntese do ácido (dimetoxifosforil)hidroxi(1-metil-1H-indazol-3-il) fosfónico (LM25).....	23
Figura 17- Estrutura do composto LM25	24
Figura 18- Reação síntese do (4-cianofenil)hidroxi)metilfosfonato de dimetilo (LMC2)	25
Figura 19-Extrutura do LMC2.....	25
Figura 20- Reação síntese do (2,4-dinitrofenil)(hidroxi)metilfosfonato de dimetilo (LMC7)	26
Figura 21- Estrutura do composto LMC7	26
Figura 22- Reação entre o DPPH e a substância antioxidante, dadora de um átomo de hidrogénio.....	27
Figura 23- Reação de oxidação do ácido linoleico (Adaptado de Stenberg et al.,2005).	28
Figura 24- Reação de redução do Fe (III) a Fe (II) na presença de substâncias antioxidantes (Adaptado de Jayanthi & Lalitha, 2011).	30
Figura 25- Esquema geral da síntese dos ácidos fosfónicos	37
Figura 26-Reação síntese dos compostos LMA3 e LMA12	38

Figura 27- Estrutura do composto AL1	39
Figura 28- Esquema geral de síntese dos ésteres fosfônicos LMC2 e LMC7	39
Figura 29- Estruturas dos compostos F257 e F2594	40
Figura 30-Estrutura do composto GABA-BP-BP	41
Figura 31- Representação gráfica dos valores de inibição da oxidação (%) aos 60min para os compostos bisfosfonatos na concentração 1,3 mg/mL (A) e para os padrões na concentração de 1,3 µg/mL (B) Representação gráfica da percentagem de inibição da oxidação dos padrões para a concentração 1,3µg/mL aos 60min,para o método do radical de DPPH	42
Figura 32- Representação gráfica da variação da percentagem de inibição da oxidação do composto F257 aos 30min, 60min e 120min para o método do radical de DPPH	43
Figura 33- Representação gráfica da variação da percentagem de inibição da oxidação do composto f294 aos 30min, 60min e 120min para o método do radical de DPPH	44
Figura 34-Representação gráfica da variação da percentagem de inibição da oxidação do composto LMC7 aos 30min, 60min e 120min para o método do radical de DPPH	44
Figura 35- Representação gráfica da variação da percentagem de inibição da oxidação do composto AL1 aos 30min, 60min e 120min para o método do radical de DPPH	45
Figura 36- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β-caroteno/ácido linoleico para os compostos F294, GABA, AL1, LMC7 e F257 para a concentração de 1,3 mg/mL (A) e para os padrões (B) na concentração de 1,3 µg/mL.....	47
Figura 37- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β-caroteno/ácido linoleico para o composto GABA-BP	48
Figura 38- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β-caroteno/ácido linoleico para o composto F257	48
Figura 39- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β-caroteno/ácido linoleico para o composto F294	49
Figura 40- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β-caroteno/ácido linoleico para o composto AL1	50
Figura 41- Representação gráfica dos resultados do método do poder redutor para os compostos F294, F257 e Al1 para a concentração 0,3 mg/ml.....	51
Figura 42- Representação gráfica dos resultados do método do poder redutor para o composto F257.....	52
Figura 43- Representação gráfica dos resultados atividade antioxidante pelo método do poder redutor para o composto AL1.	52
Figura 44-Representação gráfica atividade antioxidante pelo método do poder redutor para o composto F294.	53
Figura 45- Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH expressa em equivalentes de ácido ascórbico (A), quercetina (B) e BHT (C).....	55

Figura 46- Avaliação da atividade antioxidante pelo método do caroteno/ácido linoleico expressa em equivalentes de ácido ascórbico (A), quercetina (B) e BHT (C).	56
Figura 47- Avaliação da atividade antioxidante dos compostos F257 e F294 pelo método do poder redutor expressa em equivalentes de ácido ascórbico (A), quercetina (B) e BHT (C).....	57
Figura 48- Valores de inibição da desnaturação da albumina (%) dos derivados fosfônicos na concentração de 1mg/mL (A), e do padrão ibuprofeno (0,125mg/mL).	58
Figura 49- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto F294.....	59
Figura 50- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto GABA-BP.	60
Figura 51- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto AL1.....	60
Figura 52- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMA1.....	61
Figura 53- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMA2.....	62
Figura 54- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMC2.....	63
Figura 55- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMA3.....	63
Figura 56- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMC7.....	64
Figura 57- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto F257	65
Figura 58- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LM25	65
Figura 59— Perfis de reação do padrão quercetina, pelo método do radical DPPH ..	85
Figura 60— Perfis de reação do padrão BHT, pelo método do radical DPPH.....	85
Figura 61- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do DPPH F257 aos 120min para o método do radical de DPPH	86
Figura 62- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do DPPH LMC7 aos 120min para o método do radical de DPPH	87
Figura 63— Curva de calibração do padrão Ácido ascórbico, pelo método do β -caroteno/ácido linoleico	87
Figura 64-Curva de calibração do padrão Quercetina, pelo método do β -caroteno/ácido linoleico.....	88
Figura 65—Curva de calibração do padrão BHT, pelo método do β -caroteno/ácido linoleico	88
Figura 66-Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β -caroteno/ácido linoleico para o composto F257	89
Figura 67-Curva de calibração do padrão BHT, pelo método do Poder redutor	89

Figura 68-Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do poder redutor para o composto F257	90
Figura 69-Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do poder redutor para o composto F294	90
Figura 70-Curva de calibração do padrão ácido ascorbico, pelo método do Poder redutor	91
Figura 71-Curva de calibração do padrão quercetina, pelo método do Poder redutor	91
Figura 72-Curva de calibração do padrão ibuprofeno pelo método da inibição da desnaturação da albumina	92
Figura 73- Curva de calibração do composto F294 para o método da inibição da desnaturação da albumina	92
Figura 74-Curva de calibração do composto LMA1 para o método da inibição da desnaturação da albumina	93

Índice de Quadros

Tabela 1- Tabela dos microrganismos em estudo na atividade antibacteriana	32
Tabela 2- Valores de IC ₃₀ e de IC ₅₀ obtidos para os compostos e para os padrões para o método do radical de DPPH	46
Tabela 3- Valores de IC ₅₀ e IC ₃₀ obtidos para os compostos e para os padrões para o método do β-caroteno/ácido linoleico	50
Tabela 4- Valores de IC ₅₀ e IC ₃₀ obtidos para os compostos e para os padrões para o método do poder redutor.....	53
Tabela 5- Valores de IC ₅₀ obtidos para os compostos e para os padrões para o método da inibição da desnaturação da albumina.....	66
Tabela 6- Tabela da concentração mínima inibitória dos compostos para as bactérias em estudo.....	69
Tabela 7- Tabela da concentração mínima bactericida dos compostos para as bactérias em estudo.....	71

1. Problemática

Estes compostos têm diversas aplicações terapêuticas, principalmente aplicações relacionadas com as doenças do metabolismo mineral do osso e têm sido também avaliados para a sua potencial utilização em outras aplicações terapêuticas, como por exemplo, no tratamento de certos tipos de doenças oncológicas.

Face à importância das suas cadeias laterais no estabelecimento da sua atividade biológica, a modificação da estrutura permite obter novos compostos com diferentes propriedades. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de novos estudos, de modo a observar como a alteração da estrutura das cadeias laterais poderá influenciar diversos tipos de propriedades destes mesmos compostos, como por exemplo propriedades antioxidantes, antibacterianas e o seu potencial anti-inflamatório.

Neste trabalho pretende-se preparar e caracterizar diversos ácidos e ésteres mono- e bisfosfônicos, contendo cadeias laterais hidrocarbo e hétero-aromáticas, e avaliar algumas das suas potenciais propriedades biológicas, designadamente as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como principal objetivo proceder à síntese de ácidos e ésteres fosfônicos, bem como avaliar das suas propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar ácidos e ésteres fosfônicos.
- Caracterizar espectroscopicamente dos compostos sintetizados.
- Determinar a concentração mínima inibitória de crescimento microbiano para os compostos sintetizados.
- Determinar a atividade antioxidante dos compostos fosfônicos através de três métodos com mecanismos de ação diferenciados, nomeadamente:
 - Método do radical DPPH,
 - Avaliação do poder redutor total,
 - Sistema β -caroteno/ácido linoleico.
- Avaliar o potencial anti-inflamatório dos compostos fosfônicos através da capacidade de inibição da desnaturação da albumina.

3.Introdução

3.1 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos são uma classe importante de compostos na farmacologia. Estes compostos são análogos do pirofosfato inorgânico (PPi) em que a ligação P-O-P foi substituída por uma ligação P-C-P não hidrolisável. Os bisfosfonatos fazem parte de um grupo de compostos que possuem dois grupos fosfonatos ligados ao mesmo átomo de carbono. A estrutura P-C-P permite uma maior estabilidade e uma maior variedade estrutural, devido a um número maior de variações de ligações, quer alterando duas cadeias laterais no carbono ou por esterificação dos grupos fosfatos (Russell, 2011)(Jaiman & Hafez, 2013).

Os bisfosfonatos têm duas cadeias laterais na sua estrutura. Estas são denominadas R1 e R2, respetivamente, e estão ligados ao átomo de carbono central (Figura 1). A presença destas cadeias laterais permite a introdução de numerosas substituições, e levou à síntese de um grande número de compostos com propriedades diferentes. Em geral, uma substituição hidroxilo em R1 aumenta a afinidade dos BPs para os cristais de cálcio, enquanto que a presença de um átomo de azoto em R2 aumenta a sua potência e determina o mecanismo de ação. (Galezowska & Gumienna-Kontecka, 2012)(Russell, 2011).

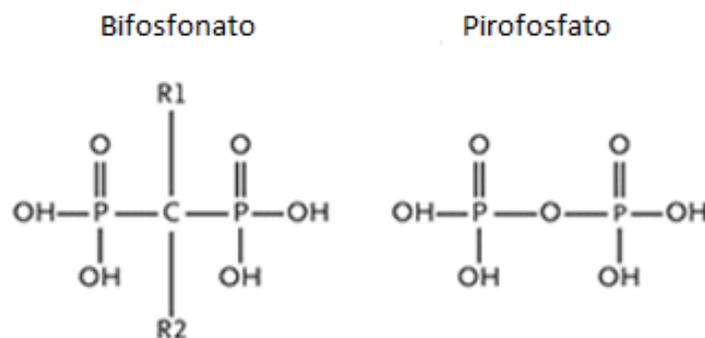


Figura 1- Estrutura química do bisfosfonato e pirofosfato (adaptado de (Zhang & Uludağ, 2007)

Os bisfosfonatos têm desempenhado um papel importante na terapia metabólica em doenças ósseas, tais como a doença de Paget, hipercalcemia e osteólise associada a tumores, devido à sua capacidade para inibir a perda óssea. Tal deve-se à sua capacidade de quelar iões Ca^{2+} (Papapoulos, 2008).

3.2 Ação dos bisfosfonatos

Estes compostos têm demonstrado atividade anticancerígena contra uma ampla variedade de células tumorais *in vitro*. A potência de vários bisfosfonatos contendo azoto (N-BPs) para inibir e aumentar a apoptose de células de cancro foi demonstrada em cancros da mama, da próstata, do ovário, da bexiga, no hepatoma, no osteossarcoma, na leucemia, no melanoma bem como em células de mieloma. O principal mecanismo através do qual os N-BPs induzem a apoptose parece ser através da via do mevalonato, inibindo a farnesilpirofosfatase (FPPase) (Figura 2). Os BPs promovem a dissolução de cristais de hidroxiapatite e a calcificação de tecidos, no entanto ao contrário dos seus análogos não são clivados pela pirofosfatase (Papapoulos, 2008)(Coleman & McCloskey, 2011).

A atividade biológica dos BPs depende em grande parte das propriedades quelantes do Ca^{2+} dos dois grupos presentes na sua estrutura. O cálcio é utilizado no organismo para a sinalização celular, este ião é sequestrado em organelos celulares e é utilizado para ativação das células.

A manutenção da concentração do gradiente do cálcio entre o citoplasma e os organelos é crucial para a sobrevivência de células homeostáticas o qual é regulado através de vários mecanismos. Um sinal de Ca^{2+} descontrolado pode alterar a secreção, a atividade da proteína, a apoptose e outros processos críticos para a sobrevivência da célula (Rogers, Crockett, Coxon, & Mönkkönen, 2011).

Existem vários tipos de bisfosfonatos, sendo que os bisfosfonatos contendo azoto (N-BP) são os mais usados no tratamento de doenças ósseas. Estes são várias vezes mais potentes na inibição da reabsorção óssea do que os BPs não azotados. Estes compostos atuam na via do mevalonato inibindo a enzima farnesil-difosfato-sintase (FPP sintase), esgotando assim os lípidos isoprenóides e

difosfatos geranylgeranilo, os quais são necessários para a prenilação de proteínas G, as quais incluem as GTPases tais como Ras e Rho (Rogers et al., 2011).

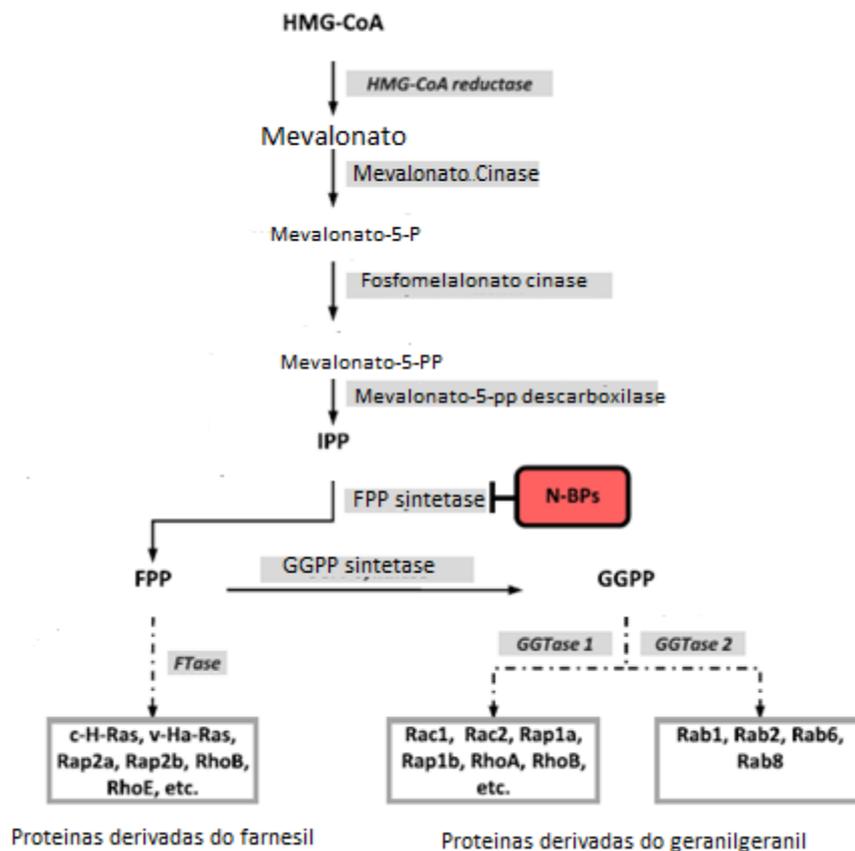


Figura 2- Via do mevalonato e locais de ação dos bisfosfonatos azotados (adaptado de (Stresing & Clézardin, 2007))

As prenilases são proteínas de sinalização que regulam uma grande variedade de processos celulares essenciais para a normal atividade e sobrevivência celular, tendo também um papel central em alguns tipos de cancro. Como inibidores de reabsorção óssea, os bisfosfonatos vão atuar ao nível destas proteínas, pelo que em anos recentes têm-se tornado o tratamento padrão para pacientes com doenças ósseas induzidas por cancro (Ohba et al., 2014)(Clézardin, Benzaid, & Croucher, 2011).

3.3 Farmacocinética e farmacodinâmica dos bisfosfonatos

A principal desvantagem dos bisfosfonatos que contêm azoto é a sua elevada hidrofília e polaridade, pelo que muitos bisfosfonatos apresentam pouca permeabilidade membranar para as células tumorais e outras células (Coleman & McCloskey, 2011).

A captação e ligação ao mineral ósseo é determinada pela presença dos grupos fosfônicos, enquanto os substituintes ligados a uma porção P-C-P são considerados essenciais para garantir a potência anti-absorvente satisfatória. Assim, pequenas alterações nos substituintes do radical P-C-P podem influenciar as propriedades de reabsorção (Soto & Chiappe Barbará, 2014)(Jaiman *et al.*, 2013).

Outra consequência da elevada hidrofília dos bisfosfonatos azotados é a sua estabilidade metabólica, pelo que estes compostos não são metabolizados pelo CYP450 ou enzimas do metabolismo de fase I, e são principalmente eliminados inalterados na urina. Por um lado, um extenso metabolismo de um fármaco pode pôr em risco a sua atividade farmacológica; por outro lado, quando os fármacos são substratos para os enzimas do CYP450, os efeitos farmacológicos e de toxicidade podem ser modulados por modificações sintéticas (Miller, 2011)(Ohba *et al.*, 2014).

Estes tipos de compostos fosfônicos podem apresentar por vezes efeitos adversos, uma vez que a quantidade administrada que é necessária para estes surtirem o efeito desejado é muito elevado. Os bisfosfonatos administrados por via oral podem ter efeitos adversos no trato gastrointestinal, tais como ulceração no esófago, estômago e duodeno. Também é possível observar casos extremos em que os efeitos adversos podem causar osteonecrose da mandíbula. Assim o melhoramento das propriedades farmacocinéticas pode ser considerado como uma estratégia terapêutica valiosa para obtenção de uma nova forma de fármacos mais seguros(Ebetino *et al.*, 2011)(Stresing *et al.*, 2007)(Galezowska & Gumienna-Kontecka, 2012).

Os bisfosfonatos são absorvidos pelo esqueleto, principalmente nos locais ativos de remodelação, e ligam-se fortemente ao cálcio. Estudos anteriores mostraram que a presença do grupo OH em R1 aumenta a ligação de bisfosfonatos para o mineral ósseo independentemente da estrutura de substituições em R2. Em contraste, os bisfosfonatos em que falta uma substituição em R1, ou compostos com outros grupos, tais como Cl ou H, que fornecem a ligação bidentada para cristais de cálcio, têm afinidades de ligação mais baixas (Figura 3) (Rogers *et al.*, 2011)(Clézardin *et al.*, 2011).

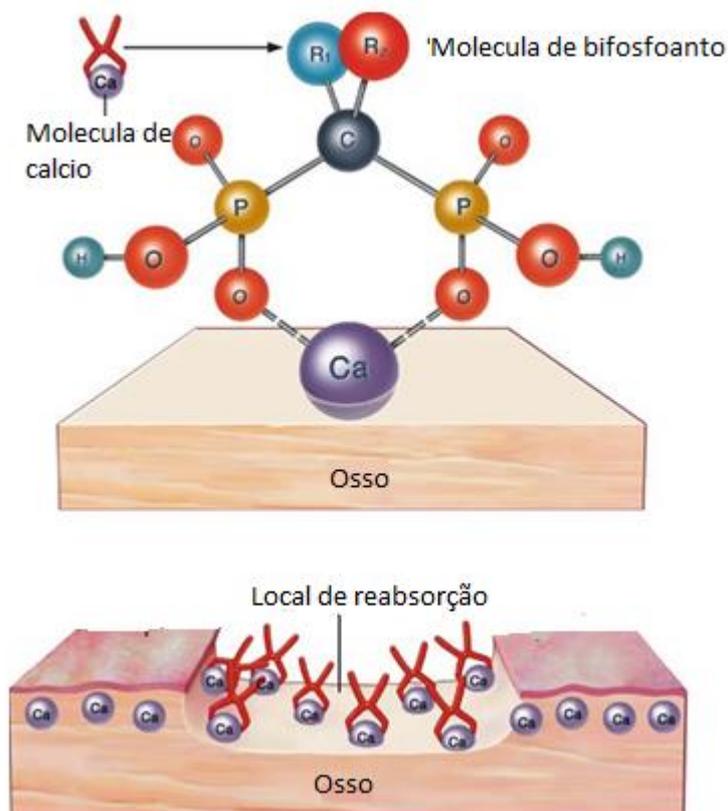


Figura 3- Representação da ligação entre os bisfosfonatos e o osso (adaptado de (Giger & Leroux, 2013))

Os bisfosfonatos são absorvidos preferencialmente pelo esqueleto e diminuem a reabsorção óssea dos osteoclastos. O esqueleto apresenta grande capacidade de reter bisfosfonatos e não parece existir indicação para a saturação dos locais de ligação usando as doses normalmente utilizadas no tratamento da osteoporose.

Devido à sua capacidade de inibirem a reabsorção óssea dos osteoclastos, estes compostos diminuem a velocidade de reabsorção e rotatividade, levando conseqüentemente ao aumento da densidade mineral dos ossos podendo levar a um aumento da redução de fraturas e a um melhoramento da estrutura óssea.

A quantidade de bisfosfonatos absorvidos pelo esqueleto depende da função renal, da taxa de remodelação óssea e da afinidade do bisfosfonatos para o osso mineral. A capacidade do esqueleto para reter bisfosfonatos é elevada, pois a dose utilizada no tratamento para doenças ósseas é demasiado baixa para saturar os locais de ligação ao esqueleto (Cremers & Papapoulos, 2011)(Papapoulos, 2008)

No que respeita a eliminação dos bisfosfonatos do corpo, o tempo de meia vida é drasticamente influenciado pela sua estrutura e pelo tipo de técnicas analíticas e farmacocinéticas utilizadas no estudo, pelo que este vai variar de bisfosfonatos para bisfosfonatos. Após a remodelação óssea, os bisfosfonatos incorporados no osso vão ser libertados a partir de cristais de hidroxapatite. O destino destes compostos libertados é incerto sendo desconhecido até que ponto estes bisfosfonatos libertados podem ser novamente ativos (Cremers & Papapoulos, 2011)(Papapoulos, 2008).

Estudos mostram que durante os primeiros meses do tratamento com bisfosfonatos ocorre um novo estado de equilíbrio entre a reabsorção óssea e a formação óssea e este equilíbrio leva ao aumento da mineralização primária.

O efeito farmacológico dos bisfosfonatos está relacionada com a sua ligação ao mineral ósseo e os seus efeitos bioquímicos sobre células, predominantemente osteoclastos. Os osteoclastos destroem os ossos por um processo chamado reabsorção óssea, depois da sua acumulação em tecidos ósseos, os bisfosfonatos são entregues por osteoclastos num mecanismo de libertação específico (Figura 4) (Cremers & Papapoulos, 2011)(Papapoulos, 2008).

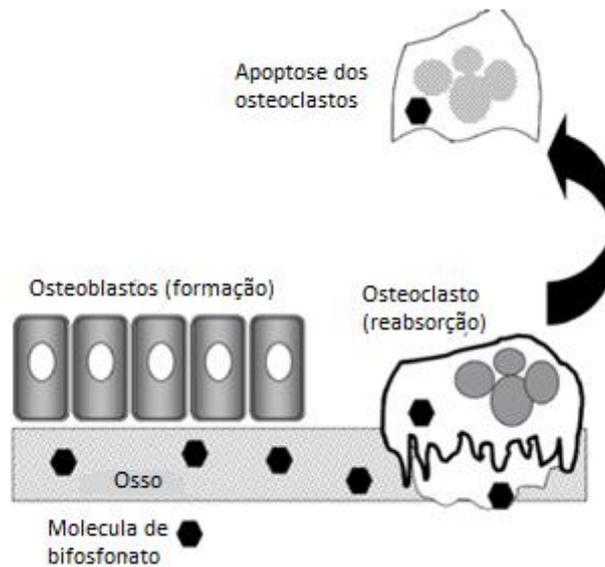


Figura 4- Incorporação dos bisfosfonatos na matriz óssea e reabsorção dos bisfosfonatos por parte dos osteoclastos e sua consequente apoptose (adaptado de (Ohba et al., 2014))

Os bisfosfonatos, apesar de serem absorvidos através do trato gastrointestinal, exibem uma biodisponibilidade oral média entre 1 a 3%, onde podem formar complexos que são menos suscetíveis de serem absorvidos (Miller, 2011).

Neste momento existem vários estudos que se focam sobre diferentes vias de administração com o intuito de melhorar a sua biodisponibilidade como por exemplo a via pulmonar, intranasal e transdérmica. Estas vias de administração ao serem implementadas em modelos animais mostraram que a biodisponibilidade aumenta exponencialmente, podendo chegar a ser vinte cinco vezes superior do que se fosse administrado oralmente. Apesar do uso destas vias cumprir o seu objetivo de aumentar a biodisponibilidade também pode ter efeitos colaterais tal como ao aumento da toxicidade local (Miller, 2011).

Estes compostos são eliminados em grande parte pelo rim sem sofrerem qualquer metabolização e em pequena parte pela biliar. Os bisfosfonatos são transportados passivamente através do fluxo sanguíneo até ao rim e o restante é distribuído para os ossos podendo se acumular ou ser libertado durante a

reabsorção óssea. A depuração renal de bisfosfonatos é conseguida pela filtração glomerular, bem como a excreção tubular ativa (Miller, 2011).

A excreção de bisfosfonatos administrados por via intravenosa é multifásica, ocorrendo primeiro uma eliminação rápida a partir do sangue, seguido de uma fase mais longa, com uma meia-vida de eliminação final de diversos dias (Miller, 2011).

Na Figura 5 apresentam-se as principais vias de excreção dos bisfosfonatos pelo organismo.

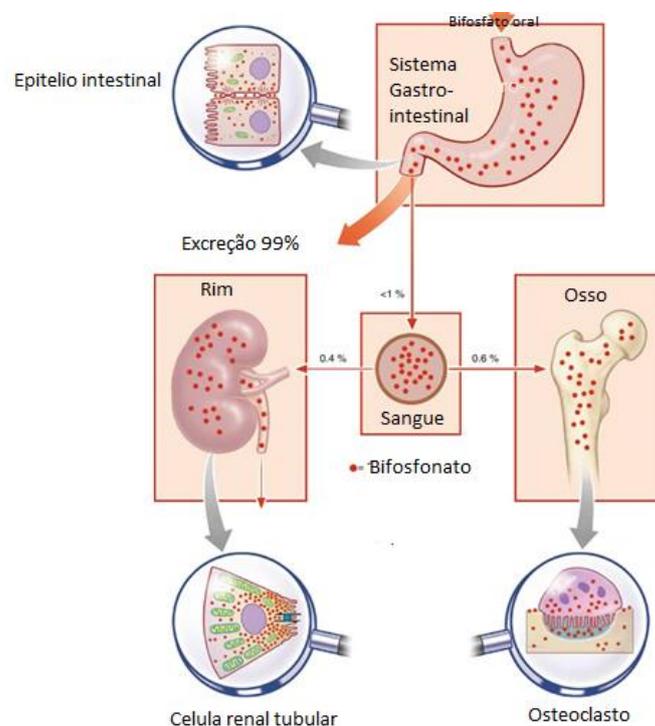


Figura 5- Principais vias de excreção do bisfosfonatos (adaptado de Miller, 2011)

3.4 Atividade antioxidante

Os antioxidantes podem ser divididos em antioxidantes primários e secundários, dependendo do seu mecanismo de ação. O primeiro reage com radicais de peróxido lipídico para convertê-los em produtos estáveis. Os antioxidantes secundários, tais como sequestradores de oxigénio, impedem a formação de radicais, pelo que podem diminuir o número de reações em cadeia que os oxidantes provocam (Sharma & Bhat, 2009)(Jiménez & Barroso, 2014).

A atividade antioxidante não deve ser determinada com base num único método, pelo que na prática são usados diversos *ensaios in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante de compostos (Dombrecht et al., 2004).

Um desses mecanismos, relacionado com a capacidade de sequestração de radicais livres, é avaliado pelo método radical de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), é um dos mais amplamente utilizados para a determinação da atividade antioxidante. Este método baseia-se numa avaliação do consumo do radical DPPH por um composto antioxidante (Sharma & Bhat, 2009; Dombrecht et al., 2004).

3.3 Atividade anti-inflamatória

A inflamação pode ser definida como uma reação do organismo a um estímulo nocivo, como por exemplo agentes patogénicos ou lesões. A inflamação pode ser considerada como um mecanismo do sistema imunitário inato, uma vez que esta é uma resposta não específica do organismo a uma agressão nos tecidos. A principal função da inflamação é a reparação dos tecidos e a eliminação da dor.

Após o estímulo nocivo nos tecidos ocorre um aumento da irrigação sanguínea, de seguida ocorre o aumento da produção de mediadores inflamatórios, que promovem o aumento da permeabilidade capilar. Após esses aumentos de permeabilidade vão ser atraídos até ao local de ação macrófagos e neutrófilos para realizarem a fagocitose do estímulo nocivo que provocou a inflamação (Govindappa, & Raghavendra, 2011)(Akinwunmi & Oyedapo, 2015).

A inflamação ocorre devido à libertação de mediadores inflamatórios, incluindo as prostaglandinas, as quais são sintetizadas pelos enzimas ciclooxigenases (COX). No combate à inflamação são utilizados mais frequentemente anti-inflamatórios não esteroides (AINES), os quais inibem as ciclooxigenases (COX1 e COX 2) impedindo a síntese de prostaglandinas (Figura 6).

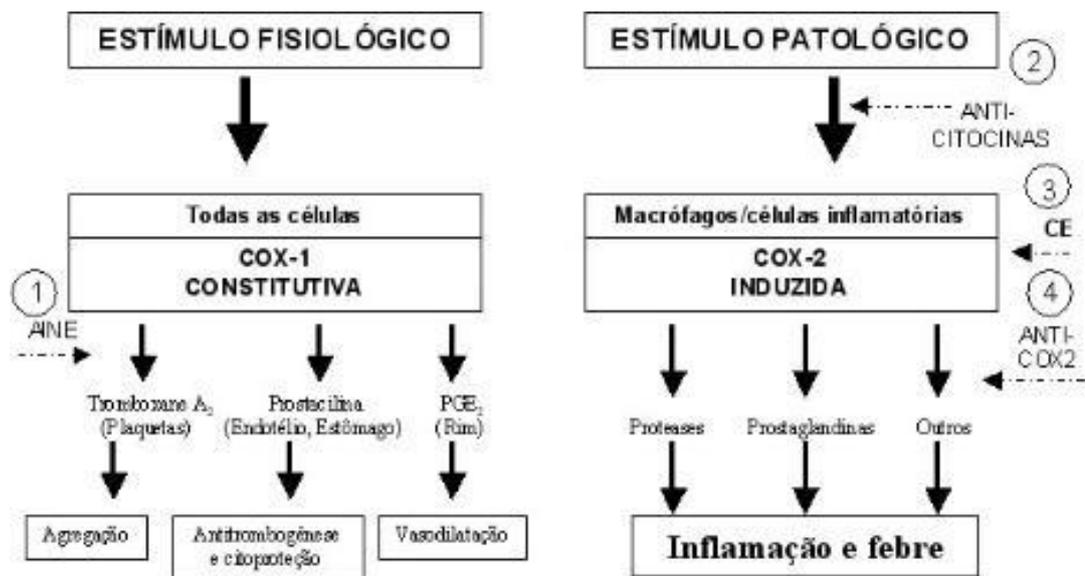


Figura 6- Mecanismos de ação de dois tipos de cicloxigenases, COX-1 e COX-2 (adaptado de (Ndoye Foe *et al.*, 2016))

Um dos métodos utilizados para a determinação da atividade anti-inflamatória é o método da inibição da desnaturação da albumina, o qual baseia-se na aplicação de calor para levar a albumina à desnaturação. A albumina é uma proteína intrínseca que constitui cerca de 70% das proteínas do plasma sanguíneo (Govindappa *et al.*, 2011). Esta desempenha muitas funções importantes no sangue, incluindo a manutenção da pressão osmótica, ligação e transporte de várias substâncias como hormonas e fármacos e neutralização de radicais livres. A desnaturação ocorre quando a proteína perde sua estrutura secundária ou terciária, ou seja, ocorre a perda da sua estrutura tridimensional, fazendo com que perca a sua atividade biológica. Assim, usando o calor como fonte de desnaturação da albumina, é possível determinar se o composto a analisar apresenta capacidade anti-inflamatória (Govindappa *et al.*, 2011)(Akinwunmi & Oyedapo, 2015).

3.4 Atividade antibacteriana

A utilização em excesso de antibióticos nos países desenvolvidos e em desenvolvimento tem levado a um aumento da resistência a fármacos por parte de microrganismos patogénicos. Com esta preocupação em mente, estes mesmos países têm vindo a desenvolver várias pesquisas direcionadas ao desenvolvimento

de novos agentes antimicrobianos, quer sejam provenientes de produtos naturais ou desenvolvidos sinteticamente. Um agente antibacteriano pode ser definido como uma substância com capacidade para eliminar as bactérias ou suprimir o seu crescimento, bem como a sua capacidade de reprodução. Estes agentes podem ser ou bactericidas, com capacidade para erradicar as estirpes bacterianas, ou bacteriostáticos, ou seja, impedem o desenvolvimento/multiplicação das estirpes. Existem vários mecanismos de atividade antibacteriana, através da inibição da síntese proteica, através da inibição da síntese da parede celular, através da alteração da permeabilidade ou através da inibição da síntese de ácidos nucleicos. No caso dos agentes que inibem a síntese da parede celular, estes apresentam capacidade para degradar o peptidoglicano, levando à sua lise celular.

Relativamente aos bactericidas que promovem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, estes libertam polimixinas, as quais rompem os fosfolípidios, alterando a característica normal da permeabilidade da membrana, deixando escapar substâncias essenciais das células, causando a sua morte celular. Este tipo de bactericida possui NH_3^+ e uma cadeia lateral de ácidos gordos. Os ácidos gordos, quando alcançam a membrana plasmática da bactéria, penetram na sua parte lipídica e permanecem na superfície. Essa intercalação de moléculas provoca a sua desorganização, resultando na saída dos componentes celulares e morte da bactéria.(Laminar, & Ap, n.d.)(Barzic & Ioan, 2015)

No que respeita aos bactericidas que inibem a síntese proteica ou inibem a síntese de ácidos nucleicos estes são específicos para cada tipo de bactericida pois a biossíntese de DNA, RNA e proteínas envolve um número de reações bioquímicas complexas, pelo que diferentes tipos de bactericida podem atuar em reações diferentes.

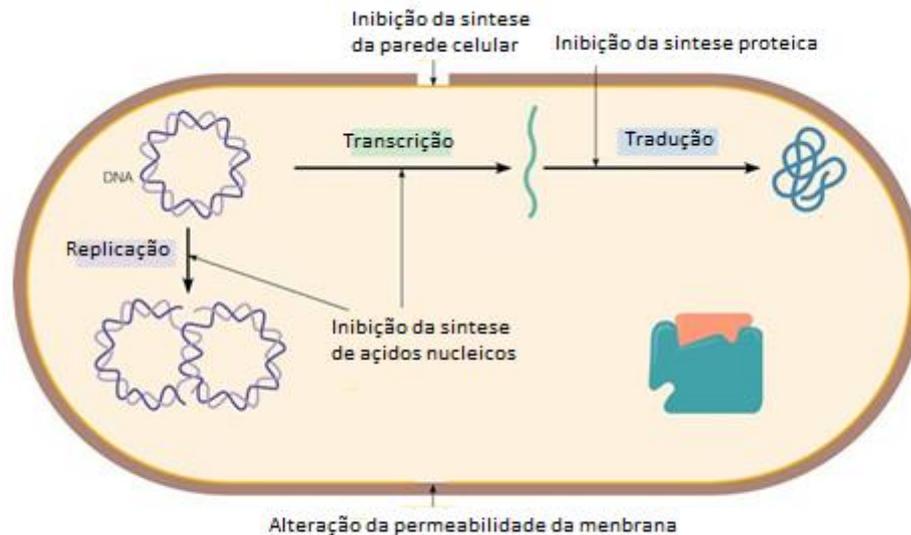


Figura 7- Mecanismos de ação dos agentes antibacterianos (adaptado de Barzic & Ioan, 2015)

Existem vários métodos de avaliação da atividade antibacteriana, sendo os mais utilizados o método de difusão em agar, com determinação dos halos de inibição de crescimento microbiano e os métodos em meio líquido (macrodiluição e microdiluição) para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).

A concentração mínima inibitória (CMI) pode ser definida como a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo

A concentração mínima bactericida (CMB) é a menor concentração de um agente antimicrobiano necessário para matar um determinado microrganismo. A CMB é complementar CMI, visto que em conjunto permitem avaliar a ação bacterisotática e bactericida de um determinado composto (Chen *et al.*, 2011, Barzic & Ioan, 2015).

A avaliação da CMI pode ser uma ferramenta boa e relativamente barata para classificar um grande número de agentes antimicrobianos por potência, para fins de rastreio. Uma das desvantagens deste método é a necessidade de ter que se determinar individualmente para cada microrganismo a sua suscetibilidade ao

agente antimicrobiano, pois provavelmente este terá valores diferentes para diferentes microrganismos.

O método do CMI é utilizado por laboratórios de diagnóstico, principalmente, para confirmar a resistência, mas mais frequentemente como uma ferramenta de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novos agentes antimicrobianos, e os dados a partir de tais estudos têm sido usadas para determinar os pontos de quebra do CMI (Chen *et al.*, 2011).

4. Materiais e métodos

4.1 Síntese de ácidos e ésteres fosfônicos

Na preparação dos diferentes compostos foram utilizados diversos reagentes adquiridos comercialmente, os quais foram utilizados tal como recebidos, sem qualquer tratamento ou purificação. Os solventes utilizados foram adquiridos comercialmente e utilizados sem qualquer purificação com exceção dos solventes secos, os quais foram tratados de acordo com os procedimentos habituais descritos na literatura (Armarego & Perrin, 2003).

O composto AL-1 e os compostos F257, F294 e GABA-BP foram gentilmente cedidos pela Dr.^a Andreia Vieira e pela Doutora Fátima Teixeira, respetivamente, e foram usados tal como recebidos.

Os compostos obtidos foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN) de protão (400 MHz), de carbono-13 (100 MHz) e de fósforo-31 (162 MHz) num espectrómetro Bruker Avance III HD. Os desvios químicos estão indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz). A multiplicidade dos sinais está indicada por s – singuleto, d – duplete, t – tripleto e m - multiplete. Na análise das amostras utilizou-se dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) ou clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solventes.

4.1.1 Síntese do ácido [(4-dimetilamino)fenil]hidroximetilfosfónico (LMA1)

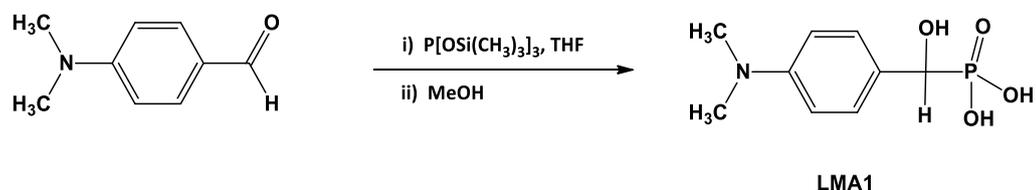


Figura 8- Síntese do ácido [(4-dimetilamino)fenil]hidroximetilfosfónico (LMA1)

A uma solução de 0,3023 g (2 mmol) de 2,4-dimetilaminobenzaldeído em 15 mL de tetra-hidrofurano (THF) foi adicionado 0,86 mL (1,3eq) de tris(trimetilsilil)fosfito ($P(OSiMe_3)_3$), com agitação e à temperatura ambiente, durante 3h. Em seguida, a solução foi levada à secura num evaporador rotativo. Ao sólido obtido foi adicionado 15 mL de metanol. A mistura foi mantida em agitação durante a noite. O sólido obtido foi lavado repetidamente com éter etílico até à obtenção de um composto sólido branco (0,0953 g, rendimento: 32%) que, por análise por RMN mostrou ser o composto pretendido (65%) e um outro composto que não foi possível identificar.

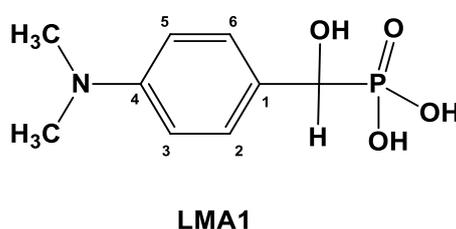


Figura 9-Estrutura do composto LMA1

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 2,86 (s, 6H, NCH_3), 4,53 (d, $J_{HP}=12,5$, CH), 6,67 (2H, ArH, H3,H5)^(a), 7,21 (2H, d, $J=7,0$, ArH, H2,H6) ^(a) – sinal parcialmente sob o sinal a 6,69 ppm do outro composto presente).

^{31}P NMR (162 MHz, $DMSO-d_6$): δ (ppm) = 16,06 (s).

4.1.2 Síntese do ácido (4-cianofenil)hidroximetilfosfónico (LMA2)

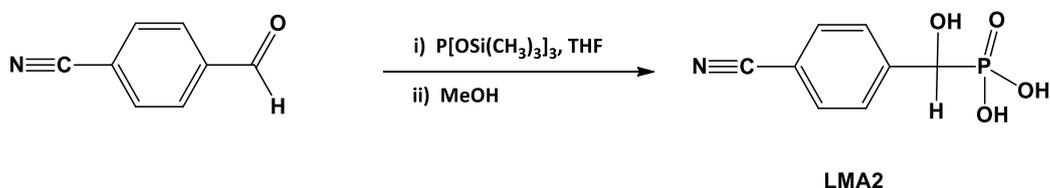
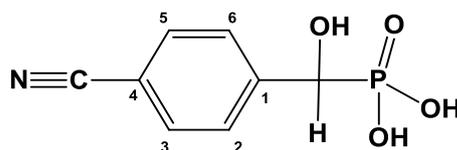


Figura 10- Síntese do ácido (4-cianofenil)hidroximetilfosfónico (LMA2)

A uma solução de 0,2618 g (2 mmol) de 4-cianobenzaldeído em 15 mL de tetra-hidrofurano (THF) foi adicionado 0,85 mL (1,3 eq) de tris(trimetilsilil)fosfito

(P(OSiMe₃)₃), com agitação e à temperatura ambiente, durante 3h. Em seguida, a solução foi levada à secura num evaporador rotativo. Ao sólido obtido foi adicionado 15 mL de metanol e a mistura foi mantida em agitação durante a noite. A purificação do composto foi realizada com a adição de éter etílico de forma repetida até obtermos um composto sólido branco (0,1860 g, rendimento: 71%) que por análise por RMN mostrou ser o composto pretendido.



LMA2

Figura 11- Estrutura do composto LMA2

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 3,43 (s 1, OH), 4,79 (1H, d, $J_{HP}=15,6$, CH), 7,57 (2H, dd, $J_{H2H6,H3H5}=8,3$, $J_{H2H6,CH}=1,9$, ArH, H2,H6), 7,77 (2H, d, $J_{H2H6,H3H5}=7,8$, ArH, H3,H5).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 70,28 (d, $J_{CP}=156,9$, CH₂), 109,55 (d, $J_{CP}=3,0$, C4), 119,32 (CN), 128,30 (d, $J_{CP}=4,9$, C2,C6), 131,63 (d, $J_{CP}=2,2$, C3,C5), 146,42 (C1).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 16,70 (s).

4.1.3 Síntese do ácido (4-formilfenil)(hidroxi)metilfosfónico (LMA12)

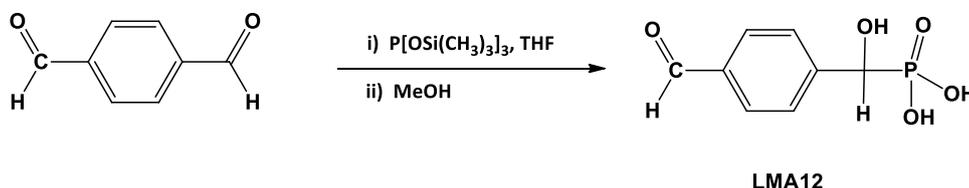


Figura 12- Síntese do ácido (4-formilfenil)(hidroxi)metilfosfónico (LMA12)

A uma solução de 0,3023 g (2 mmol) de tereftaldeído, em 15 mL de tetra-hidrofurano (THF) foi adicionado 0,86 mL (2,3 eq) de tris(trimetilsilil)fosfito (P(OSiMe₃)₃), com agitação e à temperatura ambiente, durante 3h. Em seguida, a

solução foi levada à secra num evaporador rotativo. Ao sólido obtido foi adicionado 15 mL de metanol e a mistura foi mantida em agitação durante a noite. A purificação do composto foi realizada com a adição de éter etílico de forma repetida até obtermos um composto sólido creme (0,1724 g, rendimento: 64%) que por análise por RMN mostrou ser o composto pretendido.

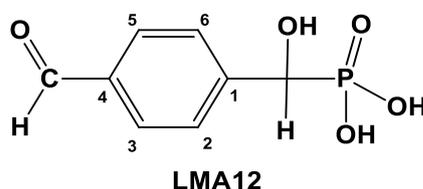


Figura 13-Estrutura do composto LMA12

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 4,80 (1H, d, $J_{\text{HP}}=15,7$, CH), 7,61 (2H, dd, $J_{\text{H}_2\text{H}_6, \text{H}_3\text{H}_5}=8,2$, $J_{\text{H}_2\text{H}_6, \text{CH}}=1,9$, ArH, H2,H6), 7,85 (2H, d, $J_{\text{H}_2\text{H}_6, \text{H}_3\text{H}_5}=8,0$, ArH, H3,H5), 9,98 (1H, s, CHO).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 70,56 (d, $J_{\text{CP}}=157,0$, CHOH), 128,07 (d, $J_{\text{CP}}=5,0$, C2,C6), 129,02 (d, $J_{\text{CP}}=2,1$, C3,C5), 135,18 (d, $J_{\text{CP}}=2,8$, C4), 147,62 (C1), 193,08 (CHO).

^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 17,01 (s).

4.1.4 Síntese do ácido [1,4-fenilenobis(hidroxi metileno)]difosfónico (LMA3)

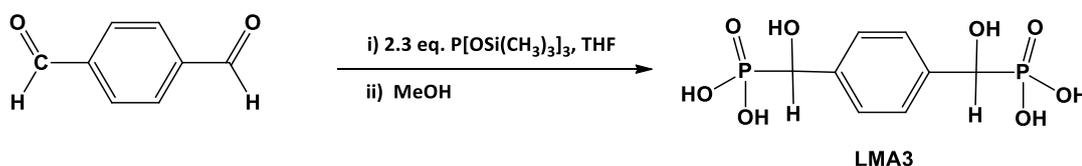


Figura 14- Síntese do ácido [1,4-fenilenobis(hidroxi metileno)]difosfónico (LMA3)

A uma solução de 0,1354 g (1 mmol) de tereftaldeído em 15 mL de tetra-hidrofurano (THF) foi adicionado 0,86 mL (2,6 mmol, 2,3 eq.) de tris(trimetilsilil)fosfito ($\text{P}(\text{OSiMe}_3)_3$), com agitação e à temperatura ambiente, durante 5h. Em seguida, a solução foi levada à secra num evaporador rotativo. Ao sólido obtido foi adicionado 15 mL de metanol e a mistura foi mantida em agitação

durante a noite. A purificação do composto foi realizada com a adição de éter etílico de forma repetida até obtermos um composto sólido branco (0,2106 g, rendimento: 64%) que por análise por RMN mostrou ser o composto pretendido, com 5% do composto LMA12.

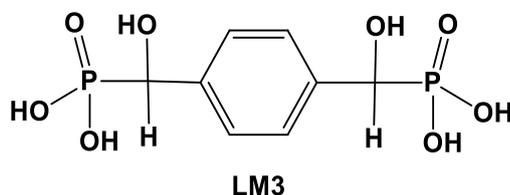


Figura 15- Estrutura do composto LMA3

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 4,64 (2H, d, $J_{\text{HP}}=12,2$, CH), 7,31 (4H, ArH).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 70,55 (dd, $J_{\text{CP}}=158,6$, $J_{\text{CH, ArH}}=6,0$, CHOH), 126,77 (ArCH), 138,74 (ArC_{ipso}).

^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 18,28 (s).

4.1.5 Síntese do ácido (dimetoxifosforil)hidroxi(1-metil-1H-indazol-3-il)fosfónico (LM25)

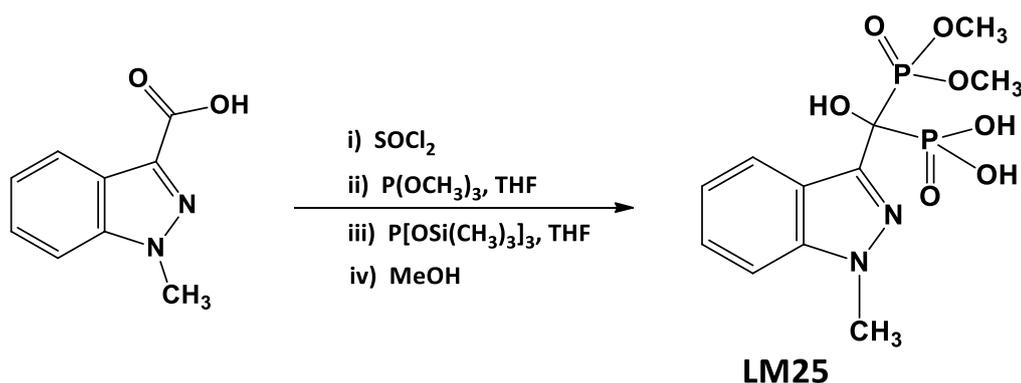


Figura 16- Síntese do ácido (dimetoxifosforil)hidroxi(1-metil-1H-indazol-3-il)fosfónico (LM25)

Dissolveu-se 0,2051 g de ácido 1-metil-1*H*-indazole-3-carboxílico em 5 mL de cloreto de tionilo (SOCl₂) e agitou-se, à temperatura de 70°C, durante 2h. Em seguida, levou-se a mistura à secura no evaporador rotativo. Ao resíduo foi adicionado 15 mL de tetra-hidrofurano (THF) e, após a dissolução do resíduo, adicionou-se 0,3 mL de trimetilfosfito e a solução foi deixada em agitação cerca de 1h, à temperatura 70°C, e depois foi levada à secura. O resíduo obtido foi dissolvido em THF e de seguida foi adicionado 0,8 mL de tris(trimetilsilil)fosfito, e a solução ficou em agitação, à temperatura 70°C durante 3h. Posteriormente foi adicionado 10 mL de metanol, e a solução foi deixada sob agitação magnética até formar precipitado. Para a obtenção do composto, o resíduo resultante foi lavado inicialmente com diclorometano e depois com éter etílico, até se obter 0,1202 g (rendimento: 60%) de um sólido creme, que por análise por RMN mostrou ser o composto LM25.

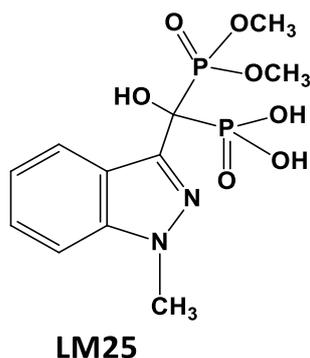


Figura 17- Estrutura do composto LM25

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 3,53 (3H, d, $J_{HP}=10,4$, POCH₃), 3,73 (3H, d, $J_{HP}=10,5$, POCH₃), 4,03 (3H, s, NCH₃), 7,06 (1H, t, $J=7,6$, ArH, H5), 7,35 (1H, t, $J=7,6$, ArH, H6), 7,54 (1H, d, $J=8,6$, ArH, H7), 8,25 (1H, d, $J=8,3$, ArH, H4).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 35,57 (NCH₃), 53,91 (d, $J_{CP}=6,9$, POCH₃), 54,25 (d, $J_{CP}=8,1$, POCH₃), 75,75 (t, $J_{CP}=151,5$, COHP₂), 109,17 (C7), 119,57 (C4), 121,27 (C3a), 125,12 (C5 ou C6), 126,14 (C6 ou C5), 139,70 (C7a), 141,58 (C3).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 11,75 (d, $J=33,2$, PO(OCH₃)₂), 19,01 (d, $J=33,3$, PO₃H₂).

4.1.6 Síntese de (4-cianofenil)(hidroxi)metilfosfonato de dimetilo (LMC2)

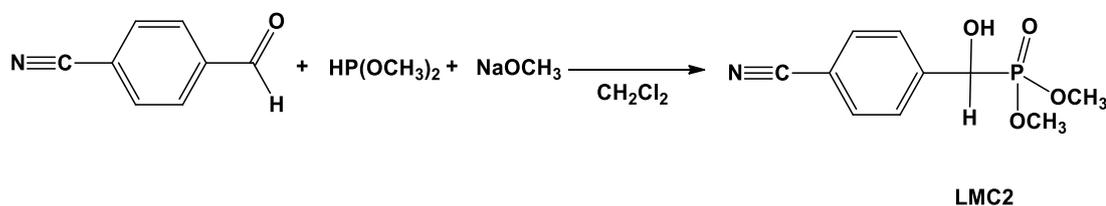


Figura 18- Síntese do (4-cianofenil)(hidroxi)metilfosfonato de dimetilo (LMC2)

A uma suspensão com 0,5788 g (10,7 mmol, 1,8 eq.) de metóxido de sódio em diclorometano seco, a -35 °C, adicionou-se 0,6 mL (1,1 eq.) de dimetilfosfito. Após 30 minutos em agitação, adicionou-se 0,6611 g de 4-cianobenzaldeído (6,00 mmol) e deixou-se a mistura em agitação durante 16 h. À mistura adicionou-se 20 mL de HCl 0,5 M e, após 15 min. em agitação, extraiu-se a solução com 3 x 40 mL de diclorometano. As fases orgânicas reunidas foram secas com sulfato de magnésio anidro e levadas à secura, tendo-se obtido um sólido branco. Este sólido foi lavado sucessivamente com hexano e éter etílico, tendo-se obtido 0,8672 g do composto LMC7 (3,596 mmol; rendimento: 60%).

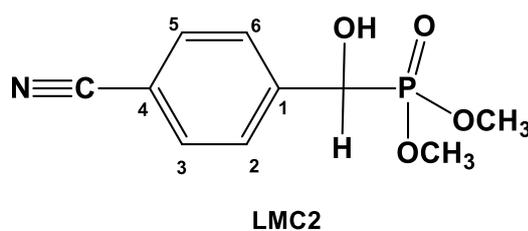


Figura 19- Estrutura do LMC2

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3,71 (3H, d, $J_{\text{HP}}=8,8$, POCH_3), 3,73 (3H, d, $J_{\text{HP}}=9,9$, POCH_3), 5,12 (1H, d, $J_{\text{HP}}=12,1$, CH), 7,59 (2H, d, $J=8,0$, ArH, H2,H6), 7,66 (2H, d, $J=8,0$, ArH, H3,H5).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 53,84 (d, $J_{\text{CP}}=7,5$, POCH_3), 54,21 (d, $J_{\text{CP}}=7,5$, POCH_3), 70,08 (d, $J_{\text{CP}}=158,1$, CHOH), 111,96 (C4), 118,57 (CN), 127,41 (d, $J_{\text{CP}}=5,3$, C2,C6), 132,13 (d, $J_{\text{CP}}=2,8$, C3,C5), 141,50 (d, $J_{\text{CP}}=2,7$, C1).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 21,97 (s).

4.1.7 Síntese de (2,4-dinitrofenil)(hidroxi)metilfosfonato de dimetilo (LMC7)

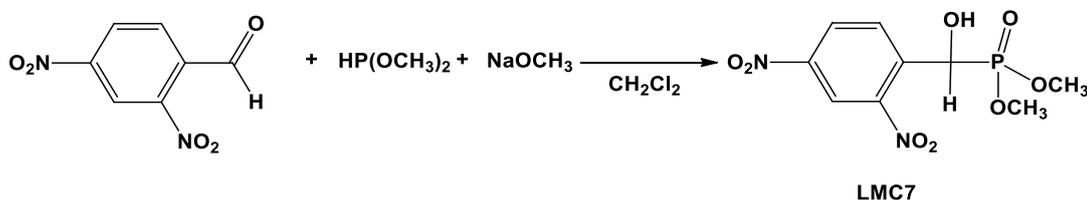


Figura 20- Síntese do (2,4-dinitrofenil)(hidroxi)metilfosfonato de dimetilo (LMC7)

A uma suspensão com 0,4995 g (9,2 mmol, 1,7 eq.) de metóxido de sódio em diclorometano seco, a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, adicionou-se 0,6 mL (1,15 eq.) de dimetilfosfito. Após 30 minutos em agitação, adicionou-se 1,0460 g de 2,4-dinitrobenzaldeído (5,35 mmol) e deixou-se a mistura em agitação durante 16 h. À mistura adicionou-se 18 mL de HCl 0,5 M e extraiu-se com 2 x 30 mL de acetato de etilo. As fases orgânicas reunidas foram secas com sulfato de magnésio anidro e levadas à secura, tendo-se obtido um sólido amarelo-claro. Este sólido foi lavado sucessivamente com hexano e éter etílico, tendo-se obtido 1,1092 g do composto LMC7 (3,625 mmol; rendimento: 68%).

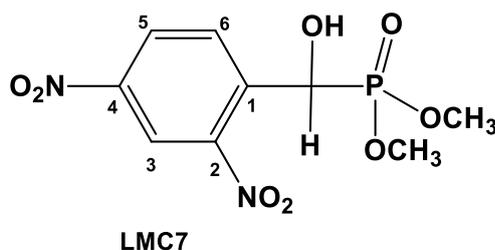


Figura 21- Estrutura do composto LMC7

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3,71 (3H, d, $J_{\text{HP}}=10,8$, POCH_3), 3,77 (s, l, OH), 3,81 (3H, d, $J_{\text{HP}}=10,5$, POCH_3), 6,40 (1H, d, $J_{\text{HP}}=15,1$, CH), 8,23 (1H, d, $J=8,7$, ArH, H6), 8,50 (1H, d, $J=8,7$, ArH, H5), 8,84 (1H, s, H3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 53,86 (d, $J_{\text{CP}}=7,6$, POCH_3), 55,18 (d, $J_{\text{CP}}=7,3$, POCH_3), 65,84 (d, $J_{\text{CP}}=160,1$, CH2), 120,22 (d, $J_{\text{CP}}=2,5$, C6), 127,37 (d,

$J_{CP}=3,0$, C5), 130,39 (d, $J_{CP}=4,4$, C3), 139,31 (d, $J_{CP}=2,0$, C1), 147,20 e 147,23 (C2 e C4).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 20,37 (s).

4.2 Avaliação da atividade antioxidante

4.2.1 Método do radical DPPH

O método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) permite avaliar a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados, pois permite detetar a captura do radical de DPPH por parte dos compostos. Neste método, o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), permite avaliar a atividade antioxidante de um radical estável (DPPH) espectrofotometricamente, de coloração roxa. Na presença de compostos com propriedades antioxidantes (Figura 22), estes compostos vão doar um átomo de hidrogénio ao átomo de azoto que possui um eletrão desemparelhado, sofrendo redução (Scherer *et al.*,2009).

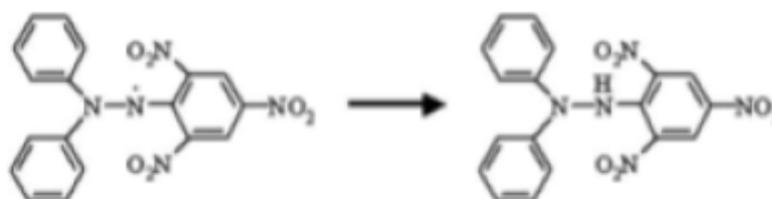


Figura 22- Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (adaptado de Endo et al, 2006)

Para a avaliação da atividade antioxidante em solução, preparou-se uma solução de DPPH 0,1mM por dissolução de 0,00394 g de DPPH em 100 mL de metanol. Neste método foram preparadas três curvas de calibração padrão de ácido ascórbico, BHT e quercetina. As soluções dos compostos foram preparadas em DMSO puro e os padrões dissolvidos em etanol absoluto (EtOH). O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, adicionando 200 μL de solução DPPH 0,1 mM a 30 μL de cada solução de amostra/padrão. As placas foram incubadas no

escuro e à temperatura ambiente. Após 30 minutos de incubação procedeu-se à leitura da absorvência a 490 nm. No estudo do ácido ascórbico foram estudadas concentrações entre 500-2 µg/mL, sendo as suas concentrações reais no ensaio de 65,2-0,3 µg/mL. Para o BHT as concentrações estudadas foram entre 200-6,25 µg/mL, sendo o seu valor real entre 26,089-0,815 µg/mL. As concentrações estudadas para a quercetina foram entre 200-3,13 µg/mL sendo o seu valor real no poço entre 26,089-0,408 µg/mL. As concentrações estudadas para os compostos neste método foram entre 20-0,08 mg/mL sendo o seu valor real no poço entre 2,61-0,01 mg/mL. O ensaio foi efetuado em sextuplicado.

A atividade antioxidante foi determinada com base na capacidade de inibição da oxidação (I%) recorrendo à seguinte expressão:

$$I (\%) = \frac{A_{490}(\text{branco}) - A_{490}(\text{amostra})}{A_{490}(\text{branco})} \times 100$$

4.2.2 Método do β-caroteno/ácido linoleico

Este método permite analisar a atividade oxidante dos compostos sintetizados. O β-caroteno sofre descoloração quando se encontra na presença de um radical linoleato. O ácido linoleico possui um grupo metileno bis-alílico ativo ao qual é removido um átomo de hidrogénio durante a sua oxidação, formando-se assim um radical pentadieno que ataca o β-caroteno insaturado para readquirir os átomos de hidrogénio (Burda & Oleszek, 2001; Amarowicz *et al.*, 2004).

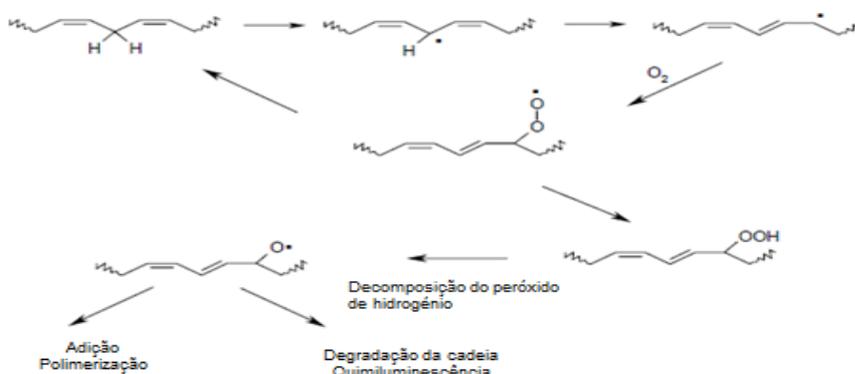


Figura 23- Reações de oxidação do ácido linoleico (adaptado de Stenberg *et al.*, 2005).

Para avaliar a atividade antioxidante, preparou-se uma solução *stock* de β -caroteno/ácido linoleico, dissolvendo-se 0,5 mg de β -caroteno num 1 mL de clorofórmio e adicionam-se 25 μ L de ácido linoleico e 200 mg de *Tween* 40. Procedeu-se à evaporação do clorofórmio em evaporador rotativo a pressão reduzida, a cerca de 40 °C. Após completa evaporação, adicionou-se ao resíduo aproximadamente 100 mL de água destilada previamente saturada em oxigénio (100 mL/min; 30 minutos) de modo a que a absorvância fique no intervalo 0,6-0,7 a 490 nm (Stendberg et al,2005).

A avaliação da atividade antioxidante foi efetuada em microplaca. Procedeu-se à avaliação da atividade antioxidante adicionando, a cada poço, 250 μ L de solução *stock* a 35 μ L de amostra/padrão, em sextuplicado. As placas foram agitadas e mediu-se a absorvância a 490 nm. Incubaram-se as placas na estufa a 50 °C durante 2 horas. Mediu-se novamente a absorvância a 490 nm. Preparou-se um branco, utilizando solvente em vez de amostra/padrão. Os compostos foram dissolvidos em DMSO e os padrões ácido ascórbico, quercetina e BHT em etanol absoluto. Para o estudo do ácido ascórbico, as concentrações utilizadas foram entre 32-0,25 μ g/mL sendo a concentração real no poço entre 3,930 e 0,031 μ g/mL. No que diz respeito a quercetina, os valores estudados foram entre 100-6,25 μ g/mL o qual corresponde a 12,281-0,768 μ g/mL. No que diz respeito ao estudo da inibição do BHT, as concentrações estudadas foram 100-0,78 μ g/mL sendo as correspondentes concentrações no poço 12,281-0,096 μ g/mL. Para os compostos em estudo as concentrações utilizadas foram entre 20-0,08 mg/mL, sendo a sua concentração no poço 2,61-0,01 mg/mL. O ensaio foi realizado em sextuplicado.

As amostras foram lidas (t_0) a 490 nm após a adição da solução *stock* de β -caroteno/ácido linoleico. Após incubação das amostras a 50°C, durante 2h, procedeu-se novamente à leitura da absorvância (t_1) a 490nm.

A atividade antioxidante, avaliada pela capacidade de inibição da oxidação (I%) foi determinada pela fórmula:

$$I (\%) = \frac{A_{490}(\text{branco}) - A_{490}(\text{amostra})}{A_{490}(\text{branco})} \times 100$$

4.2.3 Método do poder redutor

O método do poder redutor permite avaliar a capacidade antioxidante de compostos, de modo a que estes reduzam o Fe^{3+} (Dutta & Maharia.,2012).

Na Figura 24 apresenta-se um esquema do mecanismo observado na presença de espécies com potencial redutor, as quais reagem com o ferricianeto de potássio com formação de um complexo ferroso que têm o seu máximo de absorção a 700nm (Berker at al, 2007).



Figura 24- Reação de redução do $\text{Fe}(\text{III})$ a $\text{Fe}(\text{II})$ na presença de substâncias antioxidantes (adaptado de Berker at al, 2007).

Num microtubo de centrífuga adicionou-se 50 μL de DMSO, seguido de 200 μL de amostra, 200 μL de tampão fosfato 200 mM pH 6,6 e 200 μL ferricianeto de potássio(III) 1%, para os compostos fosfônicos. Para os padrões substituiu-se os 50 μL de DMSO por etanol, tendo o restante procedimento sido efetuado nas mesmas condições.

As amostras/padrões foram incubadas 20 minutos a 50°C , após os quais foram adicionados 200 μL de ácido tricloroacético 10% e centrifugadas posteriormente 10 minutos a 3000 rpm. Após centrifugação, numa microplaca são adicionados 100 μL de sobrenadante e 100 μL de cloreto de ferro(III). A absorvância foi lida a 700 nm (Ferreira *et al.*,2007). A avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor baseia-se na relação entre o aumento da absorvância e a presença de

coloração do complexo formado entre o verde e azul da prússia o qual é indicativo de um maior poder redutor. O valor da concentração capaz de Inibir cerca de 50% da oxidação (IC₅₀) de uma amostra corresponde a um valor de absorvância de 0,5 (Ferreira *et al.*,2007).

4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.4.1 Método da inibição da desnaturação da albumina

A inibição da desnaturação da albumina foi medida usando uma adaptação do método descrito por Karthik *et al.*, 2013.

Prepararam-se soluções dos compostos com concentrações compreendidas entre 6,25-200 mg/mL. Como padrão utilizou-se ibuprofeno com concentração compreendida entre 0,5-24 mg/mL.

Para avaliação da atividade anti-inflamatória, preparou-se uma solução de albumina de soro bovino 0,2% (BSA), a qual foi adicionada a *ependorfs* (1485 µL), seguidos da adição de 15 µL de amostra. Foram preparados dois brancos com DMSO para os compostos fosfônicos em estudo e para o padrão.

As amostras/padrão foram incubadas a 37°C durante 20 minutos, depois foram a desnaturar durante 30 minutos a 72°C. Após 10 minutos de incubação das amostras no gelo, adicionaram-se 150 µL das soluções, em sextuplicado, numa microplaca e a absorvância foi lida a 630nm.

A atividade anti-inflamatória, avaliada pela capacidade de inibição da desnaturação da albumina foi determinada recorrendo à seguinte expressão (Karthik *et al.*, 2013):

$$\text{Inibição da desnaturação (\%)} = \frac{A_{630}(\text{branco}) - A_{630}(\text{amostra})}{A_{630}(\text{branco})} \times 100$$

4.4 Avaliação da atividade antibacteriana

4.4.1 Microrganismos em estudo

Na tabela 1 apresentam-se os microrganismos utilizados neste estudo. Foram utilizadas estirpes bacterianas Gram+ e Gram- tipo, adquiridas à *American Type Colection Culture* (ATCC) e estirpes bacterianas isoladas clínicos cedidos pelo Laboratório Flaviano Gusmão (LFG), Lda, do grupo LABCO .

Tabela 1- Tabela dos microrganismos em estudo na atividade antibacteriana

Gram -	Gram +
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFG 1002 • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 • <i>Proteus mirabilis</i> LFG 1004 • <i>Salmonella enteritidis</i> LFG 1005 • <i>Salmonella typhimurium</i> LFG 1006 • <i>Morganella morganii</i> LFG 1008 • <i>Escherichia coli</i> LFG 1003 • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> LFG 1007 • <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 • <i>Enterococcus faecalis</i> LFG 1001 • <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 • <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228

4.4.2 Preparação das suspensões microbianas

A análise da atividade antimicrobiana das estirpes em estudo foi realizada através de suspensões das mesmas em soro fisiológico estéril (NaCl a 0,9%). Para as estirpes bacterianas. Assim, iniciou-se a preparação do inóculo, que consistiu na preparação deste recorrendo a zaragatoa, com a qual se raspou a rampa com o inóculo, embebendo-a posteriormente num tubo contendo 10 mL de soro fisiológico, de modo a obter uma solução com uma turbidez correspondente a 0,5 na escala de turbidimetria de *McFarland*. A concentração da suspensão foi monitorizada através da leitura da absorvância da suspensão a 630 nm, tendo esta

que apresentar valores entre 0,250-0,300. A manipulação de bactérias patogénicas foi realizada numa câmara de fluxo de ar laminar.

4.4.2.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

O estudo da concentração mínima inibitória (CMI) dos compostos fosfônicos corresponde à determinação da concentração mínima de cada composto em que não é verificado crescimento microbiano. Para a realização deste ensaio foram testadas diferentes concentrações dos compostos através de diluições sucessivas em meio líquido (Lang & Buchbauer, 2011).

Para a avaliação da concentração mínima inibitória foi utilizado meio *Mueller-Hinton Broth* (MHB). Os inóculos utilizados neste estudo têm uma concentração de 10^6 UFC/mL, sendo primeiramente preparados como descrito anteriormente. Posteriormente, é realizada uma diluição 1:100 em meio de cultura.

A determinação dos valores de CMI foi realizada em microplaca de 96 poços, sendo utilizada uma placa para cada composto. Foi também testado o valor CMI de cloridrato de tetraciclina partindo de uma solução de 4 mg/mL e realizando 11 diluições sucessivas 1:2, em meio de cultura, até à concentração de 1,95 µg/mL.

Durante a preparação das microplacas foi inicialmente colocado o composto (75 µL) e seguidamente o inóculo (75 µL). Deste modo, a concentração presente na placa é metade da solução previamente preparada. Para confirmar a veracidade dos resultados obtidos, utilizou-se dois controlos: controlo positivo e controlo negativo. O controlo positivo é composto por meio de cultura estéril (75 µL) com inóculo (75 µL). O controlo negativo é composto por meio de cultura estéril (75 µL) com meio de cultura suplementado com DMSO 10% (75 µL).

De modo a evitar possíveis contaminações, as placas foram vedadas com parafilme e colocadas na estufa a 37°C durante 16 horas.

Após o período de incubação, o crescimento microbiano foi avaliado com o auxílio de um sistema estereoscópico.

4.4.2.2 Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A concentração mínima bactericida (CMB) corresponde ao valor de concentração de solução de composto necessário para provocar a morte celular. Assim, este ensaio é realizado posteriormente ao ensaio CMI e apenas são testadas as concentrações de composto iguais ou superiores ao valor CMI obtido em cada estirpe microbiana.

A concentração mínima bactericida foi obtida por inoculação de placas de *Petri* com meio NA (agar nutriente) estéril, através da técnica de riscado. As placas são colocadas na estufa durante 24 horas a 37°C.

Após incubação foi avaliada a existência ou não de crescimento microbiano. O valor mínimo onde não se observou crescimento foi designado de CMB.

5. Resultados e discussão

5.1 Síntese dos compostos fosfônicos

O objetivo inicial deste trabalho foi a síntese de compostos com as funções ácido e éster fosfônicos, de modo a tentar avaliar a influência destes 2 grupos funcionais nas propriedades e atividades biológicas estudadas. Para além disso, a presença de outros grupos funcionais ligados ao anel aromático pode modificar estas atividades e pretende-se também tentar avaliar a sua influência nestes compostos.

Inicialmente, tentou sintetizar-se compostos com dois grupos ácido fosfónico geminais (1,1-bisfosfonatos) mas não foi possível efetuar a sua síntese ou concluir a sua purificação.

Assim, partindo de compostos com o grupo aldeído, com a adição de tris(trimetilsilil)fosfito, preparou-se os compostos LMA1, LMA2, LMA3 e LM12, por um procedimento similar ao descrito por S.O. Cherenok *et al.* (Figura 25).

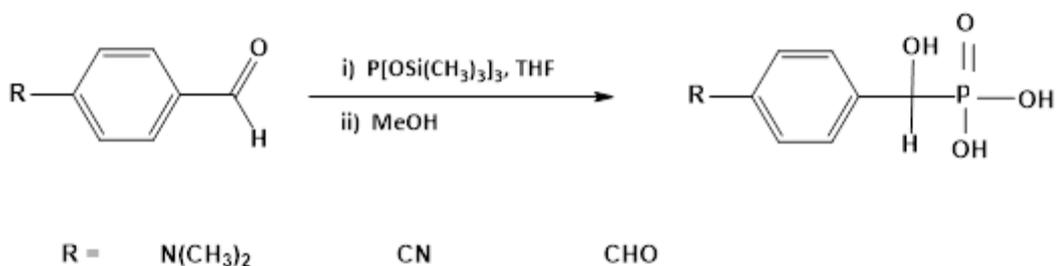


Figura 25- Esquema geral da síntese dos ácidos fosfônicos

A síntese do composto LMA1 (figura 8) foi efetuada a partir do 4-dimetilaminobenzaldeído tendo-se obtido o composto pretendido. No entanto, nesta síntese formou-se também outro composto maioritário cuja identificação estrutural ainda não foi possível concluir.

Como o rendimento da reação foi baixo, tentou melhorar-se o rendimento da reação efetuando novas sínteses. No entanto, não foi possível melhorar o rendimento ou purificar o composto.

Em seguida procedeu-se à síntese do derivado com um grupo nitrilo em condições similares. Neste caso, obteve-se o composto LMA2 (figura 10) com bom rendimento.

Seguindo o mesmo procedimento, foram preparados os ácidos fosfônicos derivados do tereftaldeído. Neste caso, como possui duas funções aldeído, fazendo-se variar o número de equivalentes de tris(trimetilsilil)fosfito, foi possível preparar os compostos com apenas um e com dois grupos ácido 1-hidroxifosfônicos (figura 26). No caso do composto LMA3, é possível observar-se a presença do composto LMA12, em cerca de 5%, quantidade de composto que não sofreu a segunda fosfonação.

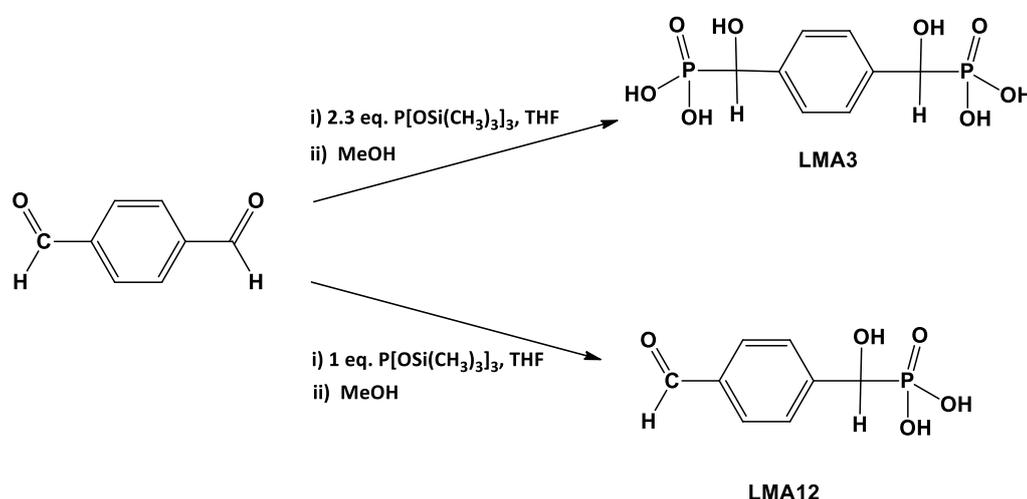


Figura 26-Síntese dos compostos LMA3 e LMA12

Analisando a estrutura dos compostos sintetizados pode observar-se que os compostos LMA1, LMA2, LMA3 e LM12 são ácidos 1-hidroxifosfônicos. O composto LMA3 difere dos outros dois compostos anteriormente referidos, pelo facto de possuir na sua estrutura dois grupos ácidos nas extremidades opostas (posições 1 e 4), sendo um bisfosfonato não geminal. Este é um bisfosfonato não azotado, pois não possuiu átomos de azoto na sua estrutura, diferente dos já utilizados na terapêutica atual. Esta ausência de azoto na sua estrutura deve afetar a sua atividade, pois os bisfosfonatos azotados apresentam atividades superiores no que respeita à afinidade ao osso.

Tentou efetuar-se a síntese de outros derivados com o ácido fosfónico mas não foi possível obtê-los ou purificá-los. Por isso, neste trabalho vai utilizar-se um outro ácido 1-hidroximetilfosfónico, com um átomo de bromo na posição 4 do anel aromático, cedido pela Dr.^a Andreia Vieira (figura 27).

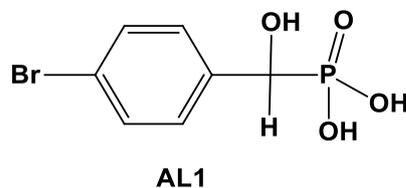


Figura 27- Estrutura do composto AL1

Em seguida, tentou sintetizar-se os derivados ésteres correspondentes. Assim, de acordo com o procedimento descrito por J.-P. Fu *et al.*, procedeu-se à síntese dos compostos LMC2 e LMC7 (Figura 28).

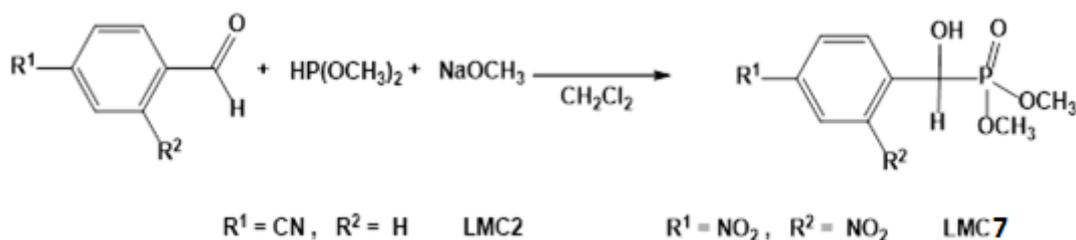


Figura 28- Esquema geral de síntese dos ésteres fosfônicos LMC2 e LMC7

O composto LMC2 foi preparado por reação do aldeído com o anião do dimetilfosfito, gerado *in situ* por reação deste com uma base forte, o metóxido de sódio, a $\approx -35^\circ\text{C}$ (Figura 18), tendo-se obtido o composto com um rendimento de 60%. O produto obtido é similar ao composto LMA2 mas apresenta um grupo éster fosfónico em vez do grupo ácido.

Foi ainda efetuada a síntese do composto LMC7, composto com estrutura similar mas com dois grupos nitro nas posições 2 e 4 do anel aromático (Figura 20). Este composto foi também obtido com bom rendimento (68%).

Foi tentada a redução dos grupos nitro deste composto de modo a obter os derivados correspondentes com os grupos amina mas a reação originou diversos produtos, não tendo sido possível isolar o composto pretendido.

Tentou-se efetuar a síntese de outros compostos similares, mas sem sucesso. Assim, para melhor poder comparar o efeito da estrutura dos compostos nas atividades biológicas estudadas, utilizou-se os compostos F257, F294, cedidos pela Doutora Fátima Teixeira (Figura 29). O composto F294 difere do composto LMC7 pois apresenta apenas um grupo nitro. O composto F257 difere do composto anterior pois apresenta o grupo nitro reduzido a amina.

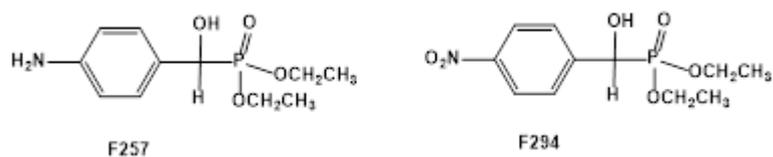


Figura 29- Estruturas dos compostos F257 e F2594

Por fim, tentou sintetizar-se compostos com grupos ácido e éster fosfônicos geminais. No entanto, a síntese destes compostos, tal como no caso dos ácidos bisfosfônicos, revelou-se extremamente difícil tendo-se obtido apenas o composto LM25, composto derivado do 1-metilindazole.

A síntese deste composto foi efetuada por um processo similar ao descrito por F. Teixeira *et al.*, pela adição de cloreto de tionilo ao ácido 1-metil-1H-indazole-3-carboxílico, seguida da adição de dimetilfosfito ao cloreto de ácido formado e posterior adição do tris(trimetilsilil)fosfito, seguido de metanólise (Figura 16).

O composto LM25 diferencia-se dos compostos anteriores pelo facto de possuir dois grupos, um ácido e um éster fosfônicos, ligados ao mesmo átomo de carbono (fosfonatos geminais), e também dois átomos de azoto, tornando-o um bisfosfonato azotado. Este composto, ao possuir estas duas características, não só terá uma estrutura mais estável como possivelmente apresentará uma maior atividade relativa ao metabolismo mineral do osso.

Para além destes compostos, vai ainda estudar-se a atividade do GABA-BP (alendronato de sódio) (figura 30), composto que é utilizado na terapêutica de patologias associadas ao osso, como a osteoporose.

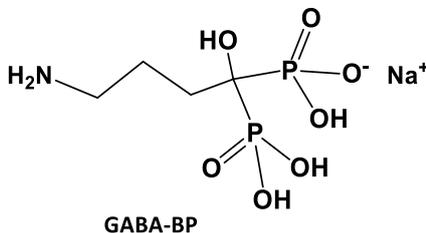


Figura 30-Estrutura do composto GABA-BP

5.2 Avaliação da atividade antioxidante

5.2.1 Método do radical livre DPPH

A avaliação das propriedades antioxidantes dos fosfonatos foi avaliada pelo método do radical livre DPPH, método do β -caroteno/ácido linoleico e método do poder redutor, com vista a avaliar o mecanismo de atividade antioxidante preferencial dos compostos em estudo.

Na Figura 31, encontram-se apresentados os valores da percentagem de inibição da oxidação obtidos para os compostos F257, F294, LMC7, AL1, GABA (Figura 31 A), e para os padrões quercetina, BHT e ácido ascórbico (Figura 31B), pelo método do radical DPPH.

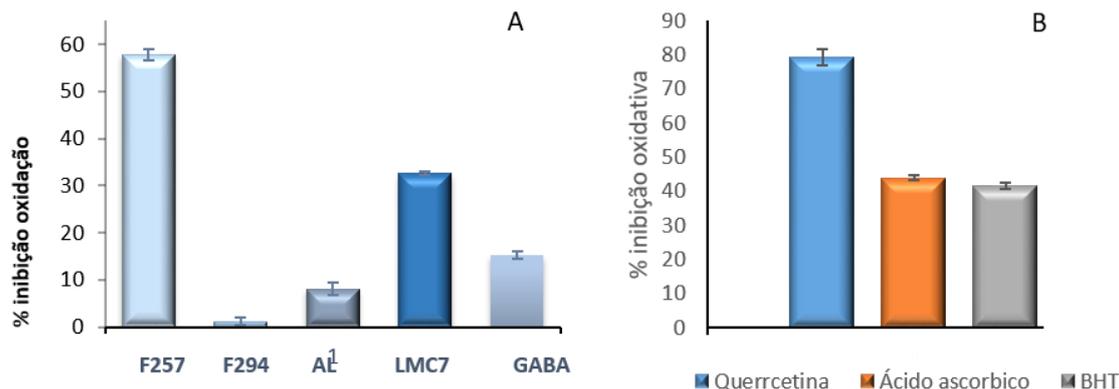


Figura 31- Representação gráfica dos valores de inibição da oxidação (%) pelo método do radical DPPH, aos 60 min., para os fosfonatos na concentração $1,3 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$ (A) e para os padrões na concentração de $1,3 \mu\text{g/mL}$ (B).

Os compostos fosfônicos analisados apresentaram baixa atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH, comparativamente com os padrões (Figura 31), com valores de percentagem de inibição da oxidação compreendido entre os 1% e os 58%. Os compostos que apresentaram maior potencial para atuar como sequestradores de radicais livres, foram os ésteres F257 e LMC7.

O estudo da avaliação das propriedades antioxidantes dos compostos bisfosfonato pelo método do radical DPPH mostrou um comportamento cinético, com o aumento das absorvâncias com o tempo de incubação (30, 60 e 120 min). Na Figura 32 estão apresentados os resultados e inibição da oxidação (%) do composto F257 aos 30min, 60min e 120min. Observou-se um aumento da atividade antioxidante, proporcional ao aumento da concentração de composto (Figura 32). A percentagem de inibição da oxidação aumentou também ao longo do tempo, observando-se um comportamento linear e cinético, nos três tempos de leitura, entre 0,16 e 2,6 mg/mL. Na concentração mais elevada, 2,6 mg/ml, a atividade antioxidante aumentou de 62,5 para 68% quando determinada aos 30 min e aos 120 min, respetivamente.

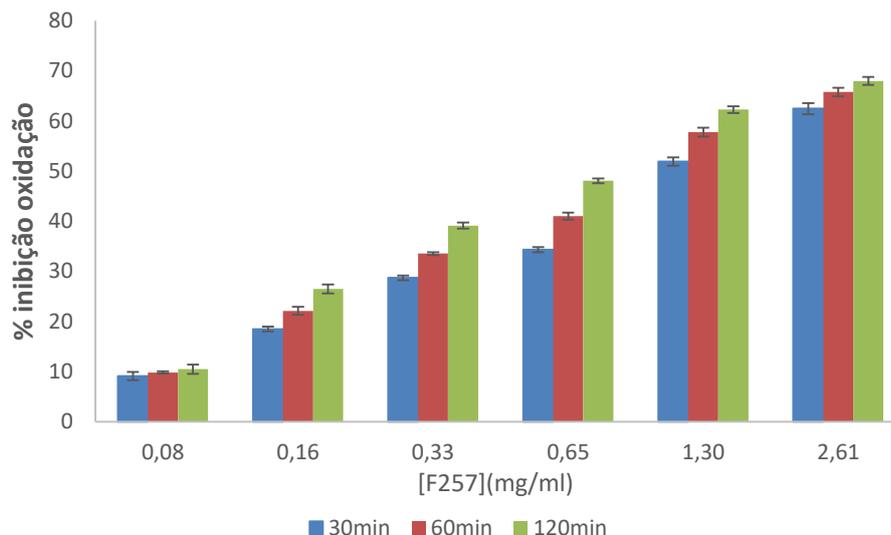


Figura 32- Representação gráfica da variação da porcentagem de inibição da oxidação do composto F257 aos 30 min, 60 min e 120 min para o método do radical DPPH.

Na Figura 33, estão apresentados os resultados obtidos para a porcentagem de inibição da oxidação do composto F294 aos 30min, 60min e 120min. Este composto apresentou um comportamento completamente diferente do composto F257, não apresentando atividade proporcional à concentração. A porcentagem de inibição da oxidação nas concentrações entre 0,08 e 1,30 foi muito baixa, tendo-se observado valores de porcentagem de inibição de oxidação próximo de 1% para concentrações entre 0,08 e 1,30 mg/mL. No entanto, na concentração de 2,61 mg/mL, o composto apresentou atividade antioxidante com valores de porcentagem de inibição da oxidação próximo de 90%, independentemente do tempo de incubação.

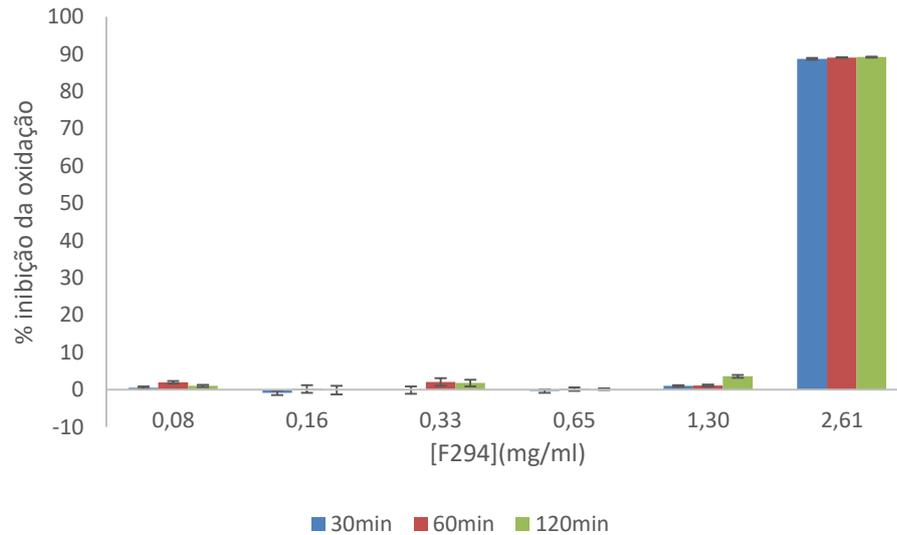


Figura 33- Representação gráfica da variação da percentagem de inibição da oxidação do composto F294 aos 30 min, 60 min e 120 min para o método do radical DPPH.

Na Figura 34, estão apresentados os valores obtidos de percentagem de inibição da oxidação para o composto LMC7.

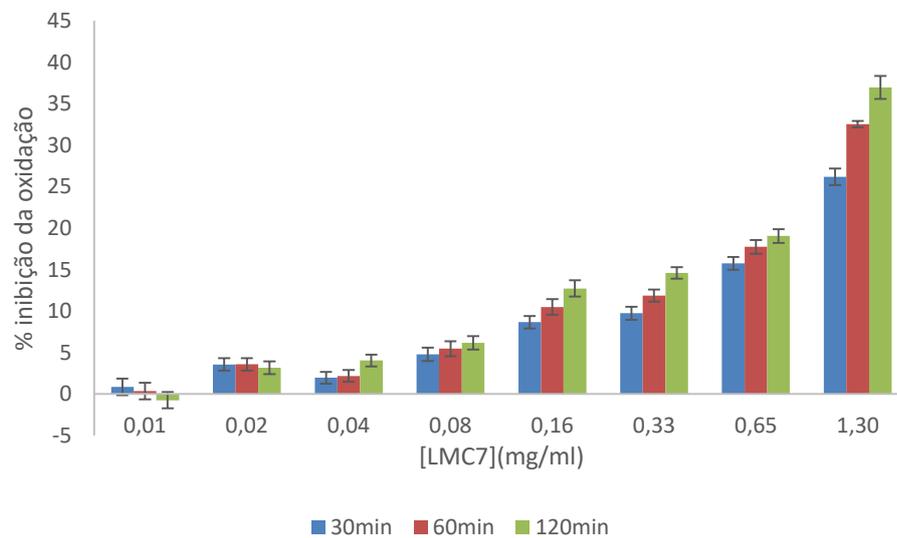


Figura 34- Representação gráfica da variação da percentagem de inibição da oxidação do composto LMC7 aos 30 min, 60 min e 120 min para o método do radical DPPH.

Para o composto LMC7, no que diz respeito a variação da percentagem de inibição da oxidação aos 30 min, 60 min e 120 min, observou-se um aumento da atividade antioxidante, proporcional ao aumento da concentração, exceto nas concentrações mais baixas. No entanto, apesar de se obter um aumento da atividade antioxidante à medida que se aumentou a concentração de composto, não foi possível o cálculo do valor de IC_{50} pois a atividade deste atingiu um máximo de 37% de inibição da oxidação aos 120 min na concentração máxima testada (1,30 mg/mL).

O composto AL1 (Figura 35) apresentou um perfil de atividade antioxidante semelhante ao observado para o composto F294, com valores de atividade antioxidante muito baixos para as concentrações entre 0,08 e 1,30 mg/mL, observando-se uma percentagem de inibição da oxidação entre 1,5% e 9% e um valor de atividade antioxidante próximo de 90% para a concentração de 2,6 mg/mL. No entanto, observou-se um comportamento cinético para as diferentes concentrações testadas, com valores de atividade superiores aos 120min, comparativamente com os obtidos aos 30 e 60 minutos de incubação.

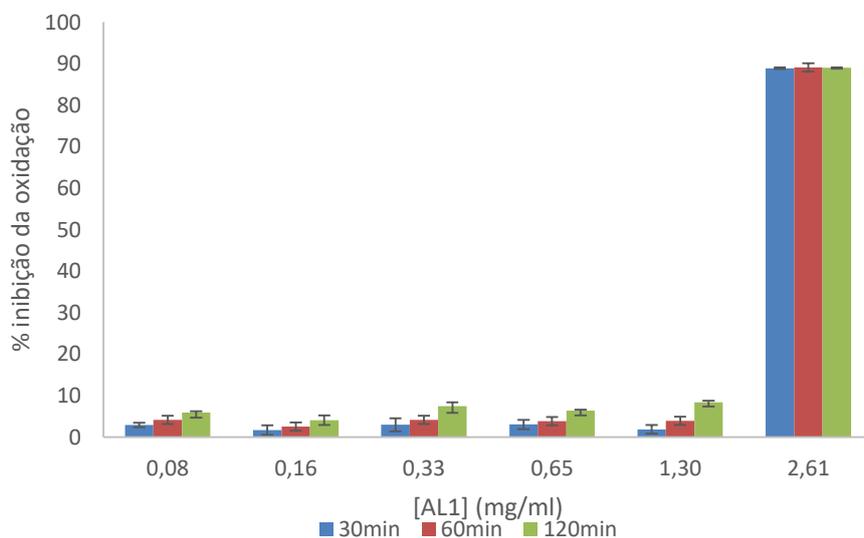


Figura 35- Representação gráfica da variação da percentagem de inibição da oxidação do composto AL1 aos 30 min, 60 min e 120 min para o método do radical DPPH.

Tendo em conta as variações de atividade antioxidante em função do tempo e dos compostos em estudo, optou-se por calcular os valores de concentração necessários para obter 30 e 50% de inibição de oxidação (IC₃₀ e IC₅₀, respetivamente) aos 60 min., para os compostos que apresentaram proporcionalidade entre a atividade e a concentração testada. Na tabela 2 apresentam-se valores de IC₃₀ e de IC₅₀ obtidos para os compostos e para os padrões para o método da redução do radical DPPH.

Tabela 2- Valores de IC₃₀ e de IC₅₀ obtidos para os compostos e para os padrões para o método do radical DPPH.

Composto/padrão	IC ₃₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
F257	275,8	944,5
LMC7	1035	-
Acido ascórbico	2,92	9,3
Quercetina	2,1	4,71
BHT	0,17	24,66

Os compostos em estudo apresentaram baixa capacidade para sequestrar os radicais livres nas concentrações testadas, tendo sido o composto F257 o que apresentou maior potencial antioxidante por este método, com o valor de IC₅₀ de 944,5 µg/mL, no entanto, muito inferior aos obtidos para os padrões testados, para os quais se obtiveram valores de IC₅₀ compreendidos entre 4-25 µg/mL.

5.2.2 Método do β-caroteno/ácido linoleico

Os valores da percentagem de inibição da oxidação atividade antioxidante pelo método do β-caroteno/ ácido linoleico estão apresentados na Figura 36 para a concentração 1,3 mg/mL de composto.

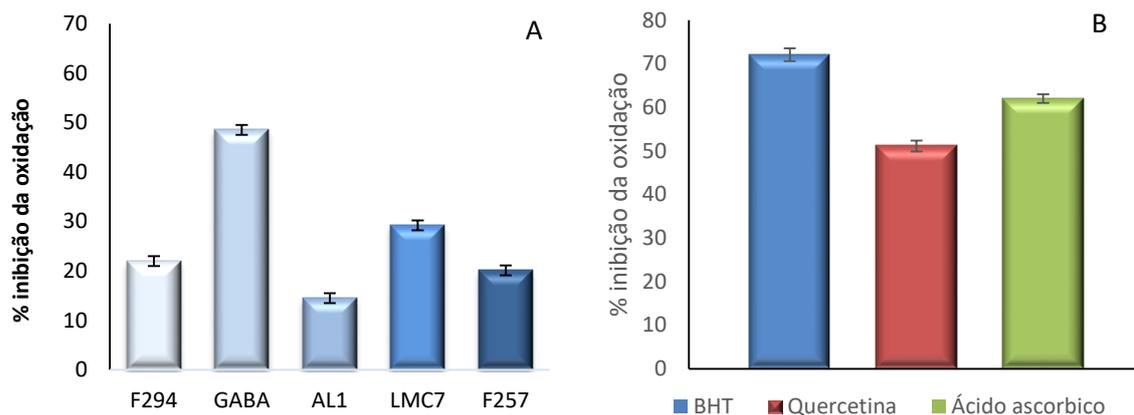


Figura 36- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β -caroteno/ácido linoleico para os compostos F294, GABA-BP, AL1, LMC7 e F257 para a concentração de 1,3 mg/mL (A) e para os padrões (B) na concentração de 1,3 μ g/mL.

Os compostos em estudo apresentaram baixo potencial de atividade antioxidante para proteção do substrato lipídico. Os compostos que apresentaram maior atividade antioxidante, foram os compostos LMC7 e GABA-BP, com valores de percentagem de inibição da oxidação de 29 e 49%, respetivamente. O composto AL1 apresentou menor atividade, com um valor de percentagem de inibição da oxidação de 14,5%. Os 3 compostos padrão testados apresentaram elevado potencial de atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

Os resultados da atividade antioxidante para as diferentes concentrações do composto GABA-BP estão apresentados na Figura 37. Este composto apresentou valores de atividade antioxidante superiores a 40%, mesmo em baixas concentrações, no entanto não se observou uma variação linear da atividade antioxidante com o aumento da concentração.

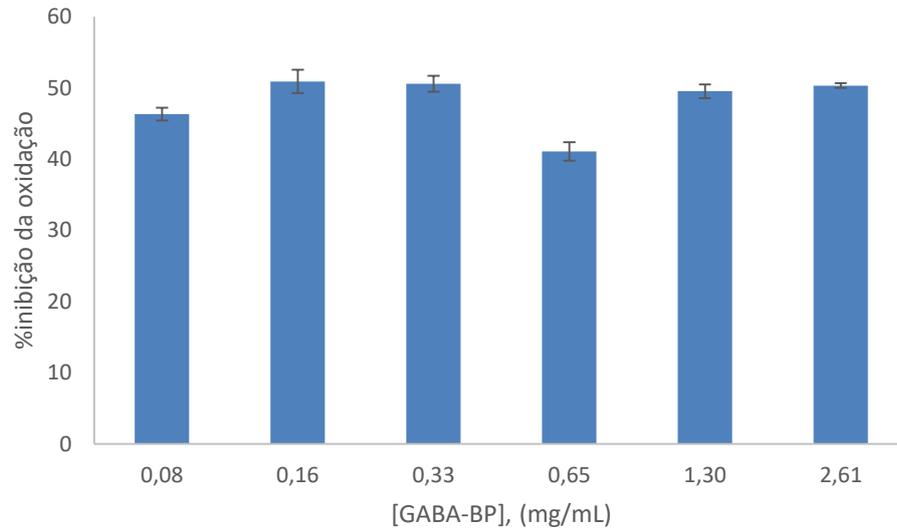


Figura 37- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β -caroteno/ácido linoleico para o composto GABA-BP

O composto F257 também apresentou potencial antioxidante por este método, no entanto, observa-se uma fraca linearidade entre a concentração e o aumento da atividade antioxidante (Figura 38).

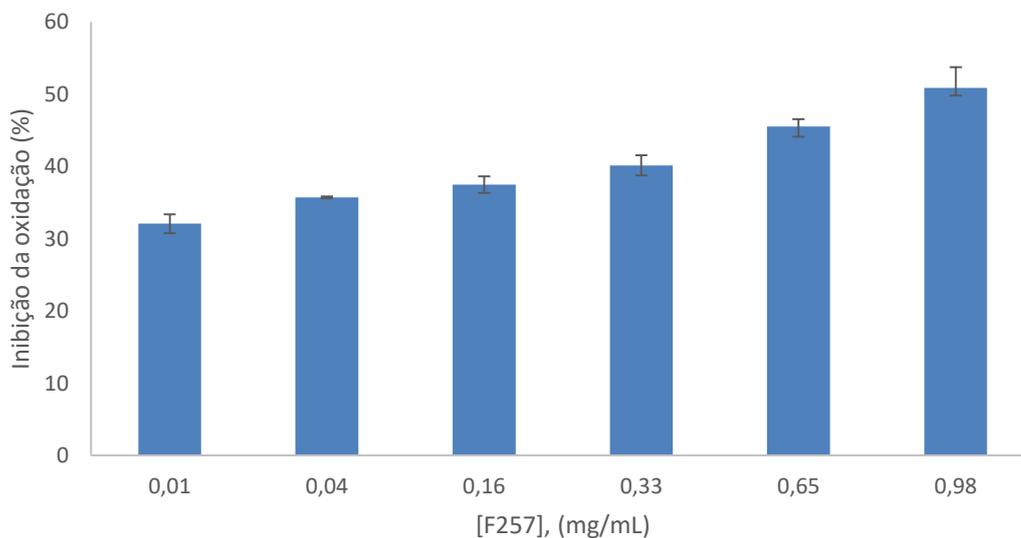


Figura 38- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β -caroteno/ácido linoleico para o composto F257.

O perfil antioxidante do composto F294 (Figura 39), mostrou que nas concentrações testadas mais baixas não se observou um aumento da atividade antioxidante proporcional ao aumento da concentração de composto. No entanto, este composto na concentração de 1,3 mg/mL apresentou cerca de 47% de inibição da oxidação.

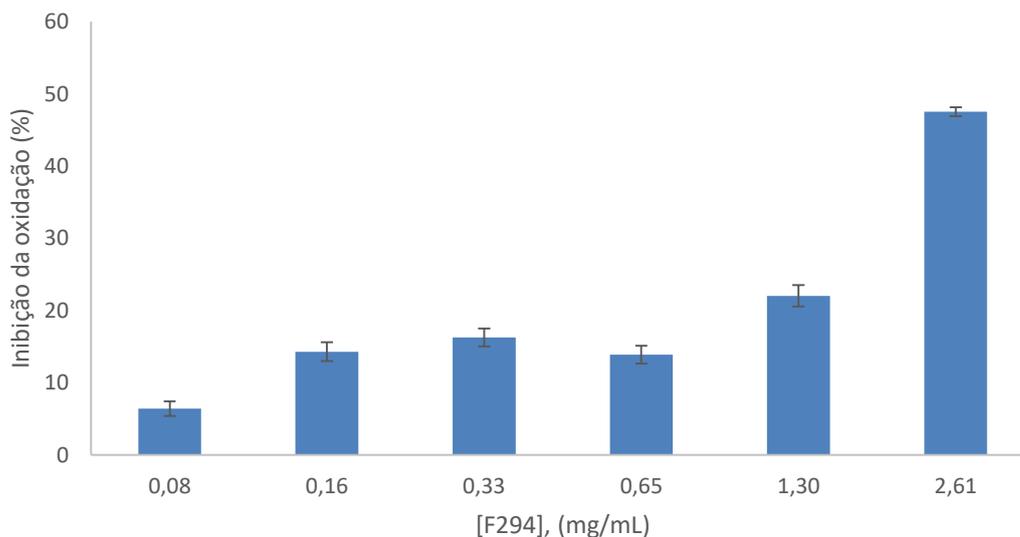


Figura 39- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β -caroteno/ácido linoleico para o composto F294.

Na Figura 40 é possível observar a variação da percentagem de inibição da oxidação para o composto AL1. Este composto apresenta um máximo de percentagem de inibição da oxidação de 38%, no entanto, não se observou um aumento de percentagem de inibição da oxidação proporcional ao aumento da concentração de composto.

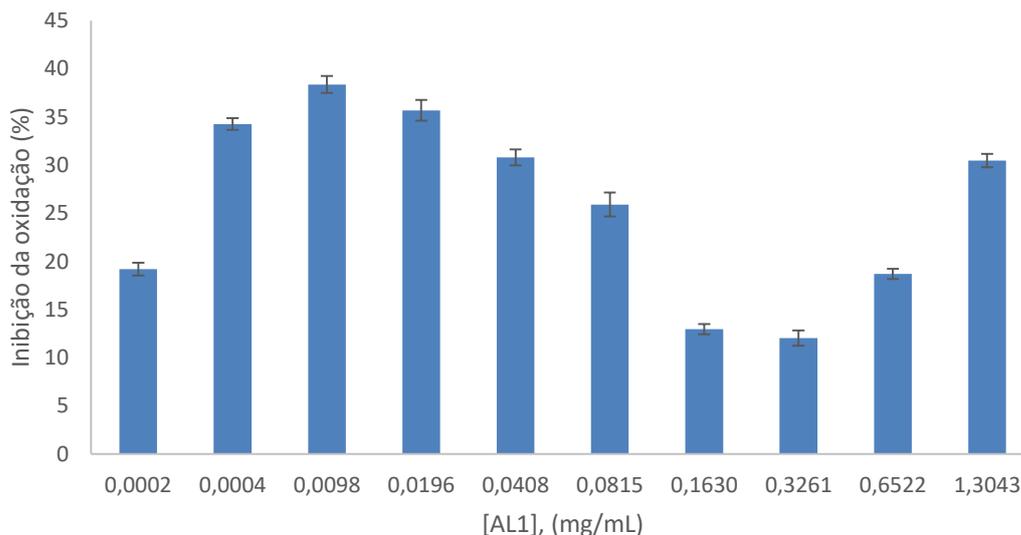


Figura 40- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β -caroteno/ácido linoleico para o composto AL1

Na tabela 3 apresentam-se os valores de IC_{30} e de IC_{50} dos compostos que apresentaram comportamento linear e para os padrões (Anexo I Figura 67,68 e 69) pelo método do β -caroteno/ácido linoleico.

Tabela 3- Valores de IC_{50} e IC_{30} obtidos para os compostos e para os padrões pelo método do β -caroteno/ácido linoleico.

Composto/padrão	$IC_{30}(\mu\text{g/mL})$	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$
GABA-BP	-	237,03
LMC7	1198	-
F257	-	860
Acido ascórbico	292	1438
Quercetina	2,1	9,78
BHT	0,168	0,25

A observação dos resultados obtidos (Tabela 3) mostra que os compostos em estudo apresentaram baixa capacidade para o método do β -caroteno/ácido linoleico, sendo apenas possível determinar o valor de IC_{50} de 850 $\mu\text{g/mL}$ e 2370,03 $\mu\text{g/mL}$, para os compostos F257 e para o GABA-BP, respetivamente. O

GABA-BP apresentou menor atividade que os três padrões em estudo, mas foi o composto estudado com maiores valores da inibição da oxidação por este método, estes padrões apresentaram valores de IC₅₀ compreendidos entre 0,25-1438 µg/mL.

5.2.3 Método do poder redutor

Os resultados obtidos pelo método do poder redutor, estão apresentados na Figura 45.

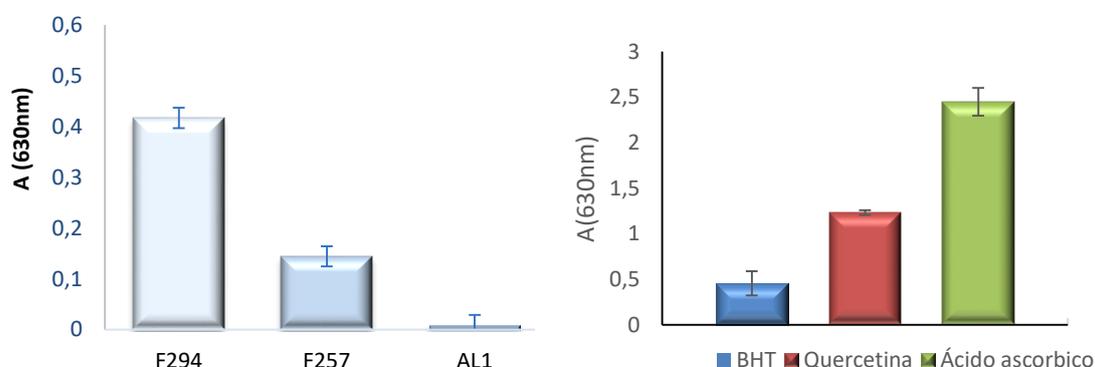


Figura 41- Representação gráfica dos resultados do método do poder redutor para os compostos F294, F257 e AL1 para a concentração 0,3 mg/ml.

Os compostos F257 e AL1 na concentração de 0,3mg/mL apresentaram baixa atividade. O composto F294 apresentou maior potencial redutor, apresentando uma absorvância de 0,42 com 0,3 mg/mL de composto.

O composto F257 (Figura 42) apresentou um comportamento linear, observando-se um aumento do poder redutor com o aumento da concentração de composto.

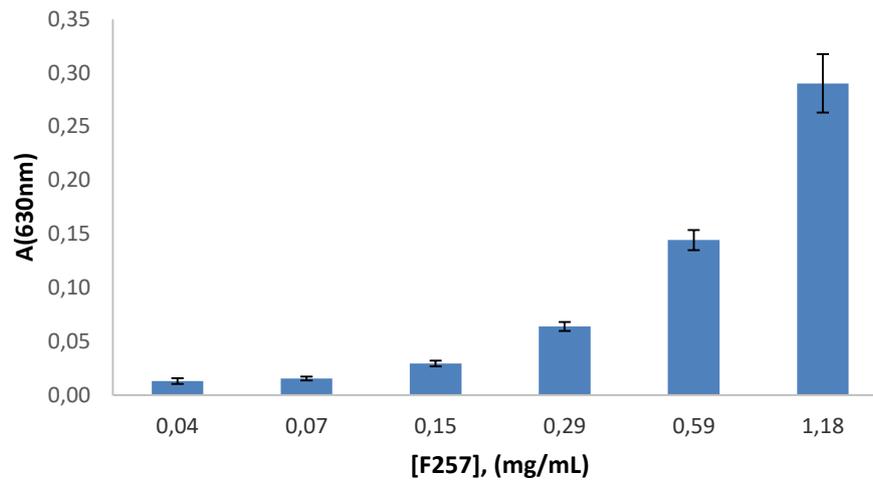


Figura 42- Representação gráfica dos resultados do método do poder redutor para o composto F257.

O composto AL1 apresentou baixo potencial redutor, não se observando diferenças nas duas primeiras concentrações testadas e nas concentrações mais elevadas observou-se uma diminuição da atividade, sugerindo que este possa exercer um efeito pró-oxidante (Figura 43).

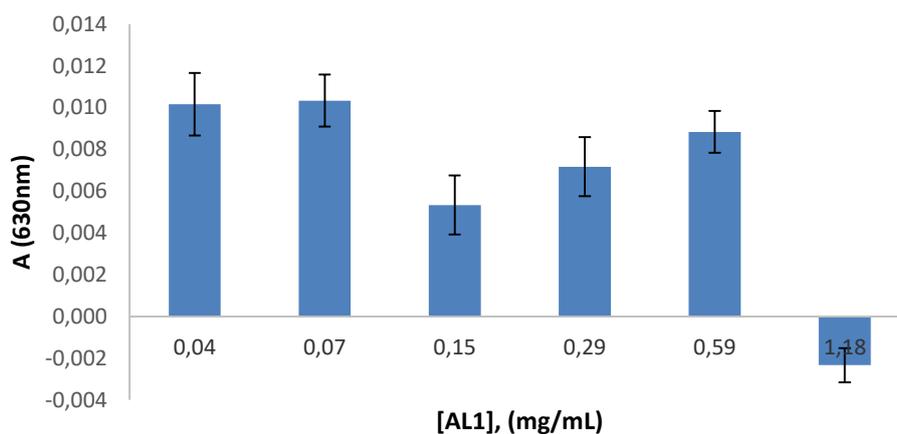


Figura 43- Representação gráfica dos resultados da atividade antioxidante pelo método do poder redutor para o composto AL1.

O composto F294 (Figura 44) foi o composto que apresentou maior potencial redutor, observando-se um aumento da atividade antioxidante proporcional ao aumento da concentração de composto.

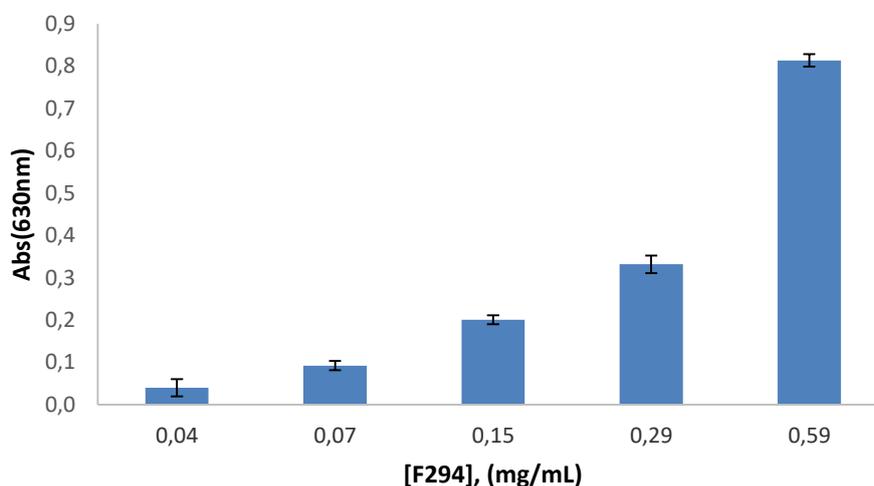


Figura 44-Representação gráfica atividade antioxidante pelo método do poder redutor para o composto F294.

Ao observarmos os resultados obtidos, os compostos F294 e F257 apresentaram menor potencial redutor que os três padrões em estudo, com valores de IC₅₀ de 376 e 1116 µg/mL, respetivamente (Tabela 4).

Tabela 4- Valores de IC₅₀ e IC₃₀ obtidos para os compostos e para os padrões pelo método do poder redutor.

Compostos/padrões	IC ₅₀ (µg/mL)
F294	376
F257	1116
Acido ascórbico	6,5
Quercetina	8,15
BHT	1,53

5.2.4 Comparação do potencial antioxidante dos derivados fosfônicos em estudo

Para avaliar o potencial antioxidante dos derivados fosfônicos em estudo procedeu-se à comparação dos valores de atividade antioxidante dos compostos com os valores de atividade obtidos para os padrões, nos diferentes métodos em estudo. Os valores de atividade antioxidante dos compostos obtidos foram expressos em equivalentes de BHT ($\mu\text{g/mL}$), ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$) e de quercetina ($\mu\text{g/mL}$)

Na Figura 45 A, B e C estão representados os valores de atividade antioxidante dos compostos pelo método do radical de DPPH, expressos em equivalentes de BHT ($\mu\text{g BHTE/mg}$ composto), equivalentes em ácido ascórbico ($\mu\text{g AAE/mg}$ de composto) e em equivalentes de quercetina ($\mu\text{g QE /mg}$ composto).

Através da análise da Figura 45, podemos observar que o composto que apresentou maior potencial para captação dos radicais livres foi o F257, e que na concentração de 1mg/mL foi equivalente a $5,69\ \mu\text{g}$, $5,01\ \mu\text{g}$ e $26,23\ \mu\text{g}$ de ácido ascórbico, quercetina e BHT, respetivamente, F294 e AL1.

O composto que apresentou uma maior atividade antioxidante de entre os quatro expressos na Tabela 4, foi o composto F257, o qual apresentou valor IC_{50} de $1116\ \mu\text{g/mL}$.

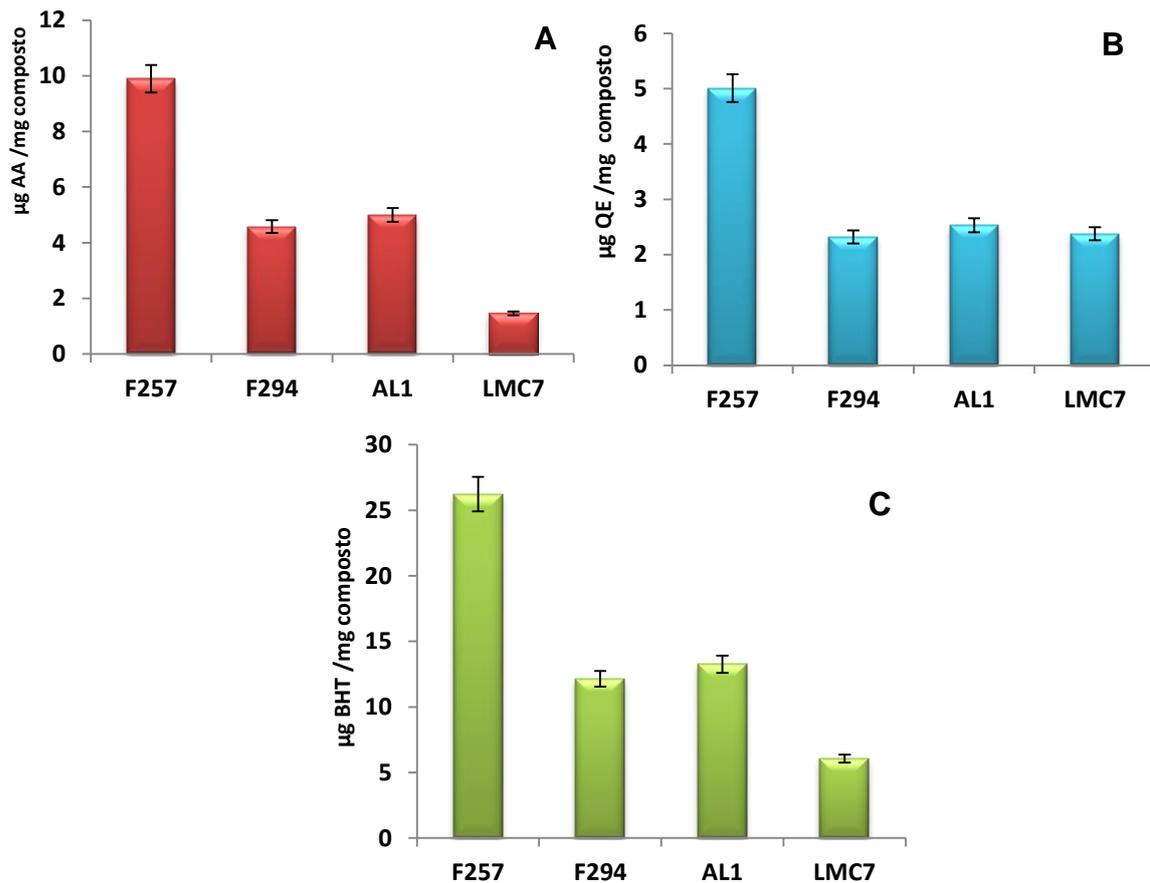


Figura 45- Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH expressa em equivalentes de ácido ascórbico (A), quercetina (B) e BHT (C).

Na Figura 46 A, B e C estão representados os valores de atividade antioxidante pelo método do β -caroteno/ácido linoleico dos compostos obtidos, expressos em equivalentes de BHT ($\mu\text{g BHT/mg}$), ácido ascórbico ($\mu\text{g AA/mg}$) e de quercetina ($\mu\text{g QE/mg}$).

É possível observar que o composto que apresentou maior capacidade de proteção do substrato lipídico foi o composto F257, com valores equivalentes (1 mg) a 11,16, 426 e 0,70 μg de ácido ascórbico, quercetina e BHT respectivamente.

Os restantes derivados fosfônicos, F294 e LMC7, apresentaram uma atividade antioxidante muito mais baixa que o composto F257 pelo método do β -caroteno/ácido linoleico.

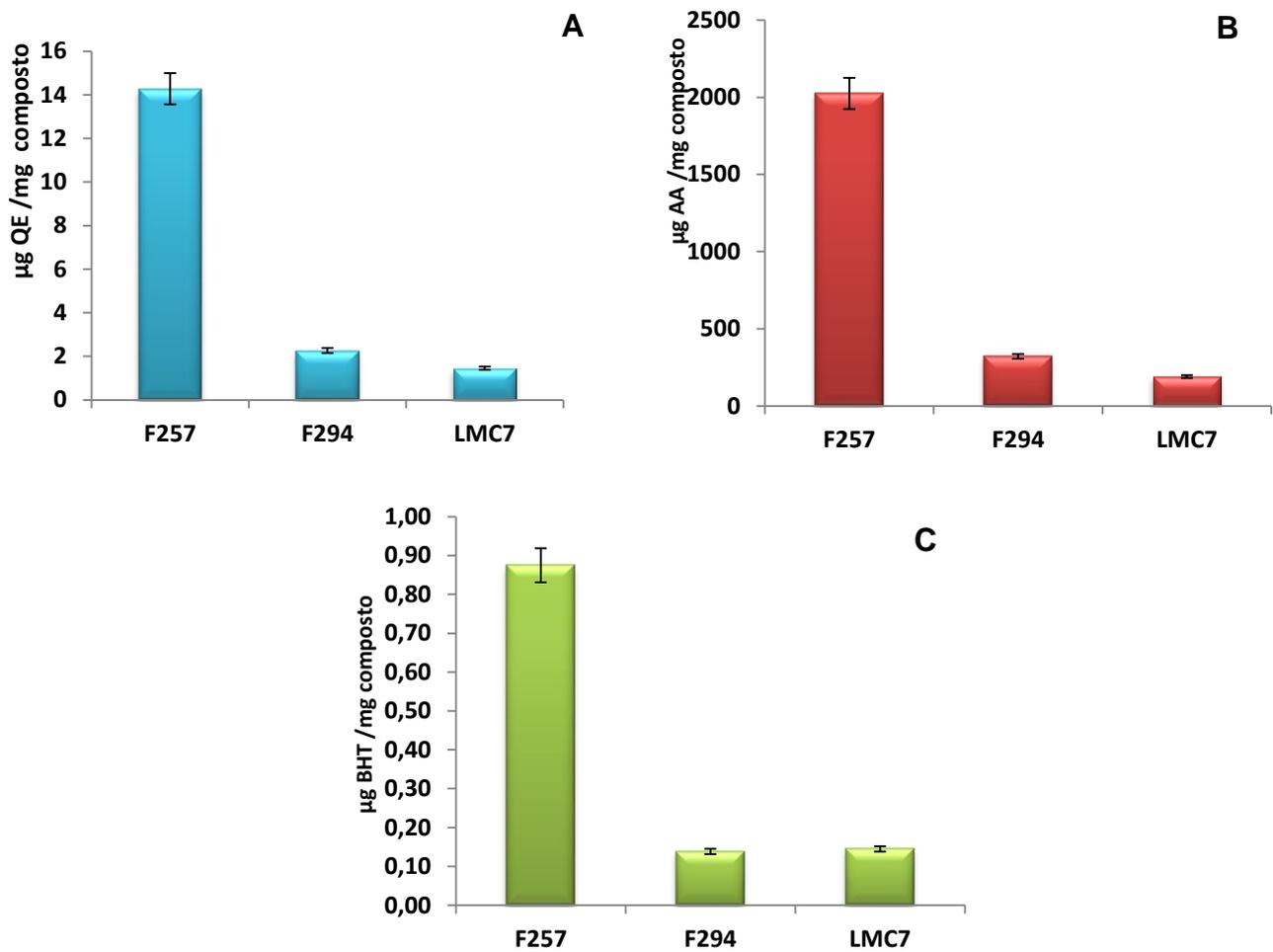


Figura 46- Avaliação da atividade antioxidante pelo método do caroteno/ácido linoleico expressa em equivalentes de ácido ascórbico (A), quercetina (B) e BHT (C).

Na Figura 47 A, B e C estão representados os valores de atividade antioxidante pelo método do poder redutor, dos compostos estudados, expressos em equivalentes de BHT ($\mu\text{g BHT}/\text{mg}$), ácido ascórbico ($\mu\text{g AA}/\text{mg}$) e de quercetina ($\mu\text{gQE}/\text{mg}$).

O composto que apresentou maior capacidade de redução do ferro(II) foi o composto F294, com valores equivalentes (1 mg) a 22 μg , 17 μg e 83 μg de quercetina, ácido ascórbico e BHT respetivamente.

Por sua vez, o outro composto estudado neste método, F257, apresentou uma baixa atividade antioxidante quando comparado com o composto F294. Este composto, F257, quando expresso em equivalentes de padrão, apresentou como valores 3,66 μg , 3,36 μg , 14,88 μg , para a quercetina, ácido ascórbico e BHT, respectivamente.

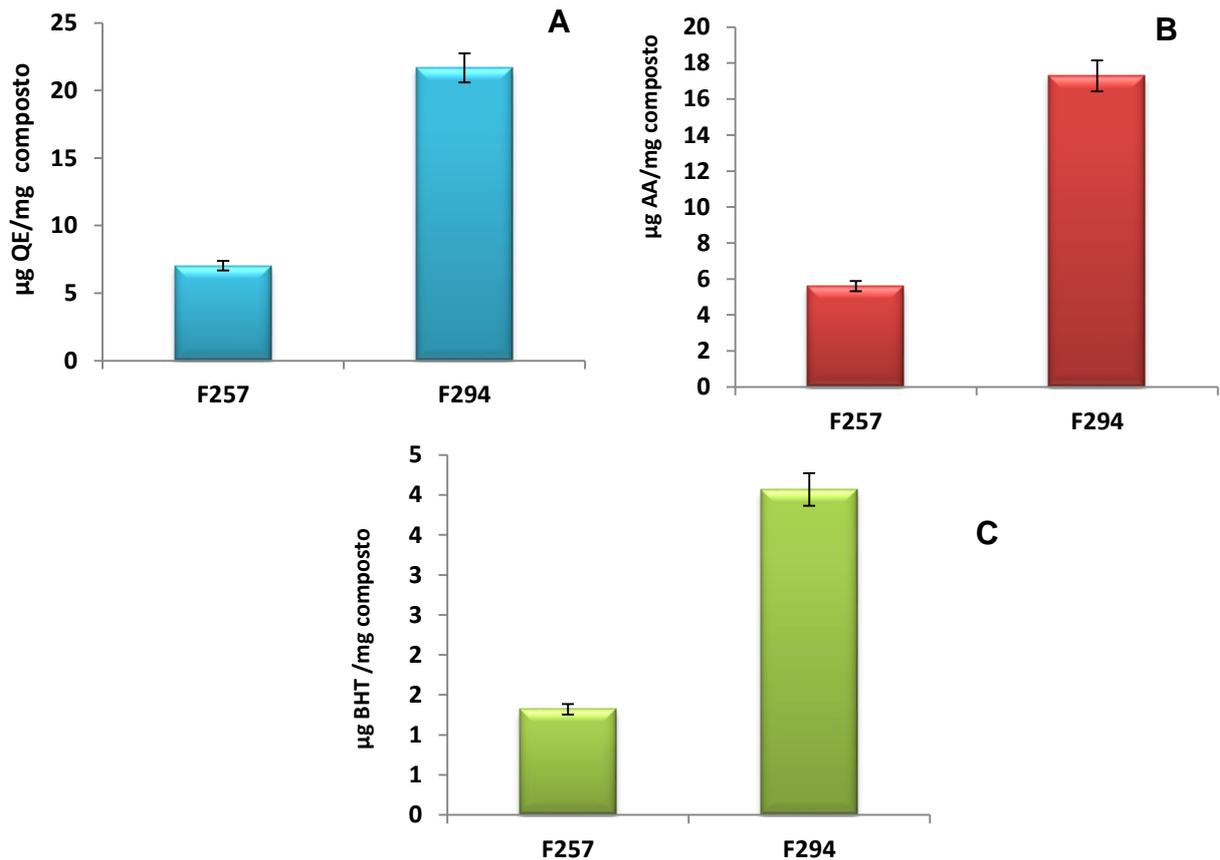


Figura 47- Avaliação da atividade antioxidante dos compostos F257 e F294 pelo método do poder redutor expressa em equivalentes de ácido ascórbico (A), quercetina (B) e BHT (C).

5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

5.3.1 Método da inibição da desnaturação da albumina

Na Figura 48 encontram-se apresentados os valores da capacidade de inibição da desnaturação da albumina para os compostos F257, F294, LMC7, AL1, GABA-BP, LM25, LMA1, LMA2, LMA3, LMC2 (A) e do padrão ibuprofeno (B).

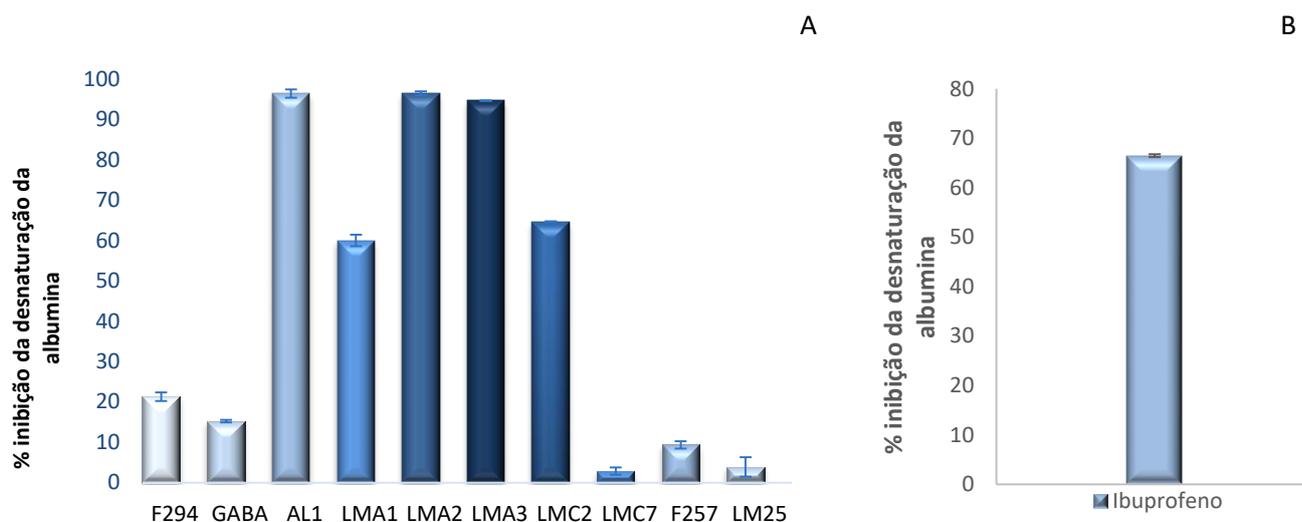


Figura 48- Valores de inibição da desnaturação da albumina (%) dos derivados fosfônicos na concentração de 1mg/mL (A), e do padrão ibuprofeno (0,125mg/mL).

Na concentração 1 mg/mL, os compostos que apresentaram mais atividade foram os compostos AL1, LMA2 e LMA3, observando-se uma inibição da desnaturação da albumina de cerca de 90%. Os compostos LMA1 e LMC2 também apresentaram elevado potencial anti-inflamatório, inibindo cerca de 60% da desnaturação da albumina. Os compostos F294, GABA-BP e F257 apresentaram valores de capacidade de inibir a desnaturação da albumina, de 20, 15 e 10% respetivamente. Os compostos LMC7 e LM25 apresentaram atividade inibitória quase residual variando entre os 2 e 4%.

Para o composto F294 (Figura 49), observou-se um aumento da inibição da desnaturação da albumina, proporcional ao aumento da concentração de

composto, até à concentração de 0,125 mg/mL. Após esta concentração, observou-se uma diminuição da capacidade de inibição da desnaturação da albumina.

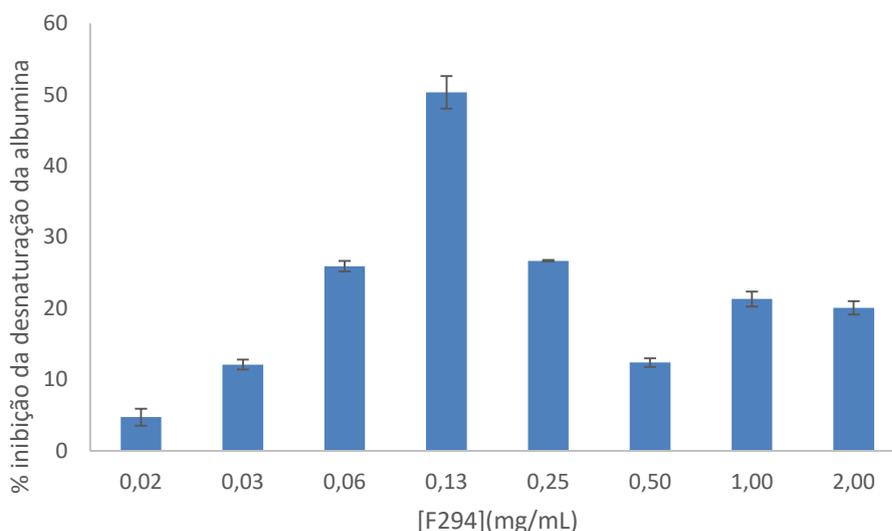


Figura 49- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto F294.

Através da análise da curva de reação do composto F294 (Figura 73 anexo II) foi possível obter uma curva de calibração, a partir da qual foi possível o cálculo do seu IC₅₀, o qual apresenta um valor de 0,124 mg/mL. Para este composto, nas concentrações superiores a 0,13 mg/mL, a percentagem de inibição da desnaturação da albumina diminuiu variando entre valores de 15 e 25% de atividade.

O composto GABA-BP (Figura 54) apresentou uma percentagem de inibição da desnaturação da albumina compreendida entre 13 e 20%. Para este composto, não se observou um aumento da atividade proporcional ao aumento da concentração de composto.

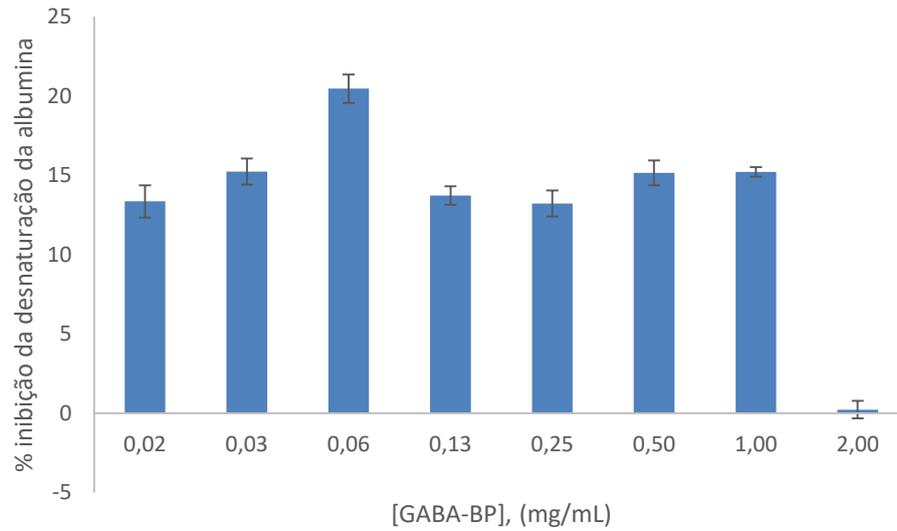


Figura 50- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto GABA-BP.

O composto AL1 (Figura 51) nas concentrações mais baixas, apresentou baixo potencial anti-inflamatório.

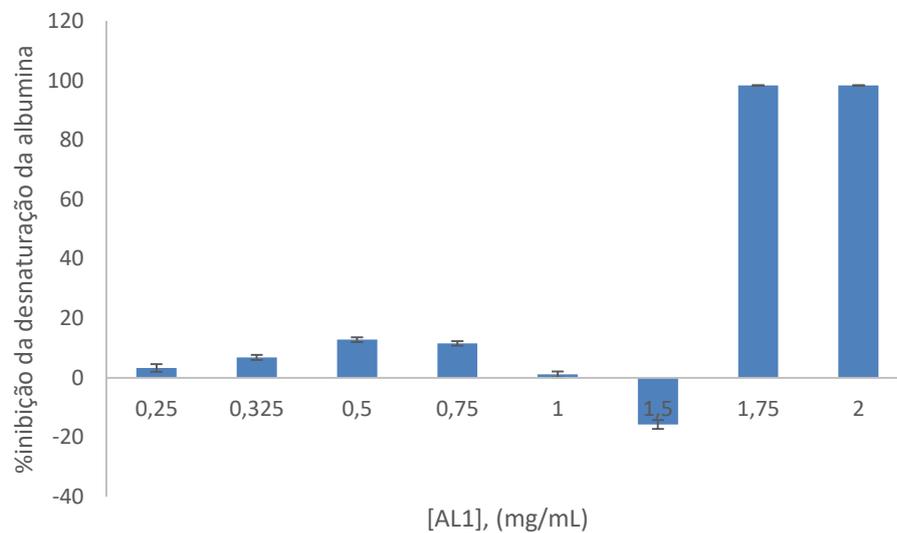


Figura 51- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto AL1.

Para o composto AL1, não se observou um aumento da atividade anti-inflamatória proporcional ao aumento da concentração de composto. No entanto,

nas concentrações de 1,75 e 2 mg/mL, o composto AL1 apresentou cerca de 98% de inibição da desnaturação da albumina.

O composto LMA1 (Figura 52) nas concentrações compreendidas entre 0,125-0,5 mg/mL, não apresentou atividade anti-inflamatória. No entanto, nas concentrações de 1 e 2 mg/mL, apresentou uma percentagem de inibição da desnaturação da albumina de 33 e 95%, respetivamente.

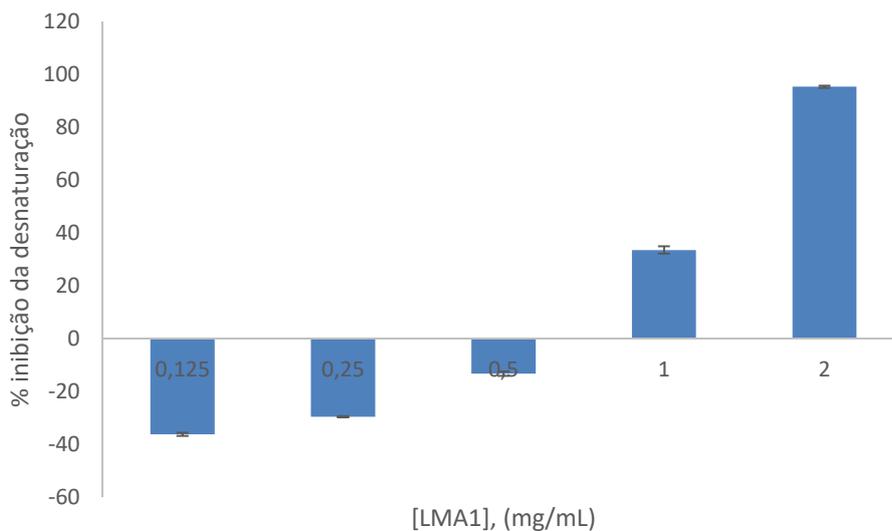


Figura 52- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMA1.

Na Figura 57, estão apresentados os resultados obtidos para a percentagem de inibição da desnaturação da albumina pelo composto LMA2.

O composto LMA2 apresentou uma abrupta subida de atividade até aos 0,25 mg/mL, após o qual atinge uma atividade de cerca de 90%, permanecendo semelhante nas restantes concentrações testadas.

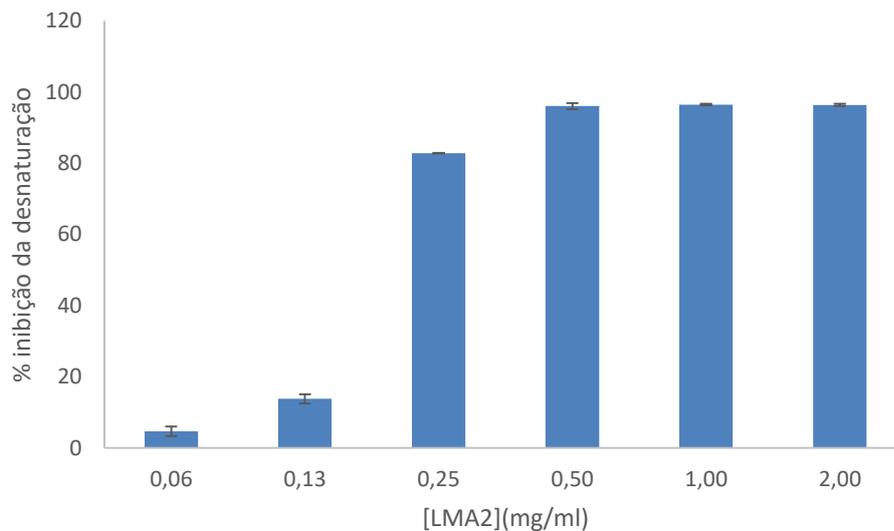


Figura 53- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMA2.

O composto LMC2 (Figura 54), nas concentrações compreendidas entre 0,0625-0,25 mg/mL, não apresentou potencial anti-inflamatório, tendo apresentado valores de percentagem negativos, pelo que é possível observar que neste intervalo de concentrações este composto apresenta atividade pró-inflamatória. A partir da concentração de 0,5 mg/mL, observaram-se percentagem de inibição da desnaturação da albumina compreendidas entre 58 e 77%.

Na Figura 55 é possível observar os resultados obtidos para a variação da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMA3.

Observou-se que este composto apresenta um máximo de atividade de cerca de 90% para todas as concentrações estudadas, com a exceção da concentração de 0,125 mg/mL. Para as outras concentrações, os valores de inibição são próximos de 90% de inibição (0,5 mg/mL) ou superiores a este valor.

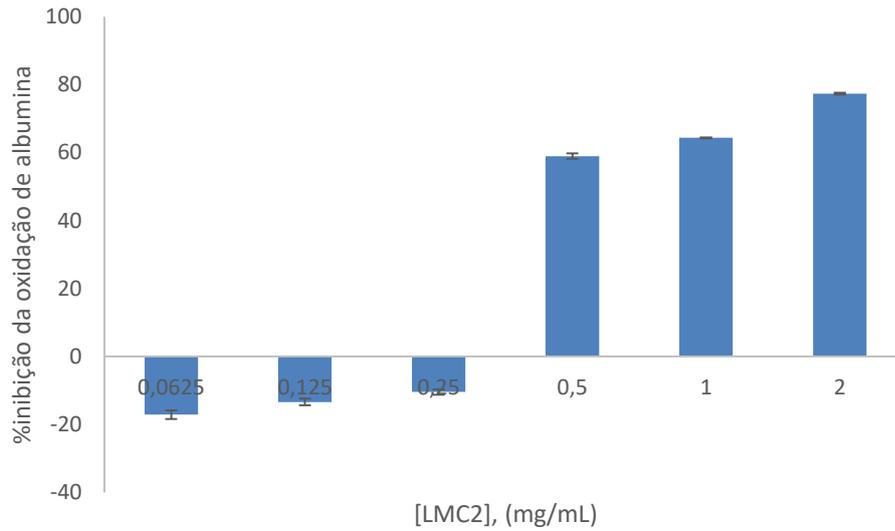


Figura 54- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMC2

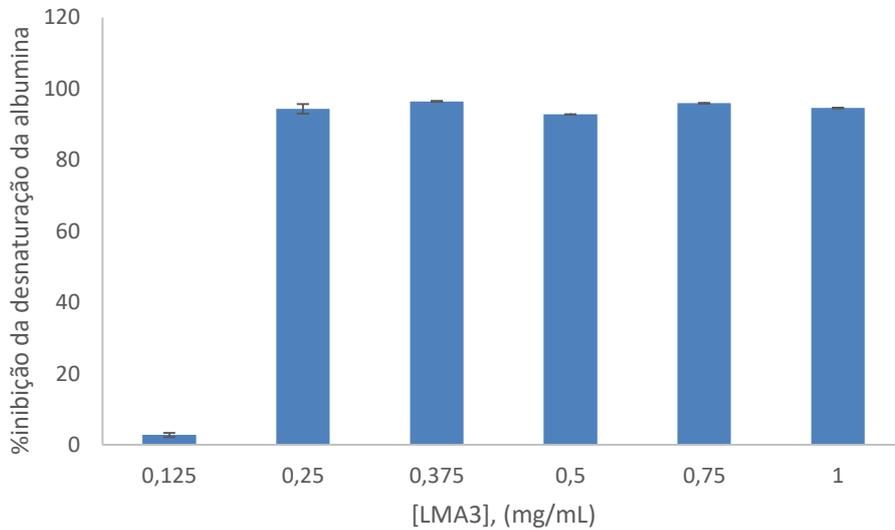


Figura 55- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMA3.

Analisando todos os resultados obtidos por este método, é possível observar que apenas foi possível calcular os IC₅₀ para os compostos F294 e LMA1, não

tendo sido possível o cálculo do IC₅₀ para o resto dos compostos devido à sua atividade não se comportar de forma linear.

A Figura 56 representa a variação da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMC7. Observa-se que este composto apresenta uma baixa capacidade anti-inflamatória, tendo tendência a perder atividade com o aumento da concentração, tendo atingido um máximo de atividade de cerca de 12% na concentração de 0,5 mg/mL.

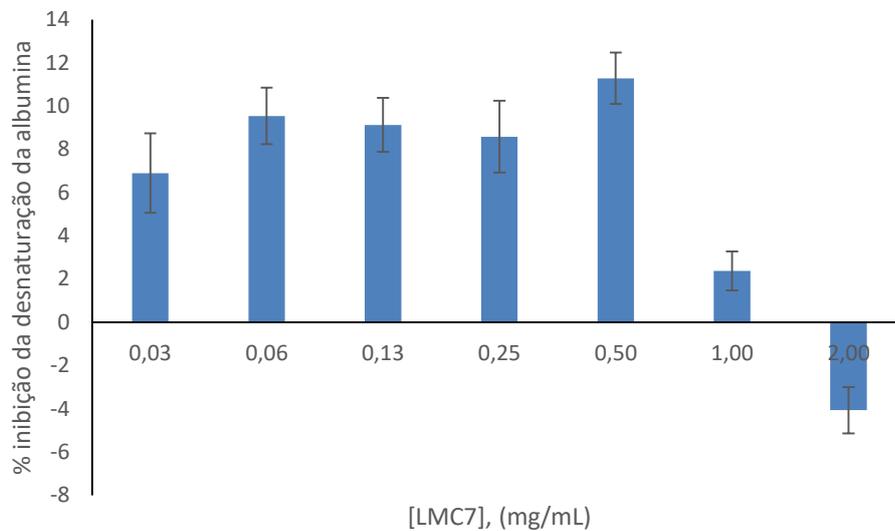


Figura 56- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LMC7.

Na Figura 57 podemos observar a variação da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto F257. Este composto atinge um máximo de atividade de 32% na concentração de 0,125 mg/mL. Ao atingir esse máximo, este composto perdeu atividade chegando a um mínimo de atividade de 8%, tendo logo surgido um aumento de atividade até aos 23%.

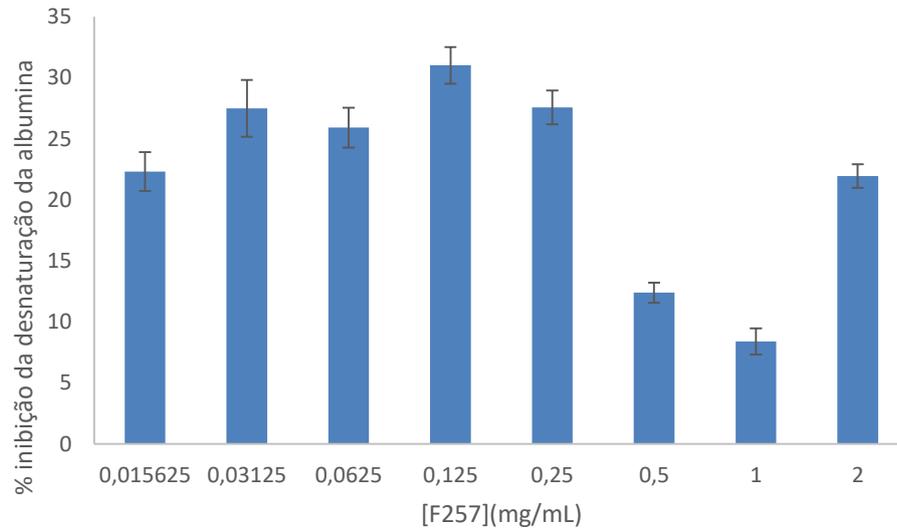


Figura 57- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto F257.

A variação da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LM25 pode ser observado na Figura 58. Podemos observar nesta Figura que este apresenta uma baixa atividade antioxidante alcançando apenas como máximo cerca de 4,5% de atividade e um mínimo de 1,3%, pelo que podemos assumir que, para as concentrações estudadas este composto apresenta uma atividade antioxidante bastante baixa.

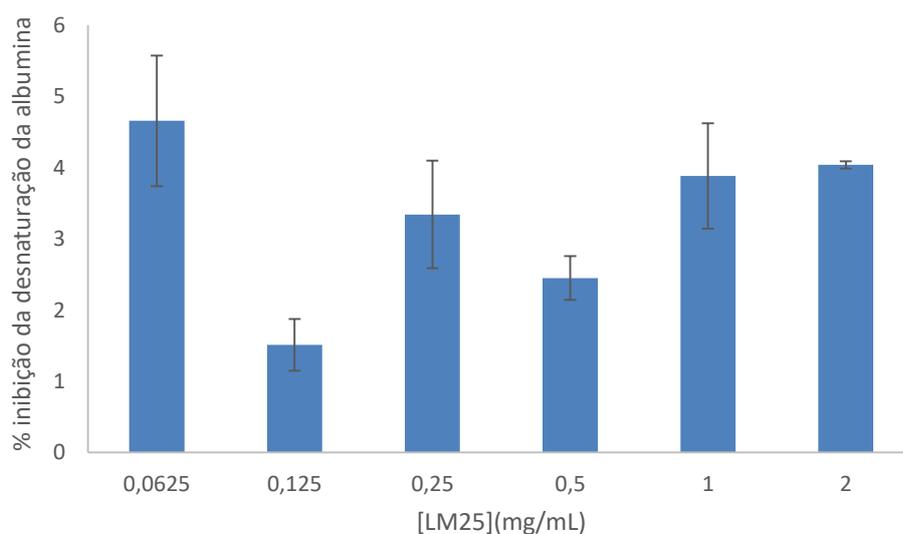


Figura 58- Representação gráfica da percentagem de inibição da desnaturação da albumina para o composto LM25.

Neste estudo observou-se que os compostos ácidos fosfônicos apresentam maior atividade anti-inflamatória que os demais compostos. No caso do composto LMA1, o seu valor pode estar diminuído pela presença de um composto a contaminá-lo.

A presença de um grupo éster no composto LM25 parece provocar a diminuição da sua atividade anti-inflamatória.

Na tabela 5 encontram-se os valores de IC₅₀, obtidos para os compostos F294 e LMA1, bem como para o padrão ibuprofeno.

Tabela 5- Valores de IC₅₀ obtidos para os compostos e para os padrões pelo método da inibição da desnaturação da albumina

Compostos/Padrão	IC ₅₀ (µg/mL)
F294	124
LMA1	640
Ibuprofeno	97x10 ⁻³

Os compostos F294 e LMA1, apresentaram valores de IC₅₀ compreendidos entre 0,1 e 0,7 µg/mL, tendo o composto F294 apresentado atividade superior ao composto LMA1. No entanto, o padrão ibuprofeno apresentou atividade anti-inflamatória superior com um valor de IC₅₀ de 0,097 µg/mL.

Uma análise integrada dos resultados obtidos, mostra que, nos derivados fosfônicos estudados, os derivados ácidos foram os que apresentaram maior potencial anti-inflamatório e que a presença de um grupo éster (composto LM25) parece levar à diminuição da sua atividade anti-inflamatória.

5.4 Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana foi efetuada através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e a determinação da concentração mínima bactericida (CMB). A concentração mínima inibitória corresponde à concentração mínima para o qual não se observa crescimento, enquanto que a CMB avalia a capacidade do composto eliminar a estirpe bacteriana em estudo.

5.4.1 Concentração mínima inibitória

Na tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos para as concentrações mínimas inibitórias dos compostos para as estirpes bacterianas em estudo.

Através da análise da tabela 6 é possível observar que o composto LMC7 apresentou maior potencial antimicrobiano, com capacidade inibitória do crescimento para a maioria das estirpes bacterianas, com exceção do *Proteus mirabilis* LFG 04. Por sua vez, os compostos que obtiveram menor atividade antimicrobiana para as bactérias estudadas foram o F257 e F294.

Neste estudo, com exceção do composto LMC7, podemos observar que os ácidos fosfônicos apresentaram melhores propriedades antimicrobianas que os outros compostos para as estirpes bacterianas estudadas. O composto LMC7 foi o que apresentou um valor de CMI mais baixo, podendo ser relevante a presença de 2 grupos nitro no anel aromático.

Os resultados obtidos (Tabela 6) mostram que os derivados fosfônicos apresentam capacidade bacteriostática face aos agentes bacterianos em estudo. Para a estirpe *Staphylococcus aureus* LFG 29213, os compostos fosfônicos que apresentaram melhor atividade antibacteriana foram o composto LMC7 e F294, com valores de CMI de 125 µg/mL e 250 µg/mL, respetivamente. Por outro lado, o composto F257 foi o que apresentou menor poder antibacteriano face a esta estirpe, com um valor de CMI de 2000 µg/mL. Para estirpe bacteriana *Enterococcus faecalis* LFG 1001, os compostos que apresentaram uma melhor capacidade de inibir o crescimento bacteriano foram os compostos LMC7, LMA1 e

LMA3, com um valor de CMI de 250 µg/mL. Os fosfonatos F257 e GABA-BP, apresentaram menor atividade antibacteriana com valores de CMI de 2000 µg/mL. Para a estirpe bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 1007, o composto com melhor capacidade inibitória foi o LMC7 com um valor inferior a 125 µg/mL. Por sua vez o composto F257 foi o composto que apresentou uma pior capacidade inibitória bacteriana com um CMI de 2000 µg/mL. A estirpe bacteriana *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 apresentou maior sensibilidade para o composto LMC7, tendo-se obtido um valor de CMI inferior a 125 µg/mL. A estirpe bacteriana *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 apresentou maior resistência ao composto F257, tendo-se observado um valor de CMI de 2000 µg/mL, enquanto que o composto LMC7 foi o mais eficiente na inibição do crescimento bacteriano com uma CMI de <125 µg/mL.

Analisando os resultados obtidos para as estirpes Gram-negativas podemos observar que para o *Proteus mirabilis* LFG 04, o composto que apresentou melhor capacidade inibitória do crescimento bacteriano foi o AL1, com um valor de CMI de 750 µg/mL.

Nas estirpes bacterianas *Salmonella enteritidis* LFG 05 e *Pseudomonas aeruginosa* LFG 1002, os compostos que apresentaram uma melhor capacidade de inibir o crescimento bacteriano para as duas bactérias foi o composto LMC7, com um valor de CMI de 500 µg/mL. Por sua vez os fosfonatos que apresentaram valores de CMI mais altos para as estirpes bacterianas foram o F294 e GABA-BP, com valores de CMI de 2000 µg/mL.

Para as estirpes *Escherichia coli* LFG 1003 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 observou-se que o composto inibitório mais eficaz foi LMC7, com um valor de CMI de 250 e os compostos F294 e F257 como os compostos com maior concentração mínima inibitória com um valor de 2000 µg/mL, sendo assim menos eficazes na inibição do crescimento bacteriano.

Tabela 6-Tabela da concentração mínima inibitória dos compostos para as bactérias em estudo

Estirpes bacterianas	Compostos em estudo (µg/mL)								
	LMC7	F257	AL1	F294	GABA-BP	LMA1	LMA2	LMA3	T.E
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<125	2000	500	250	1000	500	750	500	0,98
<i>E. faecalis</i> LFG 1001	250	2000	750	2000	1000	250	1000	250	15,65
<i>S. aureus</i> LFG 1007	<125	2000	500	250	250	500	1000	500	0,98
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<125	2000	1000	750	500	500	1000	250	3,91
<i>S. typhimurium</i> LFG 1006	<125	1000	750	750	500	NE	NE	NE	62,5
<i>P. mirabilis</i> LFG 1004	1000	1000	750	2000	2000	NE	NE	NE	62,5
<i>S. enteritidis</i> ATCC 1005	500	1000	750	2000	2000	NE	NE	NE	1,95
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	500	1000	750	2000	2000	NE	NE	NE	1,95
<i>E. coli</i> LFG 1003	250	2000	1000	2000	350	500	500	500	125
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	250	2000	1000	2000	350	750	750	500	125
<i>M. morgani</i> LFG 1006	500	>2000	1000	2000	500	750	1000	750	31,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	250	2000	1000	2000	250	500	500	500	62,5
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<125	2000	500	2000	2000	NE	NE	NE	31,25

Legenda: NE- Não efetuado T.E-Cloridrato de tetraciclina

No que diz respeito à estirpe de *Morganella morganii* LFG 08, os compostos que apresentaram melhor atividade antibacteriana foram o LMC7 e GABA-BP com valores de CMI de 500 µg/mL. Por outro lado, o composto que apresentou um CMI maior foi o F257, com um valor de CMI superior a 2000 µg/mL.

Observando os resultados obtidos na tabela 6 podemos notar que os compostos que apresentaram maior potencial inibitório para *Escherichia coli* ATCC 25922 foram LMC7 e GABA-BP com valores de CMI de 250 µg/mL.

No que respeita a estrutura do composto LMC7 é possível observar que este apresenta dois grupos nitro na sua estrutura, podendo ser este o grande fator que influencia a capacidade inibitória do crescimento bacteriano deste mesmo composto.

5.4.2 Concentração mínima bactericida

A atividade bactericida dos compostos foi avaliada para todos os testes em que se observou inibição do crescimento bacteriano. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 7.

Os compostos LMC7, GABA-BP e LMA2 foram os que apresentaram atividade bactericida para algumas das estirpes Gram-positivas, tendo sido o GABA-BP o que apresentou melhor potencial bactericida para estas estirpes.

No que respeita às estirpes Gram-negativas estudadas a que apresentou maior sensibilidade a um maior número de derivados fosfônicos foi a *E. coli* FG 1003.

Tabela 7- Tabela da concentração mínima bactericida dos compostos para as bactérias em estudo

Estirpes bacterianas	Compostos em estudo (µg/mL)								
	LMC7	F257	AL1	F294	GABA-BP	LMA1	LMA2	LMA3	T.E
<i>S. aureus</i> LFG 29213	1000	>2000	>2000	>2000	350	>2000	500	>2000	3,9
<i>E. faecalis</i> LFG 1001	2000	>2000	>2000	>2000	350	>2000	>2000	>2000	62,5
<i>S. aureus</i> ATCC 1007	2000	>2000	>2000	>2000	500	>2000	>2000	>2000	62,5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>2000	>2000	>2000	>2000	250	>2000	>2000	>2000	7,8
<i>S. typhimurium</i> LFG 06	>2000	1000	2000	1000	>2000	NE	NE	NE	62,5
<i>P. mirabilis</i> LFG 04	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	NE	NE	NE	125
<i>S. enteritidis</i> ATCC 05	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	NE	NE	NE	7,8
<i>P. aeruginosa</i> LFG 1002	2000	>2000	2000	>2000	>2000	NE	NE	NE	125
<i>E. coli</i> LFG 1003	>2000	1000	2000	1000	2000	>2000	>2000	>2000	125
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	1000	>2000	>2000	250
<i>M. morgani</i> LFG 06	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	62,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2000	>2000	2000	>2000	2000	2000	>2000	>2000	125
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	NE	NE	NE	250

Legenda: NE- Não efetuado T.E-Cloridrato de tetraciclina

Observou-se que na maioria dos compostos estudados não houve diferenças entre eles no que respeita à sua capacidade bactericida, uma vez que estes apresentaram na maioria concentrações mínimas bactericidas iguais ou superiores a 2000 µg/mL.

Assim, os compostos em estudo apresentaram elevado potencial antibacteriano, inibindo o crescimento de vários tipos de estirpes bacterianas, com largo espectro de ação sobre estirpes Gram-positivas e Gram-negativas, muitas com resistência antimicrobiana conhecida. No entanto, os compostos estudados não apresentaram elevadas capacidades bactericidas.

6. Considerações finais

Neste trabalho realizou-se a síntese de vários compostos fosfônicos, os quais apresentaram um rendimento muito variável, entre 32% e os 71%, como é o caso do LMA1 e LMA2, respetivamente. Esta grande diferença entre rendimentos pode dever-se ao número de lavagens necessárias para purificar o composto, podendo o maior ou menor quantidade dessas impurezas deverem-se à presença de composto de partida que não reagiram completamente.

No que respeita a atividade antioxidante os compostos foram testados utilizando o método do radical DPPH, o método do β -caroteno/ácido linoleico e o método do poder redutor. Através destes métodos foi possível observar que os compostos testados não apresentam grande capacidade antioxidante não tendo sido possível a determinação da capacidade antioxidante de grande parte dos compostos a testar.

Através da análise das estruturas e das atividades dos compostos estudados podemos observar que os compostos F294 e F257 foram os que apresentaram melhor atividade antioxidante.

Relativamente à atividade anti-inflamatória, a maioria dos compostos testados apresentam uma grande capacidade de inibir a desnaturação da albumina, podendo chegar, nalguns casos, a valores de atividade superiores a 90% como é o caso dos compostos AL1, LMA2 e LMA3.

Quanto à atividade antibacteriana é possível observar, através dos resultados obtidos, que os compostos fosfônicos utilizados apresentaram uma grande capacidade de inibição do crescimento bacteriano, como é o caso do composto LMC7 o qual apresentou o melhor valor de CMI para quase todas as bactérias em estudo, podendo esta maior atividade ser devida à presença de grupos NO_2 na sua estrutura.

Por sua vez, estes mesmos compostos fosfônicos apresentam uma fraca capacidade de eliminação dessas mesmas bactérias, tendo-se obtido valores elevados para a concentração mínima bactericida.

Os compostos fosfônicos têm vindo cada vez mais a ser estudados não só para as suas capacidades de tratar doenças relacionadas com os ossos, mas também para doenças oncológicas e atividades antibacterianas. Com o aumento de estudos relacionados com este tipo de compostos existe a possibilidade, de num futuro próximo, se conseguir sintetizar compostos fosfônicos com aplicações farmacêuticas que consigam apresentar diversas tipos atividades de forma eficiente e com uma capacidade de serem absorvidos pelo corpo humano, pois este é o principal problema do uso de compostos fosfônicos no tratamento clínico.

7. Referências bibliográficas

- Açil, Y., Möller, B., Niehoff, P., Rachko, K., Gassling, V., Wiltfang, J., & Simon, M. J. K. (2012). The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 40(8), e229–e235. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2011.10.024>
- Akinwunmi, K., & Oyedapo, O. (2015). In vitro Anti-inflammatory Evaluation of African Nutmeg (*Monodora myristica*) Seeds. *European Journal of Medicinal Plants*, 8(3), 167–174. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2015/17853>
- Andrade, M., das Graças Cardoso, M., de Andrade, J., Silva, L., Teixeira, M., Valério Resende, J., ... Barroso, J. (2013). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. *Antioxidants*, 2(4), 384–397. <https://doi.org/10.3390/antiox2040384>
- Barzic, A. I., & Ioan, S. (2015). Antibacterial Drugs - From Basic Concepts to Complex Therapeutic Mechanisms of Polymer Systems, 3–28.
- Carmona-Jiménez, Y., García-Moreno, M. V., Igartuburu, J. M., & Garcia Barroso, C. (2014). Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chemistry*, 165, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.106>
- Chen, M., Yang, Z., Wu, H., Pan, X., Xie, X., & Wu, C. (2011a). Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. *International Journal of Nanomedicine*, 6(3), 2873–2877. <https://doi.org/10.1002/hc>
- Chen, M., Yang, Z., Wu, H., Pan, X., Xie, X., & Wu, C. (2011b). Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. *International Journal of Nanomedicine*, 6(1), 2873–2877. <https://doi.org/10.1002/hc>

- Clearfield, A. (1996). Recent advances in metal phosphonate chemistry. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 1(2), 268–278. [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(96\)80094-5](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(96)80094-5)
- Clézardin, P. (2011). Bisphosphonates' antitumor activity: An unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone*, 48(1), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.07.016>
- Clézardin, P., Benzaïd, I., & Croucher, P. I. (2011). Bisphosphonates in preclinical bone oncology. *Bone*, 49(1), 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.11.017>
- Coleman, R. E., & McCloskey, E. V. (2011). Bisphosphonates in oncology. *Bone*, 49(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.02.003>
- Corrarino, J. E. (2015). Bisphosphonates and atypical femoral fractures. *Journal for Nurse Practitioners*, 11(4), 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2015.01.011>
- Cozin, M., Pinker, B. M., Solemani, K., Zuniga, J. M., Dadaian, S. C., Cremers, S., ... Raghavan, S. (2011). Novel therapy to reverse the cellular effects of bisphosphonates on primary human oral fibroblasts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 69(10), 2564–2578. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2011.03.005>
- Cremers, S., & Papapoulos, S. (2011). Pharmacology of bisphosphonates. *Bone*, 49(1), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.01.014>
- DeRuiter, J., & Clark, R. (2002). Bisphosphonates : Calcium Antiresorptive Agents. *Endocrine Module*, 1–7.
- Dias, A. R., Garcia, M. H., Robalo, M. P., Tekheira, A. P. S., Bulygina, L. A., & Sokolov, V. I. (2001). Synthesis of Cyclodextrin Inclusion Complexes with (D - Cyclopentadienyl) iron Derivatives as Potential Nonlinear Optics Materials *, 37(5), 620–623.

- Dombrecht, E. J., Cos, P., Berghe, D. Vanden, Van Offel, J. F., Schuerwegh, A. J., Bridts, C. H., ... De Clerck, L. S. (2004). Selective in vitro antioxidant properties of bisphosphonates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(3), 675–680. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.149>
- Ebetino, F. H., Hogan, A. M. L., Sun, S., Tsoumpra, M. K., Duan, X., Triffitt, J. T., ... Russell, R. G. G. (2011). The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone*, 49(1), 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.03.774>
- Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., & Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100(4), 1511–1516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.043>
- Galezowska, J., & Gumienna-Kontecka, E. (2012a). Phosphonates, their complexes and bio-applications: A spectrum of surprising diversity. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(1–2), 105–124. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.002>
- Galezowska, J., & Gumienna-Kontecka, E. (2012b). Phosphonates, their complexes and bio-applications: A spectrum of surprising diversity. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(1–2), 105–124. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.002>
- Giger, E. V., Castagner, B., & Leroux, J. C. (2013). Biomedical applications of bisphosphonates. *Journal of Controlled Release*, 167(2), 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.032>
- Gnant, M., & Clézardin, P. (2012). Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: A brief review of published literature. *Cancer Treatment Reviews*, 38(5), 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.09.003>
- Govindappa, M., Sadananda, T. S., Channabasava, R., & Raghavendra, V. B. (2011). In vitro anti-inflammatory, lipoxygenase, xanthine oxidase and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Tecoma stans* (L.) Juss. Ex kunth.

International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2(2), 275–285.

Griffiths, D., Hughes, J., & Brown, J. (1997). The synthesis of 1-amino-2-hydroxy- and 2-amino-1-hydroxy-substituted ethylene-1, 1-bisphosphonic acids and their N-methylated derivatives. *Tetrahedron*, 53(52), 17815–17822. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402097102459>

Guénin, E., Monteil, M., Bouchemal, N., Prangé, T., & Lecouvey, M. (2007). Syntheses of phosphonic esters of alendronate, pamidronate and neridronate. *European Journal of Organic Chemistry*, (20), 3380–3391. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200601067>

Jaiman, A., Sabat, D., Arora, S., & Hafez, M. A. (2013). We need a break: Bisphosphonates. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 4(1), 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2013.01.010>

Kandikattu Karthik, Bharath Rathna Kumar P, Venu Priya R, Sunil Kumar K, R. S. B. R. (2013). Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of *Canthium Parviflorum* By in-Vitro Method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(5), 729–731.

Kolodiazhnyi, O. I. (2005). Asymmetric synthesis of hydroxyphosphonates. *Tetrahedron Asymmetry*, 16(20), 3295–3340. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.09.007>

Laminar, A., Agar, N., & Ap, S. A. (n.d.). Avaliação atividade antibacteriana, 8–11.

Landesberg, R., Cozin, M., Cremers, S., Woo, V., Kousteni, S., Sinha, S., ... Raghavan, S. (2008). Inhibition of Oral Mucosal Cell Wound Healing by Bisphosphonates. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66(5), 839–847. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2008.01.026>

Lecouvey, M., & Leroux, Y. (2000a). Synthesis of 1-Hydroxy-1, 1-bisphosphonates, 11(7), 556–561.

Lecouvey, M., & Leroux, Y. (2000b). Synthesis of 1-hydroxy-1,1-bisphosphonates. *Heteroatom Chemistry*, 11(7), 556–561. [https://doi.org/10.1002/1098-1071\(2000\)11:7<556::AID-HC15>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1098-1071(2000)11:7<556::AID-HC15>3.0.CO;2-N)

- Lin, J.H.. (1996). Bisphosphonates : A Review of Their Pharmacokinetic Properties, *Bone*, 18, 75–85.
- Mallard, I., Benech, J.-M., Lecouvey, M., & Leroux, Y. (2000). p-SUBSTITUTED BENZYL HYDROXYBISPHOSPHONATES: Synthesis and hydrolysis. *Phosphorus , Sulfur , and Silicon and the Related Elements*, 162(1), 15–23. <https://doi.org/10.1080/10426500008045216>
- Matsumura, N., Kikuchi-Utsumi, K., Sakamaki, K., Watabe, M., Aoyama, K., & Nakaki, T. (2013). Anticonvulsant action of indazole. *Epilepsy Research*, 104(3), 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.11.001>
- Miller, P. D. (2011). The kidney and bisphosphonates. *Bone*, 49(1), 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.12.024>
- Möller, B., Niehoff, P., Rachko, K., Gassling, V., Wiltfang, J., & Simon, M. J. K. (2012). The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 40, 229–235. Journal Article.
- Musa, K. H., Abdullah, A., & Al-Haiqi, A. (2016). Determination of DPPH free radical scavenging activity: Application of artificial neural networks. *Food Chemistry*, 194, 705–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.038>
- Ndoye Foe, F. M.-C., Tchinang, T. F. K., Nyegue, A. M., Abdou, J.-P., Yaya, A. J. G., Tchinda, A. T., ... Etoa, F.-X. (2016). Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1096-y>
- Nidhi, K., Indrajeet, S., Khushboo, M., Gauri, K., & Sen, D. J. (2011). Hydrotropy: A promising tool for solubility enhancement: A review. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(2), 26–33. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Oc, H. C. O. P., & Bf, H. H. N. O. (2001). Synthesis of new donor / acceptor h 5 -cyclopentadienyl and h 5 -indenyliron (II) complexes with p-benzonitrile derivatives . Crystal structures of, 632, 145–156.

- Ogawa, K., Mukai, T., Arano, Y., Ono, M., Hanaoka, H., Ishino, S., ... Saji, H. (2005). Development of a rhenium-186-labeled MAG3-conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain based on the concept of bifunctional radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chemistry*, 16(4), 751–757. <https://doi.org/10.1021/bc040249w>
- Ohba, T., Cates, J. M. M., Cole, H. A., Slosky, D. A., Haro, H., Ichikawa, J., ... Schoenecker, J. G. (2014). Pleiotropic effects of bisphosphonates on osteosarcoma. *Bone*, 63, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.03.005>
- Oliveira, G. K. F., Tormin, T. F., Sousa, R. M. F., De Oliveira, A., De Morais, S. A. L., Richter, E. M., & Munoz, R. A. A. (2016). Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 192, 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.064>
- Palmerini, C. A., Tartacca, F., Mazzoni, M., Granieri, L., Goracci, L., Scrascia, A., & Lepri, S. (2015). Synthesis of new indole-based bisphosphonates and evaluation of their chelating ability in PE/CA-PJ15 cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 102, 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.019>
- Papapoulos, S. E. (2008). Bisphosphonates: how do they work? *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 22(5), 831–847. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2008.07.001>
- Pazianas, M., & Abrahamsen, B. (2011). Safety of bisphosphonates. *Bone*, 49(1), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.01.003>
- Ravosa, M. J., Ning, J., Liu, Y., & Stack, M. S. (2011). Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 56(5), 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.11.003>
- Rennert, G., Rennert, H. S., Pinchev, M., & Lavie, O. (2014). The effect of bisphosphonates on the risk of endometrial and ovarian malignancies. *Gynecologic Oncology*, 133(2), 309–313.
-

<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.02.014>

Rogers, M. J., Crockett, J. C., Coxon, F. P., & Mönkkönen, J. (2011). Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*, *49*(1), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.11.008>

Romanenko, V. D., & Kukhar, V. P. (2012). 1-Amino-1,1-bisphosphonates. Fundamental syntheses and new developments. *Arkivoc*, *2012*(iv), 127–166. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0013.411>

Russell, R. G. G. (2011). Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone*, *49*(1), 2–19. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.022>

Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, *113*(4), 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>

Soto, S. A., & Chiappe Barbará, A. (2014). Bisphosphonates: Pharmacology and clinical approach to their use in equine osteoarticular diseases. *Journal of Equine Veterinary Science*, *34*(6), 727–737. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.01.009>

Srivastava, P., Tiwari, A. K., Chadha, N., Chuttani, K., & Mishra, A. K. (2013). Synthesis and biological evaluation of newly designed phosphonate based bone-seeking agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *65*, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.036>

Stresing, V., Daubiné, F., Benzaid, I., Mönkkönen, H., & Clézardin, P. (2007). Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Letters*, *257*(1), 16–35. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.07.007>

Su, G., Xiang, Y., He, G., Jiang, C., Li, C., Yan, Z., & Zhong, Y. (2014). Bisphosphonates May Protect against Bone Loss in Postmenopausal Women with Early Breast Cancer Receiving Adjuvant Aromatase Inhibitor Therapy: Results from a Meta-analysis. *Archives of Medical Research*, *45*(7), 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.10.007>

Teixeira, F. C., Antunes, I. F., Curto, M. J. M., & Neves, M. (2009). Novel 1-hydroxy-1,1-bisphosphonates derived from indazole: synthesis and characterization.

Arkivoc, 2009(xi), 69–84.

Teixeira, F. C., Rangel, C. M., & Teixeira, A. P. S. (2013). New azaheterocyclic aromatic diphosphonates for hybrid materials for fuel cell applications. *New Journal of Chemistry*, 37(10), 3084. <https://doi.org/10.1039/c3nj00585b>

Wiemer, D. F. (1997). Synthesis of Nonracemic Phosphonates. *Tetrahedron*, 53(49), 16609–16644. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)10305-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)10305-2)

Yuasa, T., Kimura, S., Ashihara, E., Habuchi, T., & Maekawa, T. (2007). Zoledronic acid - a multiplicity of anti-cancer action. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 2126–2135. <https://doi.org/10.2174/092986707781389600>

Zhang, S., Gangal, G., & Uludağ, H. (2007). “Magic bullets” for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents. *Chemical Society Reviews*, 36(3), 507–531. <https://doi.org/10.1039/b512310k>

Zhang, W., Zhu, C., Sun, M., Ge, Y., & Yan, G. (2014). Efficacy of bisphosphonates against hip fracture in elderly patients with stroke and Parkinson diseases: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 23(10), 2714–2724. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.06.022>

Zhang, Y., Hudock, M. P., Krysiak, K., Cao, R., Bergan, K., Yin, F., ... Oldfield, E. (2007). Activity of sulfonium bisphosphonates on tumor cell lines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(24), 6067–6079. <https://doi.org/10.1021/jm700991k>

Zhang, Y., Shen, Y., Zhu, Y., & Xu, Z. (2015). Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.047>

8. Anexos

I. Avaliação das atividades antioxidantes

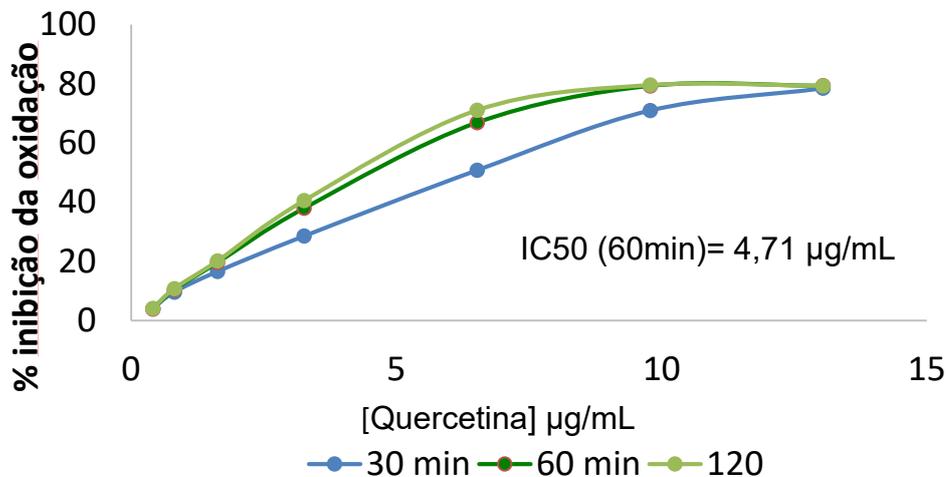


Figura 59— Perfis de atividade do padrão quercetina pelo método do radical DPPH.

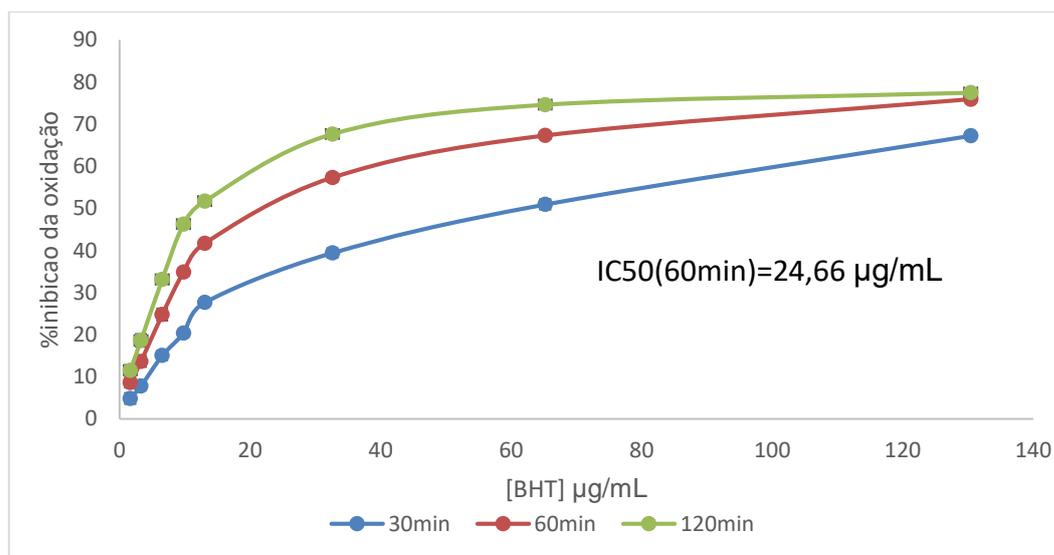


Figura 60— Perfis de atividade do padrão BHT, pelo método do radical DPPH.

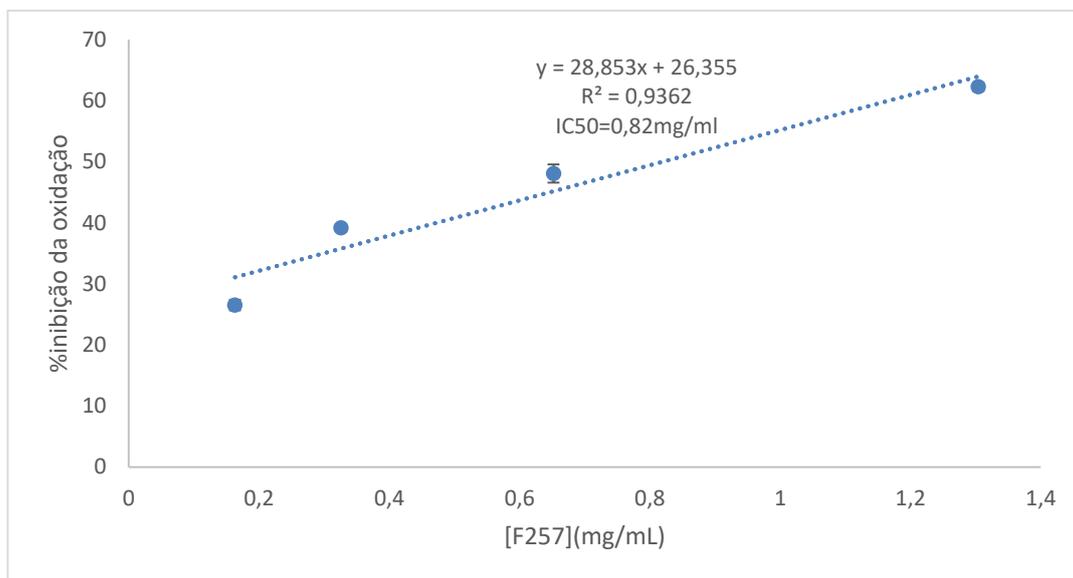
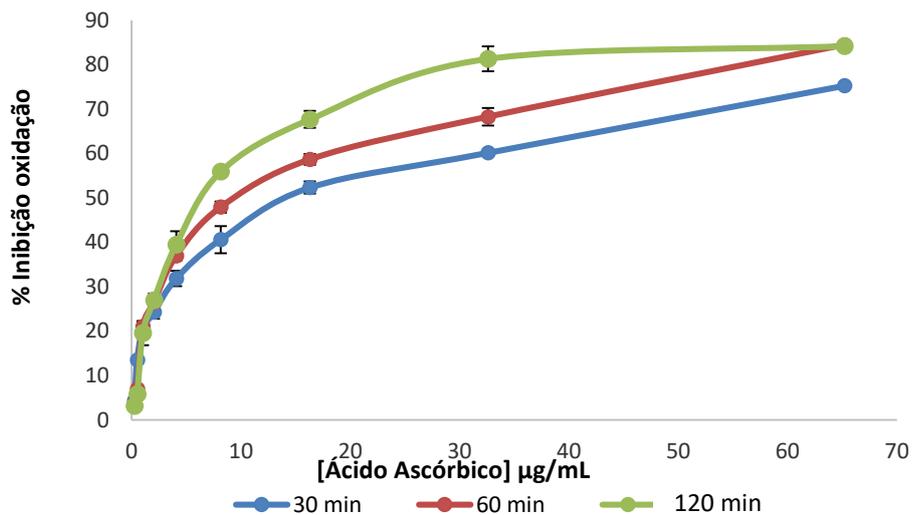


Figura 61- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do DPPH para o composto F257 aos 120 min.

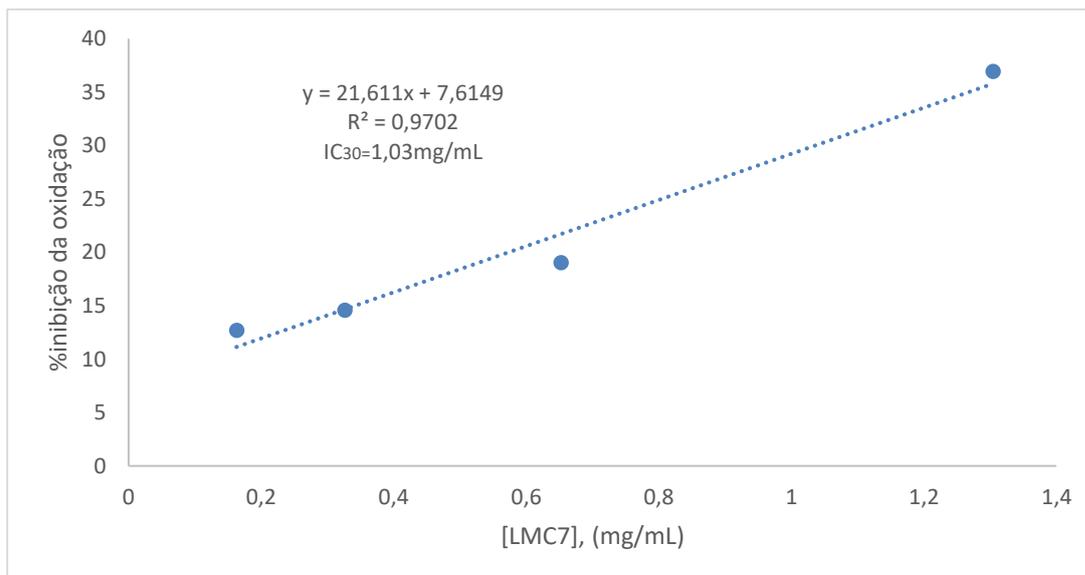


Figura 62- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do DPPH para o composto LMC7 aos 120 min.

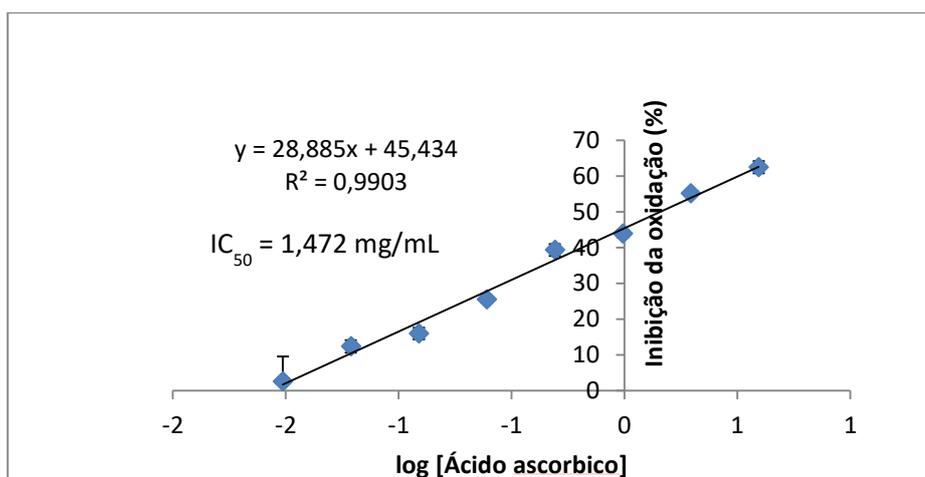


Figura 63– Curva de calibração do padrão ácido ascórbico pelo método do β -caroteno/ácido linoleico

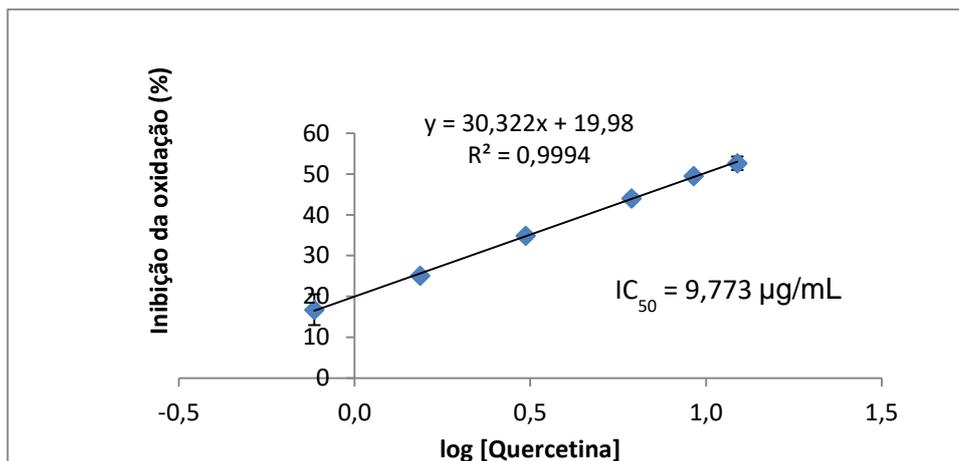


Figura 64- Curva de calibração do padrão quercetina, pelo método do β -caroteno/ácido linoleico.

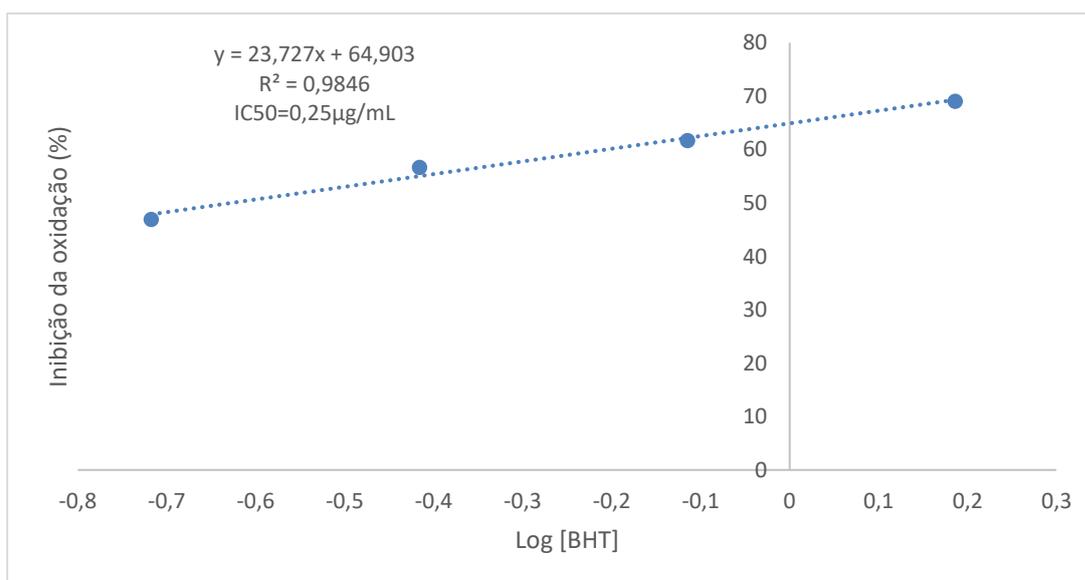


Figura 65- Curva de calibração do padrão BHT, pelo método do β -caroteno/ácido linoleico

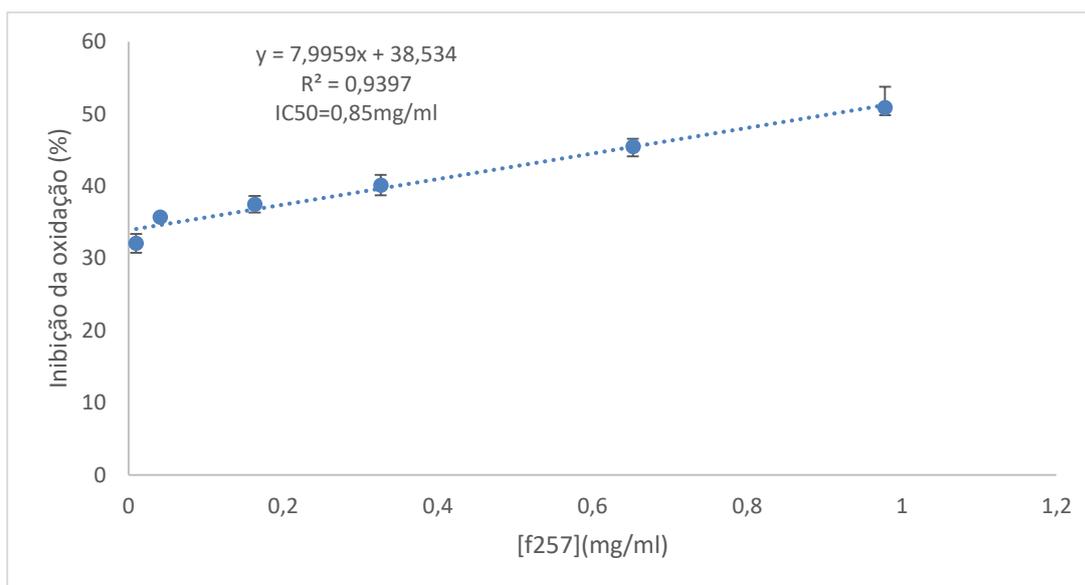


Figura 66- Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do β -caroteno/ácido linoleico para o composto F257

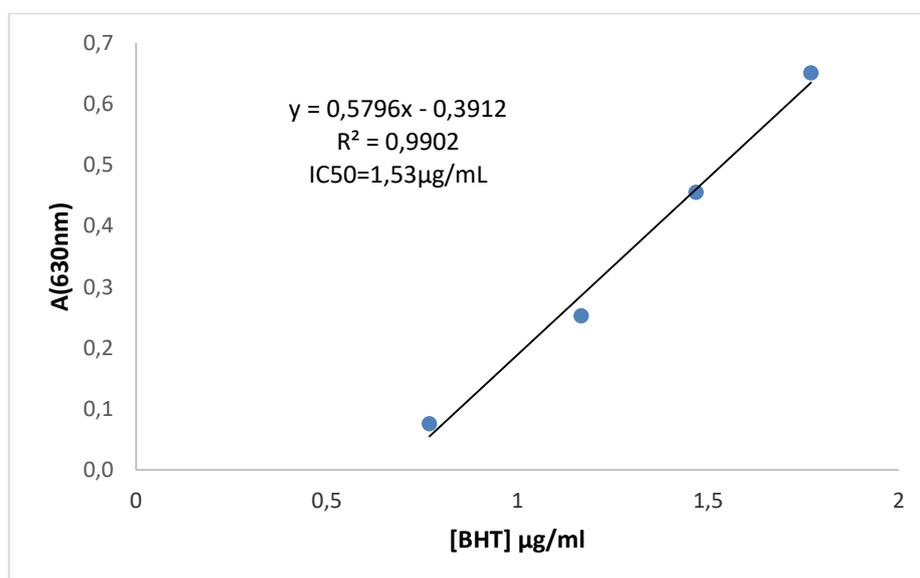


Figura 67- Curva de calibração do padrão BHT pelo método do poder redutor.

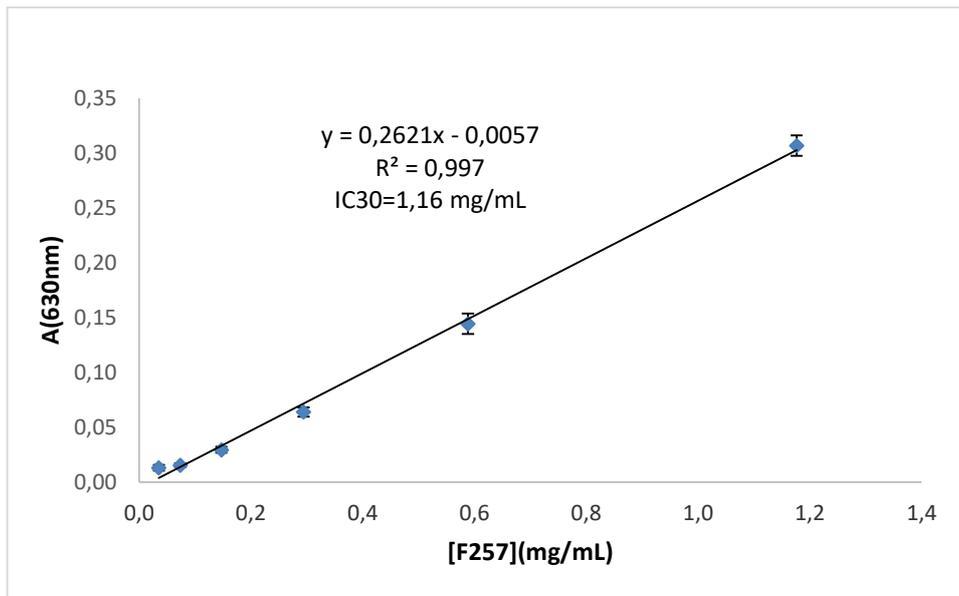


Figura 68-Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do poder redutor para o composto F257.

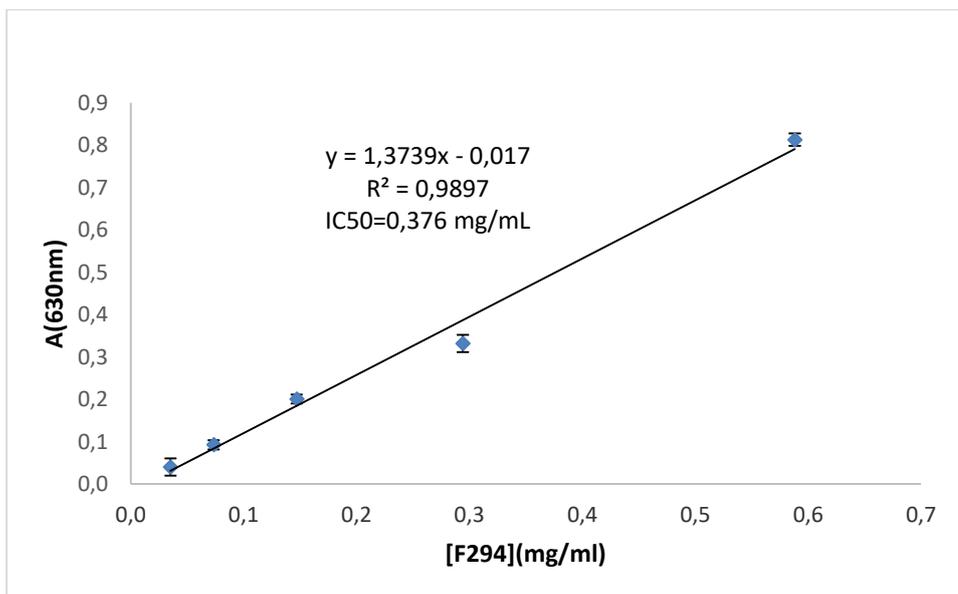


Figura 69-Representação gráfica da percentagem de inibição de oxidação pelo método do poder redutor para o composto F294.

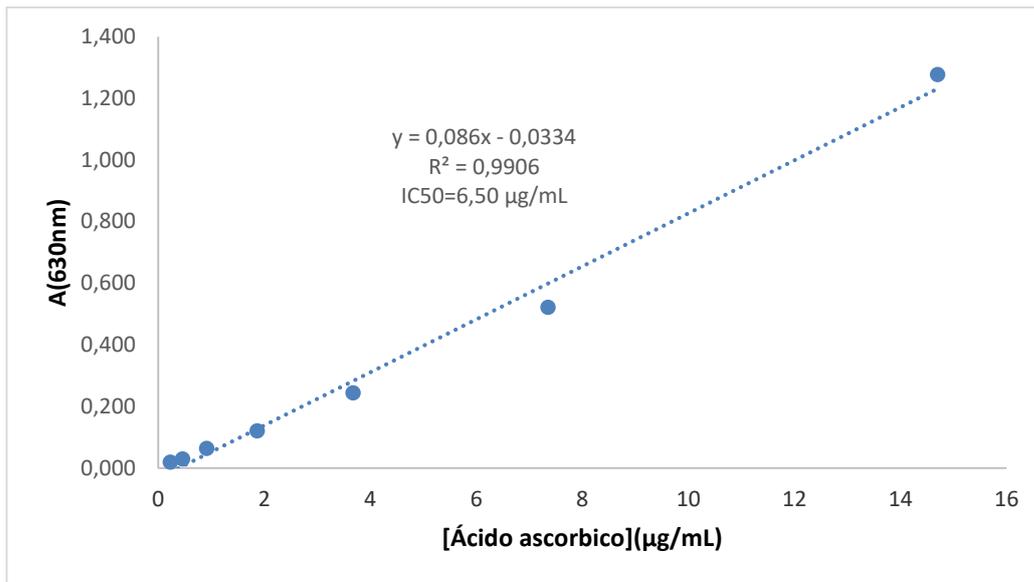


Figura 70-Curva de calibração do padrão ácido ascórbico pelo método do poder redutor.

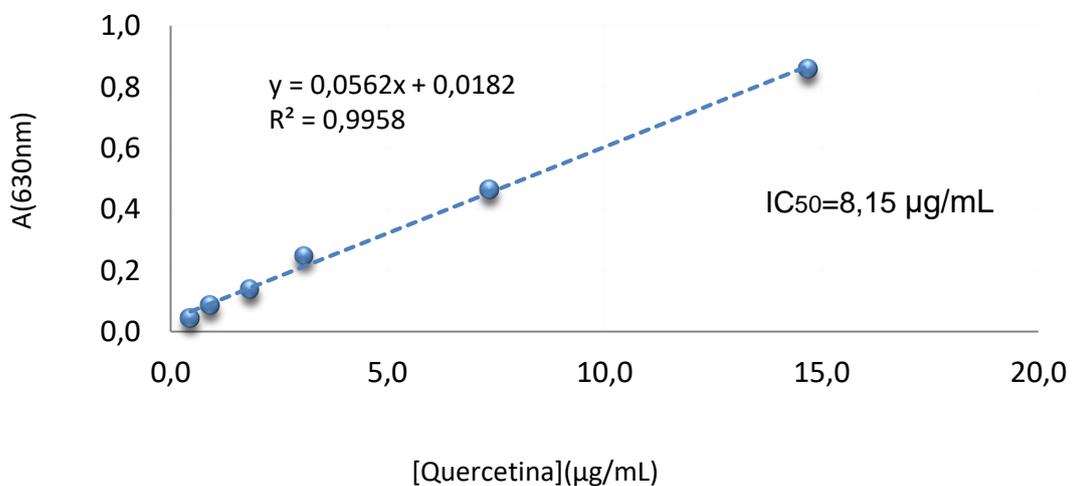


Figura 71- Curva de calibração do padrão quercetina pelo método do poder redutor.

II. Avaliação das atividades anti-inflamatórias

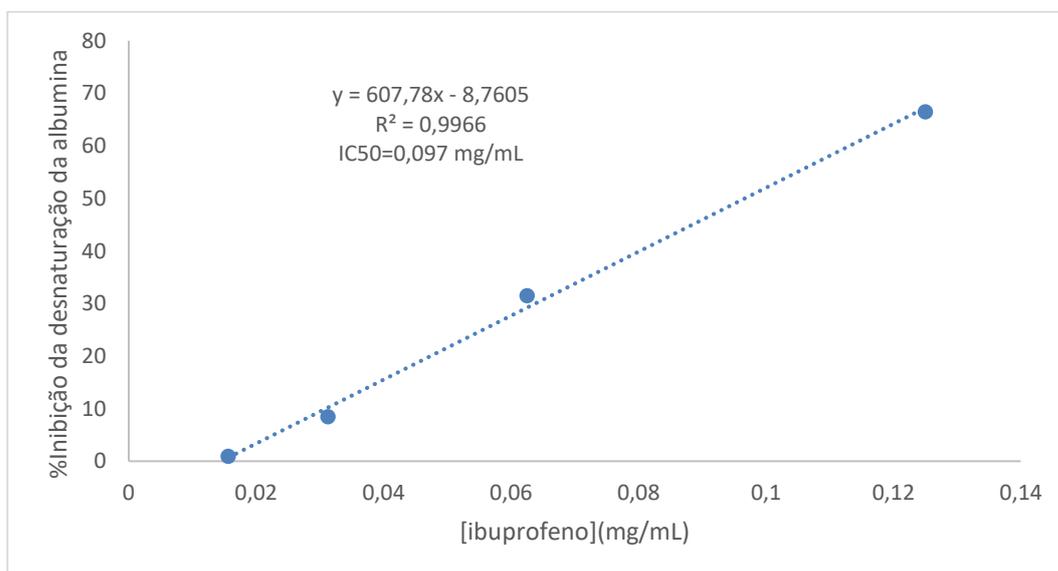


Figura 72- Curva de calibração do padrão ibuprofeno pelo método da inibição da desnaturação da albumina.

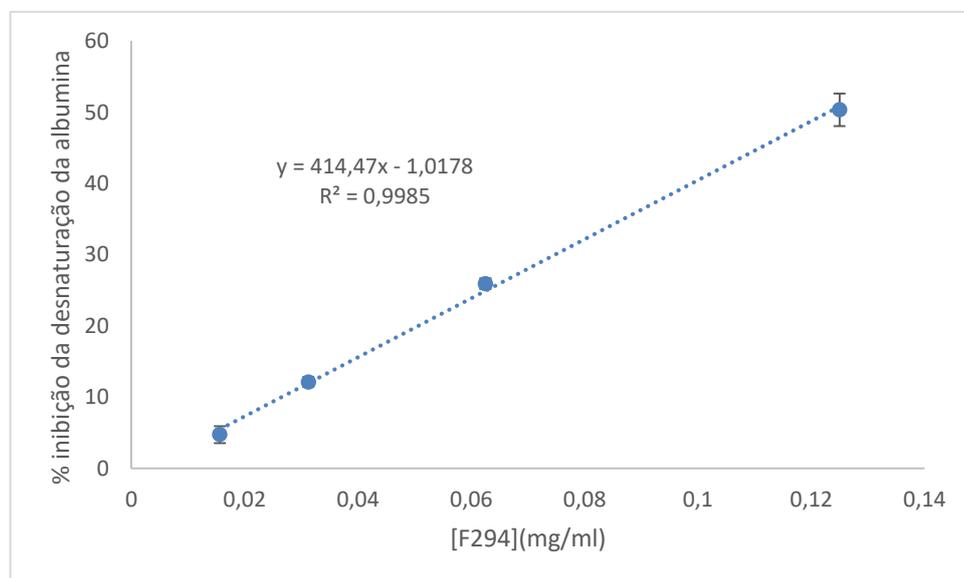


Figura 73- Curva de calibração do composto F294 para o método da inibição da desnaturação da albumina

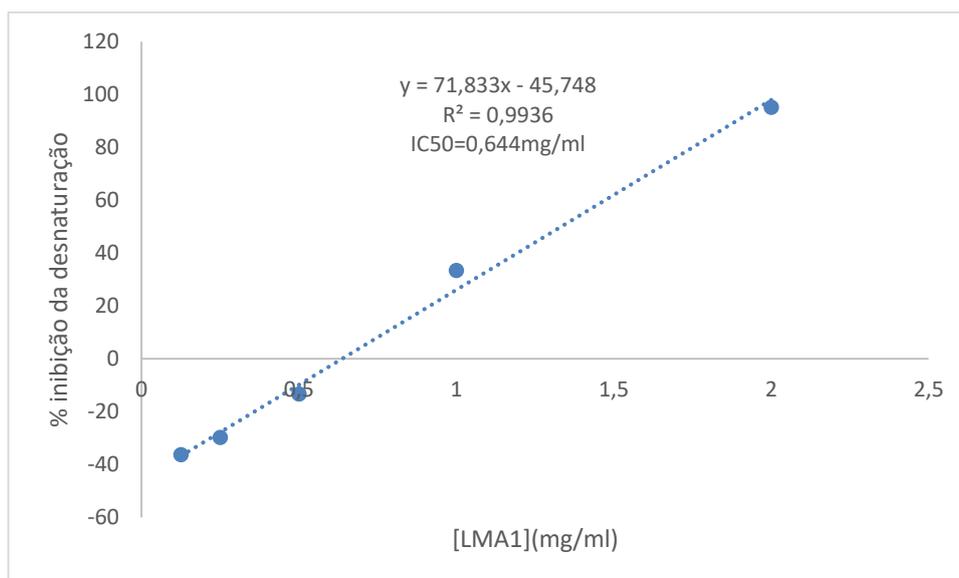


Figura 74-Curva de calibração do composto LMA1 para o método da inibição da desnaturação da albumina